図書室
収受
50.12.12
東京都立衛生研究所

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

26-1

1975

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

刊行に当って

1974年（昭和49年）に終了した研究および同年中に他の専門誌に発表した論文の抄録をここにまとめて報告することにしました．乏しい研究費をやりくりしながら行った研究の成果であります．

衛生研究所で行う調査研究には，公衆衛生の発展推進に関する応用研究，公衆衛生に関係のある科学分野の基礎的研究，衛生行政上実施する試験検査に関連して行ういわゆる関連研究および試験検査方法の開発改善に関する研究等があり，かなり広範にわたるものであります．いずれにしても，ここで行う調査研究は，人の，地域住民の生命と健康を守ることに目標が置かれなければならないと思います．この研究報告をご覧になれば，衛生研究所の使命から発するユニークな動きを感じていただけると思います．

研究業績も年々増加し，昨年はついに740頁をこえましたが，これだけの論文を一冊に収めることは，この種の報告書としては限界であると思います．そこで，1975年発行のこの研究年報は26-1号と26-2号の2冊に分けることにしました．そして，26-1号には微生物学，衛生化学，環境衛生，環境医学等に関する論文を，26-2号には当所毒性部で実施した研究の結果をまとめた諸論文を載せることにしました．今後もこの体裁をつづけていくことになりましょう．

本研究年報に忌憚ない御意見または御批判をいただければ誠に幸いであります．

1975年8月20日

東京都立衛生研究所長　辺野喜　正　夫

目　　次

報　　文

黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別簡易法とその応用……潮田弘，寺山武，坂井千三，善養寺浩…… 1
Yersinia enterocolitica の再分類と種の規定に関する提案……丸山務，柳川義勢，坂井千三，善養寺浩…… 7
東京都内の中川流域で発生したカモのボツリヌス中毒に関する疫学的ならびに細菌学的検討
……坂井千三，伊藤武，岡沢久美子，善養寺浩，辺野喜正夫……14
ヒト・市販食品およびと場汚染水由来の *Salmonella typhimurium* の生物型とファージ型について
……伊藤武，津野正朗，坂井千三，善養寺浩，大橋誠……20
患者由来腸炎ビブリオの血清型別および新K抗原型の提案
……工藤泰雄，太田建爾，斎藤香彦，松下秀，坂井千三，善養寺浩……25
本邦食品の糸状菌汚染に関する研究　東京における市販ゴマ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……30
酵素製剤中の残留ストレプトマイシンの検出同定方法の検討ならびに，それを応用した市販製剤中のストレプトマイシンの検査成績……加納堯子，村田以和夫，大久保暢夫……36
小笠原父島住民の広東住血線虫感染症の疫学調査
……加納堯子，村田以和夫，門野義雄，大久保暢夫，浅沼邦広……42
1974年度に分離されたA群溶連菌の薬剤感受性と菌型について
……浅野洋子，柏木義勝，柴田実，徳江シゲ子，大久保暢夫……47
梅毒ＴＰ感作血球凝集反応（ＴＰＨＡ）の自動化によ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……53
1974年春以降東京都に発生したかぜ疾患の病因に関するウイルス学的研究
……矢野一好，柳澤靖子，伊藤忠彦，藪内清，岩崎謙二……59
1974年８月から1975年３月における東京都民の風疹の血清疫学的研究……柳澤靖子，岩崎謙二，柳下徳雄……64
1968～75年に分離したＡホンコン型インフルエンザウイルス株の抗原分析に関する研究
……岩崎謙二，藪内清，伊藤忠彦，柳澤靖子，矢野一好……69
1974年度東京都の日本脳炎の疫学的調査
……柳澤靖子，藪内清，伊藤忠彦，岩崎謙二，木下正彦，永野清一郎，加藤孝雄……73
腸内ウイルス感染の実態は握に関する研究（第７報）　1974年の東京都内３下水処理場下水からのウイルス分離成績……矢野一好，藪内清，岩崎謙二，辺野喜正夫……77
1968～1974年における東京都民の日本脳炎ウイルスＨＩ抗体保有状況の分析……岩崎謙二……81
生薬の試験法に関する研究（Ⅵ）　蒼朮および白朮の識別法……西川洋一，瀬戸隆子，渡辺四男也……87
生薬の品質評価に関する研究（Ⅳ）ロートコンおよびその製剤の品質について
……渡辺四男也，安田一郎，瀬戸隆子，中島和雄，西川洋一……90
薬剤に対する Limulus Test の検討……下平彰男，中島和雄……93
リノール酸メチルの酸化時における酸化防止剤と synergist 有機酸の関係……松本茂，中山京子……98
白アリ防除剤中のカーバメート分析法……吉原武俊，遠山逸雄，奥本千代美，寺島潔，長嶋真知子…… 106
アルカリ分解法によるヒト臓器中のメチル水銀定量法……植田忠彦，山添律子，山野辺秀夫，戸谷哲也…… 110
セレンによるメチル水銀の毒性軽減作用（第１報）　メチル水銀およびセレン混合投与時におけるラット臓器中のメチル水銀およびセレンの含有量について
……鈴木助治，天川映子，山野辺秀夫，雨宮敬，伊藤弘一，竹内正博，江波戸挙秀，原田裕文，戸谷哲也…… 115
セレンによるメチル水銀の毒性軽減作用（第２報）　メチル水銀，セレンおよびビタミンＥ投与時におけるラット臓器中のメチル水銀ならびに総水銀含有量について
……原田裕文，伊藤弘一，江波戸挙秀，竹内正博，雨宮敬，山野辺秀夫，鈴木助治，戸谷哲也…… 123
東京都における水銀汚染の実態について（第２報）　魚介類中の水銀含有量について
……雨宮敬，竹内正博，伊藤弘一，江波戸挙秀，原田裕文，戸谷哲也…… 129
東京都におけるＰＣＢ汚染の実態について（第３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…… 134

起炎性物質に関する衛生化学的研究（第１報）　化粧品中のベルガプテンの分離定量法
……水石和子，風間成孔，中村義昭，観照雄，原田裕文，戸谷哲也…… 139
起炎性物質に関する衛生化学的研究（第２報）　ネイルエナメル皮膜中からのホルムアルデヒドの溶出
……中村義昭，風間成孔，水石和子，山添律子，原田裕文，戸谷哲也…… 146
ゴム製器具に関する衛生化学的研究（第２報）　医療用ゴム中の亜鉛の定量……西田茂一，森謙一郎…… 150
冷却生乳の細菌学的品質評価法に関する検討……松本昌雄，神保勝彦，北原康弘，村上一，春田三佐夫…… 155
加熱損傷 *S. anatum* におよぼす選択培地の影響ならびに修復について
……神保勝彦，神崎政子，松本昌雄…… 161
食品細菌検査用試料調整のためのストマッカーとホモジナイザーの機能の比較
……庭山邦子，小久保弥太郎，井草京子…… 165
ＭＰＮ法による食肉魚介加工品中の推定ウェルシュ菌数の測定
……神崎政子，神保勝彦，村上一，春田三佐夫…… 168
走査型電子顕微鏡によるべん毛，線毛の観察……前木吾市…… 172
食品中のマイコトキシンに関する研究（第６報）　市販ピーナツ類及びピーナツ製品よりアフラトキシンB_1 の検出 ……直井家寿太，小川仁志，風間栄治，斎藤和夫，観公子，井部明広，木村康夫…… 179
アーモンド中のシアンについて
……西島基弘，冠　政光，高橋尚子，上村　尚，中里光男，渡利優子，木村康夫…… 183
天然由来による食品中の安息香酸に関する研究〔Ⅱ〕　豆およびその加工品について
……西島基弘，冠政光，高橋尚子，上村尚，中里光男，渡利優子，木村康夫…… 187
食品中のフッ素の定量について（第２報）　Market-Basket Study に準拠した摂取量の評価
……友松俊夫，鈴木二郎，中沢久美子，木村康夫…… 192
魚介類中の微量元素に関する基礎的研究（第２報）　かつお体内の重金属分布
……勝木康隆，安田和男，上田工，木村康夫…… 196
魚介類への微量元素の蓄積挙動の研究（第Ⅲ報）　マグロ中の水銀およびセレンの体内分析
……田村行弘，真木俊夫，山田洋，嶋村保洋，落合節子，西垣進，木村康夫…… 200
加工食品中のリン酸塩の使用実態調査
……田村行弘，真木俊夫，山田洋，嶋村保洋，落合節子，西垣進，木村康夫…… 205
食品用洗浄剤の成分分析　(1)界面活性成分……遠藤英美，広門雅子，宇佐美博幸，半田八十三，藤居瑛…… 208
D-ソルビットの液性について ……遠藤英美，広門雅子，宇佐美博幸，藤居瑛…… 214
食品添加物中の多核芳香族炭化水素（ベンズ(a)ピレン）について　(2)流動パラフィンおよびクン液
……広門雅子，遠藤英美，宇佐美博幸，藤居瑛…… 220
ケイソウ土の成分規格について……遠藤英美，小野綾子，安野哲子，荻野周三，大畠敏子，藤居瑛…… 225
塩化ビニル樹脂製容器包装の衛生化学的研究……渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，諏訪世津子，藤居瑛…… 230
うに製品の品質検査……西田甲子，深野駿一，牛尾房雄，道口正雄，可児利朗…… 236
日本食品標準成分値の検討（Ⅰ）　アイスクリーム類および即席めん類の各栄養素成分値について
……友成正臣，塚越ヤス，古内正孝，武士俣邦雄，可児利朗…… 241
ポルフィリン代謝系成分に関する調査およびその生化学的研究（第Ⅰ報）　δ-アミノレブリン酸の尿中排泄の実態……小笠原公，武士俣邦雄，霜田さと子…… 246
ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅵ）　尿中排泄 δ-ALA，Cp および Ug の相互関係
……武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公…… 252
ポルフィリン代謝系尿中成分の統計的観察……武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公…… 259
東京都における降下煤塵及び亜硫酸ガス等の動態について
……佐藤泰仁，牧野国義，狩野文雄，大沢誠喜，福田雅夫，多田宇宏，青木実，溝口勲，野牛弘…… 265
大気中浮遊粉塵の EDX による組成分析（第１報）……佐藤泰仁，溝口勲…… 272
母体血および臍帯血中 PCB の測定……秋山和幸，藤谷和正，高橋利恵子，大井玄，野牛弘…… 277
都内興行場で集められたゴミの中のダニ，昆虫相……中田英吉，千種翠…… 280
光化学スモッグによる自覚症状の変動　素因との関連において……溝口勲…… 289
メチル水銀中毒修正因子としてのマグロ由来セレンの有効率
……関比呂伸，西垣　進，田村行弘，真木俊夫，山田洋，嶋村保洋，
今野ヒロ子，落合節子，湯目邦雄，溝口　勲，野牛　弘，大井　玄…… 294
メチル水銀中毒に対しセレンが保護的効果を示すためのいくつかの条件
……今野ヒロ子，関比呂伸，野牛弘，大井玄…… 301

メチル水銀のラット臓器別半減期の試算……野牛弘，大井玄，関比呂仲，西垣進，田村行弘…… 305
防火用貯水槽水の衛生学的研究……中村弘，斎藤庄次，高橋正博，大橋則雄，山崎堅吉，三村秀一…… 312
逆相液一液分配クロマトグラフ法による有機塩素系化合物の分析法
……小輪瀬勉，土屋悦輝，山崎堅吉，三村秀一…… 319
東京都内の工場周辺井戸水の重金属汚染調査……高橋保雄，大橋則雄，小輪瀬勉，山崎堅吉，三村秀一…… 323
パラジクロルベンゼンによる環境汚染…森田昌敏，西沢恒幸，三村秀一，大石真之，中尾順子，平賀興吾…… 329
ヘキサクロルベンゼンによる環境汚染……森田昌敏，西沢恒幸，三村秀一…… 333
都内陸水の生活環境に関する調査研究（第１報）　皇居外苑濠群の富栄養化の現状
……山崎洋子，松本浩一…… 336
Plesiomonas shigelloides の生態学的研究　1　河川水と淡水魚における本菌の分布状況
……池島伸至，新井輝義，楠淳，榊田真知子，伊藤元彦，伊藤武，坂井千三…… 343

他誌発表…… 349

CONTENTS

REPORTS

Simplified Method for the Coagulase Typing of *Staphylococcus aureus* and Its Application in Routine Works……H. Ushioda, T. Terayama, S. Sakai and H. Zen-Yoji…… 1

A Proposal on the Classification of *Yersinia enterocolitica* ……T. Maruyama, Y. Yanagawa, S. Sakai and H. Zen-Yoji…… 7

An Outbreak of Botulism in Water Fowl at the Area of the Naka River in Tokyo ……S. Sakai, T. Itoh, K. Okazawa, H. Zen-Yoji and M. Benoki……14

Biotypes and Phagetypes of *Salmonella typhimurium* isolated from Human Cases and Other Sources in Tokyo……T. Itoh, M. Tsuno, S. Sakai, H. Zen-Yoji and M. Ohashi……20

Serological Typing of Isolates of *Vibrio parahaemolyticus* from Food Poisoning Cases, and Proposal of New K Antigen Types ……Y. Kudoh, K. Ohta, K. Saitoh, S. Matsushita, S. Sakai and H. Zen-Yoji……25

Studies on Fungal Contamination of Foodstuffs in Japan : Fungal and Aflatoxin Contamination in Sesame and Its Products marketing in Tokyo ……H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and H. Zen-Yoji……30

Detection and Identification Procedures for Residual Streptomycin in Enzyme Preparation and Their Application on Commercial Products …… T. Kanoh, I. Murata and N. Ohkubo……36

Epidemiological Surveys for the Prevalence of Angiostrongyliasis among Inhabitants of Chichi-jima of the Ogasawara Islands ……T. Kanoh, I. Murata, Y. Kadono, N. Ohkubo and K. Asanuma……42

Antibiotics Sensitivities of Isolates of Group A Hemolytic Streptococci and Their Serotypes in 1974……Y. Asano, Y. Kashiwagi, M. Shibata, S. Tokue and N. Ohkubo……47

Evaluation of a Modified Automatic Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* antibodies……I. Murata, M. Hori, S. Miyazawa, T. Kanoh and N. Ohkubo……53

Virological Studies on Respiratory Disease in Tokyo in 1974 ……K. Yano, Y. Yanagisawa, T. Ito, K. Yabuuchi and K. Iwasaki……59

Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants in Tokyo, in the Period from August 1974 to March 1975……Y. Yanagisawa, K. Iwasaki and N. Yanagishita……64

Antigenic Analysis of A/Hong Kong Influenza Virus Strains isolated in 1968—1975 ……K. Iwasaki, K. Yabuuchi, T. Ito, Y. Yanagisawa and K. Yano……69

Ecological Survey of Japanese Encephalitis Virus in Tokyo in 1974 ……Y. Yanagisawa, K. Yabuuchi, T. Ito, K. Iwasaki, M. Kinoshita, S. Nagano and T. Kato……73

Epidemiological Survey on Enterovirus Infection (VII) Virus Isolation made at Three Sewage Treatment Plants in Tokyo in 1974……K. Yano, K. Yabuuchi, K. Iwasaki and M. Benoki……77

Seroepidemiological Observation on the Incidence of HI Antibodies against Japanese Encephalitis in Tokyoites in 1968—1974……K. Iwasaki……81

Studies on Examination of Crude Drugs (VI) Differentiation of *Atractylodes Lancea Rhizoma* and *Atractylodes Rhizoma* ……Y. Nishikawa, T. Seto and Y. Watanabe……87

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (IV) Quality of Scopolia Rhizome and Its Preparations ……Y. Watanabe, I. Yasuda, T. Seto, K. Nakajima and Y. Nishikawa……90

Evaluation of Limulus Test for Drugs……A. Shimohira and K. Nakajima……93

The Relationship between Antioxidants and Synergistic Organic Acids at the Oxidation of Methyl Linoleate……S. Matsumoto and K. Nakayama……98

Analytical Method for Carbamate Insecticides in Termicide ……T. Yoshihara, I. Toyama, C. Okumoto, K. Terashima and M. Nagashima…… 106

Determination of Methylmercury in Human Organs by Alkaline Digestion Method ……T. Ueta, R. Yamazoe, H. Yamanobe and T. Totani…… 110

Effect of Selenium on the Toxicity of Methylmercury (I) Methylmercury and Selenium Concentrations of Organs in Rats administered Methylmercury and Selenium ……S. Suzuki, E. Amakawa, H. Yamanobe, T. Amemiya, K. Ito, M. Takeuchi, K. Ebato, H. Harada and T. Totani…… 115

Effect of Selenium on the Toxicity of Methylmercury (Ⅱ) Methylmercury and Total Mercury Concentrations of Organs in Rats administered Methylmercury, Selenium and Vitamin E
H. Harada, K. Ito, K. Ebato, M. Takeuchi, T. Amemiya, H. Yamanobe, S. Suzuki and T. Totani…… 123
Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (Ⅱ) Mercury Content of Fish and Shellfish
……T. Amemiya, M. Takeuchi, K. Ito, K. Ebato, H. Harada and T. Totani…… 129
Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (Ⅲ) Polychlorinated Biphenyls Content of Foods ……H. Yamanobe, E. Amakawa, S. Suzuki, S. Koizumi and T. Totani…… 134
Hygienic Chemical Studies on Irritants (Ⅰ) Quantitative Determination of Bergapten in Cosmetics ……K. Mizuishi, M. Kazama, Y. Nakamura, T. Kan, H. Harada and T. Totani…… 139
Hygienic Chemical Studies on Irritants (Ⅱ) Elution of Formaldehyde from Film of Nail Enamels……Y. Nakamura, M. Kazama, K. Mizuishi, R. Yamazoe, H. Harada and T. Totani…… 146
Hygienic Chemical Studies on Rubber Devices (Ⅱ) Determination of Total Zinc in Rubber for Medical Supplies …… S. Nishida and K. Mori…… 150
Studies on Assessment of the Bacterial Quality of Cooled Raw Milk
……M. Matsumoto, K. Jinbo, Y. Kitahara, H. Murakami and M. Haruta…… 155
Effects of Selective Plating Media on the Growth of Heat-Injured *Salmonella anatum* and Its Resuscitation……K. Jinbo, M. Kanzaki and M. Matsumoto…… 161
Comparative Evaluation of Suspending Ability of the Stomacher and of the Homogenizer for the Preparation of Bacteriological Food Specimens…K. Niwayama, Y. Kokubo and K. Igusa…… 165
Enumeration of Presumptive *Cl. perfringens* in Meat and Fish Products by the Use of Most Probable Number Technique……M. Kanzaki, K. Jinbo, H. Murakami and M. Haruta…… 168
Scanning Electron Microscopic Observation for Flagella and Fimbriae of *Enterobacteriaceae*
……G. Maeki…… 172
Studies on Mycotoxins in Foods (Ⅵ) Detection of Aflatoxins in Peanut and Its Products
……Y. Naoi, H. Ogawa, E. Kazama, K. Saito, K. Kan, A. Ibe and Y. Kimura…… 179
Survey of Cyanide in Almond
……M. Nishijima, M. Kanmuri, S. Takahashi, H. Kamimura, M. Nakazato, Y. Watari and Y. Kimura…… 183
Studies on Naturally Derived Benzoic Acid in Food (Ⅱ) Detection from Beans and Their Products……M. Nishijima, M. Kanmuri, S. Takahashi, H. Kamimura, M. Nakazato, Y. Watari and Y. Kimura…… 187
Determination of Fluorine in Foods (Ⅱ) Estimation of Fluorine Intake based on the Market-Basket Study ……T. Tomomatsu, J. Suzuki, K. Nakazawa and Y. Kimura…… 192
Study on Amounts of Trace Elements in Marine Fishes (Ⅱ) Distribution of Heavy Metals in Bonito Tissue ……Y. Katsuki, K. Yasuda, K. Ueda and Y. Kimura…… 196
Studies on the Behaviour of Accumulation of Trace Elements in Fishes (Ⅲ) Accumulation of Selenium and Mercury in Various Tissues of Tuna
……Y. Tamura, T. Maki, H. Yamada, Y. Shimamura, S. Ochiai, S. Nishigaki and Y. Kimura…… 200
Survey on the Actual Conditions of Phosphorate in the Processed Foods
……Y. Tamura, T. Maki, H. Yamada, Y. Shimamura, S. Ochiai, S. Nishigaki and Y. Kimura…… 205
Analysis of the Synthetic Detergent for Kitchen (1) Surface Active Agent
…… F. Endo, M. Hirokado, H. Usami, Y. Handa and T. Fujii…… 208
Study on the pH Value of D-Sorbite……F. Endo, M. Hirokado, H. Usami and T. Fujii…… 214
Survey for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (Benzo (*a*) pyrene) in Food Additives (2) Liquid Paraffin and Liquid Smoke Flavor
……M. Hirokado, F. Endo, H. Usami and T. Fujii…… 220
Studies on the Japanese Standard of Diatomaceous Earth
……F. Endo, A. Ono, T. Yasuno, S. Ogino, T. Ohata and T. Fujii…… 225
Hygienic Chemical Studies on Polyvinylchloride Container-Package
……Y. Watanabe, K. Sato, R. Yoshida, S. Suwa and T. Fujii…… 230
Quality of the Paste of Seasoned Sea Urchin Eggs
……K. Nishida, S. Fukano, F. Ushio, M. Doguchi and T. Kani…… 236

Investigation on the Standard Tables of Food Composition in Japan (I) The Nutritive Composition of Ice Cream and Sokuseki-Men
.....M. Tomonari, Y. Tsukagoshi, M. Furuuchi, K. Bushimata and T. Kani..... 241
Investigations and Biochemical Studies on the Porphyrin Metabolites (I) The Actual State of Urinary δ-Aminolevulinic Acid Excretion in Tokyoites
.....K. Ogasawara, K. Bushimata and S. Shimoda..... 246
Biochemical Studies on the Porphyrins (VI) Mutual Relationship of Urinary Output δ-ALA, Cp and Ug .....K. Bushimata, S. Shimoda and K. Ogasawara..... 252
Statistical Observations on the Porphyrin Metabolites in Urine
.....K. Bushimata, S. Shimoda and K. Ogasawara..... 259
Changes Noted in the Amount of Falldust and Sulfurous Acid Gas in Tokyo Area
.....Y. Sato, K. Makino, F. Kano, M. Osawa, M. Fukuda, T. Tada, M. Aoki, I. Mizoguchi and H. Yagyu 265
Component Analysis of Suspended Particulate Matters in Atmosphere by EDX (I)
.....Y. Sato and I. Mizoguchi..... 272
Polychlorinated Biphenyl Residues in Maternal and Cord Blood
.....K. Akiyama, K. Fujitani, R. Takahashi, G. Ohi and H. Yagyu..... 277
Mite and Insect Fauna in Dusts collected from Seats and Floors of Theaters in Tokyo
.....E. Nakada and M. Chigusa..... 280
Changes of Subjective Signs caused by Photochemical Smog A Study Concerning Predisposition of Students.....I. Mizoguchi..... 289
Effectiveness of Selenium in Tuna Meat in Modifying Methylmercury Toxicity
.....H. Seki, S. Nishigaki, Y. Tamura, T. Maki, H. Yamada, Y. Shimamura, H. Konno, S. Ochiai, K. Yunome, I. Mizoguchi, H. Yagyu and G. Ohi..... 294
Protective Effect of Selenite against Methylmercury Toxicity: Observation Concerning Time, Dose and Route Factors in the Development of Methylmercury Poisoning
.....H. Konno, H. Seki, H. Yagyu and G. Ohi..... 301
Biological Half Lives of Methylmercury in the Organ Compartments of a Rat
.....H. Yagyu, G. Ohi, H. Seki, S. Nishigaki and Y. Tamura..... 305
Hygienic Studies on the Water of Fire Cisterns
.....H. Nakamura, S. Saito, M. Takahashi, N. Ohashi, K. Yamazaki and S. Mimura..... 312
Analysis of Chlorinated Biphenyls (PCBs) and Chlorinated Pesticides in Water by Reversed Liquid-Liquid Partition Chromatography
.....T. Kowase, Y. Tsuchiya, K. Yamazaki and S. Mimura..... 319
Heavy Metal Pollution of Well Water in Tokyo Metropolitan Area
.....Y. Takahashi, N. Ohashi, T. Kowase, K. Yamazaki and S. Mimura..... 323
Environmental Pollution by Paradichlorobenzene
.....M. Morita, T. Nishizawa, S. Mimura, S. Oishi, T. Nakao and K. Hiraga..... 329
Environmental Pollution by Hexachlorobenzene.....M. Morita, T. Nishizawa and S. Mimura..... 333
Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (I) Eutrophication of a Group of the Moats around the Imperial Palace..... Y. Yamazaki and K. Matsumoto..... 336
Ecological Surveys of *Plesiomonas shigelloides* (1) Isolation from River Water and Fresh Water Fish
.....N. Ikejima, T. Arai, J. Kusunoki, M. Sakakita, M. Itoh, T. Itoh and S. Sakai..... 343
SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 349

報　　文

REPORTS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 1—6, 1975

黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別簡易法とその応用

潮田 弘* 寺山 武* 坂井千三*
善養寺 浩*

Simplified Method for the Coagulase Typing of *Staphylococcus aureus* and Its Application in Routine Works

HIROSHI USHIODA*, TAKESHI TERAYAMA*, SENZO SAKAI*
and HIROSHI ZEN-YOJI*

The coagulase typing developed by Zen-Yoji *et al* was a reliable method for the typing of *Staphylococcus aureus* and had been applied routinely in our laboratory. However, since the original method was complicative in procedure, we made an attempt to simplify the typing and established an improved method. The procedure is as follows.

A single colony or a culture suspected as *S. aureus* is inoculated into a small test tube containing a 3 ml of Brain Heart Infusion broth with rabbit plasma in a concentration of 5%(plasma broth), and then the tube is allowed to stand over-night at 37C, followed by the observation of coagulase reaction.

When the plasma broth is coagulated by an inoculum, the coagulated culture is used as test antigen for coagulase typing after it is broken and homogenized by pipetting several times. To determine the type of organism, 0.1 ml of the homogenized test antigen is delivered to 8 test tubes as shown in the figure 2, and then 0.1 ml of anticoagulase typing sera, I-VII, with 4 units is added into 7 tubes respectively; 0.1 ml of diluent with 5% rabbit serum is poured into the 8th tube, which is used as a control. After they are mixed and then incubated at 37C for 1 hour, each 0.2 ml of 10% rabbit plasma is added to all tubes, and then the tubes are allowed again to stand in a 37C incubator for reaction.

Results are read at the end of incubation periods for 1, 2, 4, 6, 24 and 48 hours. The determination of coagulase type of the test organism is made on the basis of the inhibition of plasma coagulation.

Merits of the simplified method in comparison with the original one are the abbreviation of centrifugation for preparing the antigen solution and of titration of coagulase activity, and the saving of time spending for performance of the procedure.

緒　言

ブドウ球菌感染症の病院内感染源の追究をはじめとして，食中毒の疫学，食品衛生の環境汚染調査など広く，黄色ブドウ球菌（以下黄色ブ菌と略す）の簡便な型別法が要求されている．しかし，これまで報告された本菌の型別法はいずれも操作が繁雑であり，型別率が低いなどの点から，それほど普及するまでにいたっていない．世界的によく知られているファージ型別法[1]や簡易なはずの血清型別法[2-5]にしても，前述の理由の外に，ファージの供給や型別用血清の作製が困難であるなどの理由で，需要は多いにもかかわらず，現在は特定の研究機関においてのみ実施されているにすぎない．一方，私どもがこれまで報告してきたコアグラーゼ型別法[6-9]は黄色ブ菌をほぼ100%型別することができた．しかし，操作が稍々繁雑であり，多量の器材が必要であること，所要時間が長いこと，そして，型別用抗コアグラーゼ血清の作製法が困難であることなどの欠点があった．最近，コアグラーゼ型別用抗血清が市販（東芝化学製）されるようになったのを機会に，この型別法の改善を進めてきた結果，ほぼ満足すべき方法が確立されたので，その方法および改善点について報告する。

実験材料および方法

I　コアグラーゼ型別簡易法

1. 材料

i) 型別用抗コアグラーゼ血清：型別用抗血清は，黄色ブ菌のコアグラーゼ型標準株の培養上清を濃縮して得

* 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

たコアグラーゼを抗原としてウサギを免疫して作製した[6-9]また，参考として最近市販された抗コアグラーゼ型別血清（東芝化学製）も併用した．

コアグラーゼ型はこれまでⅠ～Ⅷ型に分けられているが[10]，VIII型菌は極めてまれにしか検出されないので，以下Ⅰ～Ⅶ型について述べる．

ii）健康ウサギ血清および血漿：常法により採血，分離した健康ウサギ血清および3.8％クエン酸ナトリウムを用いて採血して得た健康ウサギ血漿を用いた．

iii）コアグラーゼ希釈液：コアグラーゼ抗原液の希釈ならびに抗血清，健康ウサギ血清および血漿などの希釈は，つぎの希釈液を用いた．組成　ポリペプトン　20.0 g，クエン酸ナトリウム　10.0 g，塩化ナトリウム 8.5 g，窒化ナトリウム 0.5 g，チメロサール 0.1 g，精製水1,000 m*l*.

iv）被検菌のコアグラーゼ抗原液：健康ウサギ血漿を5％に添加したBHI broth（Difco）（以下P.B brothと略す）を小試験管（1.2cm×10.5cm）に3 m*l* 分注したものを用意し，これに，3％卵黄加マンニット食塩カンテン平板（MSEY）[11]上の黄色ブ菌と疑われる集落を，あるいは純培養の黄色ブ菌を接種し，37°，20～24時間（以下hと略す）静置培養を行なった．黄色ブ菌であれば，コアグラーゼの産生により血漿凝固が起る．この凝固したP.B brothをつぎのようにして抗原液として用いた．すなわち，1 m*l* ピペットをつっ込み，かきまわすとフィブリンがピペットの先端にまきついてくる，これをとりだすとほとんど透明な液が得られる．あるいは口径の比較的大きなピペットで強く攪拌し，フィブリンを細かく砕いたものをコアグラーゼ抗原液とした．

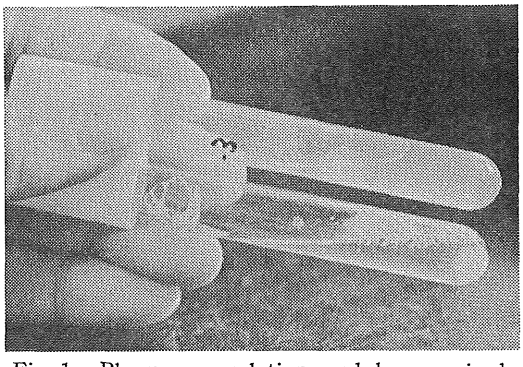
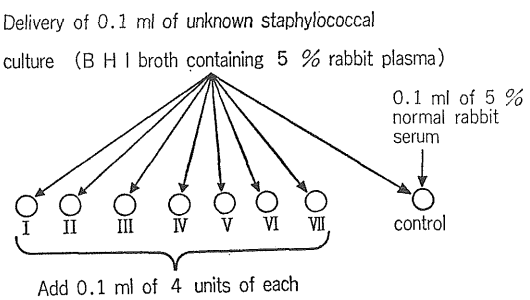


Fig. 1. Plasma coagulation and homogenized coagulase antigen. The upper tube shows the plasma coagulation, and the lower one shows an antigen solution after the coagulant is homogenized by pipetting.

(Fig. 1. 写真参照)

2. 型別本試験

i）中和反応：前記1の iv）で作製した被検菌のコアグラーゼ抗原液を Fig. 2. に示したごとく，8本の小



Incubate at 37 C for 60 min.

Add 0.2 m*l* of 10% normal rabbit plasma

Incubate at 37 C for 1,2,4,6,24 and 48 hours

Reading is made at the end of each incubation periods

Fig. 2. Procedure of simplified method for coagulase typing of *S. aureus*.

試験管に各々 0.1 m*l* ずつ分注する．ついで4単位（1 MCD／1 h のコアグラーゼ活性を中和する抗体を1単位とし，その4倍濃度の抗血清）[6]のⅠ～Ⅶ型の抗コアグラーゼ血清をそれぞれ 0.1 m*l* ずつ，7本の試験管に注加する．残りの1本の試験管には対照として，健康ウサギ血清の20倍希釈液を 0.1 m*l* 注加し，よく振盪混和する．37° に1 h 静置し，被検菌のコアグラーゼ抗原と抗コアグラーゼ血清との中和反応を起させる．その後に10％健康ウサギ血漿液 0.2 m*l* を8本の試験管全てに注加し，よく振盪混和後，再び37°に保ち，1 h，2 h，4 h，6 h，24 h および 48 h 後に，血漿凝固の有無を観察する．抗コアグラーゼ血清をはじめとして，血清，血漿ともに殺菌剤，防腐剤の入った希釈液を用いているので，型別には無菌操作を要しない．

ii）型判定法：血漿液を加えてから，時間を追って血漿凝固の発現を観察する．まず，正常血清を加えた第8本目の対照管をもち上げ，液がこぼれないようにゆっくり傾けてゆく．完全に凝固が起っているならば，ゼリー状の塊が試験管の底にくっついているか，はなれてゆっくり動き出す．凝固の度合は Fig. 3 に示したごとく，コアグラーゼ活性の強弱により何段階か認められる．対照に凝固が現われると，他の7本にも凝固が起ってくるが，中の1本の血漿凝固が阻止されているはずである．

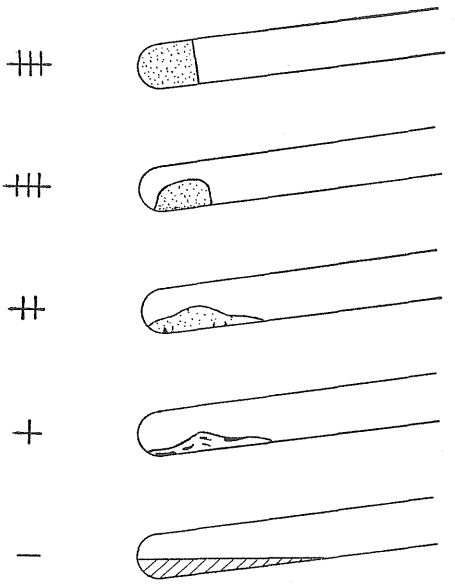


Fig. 3. Remarks of coagulation degree

その管に注加された抗コアグラーゼ血清の型が，被検菌のコアグラーゼ型である．

なお，対照管に凝固が認められ，7本の本試験管の凝固観察に当り，ある時間帯では，2本あるいは3本の試験管で凝固が生じない場合がある．その時点で，例えばⅠ・Ⅱ型あるいはⅡ・Ⅲ型のように複合型として判定することなく，さらに反応時間を延長し，1つの型血清のみに凝固の阻止されるまで経時的に観察を行ない，凝固が阻止された管の血清型をもって，そのコアグラーゼ型と決定する．

Ⅱ コアグラーゼ型別原法

型別原法の器具器材および実験方法は既報によった．[6-9]

Ⅲ 供試菌株

1. 臨床由来株：ヒトの化膿巣由来黄色ブ菌100株である．

2. 食中毒由来株：ウグイス豆を原因食として1971年5月都内および神奈川県に発生した食中毒事件の各種材料から検出された黄色ブ菌50株である．

3. 食品由来株：市販食品から検出された黄色ブ菌50株であり，1食品1菌株である．

成　績

Ⅰ 改良簡易型別法の利点

1. 簡易法と原法との所要日数比較：分離平板上の黄色ブ菌と疑われる集落のコアグラーゼ試験を出発として，コアグラーゼ型別試験の最終判定までの所要時間と検査過程の比較を Fig. 4 に示した．原法では同定のための

Day	Simplified method	Original method
First	Coagulase test in tube | Preparation of typing antigen | 37° for over-night	Coagulase test in tube | 37° over-night Preparation of typing antigen
Second	Procedure for coagulase typing	| 37° for 3-5 days
Third	Observation of plasma coagulation	Supernatant is obtained by centrifugation
4th	Final dicision of type	Titration of coagulase activity of supernatant
5th		Procedure for coagulase typing
6th		Observation of plasma coagulation
7th		Final decision of type
8th		

Fig. 4. Comparative schedule between simplified and original methods for coagulase typing.

コアグラーゼ試験で1日を要し，さらに抗原作製のために3～5日間の BHI broth 培養，ついで遠沈による上清分離，さらにコアグラーゼ力価の測定と，型別用抗原作製までに最低5日間を必要とした．これに比較し，簡易法では同定のためのコアグラーゼ試験と抗原作製を兼ねて，P.B broth 培養が20～24hでよく，4日間以上の日時の短縮が可能となった．

2.遠沈操作およびコアグラーゼ力価測定操作の省略：原法の BHI broh 培養での濃厚な菌の浮遊状態では，クランピングファクターの影響により，力価測定や型別本試験の血漿凝固の判定が困難であること，また菌浮遊のままでは，コアグラーゼ力価の低下が早いことなどのために，菌体を除く必要があった．力価測定の省略については後の項で，成績をもとに詳しく述べるが，原法による抗原調製のための培養では，個々の菌株のコアグラーゼ力価の高低が著しかったものが，P.B broth 培養により全体に高くなり，原法で3～5日の BHI broth 培養で極端に高い力価を示したものは，P.B broth 培養が20～24hという短い時間のためにある程度の力価におさえられた．また，原法ではコアグラーゼ力価の低いものが，P.B broth 中の血漿の存在により，コアグラーゼ産生が助長され，よく産生するようになるなど，供試菌株は全体的に，平均したコアグラーゼ力価を示し，力価の測定操作を省略しても，型別に何ら影響を来たさなかった．

Ⅱ 簡易法および原法による型別成績

1.臨床材料由来株の簡易法による型別成績：臨床由来株100株の簡易法による型別成績を Table 1 に示した．供試菌株の型判定時間（凝固観察時間）と型別された菌株数との関係をみると，判定時間2hで4株，4hで54株（54%），24hでは90%が型別され，残り10株は48hまでに型別された．型別率は100%であった．

2.食中毒由来株の簡易法と原法による型別成績：食中毒由来株50株の両型別法による型別成績を Table 2 に示した．この事件はウグイス豆を原因食として発生した例で，原因菌のコアグラーゼ型はⅥ型であった．なお，本例は汚染源が同一と考えられるので，同一菌型の株では当然コアグラーゼ力価もほぼ同じであろうと考えられた．推定通り，簡易法による型判定時間は1株を残し，2hで49株（98%）が型別され，平均したコアグラーゼ力価を示した．これに比較し，原法では型決定時間に少しのずれが認められた．既報[6-9]で述べてきたごとく，原法での被検菌のコアグラーゼ抗原力価は原則として，1MCD／1h（Minimum Clotting Dose：1hに血漿を凝固させる最少コアグラーゼ量）[6]を型別に使用することになっているが，本例では1MCD／1hの力価を示す菌株は認められなかったので，1MCD／6hのものまでを型別に用いた．その結果，2hでは10株，4hで39株と各菌株間にコアグラーゼ力価のわずかな差異が認められた．なお，両法で6h目に型決定された1株は，本事件の原因菌ではないと考えられたコアグラーゼⅢ型菌である．型別率は両法とも100%であった．

3.食品由来株の簡易法と原法による型別成績：食品由来株50株（1食品1菌株）の型別成績を Table 3 に示した．無作意に抽出された市販食品由来黄色ブ菌50株のコアグラーゼ力価は個々に異なり，前記食中毒由来株とは

Table 1. Coagulase typing of isolates of *S. aureus* from clinical specimens by simplified method.

No. of tested	Incubation period	No. of typed	No. of accumlated
100	1 hour	0／100	
	2	4／100	4
	4	50／100	54
	6	14／100	68
	24	22／100	90
	48	10／100	100

Table 2. Comparison of results of coagulase typing of isolates of *S. aureus* from an outbreak of staphylococcal food poisoning by simplified and original methods.

No. of tested	Incubation period	Simplified method		Original method	
		No. of typed	No. of accumulated	No. of typed	No. of accumulated
50	1 hour	0／50		0／50	
	2	49／50	49	10／50	10
	4	0／50	49	39／50	49
	6	1／50	50	1／50	50

Table 3. Comparison of results of coagulase typing of isolates of *S. aureus* from commercial food by simplified and original methods.

No. of tested	Incubation period	Simplified method		Original method	
		No. of typed	No. of accumulated	No. of typed	No. of typed
50	1 hour	0／50		0／50	
	2	1／50	1	0／50	
	4	12／50	13	0／50	
	6	5／50	18	2／50	2
	24	21／50	39	33／50	35
	48	11／50	50		

型決定時間のばらつきなど，明らかに違いがみられた．簡易法では2hから型別され，4hで13株，6hで18株24h39株（78%），48hでは50株のすべてが型別された．

原法では，前の例でも述べたごとく，型別用コアグラーゼ抗原の力価は1MCD／1hを原則とするが，抗原力価の最低値を2MCD／24hと定めてきた．しかしながら，この例では力価測定の結果，50株中1MCD／1h力価を示すものは認められず，1MCD／6h値を示した2株が，最も高いコアグラーゼ力価であった．残りの48株のうち，33株が2MCD／24h値を示し，15株はそれ以下の力価であった．15株のコアグラーゼ産生能の弱い株については原法では型別不可能とし，これらの株は陳旧培養などを行ない，血漿平板を用いてcolony selectionを行ない，コアグラーゼ産生能の強いものを選び出した．くり返しのcolony selection操作により最終的には100%の型別率であるが，この時点での型別率は50株中35株（70%）であるのに対して，簡易法では48hの最終判定で，100%の型別率であった．

考　察

黄色ブ菌はヒトの鼻前庭や腸管内に保菌されているばかりでなく，食品や自然界，動物などを含めて分布は広く，そうした菌が何らかの機会に，各種の化膿性疾患や食中毒発生の原因となるものと考えられる．多様な疾患の原因菌である黄色ブ菌の感染源，汚染源の追跡には，分離菌の型別が必要とされるが，日常検査の中に取り入れられていないのが現状である．黄色ブ菌の型別法としては，凝集反応による型別法がCowan,[2] Oeding,[3] 秋山,[4] Pillet[5]などにより報告されているが，抗血清の作製が繁雑なため普及していない．これに対して，ファージ型別法[1]は世界的に普及しているが，やはり手技が繁雑であり，さらに菌株の由来によって著しく型別率に差が認められる．私どもが食中毒事件の汚染源追跡法として，分離菌の型別にこの方法を用いた場合，型別不能株が70%に達することもまれではなく，また，健康人の鼻前庭およびふん便由来株の場合も非常に型別率が低かった．由来による型別率の違いは何に原因するのか明らかでないが，このように型別率が極めて低いことはファージ型別法の応用面での限界があるものと考える．

これに対して，私どもの報告してきたコアグラーゼ型別法は黄色ブ菌をほぼ100%型別することができ，由来による型別率の差異は認められない．しかしながら，これまでに報告してきたコアグラーゼ型別原法では，型別可能なコアグラーゼ力価を有しない株については，血漿平板などを用いて，colony selectionの操作を行なわなければならないものが，自然界由来株，ふん便由来株などに10～20%存在することは否めない事実であった．

本報の簡易法では，コアグラーゼ力価の低いこれらの株の問題も，ほぼ解決された．つまり，被検菌のコアグラーゼ抗原作製用として用いたP．B broth培養は，Altenbernの報告[12]にもあるごとく，血漿の存在によって，コアグラーゼ産生が助長され，原法のBHI broth培養法では極めて低い力価を示した株が，P．B brothでは型別可能な量のコアグラーゼを産生した．このため原法では力価の低かったものは高くなり，高かったものは逆に培養時間の短縮によって力価がそれほど高くならず，全体に型別可能な範囲の力価を示し，コアグラーゼ力価の測定にかわって経時的に観察することによって，型別が可能となった．

コアグラーゼ力価の上昇は，血漿の添加量と関係あるが，高濃度（10%以上）に添加されても無制限に高い力価を示すものではなく，血漿凝固が堅く，以後の操作がより不便になるのみであった．また，低濃度（3%以下）では力価が低く，血漿凝固があまり軟弱なため，コアグ

ラーゼ産生の有無の判定が困難となるなどのため，前述のごとく5％の血漿添加が適量であった．今回報告した簡易法はコアグラーゼ試験と抗原作製用BHI brothでの培養という二度の手数をP.B brothの培養一回に切換えられた点および遠沈操作の省略と合せて，コアグラーゼ力価の測定操作の省略が可能となった．このことは器具，器材の節約はもとより，実験操作が極めて簡易化されたので，本法はブドウ球菌型別法として広く応用されるものと考える．

結　論

黄色ブ菌の型別，分類法としてのコアグラーゼ型別法を報告してきたが，これまでの方法（原法）には，型別用抗コアグラーゼ血清が供給（市販）されるにしても，日数がかかる，器材が多量にいる，操作が繁雑であるなどの問題点があった．そこで，これらの点の改善を計り簡易法を確立した．

被検菌のコアグラーゼ抗原作製には5％にウサギ血漿を加えたBHI broth (P. B broth) に菌を接種し，37° 1夜培養後，血漿凝固の生じたものをピペットで強く攪拌して，フィブリンを細かくする．これを直接型別の抗原として用いた．　P. B brothでの培養は血漿の存在により，コアグラーゼ産生の微弱な株ではコアグラーゼ産生が助長されて，力価が高くなり，産生能の高い菌株では培養日数の短縮により，抑えられるために，全体に平均化されるので，簡易法では力価の測定を行なわないで，型別が可能となった．簡易法では原法に比して型別までに要する日数が大幅に短縮されるとともに，使用器具，器材の量が半減された．

文　献

1) Blair, J. E. and Williams, R. E. : *Bull. W. H. O.*, 24, 771, 1961
2) Cowan, S. T. : *J. Path. Bacteriol.*, 49, 169, 1939
3) Oeding, P. : *Acta. Path. Microbiol. Scand. suppl.*, 93, 356, 1952
4) 秋山昭一：日伝染会誌，33，495，1959
5) Pillet, J. B., Orta, B. and Corrieras, F. : *Ann. Inst. Pasteur Paris.* 113, 363, 1967
6) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M. and Kuwahara, S. : *Jap. J. Microbiol.*, 5, 237, 1961
7) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M. and Kuwahara, S. : *Jap. J. Microbiol.*, 5, 367, 1961
8) Zen-Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M. and Kuwahara, S. : *Jap. J. Microbiol.*, 6, 59, 1962
9) 善養寺浩，寺山武：モダンメディア，12，20，1966
10) 寺山武，潮田弘，稲葉美佐子，五十嵐英夫，善養寺浩：日細菌誌，29，608，1974
11) 善養寺浩，寺山武，潮田弘，五十嵐英夫，丸山務，坂井千三：食衛誌，12，311，1971
12) Altenbern, R. A. : *J. Infect. Dis.*, 116, 593, 1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 7—13, 1975

Yersinia enterocolitica の再分類と種の規定に関する提案

丸山 務* 柳川義勢*
坂井千三* 善養寺浩*

A Proposal on the Classification of *Yersinia enterocolitica*

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

The species of *Yersinia enterocolitica* consists of strains considerably different in biochemical properties as classified into 5 biotypes. The fact seems to have made some confusion in considering the pathogenicity of various isolates to humans. Thus we attempted a study for the reinvestigation of definition of the species. In the study, strains used were 30 reference strains of O 1～O 34 and 27 isolates belonging to various serotypes from patients and other sources, and 36 biochemical characteristics were tested on these strains.

The results indicated that the strains used were classified into 5 groups, A～E, by their biochemical reactions as shown in Table 8. Consequently, all the strains originally isolated from patients were noted to be classified in to groups A and B. Thus, here we propose that to avoid any further confusion, the species of *Y. enterocolitica* should be limited to the organisms belonged to groups A, B and C, and that groups D and E, including the strain of O 8 serotype, should be belonged to new species of genus *Yersinia*.

最近，腸管系病原菌として注目されている *Yersinia enterocolitica* は，当初 *Pasteurella pseudotuberculosis* の一生物型，血清型として扱われていたが，現在は腸内細菌科の一菌種として位置づけられている．1974年に出版された Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版[1]でも family *Enterobacteriaceae* の中に新しく genus *Yersinia* を設け，この中に *Pasteurella* から移行させた *Y. pestis*（ペスト菌），*Y. pseudotuberculosis*（偽結核菌）と共に本菌を加えている．しかしながら，現在 *Y. enterocolitica* と呼称されている菌種はきわめて幅広い性状のものを包含し，一菌種としての統一的な性状を示し難いのが実状である．これは，本菌の命名に際して菌種としての明確な性状の規定を行わなかったことに端を発し，それに加えて，この問題を十分に検討しないまま，主として感染源追求を目的として本菌の生態学的研究が進められた結果の混乱によるものと思われる．

現在，各種動物，自然環境からは，さまざまな性状をもつ *Y. enterocolitica* と呼ばれる菌が分離されているが，これらをはたしてヒト患者由来の菌と同一種として扱うべきか否か，本菌種の再整理をする必要が強く望まれている．

Y. enterocolitica は比較的最近注目されはじめた病原菌であるがために，細菌学的基礎研究，特に，その分類学的検討は十分に行われていない．そこで著者らは，まずこれまでの本菌の分類に関する知見を文献的に考察し，次に，諸外国において一般に血清型別参考菌株として用いられている菌株および，著者らが下痢症患者をはじめ，各種材料から分離した株について検討した成績を基にして *Y. enterocolitica* の再分類を試みた．

Y. enterocolitica の命名

Y. enterocolitica は当初，*P. pseudotuberculosis* の特殊な生物型，血清型として扱われていたため，*Bacterium enterocoliticum*,[3] *Yersinia X*,[3] *P. pseudotuberculosis X*[4] などと仮称されていた．現在の *Y. enterocolitica* なる命名は1964年 Frederiksen[5] の提唱によるものである．

一方，1940年代における *Pasteurella* の分類学的研

* 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

究は，従来の *Pasteurella* 属をいくつかに分ける方向へと進展した．例えば van Loghem[6,7]は，ペスト菌（*P. pestis*），偽結核菌（*P. pseudotuberculosis*）を *Pasteurella* から分離し，この2菌種を含む *Yersinia* 属の新設を提案した．Thal[8]もこの意見を支持し，さらに，Smith & Thal[9]は，*Pasteurella X* を含む *Pasteurella* の数値分類を行ない，チトクローム反応陰性群である *Yersinia* 属を腸内細菌科に編入すべきことを報告した．

Y. enterocolitica の性状

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology の第8版[1]では，従来の genus *Pasteurella* を *Pasteurella, Francisella* および *Yersinia* の3 genus に分け，*Yersinia* 属は腸内細菌科の中において，*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* および *Y. enterocolitica* の3菌種を含ませている．この3菌種と *Salmonella* および，*Pasteurella* を比較した性状を表1に示した．ここでは

Table 1. Distinguishing characters between the species of *Yersinia*, and a comparison of these characters with those of *Salmonella* and *Pasteurella multocida*

(Bergey's Manual 8th. ed.)

	Y. pestis	*Y. pseudotuberculosis*	*Y. enterocolitica*	*Salmonella*	*Pasteurella*
Motility 22 C	−	+	+	+	−
37 C	−	−	−	+	−
Urea hyrolyzed	−	+	+	−	−
Esculin	+	+	−	−	−
Rhamnose	(d)	+	−	+	−
Salicin	d	+	−	−	−
Sucrose	−	−	+	−	+
Gas from glucose	−	−	−	+	−
β-Galactosidase	+	+	+	d	−
Ornithine decarboxylase	−	−	+	+	
Citrate utilized	−	−	−	+	−
Indole	−	−	d	−	d

Y. enterocolitica はかなりよく整理された形でその性状が示されているが，実際には，現在 *Y. enterocolitica* と呼ばれているものはきわめて多彩な性状の菌群を包含している．したがって，本菌は表2に同属の *Y. pseudotuberculosis* と比較して示すごとく，その生物性状を掲げた場合，“d”，すなわち性状不定として記載せざるを得ない項目が多い．

Y. enterocolitica は現在，いくつかの指標となる性状によって1から5の生物型に分けられており[9,10]（表3）ヒト由来株のほとんどは生物型4または2である．

また，本菌は血清学的には，他の腸内細菌と同様にO，H，Kの抗原から成り，現在までに34のO抗原，1つのK抗原，19のH抗原の存在が明らかにされ，30以上の血清型があげられている．[11,12] 表4に示されているようにO抗原は単独ではなく，2つあるいは3つの因子抗原の組合せで存在する場合が多いため，O群として記載すべきであろう．これらO群は，生物型と密接な関連があり，さらに由来にも相関関係があることが知られている[10,13,14]（表5）．ヒト由来株の多くは，生物型4，O群3であり次いで生物型2のO群5および9などである．

再分類の試み

以上のように *Y. enterocolitica* は，いろいろな材料から多彩な性状の菌株が分離されるが，最近になってこれを再整理しようという動きがみられるようになった．例えば Knapp & Thal[15] はO群1から17に属している菌株について，生化学的，血清学的に詳細な研究を行ない，生化学的には，インドール，キシロース，エスクリンおよびサリシンの性状によって1～4群に分類している（表6）．これらのうち，彼等はインドール産生能を最も重視し，ヒト由来の生物型4を中心としたインドー

Table 2. Biological Characteristics of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*

	Y. enterocolitica	*Y. pseudotuberculosis*
MacConkey agar growth	+	+
SS agar growth	+	−
Cytochrome oxidase	−	−
Nitrate reduction	+	+
H_2S	−	−
Indole	− d	−
Urease	+	+
Voges-Proskauer 25C	+ d	−
Voges-Proskauer 37C	− d	−
Lysin decarboxylase	−	−
* Ornithin decarboxylase	+	−
Motility 25C	+ d	+
Motility 37C	−	−
Fermentation of		
Glucose/gas	+/−	+/−
Lactose	−	−
* Sucrose	+	−
* Cellobiose	+ d	−
* Rhamnose	−	+
* Salicin	− d	+
* Aesculin	− d	+
* Melibiose	−	+
Xylose	+ d	+

*=Key characteristics for differentiation

Table 3. The biotypes of *Y. enterocolitica* compared with characteristic biochemical of *Pasteurella X* (Knapp & Thal, 1973)

Biochemical test	Biotype of *Y. enterocolitica* Niléhn (1969)					Wauters (1970)					Knapp & Thal (1963) *Pasteurella X*
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Lecithin						+	−	−	−	−	
Salicin	+	−	−	−	−						−
Aesculin	+	−	−	−	−						−
Indole	+	+	−	−	−	+	(+)	−	−	−	−or(+)/+
Lactose	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	d
Xylose	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	+/−
Nitrate	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
Trehalose	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
Sorbitol	+	+	+	+	−						+
Ornithin decarboxylase	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	−						+
β-Galactosidase	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
Sucrose	+	+	+	+	−						+
Sorbose	+	+	+	+	−						

Table 4. Antigenic Schema of *Yersinia enterocolitica*

Group	O : K antigen	H antigen
1	1, 2a, 3	a, b, c
2	2a, 2b, 3	b, c
3	3	a, b, c
	3	c
4	4, 32	b, e, f, i
	4, 33	
5A	5	b, c, d, e, i
	5	a, b, c, d, g
	5, 27	
5B	5	a, b, c
6	6	d, e, f, g, i
	6, 30	a, b, d, g, i
	6, 31	
	6	b, d, e, g, i
7	7, 8	d, e, f, g, h
	7, 8	b, d, e, g, i
	7, 8	b, c, d, k
8	8	b, e, f, i
	8, 19	
9	9	a, b
10	10 : K_1	b, f, k
	10 : K_1	b, c, d, e, i
	10	b, c, e, f, i
	10	o
11	11, 23	l
	11, 24	r
12	12, 25	o
	12, 26	l
	12, 26	t
13	13, 7	n
14	14	m
15	15	c
16	16	
	16, 29	p
17	17	q
	18	
	20	
	21	
	22	
	28	s
	34	

Table 5. General Classiffication of *Y. enterocolitica* (Wauters, 1970)

			Group	Biotype	Source
Y. enterocolitica	-Indole −		- 1	3	Chinchilla
			- 2	5	Hare
			- 3	4	Man, Pig
			-15	4	Man
	-Indole +	-Lecithin +	- 4	1	No ecological conclusions were obtained at present
			- 5A	1	
			- 6	1	
			- 7	1	
			- 8	1	
			-10	1	
			-13	1	
			-14	1	
			-16	1	
		-Lecithin −	-11	2	
			-12	2	
			- 5B	2	
			- 9	2	Man

ル非産生株である group 1 には，*Y. enteritidis* という新しい菌種名を与え，インドールを遅れて産生，キシロース分解の group 2 にはこれまでの *Y. enterocolitica* の名称を残し，インドール陽性の group 3 および4を上記2つの group と同列に扱うべきではないという新しい提案をした．血清学的には，さらにこの生物性状による group 1 および2に属するものについてのみ subgroup を含んだ I から VI の group に独自の再編成を行った．従来の O factor および O group と比較して表7に示したが，ヒト患者由来株の多くは 1A group である．

また，Stevens & Mair[16] はこの問題を数値分類によって検討している．彼らは，少数株の *E. coli* などの *Enterobacteriaceae* とペスト菌，偽結核菌，*Pasteurella* 等を含んだ計116株について111項目の性状を調べた．図1にはその similarity matrix を示したが，*Y. enterocolitica* は少なくとも A, B 2つの group に大別され，A group はさらに A_1 から A_3 の subgroups に分けられる．B は biotype 5 が該当し，ヒト由来である生物型4の大部分は A_1 に入ることが明らかであると述べている．

私どもの提案

私どもは，Dr. Niléhn, Dr. Mollaret, Dr. Wauters から分与された O1～O34 までの参考菌株30株および，私どもが1971年から現在までに各種材料から分離したO群の異なる27株を用いて36項目の生物性状を調べた．その結果，供試菌株はレシチネース，インドールなどいくつかの性状を基準にして，AからEの5群に分けることができた．表8はこの成績と従来の biotype および O group とを比較対応させて示したものである．すなわち，group Aはレシチネース，インドールなどが陰性

Table 6. A new biological grouping of *Y. enterocolitica* (Knapp & Thal, 1973)

Group	Indole	Xylose	Aesculin	Salicin		Biotype Niléhn	Biotype Wauters
1	−	−	−	−	*Y. enteritidis*	4, 3	4, 3
2	(+)	+	−	−	*Y. enterocolitica*	1, 2	2, 3
3	+	+	+	+	(Glucose gas+)	1	1
4	+or−	+or−	+or−	+or−	(Lactose+, Sucrose−, Rhamnose−)	1,2,5,(6)	

Table 7. A revised antigenic schema of *Y. enterocolitica* (Knapp & Thal, 1973)

O-groups	O-subgroups	O-factors	Serotypes or groups by		
			Winblad	O-factors	Wauters
	A	(1) 2	3	3	3
I	B	(1) 2, 3	1	1, 2, 3 1, 2a, 3	1
II		(1) 4		15	15
III		(1) 5	4	4	4
IV		(1) 6	5	5	5B
V		(1) 7	9	9	9
VI		(1) 8	8	8	8

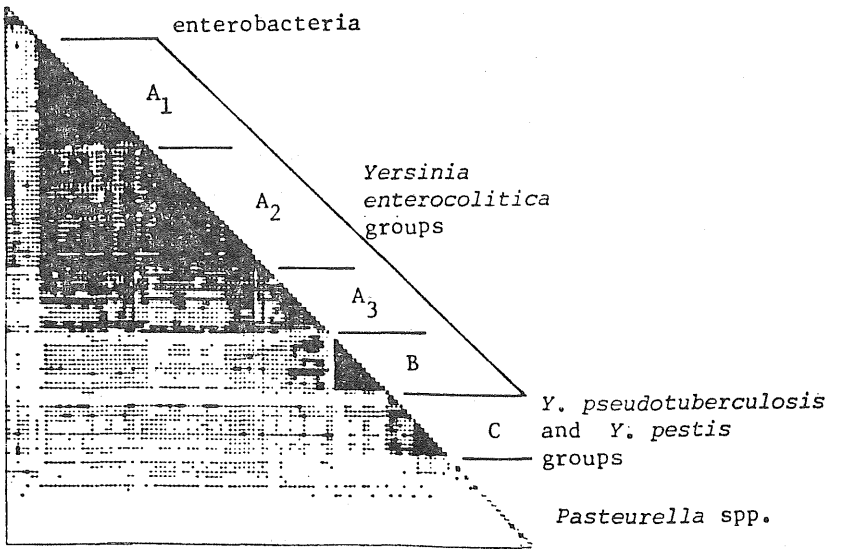


Fig. 1. Numerical taxonomy of *Y. enterocolitica* (Stevens & Mair, 1973)

で，運動性を欠如しているかきわめて弱い従来の生物型4と一致する株である．group Bはインドール，キシロース共に陽性であるが，レシチネース，エスクリン，サリシンが陰性の group で従来の生物型2が該当する．

Table 8. A proposal on the classification of *Yersinia enterocolitica*

Group	Lecithin	Indole	Esculin	Salicin	Xylose	Lactose	Sucrose	V-P	Bio-type	O-group	
A	−	−	−	−	−	−	+	+	4	3, 15	*Y. enterocolitica*
B	−	+	−	−	+	−	+	+	2	5, 9	
C	−	−	−	−	+	+	+	+	3	1	
D	−	+	+	−	+	+	−	−	2	11, 12	*Yersinia* sp.
E	d	+	d	d	+	d	+	d	1, 5	Others	*Yersinia* sp.

group Cは，group Bときわめて近似しているが，インドールが陰性であり，また，乳糖をすみやかに分解することで区別され，チンチラ兎由来の生物型3がここに入れられる．group Dは白糖非分解の Winblad のいう，いわゆる paraenterocolitica[17]である．以上のものに属さない全ての株は group E としてまとめられた．この group には従来の生物型1および5に該当するものが含まれ，きわめて多彩な性状を示すものである．

考　察

1972年 *Pasteurella*, *Yersinia* および *Francisella* の分類に関する小委員会[18]は動物由来株の Ye 39(Daniels 905) と Ye 62 (Becht 18) およびヒト由来株である Ye 160 (Hässig 2533/24), Ye 373 (Ahvonen 246/68), Ye 161 (Schleifstein の *Bacterium enterocoliticum* 33114) の計5株を reference strain として決め，この5株とよく一致した生物性状を持つ菌株を *Y. enterocolitica* として認める見解を提出した．しかしながら，これら5株中には生物型1のものも含まれているため，依然として *Y. enterocolitica* の性状は明確でなく，これらを一菌種として扱う不合理を残したままである．

この点を明らかにし，再整理する目的で行った Knapp & Thal[15], Stevens & Mair[16] および今回の私どもの検討から共通して得られた成績は，ヒト患者由来株が動物あるいは環境由来株と明瞭に区別されたことである．すなわち，患者由来株は私どもの提案するAおよびB，Knapp & Thal の group 1 および 2, Stevens & Mair の A_1 および A_2 の一部に限定されて一つの群を形成する．これは従来の生物型4および2に一致し，血清学的にはO群の3，15，5，9である．ヒトへの病原性を基調とする合目的的分類には著者らも異論はあるが，ただ，本菌の再分類がヒト由来株とそれ以外の菌株との異同を明確にする必要性を基点としているのであれば，以上の成績から，*Y. enterocolitica* とは生物型4および2に限定すべきであろう．ただ，私どものいう group C に該当する生物型3，O群1　チンチラ兎由来株は，ヒトへの病原性は明らかでなく，おそらくこの動物固有のものと思われるが，性状としては group B とはインドールおよび乳糖のみが相異点であるため group A および B と同列に扱うことが許されよう．しかしながら，ヒト患者由来株でも，米国でのみ分離され，しばしば敗血症の起因菌となるO群8の菌株はレシチネースが陽性の生物型1であり，group A，B，Cとは明らかに区別される．

本来，細菌の分類学的研究には，生化学的性状のみでなく，G-C contents, DNA homology あるいは numerical taxonomy などの手法を用いてこれらの総合的な検討によって種の規定がなされなければならないことは勿論である．結論はこれらの検討が十分に行われてから出されるべきであるが，*Y. enterocolitica* という菌種の現在の混乱をこれ以上拡げないために，生物型2，3および4の性状をもつ菌株のみに規定するのが現状では最も妥当であろうと思われる．少くとも私どもの group DおよびE，すなわち生物型1および5は別の菌種として位置されるべきであろう．このように本菌種を規定した場合，その生物性状は表9のように定めることができる．

結　論

現在きわめて幅広い性状をもつ *Yersinia enterocolitica* の再分類を行う目的で，O群1から34までの菌株を用い各種生物性状を検討した結果，本菌種はA～Eの5群に整理された．

A群とB群はインドール，キシロース，運動性が異なるが，いずれもレシチネース，エスクリン，サリシン，ラクトースが全て陰性であり，DおよびE群と明瞭に区別することができる．

ヒト患者由来株はAおよびBのいずれかの群に属し，動物，環境由来株のほとんどはC～E群に含まれる．このAおよびB群はそれぞれ従来の生物型4，2に一致

Table 9. Biological characteristics of *Y. enterocolitica*

Growth on SS agar	+
Cytochrome oxidase	−
Nitrate reduction	+
H_2S	−
Urease	+
Voges-Proskaur 25C	+
Indole 29C	− or +
Lysin decarboxylase	−
Ornithin decarboxylase	+
Lecithinase	−
Motility 22C	− or +
37C	−
Fermentation of	
Glucose/gas	+／+
Sucrose	+
Cellobiose	+
Xylose	− or +
Lactose	− or +
Rhamnose	−
Melibiose	−
Salicin	−
Aesculin	−

し，また血清学的にO群では前者は3，15，後者は5，9が該当する．

C群はチンチラ兎由来の生物型3，O群1の菌株がこれに該当するが，ラクトースのみによってAおよびB群と区別される．

したがって，今後 *Y. enterocolitica* はA，BおよびC群の性状に一致するもののみに規定することを提案する．

（本研究の概要は第48回日本細菌学会総会シンポジウム“細菌分類学への誘い”，1975年4月で発表した．）

文　献

1) Mollaret, H. H. and Thal, E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th Ed., pp. 330, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974
2) Schlifstein, J. I. and Coleman, M. B. : *N. Y. St. J. Med.*, 39, 1749, 1939
3) Smith, J. E. and Thal, E. : *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 64, 213, 1965
4) Daniels, J. J. and Goudzwaard, C. : *Tijdschr. Diergeneesk.* 88, 96, 1963
5) Frederiksen, W. C. : *Proc. XIVth Scand. Congr. Pathol. Microbiol., Oslo,* 103, 1964
6) Loghem, J. J. van. : *J. Microbiol. Serol.* 10, 15, 1945
7) Loghem, J. J. van. : *Ann. Inst. Pasteur,* 72, 975, 1946
8) Thal, E. and Knapp, W. : *Int. Symp. Enterobact. Vaccines, Symp. Series Immunobiol. Standard.*, 15, 219, Karger, Basel, 1971
9) Niléhn, B. : *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl.* 206, 1, 1969
10) Wauters, G. : *Contribution a l'etude de Yersinia enterocolitica,* Univ. Cathol. de Louvain, Vander, Louvain. 1970
11) Wauters, G., Le Minor, L. and Chalon, A. M. : *Ann. Inst. Pasteur,* 120, 631, 1971
12) Wauters, G., Le Minor, L., Chalon, A. M. and Lassen, J. : *Ann. Inst. Pasteur,* 122, 951, 1972
13) Winblad, S. : *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl.* 187, 115, 1967
14) Zen-Yoji, H., Sakai, S., Maruyama, T. and Yanagawa, Y. : *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, 25, 1, 1974
15) Knapp, W. and Thal, E. : *Contribution to Microbiol. Immunol.*, 2, 10, Karger, Basel, 1973
16) Stevens, M. and Mair, N. S. : *Contribution to Microbiol. Immunol.*, 2, 17, Karger, Basel, 1973
17) Winblad, S. : *Contribution to Microbiol. Immunol.*, 2, 27, 1973, Karger, Basel
18) Mollaret, H. H. and Knapp, W. : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22, 401, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 14—19, 1975

東京都内の中川流域で発生したカモのボツリヌス中毒に関する疫学的ならびに細菌学的検討

坂井千三* 伊藤 武* 岡沢久美子*
善養寺浩* 辺野喜正夫*

An Outbreak of Botulism in Water Fowl at the Area of the Naka River in Tokyo

SENZO SAKAI*, TAKESHI ITOH*, KUMIKO OKAZAWA*,
HIROSHI ZEN-YOJI* and MASAO BENOKI*

An outbreak of type C botulism in water fowl occurred at the delta area of the Naka River in Tokyo during the period from September through November, 1973.

In this outbreak, over 115 water fowls consisting of teal, pintail, eastern spot-billed duck, eastern kentish plover and eastern dunlin died. Many of the sick and dying birds manifested the paralysis of the legs and wings. The affected birds, however, did not display any significant head and neck paralysis.

Through the bacteriological examination, *Clostridium botulinum* type C was isolated from 7 out of 33 gizzard specimens collected from dead or dying birds. *C. botulinum* type C toxin was also demonstrated in 26 out of 33 blood specimens and 10 out of 35 gizzard specimens from dead or dying birds.

Furthermore, *C. botulinum* type C and its toxin were found in maggots collected from dead birds. *C. botulinum* type C was also isolated from the mud specimens collected from the area of the Naka River. Neither the organism nor the toxin was detected from river water and root of reed or cattail in the contaminated areas.

緒　言

本邦におけるボツリヌス中毒の発生は，その大部分がE型菌によるヒトの食中毒であった．ヒト以外の動物のボツリヌス中毒は，北海道で1961年[1]と1964年[2]にそれぞれ1例づつのC型ボツリヌス菌によるミンクの集団斃死例が報告されているに過ぎない．

ところが，1973年9月東京都の中川流域に生息しているカモなどの野鳥が多数斃死した事件について，その原因物質の究明を行なったところ，初めに考えられた水銀やPCBなどの化学性物質あるいはウイルス性疾患によるものではなく発症カモや斃死野鳥からボツリヌスC型毒素およびC型ボツリヌス菌が検出され，本疾患はボツリヌスC型中毒であることが判明した．

本事例は本邦で最初に確認された興味ある野鳥のボツリヌス中毒であり，以下その発生の概要と細菌学的検査成績について報告する．

発生状況

1. 発生場所

カモの集団斃死が起こった場所は，Fig. 1 に示すように，東京湾から7 km 程上った東京都葛飾区高砂1丁目から奥戸新町にかけての中川流域である．

特に多数のカモの斃死が観察されたのは，川岸が入り込んだ浅瀬で，アシやガマなどが密生していて水棲生物の繁殖がよく，カモなどの野鳥の餌場あるいは営巣地になっている所である．その付近ではカルガモが年間を通じて棲息している．また，毎年9月中旬頃から渡り鳥のカモがみられ，最盛期には300～500羽のカモが棲息している．

2. 発生時期

最初にカモの斃死が認められたのは1973年9月10日頃で，9月中旬から10月上旬にかけて多くの死亡が確認された．この発生は11月21日に著者らが現地を調査した時

* 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

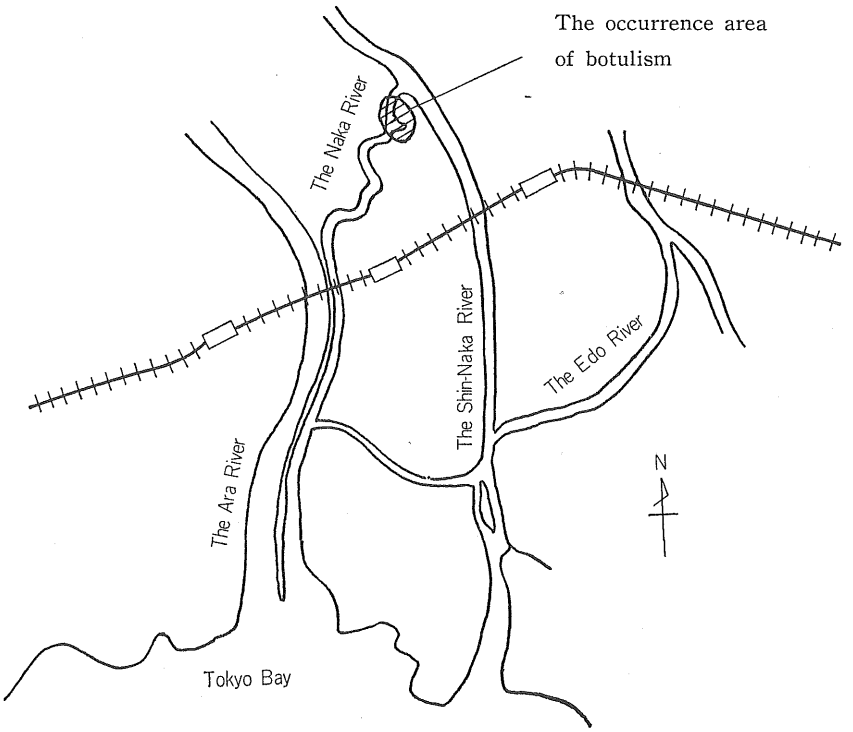


Fig. 1 Sketch map of the Naka River

にも斃死したカモがみられ，11月下旬まで継続していたものと思われる．

3. 斃死野鳥の種類

ボツリヌス中毒で斃死した野鳥は川底に沈んだり，水に流されたりして，正確な数は明らかでないが，東京都で確認した斃死数は，115羽である．最も多くみられた野鳥の種類はコガモ（*Nettion crecca crecca*），カルガモ（*Polionetta paecilorhyncha zororhyncha*）およびオナガカモ（*Dafila acuta acuta*）で，その他バン（*Gallinula chloropus parvifrons*），シロチドリ（*Charadrius alexandrinus dealbatus*）が少数例みられた．

4. 症状

本発生が野生の鳥類で起きたため，詳細な臨床症状は観察できなかったが，著者らが現地を調査してまず気がついたことは，脚や翼の運動神経麻痺のため飛ぶことも泳ぐこともできず，ただ翼をバタバタさせている事であった．なお捕獲された5羽のカモは，脚や翼の麻痺のほかに，軽度の頸の麻痺も認められた．しかし，野鳥のボツリヌス中毒にみられる瞬膜の麻痺や重篤な “Limber neck” の症状を確認することはできなかった．

細菌学的検査成績

1. 調査対象および方法

1) 被検材料

1973年10月8日から11月21日までの間に，中川で捕獲した発症カルガモ3例，発症コガモ2例，斃死カルガモ1例，斃死オナガカモ5例，および斃死コガモ17例計28例のカモと，10月31日に中川下流海岸で採取した斃死ハマシギ2例ならびにシロチドリ3例を対象に細菌学的検索を行なった．各野鳥は剖検を行ない，筋胃内容物と血液を採取して，これらの材料からボツリヌス菌検索と毒素の証明を試みた．なお，血液の採取が困難であった斃死鳥の場合は，心臓内の凝固血液を採取した．

感染源の追求を目的として，10月19日から11月6日の間に，発生地域内での斃死カモ4羽の体表に付着していたキンバエ（*Lucilia caesar*）とヒツジキンバエ（*Phaenicia cuprira*）の幼虫4件および最も多数の斃死が確認された中川地域周辺から採取したイトミミズ，マツモ，アオミドロ，アシの根，ガマの根計10件を被検材料とした．

また，泥土中のボツリヌス菌汚染状況を明らかにするため，発生地域6箇所の川底の泥土を採取し被検材料と

した.

2) ボツリヌス毒素の証明法

発症あるいは斃死野鳥からのボツリヌス毒素の証明は辺野喜ら[3]や阪口[4]の方法に準拠した.すなわち,筋胃内容物の場合は,約5倍量のゲラチン加リン酸緩衝液(pH 6.3)を加えて混和してから静置し,その上清を被検材料とした.発症カモから採取した血清はそのまま,凝固血液の場合は3～5 ml のゲラチン加リン酸緩衝液を加えて攪拌した後遠心分離し,その上清を,またハエの幼虫,イトミミズ,マツモ,アオミドロ,アシ,ガマについては,ゲラチン加リン酸緩衝液を等量加え乳剤とし,その遠心上清を用いた.泥土については,小林ら[5]に従って次のごとく遠心沈澱法処理を行なった.すなわち,泥土に約5倍量の生理食塩液を加えてよく攪拌し,10分間静置後その上清について10,000rpm,20分間遠心を行ない,その沈渣を生理食塩液に浮遊させ被検材料とした.

前述の各被検材料を2分し,一方は非加熱,他方は80°,30分間加熱処理後,ペニシリンを 200U/ml とクロラムフェニコールを 100μg/ml に加え,4週令前後のマウス腹腔内に 0.25～0.50ml あて接種した.非加熱材料を接種し,ボツリヌス毒素による典型的な症状を呈したか,あるいは発症後死亡した場合は,被検材料中にボツリヌス毒素の存在が疑われるので,ボツリヌスA,B,C,D,EおよびFの各抗毒素血清による中和試験を行なった.中和試験は,被検材料を2～3 MLD/ml の毒素量に希釈しあらかじめ1 U/ml 当りの抗毒素血清を接種した3匹のマウスの腹腔内に接種し,マウスの生死を観察した.なお,供試したボツリヌスA,B,EおよびF型各抗毒素血清は千葉血清研究所 近藤久博士,C型およびD型抗毒素血清は大阪府立大学 阪口玄二博士より分与を受けたものである.

3) ボツリヌス菌の分離および同定

被検材料からのボツリヌス菌分離は,東[6]の方法に従い,ガス噴射装置を用いてVL変法培地でのロールチューブ内培養を行なった.すなわち,まず被検材料を80°,20分間加熱し,それを生理食塩液で10倍段階希釈して,その 0.1～0.2ml を上記のVL変法培地に接種した。37°,15～18時間培養後,疑わしい集落を釣菌し生化学的性状を調べた.

なお,炭水化物分解,蛋白消化,インドール,硝酸塩還元および運動性の各性状試験は東[6]の方法に従った.また,揮発性脂肪酸は被検菌を1%ブドウ糖加VL変法液体培地で 37°,3日間培養後,その培養上清についてHoldemanら[7]の記載に準じてエーテル抽出を行ない,ガスクロマトグラフィー(島津GC-5A)で分析した.カラムおよび分析条件は次のごとくである.カラム;Chromosorb に Free fatty acid polyester を2%被覆,カラム温度;100°,キャリャーガス流量;60ml/min N_2,検出器;水素炎イオン化検出器(水素量;50 ml/min,空気量;1l/min)

分離菌株の毒素型は,0.5% ブドウ糖加VL変法液体培地を加えたクックドミート培地に供試菌を接種し,30°,3～4日間培養後,その上清について抗毒素血清による中和試験を行なって決定した.

2. 成績

1) 野鳥からのボツリヌス毒素の証明

発症あるいは斃死野鳥の筋胃内容物と血清の非加熱材料を接種した場合,少数を除いてマウスは3～5時間後にボツリヌス毒素による特有な腹部の陥凹がみられ,いずれも24時間以内に死亡した.これに反して,80°,30分間加熱処理の材料を接種した場合では,全くマウスは発症しなかったことから,ボツリヌス毒素の存在が疑われた.

次に,上記検体の毒性はボツリヌス抗毒素血清による中和試験では,A,B,E,FおよびD型抗毒素血清では中和されず,C型抗毒素血清で特異的に中和が成立した.すなわち,発症あるいは斃死野鳥の筋胃内容物や血清(凝固血液を含む)中にはボツリヌスC型毒素の存在が証明された.

調査を行なった野鳥33例についてのボツリヌスC型毒素の検出成績は,Table 1に示すとおりである.被検材別にみると,筋胃内容物では33例中10例,血清(凝固血

Table 1. Detection of type C botulinal toxin from gizzard and sera of paralysed and cadaveric water fowl

Species	Number of tested	Number of positive (%)	
		Gizzard	Sera
Paralysis :			
Eastern spot-billed duck	3	1	3
Teal	2	0	1
Cadaver :			
Eastern spot-billed duck	1	0	1
Teal	17	6	15
Pintail	5	3	5
Eastern dunlin	2	0	0
Eastern kentish plover	3	0	1
Total	33	10(30.3)	26(78.8)

液を含む）では33例中26例から本毒素が証明された．また，筋胃内容物からボツリヌス毒素が証明された鳥は，いずれも血清あるいは凝固血液から本毒素が証明された．

野鳥の種類では，発症していたカモ5例中4例および斃死カモ23例中22例が陽性であった．一方，同時期に中川河口海岸で斃死していたシロチドリ3例中1例の血清からも本毒素が証明された．

発症カモの血清中に含まれていたボツリヌスC型毒素量は，4例中1例は 20MLD/m*l*，3例は 4MLD/m*l* であった．

2) 野鳥からのボツリヌス菌検出状況

発症あるいは斃死野鳥の筋胃内容物からのC型ボツリヌス菌の検出状況を Table 2 に示した．すなわち筋胃内容物33例中7例（21.2%）からC型ボツリヌス菌が検出された．陽性例7件のうち1例は10月8日に捕獲した発症カルガモの筋胃内容物であって，他の6例はいずれも斃死カモのそれであった．

Table 2. Detection of *Clostridium botulinum* type C from gizzard of water fowl

Species	Number of tested	Number of positive (%)
Eastern spot-billed duck	4	2
Pintail	5	4
Teal	19	1
Eastern dunlin	2	0
Eastern kentish plover	3	0
Total	33	7(21.2)

3) 発生経路の追求

今回のボツリヌス中毒の発生経路を解明するため，カモなど野鳥が採食すると考えられる餌についてボツリヌス毒素と菌検索を行なった．

採取できた材料は，発生地域の泥土中にいたイトミミズ，水面に浮遊していたアオミドロ，マツモ，腐敗したアシやガマの根および斃死カモの体表に付着していたハエの幼虫である．

ボツリヌス毒素の証明では，発生地域での斃死カモ4例の体表に付着していたハエの幼虫全例からボツリヌスC型毒素が検出された．なお，この内の1例については，斃死カモの体表にハエの卵が多数付着していたので，そのままカモをビニール袋に入れ4日間室温に放置して孵化させたものである．

ハエの幼虫に含まれていたボツリヌス毒素量を，2例について検討したところ，1例の毒素量は幼虫の乳剤1m*l* 当り 2.0×10^3MLD，他の1例は 1.0×10^2MLDであった．

イトミミズ，アオミドロ，マツモ，アシおよびガマからはボツリヌス毒素は検出されなかった．

ボツリヌス菌は，毒素が証明されたハエ幼虫2例から，およびガマ，アシの根からもC型菌が検出された．

4) 発生地域の土壌からのボツリヌス菌検出状況

ボツリヌス菌による中毒発生地域の汚染状況を明らかにする目的で，カモの斃死がみられた中川流域の浅瀬の泥土を採取して，本菌の検索を行なった．菌検索の結果，土壌6例中3例から本菌が検出された．

すなわち，発生地域の河川の泥土は，高度にC型ボツリヌス菌の汚染を受けていることが判明した．

5) 分離菌株の生化学的性状

カモの筋胃内容物，ハエの幼虫，泥土，アシおよびガマから検出された代表菌株の生化学的性状は，Table 3 に示すとおりである．

分離菌株はいずれも対照として供試した Stockholm 株と同様にグラム陽性の桿菌で，Wirtz の芽胞染色を行なって観察したところ，卵円形の芽胞が菌体の端近くに形成されていることが認められた．

培養性状は，ツァイスラーのブドウ糖血液寒天では半透明の偏平な集落を形成し，集落直下あるいは集落の周囲に溶血環がみられ，卵黄加CW寒天では集落の周囲に真珠層とレシチナーゼ反応が認められた．

その他の生化学的性状では，Table 3 に示すごとくイノシット，ブドウ糖，マルトース，メリビオース，フラクトースおよびリボースを分解，ゲラチンを液化するが凝固血液や肉片を消化しない蛋白非分解性であった．

なお，Holdeman ら[7]の方法に従って分離菌についての揮発性脂肪酸の産生パターンを検討した結果，対照の Stockholm 株と全く同様に酢酸，プロピオン酸，酪酸のピークが認められた．

また，これらの菌株について産生毒素の毒素型を検討した結果，いずれもボツリヌスC型抗毒素血清により特異的に中和され，ボツリヌスC型菌と同定された．

考　察

Giltner ら[8]によって1930年に，カモなどの水禽はC型ボツリヌス菌によって食中毒を起こすことが明らかにされ，それまで米国のカリフォルニア州やユタ州の河川や沼に生息するカモなどにしばしばみられたカモの変死 "Western duck disease" はいずれもボツリヌスC型中毒と推定された．[9] それ以降，米国以外でも，カナダで Fish ら[10]はキジの中毒例，Grubb[11]はオーストラリヤで水禽の，Blardford[12]や Roberts ら[13]は英国で

Table 3. Biochemical characteristics of strains isolated from botulism in water fowl

	Strain No.								
	(Wild duck)		(Mud)		(Maggot)		(Reed)	(Cattail)	Stockholm
	CB1	CB7	CB13	CB14	CB11	CB12	CB8	CB10	
Hemolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecithinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Digestion of :									
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meat	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Milk coagulation	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Nitrate reduction	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Acid from :									
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	−
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	−
Mannitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Salicin	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Sucrose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Fractose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spore location	st	st	st	st	st	st	st	st	st
Volatile fatty acid	A B P	A B P	A B P	A B P	A B P	A B P	A B P	A B P	A B P
Toxicity for mice	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Note : +=positive, −=negative, st=subterminal, A=acetic acid
B=butyric acid, P=propionic acid

ニワトリや野鳥の，Henning[14]は南アフリカでアヒルの中毒を，また Haagsma ら[15] はオランダでカモなどの中毒例を報告している．

しかし，本邦においては今までに野鳥のボツリヌス中毒の発生は確認されておらず，1973年に中川流域で発生した本中毒が最初のものである．本発生例については，著者らと同時に小野ら[16]によって原因究明がなされ，著者らと同様の成績が得られている．

また，この事例と同じ頃，茨城県菅生沼や千葉県五駄沼，座生沼でもカモの大量斃死がみられ，その原因は阪口[17]や福田ら[18]によってボツリヌス中毒であることが明らかにされた．

これらの成績より，カモなどの野鳥が飛来してくる日本各地の河川や沼は，C型ボツリヌス菌で広く汚染を受けているものと推察される．

著者らが，今回の発生例について最も疑問とした点は，発生経路である．ボツリヌス中毒は "intradietic intoxication" による中毒であるから，本発生例においても，ボツリヌス毒素を多量に含んだカモなど野鳥の餌が，中川流域ないしその付近に存在するものと考え，カモの餌になると確認されたイトミミズ，アオミドロ，マツモ，川の表面に浮んだ腐敗したアシやガマの根および発生地域の斃死カモ体表に付着していたハエの幼虫をできる限り多数採取し，ボツリヌス毒素と菌検出を行なった．その結果，斃死カモの体表に付着していたハエの幼虫からボツリヌス毒素と菌が証明された．ハエの幼虫がボツリヌス中毒の媒体となることは，Fish[10] や Haagsma ら[15] によっても指摘されており，本発生例においても初期の発生源は明らかでないが，毒素を含んだハエの幼虫をカモが採食することによって，続発的に増幅され長期間にわたる集団斃死が起きたものと考える．

なお，著者らは1974年6月から7月に，本発生流域の

河川の泥土および淡水魚についてボツリヌス菌による汚染調査を行なった結果，本発生がみられた地域を中心にして広範囲にわたる河川の泥土から，C型ボツリヌス菌が証明された．また，同河川のフナやコイなどの淡水魚の腸管内容物79件中9件（11.4%）からC型ボツリヌス菌が証明され，本流域の泥土や魚は本菌によりかなり濃厚に汚染されていることが明らかとなった．[19]

以上の結果より，同地域におけるカモのボツリヌス中毒の再発生が予測された．

事実，この調査の約1年後の1974年8月22日から10月上旬にかけ，本発生例と同一地域で49羽のカモが斃死するボツリヌスC型中毒の発生がみられた．

従って，中川流域ではカモなど野鳥のボツリヌス中毒が今後とも再発生する危険性が考えられる．

結　論

1973年9月上旬より11月下旬にわたり，東京都内中川流域においてカモなど野鳥の大量斃死事例がみられた．本発生例は，原因物質究明の結果，ボツリヌスC型中毒であることが判明した．

本発生例の概要および，細菌学的検索成績は次のごとくである．

1，確認された斃死数はコガモ，カルガモ，オナガカモ，バンおよびシロチドリ計115羽であった．発症野鳥は，運動神経麻痺を主徴とするボツリヌス中毒の特徴的な症状を示した．

2，発症ならびに斃死した野鳥33件中，その筋胃内容物10例および血液や凝固血液26例よりボツリヌスC型毒素が証明された．

C型ボツリヌス菌は，筋胃内容物33例中7例より検出された．

3，本中毒発生経路追求のための検査に際し，斃死カモに付着していたハエの幼虫4例中全例よりボツリヌスC型毒素が証明された．

C型菌は，ハエの幼虫2例より検出された．

4，発生地域の河川泥土6件中3件よりC型ボツリヌス菌が検出された．

謝辞　本調査に当たり，有益な助言や御指導並びに抗毒素血清と標準菌株の分与を賜わった大阪府立大学　阪口玄二博士，家畜衛生試験所　東量三博士，千葉血清研究所　近藤久博士および予防衛生研究所　栗飯原景昭博士に深謝致します．

（本研究の概要は日本獣医学会第77回学会1974年4月に発表した）

文　献

1) 唐島田隆，小野悌二，飯田広夫，安藤芳明，阪口玄二，阪口澄子，籠田勝基：北海道衛生研究所報，15，17，1965
2) 小野悌二，唐島田隆，神沢謙三，飯田広夫，犬養勝一：日細誌，20，40，1965
3) 辺野喜正夫，善養寺浩：新細菌性食中毒，155，1972，南山堂，東京
4) 阪口玄二：食品衛生研究，24，447，1974
5) 小林運蔵，金鉄三郎：秋田県衛生科学研究所報，15，55，1971
6) 東量三：メディヤサークル，11，169，1966
7) Holdeman, L. V. and Moore, W. E. C.: *Anaerobe laboratory manual*, 67, 1972, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia
8) Giltner, L. T. and Couch, J. F.: *Science*, 72, 660, 1930
9) Kalmbach, E. R.: *Science*, 75, 57, 1932
10) Fish, N. A., Mitchell, W. R. and Barnum, D. A.: *Can. vet. j.*, 8, 10, 1967
11) Grubb, W. B.: *Austral. J. Exp. Biol.*, 42, 17, 1964
12) Blandford, T. B., Roberts, T. A. and Ashten, W. L. G.: *Vet. Rec.*, 85, 541, 1969
13) Roberts, T. A., Thomas, A. I. and Gilbert, R. J.: *Vet. Rec.*, 92, 107, 1973
14) Henning, M. W.: *Animal diseases in South Africa*, 3th Ed., 515, 1956, Central New Agency Johannesburg
15) Haagsma, J., Over, H. J., Smith, Th. and Hoekstra, J.: *Neth. J. Vet. Sci.*, 5, 12, 1972
16) 小野武男，石橋幸子，東量三：日細菌誌，29，161，1974
17) 阪口玄二：食品衛生研究，24，17，1974
18) 福田芳生，佐々木熙夫，七山悠三，福島悦子，本田久義：第27回日本食品衛生学会，5月，1974，東京
19) 坂井千三，伊藤武，岡沢久美子，善養寺浩：第49回日本感染症学会，4月，1975，京都

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 20—24, 1975

ヒト・市販食品およびと場汚水由来の *Salmonella typhimurium* の生物型とファージ型について

伊藤 武* 津野正朗* 坂井千三*
善養寺 浩* 大橋 誠**

Biotypes and Phagetypes of *Salmonella typhimurium* isolated from Human Cases and Other Sources in Tokyo

TAKESHI ITOH*, MASAAKI TSUNO*, SENZO SAKAI*,
HIROSHI ZEN-YOJI* and MAKOTO OHASHI**

A total of 813 strains of *Salmonella typhimurium* was isolated from food poisoning cases, sporadic cases with acute enteritis, healthy subjects, food, and sewages in 2 abattoirs in Tokyo during 1965 to 1971 and was subjected to the type differentiation by means of Cordano's biotyping with 4 biochemical reactions and Anderson's phagetyping.

The results of biotyping on the isolates from cases and incriminated foods in 15 food poisoning outbreaks revealed that out of 15 outbreaks 7 were due to organisms typed as biotype a, 4 due to biotype b, 2 due to biotypes a and b, 2 due to biotypes a and d, and 1 due to biotype d. Besides, it was found that isolates not only from cases but also from an incriminated food in a single outbreak consisted of same biotype strains. In addition, a good agreement in biotyping between isolates from humans and from foods and others was observed. That is, biotypes of 760 isolates from outbreaks, sporadic cases and healthy subjects were d (37.5%), b (30.8%), a (30.1%), c (0.9%) and f (0.3%), and those of 53 isolates from foods and sewages were a (35.8%), d (32.1%), b (30.2%) and f (1.9%).

By phagetyping on the 604 out of 813 isolates, only 240 (39.7%) could be typed, and 364 (60.7%) were phage non-sensitive or untypable by known phage sets. Major phage types of the isolates were la (14.9%), 2b (8.8%), la var. 1 (8.6%) and 2 (3.1%). However, there was no any correlation between phagetypes and biotypes of the isolates.

The present work suggests that biotyping is more valuable as an epidemiological tool than phagetyping for differentiation of *S. typhimurium*.

緒　言

わが国におけるサルモネラ下痢症や健康保菌者から検出されるサルモネラ菌型は，以前に比して極めて多彩化がみられ，著者らの最近の成績では98菌型に達している.[1] このうち最も検出頻度の高い菌型は *S. typhimurium* で，下痢症由来サルモネラの67.0%，また健康保菌者の場合でも約15%を占めている.

このように検出頻度の高い *S. typhimurium* については，その感染源を追求する手段として従来からファージ型別が広く行なわれている.

一方，最近 Cordanoら[2] は，*S. typhimurium* について生化学的性状の相違によるいわゆる生物型分類を提唱している.

そこで著者らは，東京都内に発生した食中毒患者，散発下痢患者，健康保菌者，食品およびと場汚水から検出された *S. typhimurium* を対象に，Cordano らの生物型分類と，従来から行なわれているファージ型別を行ない，両者について応用面での立場から比較検討を行なった．以下その成績について報告する.

実験材料および方法

1) 供試菌株

集団食中毒由来株：1965～1971年の7年間に東京都内

* 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
**国立予防衛生研究所細菌第一部

に発生した *S. typhimurium* による集団食中毒15事例の患者ふん便から検出された92菌株，ならびに3事例の推定原因食品から検出された7菌株計99菌株である．

散発下痢患者由来株：1967～1971年の5年間に，東京都内の5カ所の病院で赤痢診定患者および外来下痢患者から検出された *S. typhimurium* 360菌株である．

健康人由来株：1964～1971年の8年間に，東京都内在住の健康成人および健康学童から検出された *S. typhimurium* 301菌株である．

食品由来株：東京都内の市販の食肉，卵および魚介類から検出された *S. typhimurium* 25菌株である．

と場汚水由来株：東京都内の2カ所のと場汚水処理所の汚水から検出された *S. typhimurium* 28株である．

2) 生物型別

S. typhimurium の生物型分類は，Cordano ら[2]が報告した基準に準拠した．すなわち，テトラチオン酸塩の還元性，イノシットおよびトレハロースの発酵性，d-酒石酸の利用性の4種の生化学的性状によって Table 1 に示す8型の生物型に分類した．

なお，テトラチオン酸塩の還元性は Minor ら[3,4]の方法に従った．イノシットとトレハロースの発酵性は Barsikow の基礎培地を使用，d-酒石酸の利用性は，Kauffman-Peterson の方法[5]によった．各生化学的性状は，37°C培養で7日間観察した．

3) ファージ型別

S. typhimurium のファージ型別は Anderson の方法[6]に従った．

Table 1. Biotype of *Salmonella typhimurium* according to Cordano

Type	TTR*	Fermentation of		d-Tartrate
		Inositol	Trehalose	
a	+	+	+	+
b	+	−	+	+
c	+	+	−	+
d	+	+	+	−
e	+	−	+	−
f	−	+	+	+
g	−	+	−	−
h	−	−	+	+

Note : *=Tetrationate reductase

成　績

1) 集団食中毒例由来株の生物型とファージ型

1965～1971年の7年間に東京都内に発生した *S. typhimurium* による集団食中毒28事例のうち，患者数が5名以上であった15事例を対象とした．その15事例の食中毒由来 *S. typhimurium* の生物型およびファージ型別を行なった成績を Table 2 に示した．

すなわち15事例の起因菌の生物型はa型7例，b型4例，d型1例，aとb型が1例，aとd型が2例であった．また15事例のうち原因食品からも *S. typhimurium* が検出された3例の場合は，すべて患者便由来株と原因食品由来株とが同一生物型であった．

Table 2. Biotype and phagetype of strains of *S. typhimurium* from food poisoning incidents during 1965-1971, in Tokyo

Case No.	Date	Patient/at risk(%)	Biotype*	Phagetype*
1	15, Feb., 1965	53/90 (58.9)	b(11)	1a(3)
2	27, Feb., 1965	12/13 (92.3)	b(5)	1a(1)
3	6, Jun., 1965	8/20 (80.0)	a(2), b(2)	1a(1), la var. l(1), NS(1)
4	20, Aug., 1965	7/7 (100.0)	a(5)	NS(5)
5	4, Apr., 1966	9/9 (100.0)	a(4)	NS(4)
6	22, May, 1967	40/270 (14.8)	a(2), d(6)	NS(8)
7	3, July, 1967	16/30 (53.3)	a(2), d(1)	2(1), UT(2)
8	4, July, 1967	38/72 (52.8)	a(4)	2(2), UT(2)
9	24, Aug., 1967	22/31 (71.0)	a(5)	1a(5)
10	9, Sep., 1967	12/13 (92.3)	a(5)	2b(2)
11	6, July, 1968	12/20 (60.0)	a(4)	NS(4)
12	13, Oct., 1968	41/51 (80.4)	b(5)	2b(2)
13	7, May, 1970	57/200 (28.5)	a(15)	NS(4), UT(3)
14	7, May, 1970	57/67 (85.1)	d(15)	NS(2)
15	9, Sep., 1971	22/30 (73.3)	b(6)	NS(3)

Note : *=no. of strains, UT=react with typing phages but do not conform to a designated type, NS=does not react with typing phages.

15事例のファージ型は1 a型が3例，2 b型が2例であった．事例3，7，8については，それぞれ同一事例患者株であっても，ファージ型は異なっていた．残りの集団食中毒7例のファージ型は，供試菌株51株中49菌株は既知のファージに非感受性株，3株は型別不能株であった．

2) ヒト・市販食品およびと場汚水由来株の生物型

散発下痢患者，健康者，市販食品およびと場汚水由来 *S. typhimurium* の生物型を Table 3に示した．

散発下痢患者および健康者由来の生物型と食品およびと場汚水由来株の生物型とは極めてよく一致している．すなわちヒト由来株はa，b，c，dおよびf型の生物型に型別され，一方食品およびと場汚水由来株もa，b，dおよびf型に型別されている．

これらの菌株の生物型は全体的にはa型 (29.0%)，b型 (30.9%)，d型 (39.2%) が高率であり，c型 (1.0%)，f型 (0.4%) は極めて少なく，e，g，hの生物型に該当する菌株は検出されていない．

これらの成績は，食中毒由来株の生物型と極めてよく一致している．

次に，各材料由来菌株の生物型を分離年次別にみると，1964～1968年までの分離菌株の場合はd型該当株が220株中30株 (13.6%) で他の生物型に比して少なかったが，1968年以降では，d型株がa型，b型株に比して高い割合を示している．すなわち，1969～1971年におけるd型該当株の年次別検出率は1969年では34.0%，1970年43.2%，1971年61.3%であった．

3) ヒト，市販食品およびと場汚水から検出された *S. typhimurium* のファージ型

上記と同じヒト，食品およびと場汚水由来菌株のファ

Table 3. Biotype of strains of *S. typhimurium* from feces, food and sewage

Source	Number of strains used for typing	Biotype								
		a	b	c	d	e	f	g	h	UT*
Feces of patients subjects	360	88 (24.4)	114 (31.7)	6 (1.7)	150 (41.7)		2 (0.6)			
Feces of healthy subjects	301	93 (30.9)	91 (30.2)	1 (0.3)	113 (37.5)					3 (1.0)
Commercial food	25	8 (36.0)	14 (56.0)		1 (4.0)		1 (4.0)			
Sewage	28	10 (35.7)	2 (7.1)		16 (57.1)					
Total	714	200	221	7	280		3			3

Note : Number in parenthese are percentages equivalents of each biotype against number of strains used for typing. *UT : not typable

Table 4. Phagetype of strains of *S. typhimurium* from feces, food and sewage

Source	Number of strains used for typing	Phagetype													
		1	1a	1a var.1	1b	2	2a	2b	2c	2d	2e	3a	5	NS	UT
Feces of patients subjects	273	6	40	33		7	3	18	1	1	2	2	1	131	33
Feces of healthy subjects	231	2	34	18	1	5	1	30	1	1	2	2		98	36
Commercial food	25		6			2		1						11	5
Sewage	14					2								9	3
Total	548	8 (1.5)	80 (14.6)	51 (9.3)	1 (0.2)	16 (2.9)	4 (0.7)	49 (8.9)	2 (0.4)	2 (0.4)	4 (0.7)	4 (0.7)	1 (0.2)	249 (45.4)	77 (14.5)

Note : Number in parenthese are percentages equivalents of each phagetype against number of strains used for typing.
NS=does not react with typing phages, UT=react with typing phages but do not conform to a designated type.

Table 5. Relation between biotype and phagetype of *S. typhimurium* from feces, food and sewage

Biotype	number of strains	Phagetype													
		1	1a	1a var.1	1b	2	2a	2b	2c	2d	2e	3a	5	UT	NS
a	200	7	8	2	1	11	1	42	1	2	2			25	98
b	209	1	75	48		3	3	7			1	4	1	22	44
c	6		1					2						3	
d	186		6	2		4		2	1		1			33	137
f	3					1								1	1
Tatal	604	8	90	52	1	19	4	53	2	2	4	4	1	84	280

Note : UT=react with typing phages but do not conform to a designated type, NS=does not react with typing phages.

ージ型を Table 4 に示した.

供試菌株548株中222株（40.5%）が Anderson によるファージ型で型別されたが，249株（45.4%）は既知の各ファージに感受性のない株（NS），77株（14.1%）は型別不能株（UT）であった．型別された222株のファージ型をみた場合は供試菌の由来による差異は認められない.

ファージ型別された222株のファージ型は全体で12型で，そのうち高頻度に型別されたファージ型は1a型80株（14.6%），1a var.1 型51株（9.3%），2b型49株（8.9%）および2型16株（2.9%）であった.

4) ヒト，食品およびと場汚水由来株の生物型とファージ型との関係

上記の各種材料由来株のファージ型別を行なった548株および集団食中毒由来株56株計604株の生物型とファージ型との関係を Table 5 に示した.

すなわち，全供試菌株604株の生物型はa型が200株（31.1%），b型が209株(33.8%)，c型が6株(1.0%)，d型が186株（29.0%），f型が3株（0.5%）であり，それらのファージ型は604株中240株（40.5%）が型別され，残りの364株（59.5%）は型別不能株あるいは非感受性株である．生物型とファージ型との関係をみた場合，同一生物型であっても多くのファージ型に型別され，また，同一ファージ型に属する菌株でも異なった生物型を示し，従って *S. typhimurium* の生物型とファージ型との間には特に関連は認められなかった.

考　察

S. typhimurium の生物型による分類は，最初 Kristensen ら[7]によって，キシロース，ラムノース，イノシットの各発酵性，酒石酸およびクエン酸の利用性などの生化学的諸性状をもとに，18型の生物型が提唱された．この分類は Hansen,[8] Wuthe[9] および Kallinge ら[10]によって応用されている.

ところが Cardano ら[2] は今まで用いられていた生物型分類基準の性状のうち最も重視すべき性状としてイノシットとトレハロースの各発酵性，d-酒石酸の利用性およびテトラチオン酸の還元性をとりあげ，性状の違いによって8型の生物型に分類している.

今回著者らは集団食中毒15事例由来の *S. typhimurium* の生物型を Cordano らの方法に従がって分類し，この生物型が実際に疫学追求の手段としての応用が可能か否かを検討した．その結果同一集団発生の患者由来株の生物型は同一パターンを示すことが実証され，また原因食品由来株とその事例の患者由来株の生物型はまったく同一であることも確認されたことから，この *S. typhimurium* の生物型分類は疫学調査面に十分応用できることが示唆された.

都内に発生した集団食中毒患者，散発下痢患者および健康人から検出された *S. typhimurium* の生物型はd型によるものが最も多く，ついでb型，a型，c型，f型であった.

一方，食品，と場汚水由来の場合もd型，a型，b型であって，ヒト由来株と極めてよく一致している.

つぎに Cordano ら[2] のフランスでの成績では分離株513株のうちa型該当株が45.0%を占め，b型が25.2%，c型3.0%，d型4.5%，e型0.7%，f型12.0%，g型8.5%，およびh型0.7%となっている．これらの成績に比較して著者らの成績では，d型該当株の比率が高く，しかもe～h該当株が極めて少ないということは極めて興味ある問題であろう.

また，*S. typhimurium* の疫学的調査あるいは生態学的調査に以前からファージ型別が応用されているが，今回の著者らの成績では供試菌株の半数以上が型別されず，村瀬ら,[11] 河西ら[12]も同様な結果を示している.

生物型とファージ型との関係については，前述のごとく，供試菌株の半数以上がファージ型別不能株であるため，詳細は不明であるが，ファージ型別された菌株の範囲内では，生物型とファージ型との間に密接な関係は認められない．

結　論

ヒトおよび自然界由来の *S. typhimurium* の生物型およびファージ型を検討した結果以下の成績を得た．

1　1965～1971年に東京都で発生した*S. typhimurium* 食中毒15例の生物型はａ型７例，ｂ型４例，ｄ型１例，ａとｂ型１例およびａ型とｄ型が２例であった．また推定原因食品から菌が検出された３例はいずれも患者ふん便と原因食品検出株とが同一生物型を示した．

2　散発下痢患者，および健康者から検出された菌株の生物型はｄ型（39.8%），ｂ型（31.0%），ａ型（27.4%），ｃ型（1.1%）およびｆ型（0.3%）であった．

3　食品およびと場汚水由来株の生物型はａ型（35.8%），ｄ型（32.1%），ｂ型（30.2%）およびｆ型（1.9%）であった．

4　以上の菌株のファージ型別では604株中240株(39.7%）が型別され，280株（46.5%）は既知の各ファージ液に感受性のない株，84株（13.7%）は型別不能株であった．高頻度に型別されたファージ型は 1a，1a var. 1 および２型であった．

5　生物型とファージ型との間に密接な関連は認められなかった．

（本研究の概要は第29回日本細菌学会関東支部総会1973年６月に発表した．）

文　献

1) 坂井千三，伊藤武，津野正朗，岡沢久美子，小野川尊：日感染会誌，49，481，1974
2) Cordano, A. M., Richard, C. and Vieu, J. F.: *Ann. Inst. Pasteur.*, 121, 473, 1971
3) Minor, L. L.: *Ann. Inst. Pasteur*, 113, 117, 1967
4) Minor, L. L., Chippaux, M., Pichinoty, F., Coynauct, C. and Piechaud, M.: *Ann. Inst. Pasteur.*, 119, 733, 1970
5) Kauffmann, F. and Petersen, A.: *Acta path. et microbiol. Scand.*, 38, 481, 1956
6) Anderson, E. S.: *The World Problem of Salmonellosis*, 89, 1964, Dr. W. Junk Pablishers, The Hague
7) Kristensen, M., Bojlen, K. and Faarup, C.: *Bibliot. f. Laeger.*, 129, 310, 1937
8) Hansen, A. C.: *Zbl. Bakt. Orig.*, 149, 222, 1942
9) Wuthe, H. H.: *Arch. Hig.*, 153, 281, 1969
10) Kallinge, L. O. and Laurell, A. B.: *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 40, 328, 1957
11) 村瀬稔，貫名正文，仲西寿男，島田俊雄：第27回日本食品衛生学会，５月，1974，東京
12) 河西勉，鈴木昭，小沼博隆：第75回日本獣医学会，４月，1973，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 25—29, 1975

患者由来腸炎ビブリオの血清型別および新K抗原型の提案

工藤泰雄* 太田建爾* 斉藤香彦*
松下秀* 坂井千三* 善養寺浩*

Serological Typing of Isolates of *Vibrio parahaemolyticus* from Food Poisoning Cases, and Proposal of New K Antigen Types

YASUO KUDOH*, KENJI OHTA*, KAHIKO SAITOH*, SHIGERU MATSUSHITA*, SENZO SAKAI* and HIROSHI ZEN-YOJI*

During the period from 1971 through 1974, a total of 218 outbreaks of food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* had occurred in Tokyo.

The results of serological typing made on a total of 2,307 isolates from these food poisoning cases and from sporadic cases revealed that there was a conspicuous annual replacement in the principal prevalent strains yearly. Major causative strains in 1971 were O4 : K8 (24.8%) and O4 : K4 (24.0%); in 1972 were O4 : K8 (14.5%), O5 : K15 (12.3%) and O8 : K39 (9.3%); in 1973 were O3 : K33 (30.9%) and O4 : K12 (10.6%); in 1974 were O3 : K5 (13.3%), O4 : K10 (10.6%) and O4 : K13 (10.1%).

Furthermore, it was also found that there were some strains having new K antigens and new O : K combinations which had not been known previously. They were O1 : TNK 11 (87 strains), O3 : TNK 12 (14 strains), O1 : K33 (7 strains) and O3 : K51 (11 strains). Thus, here we proposed these antigens and antigenic combinations as new serotypes of *V. parahaemolyticus*.

腸炎ビブリオの血清型は，現在本菌の血清型別委員会[1]の検討を経て，O1～12の12O群とK1～57の52K抗原（K2, 14, 16, 27および35は欠番）の組合せからなる54型に分類されている．

この血清学的分類に基づいた腸炎ビブリオの型別は，本菌食中毒の疫学あるいは感染源の追求といった面に大きな手懸かりを与えることから，これまで広く行なわれている．

著者らも1961年以降都内に発生した本菌食中毒の患者，推定原因食品等から分離した腸炎ビブリオの血清型別を行ない，主要起因菌型の年次による大きな入れ替り，既知K抗原型に型別されない菌株の突然の出現，同一集団事例あるいは同一患者例であってもそれから分離された菌株の血清型はしばしば共通でなく数型にわたっているといった特徴を明らかにしてきた.[2-5] また，既知K抗原型に型別されない菌株の抗原分析の結果から現在までに10型の新K抗原型を明らかにし，本菌血清型別委員会の検討を経て抗原表に追加している.[6,7]

本報では，引続き患者分離株の血清型の年次別推移を明らかにするために，1971年以降4年間に分離された菌株の血清型別を行なったのでその成績について報告する．また，1970年から1974年にかけて分離された菌株中に既知抗原型に一致しない新抗原型および既知O：K抗原型の組み合せの異なる血清型を有する菌株を認めたのでそれらの血清型について報告する．

材料および方法

供試菌株：1971年から1974年の4年間に東京都内に発生した集団食中毒事例あるいは散発下痢患者から当研究所において分離した菌株である．分離菌株は，1検体から3～5個の集落について血清型別を行ない，同一血清型だけが得られた場合は1株とし，いくつかの異なった血清型が得られた場合には血清型を異にするごとに1株とした．

分離・同定および生化学的性状試験：Zen-Yoji et al.[8,9]の方法に従って行なった．

血清型別法：K抗原型別およびO群別とも市販（東芝化学工業KK）の診断用抗血清を用い，すべてスライド凝集反応により行なった．なお，新K抗原型であるTN

* 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

K11およびTNK12抗血清は自家調製の特異吸収血清を用いた．

新K抗原の分析：新K抗原特異抗血清は善養寺ら[7]の方法に従って作製した．特異性の検討は，新K抗原型と思われる菌株の特異抗K血清とK1～57のパイロット株との試験管内凝集反応によった．

結果および考察

腸炎ビブリオ食中毒の発生状況：東京都において1971～1974年の4年間に発生した腸炎ビブリオ食中毒の年次別，月別発生状況を表1に示した．本菌食中毒の発生は，これまでに報告してきた成績[4-6]と同様おおむね6～10月にわたっており，11～5月の期間には全く認められなかった．ただ，1974年では発生件数，患者数とも例年にくらべて激減をみている．この減少は，気温あるいは海水温が平年と大差がないことから，その影響は考えられず，むしろ魚介類流通過程の改善の成果が反映した結果と思われる．

患者由来株のK抗原型の年次別推移：1971～1974年の4年間に分離された2,307株のK抗原型による血清型別成績を表2に示した．年により若干の差異はあるが，分離株のうち91.6～96.8%は既知抗原型のK1～57いずれかに型別された．出現K抗原型は，1971年が33型，1972年が34型，また1973年および1974年が30型となっており，1964年から1968年までの14～22型に比べて，1969年以降新K抗原型が追加されると共に多岐にわたる傾向にあった．

1971年の主要起因菌型は1970年ではK7（22.7%）およびK55（13.2%）であったのに対しK8（24.8%），K4（24.0%）と大きく入れ替り，1972年では1971年同様K8（14.5%）と新らたにK15（12.3%）が主要起因菌型として認められた．1973年にはK33（30.9%），K12（10.6%）へと，また主要起因菌型の交代がみられ，前年まで流行したK8は1株も検出されなかった．1974年は，食中毒の発生例が少なかったため，分離菌株数も188株と少なくなっているが，前年のK33は僅か1株と激減し，代ってK5（13.3%），K10（10.6%）が主要菌型として認められた．

これらの主要菌型の年次による変動は，従来の成績[4-6]と同様の結果であったが，ただ最近においては，主要起因菌型はいくつもの血清型に分散する傾向がうかがわれた．なお，分離株の神奈川現象について検討した結果を参考までに表3に示した．すでに神奈川現象は腸炎ビブリオの病原性と密接な関連のあることが明らかにされてきているが，[6,11,12]今回の著者らの成績でも，陽性株が病原株であることを支持する結果であった．

二つのO群に属するK抗原型：著者らはすでにK4およびK30が2つのO群に存在することを報告[8]している．今回全分離株のO群についてもK抗原と同様検討した結果，以上の外，K33がO1およびO3群，K51がO3およびO11の両群に存在することが確認された．これらのK抗原型が同じでO群が異なる菌株の検出頻度は表4に示すとおりで，K33を除いてはいずれもこれまでの血清型とは異なるO4：K4，O5：K30およびO3：K51の組合せを有する株が多い結果であった．

新K抗原型：新K抗原型であるTNK11およびTNK12の参考菌株としたものは，1970年および1972年に食中毒患者から分離されたT-4336-1株およびT-6389株であり，そのO群は既知のO1，O3にそれぞれ該当するものである．参考菌株および同一抗原型に型別された分離株各20株について生化学的性状試験を行なった結果，TNK11株がすべてインドール反応陰性[13]であった点を除きいずれも腸炎ビブリオの性状に一致し，また，これらの菌株はすべて神奈川現象陽性であった．

このTNK11およびTNK12のK抗原特異性を検討し

Table 1. Monthly incidence of *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning in Tokyo from 1971 through 1974.

Year		Month June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Total
1971	Outbreaks	2	14	37	14	2	69
	Patients	4	230	836	274	58	1,402
1972	Outbreaks	2	7	45	23	3	80
	Patients	126	58	652	300	25	1,161
1973	Outbreaks	1	18	18	10		47
	Patients	9	400	174	250		833
1974	Outbreaks		5	8	6	3	22
	Patients		40	76	63	106	285

Table 2. Serological typing of *Vibrio parahaemolyticus* from food poisoning cases in Tokyo from 1971 through 1974.

K type	1971 No. of isolates(%)	1972 No. of isolates(%)	1973 No. of isolates(%)	1974 No. of isolates(%)
1	—	15 (1.9)	—	—
3	3 (0.4)	5 (0.6)	16 (3.2)	2 (1.1)
4	197 (24.0)	66 (8.3)	9 (1.8)	4 (2.1)
5	14 (1.7)	9 (1.1)	1 (0.2)	25 (13.3)
6	4 (0.5)	3 (0.4)	1 (0.2)	2 (1.1)
7	25 (3.0)	34 (4.3)	48 (9.6)	14 (7.4)
8	204 (24.8)	116 (14.5)	—	8 (4.3)
9	8 (1.0)	3 (0.4)	—	9 (4.8)
10	—	3 (0.4)	8 (1.6)	20 (10.6)
11	65 (7.9)	5 (0.6)	5 (1.0)	1 (0.5)
12	13 (1.6)	73 (9.1)	53 (10.6)	15 (8.0)
13	7 (0.9)	5 (0.6)	47 (9.4)	19 (10.1)
15	28 (3.4)	98 (12.3)	8 (1.6)	9 (4.8)
17	2 (0.2)	—	2 (0.4)	1 (0.5)
18	—	47 (5.9)	9 (1.8)	—
19	4 (0.5)	—	—	—
20	—	—	—	1 (0.5)
21	—	1 (0.1)	—	2 (1.1)
22	—	3 (0.4)	—	—
24	1 (0.1)	—	3 (0.6)	1 (0.5)
25	4 (0.5)	—	—	—
26	1 (0.1)	—	—	—
28	1 (0.1)	5 (0.6)	3 (0.6)	3 (1.6)
29	5 (0.6)	1 (0.1)	1 (0.2)	—
30	2 (0.2)	2 (0.3)	1 (0.2)	2 (1.1)
32	8 (1.0)	2 (0.3)	—	1 (0.5)
33	11 (1.3)	13 (1.6)	154 (30.9)	1 (0.5)
34	2 (0.2)	2 (0.3)	1 (0.2)	2 (1.1)
36	—	—	6 (1.2)	6 (3.2)
37	1 (0.1)	4 (0.5)	3 (0.6)	—
38	1 (0.1)	—	17 (3.4)	—
39	17 (2.1)	74 (9.3)	1 (0.2)	1 (0.5)
40	1 (0.1)	—	—	—
42	1 (0.1)	—	1 (0.2)	—
46	—	7 (0.9)	—	—
47	—	1 (0.1)	1 (0.2)	1 (0.5)
48	—	—	1 (0.2)	—
49	1 (0.1)	—	3 (0.6)	—
51	1 (0.1)	14 (1.8)	2 (0.4)	—
52	8 (1.0)	2 (0.3)	—	1 (0.5)
53	—	11 (1.4)	—	2 (1.1)
54	48 (5.8)	25 (3.1)	44 (8.8)	16 (8.5)
55	13 (1.6)	8 (1.0)	1 (0.2)	1 (0.5)
56	76 (9.2)	47 (5.9)	—	7 (3.7)
57	5 (0.6)	21 (2.6)	6 (1.2)	5 (2.7)
UT	40 (4.8)	74 (9.3)	42 (8.4)	6 (3.2)
Total	822 (100)	799 (100)	498 (100)	188 (100)

Table 3. Kanagawa hemolysin test of *Vibrio parahaemolyticus* from food poisoning cases in Tokyo from 1971 fhrough 1974.

Year	No. of isolates tested	No. of positives(%)
1971	822	757 (92.1)
1972	799	740 (92.6)
1973	498	478 (96.0)
1974	188	176 (93.6)
Total	2,307	2,151 (93.2)

た成績を表5に示した．表から明らかなごとく，両新K抗原特異血清とも，それぞれの対応する菌株とのみ反応し，K1～57のパイロット株とは全く反応しないことから，両抗原型はともに新K抗原型であることが確認された．両新K抗原型株の出現頻度は表6に示すごとく，この4年間にTNK11に型別された菌株は87株で，1972および1973年ではそれぞれ主要起因菌型の1つとなっている．TNK12は1972年に14株分離されたが，その後は全く検出されていない．

以上のごとく，過去4年間に東京都内に発生した腸炎ビブリオ食中毒の患者あるいは散発下痢患者から分離された2,307株について血清型別を行ない，年次による主要起因菌型の入り替りと，同時に既知血清型に一致しない新血清型株の出現を認めた．

Table 4. Incidence of human isolates of *Vibrio parahaemolyticus* having new O:K combination.

Serotypes	Year				
	1971	1972	1973	1974	Total
O 3 : K 4	0	0	1	0	1
O 4 : K 4	197	66	8	4	275
O 3 : K30	0	0	1	2	3
O 5 : K30	2	2	0	0	4
O 1 : K33	2	2	2	1	7
O 3 : K33	9	11	152	0	172
O 3 : K51	0	11	0	0	11
O11 : K51	1	3	2	0	6

Table 5. Antigenic specificity of new K antigens, TNK 11 and 12, of *Vibrio parahaemolyticus*

Antigen	Antiserum		
	K 1-57	TNK 11	TNK 12
K 1-57	NT	—[a]	—[a]
TNK 11	—[b]	400	—[a]
TNK 12	—[b]	—[a]	400

a=negative in a dilution of 1: 50. b=negative in slide agglutination test by commercial antisera. NT=not tested.

Table 6. Incidence of new K type strains of *Vibrio parahaemolyticus* from food poisoning cases in Tokyo from 1971 through 1974.

Year	No. of isolates (%)	Serotypes (%)			
		K 1-57	TNK 11	TNK 12	UT*
1971	822 (100)	782 (95.2)	11 (1.3)	0 (—)	29 (3.5)
1972	799 (100)	725 (90.7)	44 (5.5)	14 (1.8)	16 (2.0)
1973	498 (100)	456 (91.6)	28 (5.6)	0 (—)	14 (2.8)
1974	188 (100)	182 (96.8)	4 (2.1)	0 (—)	2 (1.1)
Total	2,307 (100)	2,145 (93.0)	87 (3.8)	14 (0.6)	61 (2.6)

* UT=untypable.

結　論

1971～1974年にかけて東京都内において計218件の腸炎ビブリオ食中毒の発生があった．これらの食中毒あるいは散発下痢症患者から分離された2,307株について血清型別を行なった結果，全株が既知のO1～12群に，またうち2,145株（93%）が既知のK1～57のK抗原型のいずれかに型別された．

主要起因菌型は，1971年ではK8（24.8%），K4(24.0%)；1972年ではK8（14.5%），K15（12.3%），K39（9.3%）；1973年ではK33（30.9%），K12（10.6%）；1974年ではK5（13.3%），K10（10.6%），K13（10.1%）となっており，これまでに得られた成績と同様，年次による菌型の入れ替りが顕著であった．

また，これら分離株中にO1：TNK11（87株），およびO3：TNK12（14株）の2種の新K抗原型と既知のO：K抗原の組み合せと異なるO1：K33（7株）およびO3：K51（11株）の2種の血清型を有する菌株を認めた．

これらの新K抗原であることが確認されたTNK11, およびTNK12と既知O：K抗原の組み合せと異なるO1：K33およびO3：K51を，それぞれ腸炎ビブリオの新血清型として提案する．

文　献

1) The committee on the Serological Typing of *Vibrio parahaemolyticus* : *Japan. J. Microbiol.*, 14, 249, 1970
2) 善養寺浩，坂井千三，寺山武，工藤泰雄，一言広：日本伝染病学会誌，37，195，1963
3) Zen-Yoji, H., Sakai, S., Terayama, T., Kudoh, Y., Itoh, T., Benoki, M. and Nagasaki, M. : *J. Infect. Dis.*, 115, 436, 1965
4) Zen-Yoji, H., Sakai, S., Kudoh, Y., Itoh, T. and Terayama, T. : *Health Lab. Sci.*, 7, 100, 1970
5) 工藤泰雄，太田建爾，池島伸至，伊藤武，善養寺浩：東京衛研年報，22，15，1971
6) Kudoh, Y., Sakai, S., Zen-Yoji, H. and Le Clair, R. A. : International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*, Edited by Fujino, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R. and Takeda, Y., 9, 1974, Saikon. Publ. Co., Tokyo
7) 善養寺浩，坂井千三，工藤泰雄，伊藤武，斉藤クラ，寺田友次，橋本治雄，馬場貞義：東京衛研年報，18，47，1966
8) 善養寺浩，寺山武，工藤泰雄，太田建爾，坂井千三：日本細菌学雑誌，26，298，1971
9) Zen-Yoji, H., Le Clair, R. A., Ohta, K. and Montague, T. S. : *J. Infect. Dis*, 127, 237, 1973
10) Le Clair, R. A., Zen-Yoji, H. and Sakai, S. : *Publ. Health Lab.*, 28, 82, 1970
11) Sakazaki, R., Tamura, K., Kato, T., Obara, Y., Yamai, S. and Hobo, K. : *Japan. J. Med. Sci, Biol.*, 21, 325, 1968
12) Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K. and Yamai, S. : *J. Bacteriol.*, 100, 1147, 1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 30—35, 1975

本邦食品の糸状菌汚染に関する研究
東京における市販ゴマ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 Foodstuffs in Japan; Fungal and Aflatoxin Contamination in Sesame and Its Products marketing in Tokyo

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

A survey of fungal and aflatoxin contamination was carried out on a total of 42 batches of sesame and its products consisting 39 batches of the grains and 3 of the pastes on the market in Tokyo.

Filamentous fungal counts of sesame grains and pastes were ranged 1-275/150 grains with average of 28/150 grains, 14/gram of only one positive paste, respectively. Dominant fungal species among the total 1,173 isolates were *Aspergillus ruber*, *Penicillium variable*, *A. chevarieli*, *A. candidus* and *A. flavus*, and these species accounted for 56.7% of total isolates. Results of mycotoxin productivity test demonstrated that 96 isolates of *A. flavus* from 10 samples produced aflatoxin when cultured in SL medium, and 22 isolates of *A. versicolor* from 4 samples produced sterigmatocystin when cultured in YES medium. Especially, 12 out of these aflatoxin producing strains were noted to produce large amount of aflatoxin B_1 ranging from 20 to 30 μg per m*l*. However, aflatoxin was not detected directly from sesame grains.

緒　言

1960年の英国における発がん性カビ毒 aflatoxin の発見以来，農産物，とくに穀類等のいわゆるでんぷん質食品の糸状菌汚染が食品衛生の立場から注目されるようになり，世界各地でそれらの調査がなされてきた．我が国においても同様に穀類，穀粉に関する調査報告例は極めて多い．

我が国の食品原料はその大部分を輸入に頼っているといわれる．したがって輸入時における食品の品質検査が極めて大切である．しかるに，先頃の市販ピーナッツの aflatoxin 汚染例[1]のように，輸入時から流通過程の末端に当る市販品に至るまでに全く検査の機会がないため，市販品の検査で初めて汚染の発見された事実は，食品衛生上多くの問題を提起しているものと考えられる．

著者らはこれまで，各種市販食品，ことに保存性の高い食品における糸状菌汚染ならびに検出糸状菌の mycotoxin 産生性について検討を行なってきた.[2-8] その結果，我が国の市販食品からの糸状菌検出率は極めて高く，しかも既知 mycotoxin 産生菌も比較的高頻度に分布していることを認めた．また，従来保存性がすぐれているとされている食品であっても，比較的短期間の室温放置で糸状菌の増殖が認められた例も少なくない.[6,8] これらの成績は各種食品で糸状菌が増殖し，それに伴って mycotoxin の産生・蓄積の危険性も大きいことを示唆している．

今回とり上げたゴマの場合は食用油の原料あるいは栄養価の高い副食品として広く食用に供せられており，大部分が輸入品であるが，その糸状菌ならびに mycotoxin 汚染について我が国における報告例は皆無である．

そこで，市販品としてのゴマ粒およびその加工品における糸状菌および mycotoxin の汚染実態について調査したので報告する．

実験方法

1) 試　料

調査に用いた試料はゴマ粒39検体およびゴマ加工品（ペースト状に加工して缶詰ないしびん詰としたもの）3検体の合計42検体で，いずれも1972年8月より9月にかけて，都内で市販中のものを購入して使用した．なお

* 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 Labolatory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

検体の購入にあたり，原則として各商店毎に白ゴマおよび黒ゴマの2種を一対にして購入することに努めたが，39検体中白ゴマ29検体黒ゴマ18検体という割合になった．近年ゴマも他の食品と同様にその大部分は輸入に頼っているといわれているが，今回購入した製品はいずれも国内卸売業者名が記載してあるのみで，その詳細は不明であった．

2) 糸状菌の分離

糸状菌の分離にはクロラムフェニコール 100μg/ml 添加 potato dextrose agar（PDA）およびブドウ糖20%添加PDAの2種を用いた．

ゴマ粒の培養は，あらかじめ粒を滅菌精製水で20回洗浄し，粒表面の附着物を除去したのち，各平板に12～13粒をおき計150粒を培養した．

また，ゴマペーストは滅菌スパーテルで十分攪はんしたのち，その 0.5 ml を各平板に塗沫し計 5 ml を培養した．

これらの各試料を接種した平板は25°，7—10日間培養した．その間連日観察しつつ，発育した集落をPDA斜面に移植し，以後の同定操作に供した．

菌種の同定は前報の記載[2]にしたがった．

3) 対照用標準 mycotoxin

MAKOR Co., Israel 製の純品の aflatoxin B_1, B_2, G_1 および G_2, ochratoxin A および sterigmatocystin を使用した．また，cyclopiazonic acid およびその誘導体は東京教育大学農学部阿部又三教授から恵与されたものを使用した．これらの製品は用にのぞみ精製クロロホルムまたはベンゼン：アセトニトリル(98：2) に溶解して使用した．

4) ゴマ粒およびゴマペーストからの aflatoxin の検出

ゴマ粒およびゴマペースト各 25 g を用いてこれら試料から直接aflatoxin の検出を試みた．すなわち，各検体25 g をメタノール：水 (55：45) 125 ml および n-ヘキサン 100ml と共にブレンダー（日本精機 K.K.）により高速で3分間粉砕，混和したのち遠心分離を行ないメタノール：水画分を採取した．このメタノール：水画分を更に n-ヘキサン 100 ml により洗浄を行なったのちその 50 ml についてクロロホルム 50 ml を用い2回抽出操作を行ない，得られたクロロホルム画分 100 ml を減圧濃縮後，前報[2]に記載した方法に従い clean up およびTLCを行ない aflatoxin の有無を検討した．

5) 検出菌の mycotoxin 産生試験

検出菌の mycotoxin 産生性の有無を検討するため液体培地を用いて供試菌を培養した．すなわち，aflatoxin 産生用には 10 ml のSL培地，[9] ochratoxin および sterigmatocystin 産生用にはYES培地[10]を用い前報[2]の記載に従い毒素産生の有無を検討した．また，cyclopiazonic acid およびその誘導体の産生試験は大桃ら[11]の方法に従った．

6) その他

Mycotoxin 産生用参考株，clean up 法，TLCおよび aflatoxin B_1 の確認および定量試験法等については，いずれも前報[2]の記載に従った．

実験成績

1) ゴマ類における汚染糸状菌数

ゴマ粒39検体およびゴマペースト3検体における検出糸状菌数を Table 1 に示した．すなわち，ゴマ粒では

Table 1. Fungal Counts made on Sesames and Its Products

Sample	Number of Samples tested	Number of fungi estimated		Moisture
		Range	Average	
Grain	39	0-245/150 grains	28/150 grains	5.81%
Paste	3	0-14/ml	5/ml	—
Total	42	—	—	—

全く糸状菌の検出されなかった検体は39例中6例で，残りの33例では1-245個／150粒の汚染糸状菌数であった．これを1 g当りに換算すると約100個となり，他の穀粒等にくらべやや多い汚染菌量であった．また，ゴマペーストでは3例中2例は菌の汚染が認められなかったが，残る1例は1 ml 当り14個の汚染菌数であった．

ゴマ粒における水分含量は3.7-7.7%，平均5.8%と極めて低く，よく乾燥した食品といえる．なお，各検体においてこれら水分含量と検出菌数との間に相関性は認められなかった．

2) 検出糸状菌の菌種分布

分離した汚染糸状菌の菌群の分布を Table 2 に示した．すなわち，最も多く検出された菌属は *Aspergillus* 属で，全検出菌数の61%を占め，次いで *Penicillium* 属の23%，残りの16%は *Cladosporium* (7.4%)，*Rhizopus* (2.4%)，*Mucor* (2.2%) および *Alternaria* (1.5%)

Table 2. Incidence of Fungi in Sesames and Its Products

Fungus		Fungal count	(%)
Genus *Aspergillus*:			
A. glaucus	group	378	(32.2)
A. flavus	〃	105	(9.0)
A. candidus	〃	97	(8.3)
A. niger	〃	39	(3.3)
A. versicolor	〃	27	(2.3)
A. fumigatus	〃	17	(1.2)
A. ochraceus	〃	8	(0.7)
A. terreus	〃	2	(0.2)
A. nidulance	〃	1	(0.1)
Aspergillus spp.		45	(3.9)
		total	719(61.3)
Genus *Penicillium*:			
P. purpurogenum	series	130	(11.1)
P. cyclopium	〃	27	(2.3)
P. citrinum	〃	19	(1.6)
P. viridicatum	〃	9	(0.8)
Ramigena	〃	7	(0.6)
P. implicatum	〃	6	(0.5)
P. expansum	〃	6	(0.5)
P. restrictum	〃	1	(0.1)
P. digitatum	〃	1	(0.1)
P. italicum	〃	1	(0.1)
Penicillium spp.		63	(5.4)
		total	270(23.0)
Genus *Cladosporium*		87	(7.4)
〃 *Alternaria*		17	(1.5)
〃 *Fusarium*		9	(0.8)
〃 *Chaetomium*		6	(0.5)
〃 *Wallemia*		4	(0.4)
〃 *Arthrinium*		3	(0.3)
〃 *Phoma*		2	(0.2)
〃 *Rhizoctonia*		1	(0.1)
		total	129(11.1)
Genus *Rhizopus*		29	(2.4)
〃 *Mucor*		26	(2.2)
		total	55(4.6)
Sum total		1173	(100)

等の各属によって占められていた.

さらに，これら各菌属のうちで検出頻度の高い菌をあげると，*Aspergillus* 属では *A. glaucus* (32.2%), *A. flavus* (9.0%) および *A. candidus* (8.3%) の各 group の菌，また，*Penicillium* 属では *P. purpurogenum* series (11.1%) および *P. cyclopium* series (2.3%) であった．なお，*A. glaucus* group では *A. ruber* (18.7%) および *A. chevarieli* (10.4%) の2菌種が圧倒的に多く，その他 *A. amsterodami*, *A. repens* および *A. umbrosus* などが認められた．*A. flavus* group では96株の *A. flavus* を除き残り9株はすべて *A. tamarii* であった．*P. purpurogenum* series の菌は全株 *A. variable* であった．また *P. cyclopium* series では25株は *P. cyclopium* で残りの2株は *P. puberulum* であった．つぎの *Cladosporium* 属では66株が *Cl. sphaerospermum* で，その他に *Cl. cladosporioides* および *Cl. herbarum* が認められた．

3) Mycotoxin 産生能を有すると思われる菌群の分布

Mycotoxin 産生能を有すると思われる菌とその菌を検出したゴマ検体との関係を Table 3 に示した．すなわち，最も多く検出された菌種は *A. flavus* で10検体より合計96株分離された．また *A. versicolor* および *Fusarium* spp. は5検体からそれぞれ27および9株分離された．

一方，検体の側からこれらの菌の分布をみると，ゴマ粒は分離菌株数217個／150粒と汚染菌量の極めて多い試料の1つであり，Table 3 に示した7菌種のうち6菌種により汚染されていた検体である．しかし，他の検体における分布傾向からみると，汚染菌数の多い場合に必ずしも毒素産生の疑わしい菌種による汚染が多いとはいえず，両者に相関性は認められなかった．

4) 検出菌の mycotoxin 産生能の検討

Table 3 に示した既知 mycotoxin 産生能を有すると思われる各種菌株のうち，*A. flavus* および *Rhizopus* については aflatoxin を，また *A. versicolor* については sterigmatocystin, cyclopiazonic acid およびその誘導体を，*A. ochraceus* については ochratoxin A を，さらに *P. cyclopium* については cyclopiazonic acid およびその誘導体の産生能をそれぞれ検討した．

その結果，Table 4 に示したように，aflatoxin 産生性の *A. flavus* と sterigmatocystin 産生性の *A. versicolor* が認められ，それ以外の菌株ではいずれも毒素産生性は認められなかった．Aflatoxin 産生性の *A. flavus* は10検体のゴマ粒から検出され，その大部分は aflatoxin B 群のみを産生する株であったが，*A. flavus* G-22 株のみは B_1, B_2, G_1 および G_2 の4種を産生することが確認された．また，*A. flavus* G-1 株は Reddy ら[9]の用いた SL 培地において 30 μg／ml 以上の aflatoxin B_1 を産生する強産生株であった．

また，sterigmatocystin 産生性の *A. versicolor* は2検体のゴマ粒および1検体のゴマペーストから検出された．

5) ゴマ粒からの aflatoxin の検出

Table 3. Occurrence of Fungi Belonging to Toxin-Producing Species in Sesame Samples

Species	Sample number																		Total count
	1	5	6	9	13	16	21	22	23	24	25	27	29	33	34	35	36	K-1	
A. flavus	8	10		1	23			1	32	5	1		10				2		93
A. versicolor		20	4									1					1	1	27
A. ochraceus		4	1												1	2			8
P. citrinum		17																	17
P. cyclopium		24	1																25
Rhizopus spp.			3						19	4									29
Fusarium spp.		3			3	2	1	2						1					9
Total count	8	78	9	1	26	2	1	3	51	9	1	1	10	1	1	2	3	1	208

Table 4. Mycotoxin Producing ability of Isolates

Sample number	Species	Number of isolates per 150 grains	Toxin producing ability					Source
			Aflatoxin (ppm)				Sterigmatocystin	
			B1	B2	G1	G2		
G-1	*A. flavus*	8	+(30.8)	+	−	−		
G-5	*A. flavus*	10	+(6.4)	+	−	−		
	A. versicolor	20					+	
G-9	*A. flavus*	1	+(0.02)	+	−	−		
G-13	*A. flavus*	23	+(3.9)	+	−	−		
G-22	*A. flavus*	1	+(21.0)	+	+	+		Sesame
G-22	*A. flavus*	32	+(1.6)	+	−	−		grains
G-24	*A. flavus*	5	+(6.9)	+	−	−		
G-25	*A. flavus*	1	+(7.7)	+	−	−		
G-29	*A. flavus*	10	+(12.5)	+	−	−		
G-36	*A. flavus*	2	+(trace)	+	−	−		
	A. versicolor	1					+	
K-1	*A. versicolor*	1					+	Sesame paste

ゴマ粒試料各 25 g を用いてこれらの試料から直接 aflatoxin の検出を試みた．その結果，全試料において aflatoxin は検出されなかった．

6) ゴマ粒の mycotoxin 産生用基質としての検討

上記毒素産生菌が高頻度にゴマ粒より検出された事実から，mycotoxin 産生菌のゴマ粒における毒素産生性についての検討を行なった．すなわち，白ゴマ粒および黒ゴマ粒 25 g を 300 m*l* 容の三角フラスコ中で精製水により数回洗浄したのち，そのまま約 4 時間室温に放置し水分を吸収させたのち，紙上で余分な水分を除去後フラスコ中にもどし，121°，15分間高圧滅菌を行なった．これに aflatoxin 産生株として *A. parasiticus* NRRL 3000 および今回の分離株である *A. flavus* G-5 を，sterigmatocystin 産生株として *A. versicolor* I-20-b，ochratoxin A 産生株として *A. ochraceus* st A-15 をそれぞれ接種し，25°，8 または 12 日間培養した．その間 1 日 1 回菌の発育を均一にするためにフラスコ内のゴマ粒をよく振とうした．培養を終えた時点で，これらの試料を 110°，10 分間滅菌を行ない，ゴマ粒からの aflatoxin 抽出法を用いて，また clean up および TLC は前報[2] の記載にしたがい各毒素の産生の有無を検討した．

その結果，すべての接種菌に毒素産生が認められ，ゴマ粒が aflatoxin，sterigmatocystim および ochratoxin

Aの毒素産生基質となり得ることが確認された．なお，これらの mycotoxin 産生用基質として白ゴマおよび黒ゴマに差は認められなかった．

考　察

今回調査したゴマ類における糸状菌汚染についてみると，39検体のゴマ粒のうち33検体（85%）に糸状菌汚染を認め，ゴマ加工品においては3検体中の1検体より糸状菌を検出した．さらに，これら検出糸状菌のうち高い検出率で認められた菌種は *A. ruber*, *A. chevarieli* 等の *A. glaucus* group の菌および *P. variable* でそれぞれ18.7%，10.4%および11.1%の検出率であった．このほかに *A. candidus* および *A. flavus* が8%前後の検出率で認められ，それ以外の菌はいずれも5%以下の検出率であった．しかし，Shank ら[12] のタイおよびホンコン産の，また Husain ら[15] のパキスタン産のゴマ粒における糸状菌汚染調査の成績ではいずれも *A. flavus* が優先菌種となっており，この点著者らの成績と一致しない．Christensen ら[16-18] は穀粒において糸状菌相は収穫後の時間的経過および含水量の変化に伴い変化すると報告しており，今回著者らが入手したゴマ粒は収穫後の時間的経過も長いと考えられ，水分含量も平均5.8%と極めて低い等の原因で上述のごとく菌相に変化を来たしたものと考えられる．

今回の検出菌のうち既知 mycotoxin 産生能を認めた菌種はゴマ粒10検体より検出された *A. flavus* 96株およびゴマ粒2検体，ゴマペースト1検体より検出された *A. versicolor* でそれぞれ aflatoxin および sterigmatocystin 産生能が認められた．これら mycotoxin 産生菌による検体汚染率は26.1%で，他の食品における汚染率，すなわちそば粒，そば粉および乾そば6.6%，茶32.2%，煮干17.6%[2,4,6] と比較すると茶についで高い値であった．しかも茶葉が mycotoxin 産生用基質となり得ないのに反しゴマでは aflatoxin, sterigmatocystin および ochratoxin A産生の良好な基質となり得ることが確認された．このことは我が国やゴマの主要生産地である東南アジアの高温多湿な気候のもとでは収穫から喫食に至るまでの間に種々の原因により過剰な水分の加わるおそれも十分考えられ，従ってゴマは mycotoxin 汚染を受ける危険の極めて大きい食品であると考えられる．事実，Shank ら[13,14] はタイにおいて収集した75例のゴマ粒の3%に aflatoxin 汚染が認められたと報告している．我が国においてはゴマ粒は例年4万トン程度輸入されており，[19] mycotoxin 汚染ゴマ粒の輸入される危険性も今後十分考慮する必要があろう．

結　論

市販のゴマ粒およびゴマペーストの糸状菌汚染ならびに aflatoxin 汚染について検討を行なった結果，以下の結論を得た．

1) 市販ゴマ粒39検体中33検体（84.6%）から糸状菌を検出し，ゴマ粒150当りの汚染菌数は1-245，平均28個でこれを1g当りに換算するとその汚染菌数は約100個となり，他の穀粒等に比して高い汚染菌量であった．一方，ゴマペーストにおいては3検体中1例から糸状菌を検出し，その1ml当りの検出糸状菌数は14個であった．

2) 検出糸状菌1,173株のうち比較的高率に検出された菌種は，*A. ruber* (18.7%)，*P. variable* (11.0%)，*A. chevarieli* (10.4%)，*A. candidus* (8.3%) および *A. flavus* (8.2%) であった．

3) これらの汚染菌のうち mycotoxin 産生能を有する菌種として，10検体より検出した96株の *A. flavus* に aflatoxin 産生能を，また3検体より検出した22株の *A. versicolor* に sterigmatocystin 産生能をそれぞれ認めた．

4) 市販ゴマ粒がこれら mycotoxin 産生菌の毒素産生基質となり得るか否かを検討する目的で，aflatoxin 産生菌として *A. flavus* G-5 および *A. parasiticus* NRRL-3000，sterigmatocystin 産生菌として *A. versicolor* I-20-b，ochratoxin 産生菌として *A. ochraceus* st A-15をゴマ粒に接種し mycotoxin 産生の有無を検討した結果，各毒素の良好な産生・蓄積が認められた．

5) 市販ゴマ粒39検体について aflatoxin 汚染の有無を検討した結果，全ての検体において aflatoxin 汚染は認められなかった．

謝　辞　今回の実験に用いた cyclopiazonic acid ならびにその誘導体を御恵与くださった東京教育大学農学部阿部又三元教授ならびに田淵武士教授に感謝いたします．

（本研究の概要は第25回日本食品衛生学会学術講演会1973年5月で発表した）

文　献

1) 直井家寿太，小川仁志，風間栄治，斉藤和夫，志村公子，井部明広，一言広，木村康夫：第29回食品衛生学会学術講演会口演，1975
2) 一言広，諸角聖，和宇慶朝昭，善養寺浩，倉田浩，一戸正勝：食衛誌，14，364，1973
3) 一言広，諸角聖，和宇慶朝昭，善養寺浩：東京衛研年報，24，41，1973

4) 一言広，諸角聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺浩：同上，25，17，1974
5) 倉田浩，田辺弘也，栗飯原景昭，諸角聖，一言広，善養寺浩：第 22 回食品衛生学会学術講演会口演，1971
6) 一言広，諸角聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺浩：第28回食品衛生学会学術講演会口演，1974
7) 一言広，諸角聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺浩，倉田浩：第29回食品衛生学会学術講演会口演，1975
8) 諸角聖，一言広，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺浩，倉田浩：同上
9) Reddy, T. V., Viswanathan, L. and Venkitasubramanian, T. A.: *Appl. Microbiol.*, 22, 393, 1971
10) Davis, N. D., Diener, U. L. and Eldridge, D. W.: *ibid.*, 14, 378, 1966
11) 大桃定洋，杉田正徳，阿部又三：農化，47，57，1972
12) Shank, R. C. and Wogan, G. N.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 10, 51, 1972
13) Shank, R. C., Gordon J. E. and Wogan, G. N.: *ibid.*, 10, 61, 1972
14) Shank, R. C. and Wogan, G. N.: *ibid.*, 10, 71, 1972
15) Husan, S. S. and Ahmed, M. A.: *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, 14, 137, 1971
16) Christensen, C. M.: *Bot. Rev.* 23, 108, 1957
17) Christensen, C. M.: *Mycotoxin in Foodstuffs*, 1966, M. I. T. Press, Massachusets
18) Christensen, C. M. and Kaufman, H. H.: *Grain Storage*, 1969, University of Minesota Press, Minneapolis
19) 輸入農林水産物の現況，1972，日本貿易振興会編

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1. 36—41, 1975

酵素製剤中の残留ストレプトマイシンの検出同定方法の検討ならびに，それを応用した市販製剤中のストレプトマイシンの検査成績

加 納 堯 子* 村田 以和夫* 大久保 暢 夫*

Detection and Identification Procedures for Residual Streptomycin in Enzyme Preparation and Their Application on Commercial Products

TAKAKO KANOH*, IWAO MURATA* and NOBUO OHKUBO*

Detection of residual streptomycin (SM) in the enzyme preparation was made by a pulp disk assay technique with *B. subtilis* ATCC 6633 strain. For the determination of the detected antimicrobial agent, SM resistant *B. subtilis* ATCC 6633 and *E. coli* NIHJ-C_1 strains, and a SM inactivating enzyme which was extracted from a SM resistant R factor obtained from *E. coli* YE-100/VR_1 strain were used. In addition to these, several physiochemical confirmations were also made by the use of the Sakaguchi, Elson-Morgan, Maltol reaction, and fast liquid chromatography simultaneously.

When these procedures were applied on the 3 commercial products for the medical use, it was found that all the samples tested contained a considerable amount of SM, i. e., the product A contained 92.2 (±17.0 μg per capsule, the product B, 55.1(±)8.9 μg per capsule, and the product C, 11.1(±)1.3 μg per lmg, respectively.

酵素製剤は，臨床分野に広く用いられているのでその品質は純粋であることが望ましい．今回，行政的な立場から酵素製剤の純度試験を実施して，酵素製剤中に残留する抗生物質を検出した．本報告では，検査酵素製剤中に含有されたストレプトマイシンの検出同定方法と，検出されたストレプトマイシンの定量方法，及びこれらの方法を応用して検出同定された上記3剤中のストレプトマイシンの濃度について報告する．

（I） 検査材料

1. 検査材料 検査酵素製剤は，都衛生局より純度確認のため送付を受けた製剤で，3剤とも消炎酵素製剤である．検査酵素製剤中に含有される酵素は，放線菌の一種 *streptomyces griceus* を利用した streptomycin（SM）製造過程中の培養沪液中に副生する酵素で蛋白分解酵素である．

A試料は，カプセル剤で，内容は淡かっ色の顆粒及び粉末の混合物で微かに特異の臭気と苦味を持ち，粉末は水溶性，顆粒部分はアルカリ性水溶液に崩壊しながら溶ける腸溶性顆粒剤である．1カプセル中の淡かつ色顆粒は 0.131 g（65カプセル平均値）含有される．B試料もカプセル剤で，顆粒剤はわずかに特異な臭いと苦味を持つ腸溶性顆粒剤で1カプセル中に 0.095 g（65カプセル平均値）含有される．C試料は，淡黄かっ色の粉末で微かな特有の臭いとわずかな苦味がある．本品は水溶性でエタノールにほとんど溶解しない．本品水溶液（0.1→10）の pH は約7.0である．

(II)-A 実験方法（生物学的方法）

1） 試料調製 A，B試料共にカプセル中の内容物を完全に取り出し，A試料については，蛋白分解酵素を主成分とする淡かっ色顆粒とバレイショでんぷんを主成分とする粉末に，B試料については，乳糖を主成分とする白色顆粒と蛋白分解酵素を主成分とする淡かっ色顆粒とに区別して淡かっ色顆粒のみを検査材料として供試した．C試料は蛋白分解酵素粉末であるのでそのままを検査材料として使用した．A，B試料は10カプセル中の顆料試料に酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）50 m*l* を加えて混合し，沪紙で沪過して沪紙上の残渣を別の容器に移す．残渣にリン酸緩衝液（pH 7.4）を20～30 m*l* 加えて40°の水浴中で30分ふりまぜ腸溶性剤皮を溶解する．その後スパーテル等を用いて充分に顆粒を崩壊させ，沪紙で沪過，沪液は検査法により100°の水浴中で30～40分加温するか，又は高速遠心（10,000 rpm）後，その上清を

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科 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

滅菌フィルターを用いて沪過する．沪液は pH 7.0～8.0 に調整し試料液とする．

2) **使用器材** 分光光度計：島津ＱＶ50，ディスク：直径8.0mm東洋沪紙厚手ディスク，カップ：日本抗生物質医薬品基準に準じたもの，滅菌フィルター：Sterile Sartorius Membrans Filters GMBH 0.45μ Size 13.0 mm，コロジオンバック：Sartorius Membrans Filter GMBH SM 13200，樹脂：Amberlite IRC-50AG 分析用，ゲル：Sephadex G-25 (fine)，G15，マイクロピペット：20 μl

3) **使用菌株** *Bacillus subtilis* ATCC 6633，*Escherichia coli* NIHJ-C_1，実験 SM 耐性 *B. subtilis* ATCC 6633，実験ＳM耐性 *E. coli* NIHJ-C_1，*E. coli* YE-100/VR_1

4) **使用培地** Antibiotic Medium No. 5 (Difco)，MacConkey Agar (栄研)，普通寒天 (栄研)，L-Broth (Bacto-Tryptose : 10g, Yeast extract : 5g, Sodium chloride : 5g，を滅菌精製水に溶解し pH 7.2 とする)

5) **標準抗生物質** 常用標準ストレプトマイシン硫酸塩 (780 μg/ml 力価)

6) **使用試薬** 酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)，リン酸緩衝液 (pH 7.4)，0.1Ｍ リン酸カリ緩衝液 (pH 7.8～8.0)，Ｒ—緩衝液 (147mM Tris—塩酸 pH 8.0, 11.4mM 塩化マグネシウム，114mM 塩化アンモニウム，7.15mM Dithiothreitol)，100mM ATP-2Na in 147mM Tris—塩酸，147mM Tris—塩酸 pH 8.0，Folin-Ciocaltau 試薬

7) **実験 SM 耐性菌育成方法** *B. subtilis* ATCC 6633 の dihydrostreptomycin の実験耐性株は，農林省動物医薬品検査所長，二宮幾代治博士の好意により分与を受けた．芽胞状態の凍結乾燥粉末は，アンプル開封後純培養してその生育したコロニーを釣菌し，再度芽胞を形成させ8)に準じて芽胞浮遊液を調製した．実験ＳM耐性 *E. coli*-NIHJ-C_1 は原株の *E. coli*-NIHJ-C_1 の増菌液の約 10ml を一度集菌し，1 ml の滅菌精製水に浮遊させてこの浮遊液の 0.1 ml を SM が添加された MacConkey Agar 平板上の表面に一様に塗布する．培養は 37°，72 時間後 MacConkey Agar 上に育成したコロニーを植継いでゆく．平板上に添加されるＳMは 100 μg/ml から始めて 2～3 代で 1000 μg/ml の高度耐性株が得られる．

8) **芽胞浮遊液の調製** *B. subtilis* ATCC 6633 及び実験 SM 耐性 ATCC 6633株を寒天斜面培地上に37°で7～10日間培養し，芽胞を作らせた後菌苔をかきとって滅菌精製水で洗浄する．菌苔を精製水に再浮遊させ 65° 30分間，3回，24時間間隔で加熱し 1000rpm で5分間遠心し，その上清を4°で保存する．種層用の培地 100ml に加える胞子懸濁液の適用量をあらかじめ定めておく．使用した芽胞浮遊液は，*B. subtilis* ATCC 6633 : 3×10^7/ml，透過率60%，実験ＳM耐性 *B. subtilis* ATCC 6633株：2×10^9/ml 透過率55% (640nm filter) である．

9) **芽胞含有平板の調製** 滅菌し 56～60° に冷却した Antibiotic medium No. 5 100ml に８) で調製された *B. subtilis* ATCC 6633 及び実験 SM 耐性 *B. subtilis* ATCC 6633 の芽胞浮遊液 0.1 ml を加える．均一に分散混合した後，その 20 ml を水平に保持された滅菌浅型シャーレ (直径90mm) に分注する．新たに滅菌浅型シャーレ (直径90mm) と長方形シャーレを用意して，前者の場合は，滅菌カップをシャーレ面積を４等分したその中央に１カップずつ計４ヶ，長方形シャーレには底部に印されたカップ位置上に30ヶ配置し，各々に 10ml，30 ml の芽胞液をすばやく操作して一様に広がるように分注し固める．完全に冷却した後カップを取り除くと，寒天平板上にカップによって作られた孔が作成される．*E. coli*-NIHJ-C_1，実験 SM 耐性 *E. coli*-NIHJ-C_1 の含有平板は，両株の増菌液の一白金耳をあらかじめよく表面を乾燥させた MacConkey Agar 平板上に均等に塗抹し種層とした．

10) **実験 SM 耐性菌による同定** １回の試験に，Ａ，Ｂ剤は10カプセル使用し，Ｃ剤は５～10 mg/ml の水溶液を試料として実験に供した．各試料とも1)に準じて調整し，マイクロピペットを使用して試料液の 40 μl ずつを１検体２枚の滅菌ディスクに吸収させた．ただちに9)で調整した４種の平板上に試料吸収したディスクを水平に置き，ピペットの先で軽く押える．対照には 4μg/ml ＳM標準希釈液を同様に２枚のディスクに吸収させ，試料と同一平板上に置く．37°，18～20 時間培養後，*B. subtilis* ATCC 6633，*E. coli*-NIHJ-C_1 株含有平板上のディスク周囲に出現する明確な阻止円と，実験ＳM耐性 *B. subtilis* ATCC 6633，実験 SM 耐性 *E. coli*-NIHJ-C_1株が示すディスク周囲の阻止円形成阻害を観察する．

11) **Ｒ因子によって生産されるＳM不活化酵素による同定** 試料の前処理は全て耐性菌利用の例と同様であるが，理化学試験の前処理操作を実施したＳM含有分画液を，更に100°30～40分間加熱処理をし蛋白分解酵素作用を完全に不活化させた後，試料液とした．蛋白分解酵素作用の不活化確認は，カゼイン消化力試験によった．カゼイン消化試験は蛋白分解酵素が示すカゼイン消化効力を，蛋白沈殿試薬 (0.1M三塩化酢酸，0.2M酢酸，及び 0.2Ｍ酢酸ナトリウム) が加えられたカゼイン上清液に

ついて Folin—Ciocaltau 試薬呈色の濃度によって判定した．しかし，SMも同試薬により発色するので，空試験を実施し，空試験の呈色を標準にした．

SM不活化酵素による試料中の残留SMの不活化試験は，表1に従って実施する．実験は double で行い，培養，遠心等を除き全て氷中で実施し，使用する試薬類も氷中に保存する．試薬類を試料に順次加え，37°，2時間振盪浴中に入れて酵素反応を進める．続いて，沸騰浴中に入れてこの酵素反応を停止させ，冷却後，3000rpm，15分間遠心する．得られた上清液はディスク及び9)で調製された *B. subtilis* ATCC 6633 の平板を利用して不活化されたSMを観察する．

試験に使用した酵素は，順天堂大学横田健教授の好意により，分与を受けたものである．

E. coli YE-100/VR_1 を L-Broth に増菌し，氷中で超音波（10KC，30秒3回）処理をして菌体を破壊し，0°，10,000rpm，30分遠心する．その上清液が，当試験に使用した酵素液である．なお，この酵素液のSM不活化能力の測定は次のように実施した．標準 SM 液（0.1 mg/m*l*）に酵素原液及び5倍希釈液（希釈は 147mM-Tris 塩酸緩衝液）を加え，この2組の酵素液が不活化するSM量をディスク法により測定した残留SM量から逆算し，この酵素液のSM不活化能力とした．

Table 1. The procedure for enzymatic inactivation of streptomycin by cell-free extract obtained from *E. coli* YE-100/VR_1

Reagent	Standard		Sample		Control
R-buffer	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
ATP	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SM	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1
EM	0.1 a	0.1 b	0.1 a	0.1 b	0.0
Sample	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
Buffer	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Total(m*l*)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

30° 2 hr → 100° 3 min. ↓ heat → 3000 rpm.
15 min. → supernatant → bioassay.

Note: EM or a; cell-free extract obtained from E. coli YE-100/VR_1 b; cell-free extract diluted (1:4), sample; test solution, buffer; 147 mM Tris-HCL buffer

12) **Streptomycin 定量法** 日本標準抗生物質医薬品基準[1]に準じて，SM 原液 400 μg/m*l*（力価）を調製し，原液は4°に保存，用時原液より 0.1M リン酸カリ緩衝液（7.8～8.0）を使用し，正確に1m*l* 中，2，4，10 μg/m*l*（力価）の希釈液を調製する．これら3種の希釈液は，標準曲線法の標準液として使用し，その中心常用標準希釈液は4 μg/m*l*（力価）とした．直径 90 mm 滅菌浅型プラスチックシャーレに，基層用として滅菌溶解した Antibiotic medium No. 5 の培地 7m*l* を分注し，水平に保持して放冷し平板とした．8）で調製された *B. subtilis* ATCC 6633 浮遊液の 3m*l* を上記平板上に分注し，芽胞浮遊液が培地表面に均等に広がるように平板をすばやく前後に傾け，水平に保って室温に放置する．この平板を1剤の試料につき3枚用意し，各平板には試料 40 μ*l* を吸収させたディスク2枚と標準 SM 4 μg/m*l* の 40 μ*l* を吸収したディスク2枚を配置した．約1時間，4°に放置した後，37°，18～20時間培養し，出現した阻止円をノギスを用いて 0.5mm まで正確に測定した．試料ディスクの測定値は，同時平板上で測定した4μg/m*l* ディスク測定値と下記で作成された標準曲線の4μg/m*l* 平均値との比率値によって補正され，3平板6ディスク平均値が求められる．試料中のSM濃度は，この得られた測定値の示す標準曲線上の値から得られた．

13) **標準曲線作成** SM定量平板を5枚用意し，各平板上に12)で調製した希釈液2，10 μg/m*l* の 40 μ*l* 吸収した2ディスクと4 μg/m*l* を 40μ*l* 吸収した2ディスクの計4枚を12)の操作に準じて配置する．約1時間 4° に放置後，37°，18～20時間培養，出現した阻止円を計測し，片対数表に標準曲線を画く．SM 濃度2～10μg/m*l* 間には，出現する阻止円直径とSM濃度の間に直線関係が成立した．

(II)—B 実験方法（理化学的方法）

1) **試料** A，B剤共に，一度の試験に40カプセルを使用し，カプセル剤中に含有される淡かっ色顆粒を合計して試料として供した．

2) **使用器機** 二波長分光光度計：日立356型，Rectangular operated Fraction Collector 5F-160K, To Yo Uvicon 540M 280nm フィルター使用

3) **使用試薬** 坂口反応：70%アルコール性0.1% α-ナフトール液，5%次亜塩素酸ナトリウム，ニトロプルシッド呈色反応：ニトロプルシッドナトリウム，赤血塩，水酸化ナトリウム各10%液

Elson-Morgan：2% アセチルアセトン 1N 水酸化ナトリウム液，Ehrich 試薬

Maltol 反応：5%水酸化ナトリウム液，2%炭酸ソーダ液，Folin-Ciocaltau 試薬

4) **Streptomycin の分離確認** 40カプセル分の A，B剤は，生物学的検査法と同様の方法で崩壊調製した試料を試料原液とした．試料原液はまず，collodion bag で吸引沪過し，沪液はNa型にした樹脂塔を流下させてSMが吸着される．溶出には1N—硫酸液を用いて，溶

出液は Fraction collecter (280nmフィルタ付) で分画採取し，各分画液は紫外部吸収と生物学的同定法によって，SM含有，非含有分画液に分別された．なお，生物学的同定には，分画液の pH を約 7.0～8.0 に調製して，生物学的同定法に記述した *B. subtilis* ATCC 6633 含有の長方形シャーレ平板を使用した．SM含有が確認された分画液は集められて 5～6 m*l* まで減圧濃縮され，冷却放置して析出する硫酸ソーダの結晶をグラスフィルター $3G_3$ を用いて除去し約 pH 5.0 の沪液 4 m*l* が得られた．この沪液の 0.6～1.0 m*l* を，前処理済の sephadex G15 又は G25 のゲルに添加してゲル沪過を実施した．溶出には水を用い，ゲル中に分配された SM を溶出する．続いて樹脂塔の場合と同様に，分画液中のSM含有部位を確認し，この分画液を集め濃縮して，下記の理化学試験の確認反応に供した．なお，理化学試験の確認反応に使用した試液は，濃縮液を数回に分けてゲル沪過したSM陽性分画液の集合液である．

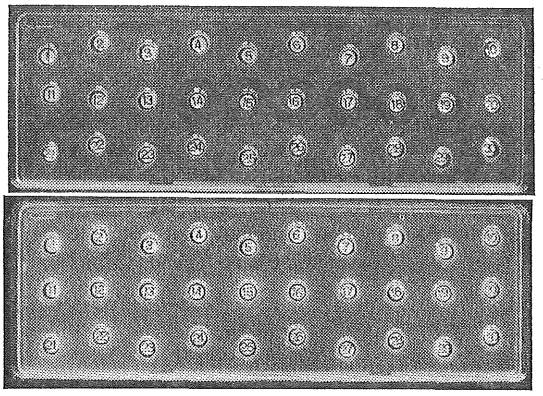


Photo. 1　The test solution eluted by resin or gel-filtration was poured into the cavities in the rectangular agar plate mixing with streptomycin-sensitive and resistant *B. subtilis* ATCC 6633.
Note. Upper plate ; streptomycin-sensitive *B. subtilis* ATCC 6633. Lower plate : streptomycin-resistant *B. subtilis* ATCC 6633

5) **確認反応**　坂口反応：70%アルコール性0.1% α-ナフトール液2～3滴，及び次亜塩素酸ナトリウム液2～3滴を滴下すると，赤色を呈する．

ニトロプルシッドナトリウム反応：各10%溶液のニトロプルシッドナトリウム，赤血塩，水酸化ナトリウムの各3 m*l* を合せ，3倍の水で希釈する．30分放置して暗かっ色が橙色に変化した後，試薬として使用する．SMとの反応液は橙赤色を呈する．

Elson-Morgan：試料液に2%アセチルアセトン1m*l*，1N水酸化ナトリウム1 m*l* を加え，約10分間沸騰水浴中で加熱後，放冷する．冷後 Ehrich 試薬の 2 m*l* を加えると桃色を呈する．

Maltol 法：試料液 5 m*l* に2N水酸化ナトリウム 1 m*l* を加え煮沸水浴中で3分間加熱した後，冷却する．生成した Maltol は，Maltol が示す 320nm 付近の極大吸収を確認し，測定された．紫外部吸収を測定後，続いて Folin-Ciocaltau 試薬を 1 m*l*，1～2 分後，20%炭酸ソーダ 3 m*l* を加え，濃青紺色の発色を観察した．

6) **高速液体クロマトグラフィーによる本酵素製剤中より Streptomycin の分離**　C剤を試料とし，その5 mg を秤量し水 1 m*l* に溶解したのち，その 10 μl を注入した．標準SM 1 mg/m*l* の 5 μl，10 μl，15 μl を注入して，SM出現ピーク位置を確認し，同一条件下で試料を注入して出現するSMピーク部分液を分取した．分取液は，生物学的同定法によってSMの含有を確認した．

(III) 実験成績

1) **B. subtilis ATCC 6633 及び実験 SM 耐性 B. subtilis ATCC 6633**　製剤中の残留SMの検出にグラム陰性陽性両菌の実験耐性菌株を使用した結果，原株の *B. subtilis* ATCC 6633 と *E. coli*-NIHJ-C_1 含有平板には，試料添加ディスク周囲に阻止帯が出現し，作成した原株耐性両株の含有平板には阻止帯が観察されなかった．使用した実験SM *B. subtilis* ATCC 6633 の SM 耐性限界は，ディスクによる本法では 750 μg/m*l* までであった．使用株は，原株，耐性株共にクロラムフェニコール，テトラサイクリン，カナマイシンの3種抗生物質に対し感受性である．試料の3酵素製剤は，本試験に供された結果，3剤とも試料添加ディスク周囲に明確な阻止帯を出現させ，SMの残留が推定された．

2) **SM不活化酵素による同定**　試料中のSM同定試験に使用した SM 不活化酵素は，添加した SM 標準液 (0.1mg/m*l*) を 98%不活化した．このSM不活化酵素を用い，3酵素製剤から得られたゲル沪過1分画液中のSMを不活化すると，含有される SM は全て不活化され，*B. subtilis* ATCC 6633 平板を用いた試料添加ディスク周囲には阻止帯は出現せず，*B. subtilis* ATCC 6633 の好発育が観察された．この結果によって，3酵素製剤中に含有される抗菌性物質はSMであると確認した．

3) **ディスク法による Streptomycin の定量**　残留確定されたSMの定量試験は，作成した標準曲線からA剤1カプセル中にSM92.2±17.0 μg (力価)，又1カプセ

---

* Waters Associate Inc, ALG/GPC—202/401

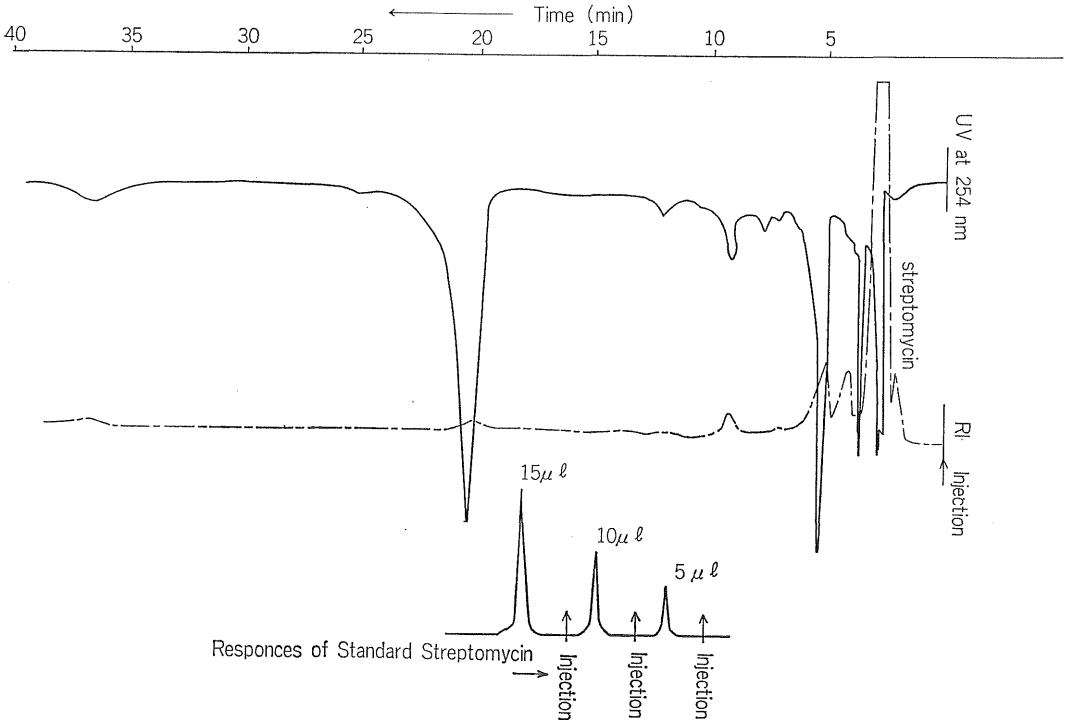


Fig. 1 Fast liquid chromatography of proteolitic enzyme
Instrument; Waters associate inc. ALG/GPO-202/401. Detector; UV at 254nm, Refractiv Index. Column Size; 4mm×30cm, Column pressure; 210kg/cm². Packing; μ Bondapak-C_{18}. Sample and Size; 5mg/m*l* Proteolitic enzyme solut. 10 μ*l*. Flow Rate; 2 m*l*/min. Chart Speed; 2 cm/min. Mobile Phase; Water.

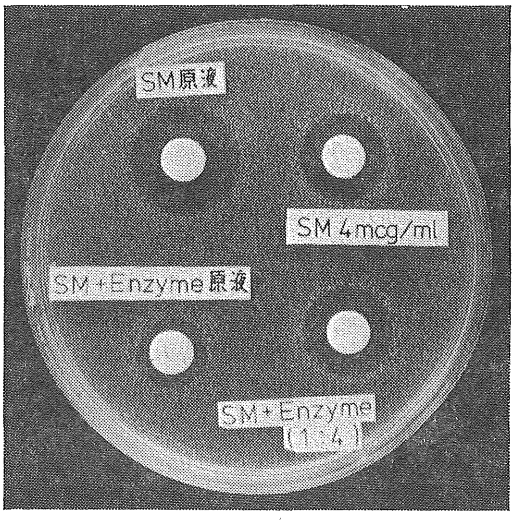


Photo. 2 Enzymatic inactivation of streptomycin by R facter-resistant *E. coli* YE-100/VR_1
Note. SM: streptomycin solution 0.1 mg/m*l*, SM+Enzyme: streptomycin solution 0.1 mg/m*l* +cell-free extract obtained from *E. coli* YE-100 /VR_1, SM+Enzyme (1:4): streptomycin solution 0.1 mg/m*l*+cell-free extract diluted (1:4), SM 4mcg/m*l*: standard streptomycin solution

ル中に含有される蛋白分解酵素1 mg 中に SM 12.3 ± 2.3 μg (力価). 測定値変動率 CV=18.5% n=32. B 剤カプセル中に, SM 55.1±8.9 μg (力価), 又1カプセル中に含有される蛋白分解酵素1 mg 中にSM 11.0± 1.8 μg (力価), 測定値変動率 CV=16.1% n=21. C 剤1 mg 中にSM 11.1±1.3 μg (力値), 測定値変動率 CV=11.7% n=9 を測定した.

4) **ディスク法の検討** SM定量試験は, 日本抗生物質医薬品基準解説[1,2]によると, 円筒平板法, 比濁法の併用が記載されているが, 標準SMを使用してディスク法を試みた結果, 良好な成績が得られたのでディスク法によって試料濃度を測定した. 即ち, 作成した標準曲線

は，SM 2 μg から 10 μg/ml の濃度範囲内において，定量平板上に出現する阻止円直径と，SM濃度との間には直線関係が存在し，回帰直線は $y=0.044\chi+1.470$，$r=0.921$，$n=33$ であった．SMの2，4，10 μg/ml の阻止円はそれぞれ平均15.4，17.2，19.1mm が計測された．なお，3回の本定量試験の結果得られた3標準曲線は，信頼区間95％，$n=89$，$y=0.047\chi+1.559$，$r=0.728$ の回帰直線であった．

5) **理化学試験による確認** 理化学試験の確認反応は，試料3剤共陽性成績を与えた．対照には，標準SMを使用し，試料液と対比した．

6) **酵素製剤より Streptomycin の分離検討** SMの酵素製剤からの分離検討は，collodion bag，樹脂，ゲル沪過等いずれの場合も完全には分離せず，分画液中に酵素の残留が認められた．イオン交換樹脂による分離は強酸を溶出に使用する結果，SMの分解が観察され，ゲル沪過による分離には長時間を必要とし，その結果はイオン交換と同様に，酵素類とは完全分離はしなかった．高速液体クロマトグラフィーは，試料分取カラムの検討が必要であるが，微量な試料からSMを検出する操作法の1つとしてその可能性を示し，その分取液は，生物学的同定法によって検査した結果，*B. subtilis* 平板法に明らかな阻止帯を作って，SM含有分画液である事が確認された．なお，上記分離操作によって得られた3酵素製剤の分取液は，生物学的試験，理化学的試験によっても全てSM陽性の結果を示し，酵素製剤中にSM含有が確認された．

考　察

試料中の蛋白分解酵素は，イオン交換樹脂，ゲル沪過等の実験中に画かれた 280nm の吸収ピークから，約4種の酵素組成に大別され，高速体クロマトグラフィーの実験成績から，これは11種の酵素組成に組分けされて，分子量もそれぞれ約1～2万と推定された．この結果は，奈良橋等の結果[3,4]とほぼ一致している．なお，本酵素製剤には，酵素活性保持の目的で酢酸カルシウムが多量に添加されている(原子吸光測定による添加量：7.1％)．今回の酵素剤に残留するSMの検出同定には，理化学的試験と生物学的試験を併用したが，生物学的試験は試料が微量，不純であっても測定出来得たので，多くの前処理を必要とした理化学的試験に比較して，簡便で有効であることが認められた．グラム陰性，陽性2種の各1株から作成した，実験SM耐性菌の試料に示す耐性は，原株の示す感受性から試料中の混入物はSMと推定させ，他の抗菌性物質の存在を否定させた．R因子によって生産されるSM不活性酵素は，SMの不活化には補酵素ATPを必要とし，この補酵素との組合わせによるSM不活化は，非常に特異的な反応である．この方法を3製剤に応用した結果，試料中の抗菌性物質は不活化され，含有される抗菌性物質をSMと確定した．なお，不活化酵素によるSM同定報告[5]は極めて少ないが，著者らの今回の経験では，不活化酵素産生菌が入手できるものであればSMの同定にすぐれた方法であることが実証された．SM定量法の円筒平板法，比濁法は共に測定技術に熟練を必要とし，一方ディスク法については多く検討されてはいるが，[6-9] 著者らの方法は，正確性，簡便性で優れ，ディスク吸着試料を 25 μl に減量させても測定が可能であった．しかし3製剤共に試料液は，失活，滅菌及び蛋白沈殿等の効果を勘案して加熱操作が加えられたものなので，測定されたSM定量値は絶対値ではないと考察している．高速液体クロマトグラフィーによるSMの分離確認報告例は知られていないであろう．分取カラム，溶媒等について更に検討すれば，今後この方法は，微量の試料から定量的にSMを分取し，SM濃度測定も可能であることを示唆した．

ま と め

市販消炎酵素製剤3剤中に残留するSMの検出同定試験を実施した．主として *B. subtilis* ATCC 6633 と *E. coli*-NIHJ-C_1 株を原株とした両株の実験SM耐性株を用い，3酵素製剤試料液の原株に対する感受性，耐性株による耐性によって3製剤中にSM残留を推定した．ついで，SM不活性酵素による実験によって3製剤中に残留する抗性物質は，SMと確定した．残留SMは，ディスク法によって次の定量測定値を得た．

A：1カプセル中　92.2±17.0 μg（力価）
B：1カプセル中　55.1±8.9 μg（力価）
C：酵素1mg 中　11.1±1.3 μg（力価）

文　献

1) 日本抗生物質医薬品基準解説：薬業時報社　1974
厚生省薬務局監修
2) 日本抗生物質医薬品基準解説：薬業時報社　1969
厚生省薬務局監修
3) Narahashi, Y.: *J. Biochemistry*, 64, 4, 1968
4) Narahashi, Y.: *J. Biochemistry*, 62, 6, 1967
5) Yamada, T. Tipper, D. and Davies, J.: *Nature*, 219 (July 20) 288, 1968
6) Loo, X. A. *et al.*: *J. Bacteriology*, 60, 701, 1945
7) 古橋進三郎他：*J. Antibiotics*, 3, 302, 1950
8) 宮村定男他：*ibid*, 3, 411, 1950
9) 金沢　裕：*ibid*, 2, 780, 1949

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, 26-1, 42—46, 1975

小笠原父島住民の広東住血線虫感染症の疫学調査

加納 堯子* 村田 以和夫* 門野 義雄*
大久保 暢夫* 浅沼 邦広**

Epidemiological Surveys for the Prevalence of Angiostrongyliasis among Inhabitants of Chichijima of the Ogasawara Islands

TAKAKO KANOH*, IWAO MURATA*, YOSHIO KADONO*,
NOBUO OHKUBO* and KUNIHIRO ASANUMA**

An attempt to detect the antibody to *Angiostrongylus cantonensis* was made on the 54 serum specimens obtained, in the period from 9 to 21 June. 1974, from the inhabitants of the Chichijima Island. In this test, crude extract of the organism was used as antigens both for complement fixation (CF) and Ouchterlony double diffusion tests. Consequently, it was found that 1 out of 54 sera tested by CF showed an antibody titer of 1 : 20, while 52 sera showing less than 1 : 10 and the remaining one serum showed anti-complementaly reaction. At the same time, however, all the 3-times concentrated serum specimens showed negative results when they were tested by the Ouchterlony technique. The person who showed an antibody titer of 1 : 20 by CF was further subjected to detect the organism or its eggs from the fecal specimen and to check his hemogram simultaneously, and then, he was found to be completely normal.

In view of the above results, we reached the conclusion that either all the 54 person, had an extremely low level of antibody titer or none of them actually suffered from angiostrongyliasis.

小笠原諸島の環境調査は本土復帰に伴い各分野から実施され，その報告も多い.[1-3] しかし広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis* に関する報告は本線虫の中間宿主体であるアフリカマイマイ *Achatina fulica* の分布，密度，本線虫寄生率及び宿主体であるネズミ類の調査報告があるに過ぎない[1,2].

従来，広東住血線虫は，太平洋諸島，台湾，東南アジアの広汎な熱帯，亜熱帯地域に分布するものとされていたが，近年，沖縄，宮古島，石垣島，西表島等にもその生息が報告され，[3-7] 更に好酸球性髄膜脳炎が本線虫に起因するものであることが確実視されてから注目をあびる様になった．日本における本症発症例の報告は沖縄の4例のみであるが，前記の環境調査により，小笠原父島に多産するアフリカマイマイ及びネズミには高率に本線虫が検出されて島民への感染が憂慮されている.[2,3]

今回著者らは，都衛生局の依頼により，1974年6月，父島住民の本線虫感染の実態調査を行う機会を得て，本島住民の本線虫感染による抗体保有状況から感染の有無を明らかにしようと試みた．本調査結果からは感染を疑われる島民は検出されなかったが頻繁な海外渡航の昨今，本線虫感染時の血清診断に，又今後の本線虫感染症の疫学資料に資するため調査結果について報告する．

調査地概要

小笠原諸島とは太平洋上北緯26度33分から27度44分，東経136度05分から153度58分の間に散在する約30の島々の総称であって中心となる島々は大別して4つの列島に分けられ，北より聟島，父島，母島，硫黄列島と南に進んでいる．著者らの調査地父島は，父島列島に属し小笠原諸島中最大で，東京より約 1,000 km 離れた南北8 km，東西5 km，周囲 52 km，面積 24 km^2 の島である．その中央部に海抜 321m の中央山があり，二見湾沿いの大村と扇浦にわずかに平地を有する外は，島のほとんどは山岳地である．気候的には，熱帯と亜熱帯の移行帯に位置し，年間平均気温 22.6°，年間降水量 1,600mm の海洋性気候の島々である．人口は，在来島民 156，旧島民488，その他 370，と公務，土木関係の短期滞在者 538

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　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
**東京都衛生局公衆衛生部防疫課

名の計1,552名より構成される（昭和48年度調査数）．動植物相は極めて貧弱であるがこれらが放任され野性化されている点では学術的に貴重な地域とされている．アフリカマイマイはアフリカ原産の大型カタツムリで，非常に雑食性で各種野菜，果実等の茎葉を食害し繁殖能力が極めて旺盛な恐るべき有害動物である．現在，父島での最大の農業害虫で，殺虫剤による駆除も効果なく，小中学生の協力による捕獲買上を実施している程である．又，植物防疫法により本土への移動が禁止されている．

材料及び方法

1） 材料

(1) 広東住血線虫

父島におけるアフリカマイマイの分布とその密度は堀等によると，二見港湾，扇浦，小曲，小港地域に特に高く，多湿を好み昼間は落葉下，又は石の間等に潜んで，夜間，早朝に活動すると報告されている．[2] 著者らは採取地を小曲，小港地域の二地点に定め，夜間2回にわけて本線虫が高率に寄生するという殻長7～9cm，殻幅4cmのものを選んで約1,500ケ採取した．採取した貝は現地において殻をたたき砕細して取り除き，貝を細くきざんだ後，1％塩酸ペプシン液による消化法で，37～40°の孵卵器に約30分間放置，ガーゼで沪過し遊出した第三期幼虫の有無を実体顕微鏡で調べた．遊出を確認した後遠心機にかけ，沈渣を収集し4°保存，輸送した．当研究所に搬入後，5,000倍希釈濃度にチメロサールを加えて4°保存管理した．本線虫第三期幼虫は，平均体長0.45mm，平均体幅0.02mmである．

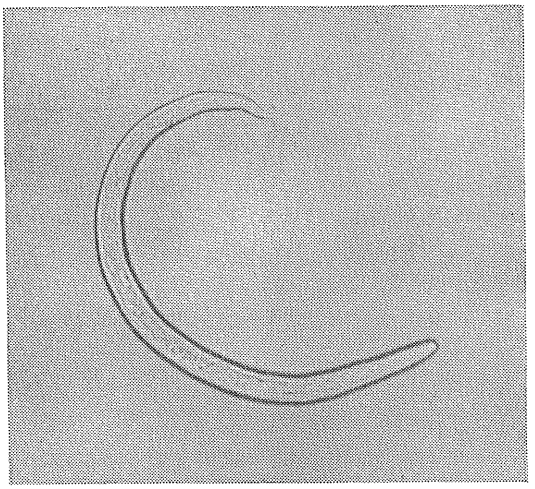


Photo. 1　3rd-stage larva of *Angiostrongylus cantonensis*

(2) 島民血清

島民54名より血液約5 m*l*を無菌的に採血し遠心して血清分離後，血清を無菌的に分取し4°で保存，研究室に搬入後は−75°で保存管理した．被検査島民は，存来島民，旧島民，2年以上滞在者に区分し選別された検査希望者である．その性，年齢，検査数等は表1に示す通りである．

表1　検査対象者一欄表

区分	年齢(代)	10	20	30	40	50	60	計	合計
在来島民	男		2		3	3	1	9	19
	女	1			6	3		10	
旧島民	男		2	2	2	2	1	9	19
	女		2	3	4		1	10	
その他	男		1	6	4			11	16
	女		2	2		1		5	
計	男		5	8	9	5	2	29	54
	女	1	4	5	10	4	1	25	

2） 方法

寄生虫疾患の補助的診断法として皮内反応，補体結合反応，沈降反応，凝集反応，螢光抗体法等の各種の検査法が日常検査に応用されてはいるが，広東住血線虫症の確定診断に有用な検査法は未だ確立されていない．著者らは，これら免疫血清学的診断法の内，現在のり患の有無と関係が深く診断的価値が高いといわれる補体結合反応と疾病の確定に特異性が高く反応感度の高いゲル内沈降反応とを応用し検討を進めた．なお第三期幼虫は免疫学的診断法の検討，および特異抗原液作成等の研究用標本として保存し，千葉大学医学部寄生虫教室より分与を受けた抗原液を使用した．この抗原用虫体は終宿主となるラットに第三期幼虫を感染させて得た成虫の広東住血線虫である．

(1) 補体結合反応

(イ) 粗抗原の調製

凍結乾燥虫体100 mgに10 m*l*のエーテルを加え氷中でホモジナイザーにより10分間摩砕し，5 m*l*のエーテルでホモジナイザー容器を洗浄し，溶液を集め，4°で30分間10,000 rpm，遠心し上清を捨て，更に沈渣よりエーテルを除去し，乾燥した沈渣に以下の処方のベロナール緩衝食塩液（pH 7.4）10 m*l*を加え4°で48時間冷抽出を行った．ついで13,000 rpmで抽出液を遠心しこの上清を粗抗原液として使用した．粗抗原液は100倍抽出液でStoch antigenとして保存され，用時，下記の緩衝食塩液50 m*l*で希釈した5,000倍液，又はLowry

法によりその蛋白量を150 μg/ml に調整した抗原液を使用した．著者らが使用した粗抗原液の蛋白濃度は150 μg/ml である．

ベロナール緩衝液 Stoch solution (VBS) の製法 (Mayer *et al.* 1948)

塩化ナトリウム：41.90 g，炭酸水素ナトリウム：1.26 g，溶性バルビタール (Sod. 5.5-diethyl barbiturate)：1.50 g，バルビタール (5.5-diethyl barbituric acid)：2.30 g

以上を滅菌精製水にとかして全量 1,000 ml とする．VBS 液として使用する際は Stoch solution 1 容に対して 4 容の精製水を加えて希釈する．この時のＶＢＳ希釈液の pH は 7.3～7.4 である．

(ロ) 標準血球浮遊液

市販の緬羊保存血球に約15倍量のＶＢＳ希釈液を加えて数回洗浄する．この洗浄血球沈渣にＶＢＳ希釈液を加え５％血球浮遊液を作る．この５％血球浮遊液 1 ml に 0.01％炭酸水素ナトリウム溶液 14ml を加え完全溶血を生じさせ光電光度計 (Beckman) を用いて波長 541 nm のＯ．Ｄ．を測定する．この際なお，完全溶血のＯ．Ｄ．が常に 0.600 になるようにＶＢＳ希釈液で補正した．なおＯ．Ｄ．が0.600±0.005なら使用し得る．このように補正された血球濃度液は約 10^9/ml 個の赤血球を含み，これを標準血球浮遊液とする．

(ハ) 感作血球浮遊液

作成した標準血球浮遊液にＶＢＳ希釈液で２単位の割合に希釈した市販の溶血素を同量加えて 37° の水浴中で30分間感作させる．感作血球液は使用時まで氷室に貯え使用に際してはよく振盪して用いる．

(ニ) 補体

市販の乾燥補体をＶＢＳ希釈液で溶解し光電光度計により 50％溶血単位 ($C'H_{50}$) を測定し，補体給合反応実施にあたってはその 2.5 単位を用いる．著者ら使用の補体はその $C'H_{50}$ 平均値 187.5 であり 2.5 $C'H_{50}$/ml は 75 倍にＶＢＳ希釈液で希釈したものに相当する．

(ホ) 被検血清

−75°に保管されていた被検血清は56°の水浴中で30分間非働化する．

(ヘ) 補体結合反応術式

補体結合反応の術式は表２に従って行う．まず非働化した血清をＶＢＳ希釈液で10倍に希釈し，この液を基として順次 160 倍まで倍数希釈を行い定量的に反応を実施する．対照には10倍希釈液と抗原の代りにＶＢＳ希釈液を加える．この対照を除いた 10～160 倍希釈の５本の試験管に抗原を入れ，次に対照を含めた全試験管に補体を加える．これを 0～4° の氷室に４時間入れて抗原抗体反応を惹起させ，その後 37° 水浴槽中で10分間加温，全試験管に感作血球，ＶＢＳ液を加え，更に 37° １時間加温，反応を終了させる．反応終了後に全試験管を遠心沈澱させ，この上清を 541nm の波長の光電光度計にかけてＯ．Ｄ．を読み，これを0.600で除して各試験管の溶血百分率を出し，これより50％溶血点を算出する．

表２　補体結合反応術式

試験管番号	Ⅰ（対照）	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ
希釈倍数	×10	×10	×20	×40	×80	×160
1/10 希釈血清	0.4 ml	0.4	0.4 ↗	0.4 ↗	0.4 ↗	0.4 ↗
ＶＢＳ液	—	—	0.4 ↗	0.4 ↗	0.4 ↗	0.4 ↗
ＶＢＳ液	0.4	—	—	—	—	—
抗原	—	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
25 単位補体	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
振盪混合後 4°C で4時間 → 37°C で10分間反応						
２単位感作血球	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
振盪混合後 37°C で１時間反応						
ＶＢＳ液	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Ｏ．Ｄ．測定（50％溶血抗体価を算出する）						

(2) ゲル内沈降反応

(イ) 抗原の検定方法

Ouchterlony により抗原液の最適濃度を検討する．90 mg の agarose を 10 ml のベロナール塩酸緩衝液 (pH 8.6, μ=0.1) で加熱溶解しこの agarose 溶解液を，水平に保たれたガラス板 (11.0cm×5.8cm) の上に流して固め，厚さ約 1.6 mm の寒天平板を作成した。これに孔間 6 mm になるように直径 4 mm の孔を６ケあ

け，本線虫高度感染ラットの血清を中央に，その周囲の孔に倍数希釈した抗原液を加える．著者らが使用した抗原液は最高蛋白濃度 8,000 μg/ml で，以下4000，2000，1000，500，250 μg/ml と倍数希釈した液である．室温で12時間，その後4°で48時間反応させ観察箱を用いて沈降線の判定を行う．著者らが実施した例では 8000μg/ml が最適であった．写真2参照

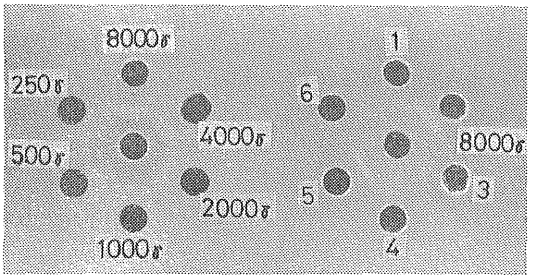


Photo. 2　Ouchterlony double diffusion test

次に，得られた最適濃度の抗原液を中心ホールに満たし，周囲に本線虫感染ラットの血清を満たして，抗原液としての適否を観察しこの液の反応感度を確認する．

(ロ)　反応術式

被検血清を凍結乾燥しＶＢＳ希釈液を用い原液に対して 1/3 濃縮濃度に溶解する．最適濃度の抗原液を中央孔に，被検血清を周囲孔に注入し，室温で24時間，沈降線が同定できぬ場合は更に24時間継続して反応させ，その後4°で24時間放置する．観察箱で沈降線を同定し，精製水で洗浄，以後は常法通りの操作で寒天平板を処理し保存する．

調査成績

本調査では小笠原父島住民の広東住血線虫による感染の有無を検討するために成虫粗抗原液を使用して補体結合反応，ゲル内沈降反応法を併用し抗体保有状況を調査した．その成績は表３に示すとおりである．被検査島民の中には，過ぎる戦時下食料不足を補うため又，興味よりアフリカマイマイを摂食した経験者や素手で取り扱っていた者等，数名が含まれていたが，何れも何ら自覚症状を呈していない．現在では，本線虫がアフリカマイマイに多数寄生すること，又好酸球性髄膜脳炎が本線虫感染に起因すること等の調査結果が周知され，素手で扱う島民は皆無である．

補体結合反応の結果，２例の血清を除いては全て陰性であった．その１例 No. 2 の血清は対照試験も非溶血で抗補体性を示し No. 19 の血清は 20 倍以上の陽性結果を示したが何れも Ouchterlony 法の検査結果は陰性で異常無しと判定された．なお後者の No. 19 の島民につ

表３　検査成績表

番号	補体結合反応	Ouchterlony	番号	補体結合反応	Ouchterlony
1	陰　性	陰　性	28	陰　性	陰　性
2	抗補体反応	〃	29	〃	〃
3	陰　性	〃	30	〃	〃
4	〃	〃	31	〃	〃
5	〃	〃	32	〃	〃
6	〃	〃	33	〃	〃
7	〃	〃	34	〃	〃
8	〃	〃	35	〃	〃
9	〃	〃	36	〃	〃
10	〃	〃	37	〃	〃
11	〃	〃	38	〃	〃
12	〃	〃	39	〃	〃
13	〃	〃	40	〃	〃
14	〃	〃	41	〃	〃
15	〃	〃	42	〃	〃
16	〃	〃	43	〃	〃
17	〃	〃	44	〃	〃
18	〃	〃	45	〃	〃
19	×20〈陽性	〃	46	〃	〃
20	陰　性	〃	47	〃	〃
21	〃	〃	48	〃	〃
22	〃	〃	49	〃	〃
23	〃	〃	50	〃	〃
24	〃	〃	51	〃	〃
25	〃	〃	52	〃	〃
26	〃	〃	53	〃	〃
27	〃	〃	54	〃	〃

いては後日，検便と血液像の観察を実施した．直接法，沈澱法，浮遊法の三法による寄生虫検査の結果は，いずれの検査法によっても虫体，虫卵は検出されず，血液像は，好酸球８，好中球35，リンパ球57／白血球 100 で共に異常は認められなかった．

考　　察

本線虫に起因する広東住血線虫症は，従来熱帯，亜熱帯地域に多く報告されていたが，札幌の家ネズミから，[9] 東京湾，横浜，川崎港湾地の住家ネズミ，ナメクジ等からも多数発見され，[10~12] 淡水産のエビも中間宿主となり得るという報告で，本線虫の分布はかなり広く人間への感染機会を拡大しているものと思われる．典型的な広東住血線虫症，すなわち好酸球性髄膜脳炎の診断は，特有な臨床所見と髄液所見で従来行われているが，他疾患との鑑別診断又は決定的診断は髄液所見によられる．しかし多数の患者が流行的に発生すれば診断が容易であろうが，散発性の場合多くは鑑別困難である．一般に，寄生虫感染症の最も確実な診断は，直接人体或いは排泄物よ

り虫体，虫卵を証明する方法がとられるが，本線虫のように，脳，肺動脈などの異所寄生等，寄生部位に関係して全く患者の体外に虫卵，虫体が排泄されることが無い場合は，免疫学的な補助診断の成績にたよる事も少なくない．本線虫症においても実際に虫体を検出して確定診断を下した例は少なく，そのため本線虫の抽出液，或いは代謝産物を抗原に用いた免疫診断が種々試みられている．[13-15] その多くは皮内反応であり，補体結合反応，ゲル内沈降反応，免疫電気泳動法，間接赤血球凝集反応等も実施されているが，今までのところ必ずしも満足すべき成果は得られていない．本線虫の皮内反応は古くは Horino and Alicata (1961) により，又最近では本年4月大鶴[16]らによって台湾島民の本線虫感染症の疫学調査に適用され，大鶴らは平均陽性32％の報告をしている．著者らの父島における調査では本線虫が入手不能であった理由，交叉反応による陽性率が高いことを思慮して皮内反応は実施しなかった．今回の調査に補体結合反応と Outerlony 法に従った理由は，次のいくつかの実験報告によるものである．

(1) 補体結合反応について

本調査で使用した抗原は，全線虫抽出液すなわち粗抗原を使用したもので，他の寄生虫，特に線虫類との交叉成分が多く含有され，その結果交叉反応が推移される．しかし蠕虫類の動物感染実験，又は臨床診断の人血清の補体結合反応の結果は，完全治癒後は Ouchterlony 法に比較して速やかに陰性に転ずるとされている．

(2) Ouchterlory 法について

蠕虫粗抗原を用いた種々の寄生虫疾患の Ouchterlony 成績の報告がある．それによると，臨床的陽性を確認された患者血清の多くに特異的な沈降帯を認め，特に好酸球増多症では Ouchterlony の結果は診断の裏づけとして十分に役立つといわれている．[17] 本症も感染時には好酸球増加を示す．

(3) 本線虫をラット，サルに経口投与し，経時的採血を行い抗体産生状況を Ouchterlony 法と免疫電気泳動法で調査した報告によると，サルの場合は，Ouchterlony 法の方が抗体産生の経過を沈降線でよく表わし，電気泳動法では確認されなかったといわれる．

このような報告例から勘案して，著者らが併用した作用機序の異なる2つの免疫診断法の組合わせは，本症の浸淫状況を推測するに十分役立ったものと思われる．

ま と め

小笠原父島住民の広東住血線虫感染の疫学調査を実施した．調査方法は，島民の本線虫抗体保有の有無を，本線虫の粗抗原を用い補体結合反応と Ouchterlony を併用して検査し，次の結果が得られた．

① 補体結合反応で検査された54名中1名は抗補体性を示し，1名は20倍以上の陽性結果を示した．その他の検査された島民は全て陰性であった．

② Ouchterlony 法では，以上の陽性者も含めてすべての沈降帯は認められず，全員陰性であった．

③ 補体結合反応で陽性を示した島民は，後日，検便と血液像を観察したが，いずれも異常は認められなかった．

以上の結果から，小笠原父島住民54名には本線虫感染は認められず，これらの結果から島民におけるその浸淫は，著しく低いか，皆無であることが示唆された．

謝辞 稿を終るに当り，本調査に御協力を賜った千葉大学医学部寄生虫学教室の皆様，又小笠原支庁村民課御一同の方々に厚く感謝の意を表します．

文 献

1) 佐々学他：小笠原環境衛生調査，小笠原諸島公衆衛生調査報告，東京都衛生局1，1969
2) 堀栄太郎他：寄生虫学雑誌，23，138，1974
3) 堀栄太郎他：*ibid.* 22 (6) 347, 1973
4) 国吉真英他：*ibid.* 14，655，1965
5) 国吉真英他：熱帯 7，26，1972
6) 堀栄太郎他：寄生虫学雑誌，23，supplement 54，1974
7) Nishimura, et. al.: *Jap. J. Parasit.*, 15, 232, 1966
8) Alicata, J. E.: *Advance in Parasitology*, 3, 223
9) 大林正士他：寄生虫学雑誌 17，1，1965
10) 堀栄太郎他：*ibid.* 18，258，1969
11) 堀栄太郎他：*ibid.* 21，90，1972
12) 堀栄太郎他：*ibid.* 22，209，1973
13) 鈴木俊夫他：*ibid.* 23 (6)，391，1974
14) 佐藤良也他：*ibid.* 23 (1)，supplement 11，1974
15) 佐藤良也他：*ibid.* 23 (2)，42，1974
16) 大鶴正満他：*ibid.* 24，supplement 44，1975
17) 辻守康他：*ibid.* 24，supplement 82，1975
18) 関川弘雄他：寄生虫学雑誌，22，supplement 67，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, 26・1, 47—52, 1975

1974年度に分離されたA群溶連菌の薬剤感受性と菌型について

浅野洋子* 柏木義勝* 柴田 実*
徳江シゲ子* 大久保暢夫*

Antibiotics Sensitivities of Isolates of Group A Hemolytic Streptococci and Their Serotypes in 1974

YOHKO ASANO*, YOSHIKATSU KASHIWAGI*, MINORU SHIBATA*,
SHIGEKO TOKUE* and NOBUO OHKUBO*

A total of 1,735 strains of group A hemolytic streptococci, which consisted of 1,153 isolates from the patients diagnosed as suffering from scarlet fever (group I), 229 from the patients other than scarlet fever (group II), and 353 from the healthy pupils (group III), were tested for their sensitivities against 16 antibiotics.

Consequently, it was found that all the strains of 3 groups tested were sensitive against 5 drugs of penicillin and cephalosporin groups, showing MICs of 0.0031～0.78mcg/ml. The incidence of resistant strains to chloramphenicol was 76.6% in the group I, 51.9% in the group II, and 43.3% in the group III isolates respectively. The incidence to tetracyclin was about 85% in the both groups I and II, and 68.2% in the group III isolates, and the one to 9 macrolides was about 75% in the group I, about 60% in the group II, and about 30% in the group III isolates respectively.

The most prevalent serotype of the organism was type 12, and it accounted for about 75～90% of the isolates of the groups I and II, and 47% of the group III.

緒　言

我々は，1965年以来，A群溶血レンサ球菌（以下溶連菌と略す）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[1-3]，考察を加えてきた．今回は，1974年度に分離された猩紅熱，猩紅熱以外の溶連菌感染症，及び，健康学童由来の溶連菌について，薬剤感受性及び菌型について，検討したので，報告する．

材料ならびに方法

供試菌株及びその収集施設

1) 猩紅熱由来株：1153株……札幌市立札幌病院，札幌市立衛生研究所，都立荏原病院，都立豊島病院，都立墨東病院，横浜市立万治病院，大阪市立桃山病院

2) 猩紅熱以外の溶連菌感染症由来株：229株……神戸市立中央市民病院，松江赤十字病院

3) 健康学童由来株：353株…… 大阪市立桃山病院，横浜市立万治病院，都立衛生研究所

なお，これらの一部の菌株については，国立予防衛生研究所又は，神奈川県衛生研究所において，群，型別が行なわれた．

供試薬剤

Penicillin G (PC G), aminobenzylpenicillin (ABPC), cephalexin(CEX), chloramphenicol(CP), tetracyclin(TC), erythromycin (EM), oleandomycin (OL), josamycin (JM) の8剤について検討した．なお，一部の猩紅熱由来株については下記の薬剤も追加した．Leucomycin (LM), propionylmaridomycin (PMDM), acetylspiramycin (ACSPM), mydecamycin(MDM). clindamycin (CLDM), cephaloridine (CER), cephazolin (CEZ)

これらの薬剤は，すべて重量単位で供試した．

感受性測定法

上記菌株は，血液寒天平板で集落選別後，tryptosoy broth（栄研化学）で増菌し，tryptosoy agar（栄研化学）を用いて，化学療法学会標準法（改訂された最小発育阻止濃度（MIC）測定法[4]）に従って，感受性を測定した．

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　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 Distribution of MICs of antibiotics calculated on group A hemolytic streptococci originally isolated from the patients of scarlet fever in 1974.

Antibiotics / MIC (mcg/ml)	PC G	ABPC	CEX	CP	TC	EM	OL	JM	LM	PMDM	ACSPM	MDM	LCM	CLDM	CER	CEZ
No. of strains	1153 (100%)	780 (100%)	820 (100%)	1153 (100%)	1153 (100%)	1153 (100%)	1153 (100%)	820 (100%)	308 (100%)	308 (100%)	308 (100%)	308 (100%)	308 (100%)	308 (100%)	308 (100%)	308 (100%)
≧200				0	34(2.9)	862(74.8)	866(75.1)	623(76.0)	228(74.1)	226(73.2)	228(74.1)	226(73.5)	230(74.8)	228(74.1)		
100				10(0.9)	387(33.6)	2(0.2)	2(0.2)	4(0.5)	0	0	0	0	1(0.3)	0		
50				251(21.7)	415(36.0)	1(0.1)	6(0.5)	0	0	0	1(0.3)	2(0.6)	0	0		
25				623(54.0)	148(12.8)	2(0.2)	9(0.8)	0	0	1(0.3)	0	1(0.3)	0	0		
12.5				63(5.5)	36(3.1)	7(0.6)	12(1.0)	0	3(1.0)	1(0.3)	4(1.3)	3(1.0)	0	1(0.3)		
6.25				60(5.2)	3(0.3)	4(0.3)	47(4.1)	5(0.6)	1(0.3)	4(1.3)	5(1.6)	0	0	0		
3.125				131(11.4)	19(1.6)	9(0.8)	157(13.6)	2(0.2)	1(0.3)	1(0.3)	30(9.7)	1(0.3)	0	0		
1.56	0	0	0	13(1.1)	69(6.0)	4(0.3)	51(4.4)	3(0.4)	1(0.3)	22(7.1)	39(12.7)	2(0.6)	2(0.6)	3(1.0)	0	0
0.78	0	0	127(15.5)	2(0.2)	41(3.6)	4(0.3)	3(0.3)	11(1.3)	3(1.0)	52(16.9)	1(0.3)	32(10.4)	4(1.3)	0	0	0
0.39	0	0	555(67.7)	0	1(0.1)	25(2.2)	0	137(16.7)	33(10.7)	1(0.3)	0	40(13.0)	13(4.2)	6(1.9)	0	0
0.2	0	2(0.3)	136(16.6)			55(4.8)	0	35(4.3)	38(12.3)	0	0	1(0.3)	46(14.9)	18(5.8)	0	59(19.2)
0.1	0	13(1.7)	2(0.2)			122(10.5)	0	0	0	0	0	0	8(2.6)	49(15.9)	0	223(72.4)
0.05	4(0.3)	88(11.3)	0			54(4.7)	0	0	0	0	0	0	4(1.3)	3(1.0)	0	26(8.4)
0.025	58(5.0)	591(75.7)	0			2(0.2)	0	0	0	0	0	0	0	0	54(17.5)	0
0.0125	797(69.2)	86(11.0)	0												161(52.3)	0
0.0063	291(25.2)	0	0												93(30.2)	0
0.0031	3(0.3)	0	0												0	0

成　績

薬剤感受性

1) 猩紅熱由来株（Group I）

Table 1 に示した如く，PC 系及び cephalosporin 系に対しては，すべての菌株が，感受性を示した．即ち，これらの MIC の分布は，PC G では，0.0031～0.05 μg/ml，ABPC は，0.0125～0.20μg/ml，CER は，0.0063～0.025μg/ml，CEZは，0.05～0.20μg/ml，CEX は，0.10～0.78 μg/ml であった．これらの薬剤の試験管内抗菌力を比較すると，PCG≒CER＞ABPC＞CEZ＞CEX の如くであった．

次に CP に対する MIC の分布は，0.78～100μg/ml で，1973年度のそれ[3]と大差なかった．

TC に関しては，MIC 25μg/ml 以上の菌株（耐性株）の比率を，1973年度と比較してみると，ほぼ同率であるが，MIC 100μg/ml 以上の菌株は，1973年度の0.5%に対し，36.5%と急激な上昇を示している．

Macrolide（以下 Mac と略す）系抗生物質では，MIC 200μg/ml 以上の高度耐性株は，1973年度に急激な増加を見せ，[3] 約70%も認められた．更に，1974年度では，約70%となり，いまだに耐性化の上昇傾向にあると思えた．

2) 猩紅熱以外の溶連菌感染症由来株（Group Ⅱ）及び健康学童由来株（Group Ⅲ）

猩紅熱以外の溶連菌感染症患者から分離された菌株（Group Ⅱ）の各薬剤に対する MIC の分布を Table 2 に示した．なお，猩紅熱以外の疾病の内訳は，急性咽頭炎99件，急性扁桃炎53件，慢性扁桃炎９件，気管支炎10件，リンパ節炎６件，中耳炎２件，皮膚疾患７件，急性腎炎12件，リウマチ熱２件，扁桃肥大３件，その他35件であった．また，健康学童より分離された菌株（Group Ⅲ）の MIC の分布を Table 3 に示した．PC 系及び cephalosporin 系に対しては，Group Ⅱも，Group Ⅲも，すべての菌株が，感受性を示し，その MIC は，Group Ⅰと同様の分布を示した．

CP に対しては，耐性株の割合は，Group Ⅰでは，76.7%であるが，Group Ⅱでは，51.9%，Group Ⅲでは，43.3%と，順次開きがみられた．

TC に対しては，耐性株の割合は，Group Ⅰでは，85.3%，Group Ⅱでは，86.1%を占めているが，Group Ⅲでは，68.2%とやや低率を示している．

Mac 系薬剤に対しては，耐性株の割合は，Group Ⅰでは，EMが75.3%，OLが76.6%，JMが76.5%であり，GroupⅡでは，EMが61.1%，OLが64.2%，JM

Table. 2 Distribution of MICs of antibiotics calculated on group A hemolytic streptococci originally isolated from the patients other than scarlet fever in 1974

Antibiotics / No. of strains / MIC(mcg/ml)	PC G	ABPC	CEX	CP	TC	EM	OL	JM
	229 (100%)	229 (100%)	229 (100%)	229 (100%)	229 (100%)	229 (100%)	229 (100%)	229 (100%)
≧200				0	18(7.9)	138(60.3)	145(63.3)	138(60.3)
100				0	73(31.9)	0	0	0
50				25(10.9)	91(39.7)	1(0.4)	0	0
25				94(41.0)	15(6.6)	1(0.4)	2(0.9)	1(0.4)
12.5				32(14.0)	2(0.9)	2(0.9)	0	4(1.7)
6.25				4(1.7)	4(1.7)	2(0.9)	2(0.9)	2(0.9)
3.125				71(31.0)	4(1.7)	1(0.4)	19(8.3)	0
1.56	0	0	1(0.4)	3(1.3)	13(5.7)	0	3(1.3)	0
0.78	0	0	3(1.3)	0	9(3.9)	0	36(15.7)	5(2.2)
0.39	0	0	205(89.6)	0	0	1(0.4)	22(9.6)	63(27.5)
0.20	0	1(0.4)	17(7.4)			5(2.2)	0	16(7.0)
0.10	0	3(1.3)	3(1.3)			51(22.3)	0	0
0.05	1(0.4)	215(93.9)	0			27(11.8)	0	0
0.025	0	10(4.4)	0			0	0	0
0.0125	208(90.9)	0	0					
0.0063	20(8.7)	0	0					
0.0031	0	0	0					

Table. 3 Distribution of MICs of antibiotics calculated on group A hemolytic streptococci originally isolated from the healthy pupils in 1974

Antibiotics / No. of strains / MIC(mcg/ml)	PC G	ABPC	CEX	CP	TC	EM	OL	JM
	353 (100%)	184 (100%)	180 (100%)	353 (100%)	353 (100%)	353 (100%)	353 (100%)	184 (100%)
≧200				0	34(9.6)	105(29.7)	108(30.6)	47(25.5)
100				1(0.3)	109(31.0)	0	0	0
50				15(4.2)	73(20.8)	0	0	0
25				137(38.8)	24(6.8)	0	0	2(1.1)
12.5				56(15.9)	6(1.7)	1(0.3)	4(1.1)	0
6.25				46(13.0)	12(3.3)	2(0.6)	41(11.6)	2(1.1)
3.125				85(24.1)	20(5.7)	0	118(33.5)	0
1.56	0	0	0	13(3.7)	57(16.1)	1(0.3)	42(11.9)	0
0.78	0	0	19(10.5)	0	18(5.0)	0	25(7.0)	1(0.5)
0.39	0	0	160(89.0)	0	0	0	15(4.2)	89(48.5)
0.20	0	1(0.5)	1(0.5)			91(25.8)	0	42(22.8)
0.10	1(0.3)	1(0.5)	0			116(32.8)	0	1(0.5)
0.05	5(1.4)	12(6.5)	0			36(10.2)	0	0
0.025	5(1.4)	154(83.8)	0			1(0.3)	0	0
0.0125	260(73.7)	16(8.7)	0					
0.0063	82(23.2)	0	0					
0.0031	0	0	0					

Table. 4 Distribution of serotypes of Group A hemolytic streptococci isolated in 1974

Source of the isolates	Serotypes									Total
	1	3	4	6	12	13	18	22	un-typable	
Patients of scarlet fever	5 (2.2)	13 (5.7)	12 (5.3)	3 (1.3)	174 (76.7)	0	9 (4.0)	1 (0.4)	10 (4.4)	227 (100)
Patients other than scarlet fever	1 (0.5)	0	11 (4.9)	1 (0.5)	203 (91.4)	0	0	0	6 (2.7)	222 (100)
Healthy pupils	31 (9.4)	26 (7.9)	8 (2.4)	0	155 (47.0)	10 (3.0)	0	0	100 (30.3)	330 (100)

Note : Figures in the Table indicate the number of isolates, and figures in parenthesis indicate per cent occupied.

が60.7%，GroupⅢでは，EMが29.7%，OLが30.6% JMが26.6%と，順次低くなる傾向にあった．

菌型

Table 4には，各由来別の菌型の分布を示した．1974年度分離株のうち，Group Ⅰ では，12型が最も多く，76.7%を占め，その他，3，4，18，1，6，22型が認められた．一方，Group Ⅱでも12型が多く，91.4%を占め，その他，1，4，6型が認められた．Group Ⅲ でも，やはり，12型が多かったが，前二者と比べ，比率は低く47%であり，un-typable が，30%も認められた．

考　察

今回の成績で，PC系及び cephalosporin 系薬剤に対して，すべての菌株が，感受性を示した．特にPC Gに関しては，既報[1-3]に述べた通り，いまだに一株も耐性菌は分離されていない．Gezon[5]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，溶血性も一時的にβからα又はγに変わると述べているが，この様な現象が，in vivo でも起こり得るならば，今までの様な分離方法では，PC 耐性溶連菌は，今後も分離される可能性がないと考えられる．

また，一方では，Chapman[6]は，PC療法で治療できなかった心内膜炎の患者から，α溶血性のA群溶連菌（un-typable）を分離しており，この菌株は，血液の種類，（馬，羊，兎）や，培養条件（in air, in CO_2）によっても，溶血性に差が出る事を報告している．また，James[7]らは，リウマチ熱患者から，非溶血性のレンサ球菌を分離しており，Lancefield の沈降反応[8]により，A群18型であったと報告している．

これらの報告などから考えて，A群溶連菌分離方法として，現在一般に行なわれているβ溶血の集落だけを拾う方法では，不充分であると思われる．今後，特に溶連菌感染症を疑われる患者からの分離株については，β溶血以外の集落についても同定する必要があるものと思われる．その事によって，現在見逃しているかも知れないPC耐性溶連菌も検出できる可能性もあろう．

一方，PC系と化学構造及び抗菌作用の類似しているcephalosporin 系薬剤に関しても，今後，耐性菌が出現するかどうか，注目される．

今回供試した薬剤のうち，PC系およびcephalosporin系を除く他の薬剤に対して，各由来株とも，多少の差はあるが，耐性化の傾向にあるという点では一致している．

特に Mac 系薬剤の場合，耐性化が著しく，MIC 200 μg/ml 以上の高度耐性株が，約75%（Group I）にも達している．

すでに，2～3年前より，溶連菌感染症におけるMac系薬剤の第一次選択剤としての価値が失われてきているにもかかわらず，この様な耐性化の傾向は，他の疾病の治療面での使用がいまだ多いためと解釈される．小栗ら[9]も，健康学童からの分離株で，TC耐性の出現頻度に，地区別の差があり，医療の普及している地区ほど，耐性菌の出現が多いと述べている．このことは，単にTCに限らず，Mac 系薬剤などにも当てはまるものと思われる．

一方，生方ら[10]は，実験的に phage によって溶連菌の薬剤耐性が伝達された事を報告しており，耐性獲得のメカニズムも近い将来解明されていくものと思われる．

菌型に関しては，1963年以前は，6型が，主導型であったものが，1964～1970年の間では，4型が主導型になり，1971年頃から12型主導型へと変換していった．[11,12] 1974年度でも，その由来にかかわらず，12型が主導型であり，現在の流行菌型であることを示している．

また，宮本ら[12]は，急激に4型の増加をみた1964年頃，TC耐性株が急激に増加していること，及び，1973～1974年度の著しい12型の偏向と Mac 系薬剤に対する耐性菌の急激な増加をみると，菌型と薬剤耐性との相関は否定し難いと述べており，今後更に12型が増加していくのか，あるいは，菌型の交代が起こるのか，興味ある問題である．

一方，健康学童由来株（Group Ⅲ）では，12型以外の菌型も多く見られている．宮本ら[13]の報告でも，健康保菌者の菌型は，患者に少ない菌型が多く認められると述べており，菌型と病原性との関連性は，薬剤耐性との相関とともに，今後に残された課題である．

なお，今回は，特に地区別の検討は行なわなかった．

結　論

1974年度に分離された猩紅熱由来 A 群溶連菌 1153 株（Group Ⅰ），猩紅熱以外の溶連菌感染症由来A群溶連菌 229 株（Group Ⅱ），及び，健康学童由来A群溶連菌 353株（Group Ⅲ）に対する，各種抗性物質の感受性及び菌型について調査し，次の結論を得た．

1) PC 系及び cephalosporin 系薬剤に対しては，各由来株とも，すべての菌株が感受性を示し，その試験管内抗菌力を比較すると次の如くであった．PCG≒CER＞ABPC＞CEZ＞CEX

2) CP に関して，各由来別に耐性株の比率を比較すると，最も高いのは，Group Ⅰ（76.6%）であり，次いで，Group Ⅱ（51.9%），最も低いのは，Group Ⅲ（43.3%）であった．

Group Ⅰに関しては，1973年度の MIC の分布とほとんど差はなかった．

3) TC 耐性株では，Group Ⅰ及び Group Ⅱは，ほぼ同率（約85%）であり，Group Ⅲは，三者の中では一番低率（68.2%）であった．

4) Mac 系薬剤9剤について，その薬剤間における耐性株の比較では，ほとんど差はなく，Group Ⅰでは，約75%，Group Ⅱでは，約60%，Group Ⅲでは，約30%の耐性菌が認められた．

5) 1974年度の流行菌型は，1973年度と同じく，12型が首位を占めていた．その内訳は，Group Ⅰ及び Group Ⅱでは，約75～90%を占めており，Group Ⅲでは，比較的少なく47%であった．

文　献

1) 大久保暢夫，柏木義勝，柴田実ら：感染症学雑誌，46（臨時増刊号），45，1972
2) 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），506，1973
3) 柴田実，柏木義勝，徳江シゲ子，冨永洋子，大久保暢夫，小野川尊：感染症学雑誌，49（3），94，1975
4) MIC 測定法改定委員会：CHEMOTHERAPY，22

(6), 1126, 1974
5) Gezon, H. M., *et al* : *Prac. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 73, 10, 1950
6) Chapman, S. S. : *Streptococci and Streptococcal Diseases*, edited by Wannamaker, L. W. and Matsen, J. M, 215 (1972), ACADEMIC PRESS, New York
7) James, L. and Mcfarland, R. B. : *New Engl. J. Med.*, 284, 750, 1971
8) Lancefield, R. C. : *J. Exp. Med.*, 57, 571, 1933
9) 小栗豊子，設楽政次，小酒井望，只野寿太郎：*Jap. J. Antibiotics*, 27(1), 1～6, Feb, 1974
10) 生方公子，紺野昌俊，藤井良知：第23回日本化学療法学会総会（神戸）1975
11) 永瀬金一郎：感染症学雑誌，47(12)，497，1973
12) 宮本泰，滝沢金次郎，浅井良夫，高橋武夫，松島章喜：感染症学雑誌，49(3)，86，1975
13) 宮本泰，滝沢金次郎，松島章喜、浅井良夫，岡崎則男：感染症学雑誌，47(12)，501，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 53—58, 1975

梅毒感作血球凝集反応（TPHA）の自動化によ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 Automatic Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* antibodies

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

緒　言

われわれは[1]すでに WHO[2]が推奨している，Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* Antibodies（MHA-TP 法）と，従来の TPHA[3]とを比較検討し，さらに，この結果に基づいて考案した改良 MHA-TP 法と，MHA-TP 法について比較試験を行なった．その結果，従来の TPHA と比較して MHA-TP 法は，特異性に差が認められなかったが，鋭敏性，抗体価一致数および偏差の点に問題が見出された．一方，われわれの改良 MHA-TP 法では，4倍稀釈法の採用とV型トレイ**を使用したことによって，MHA-TP 法（2倍稀釈，U型トレイ**）に比べ抗体価一致数と偏差に著しい向上が認められた．そして，これらの成績から，マイクロ TPHA の国内標準化にむけて1つの方向性を見出すことができた．しかしながら，正確に7.5μlを滴下できるドロッパーの開発や，抗体価一致数の向上および偏差を1管差の許容範囲内にとどめ，かつ，再現性が高い改良方式の開発など若干の問題が残されていた．そこで今回は，オートダイリューター**とオートドロッパー**を組合わせた自動化の改良プログラムを作成し，従来の TPHA を指標に，特異性，鋭敏性，抗体価の一致性，偏差および反復性について比較検討した．

材料および方法

A．材料：梅毒診断のために当所へ送付された血清のうち，TPHA 従来法陽性140例，80倍(±)10例，および陰性56例，計206例を選び被検血清とした．

B．試薬："梅毒抗原"***試薬キット Code No. FD 101を用いた．

C．方法：**a**．Automated Quantitative Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* Antibodies（AMHA-TP注）—WHO が推奨する2倍稀釈法による自動化プログラム[4]に従ったが，指定のU型トレイをV型に改めて実施した．この際，TPHA従来法は AMHA-TP 法に合わせて2倍稀釈法で抗体価を測定した．

b．改良 AMHA-TP 法—改良 MHA-TP 法で有用性が認められた4倍稀釈法に準じた改良 AMHA-TP 法のプログラム（Table 1）および，ピペットによる1：20の基礎血清稀釈法を採用し，同一検体につき，従来の TPHA とU型ならびV型トレイを用いた改良 AMHA-TP 計3法を，同時同一条件下で次のとおり実施した．

1） オートドロッパーにトレイをセットし，A例を除くBからE例までの全 Cup に吸収稀釈液を3滴（0.075 ml）づつ滴下する．

2） 0.5ml のピペットを用いて，0.05ml の原血清を小試験管に取り，0.95ml の吸収稀釈液を加えて 1：20 の稀釈血清を作る．

3） 室温で30分間以上放置して充分な吸収を行なった後，トレイA列の各 Cup に 0.1ml づつ 1：20 の稀釈血清を移す．

4） 分注を終えたトレイをオートダイリューターにセ

注）AMHA-TP 法の基本的方式：1） 0.1ml のピペットを用いて1：20の基礎血清稀釈を行なう．2） オートダイリューターで2倍血清稀釈を行なう 3） 1：6.5 血球浮液を稀釈血清量（0.025 ml）の3倍量（オートドロッパーで3滴＝0.075 ml）を滴下して，終末濃度で抗体価を表示する．以上3要素からなる．

** Cooke Engineering Company 製
*** 富士臓器製薬株式会社製

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　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 Procedure for Dilution of Reagent, Antigen and Absorvent in Modified AMHA-TP* Program (in 4-fold dilution)

Cup No.		I	II	III	IV	V	
Serum Dilution		1 : 20	1 : 80	1 : 320	1 : 1280	1 : 5120	
Diluted Test Serum	m*l*.	0.1——	0.025 ↗	0.025 ↗	0.025 ↗	0.025 ↗	0.025
Absorbing Diluent	m*l*.		0.075 ↗	0.075 ↗	0.075 ↗	0.075 ↗	discord
Unsensitized Cell	m*l*.	0.0075					
Sensitized Cell	m*l*.		0.0075	0.0075	0.0075	0.0075	

* Automated quantitative Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* antibodies

ットし，スイッチを入れる．

5) 12本のループは自動的に上下，回転，休止しながら，PBS で洗浄後，沪紙で清拭され，順次回転混合しながらA列からE列まで移行し，4倍稀釈操作を完了する．

6) 稀釈操作を終えたトレイをオートダイリューターからはずし．マイクロミキサー**にセットする．

7) 1滴が 7.5μl になる 試作の微量 ドロッパー**** を用いて，従来法と同濃度の感作血球浮游液をA列を除くBからEまでの全 Cup に1滴づつ，ミキサーを弱震しながら手操作で滴下する．

8) A列の Cup には未感作血球浮游液を(7)と同様の操作で1滴づつ滴下し，つづけてマイクロミキサーを1分間程度強震する．

9) 血球の均等混和を確認して，ミキサーからトレイをはずし，空のトレイで蓋をして1夜室温に静置する．

10) 翌朝，テストリーディングミラー**を用いて判定する．判定の基準は Fig. 1 のとおり，U型とV型のトレイの場合，それぞれ血球凝集像が異なる．陽性終末点は1(+)をもって判定し，抗体価は血球の滴下量を計算に入れずに従来法どおり血清稀釈倍数で表示する．

Fig. 1 Comparison of degree of hemagglutination pattern between U-shaped cups and V-shaped cups

U-shaped cups (C. D. C. Judgements)	Reading	V-shaped cups (Our Judgements)
Smooth mat of cells covering entire bottom of cups, edges sometimes folded	4 +	Smooth mat of cells covering entire bottom of cup, edges somtimes folded
Smooth mat of cells covering less area of cups	3 +	Smooth mat of cells covering all area of cup
Smooth mat of cells surrounded by red circle	2 +	Smooth mat of cells covering less area of cup
Smooth mat of cells surrounded by smaller red circle	1 +	Button of cells in center surrounded by agglutinated cells
Button of cells having small "hole" in center	±	Smaller button of cells in center surrounded by less agglutinated cells
Definite compact button in center of cup or may have a very small "hole" in center	−	Definite compact button in center of cup, no "hole"

c. 反復性テスト：供試血清として，従来法で陰性を示した血清と，1 : 80, 1 : 320, 1 : 1280, 1 : 5120 の抗体価を示した陽性血清をそれぞれ5本づつ選び，5回のテストをくり返した．反復性の成績は延べ抗体価一致回数／延べ検査回数で表示して，UおよびV型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法と従来の TPHA を比較した．

****日本硝子量器株式会社製

実験成績

1 AMHA-TP法（V型トレイ，2倍稀釈法）の検討

Fig. 2 はV型トレイを用いた AMHA-TP 法と，従来の TPHA の成績を対比したものである．

特異性，鋭敏性ともに 100 % と良好な成績を示し，さ

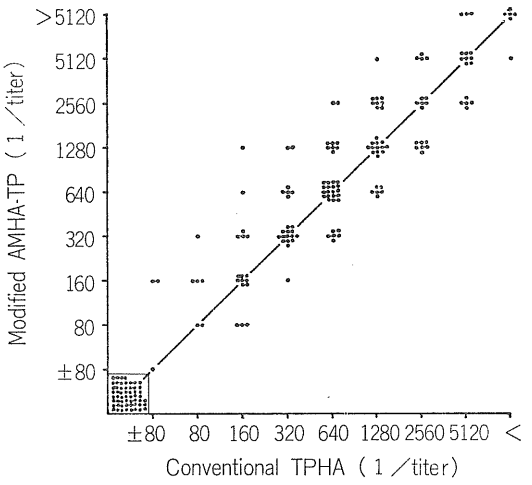


Fig. 2 Comparison between results obtained by conventional TPHA and modified AMHA-TP (in 2 fold dilution with V-shaped cups)
Note; n=206, positive=150, negative=56 (in square)

らに抗体価一致数では150例中77例（51.3%）が一致し，1管差の許容範囲を含む一致率は93.3%とほぼ満足すべき結果であった．

しかし，最大偏差（3管）および抗体価一致数の点で，改善の余地が残されていることが指摘された．

2. U型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法（4倍稀釈法）の検討

Fig. 3 はU型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法と従来法とを比較したものである．

定性的な比較では，特異性の面で良い成績を示した反面，鋭敏性で AMHA-TP 法（V型トレイ，2倍稀釈）より 4.7%低下した．

従って，抗体価の一致数は 150 例中49例（32.3%）と少数で，1管差の例を含めても，89.9%と低率であった．加えて，150例中 84 例（56.0%）に1管の低下が認められ U型トレイ使用の MHA-TP および改良 MHA-TP 法と同様の傾向が認められた．また最大偏差は自動化4倍稀釈法の採用によって2管差にとどまり，改良 MHA-TP 法の最大偏差値と一致した．

3. V型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法（4倍稀釈法）の検討

Fig. 4 はV型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法と従来法を比較したものである．

特異性および鋭敏性については，ほぼ満足すべき結果が得られた．また，抗体価一致数では，150 例中 101 例

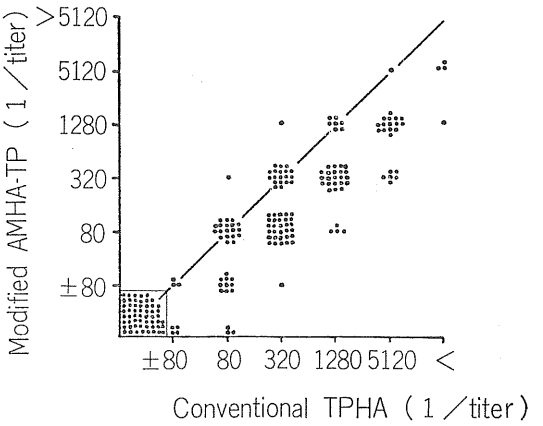


Fig. 3 Comparison between results obtained by conventional TPHA and modified AMHA-TP (in 4 fold dilution with U-shaped cups)
Note; n=206, positive=150, negative=56 (in square)

(67.3%) のものが一致し，1管差のものを含めると 99.5%と量高の一致率を示した．

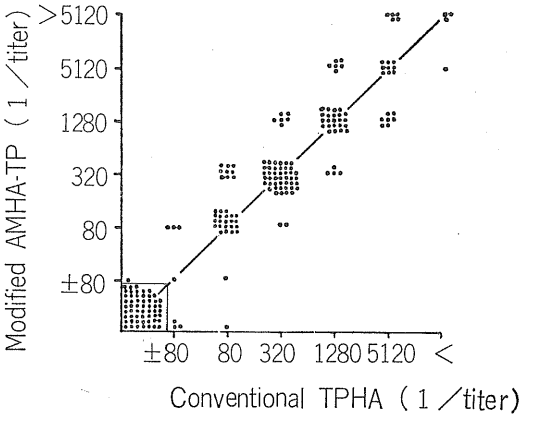


Fig. 4 Comparison between results obtained by conventional TPHA and modified AMHA-TP(in 4 fold dilution with V-shaped cups)
Note; n=206, positive=150, negative=56 (in square)

4. 従来法および改良 AMHA-TP 2法の反復性に関する検討

Table 2 は従来の TPHA とU型およびV型トレイ使用の改良 AMHA-TP 2法の反復性を比較したものである．許容範囲を含まない抗体価一致数で比較した結果，反復性の成績に著明な差違が認められた．すなわち，従来法の反復性は，延べ 125 回のテストの結果 103 回の抗

体価一致を示し，またV型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法では，109回と従来法を上まわる成績が得られた．一方，U型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法は上記2法に比べ，125回のテストのうち71回と極端に低い反復性を示した．また，各抗体価ごとに比較すると，判定に際し最も重要な1：80陽性血清では，改良 AMHA-TP 2法が従来の TPHA 反復性を上まわり，特にV型トレイ使用の場合は，20／25と高成績を示した．1：320および1：1280の血清では，従来法とV型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法はほぼ一定した成績を示したのに反し，U型トレイを使用した場合には，各抗体価血清ごとの一致数にバラツキが認められた．さらに，1：5120の高い抗体価血清において，従来法はピペットによる持ち込み誤差が少ないことを反映して，22／25と高い反復性を示し，V型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法は従来法に次いで18／25と良好な反復性を示した．しかしながら，U型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法は4／25と反復性の低下が著しかった．

Table 2 Repetition of titer-aggreements between conventional TPHA and modified AMHA-TP (in 4-fold dilution)

Titer	Number of sera tested	Number of tests	Conventional TPHA	Modified AMHA-TP	
				U-shaped cups	V-shaped cups
1：0	5	5	25／25*	25／25	25／25
1：80	5	5	14／25	16／25	20／25
1：320	5	5	21／25	9／25	22／25
1：1280	5	5	21／25	17／25	24／25
1：5120	5	5	22／25	4／25	18／25
Total	25	25	103／125	71／125	109／125

* Total number of titer-agreements/Total number of tests

5. MHA-TP 法と改良5法による成績の比較

Table 3 はすでに報告した MHA-TP 法と改良 MHA-TP 法の結果[1]ならびに今回検討した改良 AMHA-TP 法の術式の改良効果に関する成績をまとめて記載したものである．すなわち，手操作による MHA-TP 法と，自動化による AMHA-TP 法に区分し，WHO 推奨の2倍稀釈法で実施の2法と4倍稀釈による改良 MHA-TP および改良 AMHA-TP の4法，計6法について比較したものである．特異性と鋭敏性については，6法間に有意の差が認められなかったが，抗体価の一致性，偏差，および反復性については，それぞれ明らかな差違が証明された．特に抗体価の一致性については6法間の変動が顕

Table 3 Comparison of reactivities between MHA-TP and 5-modified micro-TPHA methods

	Method	Shape	Dilution	Specificity (%)	Sensitivity (%)	No. of titer-agreement (%)	Deviation-No. of tube (No. of sample %)	Repetition of titer-agreement (%)
MHA-TP*	Standard	U	2-fold	33／33 (100.0)	136／144 (94.4)	28／144 (19.4)	1—5 (44.4) (0.7)	—
	Modified	U	4-fold	33／33 (100.0)	102／104 (98.1)	47／104 (45.2)	1—2 (40.4) (13.5)	—
		V	4-fold	33／33 (100.0)	103／104 (99.0)	44／104 (42.3)	1—2 (54.8) (2.9)	—
AMHA-TP**	Modified	V	2-fold	56／56 (100.0)	150／150 (100.0)	77／150 (51.3)	1—3 (42.0) (0.7)	—
		U	4-fold	56／56 (100.0)	143／150 (95.3)	49／150 (32.3)	1—2 (57.6) (10.0)	71／125 (56.9)
		V	4-fold	56／56 (100.0)	146／150 (97.3)	101／150 (67.3)	1 (32.2)	109／125 (87.2)
							Repetition of titer-agreement obtained by conventional TPHA	103／125 (82.4)

* Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* antibodies

** Automated quantitative Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* antibodies

著であり，MHA-TP 法と改良5法との間に，それぞれ有意差が認められた．さらに，改良4法では，U型トレイ使用の場合と，V型トレイ使用の場合との成績には，明らかな差違があり，しかもV型トレイ使用の改良MHA-TP 法と AMHA-TP 法（2倍稀釈法），および改良AMHA-TP 法（4倍稀釈法）との間にそれぞれ有意の差が認められた．

偏差については，V型トレイ使用4倍稀釈法による改良AMHA-TP 法は，ほとんどの成績が1管差にとどまり，他の5法と比較して著しい改良効果が認められた．加えて，反復性についても従来の TPHA と同等の成績を示し，有意差も認められなかった．

以上の成績を総合して，V型トレイ使用の改良 AMHA-TP 法は他の5法に比べ，卓越した改良プログラムといえる．

考　　察

WHO は梅毒血清反応における TPHA の有用性に着目し，あわせて手技の簡便性や能率性および，試薬，血清量の節約による経済性を向上させるために，手で操作する AMHA-TP 法と自動化による AMHA-TP 法を推奨し，世界各地で講習会を催すなど普及に努めている．わが国においても，マイクロ TPHA の手技[2,4]および報告[5-10]が発表されて以来，マイクロ TPHA を試みる機会や機関が年々増加する傾向にある．

マイクロ TPHA の国内標準法が定められていない現在，術式や判定基準などの不統一がみられるので，マイクロ法の検討を早急に行なって標準化をはかり，梅毒血清反応検査指針[3]に取り入れてゆく必要があると考えられる．

そこで今回，MHA-TP 法と AMHA-TP 法における問題点を指摘し，次いで検討結果をもとに改良法を試み，従来の TPHA に匹敵する結果が得られたことは標準化にむけて一定の方向性を示したものとして意義があろう．しかしながら，現在，マイクロ法特有の欠点を器具，機材の方面から改良する試みがなされ，すでに市販されつつあるので，さらにプログラムの改良も必要と考えられるが，器具，機材の検討も今後に残された課題と思われる．

今回行なわれた一連の比較試験の成績から，改良効果を発揮するための要因を分析すると，次の4点に大別される．

1.　自動化と4倍稀釈法の採用は次にあげる誤差を減少し，成績のバラツキの問題を解決できるものと思われる．(ア)ダイリューターと Cup 壁の接触に起因する誤差，(イ)技術的に未習熟なための誤差，(ウ)基礎血清稀釈をピペットで行なわないための誤差，(エ)これらの複合誤差および操作回数で増幅される誤差などが考えられる．

2.　U型トレイでは総じて1～2管程度，抗体価が低下する傾向を示し，V型トレイでは1管程度抗体価が上昇する傾向を示したことはU，Vトレイ双方の構造上の相違にもとづくものと推察される．すなわち，UおよびV型トレイの最大内径（U-6.0mm，V-6.9mm）および容量（U-0.25ml，V-0.325ml）の相違がある．従って，ダイリューター（ループ）の直径（4mm）と Cup 内径との差がそれぞれ異なり，さらに血清および吸収稀釈液の粘稠度が高いなどの関係から，物理化学的な力が働いて血清つり上げ量を左右し，U型トレイではマイナス誤差，V型トレイではプラス誤差となったものと推定される．

マイクロタイターハンドブック[11]に記載されているプラスチックトレイの静電気的荷電状態については，今回，特に注意をはらわずに良好な成績を得たことから，このことは誤差を生じる大きな要因とは思われない．しかしスチレン製リヂットタイプのU型トレイにもV型と同じ内径 6.9mm のものが市販され，また静電防止剤のような製剤も市販されているので，これら製品の応用を試みる必要があろう．

3.　V型トレイのもう1つの利点は判定がしやすい点であろう．U型に比べV型トレイは震動に弱く，凝集像の保持に難があり，弱陽性例では陰転しやすいといわれているが，われわれの経験では，敏速な操作と震動にさえ注意すればさほど問題にはならなかった．むしろ，未凝集血球が中心に点状に集まり，凝集塊はその周囲にのみ存在するために，凝集塊の有無を容易に確認し得る利点がある．朝川ら[12]は，血球凝集反応における終末点の血球塊の直径と血清稀釈倍数との間に一次の回帰が成立することを利用して，凝集価を客観的に定量することができると報告している．同様の傾向は，従来のＴＰＨＡの終末点の判定にあたってしばしば経験されており，判定者は経験的にこのような相関をとらえ終末点を主観的に決定することが多い．U型トレイを用いたマイクロ法でも，これと同様のケースが多くあり，終末点の判定にあたっては，血球円の大きさや凝集塊の有無について，少なくとも血球円の内側および外側両面から観察しなくてはならない．これらの繁雑さや，事実上，マイクロ法による血球円の直径などは計測することが不可能であることから，V型トレイの有用性は強調されるべきであろう。

4.　ハンドリングによる改良ＭＨＡ－ＴＰ法の検討段階では，血球の滴下に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（1滴が8 μl±3 μl）を用いたが，今回は1滴が正確に7.5μlになる微量ドロッパーを開発し，製品化することができた．その結果，従来のＴＰＨＡと同様，血清血球濃度比を正確に1：11に規定し，精度を高めることができた．また，現在，ＴＰＨＡの試薬キットは4倍稀釈法による血球および吸収稀釈液の平衡消費量にもとづいて，製造され包装されているので，2倍稀釈法の術式で実施すると消費量のバランスがくずれ，特に血球消費量が吸収稀釈液の消費量を上まわり，非常に無駄が多い．従って，マイクロ4倍稀釈法は，さらに経済性を高めるために有用であるが，既存のドロッパーだけでは実施できないので，今回開発した微量ドロッパーの有用性はかなり高いものと思われる．

これまで述べてきた，一連の試験成績から明らかなように，すべての血清反応を2倍稀釈法で実施して，むやみに高い抗体価を求めるより，むしろ基礎血清稀釈を厳密に行なったうえで，病気の診断など必要な抗体価の消長範囲を中心に，最大限5管程度にしぼって稀釈操作を完了させる必要がある．また，総合的なマイクロ法の問題点はＴＰＨＡに限らず，すでに，細菌やウイルス分野での血清学的検索においても経験されているので，これらの考察をもとに，それぞれの分野で，使用目的にかなった術式を選定し，またプログラムを考案してゆく必要があろう．

最後に，トレイの頻回使用による Cup 底のキズやよごれは判定を誤まらせるので，洗浄方法などについても細心の注意をはらうことが望まれる．

結　論

従来のＴＰＨＡを指標に，ＷＨＯが推奨し普及に努めているＭＨＡ－ＴＰについて比較検討し，その結果にもとづいて4倍稀釈法の改良ＡＭＨＡ－ＴＰプログラムを考案した．それぞれＵ型およびＶ型トレイを用いて，同時同一条件下で比較試験を行ない，特異性，鋭敏性，抗体価一致性，偏差，および反復性について総合的に検討した．

1．改良ＡＭＨＡ－ＴＰ法（Ｖ型トレイ使用，4倍稀釈法）は，ＷＨＯ推奨のＭＨＡ－ＴＰ（Ｕ型トレイ使用2倍稀釈法）を含む他の5法を上まわる改良効果を示し，さらに，この成績は，ほぼ従来のＴＰＨＡの成績に匹敵するものと考察した．

2．Ｖ型トレイはＵ型トレイと比較して，終末点の判定が容易かつ明瞭であり，さらに，4培稀釈法に必要な微量ドロッパー（1滴が7.5 μl）の有用性とともに，マイクロＴＰＨＡにおけるＶ型トイレの有用性が確認された．

（本研究の概要は，第21回日本臨床病理学会総会，1974年10月で発表した．）

文　献

1) 村田以和夫，堀幹郎，宮沢貞雄，加納堯子，大久保暢夫：東京衛研年報，25，23，1974
2) Staff, *Venereal Disease Research Labolatory, C. D. C. USA.*: *MHA-TP Provisional Technique*, February, 1973
3) 厚生省監修：梅毒血清反応検査指針，108，1967，日本公衆衛生協会
4) Staff, *Venereal Disease Research Labolatory, C. D. C. USA.*: *AMHA-TP Provisional Technique* February 16, 1971
5) Logan, L. C. and Cox, P. M.: *Amer. J. Clin. Path.*, 53, 163, 1970
6) Cox, P. M., Logan, L. C. and Stout, G. W.: *The Public Health Laboratory*, 29, 2, 43, 1971
7) Garner, M. F., Backhouse, J. L., Daskalopoulos, G. and Walsh, J. L.: *Brit. J. vener. Dis.*, 48, 470, 1972
8) Buist, D. G. P., Pertile, R. and Morris, G. J.: *Pathology*, 5, 249, 1973
9) Anzimilt, E. J. M.: *N. Z. J. med. Labo. Technol.*, 26, 3, 102, 1972
10) Johnston, N. A.: *Brit. J. vener. Dis.*, 48, 474, 1972
11) Conrath, T. B.: *Handbook of Microtiter® Procedures*, 3, Cook Laboratory Products, Alexandria, Virginia, USA.
12) 朝川貞雄，石田説而，黒川正身，高橋宏一：第31回日本細菌学会関東支部総会講演抄録，56，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 59—63, 1975

1974年春以降東京都に発生したかぜ疾患の病因に関するウイルス学的研究

矢野一好* 柳澤靖子* 伊藤忠彦*
藪内清* 岩崎謙二*

Virological Studies on Respiratory Disease in Tokyo in 1974

KAZUYOSHI YANO*, YASUKO YANAGISAWA*, TADAHIKO ITO*,
KIYOSHI YABUUCHI* and KENJI IWASAKI*

緒言

ミキソウイルス，パラミキソウイルス，アデノウイルス，ピコルナウイルス等，多数のウイルスが，かぜ疾患の病因となることが明らかとなった現在，かぜ患者の病因検索は当然，数多くのウイルスを対象に行わなければならなくなっている．都内に発生した集団かぜ患者の病因検索に当り，著者らは，従来インフルエンザ，パラインフルエンザ，アデノ，エンテロの各ウイルスを対象として行ってきたが，1974年以降の検索には，ライノウイルスも検索対象に加えた．なお，ライノウイルスについては，わが国において，ほとんど究明されていないので，都民間のライノウイルス感染流行実態を検討するため，1973年にひきつづいて，74年も血清疫学調査を行ったので，その概要を報告する．

検査材料と方法

ウイルス分離試験 ウイルス分離用検体として，急性期に採取した患者うがい液を用いた．インフルエンザウイルスの分離には，ふ化鶏卵を，アデノ，パラインフルエンザ，エンテロの各ウイルスは，FL, HeLa, Hep2, Vero, CMK の各細胞培養を用いて行った．術技は，既報の通りである.[1] ライノウイルスの分離は，HEL細胞を用い，川名らの術技に準じて行った.[2,3]

血清試験 患者の病因解明は，急性，回復両期血清をそろえ，インフルエンザ，アデノウイルスは，補体結合反応により，パラインフルエンザウイルスは，赤血球凝集抑制試験（HI試験）によって行った．術技は，既報の通りである.[1] エコーウイルスは，中和試験によって行った．HEL細胞を用いマイクロタイター法により，100$TCID_{50}$量のウイルス感染を阻止した被検血清最大希釈倍数をもって，その中和抗体価とした．ライノウイルスは，HEL細胞を用いたマイクロタイター法により，1A型（ECHO28株），2型（HGP株），13型（353株），14型（1059株），30型（106F株）に対する中和抗体価を，川名らの報告に準じて測定した.[3]

健康者血清は，別の目的をもって，1974年6月，および10月に採取した都内居住者の血清である．ライノウイルス中和抗体の存否は，被検血清1：8希釈で30～50$TCID_{50}$量のウイルス感染を阻止するか否か，によって判定した．試験ウイルス株，および術技は，患者血清と同じである．試験に用いた HEL 細胞は，8～28代継代のものである．

検索成績と考察

集団かぜ患者の病因検索成績

1974年2月以降，都内に発生した集団かぜ患者の病因検索状況と結果は，表1の通りである．

74年々頭のインフルエンザB型ウイルスの流行にひきつづいて，2月下旬から4月中旬までインフルエンザA型ウイルスの流行が，5月から11月まではアデノウイルスの流行が，12月以降再びインフルエンザA型ウイルスの流行があった．

エコー5型ウイルス感染による患者発生は，7月と10月に1集団づつみられた．

7月のエコー感染集団では，患者5名中3名の急性期うがい液からウイルスを検出，免疫血清を用いた中和試験によって，エコー5型ウイルスと同定した．急性，回復ペア血清を用いた中和試験では，4名中3名に分離株に対する有意抗体上昇があった．

10月のエコー感染集団では，患児5名中3名からエコー5型ウイルスを検出し，急性，回復ペア血清の中和試験でも5名全例に有意抗体上昇があった．5名中1名は

* 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 集団かぜ検索成績

No.	検体採取年月日	所轄保健所	集団名	検査結果
1	74. 2.13	石神井	南田中小	インフルエンザB型
2	〃21	中野	桃園3小	インフルエンザA型
3	〃22	小金井	国分寺9小	〃
4	〃〃	牛込	愛日小	〃
5	3.13	滝野川	滝野川2小	〃
6	〃15	新宿	西戸山2中	不明
7	4.16	田谷	鶴川1小	インフルエンザA型
8	5.13	渋谷	臨川小	アデノ
9	〃20	日野	代々木ゼミ	不明
10	〃21	立川	国立3小	〃
11	〃24	玉川	二子玉川小	〃
12	6. 4	武蔵野	境南小	アデノ
13	〃19	世田谷	松ケ丘小	不明
14	7.10	府中	府中7小	エコー5型
15	〃11	町田	つくしの小	不明
16	10. 4	東村山	東大和2小	アデノ
17	〃 5	渋谷	広尾保	不明
18	〃 9	日野	日野1中	〃
19	〃15	砧	芦花中	〃
20	〃16	鷹	南浦西保	〃
21	〃28	三鷹	松庵小	アデノ
22	〃30	井戸	中村小	エコー5型
23	11. 8	練馬	東深沢小	不明
24	〃 9	玉川	愛日小	アデノ
25	〃〃	牛込	南山幼	不明
26	〃〃	麻布	毛利小	〃
27	〃27	深川	稲城5小	〃
28	12. 6	日野	林町小	〃
29	〃13	小石川	桜丘中	インフルエンザA型
30	〃17	世田谷	武蔵野小	不明
31	74.12.21	立川	東久留米1小	アデノ
32	〃26	田無	八丈・三原中	不明
33	75. 1.14	防疫課	新星中	インフルエンザA型
34	〃〃	世田谷	東原中	〃
35	〃16	杉並	谷戸2小	不明
36	〃17	田無	狛江7小	インフルエンザA型
37	〃〃	武蔵調布	原町小	〃
38	〃〃	碑文谷	国分寺8小	〃
39	〃〃	小金井	八王子3中	〃
40	〃18	王子	松上小	〃
41	〃21	八葛飾	落合1小	〃
42	〃〃	新宿	川口中	〃
43	〃〃	八王子	回田小	〃
44	〃22	東村山	西原小	不明
45	〃〃	渋谷	昭和小	インフルエンザA型
46	〃〃	中野	中野2中	〃
47	〃〃	目黒	目黒1中	〃
48	〃23	青梅	瑞穂1小	〃
49	〃〃	武蔵野	桜堤小	〃
50	〃24	糀谷	糀谷中	〃
51	〃〃	立川	立川2中	〃
52	〃〃	町田	町田南3小	〃
53	〃〃	府中	小柳小	〃
54	〃〃	新宿	落合3小	〃
55	〃27	谷戸	台東小	〃
56	〃28	小金井	小金井1小	〃
57	〃30	王子	王子3小	〃
58	2. 3	小平	森小児科	〃
59	〃 6	監察医務院	(死亡例1例)	〃

表2　1974年10月N保健所管内に発生した集団かぜ検索状況

患者	ウイルス分離	病日	ライノウイルス中和抗体価					分離株中和抗体価			補体結合反応		
			1A	2	13	14	30	I=574	I=576	I=577	AD	イA	イB
M.T	—	5	<8	<8	16	<8	<8	8	<4	<4	8	<8	<8
		19	<8	<8	16	<8	<8	16	32	32	8	<8	<8
		42	<8	<8	16	<8	<8	≧128	≧128	≧128	<8	<8	<8
K.M	E5 I=574	3	<8	<8	8	<8	<8	<4	<4	<4	16		
		17	<8	8	8	<8	<8	≧128	64	64	16		
		40	<8	<8	8	<8	<8	≧128	≧128	64	8		
N.F	—	2	<8	<8	<8	<8	8	<4	<4	<4	<8		
		16	<8	<8	<8	<8	128	32	64	64	<8		
		39	<8	<8	8	<8	64	≧128	64	64	<8	<8	<8
G.I	E5 I=576	2	<8	<8	<8	8	<8	<4	<4	<4	32		
		16	<8	<8	<8	16	<8	≧128	64	32	32		
		39	<8	<8	<8	16	<8	≧128	≧128	32	16	<8	<8
M.K	E5 I=577	4	<8	<8	<8	<8	<8	<4	<4	<4	<8	<8	<8
		18	<8	<8	<8	<8	<8	≧128	32	≧128	<8	<8	<8
		41	<8	<8	<8	<8	<8	≧128	32	≧128	<8	<8	<8

I：分離株番号　E5：エコーウイルス5型　AD：アデノウイルス
イA：インフルエンザA型ウイルス　イB：インフルエンザB型ウイルス

表3　1974年4月M保健所管内に発生した集団かぜ検索状況

患者	ウイルス分離	ライノウイルス中和抗体価					補体結合反応		
		1A	2	13	14	30	イA	イB	AD
I.K	—	<8	<8	<8	8	<8	<8	<8	<8
		<8	<8	<8	<8	<8	32	<8	<8
A.W	—	<8	<8	<8	<8	<8			<8
		<8	<8	<8	<8	<8			<8
K.K	AHK	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
		<8	<8	<8	<8	<8	≧128	<8	<8
S.I	AHK	<8	<8	<8	<8	<8			<8
		<8	<8	<8	<8	64			<8

AHK：インフルエンザAホンコン型ウイルス　イA：インフルエンザA型ウイルス
イB：インフルエンザB型ウイルス　AD：アデノウイルス

ライノウイルス30型に対しても，有意上昇を示した（表2）．

インフルエンザA型ウイルス感染は，74年2月から75年2月までの検索集団58例中，30例で確認され，患者うがい液から61株のAホンコン型ウイルスを検出した．これら分離株の詳細な抗原分析は，別報に述べた．[4]

アデノウイルス感染は，6集団で確認され18株のウイルスを検出した．

ライノウイルスは，58集団354件の急性期患者うがい液から，1株も検出されなかった．患者の急性，回復ペア血清151組について，前記5つのウイルス型に対する中和抗体価を測定したが，有意上昇があったのは，わずかに，2組であった．いづれも30型ウイルスに対する上昇であり，1例は74年4月の発生例で，インフルエンザA型ウイルスが分離された（表3）．他は10月の発生例で，エコー5型ウイルスに対する有意抗体上昇もみられた（表2）．以上は，限られた型の検索結果ではあったが，学童の集団かぜ患者におけるライノウイルスの病因

的役割は，それほど大きくないと考える．ライノウイルスの病因的役割は，検索対象ウイルスの型，検索対象年令を広げ，軽症々例をも含めた調査を行って，結論を下すべきであろう．

同一な症状が，いくつかの異ったウイルス感染によってひきおこされることがわかって来た今日では，多角的な病因検索は，病因肯定の観点からばかりでなく，否定の観点からもますます意義をもつようになって来ている．従って，その病因の多様性を考慮し，幅広い検索の必要性を痛感した．

ライノウイルスの血清疫学的調査　都民間における，ライノウイルス感染流行実態を明らかにする目的で，73年の調査にひきつづき，74年における健康都民のライノウイルス，1A，2，13，14，30型に対する中和抗体保有状況を調査した．

調査結果は，表4に示した．また，ウイルス型別中和抗体保有率の年令推移は，図1の通りで，加令に伴って抗体保有率の急上する1A，2，30型と，上昇の緩やかな13，14型の両パターンに分類されたのは，73年の調査とほぼ同様であったが，各型とも，とくに13型において，74年の保有率が73年に比べて明らかに低下していた．[5]

6月期，および10月期における中和抗体保有率の変動の大きさから，73年には，1Aと13型ウイルスの感染があったと考えたが，74年の調査では，30型ウイルスの感染流行があったものと推察した．

一方，73年12月から74年12月までに採取した集団かぜ患者血清302例について，上記5つの型のライノウイルスに対する中和抗体価を測定し，抗体保有状況の季節別変動をみると，表5の通りになる．30型に対する抗体保有率のピーク（58.2%）は，74年2月から4月にあり，高い抗体価を示したものも同時期に多くみられたので，都内における30型ウイルスの流行ピークは，74年2月から4月にあったと考える．

表4　健康都民のライノウイルス中和抗体保有率（抗体価≧1：8）

年次	年令区分	検査件数		1A型		2型		13型		14型		30型	
		6月	10月	6月	10月	6月	10月	6月	10月	6月	10月	6月	10月
				%	%								
	0-2	0	8	—	0.0	—	0.0	—	25.0	—	0.0	—	0.0
	3-5	6	0	0.0	—	0.0	—	16.7	—	0.0	—	0.0	—
'73	6-9	14	20	28.6	5.0	0.0	5.0	42.9	20.0	0.0	0.0	28.6	20.0
	10-19	20	70	25.0	24.4	20.0	17.8	55.0	26.7	10.0	7.7	50.0	27.8
	20-20	18	4	72.0	25.0	33.3	25.0	50.0	0.0	27.8	25.0	50.0	50.0
	≧30	30	4	56.6	50.0	50.0	50.0	56.7	25.0	13.3	0.0	86.6	75.0
	0-2	3	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	3-5	36	11	8.3	0.0	2.8	0.0	11.1	0.0	0.0	0.0	13.9	0.0
'74	6-9	68	37	1.4	1.2	5.8	0.0	7.3	1.2	2.9	0.0	7.6	1.2
	10-19	69	94	5.8	9.5	14.5	13.8	15.7	9.6	2.9	1.1	43.5	16.0
	20-29	51	44	41.2	33.3	27.5	22.7	15.7	13.7	13.7	2.2	45.1	29.5
	≧30	115	72	31.3	37.5	42.6	36.1	16.5	13.0	13.0	8.3	55.7	51.4

30型以外の各型ウイルスに対する抗体保有率の季節別変動は，10%前後で，30型のそれ（58.2%）に比べて明らかに小さかったが，1A型に対して高い抗体価を示すものがあり，同型ウイルス感染者が，少ないながら存在したことが推察される．

結　論

1974年2月から75年2月までに，東京都内で発生した小中学生の集団かぜ患者58集団について，病因検索を行い，また都民におけるライノウイルス中和抗体保有状況を調査した．

1）　かぜ患者検索の結果，都内におけるインフルエンザA型ウイルスの感染流行は，74年2月下旬から4月中旬までと，12月以降，アデノウイルス感染流行は，5月から11月にかけて，エコー5型ウイルス感染は，7月と10月にあったことを確認した．

検索した58集団中30集団においてインフルエンザA型ウイルス感染を確認し，61株のAホンコン型ウイルスを分離同定した．アデノウイルス感染は，6集団において確認し，18株のウイルスを分離同定した．エコー5型ウイルスは，2集団において確認し，6株のウイルスを分離同定した．ライノウイルスは，分離できなかったが，151組のペア血清の検索を行い，4月と10月に各1例づつ30型ウイルスの感染があったと確認した．

2）　74年6月と10月に採取した健康都民血清の，ライ

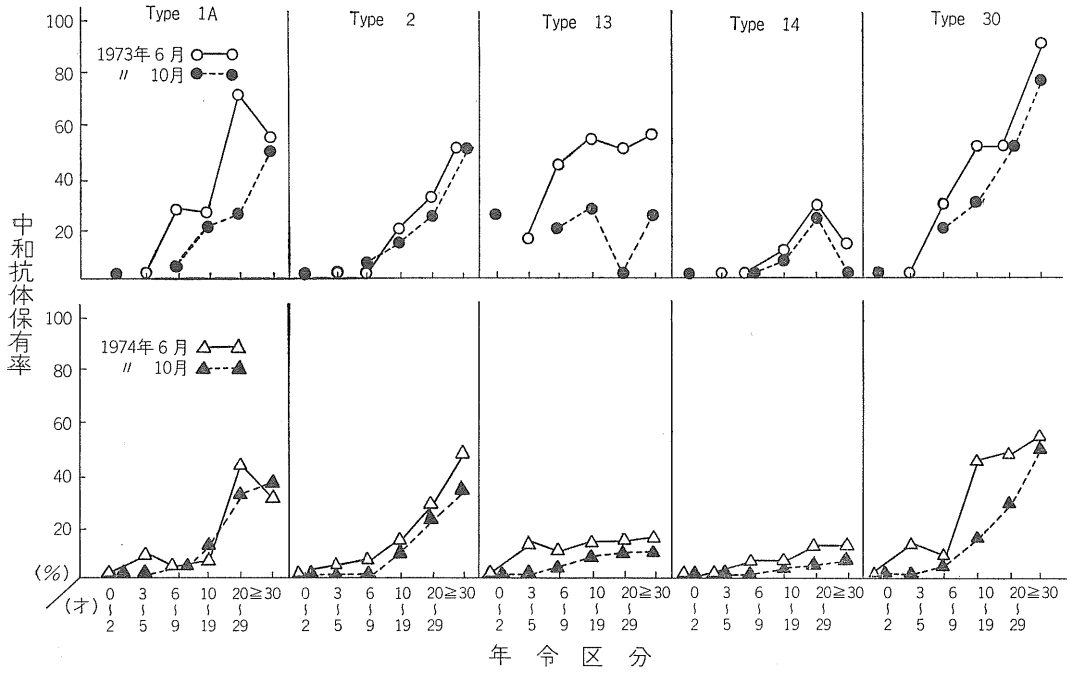


図1　ライノウイルスの年令別中和抗体保有率の推移（抗体価≧1：8）

表5　かぜ患者のライノウイルス中和抗体保有状況

型	採血時期	抗体価 <8	8	16	32	64≧128	陽性率 ≧1：8
1A	'73 12月—'74 1月	11					0.0%
	2 — 4	52	1		2		5.5
	5 — 7	34	5	1			15.5
	10 — 12	98	8	2	1	1	10.9
2	'73 12月—'74 1月	11					0.0
	2 — 4	48	7				12.7
	5 — 7	38	2				5.0
	10 — 12	101	9				8.2
13	'73 12月—'74 1月	11					0.0
	2 — 4	49	6				10.9
	5 — 7	38	2				5.0
	10 — 12	101	8	1			8.2
14	'73 12月—'74 1月	11					0.0
	2 — 4	51	2	1	1		7.3
	5 — 7	38		1	1		5.0
	10 — 12	108	1	1			1.8
30	'73 12月—'74 1月	9	1			1	18.2
	2 — 4	23	22	2	3	3 2	58.2
	5 — 7	31	6	1	1	1	22.5
	10 — 12	95	10	4	1		13.6

ノウイルス中和抗体保有状況（≧1：8）は，加令に伴う保有率の上昇パターンから，急上昇した1A，2，30型ウイルスと，上昇の緩やかな13，14型ウイルスに大別できた．

6月と10月との抗体保有率の変動状況から74年には，30型ウイルスの感染流行があったと推測した．

かぜ患者のライノウイルス中和抗体保有状況の逐時変動経過から，30型ウイルス感染流行ピークが，74年2月から4月にあったことを，明らかにした．

謝辞　ＨＥＬ細胞およびライノウイルス株を分与された日本医科大学衛生学教室の，諸先生に深く感謝する．

（本研究の一部は，日本感染症学会第49回総会で，1975年4月1日発表した．）

文　献

1）坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内清，岩崎謙二，根津尚光：東京衛研年報，24，81，1972
2）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，1，11，1973
3）川名林治，松本一郎，稲田捷也，斉藤都，佐藤豊：臨床とウイルス，1，17，1973
4）岩崎謙二，藪内清，伊藤忠彦，柳澤靖子，矢野一好：東京衛研年報，26，69，1975
5）岩崎謙二，矢野一好：東京衛研年報，25，73，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 64—68. 1975

1974年8月から1975年3月における東京都民の風疹の血清疫学的研究

柳澤靖子* 岩崎謙二* 柳下徳雄**

Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants in Tokyo, in the Period from August 1974 to March 1975

YASUKO YANAGISAWA*, KENJI IWASAKI* and NORIO YANAGISHITA**

緒　言

1975年，年頭から都内各地において，小学生を主体に幼稚園児，中学生および高校生の間に，臨床的に風疹と診断される患者が多発し，6月中旬までの届出患者数は1,112名に達し，学級閉鎖を行なった学校も80校に及んだ．

この風疹流行に際して，著者らは患者の血清学的検索を行なった一方，1969，1970，1973年の調査にひきつづき，1974年における都民の風疹ＨＩ抗体保有状況を調査したので，その概要を報告する．

検査材料および方法

患者血清　供試血清は，1975年2月以降都内で発生し，臨床的に風疹ないし同症の疑いで，学級あるいは学年閉鎖を行なった19集団81名の患者血清で，急性期・回復期ペアで採取できたのは68組であった．

健康者血清　供試血清は，都内居住健康者から採取した742件である．17～35歳の健康婦人血清418件は1974年8月から75年3月にかけて，健康小児・児童血清324件

表1　1975年2～6月に発生した風疹患者集団の検索成績

受付月日	所轄保健所	集団名	急性期血清数	回復期血清数	有意抗体上昇確認数
1975. 2. 8	蒲田	東六郷小	5	5	5
3. 8	碑文谷	私立サレジオ中	2	2	
3. 8	新宿	大久保中	5	5	2
3. 10	板橋	中台小	1		
3. 13	糀谷	萩中小	4	4	4
3. 17	芝	開業医	5		
3. 18	梅ヶ丘	富士中	4	4	4
3. 24	芝	芝浦小	5	5	5
4. 9	町田	薬師中	1	1	1
4. 16	日野	多摩市立中	14	14	
4. 25	町田	25. 35. 41歳	3		
4. 28	練馬	北町小	3	3	2
4. 30	糀谷	大森第一中	6	6	5
5. 8	梅ヶ丘	6歳	1	1	×
5. 13	葛飾	亀有小	5	5	
5. 22	小平	創価学園高	3	3	2
5. 27	梅ヶ丘	日本学園高	4		
6. 6	小金井	小金井第二小	5	5	3
6. 11	田無	保谷小	5	5	2
			81	68	35

* 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
**東京都立駒込病院感染症科

表2　風疹患者の急性期・回復期血清抗体価の相関表

		急性期のHI抗体価										
		<8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	≧4096
回復期のHI抗体価	<8	1										
	8											
	16											
	32											
	64					1						
	128	1					3					
	256	1		1	1	2		4		1		
	512	3		2		1		4		5	1	1
	1024	1	1		1	4	4	1	1	5		
	2048	4	2	1						3		
	≧4096	1	1		1			1	1			

表3　臨床的に風疹と診断された患者の血清抗体価の変動

M. S	1.	3	7	16					
	2.	16	2048	1024					
	3.								
T. S	1.	5	8	12	15	18	23		
	2.	1024	1024	≧4096	1024	1024	2048		
	3.	256	512	≧4096	512	512	1024		
M. K	1.	2	6	9	12	14	18		
	2.	32	2048	2048	2048	2048	2048		
	3.	8	≧4096	1024		512	1024		
T. H	1.	7	9	12	16	19	22	29	
	2.	512	2048	2048	2048	2048	1024	512	
	3.	256	256	512	1024	64	512	128	
A. S	1.	4	6						
	2.	512	2048						
	3.	64	512						
K. O	1.	3	5	7	9	11	13	15	17
	2.	128	2048	≧4096	≧4096	≧4066	≧4096	≧4096	≧4096
	3.	32	512	512	1024	1024	1024	≧4096	1024
M. O	1.	5	7	9	11	13	15	17	19
	2.	64	2048	2048	≧4096	≧4096	2048	≧4096	2048
	3.	32	1024	512	2048	2048	256	≧4096	1024
M. S	1.	7	9	12	16	22	25		
	2.	2048	≧4096	1024	512	1024	1024		
	3.	256		256	128	256	512		
H. M	1.	3	6	10					
	2.	32	≧4096	≧4096					
	3.	8	1024	1024					

（注）　1＝病日
2＝風疹HI抗体価
3＝2ME処理後の風疹HI抗体価

は1974年9月から75年6月にわたって採取した.

供試血清は小試験管に分注しゴム栓で密栓し，試験時まで−20° のフリーザー内に凍結保存した.

HI試験 前報と同じく，被検血清はカオリンの前処理を行ない，マイクロタイター法により実施した.[1-3] HA 抗原は市販品（東芝化学工業ＫＫ製）を使用した.

検査成績および考察

風疹患者の血清学的検索成績 1975年2～6月の間に検索した風疹患者19集団81名の検査概要を表 1 に示した.

急性期血清に対する回復期血清の HI 抗体価上昇8倍以上を有意上昇すなわち風疹ウイルス感染確認と判定すると，68例の検索で35例（51.5%）の感染を確認した.

同一患者の急性期および回復期血清の HI 抗体価を対比させると表2の通りで，当然のことながら，急性期血清の抗体価が高値になるに従って有意上昇を示した比率も低くなった. すなわち急性期の抗体価が32以下の場合にはほぼ全例において有意抗体上昇を示したが，64以上ではその抗体価上昇に応じて有意上昇の比率が低くなり，1024以上では全例が有意上昇を示さなかった.

急性期血清において，HI 価1024以上という異常な高値を示したものが16例（23.5%）もあった.

風疹発病日数と患者血中抗体価との関連を明らかにする目的で，9名の風疹患者について逐時的採血を行ない，血清中の HI 価を測定した. その成績は表3に示した.

同一病日でも個人によって抗体価の高低にかなりの差はあったが，2病日で HI 価32，3病日で16～128，4病日で512，5病日で64～2048，6病日で2048～≧4096と，風疹ウイルス罹患の場合には，他のウイルス疾患に比べて，比較的早い病日から，抗体価上昇のあることが明らかとなった.

風疹発病の病日は，一般に発疹出現を指標として算定しているが，風疹ウイルス感染後，臨床症状が出現するまでに，14～21日の長い潜伏期を経過し，その間に生体内でウイルス増殖が行なわれることを考えれば，前述の抗体早期出現は単なる見かけ上のことで，本質的なものではない. したがって，風疹罹患の血清学的診断効率を向上させるためには，他のウイルス疾患の場合以上に産生抗体の免疫化学的分析を考慮しなければならない.

前述の病日を追って採血した8名の患者血清45例につ

表4 風疹患者血清の2ME処理と処理前との抗体価の対比

		2-ME 処理後の HI 価										
処理前の HI 価		<8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	≧4096
急性期	<8	4										
	8		2									
	16			1								
	32											
	64	1			1							
	128				3	1						
	256			1	2	2	1					
	512											
	1024							8	2			
	2048									1		
	≧4096											
回復期	<8											
	8											
	16											
	32											
	64	1										
	128					2	1					
	256					1	4	1				
	512		1					6			1	
	1024							2	5	1		
	2048										2	1
	≧4096											

いて，2メルカプトエタノール処理（以下2ME処理と略す）を行ない測定したHI価を表3に示してある．[4]

風疹患者血清のHI価は早い病日であっても2ME処理による顕著な抗体価の低下がみられず，各個人の病日経過と2ME感受性抗体の出現消長との関連も明らかでなかったが，1/4以下に低下した比率を病週ごとに算出したところ，第1病週で10/14（71.4%），第2病週で9/15（60.0%），第3病週で3/9（33.3%），第4病週以上で2/7（28.6%）と病週の進行にしたがって低下する比率が下がる傾向を示した．

表1に示した患者急性期・回復期ペア血清30件について2ME処理後HI価と処理前のHI価を対比させると表4の通りで，処理前のHI価32以上のものの2ME処理によりHI価が1/4以下に低下したのは，急性期血清で17/23（73.9%），回復期血清で5/29（17.2%）であった．

他のウイルス疾患時に応用されている2ME感受性抗体のチェックによって，近い過去の感染を確認する方法は，風疹罹患の場合には応用価値が少ないように思う．

最近では，プロティンAを含む黄色ブドウ球菌（Cowan I株）で血清を吸収すると，IgGが吸収され，IgMが残存するので新しい感染がチェックできるとの報告がある．[5]

健康都民の風疹ウイルスHI抗体保有状況

妊娠可能年齢層である17～35歳の女性から採取した血清418例のHI抗体価測定結果を表5に示した．

調査期間1974年8月～75年3月の月別抗体保有率（HI

表5　健康都民女性（17～35歳）の風疹HI抗体保有状況

採取時期	検査件数	風疹HI抗体価 >8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	≧4096	≧8の抗体保有率
1974 8	40	9	1	1	2	8	10	5	2	1	1		77.5%
9	34	5	2	3	4	7	8	2	2			1	85.3%
10	50	8	1	4	7	10	8	3	2	3	3	1	84.0%
11	33	7		1	5	6	2	4	3	2		3	78.8%
12	81	16	1		10	18	19	8	5	2		2	80.2%
1975 1	83	17	2	4	7	16	15	17	3	2			79.5%
2	52	10		1	5	7	8	10	7	3	1		80.8%
3	45	10		3	11	9	7	3	2				77.8%

表6　都内健康児童の風疹HI抗体保有状況

受付月日	所轄保健所	年齢層	検体数	抗体保有率(≧8)	風疹HI抗体価 <8	8	32	64	128	256	512	1024	≧4096
74. 9.28	新宿	2—3	6	0%	6								
10. 9	〃	1—2	8	0	8								
10.15	〃	6—9	17	12	15	1		1					
10.15	〃	11—13	10	20	8					1			
10.21	〃	13—14	7	43	4		1	1	1				
12. 4	雪ケ谷	15—17	35	49	18		3	7	5	1	1		
75. 4.26	梅ケ丘	6—12	38	5	36			1	1				
5.21	青梅	6—12	58	0	58								
5.21	〃	13—15	29	3	28						1		
6. 5	糀谷	5—9	20	45	11					1	5	3	
6. 5	浅草	5—9	15	0	15								
6. 9	下谷	5—9	17	12	15					2			
6.10	〃	12—13	10	20	8						2		
6.11	東村山	5—6	11	46	6						4		1
6.17	糀谷	12—13	10	90	1			1	3	3	2		
6.18	武蔵調布	8—9	12	8	11					1			
6.18	〃	12—14	10	10	9				1				
6.21	東村山	8—9	11	18	9						2		

価；≧1：8）をみると，各月とも80%前後であって，月間変動はほとんどみられなかったが，HI価2048以上の高値を示したものは，74年10～12月に多かった．これらの調査はシングルサンプルについて行なったのでその理由は明らかにすることはできなかった．

1974年9月～75年6月に採取した健康児童・生徒324名の風疹HI抗体保有状況調査結果は表6に示した．

同一年齢階層であっても，供血群別（地域別）によって抗体保有率（HI価；≧1：8）は差があった．これは風疹の流行がしばしば散発的または小流行的に発生することの反映であろう．

1974～75年における健康児童・生徒324名全体の抗体保有率（HI価；≧1：8）は17.9%ときわめて低率であった．

1974～75年の健康都民風疹HI抗体保有状況を，1969・70・73年の調査成績と対比させると図1のとおりである．

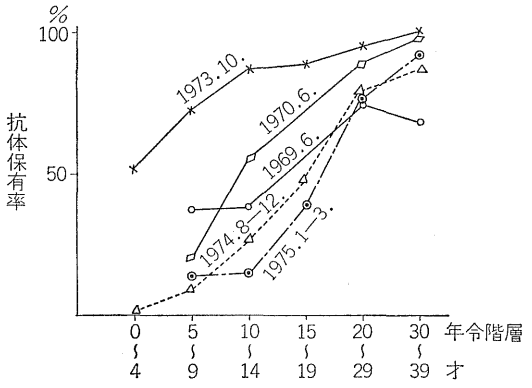


図1　風疹HI抗体保有率（≧1：8）の年次推移

74年から75年初めの風疹抗体保有率は，とくに20歳以下の低年齢において低率で，75年春の風疹多発の原因の一つとして，保有抗体の低下があったことが明らかとなった．

結　論

1975年2～6月に都内で発生した風疹患者19集団68名の血清学的検索および1974～75年における健康都民の風疹ウイルスHI抗体保有状況を調査した．

1）風疹患者68名の急性期・回復期ペア血清HI抗体検索で，有意抗体上昇（8倍以上）を示したのは35名（51.5%），急性期においてHI価1024以上の高値を示したものが16名（23.5%）あった．

急性期血清の抗体価が32以下のものは，全例有意抗体上昇を示したが，64以上のものは抗体価上昇に応じて有意上昇の比率が低下した．

発疹出現後の血中抗体出現産生は個人によって差があったが，3病日でHI価16～128，5病日で64～2048と比較的早期に高値を示すものがあった．

風疹患者血清のHI価は早い病日であっても2ME処理によって著明な抗体価減少はみられなかったが，病週経過にともなって2ME処理による低下の比率が下がる傾向を示した．

2）1974～75年における健康都民742名の風疹HI抗体保有状況調査結果をみると，17～35歳の女性の抗体保有率（HI価；≧1：8）は，80.4%，児童・学童は17.9%で，とくに低年齢層が，69・70・73年の調査に比べて低率であった．

文　献

1）岩崎謙二，坂井富士子，藪内　清他：東京衛研年報，21，31，1969
2）山田澄夫，岩崎謙二，柳澤靖子，佐々木憲子：東京衛研年報，22，47，1970
3）柳澤靖子，藪内　清，坂井富士子，伊藤忠彦，岩崎謙二：東京衛研年報，，25，47，1974
4）東　昇，石田名香雄：新ウイルス学Ⅱ，初版，633，1972，朝倉書店，東京
5）Ankert, J., Christensen, P., Kjellén, L. and Kronvall. G.: *J. Infect. Dis.* 130, 268, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 69—72, 1975

1968～75年に分離したAホンコン型インフルエンザウイルス株の抗原分析に関する研究

岩崎謙二* 藪内 清* 伊藤忠彦*
柳澤靖子* 矢野一好*

Antigenic Analysis of A/Hong Kong Influenza Virus Strains isolated in 1968—1975

KENJI IWASAKI*, KIYOSHI YABUUCHI*, TADAHIKO ITO*, YASUKO YANAGISAWA* and KAZUYOSHI YANO*

緒　言

1968年Aホンコン型インフルエンザウイルスが出現して以来，東京都内においても毎年同型ウイルスによる流行がくりかえされ，その間流行株に若干の連続抗原変異のおこってきたことは，すでに報告をした.[1-4]

今回は1968～75年の流行時に患者から分離したAホンコン型ウイルス株の抗原構造を，HI 抗体産生能および抗血清，健康成人血清によるHA被抑制の両面から検討し，ウイルス株の類別をおこない，ウイルス類別と流行年次経過の関連を究明したので概要を報告する.

実験材料および方法

ウイルス株　実験に供したウイルスは計14株のAホンコン型インフルエンザウイルス（以下AHK「イ」ウと省略す）で，A/愛知2/68株は1968年に，A/福岡1/70株は70年に，A/千葉5/71株は71年に，A/熊本1/72，A/東京494/72株は72年に，A/東京452/73，A/東京364F/73，A/東京368F/73株は73年に，A/東京3/74，A/東京649F/74は74年に，A/東京705/75，A/東京720/75，A/東京790/75，A/東京825/75株は75年に，当該流行時に患者うがい液から分離された．愛知2/68，福岡1/70，千葉5/71，熊本1/72株は北里研究所ウイルス部五十嵐博士より分与を受けた．他のウイルス株は当研究室において患者材料から分離同定したものである.

HA抗原　採取したウイルス感染鶏卵漿尿液を4° 氷室内に約1カ月放置，3,000 rpm 30分間の遠心沈殿をおこない，上清を使用した.

抗ウイルス血清　ウイルス感染漿尿液を成鶏の翼下静脈内に1週間隔で接種して作成した．接種量は5 ml/回で，ウイルス希釈を，10^{-3}，10^{-2}，10^{-1}，10° と漸時上げて免疫し，最後免疫1週後に全採血をおこない，抗ウイルス・ニワトリ血清を採取した．抗血清は−20° フリーザー内に凍結保存した.

健康成人血清　ワッセルマン反応検査依頼の目的で，当研究所に送付された単一成人血清の中から選出して実験に供した.

HI 試験　前報に準じておこなった.[5] 被検血清はRDE処理をおこなった後，マイクロタイター法によりHI価を測定した.

実験成績および考察

供試AHK「イ」ウ株と，同ウイルス株に対する抗血清を用いておこなった交叉HI 試験成績を表1および表2にしめした.

HI 価評価の基盤統一をするために，表中の数値はHomo 株のHI価に対する比率を2の対数値で表わしてある．別報で詳述しているように，著者らは抗体価の表現として扱われる数値は3次元の性状をもった数であり，またHI 価の測定手技からくる制約を考慮して，抗体価の値は対数値で表現されるべきであると思う.[6]

流行年次経過との関連究明に便利なように，表中の抗原および抗血清は当該ウイルス株の分離年次順にならべた.

各ウイルス株の免疫原性を比較するために，表1および表2の試験成績をもとにして，抗血清別に各ウイルス

* 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　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	ホモのHI価	A/愛知2/68	A/千葉5/71	A/熊本1/72	A/東京452/73	A/東京368F/73	A/東京3/74	B/東京69/73	東京649F/74
161 A/愛知2/68	2048	0	−1	−3	−2	−4	−4	<−6	−4
212 A/千葉5/71	2048	−1	0	−3	−1	−4	−3	<−6	−4
233 A/熊本1/72	8192	−3	−4	0	−2	−3	−3	<−8	−3
217 A/東京452/73	512	−4	−4	−4	0	−3	−3	<−4	−3
235 A/東京368F/73	16384	−2	−3	0	0	0	−1	<−9	−1
239 A/東京3/74	1024	−3	−4	−1	1	−1	0	<−5	0
230 B/東京69/73	4096	<−7	<−7	<−7	<−7	<−7	<−7	0	<−7

抗原のHI価比の折線グラフを作成し，パターンの相似性からウイルス株を類別したところ，5群にわけられた．すなわち1群には愛知2／68，福岡1／70，千葉5／71，東京494／72株が，2群には熊本1／72株が，3群には東京452／73株が，4群には東京364F／73，東京368F／73，東京3／74，東京790／75株が，5群には東京649F／74，東京705／75，東京720／75，東京825／75株が類別できた．

一方，HA抗原型を比較するために，表1および表2の成績をもとにして，抗原株別に各抗血清でのHI価比の折線グラフを作成し，パターンの相似性からウイルス株を類別したところ4群にわけられた．

この1～3群は前述した免疫能での類別と完全に一致したが，免疫能での4群と5群はHA抗原型では類別できずに一括された．

免疫ニワトリ血清でのHA抗原型類別を再確認する目的で，1群　愛知2／68，東京494／72株，2群　熊本1／72株，3群　東京452／73株，4群　東京368F／73，

表2　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	ホモのHI価	A/愛知2/68	A/福岡1/70	A/熊本1/72	A/東京494/72	A/東京452/73	A/東京364F/73	A/東京368F/73	A/東京3/74	A/東京649F/75	A/東京705/75	A/東京720/75	A/東京790/75	A/東京825/75
161 A/愛知2/68	4096	0	0	−2	0	−2	−4	−4	−3	−4	−4	−4	−3	−4
202 A/福岡1/70	4096	0	0	−3	−1	−2	−4	−4	−3	−4	−4	−4	−3	−4
233 A/熊本1/72	8192	−2	−3	0	−3	−2	−2	−2	−2	−2	−2	−2	−2	−2
213 A/東京494/72	4096	1	1	−4	0	−2	−4	−4	−4	−4	−4	−4	−3	−4
217 A/東京452/73	512	−3	−3	−4	−4	0	−3	−3	−3	−3	−3	−3	−2	−3
235 A/東京368F/73	16384	−2	−2	0	−2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
239 A/東京3/74	2048	−3	−3	−2	−2	0	−1	0	0	−1	0	0	0	−1
247 A/東京649F/74	16384	−1	−1	−1	−2	0	−1	0	0	0	0	0	0	−1
243 A/東京705/75	2048	−1	−2	−2	−2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
251 A/東京720/75	16384	−1	−1	−2	−1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
252 A/東京790/75	8192	−3	−3	−2	−2	0	−1	−1	0	0	0	0	0	0
255 A/東京825/75	4096	0	0	−3	−1	0	0	0	0	0	0	−1	0	0

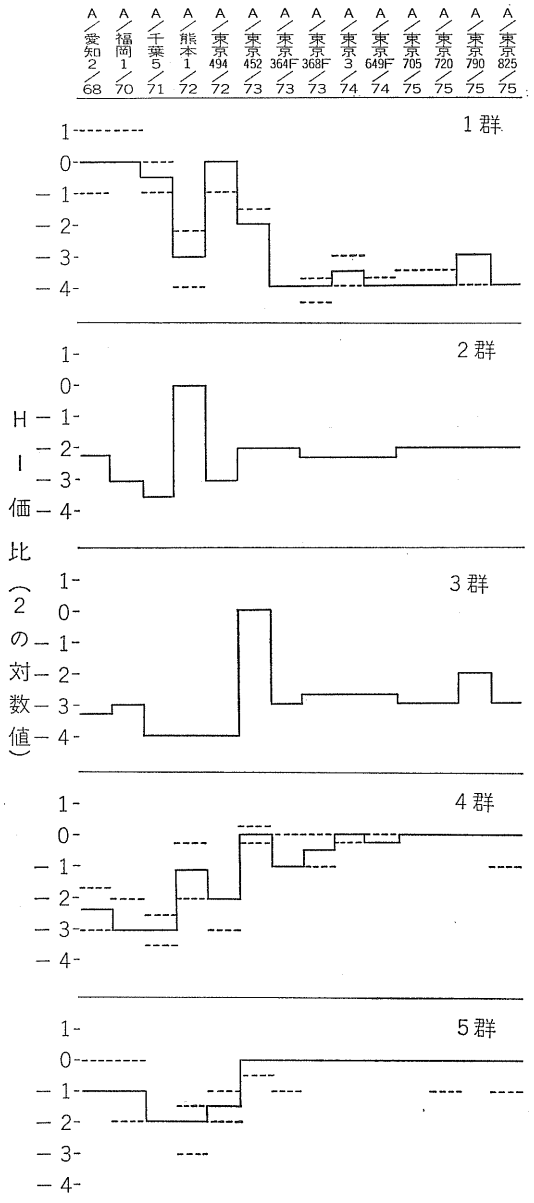


図1 免疫原性によるAホンコン型インフルエンザウイルスの類別

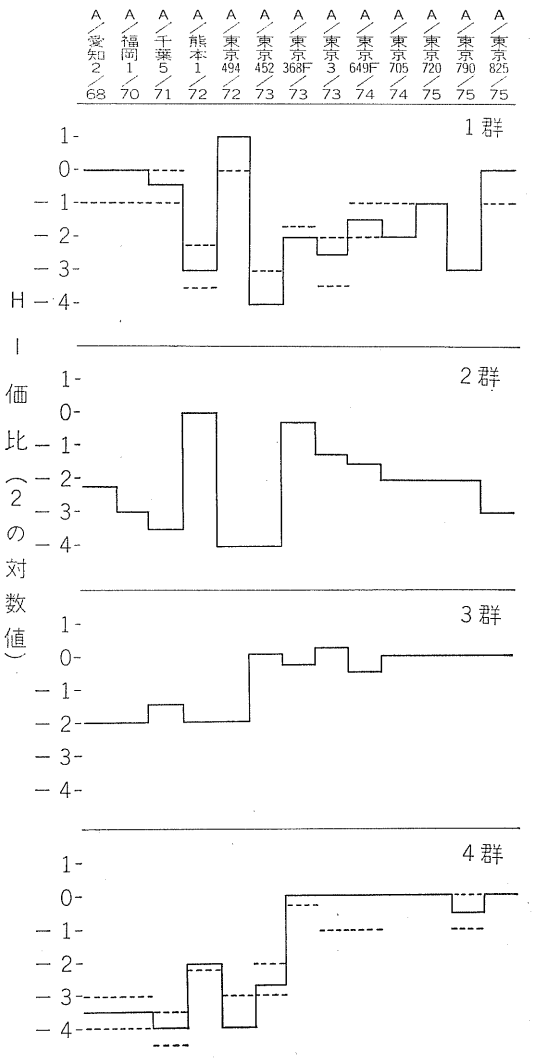


図2 A抗原性によるAホンコン型インフルエンザウイルスの類別

東京790／75，東京649F／74，東京825／75株の8抗原を用い，健康成人血清のHI試験をおこなった．HI価2^4以上の価をしめした成人血清223例を採血時期別の4群（74年9月10日49例，同月13日49例，75年5月13日61例，同月23日64例）にわけ，同一血清の各抗原に対するHI価を対比させ，ウイルス株間の相関係数を算出して平均値をしめすと表3のようになった．

相関の強さによって類別すると，1群　愛知2／68，東京494／72，2群　熊本1／72，3群　東京452／73，4群　東京368F／73，東京790／75，東京649F／74，東京825／75に大別でき，免疫ニワトリ血清での試験結果と一致した．詳細にみると，免疫ニワトリ血清を用いた試験結果と異なり，ヒト血清での試験では4群内のウイルス株間にわずかではあるが差がみとめられ，2亜群にわけることができた．

表3 健康成人血清について測定したAホンコン型インフルエンザウイルスHI抗体価のウイルス株間の相関係数

	A/愛知 2/68	A/東京 494/72	A/熊本 1/72	A/東京 452/73	A/東京 368F/73	A/東京 790/75	A/東京 825/75
A/東京494/72	0.8586 ±0.0137						
A/熊本1/72	0.6506 ±0.0467	0.6430 ±0.0358					
A/東京452/73	0.6969 ±0.0403	0.7124 ±0.0333	0.6099 ±0.0356				
A/東京368F/173	0.5809 ±0.0498	0.6142 ±0.0595	0.5673 ±0.0301	0.8190 ±0.0234			
A/東京790/75	0.6178 ±0.0291	0.6557 ±0.0377	0.6774 ±0.0299	0.8308 ±0.0243	0.8795 ±0.0061		
A/東京649F/74	0.6137 ±0.0398	0.6409 ±0.0492	0.6702 ±0.0251	0.8545 ±0.0172	0.8695 ±0.0162	0.9283 ±0.0208	
A/東京825/75	0.6473 ±0.0451	0.6557 ±0.0624	0.6749 ±0.0207	0.8152 ±0.0335	0.8566 ±0.0119	0.9098 ±0.0240	0.9126 ±0.0179

数値：相関係数値
± ：標準誤差値

1，2群にくらべて3群ウイルスの抗原型が4群に近いと考えられる試験結果ではあるが，「イ」ウイルス感染歴を明確にできないこのような集団ヒト血清を用いた試験では，相関係数値の差はすなわち抗原上の差（定性的）と考えることができるが，係数値が1に近い値であっても，偶然性を含んでいるため，そのまま抗原上の一致と理解することはできない．

以上の試験結果の分析により，AHK「イ」ウ株は抗原構造上1～4群に，4群は免疫原性から4（1），4（2）群に分類できる．

このように類別したウイルス株の流行年次経過を追ってみると，1群ウイルスは1968～72年に，2群ウイルスは72年に，3群ウイルスは73年に，4群ウイルスは73年秋以降に検出されている．

「イ」ウイルス1のつの抗原型が流行すると，集団はその型に対し抗体飽和の状態となり，抵抗を受けがたい変異ウイルスが次期流行ウイルスになると一般に考えられており，[7] 上述の1～3群までの変遷はこれで説明できるが，広い抗原域をもった4群ウイルスの出現を説明することはできない。

「イ」ウイルス粒子は保有する抗原単位の範囲内で，集団における免疫飽和に応対し，主抗原の配分を次々と変え，いわゆる連続変異をおこしながら生きのび，配分が行きづまったときに広い抗原域をもったウイルスが出現するのではないだろうか．

結　論

1968～75年に分離したAHK「イ」ウの抗原構造を，ニワトリにおけるHI抗体産生性ならびに，抗ウイルスニワトリ血清および健康ヒト血清によるHA抑制性の両面から検討し，ウイルス株の分類を試み，その分類と流行年次の関連性を究明した．

1) AHK「イ」ウ株は，免疫原性およびHA抗原性のパターンから1～4群に分類でき，4群は免疫原性上の差で2つの亜群に細別できた．4群ウイルスは1～3群に比して主抗原域が広かった．

2) 1群ウイルスは1968～72年，2群ウイルスは72年，3群ウイルスは73年，4群ウイルスは73年秋以降の流行時に検出された．

文　献

1) 坂井冨士子，岩崎謙二，藪内清，柏木義勝，山田澄夫，根津尚光：東京衛研年報，21，15，1970
2) 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：東京衛研年報，23，41，1972
3) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二，根津尚光：東京衛研年報，24，81，1973
4) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二，根津尚光：東京衛研年報，25，59，1974
5) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二，根津尚光：東京衛研年報，25，65，1974
6) 岩崎謙二：東京衛研年報，26，81，1975
7) 日本公衆衛生協会：香港かぜ，51，1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 73—76, 1975

1974年度東京都の日本脳炎の疫学的調査

柳澤靖子* 藪内 清* 伊藤忠彦* 岩崎謙二*
木下正彦** 永野清一郎** 加藤孝雄**

Ecological Survey of Japanese Encephalitis Virus in Tokyo in 1974

YASUKO YANAGISAWA*, KIYOSHI YABUUCHI*, TADAHIKO ITO*, KENJI IWASAKI*,
MASAHIKO KINOSHITA**, SEIICHIRO NAGANO** and TAKAO KATO**

緒 言

近年わが国の日本脳炎（以下日脳と略す）患者の発生は，全国的に減少の傾向をたどっている．しかし，地区別にみると，近畿以西特に九州・沖縄地方では毎年100名前後の患者が発生し，高い死亡率と重度な後遺症をのこし，依然として重要な感染症としての位置をしめている．

幸い，1968年以降東京都内での感染を疑う患者は発生していないが，1962年以来のわれわれの調査成績から，都内にはいまだに毎年日脳ウイルスの存在が確実に証明されている．[1,2] 従って，本症の疫学的性質からいって，単に表面にあらわれた患者数のみにとらわれず，今後も監視をつづける必要があると考える．

本報は1974年度の調査成績である．

実験材料および方法

1. 患者血清 本年4月から11月にかけて都内伝染病院に疑似日脳として送院された4名の患者血清延12件を検査対象とした．

当研究科に送付された血液は，直ちに血清分離し，−20° に凍結保存した．

2. ブタ血清，使用ウイルス抗原，血清試験法，コガタアカイエカの採集法およびウイルス分離同定試験法

表1 1974年度東京都に発生した疑似日本脳炎患者の血清学的検索成績

検体No.	患者氏名	年齢性	採血月日	病日	赤血球凝集抑制反応 日本脳炎 中山	赤血球凝集抑制反応 日本脳炎 JaGAr 01	日本脳炎	補体結合反応 ポリオ 1	ポリオ 2	ポリオ 3	コクサッキーB 1	コクサッキーB 2	コクサッキーB 3	コクサッキーB 4	コクサッキーB 5	ムンプス	アデノ	エコー6	ヘルペス	中和反応 ポリオ 1	ポリオ 2	ポリオ 3
487	上○つ○	53♀	7.31	8	<10	10	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	4<	4	32	16	2	8
488			8. 4	12	<10	<10	<4	16	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	8	32	128	8	16
489			8.13	21	<10	20	<4	8	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	4	32	64	8	16
492	島○昇○	33♂	4.26	36	10	20	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	4	4			
493			5.15	55	10	20	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	4	8			
494			5.28	68	10	20	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	4	16			
598	藤○良○	24♂	10.11	26	20	20	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64	16			
599			11.18	64	20	20	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64	16			
502	吉○忠○	55♂	9.30	12	20	40	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8			
503			9.28	10	20	40	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8			
510			10. 5	17	20	20	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	16			
519			10.12	24	20	20	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧128				

* 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
** 東京都多摩食肉衛生検査所

表2 1974年度東京都のと場ブタの日本脳炎 HI 抗体保有状況

採血月	日	HI 抗体価 (JaGAr 01 株) <10	10	20	40	80	160	320	640	1280	≧2560	陽性率 % (≧1:10)	2ME-S 抗体保有率 %	ウスイ分離
1.	28	42							1	1	6	16	0	(−)
2.	25	50							1			2	0	(−)
3.	18	44								1	5	12	0	(−)
4.	22	46		1	2			1				8	0	(−)
5.	27	49										0		(−)
6.	24	48	1		1							4	0	(−)
7.	1	50										0		(−)
	8	50										0		(−)
	15	50										0		(−)
	22	50										0		(−)
	29	50										0		(−)
8.	5	49	1									2	0	(−)
	12	48		2								4	0	(−)
	19	50										0		(−)
	26	46	2	1								6	0	(−)
9.	2	50										0		(−)
	9	50										0		(−)
	17	46	2									4	0	(−)
	24	42	2	3			1				2	16	38	(−)
	30	49			1							2	100	(−)
10.	7	50										0		(−)
	14	48	2									4	0	(−)
	21	44	1	1							4	12	0	(−)
	28	48										0		(−)
11.	5	50										0		(−)
12.	10	49		1								2	0	(−)

すべて既報に準じた.[1)]

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 検査成績は表1にしめす通りで，被検査者4名すべて日脳り患は否定された．そこで，更に日脳ウイルス以外で無菌性髄膜炎をおこす可能性のあるウイルスの中，当研究科で検査可能なものについて検索した．その結果，「藤○」例はムンプスウイルス感染の疑いがみとめられ，「吉○」例は血清学的にも臨床的にもヘルペス脳炎とそれぞれ診断されたが，他の2例については，われわれのおこなった検索の範囲内では確診をくだすに至らなかった．

2. と場ブタの赤血球凝集抑制 (HI) 抗体保有状況 1974年度に採血した都内産ブタの経時的日脳 HI 抗体保有状況の調査結果は表2の通りである。

すなわち，9月24日採取血清中に本年はじめての新鮮感染を疑うことができる，2メルカプトエタノール感受性（以下2ME・Sと略す）抗体陽性個体がみいだされた．これは，昨年の9月10日より更におくれている．

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 抗体価≧1：10の陽性率について図示すると，図1のようになる．すでに前報において，1963年から1973年に至る各年の HI 抗体保有状況は，四つのパターンに大別でき，最近における都内の日脳ウイルスの汚染は，年を追うごとに希薄になっていることを述べた.[3)] 本年も依然として HI 抗体保有率が低率で，最高時でも実に16%をしめしたにすぎず，ますますこの傾向を強めていることがうかがわれた。

一方，と場ブタ血清の中，HI 抗体価 <1：10のもの1248頭について，乳のみマウスを用いてウイルス分離を試みたが，全例陰性であった．

3. コガタアカイエカの消長とウイルス分離試験 当研究所および上野動物園にライトトラップを設置して蚊を採集し，その消長を調査すると共に，ウイルス分離試験をおこなった．その成績は表3にしめす通りである．われわれは，1972年以来同一個所で蚊の採集をおこなっているが，本1974年は過去いずれの年よりも多くの個体を採集できた。この採集個体数の多少から，都全体にお

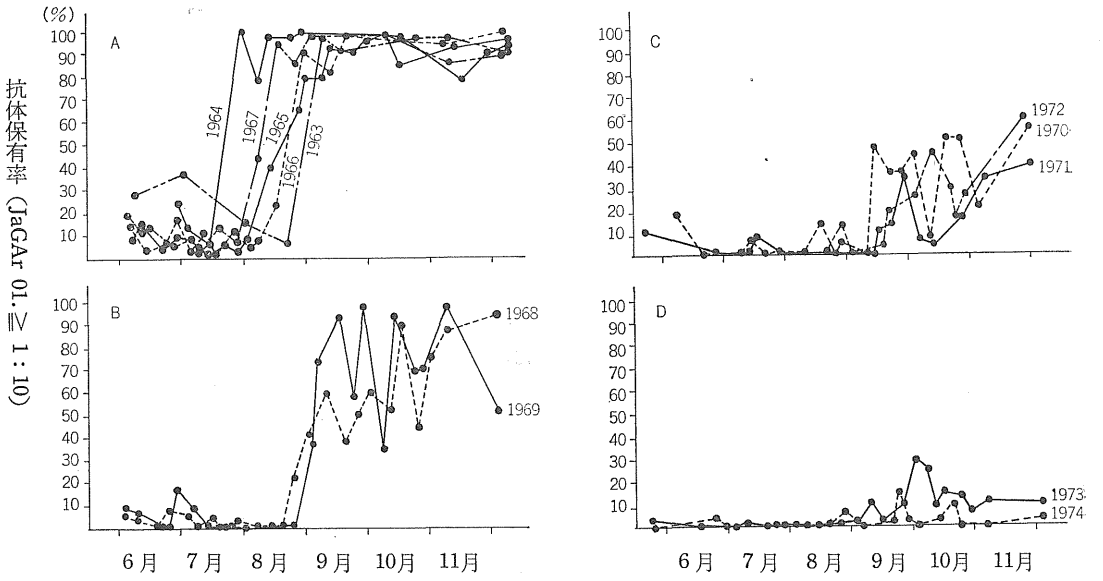


図1　東京都におけると場ブタの日本脳炎 HI 抗体保有状況の年次別比較

表3　1974年度東京都のコガタアカイエカの消長

採集月日	上野動物園 こども動物園 ウマ舎1 ♂	♀	ウマ舎2 ♂	♀	シカ舎 ♂	♀	西園 バーバリーシープ山 ♂	♀	都衛研 ニワトリ舎 ♂	♀
6. 10	1	14	0	11	0	1	0	1	0	2
24	0	11	1	9	0	0	7	13	0	0
7. 1	0	0	1	14			0	0	0	0
8	3	33	10	66	0	1	4	30	0	0
15	0	36	0	38	12	0	39	339	0	3
18	0	58	0	59	0	0	215	451	0	16
22	1	57	7	42	12	0	64	431	0	24
25	5	71	17	59	6	1	18	9	1	32
29	2	20	1	9	5	0	3	110	0	12
8. 1	0	17	4	23	18	7	8	217	1	6
5	1	73	0	58	10	5	3	335	0	0
8	4	82	6	90	4	0	7	242	0	0
12	24	115	25	98	36	31	10	127	0	0
15	74	570	114	758	0	2	70	722	1	3
19	22	200	20	192	32	30	14	24	0	4
22	14	66	6	58	5	0	10	98	0	1
26			15	48	10	7	23	95	0	0
29	23	70	11	65	10	13	2	16	3	1
9. 2	21	41	7	26	2	4	25	204	3	6
16	3	26	11	29	0	1	4	196	0	2
30	0	2	0	3			1	18	1	0

ける蚊の母集団の大きさは論じられないが，この急増はあるいは今後の日脳の流行に何らかの変化があることを示唆しているものであるかもしれない．

また，蚊からのウイルス分離は全例陰性であった．

かつては，都内においても多数の患者が発生し，高い致命率と重度な後遺症のため恐れられていた日脳も，ここ数年来減少の一途をたどり，次第に関心がうすくなる傾向にある．しかし，日脳という疾患の疫学的性質からいって，その流行は，宿主の抗体保有状況はもちろんのこと気温，湿度，雨量などの気象条件や農薬散布量その他の要因が複雑にからみあって関与しているであろうことが想像される．しかも，本症がなぜ激減したかという真の理由が解明されていない現段階では，この諸条件の変動によってはいつ再燃しないとも限らない．現に，都内においても日脳ウイルスによる汚染が毎年証明されているので，今後もこの種の疫学的調査をつづけ，警戒する必要があると考える．

結　論

1974年度東京都の日脳の疫学的調査をおこない次の結論をえた．

1. 疑似日脳として送院された4例について，血清学的検査を実施したところ，全例真性日脳は否定され，1例はムンプスウイルスの感染が疑われ，1例はヘルペス脳炎と診断できた．他の2例についてはその病因を明らかにすることはできなかった．

2. と場ブタ血清の日脳HI抗体保有状況調査では，最高HI抗体保有率16%（9月24日）で，これは過去12年間の調査中最低のものであった．また，2ME・S抗体保有個体の出現は9月24日であった．

3. と場ブタ血清およびコガタアカイエカからのウイルス分離試験はすべて陰性であった．

4. 1974年度は都内には日脳真性患者の発生はなかったが，日脳ウイルスの汚染は存在していたことを証明した．

謝辞　本調査を実施するに当り，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じんの謝意を表する．

文　献

1) 藪内　清，坂井冨士子，伊藤忠彦，岩崎謙二，根津尚光，木下正彦，永野清一郎，加藤孝雄：東京衛研年報，24，75，1972
2) 岩崎謙二，藪内清，柳澤靖子，矢野一好，根津尚光：東京衛研年報，24，61，1972
3) 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：東京衛研年報，25，53，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 77—80, 1975

腸内ウイルス感染の実態は握に関する研究（第7報）

——1974年の東京都内3下水処理場下水からのウイルス分離成績——

矢野一好* 藪内 清* 岩崎謙二* 辺野喜正夫*

Epidemiological Survey on Enterovirus Infection (VII) Virus Isolation made at Three Sewage Treatment Plants in Tokyo in 1974

KAZUYOSHI YANO*, KIYOSHI YABUUCHI*, KENJI IWASAKI* and MASAO BENOKI*

緒 言

われわれは，下水中のウイルスの消長を経時的に追及し，その検索結果から排水地域住民の腸管系ウイルスの感染流行状況を推測することができないか，という考えのもとに，1967年以来，毎月定期的に都内の下水処理場で下水を採取し，ウイルス分離試験をおこなってきた．1973年以前の成績については，既に報告した通りである．[1-4]

本報は，1974年の検索成績である．

実験材料および方法

検体採取場所，採取方法，処理方法およびウイルス分離同定法はすべて既報に準じた．[1,2] ただし，下水採取に使用した滅菌綿タンポンの脱脂綿量を500gから50gに減量した．

実験成績および考察

各下水処理場で採取した検体からのウイルス分離成績は，表1にしめす通りである．

すなわち，東京都西部地区の排水が流入している落合処理場では，60件の検体中45件から計72株のウイルスを，東部地区の排水が流入している砂町処理場では，120件中36件から計39株のウイルスを，また同じく東部地区の排水が流入している三河島処理場では，12件中5件から計5株のウイルスを，それぞれ分離した．

これらの検出ウイルスを種類別にみると表2の通りで，アデノウイルスとコクサッキーB群5型ウイルスが高ひん度に分離された．この高率に検出された両ウイルスについて，月別検出状況と，われわれの関知し得た患者発生状況とを対比した成績を図1にしめした．まず，アデノウイルスについてみると，落合処理場においては殆んど年間を通して分離されているが，砂町処理場では2～4月と11月に分離されているだけで，地域差がかなりあった．一方，われわれが検索した集団かぜの中，アデノウイルスが病因であることが確診できたものは，5～6月と10～12月に6集団発生しているが，これらはいずれも都内西部地区にあって，落合処理場への下水流入地域とその周辺であった．また，ヒトの疾患と関係の深いアデノ3型ウイルスは，落合処理場の検体からのみ分離されている．これらのことから，下水中のアデノウイルスの消長がその地域の感染流行状況をある程度反映しているものと推測された．

コクサッキーB群5型ウイルスについては，過去1968年に高率に検出されたが，それ以後はずっと検出されず，1973年になって5年ぶりに再び出現し，ひきつづいて本年8月まで主流ウイルスとしての地位を占めている．このコクサッキーB群5型ウイルスの下水中への出現状況から，昨年1月から本年8月にかけて都内においてコクサッキーB群5型ウイルスの感染流行が相当広範囲にわたってあったことが考えられたが，残念ながらわれわれが検索した範囲内では，本ウイルスと疾患との関連性はとらえられなかった．われわれが検索対象とした集団かぜおよびその他の感染を疑った者は，主として小中学校生で，低年齢層の患者，散発例および軽症例は対象とならなかった．コクサッキーB群5型ウイルスの病因を考えるには今後これらのものも検索対象にふくめる

* 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

表1　1974年東京都内で採取した下水からのウイルス分離試験成績

採取場所	検体種類	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 導水渠	P2・CB5	AD2・AD CB5	AD・CB5	AD・P2 P3		(+)	CB5		AD	AD・P2	AD・P1	AD・Reo 1
	生下水 高段	P2・CB5	AD2・AD CB5	AD・CB5	AD・P2	AD・P3	CB5	CB5	AD・CB5	AD	AD	AD	AD・Reo 1
	生下水 低段	CB5	AD・AD5	AD6・CB5	AD・P2	AD		CB3・CB5	AD		AD	AD	AD3・Reo 1
	第2沈澱汚泥	AD・CB5	AD2・CB5	AD5・AD		P2・CB5	P1. CB5	CB5	CB3		AD6		Reo 1
	第2沈澱池		CB5	AD				CB5				AD	
砂町処理場	生下水 マンホール	P2	AD					CB5				AD	Reo 1
	生下水 沪過機				AD		CB5						
	生下水 砂町系			CB5							P2		
	汚泥 砂町(1)	CB5	AD・CB5		P2		CB5	CB5	CB3		P2	P2	
	汚泥 砂町(2)	CB5	CB5	CB5				CB3・CB5					CB3
	汚泥 木場(1)		CB5				CB5				P2	CB3	
	汚泥 木場(2)	CB5	CB5		P3			CB5			P1		
	第2沈澱池 砂町(1)		AD5・CB5					CB5					
	第2沈澱池 砂町(1)												
	第2沈澱池 木場(1)		CB5	CB5	AD6								
三河島処理場	沈澱汚泥	CB5	CB5	CB5				CB5	CB5				

注　P1(2,3)＝ポリオ1型（2,3型）ウイルス．　CB3(5)＝コクサッキーB群3型（5型）ウイルス．
AD2(3,5,6)＝アデノ2型（3,5,6型）ウイルス．　AD＝アデノウイルス（型未同定）．
Reo 1＝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
P 1	2	1	0
P 2	7	6	0
P 3	2	1	0
CB3	2	4	0
CB5	20	20	5
AD2	3	0	0
AD3	1	0	0
AD5	2	1	0
AD6	2	1	0
A D	26	4	0
Reo 1	4	1	0
未同定	1	0	0
計	72	39	5

必要があると考える．

両処理場を通じて，7月以降はコクサッキーB群3型ウイルスがコクサッキーB群5型ウイルスに混在して検出されるようになった．すなわち，都内において7月以降コクサッキーB群3型ウイルスの感染流行が発生したものと考える．下水へのウイルス出現状況からみた都内におけるコクサッキーB群3型ウイルスの流行は，1970年，72年にも発生したので，最近は1年間隔で流行が発生している．

また，ポリオウイルスは春秋2回のポリオ生ワクチンいっせい投与の時期にのみ検出され，その型別は2型が13株，1型および3型はそれぞれ3株で，例年の成績とかわらなかった．

レオウイルスは12月になって5株，主として西部地区の下水から検出された．この検出は15ヵ月ぶりであった．レオウイルスの感染背景を推測することは，ウイルスの性質上むずかしい．

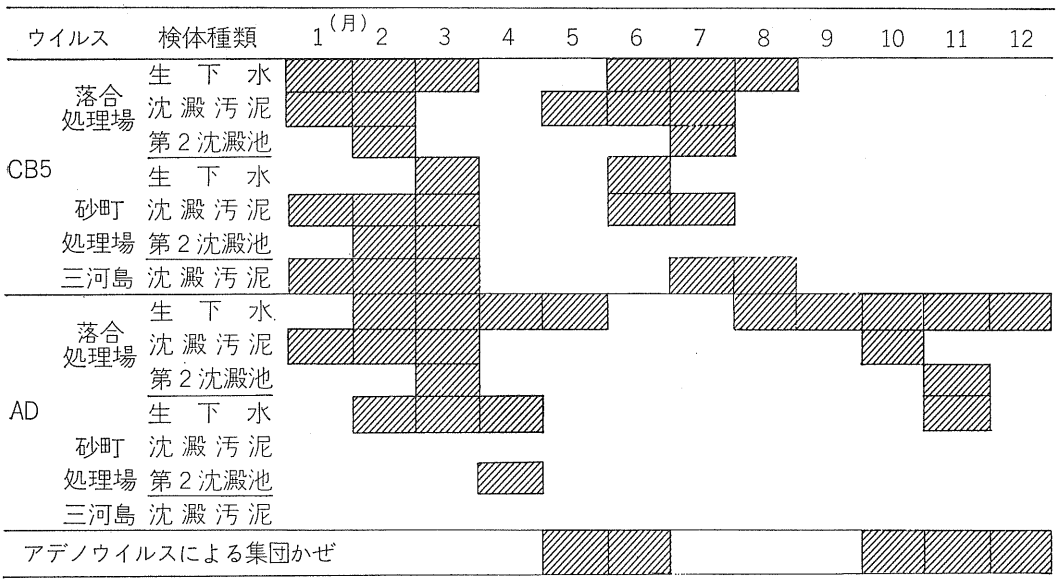


図1　1974年下水からの高ひん度検出ウイルスの月別消長

下水検体からのウイルス分離試験に使用した，5継代細胞の細胞別ウイルス検出成績を表3にしめす．

コクサッキーB群ウイルスおよびアデノウイルスは，FL，HeLe S_3，Hep2 細胞での検出率が高く，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．これは従来の傾向と同一のものであった．

結　論

1.　192件の下水検体から116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（17%），コクサッキーウイルス51株(44%)，アデノウイルス40株(34%)，レオウイルス5株(4%)，未同定ウイルス1株（1%）であった．中でも，アデノウイルスとコクサッキーB群5型ウイルスが最も高率に検出された．

2.　アデノウイルスの検出は地域差がかなりみとめられ，砂町処理場では2～4月と11月に分離されただけであったが，落合処理場ではほとんど年間を通じて分離された．われわれが検索した集団かぜの中，アデノウイル

表3 培養細胞種類別のウイルス検出成績

ウイルス	継代細胞				
	FL	HeLaS$_3$	Hep2	Vero 518	Vero #462
P 1	1	0	2	1	0
P 2	8	3	4	1	0
P 3	1	1	0	1	0
CB3	1	3	2	1	0
CB5	30	22	22	12	0
AD2	1	2	2	0	0
AD3	0	0	1	0	0
AD5	1	2	2	0	0
AD6	1	3	1	1	0
A D	12	17	17	7	1
Peo 1	0	0	0	0	5
未同定	1	1	1	1	0
計	57	54	54	25	6

スによるものと診断できたものが6集団あったが，これらはいずれも，落合処理場への下水流入地域とその周辺部に発生したものであった．

3. コクサッキーB群5型ウイルスについては，下水からの検出状況からみて，昨年1月から本年8月にかけて都内に相当の感染流行があることが推察されたが，それを裏づける流行例をみいだすことはできなかった．

4. 本年7月以降は，コクサッキーB群5型ウイルスにかわって3型ウイルスがひん繁に分離されるようになり，同ウイルスの感染流行があったものと推察される．

謝辞 本調査を実施するにあたり，多大のご協力を賜った，東京都下水道局落合処理場，砂町処理場の関係各位に深甚の謝意を表する．

文 献

1) 岩崎謙二，柏木義勝，坂井富士子，藪内清他：東京衛研年報，20，35，1968
2) 岩崎謙二，山田澄夫，柳澤靖子，佐々木憲子：東京衛研年報，22，35，1970
3) 岩崎謙二，柳澤靖子，矢野一好，山崎清，坂井富士子，藪内清，根津尚光：東京衛研年報，24，53，1972
4) 岩崎謙二，柳澤靖子，矢野一好，山崎清，坂井富士子，藪内清，根津尚光：東京衛研年報，25，41，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 81—86, 1975

1968～1974年における東京都民の日本脳炎ウイルス HI 抗体保有状況の分析

岩崎謙二*

Seroepidemiological Observation on the Incidence of HI Antibodies against Japanese Encephalitis in Tokyoites in 1968–1974

KENJI IWASAKI*

緒　言

本報は，近年の東京都内における日本脳炎ウイルス（以下日脳「ウ」と略す）汚染の急激な低下が，都民の日脳「ウ」抗体保有状況にどのように反映しているかの検索成績であり，新しい視点からおこなった集団の抗体保有状況分析の試みでもある．

都内での日脳患者発生は1968年以降わずかに4名で，これら患者はいずれも他県で感染したと考えられる例ばかりであった．また，都内飼育ブタの日脳「ウ」抗体獲得時期が7月から10月へと年ごとに遅くなり，抗体獲得率も100%から10数%と低下の一途をたどっており，最近の都内における日脳「ウ」汚染は非常に低下している[1-7]．

集団における抗体保有状況は，一般には抗体保有率および抗体価という異なった性状の代表値によって表現され，両値は独立した形で利用されることが多い．

著者は，これら両値は関連した形で利用することでより有効性を増すとの視点から，インフルエンザ「ウ」抗体保有分析に回帰線法を応用し，回帰線の変動と流行経過との関係を明らかにしてきたが，代表値の性状分析が充分でなかったため，分析結果に定量性をもたせることができなかった．[9,10]

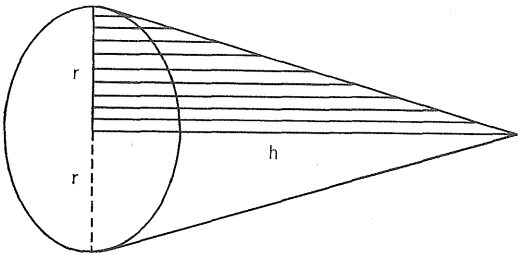
本報では分析結果に定量性を導入するため，抗体価および抗体保有率の性状を理論的に考え，数値の次元統一をはかって分析をおこなった．

実験材料と方法

健康都民血清　1968—74年に採血した計2404例の都内在住健康者血清で，毎年5—7月に約360名づつ採血した．

抗体価の測定　大谷の方法に準じて赤血球凝集抑制抗体価（以下HI価と略す）を測定した[8]．抗原としてワクチン製造株である中山株と，1959年蚊から分離したJaGAr 01株を用いた．両抗原は市販品（武田薬品KK製）を使用した．

抗体価および抗体保有率の数学的次元統一と評価パラメーターの設定　著者は集団における抗体保有状況を図1に示したように，抗体保有値rと抗体値hの構成する面積量としてとらえ，内容分析にrおよびhの変動を究明した．



$$s = \frac{1}{3}\pi r^2 h$$

図1　母集団における抗体保有状況の構成
h：抗体価　　πr^2：抗体保有率

抗体価として扱われる数値は，一定量の血清中に含まれる抗体量すなわち容量の表現値であるので，3次元の数値であって，その立方根値をとれば1次元に換元することができる．被検血清の2倍倍数希釈法によって測定されたHI価を，立方根値に換算して利用するには理論的に難点があるが，対数目盛に換算すれば単なる恒数上

* 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 東京都民の日脳 HI 抗体保有状況

年度	年齢区分	検査件数	JaGAr 01株HI価 ≧10	≧40	≧160	Nakayam 株HI価 ≧10	≧40	≧160
1968	—5歳	50	17	4	2	13	5	1
	6—12	110	28	7	1	12	1	0
	13—16	20	5	3	1	5	1	1
	17—30	53	25	17	8	26	14	5
	31—59	68	53	39	13	51	29	6
	60—	55	49	25	11	33	13	0
1969	—5	48	17	4	1	14	3	0
	6—12	109	30	12	5	16	6	1
	13—16	22	16	4	2	9	2	1
	17—30	50	23	16	5	19	8	1
	31—59	76	59	38	19	53	19	5
	60—	58	52	34	15	41	13	0
1970	—5	47	16	6	2	11	3	0
	6—12	116	34	14	3	17	4	0
	13—16	15	6	2	1	3	2	1
	17—30	63	22	12	5	16	6	0
	31—59	62	43	18	5	25	3	0
	60—	51	37	16	2	16	3	0
1971	—5	41	24	10	2	25	9	0
	6—12	115	32	6	0	28	2	0
	13—16	12	5	3	2	5	3	1
	17—30	54	24	17	7	23	13	1
	31—59	65	48	32	13	45	19	3
	60—	59	48	27	6	41	10	0
1972	—5	27	16	6	1	10	1	0
	6—12	93	30	15	2	23	7	2
	12—16	21	5	3	2	4	2	0
	17—30	62	27	16	5	26	7	1
	30—59	89	52	32	11	42	14	5
	60—	32	24	12	1	17	2	0
1973	—5	29	25	17	7	21	12	5
	6—12	87	57	30	9	40	14	1
	13—16	20	12	5	1	5	2	0
	17—30	58	28	16	3	21	6	0
	31—59	81	68	52	24	60	26	3
	60—	43	38	29	15	32	13	2
1974	—5	37	18	6	0	25	11	2
	6—12	127	44	18	3	77	29	9
	13—16	12	0	0	0	4	0	0
	17—30	56	19	6	1	24	8	1
	31—59	69	37	13	3	45	19	3
	60—	40	23	11	0	26	3	0

の差になって本質的な矛盾は解消する．以上の理由で，抗体価評価のパラメーターとして2の冪数値（対数値）目盛は当をえたものと考え，これを採用することとした．

抗体保有率は自然感染における感染者のひろがりを反映しており，百分率として算出された数値を1次元の長さと考えた場合その間隔は一般には等価値ではない．2次元的なひろがりすなわち面積と考え，rを示標とすると逓減的価値評価のパラメータが設定できる．rは実際には抗体保有率の平方根値に置換して用いれば便利である．

抗体保有状況の数値的表現 グラフy軸に抗体保有率のパラメーターを，x軸に抗体価のパラメーターをとり，実測した抗体価別の抗体保有率（累積値の平方根値）を算出して対応点上にプロットし，抗体保有率y値を抗体価x値上の回帰と考える．回帰直線は最小二乗法で算出し，回帰直線とy軸との交点を$y(x_0)$，x軸との交点を$x(y_0)$とすれば，$y(x_0)$値は当該標本の抗体保有値を，$x(y_0)$値は保有抗体値，$y(x_0)$と$x(y_0)$値の積の半分は保有抗体総量を表すことになる．

標本間の抗体保有状況の比較は，保有抗体総量値の比の形で，内容的には保有抗体値および抗体保有値の比較で表現される．

実験成績と考察

1968—74年に採取した健康都民血清2404例について測定した，日脳「ウ」JaGAr 01株および中山株抗原に対するHI価の分布を表1にしめした．

これらの成績から前述した方法で，抗体保有値$y(x_0)$値，抗体値$x(y_0)$値を算出すると表2のようになる．表2の$y(x_0)$値，$x(y_0)$値について統計分析をおこなったところ，年齢階層間および調査年次間に有意の差がみとめられた．

年令階層別の比較 年齢階層別に1968—74年の平均$y(x_0)$値および平均$x(y_0)$値を算出して図示すると図2のようになる．

$y(x_0)$値はワクチン製造株である中山株，流行株であるJaGAr 01株ともに，6—12歳を底としたJ字型の年齢推移パターンをしめしたが，前者は後者にくらべて0.4—1.8低値であった．

$x(y_0)$値は中山株とJaGAr 01株で異なった年齢推移パターンをしめした．後者では最高と最低の間に2.5の開きがあり，13—16歳をピークとした1峰性の山型パターンをしめしたが，前者では最高と最低の差が1.1で，年齢階層間に明確な違いを認めなかった．

日脳抗体保有の年次推移 抗体保有値$y(x_0)$，保有抗体値$x(y_0)$および両者の積であらわされる総抗体量の年次推移傾向をみるために，年齢階層別に年次回帰係数を算出してしめすと表3のようになる．

3者の年次回帰係数値の相互間に強い相関（0.94—0.96）がみられることから，3者の年次推移傾向はほぼ同様であると考えられる．

表2　平方根値目盛法によって算出された抗体保有値 $y(x_0)$ および保有抗体値 $x(y_0)$

年齢区分	抗原株別	調査年次 1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	年次推移の変動係数
		抗体保有値〔$y(x_0)$ 値〕							
—5歳	J	5.1	5.3	5.8	7.8	7.1	9.9	7.2	0.244
	N	4.8	5.2	4.7	7.5	5.8	8.5	8.5	0.264
6—12	J	4.8	4.9	5.1	5.2	5.8	8.1	6.0	0.202
	N	3.2	3.8	3.7	4.8	4.6	6.8	7.3	0.324
13—16	J	4.9	7.8	6.1	6.6	4.7	7.7		0.211
	N	5.1	5.8	4.7	6.4	4.4	5.2	5.8	0.131
17—30	J	7.3	6.9	5.9	7.3	6.7	7.2	5.8	0.095
	N	6.8	6.2	5.1	6.5	6.1	6.2	6.9	0.095
31—59	J	9.4	8.8	8.4	9.1	7.8	10.9	7.3	0.133
	N	8.9	7.8	6.3	8.2	6.6	8.2	8.1	0.121
60—	J	9.8	10.4	8.7	9.5	9.1	11.1	7.9	0.112
	N	7.8	8.4	5.7	8.2	7.2	8.7	8.0	0.131
		保有抗体値〔$x(y_0)$ 値〕							
—5歳	J	5.2	5.2	6.0	6.0	6.5	8.6	4.1	0.237
	N	5.0	3.6	4.1	5.4	3.9	8.6	5.6	0.328
6—12	J	4.6	7.1	5.8	4.1	5.6	6.7	5.6	0.188
	N	2.7	5.1	3.9	2.7	5.2	4.9	6.5	0.317
13—16	J	8.8	6.1	7.6	9.3	10.5	6.2		0.218
	N	3.7	5.2	6.2	6.0	6.9	5.4	2.0	0.332
17—30	J	8.5	8.3	7.5	8.0	6.4	6.7	5.1	0.169
	N	7.3	5.3	5.2	7.5	4.9	3.9	4.0	0.265
31—59	J	7.8	9.2	6.0	7.4	7.8	7.0	5.7	0.163
	N	6.6	6.4	3.1	5.4	5.9	6.0	5.3	0.212
60—	J	7.0	7.7	5.1	6.1	5.0	7.9	5.8	0.186
	N	5.0	4.8	3.6	4.5	3.0	5.6	3.5	0.219

J：JaGAr 01　N：Nakayama　$x(y_0)$ 値は HI 価 1：10を原点として算出した

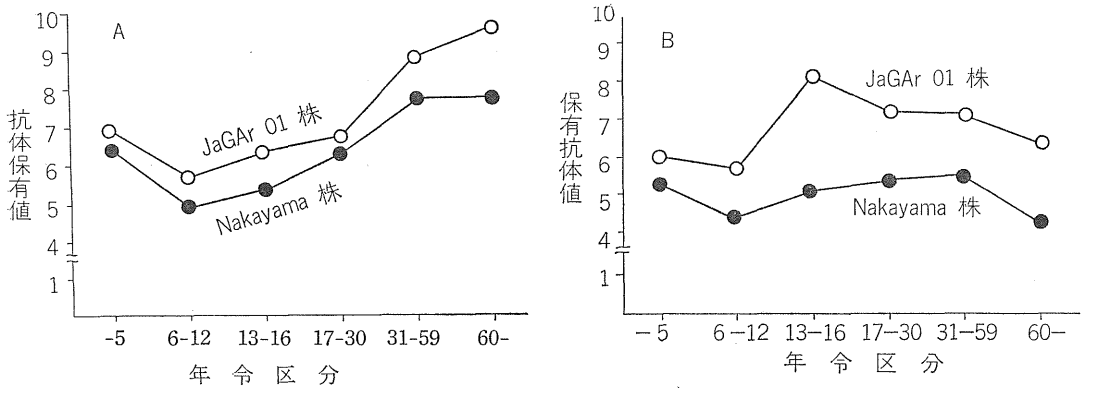


図2　A 1968～74年の平均抗体保有値 $y(x_0)$ の年齢推移
B 1968～74年の平均保有抗体値 $x(y_0)$ の年齢推移

$y(x_0)$ 値についてみると，JaGAr 01，中山両株とも16歳以下では正の係数値を，17歳以上では負の係数値をしめし，低年齢階層の抗体保有値は年次進行にともない上昇傾向を，高年齢階層では反対に下降傾向をしめしていることが明らかとなった．上昇傾向は中山株において，下降傾向は JaGAr 01株においてより明らかであった．

$x(y_0)$ 値についてみると，JaGAr 01株では16歳以下

表3 1968～74年における健康都民の日脳HI 抗体保有総量 $y(x_0)\times x(y_0)$，抗体保有値 $y(x_0)$，および保有抗体値 $x(y_0)$ の年次推移回帰

年齢区分	JaGAr 01 株			Nakayama 株		
	$x(x_0)$X $x(y_0)$	$y(x_0)$	$x(x_0)$	$y(x_0)$X $x(y_0)$	$y(x_0)$	$x(x_0)$
—5歳	4.8	0.60	0.14	6.5	0.68	0.41
	(0.51)	(0.77)**	(0.22)	(0.70)	(0.77)**	(0.53)
6—12	2.7	0.38	0.07	5.7	0.69	0.44
	(0.54)	(0.72)	(0.15)	(0.86)**	(0.94)*	(0.68)
13—16	1.2	0.15	0.05	−0.9	0.02	−0.14
	(0.37)	(0.21)	(0.06)	(−0.22)	(0.07)	(−0.18)
17—30	−4.2	−0.11	−0.52	−2.9	0.05	−0.46
	(−0.80)**	(−0.37)	(−0.92)*	(−0.58)	(0.17)	(−0.69)
31—59	−3.4	−0.10	0.32	−1.1	−0.05	−0.07
	(−0.51)	(−0.18)	(−0.58)	(−0.19)	(−0.11)	(−0.13)
60—	−1.9	−0.14	−0.12	−0.5	−0.10	−0.13
	(−0.22)	(−0.28)	(−0.22)	(−0.11)	(−0.21)	(−0.29)

( )：中の値は相関係数値　*：統計学的有意相関（危険率1％）
**：〃（危険率5％）
$x(y_0)$ 値はHI 価 1：10を原点として算出した

表4 普通目盛法およびプロビット目盛法により算出した抗体保有値 ( )，および $y(x_0)$，保有抗体値 $x(y_0)$

年齢区分	抗原株別	普通目盛				プロビット目盛			
		$y(x_0)$		$x(y_0)$		$y(x_0)$		(xy_0)	
		1968	1969	1968	1969	1968	1969	1968	1969
—5歳	J	25.6	27.5	4.1	3.8	4.3	4.4	14.3	11.8
	N	21.8	26.7	3.8	2.3	4.3	3.9	11.7	16.7
6—12	J	21.5	21.3	3.6	6.0	4.3	4.3	10.1	16.7
	N	10.2	12.8	2.0	4.5	3.8	4.0	6.9	13.7
13—16	J	23.0	59.3	5.3	4.5	4.3	5.3	11.9	12.1
	N	23.0	32.7	3.3	3.8	4.3	4.6	12.2	12.9
17—30	J	48.1	44.1	6.3	6.1	5.1	5.0	17.7	17.7
	N	43.8	35.2	5.1	4.0	4.8	4.7	16.2	11.3
31—59	J	76.8	70.2	6.4	7.2	5.9	5.7	13.1	16.7
	N	55.9	56.3	5.6	5.1	5.8	5.4	11.1	11.7
60—	J	84.9	90.3	5.5	6.0	6.2	6.3	11.4	12.5
	N	58.5	68.3	3.5	3.3	5.3	5.5	10.1	9.0

J：JaGAr 01　$x(y_0)$ 値はHI 価 1：10を原点として算出
N：Nakayama

と17歳以上，中山株では12歳以下と13歳以上を境として，$y(x_0)$ 値の場合同様に低年齢階層は年次進行に従った上昇傾向を，高年齢階層は低下傾向をしめした．また上昇傾向が中山株において，下降傾向が JaJAr 01株においてより強くあらわれたのも $y(x_0)$ 値の場合と同様であった．

これら上昇または下降傾向は単調な直線傾向ではなく，上昇下降の曲折経過をたどっているため，統計学的検定では年次間の変動は高度に有意であったが，年次推移と $y(x_0)$ 値の相関性は低年齢層を除いてほとんどが有意でなかった．昇降曲折の原因が標本血清抽出に起因するのか，抗体保有実態の反映であるのかは今後検討する必要がある．

高年齢階層における抗体有値ならびに保有抗体値の下降傾向が，流行株の抗原構造に近縁な JaGAr 01株により強くあらわれていることは，この下降傾向は近年の日脳「ウ」汚染低下の反映であると考えられる．

一方低年齢階層での抗体保有値ならびに保有抗体値の

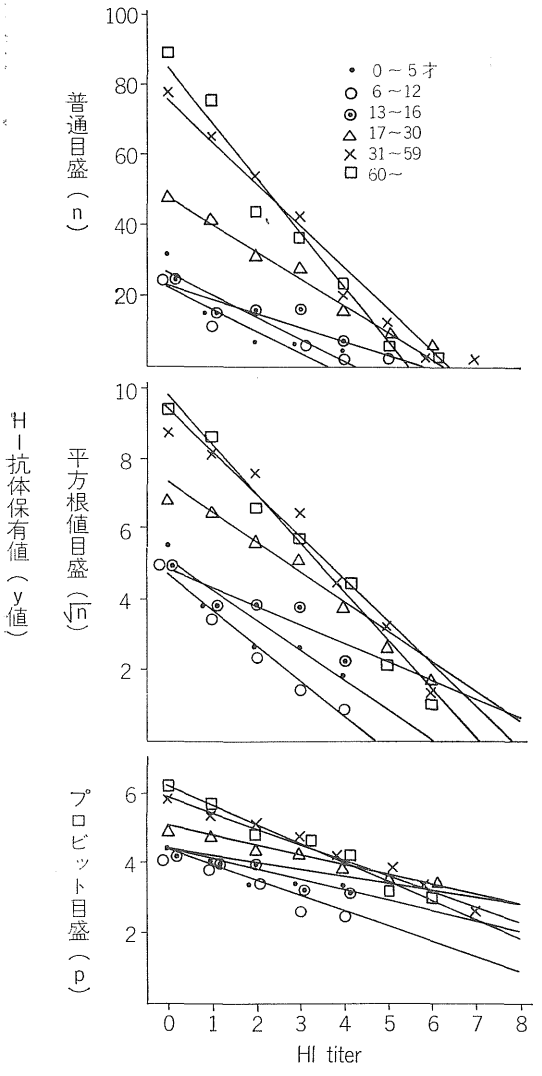


図3　1968年HI抗体保有状況の3法による比較分析（JaGAr 01株）

上昇傾向は，ワクチン製造株である中山株においてより強いことから，日脳「ウ」ワクチン接種の影響と考えられる．

日脳「ウ」HI抗体保有分析法の比較　上述した平方根値法(以$\sqrt{n}$下法と略す)と，抗体保有率値をそのままにしてあつかう普通目盛法（以下n法と略す）およびプロビット値に換算してあつかうプロビット法（以下P法と略す）で，1968，69両年の成績から $y(x_0)$ 値，$x(y_0)$ 値を算出すると表2および4のようになる．

3法により算出された $y(x_0)$ 値の相互の関連性を検討するために，相関をみると，3者の間には強い正の相関がみられた．

図3からもわかるように，標本間の差はn法で最大に，P法で最小に表現されたが，定量化という点からn法には問題がある．

一方，$x(y_0)$ 値をみると，n法が最小でP法が最大となった．標本の実測最高抗体価に比べてn法は低く，P法ははるかに高値をしめした．n法で低くなったのは，n法では低保有率値が回帰をとる際にしばしば疎外される結果であり，P法で高くなるのは，低い保有率値を過剰評価する本質的な原因と考えられる．

結　論

新しい視点にたった分析法で，1968—74年における東京都民の日本脳炎HI抗体保有状況の分析をおこなった．

集団の抗体保有状況を表現する抗体保有率および抗体価として扱れる数値の性状を検討し，抗体保有率評価パラメーターとして保有率の平方根値目盛を，抗体価評価パラメーターとして2の対数値目盛を採用した．

抗体保有率y値を抗体価x値の回帰として考え，最小二乗法により抗体保有値 $y(x_0)$ 値および保有抗体値 $x(y_0)$ 値を算出し，両値の比較で，抗体保有状況の分析をおこなった．

1.　1968—74年の平均 $y(x_0)$ 値を5歳以下，6—12歳，13—16歳，17—30歳，31—59歳，60歳以上の年齢階層別に算出し年齢推移をみると，JaGAr 01，中山両株とも6—12歳を底としたJ字型パターンをしめした．また $y(x_0)$ 値は JaGAr 01株で高値となった．

平均 $x(y_0)$ 値の年齢推移パターンは JaGAr 01株では13—16歳をピークとした一峰性の山型をしめしたが，中山株では年齢階層別の差が明らかでなかった．

2.　1968—74年における都民の日脳「ウ」HI抗体保有の年次推移は，年齢階層によって明らかな違いがあった．12歳以下の低年齢層では年次進行にともなった $y(x_0)$，$x(y_0)$ 両値の上昇傾向が，17歳以上では反対に下降傾向がみられた．低年齢層の上昇傾向はワクチン製造株ウイルスである中山株においてより強く，高年齢層の下降傾向は抗原的に流行株に近縁な JaGAr 01株により強くあらわれた．しかし，この上昇下降傾向は，昇降曲折経過をたどっているため，統計学的検定ではほとんどの例が有意とならなかった．

文　献

1) 藪内　清，岩崎謙二，村上一，坂井富士子，柏木義勝，中村義，材津尚光，平山淡二，渡辺賢哉：東京衛研年報，20，39，1968

2) 藪内　清，岩崎謙二，坂井富士子，柏木義勝，山田澄夫，根津尚光，渡辺賢哉，森脇康一：東京衛研年報，21，19，1969
3) 藪内　清，佐々木路子，坂井富士子，伊藤忠彦，岩崎謙二，根津尚光，渡辺賢哉，森脇康一，加藤孝雄：東京衛研年報，22，57，1970
4) 藪内　清，佐々木路子，坂井富士子，伊藤忠彦，岩崎謙二，根津尚光，渡辺賢哉，森脇康一，加藤孝雄：東京衛研年報，23，35，1971
5) 藪内　清，坂井富士子，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：東京衛研年報，24，75，1972
6) 藪内　清，坂井富士子，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：東京衛研年報，25，53，1974
7) 柳澤靖子，藪内　清，伊藤忠彦，岩崎謙二，木下正彦，永野清一郎，加藤孝雄：東京衛研年報，26，，1975
8) 大谷　明：微生物検査必携，451，1966，日本公衆衛生協会
9) 岩崎謙二，坂井富士子，村上一，藪内　清，柏木義勝，辺野喜正夫：東京都衛生局学会誌，29，67，1962
10) 藪内　清：日伝染会誌，40（5），129，1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 87—89, 1975

生薬の試験法に関する研究（VI） 蒼朮および白朮の識別法

西川洋一* 瀬戸隆子* 渡辺四男也*

Studies on Examination of Crude Drugs (VI) Differentiation of *Atractylodes Lancea Rhizoma* and *Atractylodes Rhizoma*

YOICHI NISHIKAWA*, TAKAKO SETO* and YOHYA WATANABE*

The rhizomes of *Atractylodes* (*Compositae*) are stipulated by Japanese Pharmacopoeia VIII dividing into *Atractylodes Lancea Rhizoma* (ALR) and *Atractylodes Rhizoma* (AR) of which identification is accepted as vanillin-hydrochloric acid reaction of atractylon.

Atractylon is a component of AR, however, it is contained in a few ALR. Atractylodin is one of specific components of ALR, so that it may be considered as a more reliable indication for differentiation of ALR and AR.

In this paper, an identification of atractylodin in n-hexane decoction of *Atractylodes* was discussed. Atractylodin is identified by TLC (as shown in Fig. 1) and UV (as shown in Fig. 3) after column chromatography with silicagel or alumina index II～III.

第８改正日本薬局方（以下日局８と略す）は朮を基原によって蒼朮と白朮に分別して収載し，生薬のエタノール温浸液に対するバニリン・塩酸反応を白朮の確認試験および蒼朮の純度試験として規定している．本反応は白朮の主成分である atractylon が塩酸々性でバニリンと赤色に反応することを応用したものである．しかし，著者らの研究によれば，現市場品の蒼朮中にもこれを含有するものがあり，またバニリン・塩酸試液で同様の呈色反応を示す他の物質も含有されているので，本反応は atractylon のみを対象とするものではなく，蒼朮，白朮の識別反応には適当でないと考えられる．そこで蒼朮の基原に共通の個有成分である atractylodin が識別対象として最適であると考え，日局８の補完試験法を目的として，生薬の n-ヘキサン浸液中の atractylodin をＴＬＣ，またはカラムクロマト処理後のＵＶ吸収測定によって確認する方法を確立したので報告する．

実験の部

朮類試料

(1)古立蒼朮（*Atractylodes lancea*）
(2)西北 〃 （*A. lancea* var. *chinensis*）
(3)天津 〃 （*A. lancea* var. *chinensis*×*A. japonica*?）
(4)北鮮蒼朮（*A. lancea* var. *simplicifolia*）
(5)韓国白朮（*A. japonica*）
(6)唐 〃 （*A. ovata*）

TLC による atractylodin の確認

プレート：①Kieselgel G，②Wakogel B-5FM. 展開溶媒：n-ヘキサン・ベンゼン・酢酸エチル混液（14：3：3）．試料溶液：生薬の粉末２ｇに n-ヘキサン５m*l* を加え，５分間振り混ぜたのち，ろ過した液．スポット量：0.01m*l*. 展開距離：10cm. スポットの検出：①紫外線（主波長365nm），②p-ジメチルアミノベンズアルデヒド１ｇを10%硫酸 20m*l* に溶かした液をスプレーし100°で５分間加熱する．atractylodin は Rf 約0.7を示し，プレート①に試液をスプレーし加熱するとき緑色～灰緑色のスポットとして，プレート②に紫外線を照射するとき暗色のスポットとして検出される．

シリカゲル（市販カラムクロマト用）

(1)Wakogel	C—200	100～200mesh
(2)Wakogel	Q—23	100～200
(3)Kieselgel	40	70～230
(4)Kieselgel	60	70～230
(5)Kieselgel	100	70～230
(6)Davison	No. 923	100～200

* 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

活性アルミナ（市販カラムクロマト用）

(1)和光純薬　（塩基性）　300mesh
(2)関東化学　（　〃　）
(3)Merck　塩基性　活性度1
(4)Merck　中　性　〃
(5)Woelm　塩基性　〃
(6)Woelm　中　性　〃

注：(1)，(2)は表示はないが試験の結果塩基性を示す．

吸着剤の活性度調節 元封を開き次の条件で処理する．

シリカゲル 180° で10時間乾燥して含水量0％のものをつくり，これに含水量5％，15%および25%となるようそれぞれ水を加えて2時間振り混ぜる．

アルミナ 180° で3時間乾燥して含水量0％のものをつくり，これに含水量3％，6％および10%となるようそれぞれ水を加えて2時間振り混ぜる．

色素による活性度の検定 活性度を調節処理した吸着剤を内径1.5cmのカラム管にかるくたたきながら長さ5cmに充塡し，これにズダンイエロー(以下SYと略す)の0.2% ベンゼン溶液2m*l*に石油ベンジン8m*l*を加えた液をおだやかに注加して吸着させたのち，石油ベンジン・ベンゼン混液（4：1）20m*l*を用いて展開させ，SY吸着帯の位置を確認する．

カラムクロマトグラフィーとUV吸収によるatractylodinの確認 吸着剤1gをn-ヘキサンを用いて内径8mmのかっ色カラム管に充塡し，これに生薬の粉末1gにn-ヘキサン10m*l*を加え5分間振り混ぜたのちろ過した液1m*l*を注入し吸着させ，n-ヘサンキで溶出する．溶出液 20m*l* をとりUV吸収を測定する．atractylodin $\lambda_{max}^{n\text{-hexane}}$nm ($\varepsilon$)：259 (11,900)，273 (13,700)，334 (38,400)，354 (30,200)

結果と考察

TLCによるatractylodinの確認 プレート①に検出試液をスプレーし加熱するとき，atractylodinはRf0.7附近に緑色～灰緑色を呈し，試料(1)～(4)で同Rf値に同呈色のスポットとして確認される．(5)および(6)はatractylodinとほぼ同じRf値にスポットを認めるが，このスポットは初め紅色を呈し，後に鮮やかな青色に変化するので区別できる (Fig. 1)．プレート②に紫外線を照射するとき，主波長254nmでは白朮類の試料(5)および(6)にatractylodinよりやや低いRf値を示す赤色のスポットが認められるが主波長 365nm ではこのスポットは認められず，atractylodinのみが蒼朮類の(1)～(4)にRf 0.7 附近に暗色のスポットとして確認される．

カラムクロマトグラフィーとUV吸収によるatractylodinの確認 高橋[2]は朮のエタノール抽出液について直接UV吸収を測定しatractylodinの吸収が認められると報告しているが，著者らがエタノールおよびn-ヘキサン浸液について直接UV吸収を測定した結果，Fig.2に示す如く蒼朮類の(1)～(4)はほぼ同様の吸収を示すが，正確なatractylodinの吸収が認められず，白朮類の(5)にもほぼ同じ波長に吸収が認められるので，生薬浸液の直接測定法は正確な確認とならない．

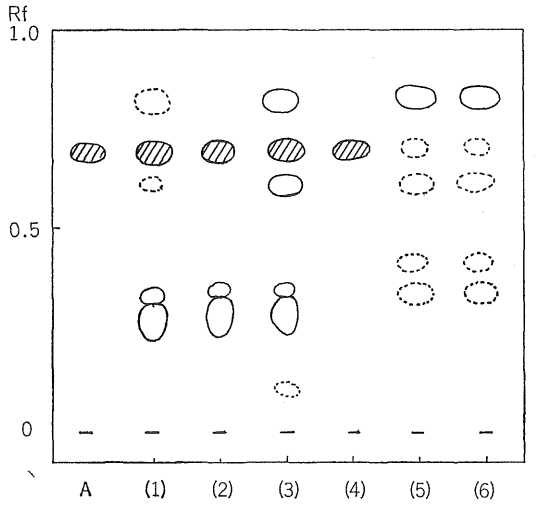


Fig. 1 Thin Layer Chromatogram of *Atractylodes*. plate : Kieselgel G, solvent : n-hexane・benzene・AcOEt (14 : 3 : 3), detection : p-dimethylaminobenzaldehyde-H_2SO_4 reagent, 100°5min
A : Atractylodin
(1) : *A. lancea*
(2) : *A. lancea* var. *chinensis*
(3) : *A. lancea* var. *chinensis*×*A. japonica*
(4) : *A. lancea* var. *simplicifolia*
(5) : *A. japonica*
(6) : *A. ovata*

そこでカラムクロマトグラフィーによって妨害物質を除去することを考え，市販の吸着剤のうち広く用いられているシリカゲルおよびアルミナについて検討した．市販のシリカゲルには活性度の表示はほとんどないが粒度は一般に表示され数段階に分けられており，アルミナは粒度の表示はほとんどないが活性度Ⅰの表示が多く，塩基性の他，中性および酸性に処理したものがある．そこでシリカゲルはよく市販されているカラム操作の行いやすい100～200mesh 付近のものについて，アルミナは塩基性および中性の活性アルミナについて実験した．シリカゲルおよびアルミナは含水量によって活性が変化するので，常法通り両者とも加熱乾燥して含水量0％(活性度Ⅰ)としたのち，シリカゲルについては Hernandez ら[3]

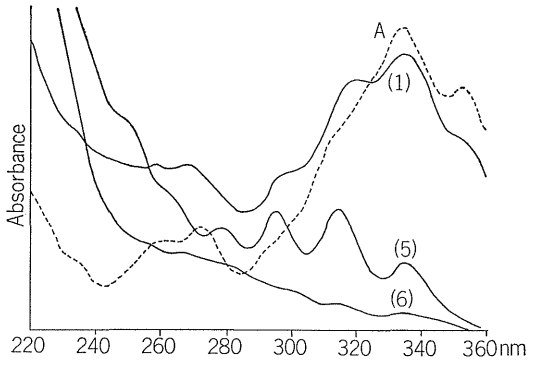


Fig. 2 UV Absorption Spectrum of n-Hexane Decoction of *Atractylodes*
A : Atractylodin $\lambda_{max}^{n\text{-hexane}}$nm (ε) : 259(11900), 273(13700), 334(38400), 354(30200)
(1) : *A. lancea* (5) : *A. japonica* (6) : *A. ovata*

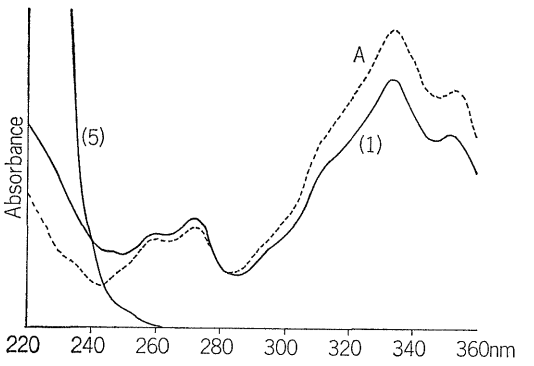


Fig. 3 UV Absorption Spectrum of Hn-exane Eluting Solution from Column
A : Atractylodin (1) : *A. lancea*
(5) : *A. japonica*

の報告に従い活性度Ⅱ，ⅢおよびⅣとなるように含水量5%，15%および25%に調製し，アルミナについては一般に活性度Ⅱ，ⅢおよびⅣは含水量3%，6%，および10%とされている[4]のでそのように調製して，これらについて色素を用いる検定法によって，はじめの溶出液20m*l* 中に溶出される atractylodin およびUV吸収妨害物質の分離について試験した．アルミナの活性度検定法としては6種のアゾ色素を用いる方法[4]がよく使われていてシリカゲル[8]にも応用されている．活性度の各段階を正しく検定するにはそれぞれ2種または3種の色素を必要とするが，簡単な目安をつけることを目的としてSYのみを用いて実験を行った．SYは活性度Ⅱでは5cmのカラムの上部に，Ⅲでは下部に吸着され，Ⅳでは溶出するとされている．[4] そこでSYの吸着帯の位置と atractylodin および妨害物質の分離能について検討した結果，両吸着剤ともSYの吸着帯がカラム上端から 0.3 cm 以下でかつ下端に達しない程度の活性度，すなわち活性度がほぼⅡ～Ⅲのとき，Fig. 3 に示す如く，蒼朮類(1)～(4)では妨害物質が溶出せず，atractylodin のみが溶出して，極大吸収が atractylodin のそれと全く一致して相対強度もほぼ同じ曲線を示し，白朮類(5)および(6)は260nm以上にほとんど吸収を示さなかったので最適条件である．この範囲より活性の強いものでは atractylodin が溶出せず，また弱いものでは同時に妨害物質が溶出してくるので，試験に供することができなかった．

n-ヘキサン浸液調製に用いる試料の量は粉末生薬の atractylodin の経時変化を考慮して1gとしたが，全形生薬を粉末として直ちに試料とする場合には，試料の採取量を少くするか，またはUV吸収測定に当って適当に希釈する必要がある．

以上考察する通り，TLCまたは活性度Ⅱ～Ⅲの吸着剤を用いてカラムクロマト処理をしたのちUV吸収を測定して atractylodin が確認されるものが蒼朮であり，バニリン・塩酸反応が強陽性で，atractylodin が認められないものが白朮である．そのほか性状からの識別法として，蒼朮は破折面がほぼ繊維性でなく，切片を放置するとき，白色綿状結晶を析出するか，または，油室が atractylodin によってかっ色に変化する．白朮のうち唐白朮は形状に著しい特徴があるので識別は容易であり，和白朮は破折面が著しく繊維性で油室はかっ色に変化しない．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「医薬品の品質と安全性に関する研究」の一部として実施したものである．）

文　献

1) 西川洋一，渡辺四男也，瀬戸隆子：東京衛研年報，25，85，1974
2) 高橋真太郎：生薬，15，255，1961
3) Hernandez, R., Hernandez, R. Jr. and Axelrod, L. R. : *Anal. Chem.* 33, 370, 1961
4) 成田耕造，村上孝夫：クロマトグラフィーの実際，20，1970，広川書店

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26 - 1, 90—92, 1975

生薬の品質評価に関する研究（IV） ロートコンおよびその製剤の品質について

渡 辺 四男也* 安 田 一 郎* 瀬 戸 隆 子*
中 島 和 雄* 西 川 洋 一*

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (IV) Quality of Scopolia Rhizome and Its Preparations

YOHYA WATANABE*, ICHIRO YASUDA*, TAKAKO SETO*, KAZUO NAKAJIMA* and YOICHI NISHIKAWA*

Although Scopolia rhizomes contain tropane alkaloids *i. e.* hyoscyamine, scopolamine etc. being different in pharmacological effects, content of those alkaloids is accepted by Japanese Pharmacopoeia VIII as total alkaloids.

As a result of separation and determination of those alkaloids with gas chromatography, the ratios of those alkaloids in Scopolia rhizomes and their preparations were not regularly obtained.

In order to evaluate their pharmacological effect, it will be necessary to investigate on not only a content of the total alkaloids but also ratio of those contents.

緒 言

ロートコンは第８改正日本薬局方[1]（以下日局８と略す）に収載され，これを製造原料とするロートエキスはロートエキス散のほか14品目の局方製剤に配合されている．

ロートコンは第７改正まで日本産の*Scopolia japonica* Maximowicz が基原として規定されていたが，日本産が資源的減少に加えて自然保護および採集賃金の高騰などの要因によりはなはだしく減産したので，日局８では *S. japonica* またはその他同属植物が規定された．同属植物としては同様の薬効成分を有する韓国産 *S. parviflora*, 中国産 *S. sinensis* およびヨーロッパ産 *S. carniolica* などがあり，現在輸入されている．

一般に日本産はエキス収量は高いがアルカロイド含量は低く，外国産はその逆であるといわれ，日本産を用いて日局８製剤総則に規定する軟エキス稠度のロートエキスを製造した場合は総アルカロイド含量が規定に達しなくなり，外国産を原料とした場合には軟エキス稠度まで濃縮するとアルカロイド含量が高くなりすぎるといわれている．そのためか近年流動性の高いロートエキスが市販されている．

ロートコンの有効成分はトロパン系アルカロイドの *l*—ヒヨスチアミン（Ⅰ）およびスコポラミン（Ⅱ）で，その他オキシクマリン化合物のスコポレチンとその配糖体スコポリンが含有されている．Ⅰは不安定で生薬調製，エキス製造工程および製剤の経年によって薬理活性の劣るアトロピン（*dl*—ヒヨスチアミン）に変化するといわれている．これらの有効成分の薬理作用については多くの研究[2-5]がなされているが，共に抗コリン作動薬として副交感神経に作用し，Ⅰはやや鎮痙作用に，Ⅱはやや鎮痛作用および分泌腺抑制作用にすぐれ，毒性の低い点からはⅡが有効であると報告されている．

従来これらのアルカロイドの分離定量はセライトあるいはイオン交換樹脂などのカラムクロマトグラフィーで分離し比色定量する方法，[6-8] 薄層クロマトグラフィー・デンシトメトリーによる方法，[9] 高速液体クロマトグラフィーによる方法，[9] ガスクロマトグラフィー（以下ＧＬＣと略す）による方法[10-12]があり，定量性，再現性，簡便性の点からＧＬＣによる方法がすぐれている．ＧＬＣによる定量法には南川[10]の内部標準物質にエフェドリ

* 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

ンを用いる方法，麻薬技術委員会[11]および勝井ら[12]のホマトロピンを用いる方法がある．これらの方法について追試したところ，著者らの実験試料では内部標準物質とt_Rを同じくする未知物質が存在し正確な定量値が得られないので，内部標準物質に n-オクタコサンを用いて分離定量し品質評価の資料とした．

実験の部

実験材料

ロートコン　日本産として長野県産（1975）および奥多摩採集品（1975, 5, 25），外国産として韓国産，北朝鮮産および中国産を用いた．外国産は外観性状から特に識別点となるような特徴はないが，日本産に比べてやや小型で根はほとんど除かれており，一方長野県産はわずかに根および細根をつけていた．奥多摩採集品は根を完全に除いて調製した．

ロートエキス　3社4製品を用いたが，そのうち3品がやや流動性の高いものであった．

ロートエキス散　7社10製品を試料とした．そのうち日局8の性状に記載する帯かっ黄色～灰黄かっ色を呈するものは3品で，そのほかは灰白色に近いものであった．

ロートコンの分析用試料調製　試料約 500g を粗切したのちよく混和し，その 100g を中末（日局8）として分析用試料とした．

エキスの定量　水および35v/v% エタノールを用い日局8一般試験法生薬試験法により定量した．

総アルカロイドの定量　日局8により定量した．

ガスクロマトグラフィーによるヒヨスチアミンおよびスコポラミンの定量　日局8の定量法に準じ総アルカロイドをクロロホルムで抽出し全量を正確に 60m*l* としその 5 m*l* を正確に量り取り，溶媒留去後 N, O-ビス(トリメチルシリル）アセトアミド（東京化成）1 m*l* を加え 60°，5分間加温，冷後内部標準物質 n-オクタコサン（和光純薬）を含む n-ヘキサン 1 m*l* を正確に加え振り混ぜ，さらに水 1 m*l* を加え振とう後遠心分離，上層の n-ヘキサン層を試料とした．標準物質としてヒヨスチアミンはアトロピン（メルク）を，スコポラミンは臭化水素酸スコポラミン（和光純薬）を使用した．相対保持時間は内部標準物質 n-オクタコサンを1とすると，ヒヨスチアミンは0.52，スコポラミンは0.77である．GLC の条件は次のとおりである．島津 4 BMPF, column : 3 %OV-17 on chromosorb W, glass on column : 3mm × 2 m, column temp. : 250°, detector temp. : 270°, carrier gass : N_2 40m*l*/min

結果および考察

鹿野ら[13]は10%，35%，50%，75%，100% エタノールおよび純水を用いてロートエキスを製した場合，エキス収量はエタノール濃度の上昇に伴い減少する傾向にあり，35%エタノールでは純水時の約60%になると報告している．しかし著者らの実験では Table 1 のごとく 35%エタノールの方が高い値を示すものがあった．純水および35%エタノールでのエキス収量は日本産が必ずしも外国産より高い値を示すことはなかった．しかし著者らのデータは日局8生薬試験法エキス定量法によったものであり，実地に大量の同一原料を用い，日局8製剤総則エキス剤製造法に準じてロートエキスを製造したデータと比較しなければ正確な結論は得られない．

ロートコン中の総アルカロイド，ヒヨスチアミンおよびスコポラミン含量の測定値は Table 1 に示した．総アルカロイド含量はいずれも日局8に適している．日本産に比べ外国産はいずれも総アルカロイド含量が高く，韓国産および北朝鮮産は中国産より高い値を示した．韓国産と北朝鮮産は同一基原のものであるが，今回の試料に関する限りでは北朝鮮産がやや高い値であった．ヒヨスチアミン対総アルカロイド含量比（以下 H／TA と略す）は外国産がいずれも79.3，83.1，90.3%と高い値を示すのに対し，日本産は39.9，66.3%とかなり低い値を示した．スコポラミン対総アルカロイド含量比（以下S／TAと略す）は日本産，朝鮮半島産の間に有位差は認められなかったが，中国産はこれらよりも高い値を示した．

試料の市販ロートエキス中3品は流動性の高いもので

Table 1　Extract and Alkaloids of Scopolia Rhizomes

Sample		H_2O-X	35%EtOH-X	TA	H/TA	S/TA	H/S
S. japonica	Okutama	30.7%	35.7%	0.300%	39.9%	8.7%	4.6
	Nagano	26.2	24.1	0.340	66.3	3.2	20.7
S. parviflora	Korean	36.1	35.4	0.655	90.3	2.9	31.1
	North-Korean	32.7	38.1	0.836	79.3	7.5	10.5
S. sinensis	Chinese	33.0	33.3	0.497	83.1	12.7	6.5

X : extract, TA : total alkaloids, H : hyoscyamine, S : scopolamine

Table 2 Alkaloids Content of Scopolia Extract and Scopolia Extract Powder

	Sample	TA	H/TA	S/TA	H/S
		(J. P. VIII 0.95~1.15%)			
Extract	No. 1	1.054%	86.3%	8.7%	9.9
	2	1.150	81.8	8.7	9.4
	3	1.094	85.5	7.8	11.0
	4	1.074	87.0	9.1	9.6
		(J. P. VIII 0.09~0.11%)			
Extract Powder	No. 1	0.111	91.2	3.3	28.1
	2	0.102	89.7	3.1	28.7
	3	0.108	90.1	3.1	29.1
	4	0.114	84.5	9.1	9.3
	5	0.112	90.3	3.4	26.5
	6	0.109	89.3	3.2	27.9
	7	0.102	87.3	6.2	14.1
	8	0.108	90.9	3.5	25.8
	9	0.111	84.9	9.0	9.5
	10	0.114	91.1	3.9	23.2

TA : total alkaloids, H : hyoscyamine, S : scopolamine

あるが，それらの日局8生薬試験法による乾燥減量はNo. 2 (26.4%), No. 3 (23.3%), No. 4(26.6%) であり，No. 1 (12.3%) の約2倍であった．

市販エキスとエキス散の総アルカロイド，ヒヨスチアミンおよびスコポラミン含量の測定値は Table 2に示した．総アルカロイド含量はいずれも日局8に適している．エキスでのH／TAおよびS／TAは 84.4±2.6%，8.5±0.6%とほぼ一定であり，流動性の異なる製品間においてもこれらの比率に差異は認められなかった．一方エキス散でのH／TAは87.9±3.3% とエキス同様ほぼ一定であったが，S／TAは5社7製品が3.5±0.4%，2社3製品が6.2，9.0，9.1% と2つのグループに大別できた．性状はS／TAの低い前者が灰白色を呈するものと一致し，高い後者が帯かっ黄色～灰黄かっ色を呈するものと一致した．

以上のごとく，著者らの実験によればロートコン，エキスおよびエキス散のヒヨスチアミン，スコポラミンの含量比率は一定ではなかった．日局8は公定法として諸般の事情から総アルカロイド含量のみを規定して力価を定めているが，本来これらの薬効を評価するには総アルカロイド含量のほかに前2者の相対含量についても考慮する必要があると考えられる．

謝辞 本研究にあたり，試料の収集にあたられた薬事監視員の皆様，生薬および製剤を提供された各社に深謝いたします．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「医薬品の品質と安全性に関する研究」の一部として実施したものである）

文　献

1) 日本公定書協会：第8改正日本薬局方解説書，C—1899，1971，広川書店，東京
2) 山田　肇：日薬理，16，22§，1933
3) 小野孝治：*ibid.*，46，192§，1950
4) 萩庭丈寿，原田正敏：薬誌，79，1094，1959
5) 佐久間昭：薬効のうらづけ，第7版，102，1971，東大出版，東京
6) 柴田承二，今関和泉：薬誌，73，797，1953
7) 古賀靖邦：日薬理，52，812，1956
8) 吉野俊雄，杉原瑞穂：薬誌，80，396，1960
9) 勝井五一郎，河部靖，大前雅彦，山野喜昭，林勇一郎：昭和48年度厚生科学研究報告，115，1974，東京医薬品工業協会，東京
10) 南川傳憲：薬誌，90，1457，1970
11) 麻薬技術委員会：医薬品研究，5，420，1974
12) 勝井五一郎，河部靖，大前雅彦，山野喜昭，林勇一郎，池谷　理：昭和49年度厚生科学研究報告，129，1975，東京医薬品工業協会，東京
13) 鹿野美弘，木島正夫：生薬，28，72，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1 93—97, 1975

薬剤に対する Limulus Test の検討

下平彰男* 中島和雄*

Evaluation of Limulus Test for Drugs

AKIO SHIMOHIRA* and KAZUO NAKAJIMA*

Evaluation of Limulus Test for the detection of bacterial pyrogen has already been reported by many workers. The previous report indicates that Limulus Test gives decrease requirements in volume, and simplicity and sensitivity are advantages of the test for detecting pyrogenic contamination in parenterals.

This paper discussed the comparative sensitivity for various Lipopolysaccharide (LPS) between the two methods employing a commercially avaiable Amoebocyte Lysate, and the increase of detection sensitivity for LPS by the addition of cations Ca^{2+} and Mg^{2+} to the parenterals caused false negative. It is concluded that sensitivity of detection of LPS is indefinite by lysate production, no addition of cation is uniformly effective in lysate improvement and detection of pyrogen in parenterats with Limulus Test does not seem reasonable if concentrations of drug is high.

緒　言

カブトガニ血球抽出成分（*Amoebocyte Lysate*）による endotoxin 検出法——Limulus Test は，ウサギの体温測定による Pyrogen Test に比較して簡便性，迅速性と共に endotoxin に対する検出感度が高いことが広く知られており，臨床検査および環境衛生的試験への応用さらに薬学領域への応用が始められている．特に薬学領域においては，注射剤の発熱事故を防止するため，Pyrogen Test による検定が広く行なわれているが，Cooper ら[1]は注射剤について，Limulus Test と Pyrogen Test の一致率を検討した結果，84% の値を得ており，少量の検液と短時間で検出し得ることから放射性医薬品への応用が有利であることを指摘している．また Eibert ら[2]は75%の一致率を報告し，将来 Limulus Test は Pyrogen Test に代り得ると述べている．小林ら[3]は日本産カブトガニ *Amoebocyte Lysate* を抽出し endotoxin に対する反応と Pyrogen Test 結果を比較し両者の検出感度の平行性をみとめており，各種薬剤および生体成分への影響を報告している．著者らは Limulus Test は Pyrogen Test よりも Lipopolysaccharide（以下ＬＰＳと略す）に対する検出感度が高く，発熱活性の異なるＬＰＳに対して両者間の平行性をみとめた．[4] しかし，各種注射剤への応用が Pyrogen Test に代り得るものかについては，Limulus Test に用いる Lysate の精製，純度の均一化の他に多くの検討を要することが加納ら[5]により指摘されている．

著者は前報[4]にひきつづいて，２社製品の Lysate および発熱活性の異なる精製された４種のＬＰＳならびに３種の化学的 Pyrogen を用い Limulus Test を行ない，Pyrogen 検出感度を比較検討した．さらにＬＰＳ最少発熱量含有の各種濃度におけるブドウ糖液およびアミノ酸溶液について Limulus Test を行ない，薬剤濃度の相違によるＬＰＳ検出感度を検討した．この際，*false negative* となった検液に Ca^{2+} および Mg^{2+} を添加したのち，Limulus Test を行ない，ゲル化の回復を観察した．

実験方法

(1)実験材料

Amoebocyte Lysate: 日本産カブトガニ（*Tachypleus tridentatus*）の血球から抽出された Lysate のアンプル凍結乾燥品（以下A社の Lysate とする）および米国産カブトガニ（*Limulus polyphemus*）の血球から

* 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 Reseach Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan

抽出されたLysateのバイアルびん凍結乾燥品（以下，B社のLysateとする）

LPS：Yersinia enterocolitica 03, ZM-20株からWestphal法により抽出したLPS（以下LPS-Yと略す），E. Coli E47a株からWestphal法により抽出したLPS（以下LPS-Eと略す），Shigella sub-group K_3 No. 153株からPalmer改良法により抽出したLPS（以下LPS-Sと略す）およびPseudomonas fluorescensのLPS 50 μg/mlを含有する注射剤（T. T. G 2号，藤沢薬品工業K. K. 製）（以下LPS-Pと略す）前2種は杏林大学微生物学教室の提供により，LPS-Sは国立衛生試験所微生物部から授与された．

化学的Pyrogen：2-4-dinitrophenol（以下DNPと略す）0.5gを0.3%炭酸水素ナトリウム溶液に溶解して100mlとなし，用時pyrogen freeの再蒸留水を用いて稀釈した．Aldol-α-naphthylamine（アミンA）およびN-Phenyl-β-naphthylamine（アミンB）をそれぞれ0.1gをとりPyrogen freeの水100mlを加えて5分間，強くふりまぜたのち，membrane（0.22μ）を用いて沪過し沪液を試料とした．

(2) Limulus Test

A，B 2社のLysate（実験材料に既述）を用いそれぞれ2社の使用法にしたがって行なった．A社の場合はLysateにpyrogen freeの水100μlを加えて溶解し，これに同量の検液を加え，しずかにふって混和し，ただちに37°Cのふらん器に入れて1時間静置したのち，動揺しないように取り出し室温にもどしてゲル化の状態を肉眼で観察し判定した．判定方法は内容物が固化していて角度45°にしずかに傾けても動かない状態を＋，固化しているが傾けると動く状態を＋，粘張性あるいは白濁がみられ傾けることによってガラス壁にいくらか粘着する状態を±，negative controlと同様にゲル化の全くみられない状態を－とした．B社の場合はLysateに直接，検液200μlを加え，しずかにふって溶解し，以下A社の場合と同様に操作し，判定した．なお検液のpHは，反応至適範囲6.25～7.25になるように0.25N—水酸化ナトリウム液を用いて補正した．

(3) Pyrogen Test

日本薬局方発熱性物質試験法にしたがって行なった．なお体温測定はウサギを首架式に固定し，12点式体温自記記録計（飯尾式機，EP-670型）を用いた．

(4) Pyrogen 検出感度

B社のpositive control液およびその10倍稀釈液，LPS-YおよびLPS-Pの10倍稀釈段階液（10^{-1}～10^{-5} μg/ml），DNP，アミンAおよびBアミンを用いて，A，B 2社のLimulus Testならびに Pyrogen Testを行なった．

(5) ゲル化の薬剤濃度による影響

ブドウ糖，デキストラン，L-LysineおよびL-Arginineをそれぞれ5，10，20，30，40，50gを100mlのメスフラスコにとりPyrogen freeの水を加えて溶解し100mlとして，滅菌したのち，それらの液にLPS-Y

Table 1. Comparative Sensitivity of Lysate A and B to Pyrogens

Pyrogen		Pyrogenicity	Lysate A	Lysate B
Positive control B		＋	＋	＋
1/10 Dilution of B		－	±	－
LPS-Y μg/ml	10^{-1}	＋	＋＋	＋＋
	10^{-2}	＋	＋＋	＋＋
	10^{-3}	＋	＋＋	＋
	10^{-4}	＋	＋	－
	10^{-5}	－	－	－
LPS-P μg/ml	2×10^{-1}	＋	＋＋	＋＋
	10^{-1}	－	＋	＋
	10^{-2}	－	＋	－
	10^{-3}	－	－	－
DNP*		＋	－	－
Amine A*		＋	－	－
Amine B*		＋	－	－

Notes : Positive control B contains 0.0025 μg/ml of LPS prepared by Company B.
* Described in the text.

(10^{-2} μg/ml) 1 ml づつを加えて検液とした．この液はすべて10^{-4}μ/ml の LPS-Y を含有するものとした．(この値は計算上誤りであるが，滅菌操作による減量などから考えて，実験誤差範囲内である．) これらの検液についてA社の Lysate を用い Limulus Test を行なった．

(6) Ca^{2+} Mg^{2+} 添加によるゲル化の回復

ブドウ糖濃度30，40および50%の滅菌溶液をそれぞれ100ml づつ調製し，これらを1組の検液とし4組を用意した．次に各組毎に LPS-Y，−S，−E，および−Pの4種のＬＰＳを(5)の実験方法と同じ操作で加えた．この際，ＬＰＳ含有量を最少発熱量とするため上から順にそれぞれ，10^{-4}，10^{-3}，10^{-3} および 2×10^{-1}μg/ml とした．これらの検液についてA社の Limulus Test を行ない，false negative となった1つの検液から20ml づつ2つを分取し，それぞれ20mM濃度になるようにCa^{2+}およびMg^{2+}を添加した．すなわち，2M濃度の塩化カルシウム溶液および塩化マグネシウム溶液をマイクロピペットで200μl 添加した．そしてこれらの液について再び Limulus Test を行なった．

つぎに，LPS-E および LPS-S 含有量を10^{-2}μg/ml としたブドウ糖溶液10，20，30，40および50%について上記と同様な実験を行なった．なお，ガラス器具類は250°C 30分間あるいは180°C 2時間加熱し，Pyrogen free とし，各種薬剤は予め Limulus Test を行なって endotoxin free を確認した．

実験結果および考察

(1) Pyrogen 検出感度

2社から市販されている Lysate を用い，LPS および化学的 Pyrogen に対する検出感度の比較を行なった結果，Table 1 に示したようにＢ社の positive control (LPS：2.5×10^{-3}μg/ml) に対してはA社B社とも陽性であるがその10倍稀釈液に対しては Pyrogen Test 陰性であるがA社の Lysate はいくらかゲル化がみとめられ，B社は全く反応を示さなかった．また LPS-Y および LPS-P に対する検出感度は，Ａ社の Lysate では前者は Pyrogen Test 結果と一致しており，後者は Pyrogen Test より20倍高い結果が得られた．Ｂ社の Lysate ではA社のそれよりも若干低い結果が得られた．化学的 Pyrogen に対しては，2社とも反応を示さなかった．

これらの結果からA社の Lysate とＢ社のそれは endotoxin に対するゲル化能に若干の相違があるものと思われ，ゲル化のメカニズムが充分に解明されていない現在では，Lysate の精製，純度，均一化などが今後の問題と思われる．米国ＦＤＡは Lysate の品質規格としてＦＤＡの標準 endotoxin に対する検出感度を，1.25×10^{-5}μg/ml では(−)であり，10^{-4} μg/ml では(+)となるように提案している．[6] また，丹羽[7] は Lysate によるＬＰＳ検出感度とウサギによる発熱性との比はＬＰＳの標品によってかなり開きがあることを述べている．著者らの実験結果からＬＰＳ検出感度は発熱活性の高い LPS-Y に対してはウサギによる Pyrogen Test 結果と一致するか，もしくは低く，発熱活性の低い LPS-P に対しては Pyrogen Test より高いことが認められた．化学的 Pyrogen に対する実験のうち，Amine AおよびＢを選んだ理由はこれらの物質がゴムの老化防止剤として用いられており，僅かではあるが水に溶出され強い発熱性が強められた[8] ことによるものである．これらの物質および DNP に対する Limulus Test はすべて negative の結果が得られたことから Limulus Test による化学的 Pyrogen 検出は可能ではないと思われる．

(2) ゲル化の薬剤濃度による影響

LPS-Y の最少発熱量10^{-4}μg/ml を含有する5～10%濃度の薬剤に対する Limulus Test を行なった結果，ブドウ糖ではその濃度30%より高くなると negative となり，デキストランでは10%，リジンでは30%，アルギニンでは10% より濃くなると negative の結果が得られた (Table 2)．薬剤の濃度が高くなると Lysate のゲル化がみられないことは既に小林ら[3] により報告されて

Table 2. Effect of Concentration of Drugs to Limulus Test

% of drugs	5	10	20	30	40	50
Dextrose	++	++	+	±	−	−
Dextran 40	+	±	−	−	−	−
Dextran 70	+	±	−	−	−	−
L-Lysine	++	++	+	±	−	−
L-Arginine	++	+	−	−	−	−

Notes : Each drugs were prepared to contain minimum fever response dose 10^{-4} μg/ml of LPS, Yersinia enterocolitica.

Table 3. Effect of Addition of Cation on Lysate Sensitivity in High Concentration of Dextrose

LPS and addition of cation	Concentration of Dextrose 30	40	50
LPS-Y, 10^{-4} μg/ml			
No added cation	±	−	−
Ca^{2+} added	±	−	−
Mg^{2+} added	±	−	−
LPS-S, 10^{-3} μg/ml			
No added cation	−	−	−
Ca^{2+} added	−	−	−
Mg^{2+} added	−	−	−
LPS-E, 10^{-3} μg/ml			
No added cation	−	−	−
Ca^{2+} added	−	−	−
Mg^{2+} added	−	−	−
LPS-P, 2×10^{-1} μg/ml			
No added cation	−	−	−
Ca^{2+} added	++	++	−
Mg^{2+} added	++	++	−

Note : Concentrations of LPS are doses for minimum fever responses.

おり，今回の実験結果から薬剤の種類によって一様ではなく，粘度が増すとゲル化が阻害されるようであるが，なお多くの検討が必要と思われる．

(3) Ca^{2+}, Mg^{2+} 添加によるゲル化の回復

Limulus Test は20mM 濃度になるように，Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} を添加するとＬＰＳ検出感度が増すことが報告されている．[9] 前記(2)の実験結果から false negative となったブドウ糖液（30，40，50%）について，新たに LPS-Y，−S，−E および−P の４種のそれぞれ最少発熱量を含有する検液を調製し，Ca^{2+} ならびに Mg^{2+} を添加し Limulus Test を行なった．その結果，Table 3に示したように LPS-P にのみ検出感度の増強がみられ，他のＬＰＳでは全くみられなかった．これらの結果から丹羽ら[10]の指摘しているように Lysate の LPS に対するゲル化反応は Ca^{2+} または Mg^{2+} を要求する反応であるが LPS の種によって一様ではないと思われる．また LPS の濃度によっても一様ではないと思われるので，LPS-S および−Eの含有量を最少発熱量の10倍すなわち 10^{-2}μg/ml としたブドウ糖溶液（５～50%)について陽イオン添加による同様な実験を行なった．その結果 Table 4に示したように，LPS-S に対しては Ca^{2+} 添加により検出感度の増強がみられたが，Mg^{2+} では変化がみられなかった．LPS-E に対しては両者のイオン添加により検出感度の増強がいくらかみられた．

Table 4. Effect of Addition of Cation on Lysate Sensitivity in Dextrose Solution contained 10^{-2} μg/ml of LPS

LPS and addition of cation	Concentration of Dextrose % 5	10	20	30	40	50
LPS-S	±	−	−	−	−	−
Ca^{2+} added	+	+	±	−	−	−
Mg^{2+} added	±	±	−	−	−	−
LPS-E		++	+	−	−	−
Ca^{2+} added				+	−	−
Mg^{2+} added				+	−	−

これらの結果から Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} 添加による Lysate のゲル化能の増強は LPS の種および量によって一様ではないと思われる．最少発熱量の Pyrogen を含有するブドウ糖注射液（含量30% 以上）から Limulus Test によって Pyrogen を検出することは不可能であると思われる．

結　語

Limulus Test は化学的 Pyrogen を検出できないが，水中の細菌性 Pyrogen 検出感度はウサギによる Pyrogen Test と同等あるいはそれ以上高い．しかし2社の Lysate による比較実験結果から，Amoebocyte Lysate の精製純度によってＬＰＳ検出感度は異なるものと思われる．Limulus Test によるブドウ糖注射液の Pyrogen 検出方法はブドウ糖含有量が30%以上になると false negative となり，Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} 添加による Lysate のゲル化の回復は LPS の種および量によって一様ではないことが認められた．薬剤濃度の高い注射剤が最少発熱量の Pyrogen を含有する場合，Limulus Test によって Pyrogen を検出することは不可能であろう．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「医薬品の品質と安全性に関する研究」の一部として実施したものである．）

文　献

1) Cooper, J. F., Hochstein, H. D. and Seligmann, E. B. : *Bull. Parenteral Drug Assoc.*, 26, 153, 1972
2) Eibert, J. : *ibid.*, 26, 253, 1972
3) 小林正義，森本武男，山元正昭：薬誌，94, 293, 1974 ; *ibid.*, 94, 298, 1974 ; *idid.*, 95, 720, 1975
4) 下平彰男：東京衛研年報，24, 97, 1973
5) 加納晴三郎，川崎浩之進：診断と治療，62, 146, 1974
6) Fine, S. D : *Federal Register*, 38 (180), 26130, 1973
7) 丹羽允：日細菌，30, 439, 1975
8) 下平彰男，風間成孔，松本 茂：東京衛研年報，22, 147, 1971
9) Sullivan, J. D. and Watson, S. W. : *Applied Microbiology*, 28, 1023, 1974
10) 丹羽允，平松卓，和栗修 : モダンメディア，20, 137, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 98—105, 1975

リノール酸メチルの酸化時における酸化防止剤と Synergist 有機酸の関係

松本　茂* 中山京子*

The Relationship between Antioxidants and Synergistic Organic Acids at the Oxidation of Methyl Linoleate

SHIGERU MATSUMOTO* and KYOKO NAKAYAMA*

In connection with the previous papers, it was reported in this article the results of our study on the interaction between antioxidants and the synergistic organic acids, which were added at the oxidation of Me-linoleate (ML).

As for the relation between the quantity of an organic acid and its synergistic effect, we found that the optimum range existed in the concentration of a synergist for a definite amount of BHA or α-tocopherol (VE), and if excess quantity was added, its effect was diminished.

The results of investigation on the diminution of the concentration of antioxidants and synergists remainig in the oxidized samples showed that residual BHA decreased in the lapse of oxidizing time similarly to the case of VE. And the rate of decompomposition decreased markedly with the addition of synergist, such as ascorbic acid (VC), citric acid (CiA), or malonic acid.

At the same time VC was decomposed, with the diminution of antioxidants, through dehydroascorbic acid partially to oxalic acid.

Other synergistic organic acids were also decomposed during oxidation.

For dibutylhydroxytoluene (BHT) VC showed no synergism, which was very effective on BHA or VE. On the other hand CiA, tartalic acid and malonic acid were also effective for BHT. The reason of these phenomena was considered to be due to steric effects between them.

The interaction between radicals formed from antioxidants and synergists at the oxidation was assumed as the functional mechanism of synergistic effect.

Additionally, relation between concentration of BHA or VE and the induction period of autoxidation was revealed to have definite ratio in some range of their concentration.

はじめに

著者らは従来リノール酸メチル（以下MLと略す）の通気酸化時の諸変化，酸化生成物およびその際におけるブチルヒドロキシアニソール（以下BHAと略す）とα-トコフェロール（以下VEと略す）の酸化防止効果，ならびにそれら酸化防止剤に対する有機酸 synergist の影響等について報告を行って来たが，[1-6] 今回はMLの酸化に際し，酸化防止剤としてBHAを使用したとき，これに添加されたアスコルビン酸（以下VCと略す）の添加量と synergist 効果の関係，酸化試料中のBHAの減少とVCの変化等について検討し，さらにジブチルヒドロキシトルエン（以下BHTと略す）に対する各有機酸の synergism を比較してBHA，VE の場合との異同を調査した．これらの結果にもとずき，MLの酸化に際してのフェノール系酸化防止剤と synergist 有機酸との作用機序について若干の考察を行った．なおBHA，VE をそれぞれMLに単独使用した際の添加量と，酸化誘導期間（induction period）との関係について所見を附記した．

実験の条件

1　通気酸化の装置および方法，induction period の測定

前報[1,2,5,6]に準じ，通気酸化容器はインピンジャー型吸収管を用い，これに精製ML[1,6] 6g に各酸化防止剤，synergist 等を添加した試料を取り，85±0.5° のグリセリン浴中300ml/min の定速で，酸素の導入を行い酸

* 東京都立衛生研究所理化学部　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

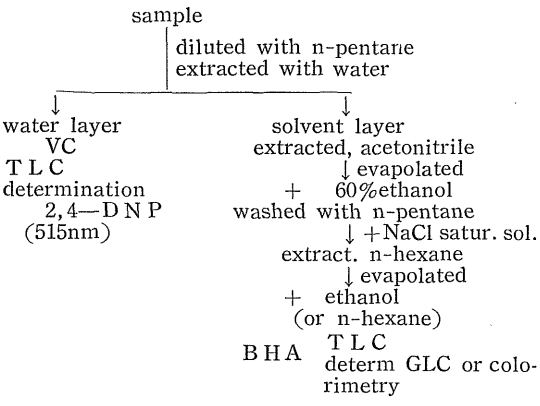


Chart 1　Separation of Butylhydroxyanisol(BHA) and Ascorbic Acid from Me-Linoleate

化した.

各酸化試料につき過酸化物価（POV）を測定[1]し，POV＝1000を示す時間を便宜上 induction period[4,6] とした.

2　ML酸化試料よりのBHAおよびVCの分離抽出

酸化試料よりBHAおよびVCを分離抽出するには Chart 1 に示す方法に従った.

すなわち試料6gに n-ペンタンを加えて60m*l* とし，水12m*l* ずつで2回振り混ぜて，有機酸を抽出したのち，ペンタン層は，アセトニトリル30m*l* ずつで2回，20m*l* ずつで2回振り混ぜてBHAを抽出する。アセトニトリル層は合せ，減圧濃縮し，約2m*l* とする．これを 60% エタノール 90m*l* に溶かしたのち，ペンタン 10m*l* を加えて振り混ぜ，混入しているMLを除く，次に含水エタノール層に飽和 NaCl 溶液 180m*l* を加えたのち，n-ヘキサン100m*l* ずつで3回振り混ぜてBHAを抽出する．抽出液を脱水したのち減圧濃縮し，定容とし，薄層クロマトグラフィー(以下TLCと略す)またはガスクロマトグラフィー（以下GLCと略す）用の試験溶液とする。BHAの回収率は添加実験においてはML中BHA0.02%のとき90～92%を示した.

BHAの比色法を行うときは，上記ヘキサン抽出液を脱水後減圧濃縮し，エタノールで定容とし試験溶液とする．また前記の水層については前報[5]に準じVC等の有機酸の試験を行った.

3　BHAの定性および定量

(1)　TLCによる定性

2の試験溶液について，次の条件で実施する.

薄層：Silicagel G 0.25mm，展開溶媒：ベンゼン・ヘキサン・酢酸（2：2：1），展開距離：15cm，発色試薬：0.1% 2,6-dichloroquinone chloroimide エタノール溶液を噴霧したのち，NH_3 ガスによる（青色スポット，Rf＝0.7）

(2)　GLCによる定量

2による試験溶液について，次の条件で実施する.

条件①液相：Silicone DC 200 (12,500C.S.)，10% on Gaschrom Q (80～100mesh)，カラム：ガラス製2m，カラム温度：170°，carrier gas N_2，FID detector 使用，定量用標準溶液：0.01% BHA ヘキサン溶液，内部標準物質：BHT

条件②　液相：Silicone OV-210，2～3% on Chromosorb W (AW, HMDS) (80～100mesh)，カラム：ガラス製2～2.5m，カラム温度：120～130°，carrier gas N_2，FID detector 使用，定量用標準溶液および内部標準物質は①と同じ

(3)　2,6-dichloroquinone chloroimide による比色定量（Gibbs 法）

2による比色用試験溶液 5m*l*（60～80v/v%エタノール溶液）を取り，0.25% 2,6-dichloroqinone chloroimideエタノール溶液（用時調製）0.4m*l*，0.25% $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 溶液 0.4m*l* を加え，水で全量を10m*l* とする．20～30分室温に放置したのち，620nm における吸光度を測定する．別に0.01%BHA標準液 0.2～1.0m*l* を取り，60%エタノールで 5m*l* としたのち，試験溶液の場合と同様に操作し，検量線を作成する.

(4)　p-nitrobenzene diazonium fluoroborate による比色法（ジアゾ化法）

2の試験溶液に，冷時2%p-nitrobenzenediazonium fluoroborate 50v/v% エタノール溶液を加え，さらに0.2%$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 溶液で微アルカリ性として発色させ，15分間放置後，色素をヘキサンに転溶させて500nmにおける吸光度を測定した。標準液等は(3)に準ずる.

4　VCの定性，定量，クエン酸（以下 CiAと略す），マロン酸のTLC．シュウ酸のTLC，ペーパークロマトグラフィーその他の定性

2による試験溶液について，次の条件で実施する。

(1)　VCの定性，定量

前報[5]の条件に準じ，ポリアミド薄層によるTLCを行い，UV検出器による螢光，またはpH指示薬噴霧によりスポットの確認を行なう．定量は前報[5]に準じ dinitrophenylhydrazone法による VC, dehydroascorbic acid（以下DVCと略す）の分別定量を行う[7].

(2)　CiA の TLC

薄層：ポリアミドUA，展開溶媒ⓐ：アセトニトリル・酢酸エチル・ギ酸(2：7.5：0.5)，ⓑ：エタノール・

Table 1 Relation between Concentration of Antioxidant and Ascorbic Acid on Antioxidative Effect for Me-Linoleate (hrs at POV=1000, 85°C)

VC% \ BHA%	0.009(0.5mmole/kg)	0.036(2mmole/kg)	0.1(5.5mmole/kg)
0	5.6hr.	11.5hr.	19.2hr.
0.0018 (0.1 mmole/kg)	9.6	21.5	—
0.0045 (0.25mmole/kg)	9.5	22.0	—
0.009 (0.5 mmole/kg)	8.7	21.0	36.5
0.018 (1.0 mmole/kg)	7.7	20.6	—
0.05 (2.8 mmole/kg)	—	—	34.8
0.1 (5.6 mmole/kg)	—	—	32.5

VC% \ VE%	0.043 (1 mmole/kg)	0.25 (6 mmole/kg)
0	3.8hr.	9.3hr.
0.009 (0.5mmole/kg)	10.2	—
0.018 (1.0mmole/kg)	11.7	—
0.027 (1.5mmole/kg)	—	19.5
0.036 (2.0mmole/kg)	11.6	—
0.054 (3.0mmole/kg)	11.5	21.0
0.108 (6.0mmole/kg)	—	22.5
0.216 (12mmole/kg)	—	22.5

アセトニトリル・酢酸エチル・ギ酸（2：7：0.5：0.5），展開操作：ⓐにより展開し，微量混在する油溶性物質を先端近くまで上昇せしめたのち風乾し，ついでⓑにより展開を行う．発色試薬：pH 指示薬〔ブロムクレゾールグリーン・メチルレッド混合指示薬（日局8），Rf=0.5〕

(3) マロン酸のTLC

薄層：ポリアミドUA，展開溶媒ⓐ：(2)に同じ，ⓒ：酢酸エチル・アセトニトリル・ギ酸（1：8：1），展開操作：(2)に準じ，ⓐで展開，風乾後ⓒで展開する．発色試薬(2)に準ずる（Rf=0.7）

(4) シュウ酸のTLC，ペーパークロマトグラフィー，呈色反応

① TLC 薄層：セルローズ粉末，展開溶媒：水飽和 n-ブタノール・ギ酸（9：1），展開距離：15～17 cm，発色試薬は(2)に準ずる．(Rf=0.7)

② ペーパークロマトグラフィー 展開溶媒：1% HCl で飽和した n-ブタノール，展開距離：16～18cm，発色試薬は(2)に準ずる (Rf=0.6)

③ 呈色反応 試験溶液に飽和 $CaSO_4$ 溶液を加えて，生じた沈殿を遠心分離したのち，Feigl[8] 法に従って還元し，glyoxlic acid としたのち HCl・phenylhydrazine 溶液を加え，さらに $K_3Fe(CN)_6$ 溶液または H_2O_2 溶液を加えて呈色を検する．シュウ酸の存在で赤色を呈する．

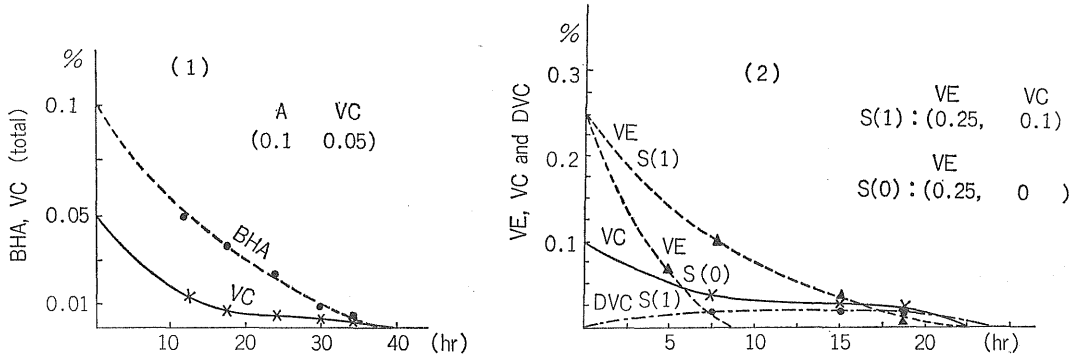


Fig. 1 Change in Concentration of Antioxidant (BHA or VE) and VC in Me-Linoleate in Course of Pxidation

実験結果

1　BHAに対するVCの添加量とそのsynergist効果

ML 6gにBHA0.5mmole/kg (0.009%), 2mmole/kg(0.036%), 5.5mmole/kg (0.1%) をそれぞれ添加し，これらに，0.1～5.6mmole/kg (0.0018～0.1%) の各種の濃度のVCを添加し，85° で通気酸化を行い，POV約1000を示す時間を測定して比較した．結果をTable 1に示す．

BHA濃度 0.5mmole/kg のときに，VC 1/5 当量 (0.1mmole/kg) の添加で，POV 1000に達する時間 (induction periodとする)は約1.7倍に延長した．またBHA 2 mmole のときには，その1/12.5～1/20当量のVCの添加で約1.9倍に，BHA 5.5mmole のときはその1/11量のVC (0.5mmole) 添加で1.9倍に延長している．しかしこれらのBHA量に対するそれ以上のVCの添加ではむしろ効果が減弱することが知られた．すなわち，BHA 0.5, 2.0, 5.5mmole/kgに対し，VC添加量はそれぞれ 0.1, 0.25, 0.5mmole/kgが最もsynergist効果が大であり，BHAに対するVC濃度にoptimum-rangeが存在している．このことは，前報[5]で述べたVEに対するVCの効果にもみられた現象であったが，Table 1に示すように，VE 1 mmole/kg添加に対する，induction period 延長効果の最大なVC濃度は 1～2 mmole/kg, VE6mmole/kgではVC 6～12mmole/kgであったことから，BHAに対してはそのsynergistとしてのVC量はVEの場合より少い所に，そのoptimum rangeを持つことが判る．しかしVCのsynergistとしての効果，すなわち，induction periodの延長倍率ではBHAに対してより，VEに対しての方が大きいことが注目された．

2　酸化試料中のBHAの減少とsynergistとしてのVCの変化

初めにML 6g, BHA0.036% (2 mmole/kg), VC 0.018% (1 mmole/kg) の試料について 85° で酸化を行い，6時間，20時間の各酸化試料を取り，BHAとVCとを分離抽出し，さらにBHAについてはGLCおよび比色法で定量を行った．この結果BHAの残存量は，6時間で0.015%，12時間で0.008%，20時間ではほとんど0となり，Fig. 1 (2) におけるVEと類似の減少状況を示した．しかしこの際におけるVCの残存量を測定したところ，この試料中のVCの減少は，VEのとき[5]に比して著しく，6時間の試料ですでに0.002%以下を示し，12時間以降の試料では定量限界以下となった．なおFig. 1 (2) はS(1)：VE0.25%，VC0.1%の場合の試料

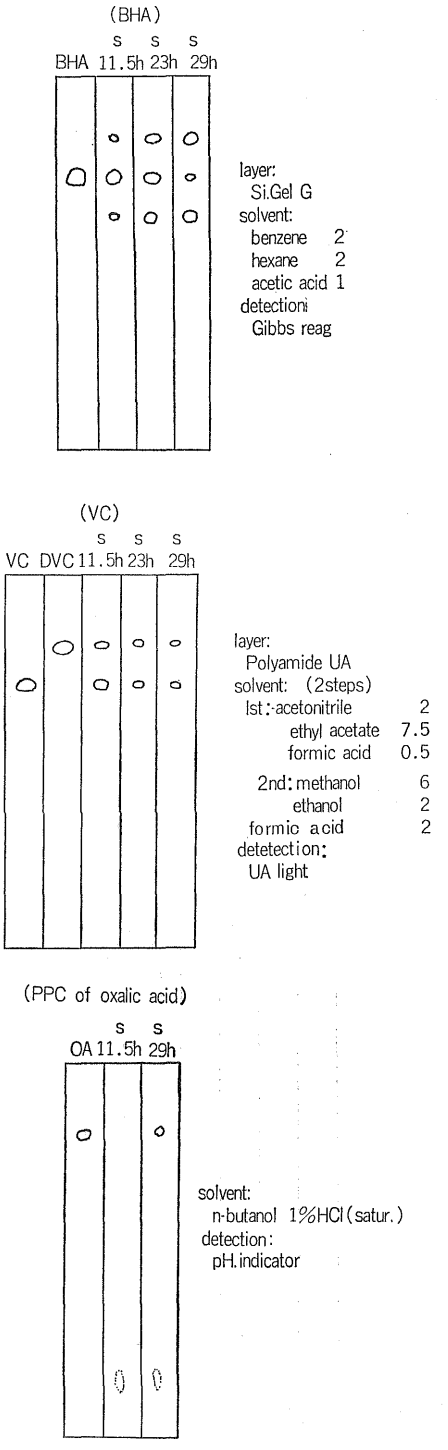


Fig. 2　TLC of BHA and Ascorbic Acid from Oxidized Samples

中のVEおよびVC，DVCの消長を示している．またS（0）はVE0.25%，VC 0%の試料におけるVEの減少状況を示す．

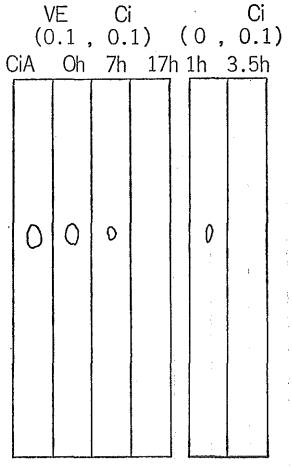
そこでBHA，VC共に増量して，ML 6 g にBHA 0.1%（5.5mmole/kg），VC0.05%（2.8mmole/kg）を加え85°で酸化を行い，酸化時間11.5，17.5，23,29，34.5時間の各酸化試料についてBHAおよびVCの残存量を測定した．その結果をFig 1 (1)に示す．BHAは経時的に漸減して34.5時間ではほとんど0となる．VCは11.5時間で0.015%に減少するが，それ以後は減少速度はゆるやかになり，34.5時間で痕跡程度となる．

Fig 1 (1)におけるVCの減少状況は，(2)の場合のそれと比較すると，速かに低濃度となり，低濃度の状態で維持されている．

また上記試料中，11.5時間，23時間，29時間酸化の各試料について，BHAおよびVCを分離抽出し，TLCを行った．その結果をFig. 2 に示す．

BHAの減少状態は Fig. 1 とほぼ一致するが，11.5時間では1個，23時間以後では2個のBHAの酸化物と見られる，Gibbs 反応陽性のスポットが認められる．VCについてもFig. 1 の結果とほぼ一致している．

なお上記各試料について，TLCおよびペーパークロマトグラフィー，呈色反応等によりシュウ酸の存否を検したが，29時間および34.5時間酸化の試料からはシュウ酸の生成が認められた．すなわち，VC はDVC を経て，一部はシュウ酸にまで酸化されることが判る．



Layer:Polyamide UA
solvent:(2steps)
1st,acetonitrile・ethyl acetate・formic acid (2:7.5:0.5)
2nd,methanol・ethanol・formic acid (6:2:2)

Fig. 3 TLC of Citric Acid from Oxidized Samples

3 VEの synergist としての CiA およびマロン酸の通気酸化による減少

ML 6 gにVE 0.1%および CiA 0.1%を添加した試料$\binom{VE}{0.1,}\ \binom{Ci}{0.1}$について，85° で酸化を行い，それぞれ7時間，17時間酸化した試料から，残存する CiAを抽出しTLCを行った．その結果をFig. 3 に示す．残存 CiA は次第に減少して17時間後には完全に消失していることが判る．なおこの際の POV は1000を超えていた．またCiA のみを添加した試料$\left(0,\ \binom{Ci}{0.1}\right)$では3.5時間の酸化でCiA は消失していた．

マロン酸の場合では，ML 6 g にVE0.25%を添加した試料中マロン酸0.06%（VEと等モル）を加えて，85° で酸化し，経時的に酸化試料を取り，CiA の場合に準じてマロン酸を抽出し，TCLによってその経時的変化を追ったところ，マロン酸は明らかに減少は見せていたが，POV1000に至り，induction period が終了しても，なお微量の残存がみとめられた．ほかにリンゴ酸でもCiA の場合に準じ，VEに添加して酸化したとき，経時的に減少することが，TLCの結果明らかにされた（なおリンゴ酸のTLCは(4)①の条件に準じた）．

4 BHTに対する有機酸の synergism

つぎにVE，BHAとの比較のため，フェノール性水酸基の両側に tert. butyl 基を有する酸化防止剤であるBHTについて有機酸類の synergistic effect を確めた．すなわちBHTをメタノール溶液とし，ML中に1 mmole/kg の濃度に添加し，さらにこれに，VC，CiA，マロン酸ならびに酒石酸を，それぞれ1 mmole/kgずつ添加した各試料について，85° で通気酸化を行い，それらの酸の synergistic effectを調べた．その結果はTable 2 に示すように，酸化誘導期間はクエン酸により1.36倍，マロン酸で1.42倍，酒石酸では1.25倍と延長されたが，その synergistic effect はいずれもBHA，VEに対してより弱かった．特に注目されるのは，VEおよびBHAのいずれに対しても顕著な効力を有するVC（およびその異性体であるエリソルビン酸）が，BHTに関しては全く無効なことであった．

5 BHAおよびVEの単独使用のときにおける添加量と酸化誘導期間の関係

BHA，VE各単独使用のときの添加量と，induction period の関係を表示すると，Table 3 のようになる．各誘導期間は近似的に濃度の平方根に比例していることに気が付く．

6 酸化防止剤および synergist 存在下で酸化した試料の酸化生成物について

Table 2 Comparison of Synergistic Effects between Organic Acids on Three Kinds of Antioxidants

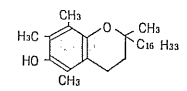
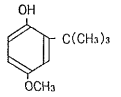
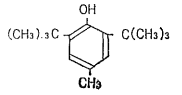
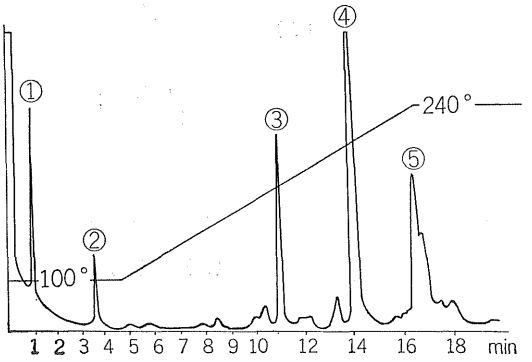
antioxidant (Immol/kg) \ organic acid (Immol/kg)	ascorbic acid	citric acid	malonic acid	tartaric acid
α-tocopherol 	(+) (×3.1)	(+) (×3.0)	(+) (×2.9)	(+) (×3.0)
BHA 	(+) (×1.8)	(+) (×1.8)	(+) (×1.8)	(+) (×1.8)
BHT 	(−)	(+) (×1.36)	(+) (×1.42)	(+) (×1.25)

Table 3 Relation betwen Concentration of Antioxidants and Induction Period

BHA (%)	0.009	0.036	0.1	0.2
induction period(hr)	5.6	11.5	19.2	27.2
VE (%)	0.04	0.1	0.25	
induction period(hr)	3.8	6.0	9.3	

$(t \fallingdotseq \sqrt{[A]})$

酸化防止剤としてBHA, synergist としてVCを添加した試料 $\begin{pmatrix} A & VC \\ 0.1, & 0.05 \end{pmatrix}$ について，酸化温度85°時間37～38時間の酸化試料を取り，前報[6]に準じて，液相OV-210を用いてGLCを行った．結果は Fig 4 に示す通りであり，その主なピーク①，②，③，④，⑤はそれぞれ n-hexanal, Me-caprylate, Me-azelaaldehydate, 原料ML ⑤Me-monoepoxyoctadecenoate であり，無添加の場合と同一のパターンを示した．



column : (2%) OV-210 on Chromosorb W(HM DS) 2.5m, N_2 30ml/min (FID), 100→240° (programm)

①n-hexanal
②Me-caprylate
③Me-azelaaldehxdate
④ML
⑤Me-monoepoxy octadecenoate

Fig. 4 Gas Chromatograms of Oxidiized Me-Linoleate

考　察

前報[5,6]および本報の結果から，MLの酸化過程で，添加されたBHAおよびVEは共に，酸化誘導期間中は残存していること，および，VC，CiA 等の synergist の存在で酸化誘導期間は延長され，synergist の効果は酸化防止剤の安定化ないし保護作用として現れていることが判る．且つ前報により，有機酸 synergist の効果は従来いわれていたように重金属類の masking によるよりは，酸化防止剤に対し直接それらの安定化に寄与していることが認められた．またVE，BHAに対し著明な synergism を有する有機酸は，オキシ酸のみではなく，マロン酸のようにオキシ酸以外にも有効なものが存在し，一方オキシ酸でも全く無効なものがあることを知った．[4]

つぎに有機酸 synergist の作用機序については，以下のように考察される．

(1) 実験結果1，2で示されたように，synergist として有効なVC，CiA，マロン酸等は，いずれも酸化の

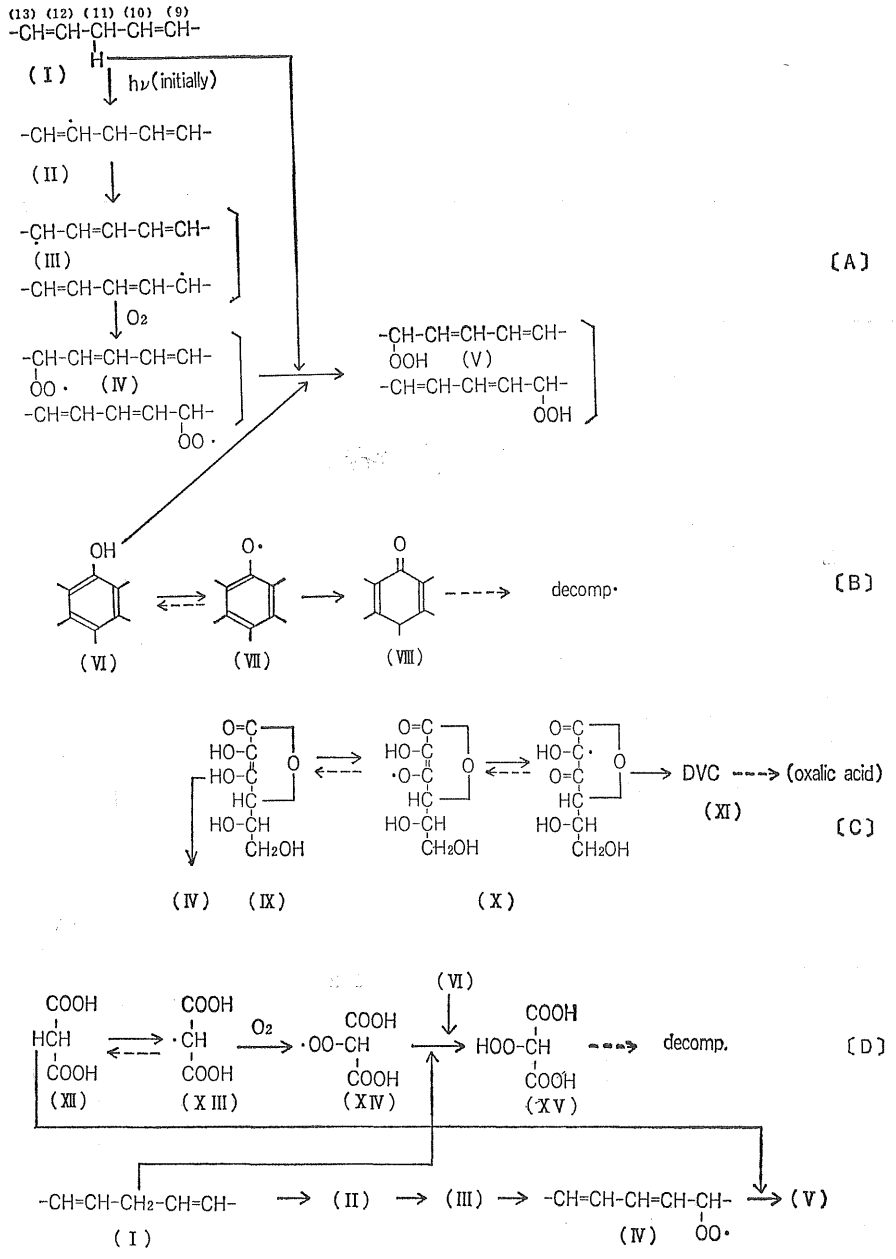


Chart 2

過程で酸自体が分解されるものであり，その際に free radical の生成があると考えることができる．

(2) ＶＥまたはＢＨＡと，ＶＣとは相互に保護作用を有し，互に関連して酸化分解が行われ，両者の消失もほとんど同時と見られた．

(3) またフェノール系酸化防止剤の効果は Chart 2 の cycle〔A〕の連鎖反応を（Ⅵ）からの水素供与〔peroxy radical（Ⅳ）による水素の引抜き〕により，切断することによるとされている．

従ってその活性の中心が遊離のフェノール基に存在

し，このことはOHがアセチル化されたトコフェロール酢酸エステル等では全く抗酸化効果のなかったことからも知ることができる．すなわち，〔B〕の過程でphenoxy radical（Ⅶ）の生成が想定される．

以上の諸点から，有機酸 synergistの機作として，それらの酸の radical と phenoxy radical とが，その生成と消失の過程で密接に共働することが考えられる．

この際まず酸化防止剤から生成する phenoxy radical への水素供与に関与して安定化することが考えられ，例えばＶＣの場合では〔C〕に示す過程で，（Ⅸ）より（Ⅶ）へ，マロン酸では〔D〕の〔ⅩⅡ〕より（Ⅶ）への水素移動が予想される．ただこれらの系で，有機酸 synergistを水素の source とするのは，量的な面から無理が生じるので，さらに（Ⅸ），（Ⅶ）および（Ⅵ），（Ⅹ）等の間に平衡関係を仮定し，安定化の寄与がそれらの結合関係にあると考えたが，それのみでそれらの効果を説明しうるか否かについては問題が残る．

一方本酸化系にＶＣ，マロン酸等を単独に加えたとき，抗酸化効果を示さないにもかかわらず，これらが分解を受けるという事実が注目される．この現象の説明として，例えばマロン酸では，Chart 2の〔D〕のように，peroxy radical（Ⅳ）がマロン酸（ⅩⅡ）の水素を引き抜き，生成したマロン酸のradicalがさらにO_2を取ってperoxy radical（ⅩⅣ）となり，これがまた（Ⅰ）の水素を引き抜くという chain reaction〔D〕の形成を仮定すれば，その酸化反応の速度はマロン酸の介在しない場合とほぼ同一になるものと考えられる．

さらに上記〔D〕の過程に抗酸化剤が介入したとき，抗酸化剤(Ⅵ)は(Ⅳ)と同時に，(ⅩⅣ)とも反応することが可能となる．(Ⅳ)と(ⅩⅣ)とを比較すればsterical には(ⅩⅣ)と，より反応しやすいと考えることができるので，その結果として抗酸化剤の効果をさらに上昇せしめることとなろう．ＶＣについても類似の過程を想定することができる．以上の仮説については今後の実験の参考となるものと思われる．

synergist の使用量については従来経験的にのみ行われていたが，ＢＨＡおよびＶＥについて検討した結果，実験結果１に示すようにsynergist有機酸の量には或る至適範囲があり，これを超えて使用するときはその効果はむしろ減少する傾向が見られた．このことは過剰の酸の存在が，その酸化分解の過程で，酸化防止剤を消費するためと考えることができる．またTable 2に示すように，tert. butyl 基の存在により，ＯＨ基に対する steric hindrance が大と見られるＢＨＴの場合では，ＶＣまたはエリソルビン酸がsynergistic effectを示さなかった．一方ＶＣ等よりは steric の影響が少いと見られるCiA，酒石酸，マロン酸では，ＶＥおよびＢＨＡに対してよりは弱いが，いずれも synegistic effect を示した．以上の事実は有機酸とフェノール系酸化防止剤との相互作用に steric effect が存在することを推定させる．

なお，ＶＥ，ＢＨＡを酸化防止剤として単独使用したとき，その添加量と誘導期間との間に，ある濃度範囲で一定の関係が存在することがみとめられた（Table 3）．すなわち酸化誘導期間はＢＨＡ，ＶＥ各濃度の平方根に，近似的に比例していた．このことは Hammond らのtetralin の自働酸化に関する研究[9]においても指摘されている．彼らは酸化防止剤の作用の動力学的根拠として，peroxyradical と antioxidant との結合を考え，さらにその結合体と peroxyradical との反応による分解過程を想定し，この前提から induction period と antioxidant 濃度との関係式を誘導しているが，これと類似の関係が，ＭＬとＶＥ，ＭＬとＢＨＡ間にも成立しているものと推定される．

おわりに

以上酸化防止剤と synergist 有機酸の相互作用についての検討を行ったが，ここに取上げた諸問題は理論的にはなお推定の域を出ない点が多いが，実用上では種々の面で利用しうる知見を含むものと信ずる．

今後さらに理論の裏付けとともに，これらの実験結果の油脂類への適用に関して研究を行ないたいと考えている．

文　献

1) 松本　茂，勝木康隆，友松俊夫，酒井昭子：衛生化学，14，110，1968
2) 松本　茂，酒井昭子，伊藤紘一，勝木康隆：衛生化学，16，67，1970
3) 松本　茂：衛生化学，17，347，1971
4) 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
5) 松本　茂，中山京子，松本あき子，鈴木侑子，片羽久恵：東京衛研年報，24，91．1972
6) 松本　茂：リノール酸メチルエステルの酸化および酸化防止剤に関する研究（東京都衛研研究報告28）
7) Freed, M.：*methods of Vitamin Assay*, 3rd Ed. 317, 1967, Interscience pub. Co. New york
8) Feigl, F.：*Spot test in Organic Chemistry* 1954, Elsevier Pub. Co.
9) Hammond, G. S., Boozer, C.E., Hamilton, C.E., Sen, J. N.：*J. Am, chem. Soc.*, 77, 3238, 1955

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 106—109, 1975

白アリ防除剤中のカーバメート分析法

吉原武俊* 遠山逸雄* 奥本千代美*
寺島潔* 長嶋真知子*

Analytical Method for Carbamate Insecticides in Termicide

TAKETOSHI YOSHIHARA*, ITSUO TOYAMA*, CHIYOMI OKUMOTO*,
KIYOSHI TERASHIMA* and MACHIKO NAGASHIMA*

An improved analytical method for carbamate insecticide was applied in the analysis of termicide which often encounters to the interferences when analysed with the conventional methods such as colorimetry, gas chromatography and thin-layer chromatography. The method employed here involves a clean-up with alumina column chromatography for the elimination of the interference and a pretreatment of trifluoroacetylation for gas chromatographic analysis. The recovery of PHC from the commercial sample was 96.2% and the variation was minimized by trifluoroacetylation which was attained by the reaction of the carbamate with trifluoroacetic acid anhydride in distilled pyridine for 4 hours at room temperature. The detectable minimum amounts of trifluoroacetylcarbamates by gas chromatography using flame ionization detector were 0.18μg, 0.16μg and 0.34μg for MTMC, XMC and PHC respectively.

現在我国には白アリ防除剤が155品目市販されている．白アリ防除剤はクロルナフタリンおよびクロルフェノール系化合物を主成分としているが，その他にカーバメート系化合物を配合しているものがある．毒物及び劇物指定令で指定されているカーバメート系化合物のうち，殺虫剤として使用されるものの劇物指定濃度はTable 1のとおりである．従ってカーバメートを配合した白アリ防除剤についても当然その含有量によっては劇物としての取扱いになる．しかし，白アリ防除剤に対するカーバメートの分析法は確立されていない．

残留農薬としてのカーバメートについては厚生省の残留農薬分析公定法の比色法[1]があるが，この方法は武田ら[2]によればカルバリルにのみ適応でき，その他のカーバメートについては応用不可能とされている．その他の分析法としては，カーバメートの組成フェノールを対象とした薄層クロマトグラフィー（以下ＴＬＣと略す）に

Table 1

Chemical name	Common name	毒物及び劇物指定令
2-isopropoxyphenyl N-methylcarbamate	PHC	劇　物（1%以上）
2-isopropylphenyl N-methylcarbamate	MIPC	〃　(1.5%以上)
4-ethylmercaptophenyl N-methylcarbamate	EMPC	〃
2-chloro-4, 5-dimethylphenyl N-methylcarbamate	——	〃
4-diallylamino-3, 5-dimethylphenyl N-methylcarbamate	APC	〃
2-(1,3-dioxolan-2-yl)-phenyl N-methylcarbamate	——	〃
3,4-dimethylphenyl N-methylcarbamate	MPMC	〃
3,5-dimethylphenyl N-methylcarbamate	XMC	〃　（3%以上）
3-methyl-5-isopropylphenyl N-methylcarbamate	——	〃
2-chlorophenyl N-methylcarbamate	CPMC	〃　(2.5%以上)
1-naphthyl N-methylcarbamate	NAC	〃　（5%以上）
3-methylphenyl N-methylcarbamate	MTMC	〃　（2%以上）
2-sec-buthylphenyl N-methylcarbamate	BPMC	〃　（2%以上）

* 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

よる方法,[3] 比色法[4] およびガスクロマトグラフィー(以下GCと略す) による方法[5] 等あるが，白アリ防除剤には一般に種々のフェノール系化合物が多量に配合されることが多いので，上記の分析法を白アリ防除剤に応用することはできない．近年残留農薬としてのカーバメートを直接無水トリフルオロ酢酸（以下無水 TFA と略す）と反応させ N-TFA 誘導体とし，ECD-GC で分析する方法が多数報告されている．[6-10]

今回，著者らは Table 1 のうち MTMC, XMC および PHC の3種について，TFA 化の反応条件，白アリ防除剤からの分離法および FID-GC による定量法について検討し，ほぼ満足する結果を得たので報告する．

実験の部

試薬は特にことわりのないかぎり試薬特級を用いた．無水 TFA：試薬特級を小アンプルに小分けし冷暗所保存，ピリジン：試薬特級蒸留，カーバメート標準物質：MTMC, XMC および PHC，それぞれベンゼン・n-ヘキサン混液より再結晶，カーバメート標準液(A)：n-ヘキサン 1 ml 中に MTMC 4.5mg, XMC 4.1mg および PHC 8.0mg を含む液，カーバメート標準液（B）：カーバメート標準液（A）を n-ヘキサンで10倍希釈，クロルフェノールおよびクロルナフタリン溶液：n-ヘキサン 1 ml 中に p-クロルフェノール，2,4-ジクロルフェノール，2,4,5-トリクロルフェノール，2,3,4,6-テトラクロルフェノール，ペンタクロルフェノール，α-クロルナフタリン，1,2-ジクロルナフタリンおよび1,2,3,4-テトラクロルナフタリンをそれぞれ 1 mgずつを含む液．

トリフルオロアセチレーション（TFA 化） 10ml 共栓試験管にカーバメート標準液（B）1.0ml をとり，溶媒を減圧で留去し，AcOEt 0.2ml，ピリジン 0.1ml を加え，次いで無水 TFA 0.2ml を加え直ちに密栓しよく振りまぜ室温に4時間放置したのち，n-ヘキサン5ml を加え，氷冷しながら水 5ml を加えよく振りまぜて反応を停止させ，分液ロートに移す．試験管は 5ml の n-ヘキサンで洗い，洗液はさきの分液ロートに合せ水層を除去したのち，さらに水 5 ml ずつで2回洗浄を繰返し，n-ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムで脱水し，溶媒を減圧で完全に留去する．

アルミナカラムクロマトグラフィーによる分離 カラムクロマト用アルミナ（Merck，活性度 I）10 g に水 0.5ml を加えよく振りまぜ一夜放置したのち，n-ヘキサンで内径 1.5cm のカラム管に充てんする．このカラム管にカーバメート標準液(A)，クロルフェノールおよびクロルナフタリンの各溶液をそれぞれ 1.0ml ずつを通導し，初めエーテル・n-ヘキサン（6：94）100 ml で，次いでアセトン・n-ヘキサン(1：9) 50ml で溶出する．

薄層クロマトグラフィーによる分離 Kieselgel HF$_{254}$（Merck）を用いて調製したプレート（0.5mm）を 110°，1時間活性化し，カーバメート標準液(A)，クロルフェノールおよびクロルナフタリンの各溶液のそれぞれ 1.0ml ずつの混液から減圧で溶媒を留去し，残留物に AcOEt 1.0ml を加えて溶かした液 100μl をマイクロドーサー（DESAGA）を用いて線状にスポットし，n-ヘキサン・n-ブタノール・ギ酸（80：20：1）を移動相として展開し，UVを照射しカーバメート部分のバンドを中心に約2 cm の幅で 10ml 共栓試験管にかきとり，AcOEt 5ml ずつで4回抽出し全抽出液を合し減圧で溶媒を留去する．

ガスクロマトグラフィーによるカーバメートの定量法 試料をアルミナカラムに通導し，アセトン・n-ヘキサン（1：9）溶出画分を減圧で溶媒を留去したのち，残留物を AcOEt の適当量に溶解し，TFA 化したのち，GC で定量を行う．内部標準液（以下 I.S. と略す）：n-ヘキサン 1ml 中に α-BHC（残留農薬試験用標準品）0.56 mg を含む液，GC：島津 GC-4CM 型 (FID), column：3mm×1.5m glass column, 5% silicone OV-17 and 2% PEGA on chromosorb W (AW-DMCS), 60～80 mesh, column temp.：175°, inject. temp., and detector temp.：210°, carrier gas：N_2 40ml/min, FID flow：Air 1.0kg/m^2, H_2 0.5kg/m^2, sensitivity：10^2 MΩ, range：16×10^{-2}V.

結果と考察

ガスクロマトグラフィー カラム充てん剤液相としてシリコン OV-17 および PEGA を検討したところ，5 % シリコン OV-17 における結果が良好であったのでこれを用いることとした．3種のカーバメート TFA 誘導体のガスクロマトグラムは Fig. 1 に示すとおりであり，保持時間および検出限界は Table 2 に示すとおりである．また，Fig. 2 に示すように MTMC 0.2～18.9μg, XMC 0.2～17.2μg および PHC 0.4～35.7μg の間で直線回帰が得られた．これらの結果から白アリ防除剤中カーバメートの定量には FID-GC が十分応用できるものと考定する．

薄層ならびにカラムクロマトグラフィーによる分離 白アリ防除剤は一般的にクロルナフタリン，クロルフェノール，デルドリンなどの有機塩素剤およびカーバメート等が配合され，この中からカーバメートを定量するためには妨害物質を除去する必要がある．製剤中よりカーバメートを分離する方法は種々考えられるが，今回は TLC とカラムクロマトについて検討した．

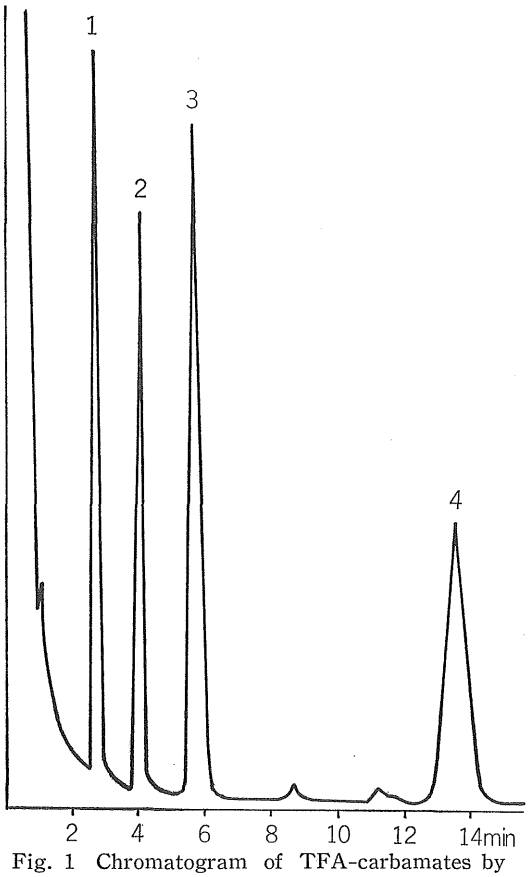


Fig. 1 Chromatogram of TFA-carbamates by FID-GC
column : 5% OV-17 glass column : 3mm×1.5m
column temp. : 175° inject. and detector temp. 210° sensitivity : 10^2MΩ range : 16×10^{-2}V
1 : TFA-MTMC 2 : TFA-XMC 3 : TFA-PHC
4 : I.S. α-BHC

TLC スポットかきとりによって分離したのち TFA 化した場合の回収率は80%で定量に応用することはできなかったが，市販品中のカーバメートの定性試験に応用

Table 2 Retention Time and Detectable Minimum Amount of TFA-carbamates by FID-GC

Carbamate	t_R(min)	Minimum Amount(μg)
MTMC	2.7	0.18
XMC	4.0	0.16
PHC	5.7	0.34
I.S. α-BHC	13.7	

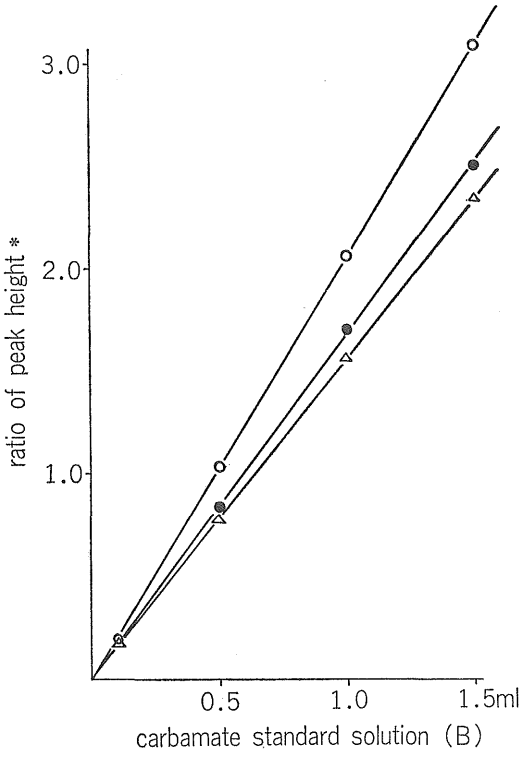


Fig. 2 Calibration Curve by FID-GC
MTMC ; —○—, PHC ; —●—, XMC : —△—
*peak height of TFA-carbamate/peak height of I.S. α-BHC

Table 3 Coefficient of Variation (C.V.) of Trifluoroacetylation

Carbamate	Reaction for 1 hr							Reaction for 4 hr						
	Ratio of peak height*				Average		C.V. (%)	Ratio of peak height*				Average		C.V. (%)
MTMC	2.018	1.994	1.882	1.769	1.982	1.784	10.7	2.031	2.127	1.995	2.001	1.848	1.974	4.6
	1.487	1.725	1.611	1.569				1.920	2.005	1.952	1.838			
XMC	1.592	1.568	1.667	1.431	1.561	1.435	10.3	1.586	1.630	1.561	1.558	1.454	1.534	3.9
	1.223	1.426	1.306	1.299				1.491	1.576	1.509	1.437			
PHC	1.932	1.861	1.670	1.568	1.812	1.641	12.2	1.871	1.939	1.831	1.820	1.692	1.801	4.4
	1.343	1.649	1.504	1.431				1.745	1.873	1.770	1.667			

*peak height of TFA-carbamate／peak height of I.S. α-BHC

することができる．

カラムクロマトについては，関田ら[8]によって有機塩素剤はエーテル・n-ヘキサン（6：94）溶出画分100mlに，またカーバメートはアセトン・n-ヘキサン（1：9）溶出画分50mlにほとんど回収されると報告されているが，クロルナフタリンおよびクロルフェノールの各溶液をカラムクロマト処理しGCにかけた結果，クロルナフタリン類はエーテル・n-ヘキサン溶出画分に回収されるが，クロルフェノール類はエーテル・n-ヘキサンおよびアセトン・n-ヘキサン溶出画分の何れも回収されず，カラム中に留まることが判明した．カーバメート標準液（A）のカラムクロマト処理の回収率は98.0%である．この結果に基づいて2，3の市販品中のカーバメートの分離をしたのち，PHC 含有の市販品に PHC を添加した試験溶液を作成し，実験の部で述べたカーバメート定量法に従い添加回収試験を行った結果は96.2%であり，満足すべき結果が得られた．

トリフルオロアセチレーション Lau ら[6]はカーバメートを無水 TFA と16時間室温暗所に放置し TFA 化を行い，土路ら[7]は水浴中で3時間反応を行っている．しかし，関田ら[8]は50°で3時間反応させた場合は，室温で16～18時間反応させた場合よりもピーク高は低い傾向を示し，変動係数も大きくなると報告している．また，武田[9]はピリジン存在下室温で1時間反応させる方法を記載しているので，その詳細について検討することにした．反応時間によって TFA 誘導体の生成量が変動するように考えられるので，検討した結果，Fig. 3 に示すように4時間で TFA 誘導体と内部標準物質のピーク高比が平衡に達していることが判明した．反応1時間では完全な平衡状態に達したとは認められず，反応1時間と4時間について変動係数を求めたところ，Table 3 に示すように4時間の方がバラツキは少なく，この変動係数は関田ら[8]の18時間反応の変動係数に近い値を示している．なお，反応停止を直接室温で行うと発熱が激しく，FID-GC で分解物のピーク高が増大し，バラツキの原因となることが判明したので，氷冷して反応を停止することとした．また，土路ら[7]によると TFA 誘導体は安定であり，3週間室温および冷暗所放置しても減少はほとんどないとされているが，Table 4 に示すごとく，室温では経時変化が速いので，TFA 化したのち GC で測定するまでの操作をできるだけ速やかに行う必要がある．宮田ら[10]は標準物質量と TFA 誘導体の生成量との関係について，カーバメート1～100μg の間で比例的に TFA 化が起こると報告しているが，今回，著者らが扱った高濃度（MTMC，XMC 40～700 μg，PHC 80～1200 μg）でも TFA 化が比例的に起こり，直線回帰が得られた．

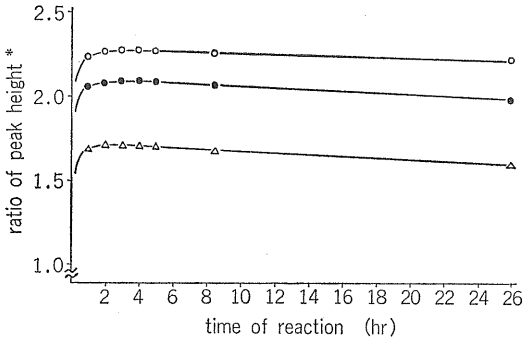


Fig. 3 Time Course of Reaction of Carbamate Insecticides with Trifluoroacetyl Anhydride in Pyridine
MTMC：—○—，PHC：—●—，XMC：—△—
*peak height of TFA-carbamate/peak height of I.S. α-BHC

Table 4 Stability of TFA-carbamate

Temp.	0°			25°		
Time(day)	1	3	9	1	3	9
MTMC	98.6%	97.6	77.8	86.8	55.2	7.5
XMC	99.4	98.1	89.2	89.2	56.1	5.8
PHC	97.9	94.8	73.3	79.1	46.1	——

謝辞 カーバメート原体を提供された日本特殊農薬工業株式会社，保土ケ谷化学株式会社および三共株式会社，実験に協力された三木一女氏に深謝いたします．

文　献

1) 厚生省告示第177号（昭和47年5月31日）
2) 武田明治，関田寛，大槻久美子，高松千賀子，田辺弘也：食衛誌，14，467，1973
3) 石川尭爾，遊佐義男，浅野譲，赤崎克之：分析化学 20，461，1971
4) 庄山正敏，宮地雄三，榊原仁作：分析化学，24，30，1975
5) Butler, L. I. and McDonough, L. M.: *J. Arg. Food chem.*, 16, 403, 1968
6) Lau, S. C. and Marxmiller, R. L.: *ibid*, 18, 413, 1970
7) 土路雅子，金沢純：分析化学，22，16，1973
8) 関田寛，鈴木隆，武田明治，田辺弘也：食衛誌，15，219，1974
9) 武田明治：衛生化学，20，116，1974
10) 宮田秀明，樫本隆：食衛誌，15，485，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Lab. P.H.*, 26-1, 110—114, 1975

アルカリ分解法によるヒト臓器中のメチル水銀定量法

植田忠彦* 山添律子* 山野辺秀夫*
戸谷哲也*

Determination of Methylmercury in Human Organs by Alkaline Digestion Method

TADAHIKO UETA*, RITSUKO YAMAZOE*, HIDEO YAMANOBE*
and TETSUYA TOTANI*

A satisfactory method for the determination of a trace amount of methylmercury in brain was made by improving alkaline digestion method.[1)]

For obtaining stable recovery of methylmercury, 5mg of L-cysteine was added to the brain and it was digested with 2.5*N* potassium hydroxide in ethanol. Various unsaponified materials in the alkaline digestion solution were excluded by once extraction with chloroform before making acid in order to prevent the formation of emulsion. This turned easy subsequent extraction procedures of methylmercury.

In case of liver and kidney, methylmercury in them could be determined by using alkaline digestion method.

The recoveries of methylmercuric chloride added to cerebrum, cerebellum, liver and kidney were 83.2%, 85.9%, 84.9% and 88.7%, respectively, and each standard deviation was 1.3%, 3.4%, 2.7% and 2.9%.

緒　　言

生体試料中のメチル水銀の定量は Westöö の方法[2,3)]またはその改良法[4)]を用いて一般的に行なわれている．しかしこれらの，試料の分解処理操作を行なうことなく，直接メチル水銀を抽出する方法（以下直接法と称する）はその抽出過程で強固なエマルジョンを形成しやすいため，分離操作が煩雑，困難となることが多い．

これらの直接法に対して，竹内ら[1)]は魚肉中のメチル水銀の定量に際して，試料をあらかじめアルカリ分解する方法について検討し，分析精度の向上が見られたと報告している．

今回われわれは人体臓器中のメチル水銀調査を意図し，このアルカリ分解法の臓器，特に大脳，小脳，肝臓および腎臓への適用性について検討した．その結果，従来直接法では定量操作が困難であった脳についても若干の改良を加えることによって，これらのすべての臓器に適用可能であり，良好な結果が得られたので報告する．

実験方法

試薬

特に断りのない限り，試薬はすべて特級を用い，水は蒸留水をイオン交換樹脂カラムに通した精製水を使用した．

(1) ベンゼン，クロロホルムおよびn-ヘキサン—これらの溶媒は使用の前に塩化メチル水銀の定量妨害物の混入していないことを確認して用いる．

(2) 塩酸—塩酸 500 g をベンゼン 100m*l* で 2 回洗浄し妨害物質を除いたのち使用する．

(3) 2.5N水酸化カリウム・エタノール溶液—水酸化カリウム70 g をエタノールに溶かし 500m*l* とする．

(4) システィン・アセテート溶液—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（$CH_3COONa \cdot 3H_2O$）0.8 g，塩化ナトリウム 15.0 g を水に溶解し 100m*l* とする．

(5) 塩化メチル水銀標準溶液—①同ベンゼン溶液：純度99%以上の塩化メチル水銀（mp 169°～170°）100.0 mg をベンゼンに溶かして 100 m*l* とし，標準原液とする．これをベンゼンで希釈して標準溶液を調整する．②同エタノール溶液：①と同様にしてエタノール溶液を調整し，この溶液は添加回収実験に供する．

(6) システィン溶液—L-システィン—塩酸塩 250 mg を水に溶かして 50m*l* とし，添加用システィン溶液とする．

* 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

装置

(1) ガスクロマトグラフ—①島津 GC-5A 型 ②検出器：電子捕獲型（線源 ^3H） ③カラム：10%DEGS-Hg（Chromosorb W AW DMCS, 80～100mesh）ϕ3mm×1.5m（ガラス） ④温度：カラム160°，注入口180°，検出器200° ⑤キャリヤーガス：60m*l*/min（N_2） ⑥注入量：5μ*l*

操作方法

(1) 脳 ホモジナイズした試料3.0gを200m*l*のナス型フラスコにとり，2.5N水酸化カリウム・エタノール溶液10m*l*，システィン溶液1m*l*（L-システィン5mgを含む）を加え，水浴上で約1時間加熱還流する．放冷後，水15m*l*を用いて200m*l*の分液ロートに移し，これに約3m*l*のエタノールを加えたのち，さらにクロロホルム20m*l*を加え2分間振とうし不ケン化物を抽出する．静置後，分離した二層に白濁が認められる場合はさらにエタノール約2m*l*を加え軽く振とうすることによって容易に除くことができる．

クロロホルム層を捨てたのち，水層に1N塩酸25m*l*を加えて中和し，1%硫酸銅溶液5m*l*を加え良く混和したのちさらに塩酸5m*l*を加え水層を酸性とし，クロロホルム30m*l*を用いて3分間激しく振とう抽出する．静置後，クロロホルム層を200m*l*の分液ロートに移す．水層はさらにクロロホルム30m*l*ずつを用いて2回抽出を繰り返し，前液と合する．

次にこのクロロホルム層にシスティン・アセテート溶液20.0m*l*を加え，5分間振り混ぜたのち，クロロホルム層をすて，システィン・アセテート溶液層をn-ヘキサン20m*l*ずつを用いて2回洗浄する．

次にこのシスティン・アセテート溶液層を正確に10.0m*l*とり，100m*l*分液ロートに移したのち塩酸2m*l*，ベンゼン20.0m*l*を加え，5分間激しく振とう抽出する．このベンゼン層をとり試験溶液とする．(Alkaline Digestion A Method)

(2) 肝臓および腎臓 細切混和した試料3.0gを200m*l*のナス型フラスコにとり，2.5N水酸化カリウム・エタノール溶液を加えて同様に加熱分解する．放冷後，1N塩酸25m*l*を用いて200m*l*分液ロートに洗い込み，1%硫酸銅溶液5m*l*を加え混和したのち，さらに塩酸5m*l*を加え水層を酸性とし，クロロホルムを用いて抽出を行なう．以下，前項(1)と同様に操作し，試験溶液とする．(Alkaline Digestion B Method)

(3) 定量法 塩化メチル水銀標準溶液の一定量をとり，ベンゼンを用いて希釈し，至適濃度（0.0025～0.03μg/m*l*）段階の各溶液を調製する．これらの溶液についてそれぞれガスクロマトグラムを測定し，その濃度とピーク高より検量線を作成する．試験溶液について同じ条件でクロマトグラムを測定し，塩化メチル水銀のピーク高より，検量線によって含有量を算出する．

結果および考察

脳

アルカリ分解 さきに竹内らが報告している条件，すなわち2N水酸化ナトリウム・エタノール溶液を用い，30分間加熱分解する方法では分解が不完全であった．従って分解にはさらにアルカリ濃度を高め，2.5N水酸化カリウム・エタノール溶液10m*l*を用いることによって，また分解時間は約1時間行なうことによって妨害を除き得ることが認められた．

メチル水銀の抽出 他の臓器と異なり脳は不ケン化物等を多量に含むため，アルカリ分解後酸性とし，メチル水銀を抽出する時これらがクロロホルム層に混入し強固なエマルジョンを形成する．この不ケン化物等をメチル水銀の損失なしに除去する方法として，まず，分解溶液をアルカリ性のままでクロロホルムと振り混ぜ不ケン化物等を除去し，その際のメチル水銀のクロロホルム層への移行について検討した．

(1) メチル水銀の挙動 2.5N水酸化カリウム・エタノール溶液10m*l*に塩化メチル水銀0.4μgを添加し，さらに水18m*l*を加えたのち，分液ロート中でクロロホルム20m*l*と共に2分間振り混ぜ，静置分離した水層とクロロホルム層についてメチル水銀の定量を行なったところ，水層から添加量の約45%，クロロホルム層からは約38%が検出された．従ってメチル水銀はアルカリ性の状態であってもかなりの比率でクロロホルム層へ移行することが明かとなった．

このことは強アルカリ性の状態で $CH_3HgCl \xrightarrow{\text{アルカリ性}} CH_3HgOH$ となり，[2] この水酸化メチル水銀がクロロホルム層に移行するためと考えられる．そこでこのメチル水銀のクロロホルム層への移行を防止するためにシスティンを加え，メチル水銀とのコンプレックス形成によるクロロホルム層への溶解度の低減効果について検討した．

(2) システィン添加量 まず，システィン添加量とメチル水銀の回収量との関係について調べたところFig. 1に示すように1mg以上のシスティン添加により回収率は上昇し，一定となった．すなわち一定量以上のシスティンを共存させればアルカリ性でクロロホルム層へのメチル水銀の移行を防止できることがわかった．

(3) システィン効果と回収率 本試験においてはシスティン5mgを添加することとし，塩化メチル水銀0.4μg

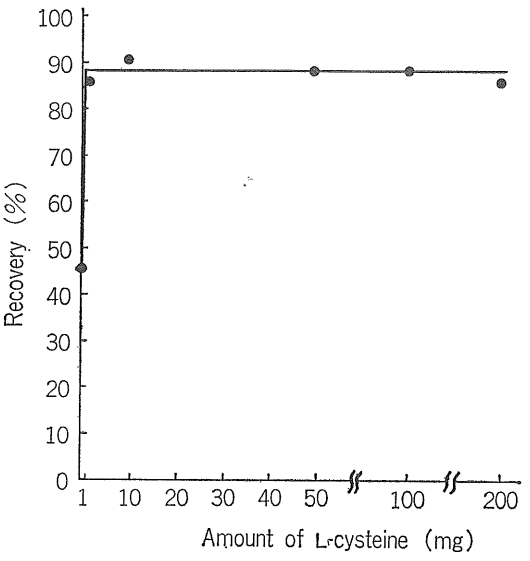


Fig. 1 Effect of Amount of Added L-Cysteine on Recovery of Methylmercuric chloride

を含む水酸化カリウム・エタノール溶液にシスティン5mgを添加したときの回収試験を行なった．またシスティンがアルカリとの加熱によりその効果をうしなう場合を考えあらかじめ100mgの水溶液を2.5N水酸化カリウム・エタノール溶液10 m*l*と加熱し，冷後，塩化メチル水銀 0.4μg を添加して回収試験を行なった．この結果を Table 1 に示した．平均回収率はそれぞれ88.6%，88.5%といずれも良好であり，システィンのメチル水銀との結合性はシスティンのアルカリとの加熱により低下しなかった．

(4) エタノール含有量の影響　アルカリ性でクロロホルムと振とうしたとき，水層のアルコール濃度のメチル水銀回収率におよぼす影響について検討したところ，

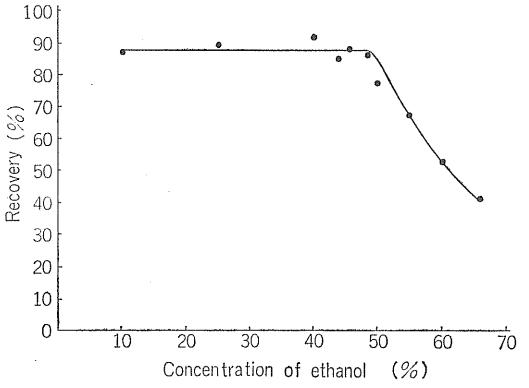


Fig. 2 Effect of Concentration of Ethanol in Aqueous Layer on Recovery of Methylmercuric chloride

Fig. 2 に示すように，エタノール含有率約48%以下で回収率は一定であった．

これらのことからメチル水銀はアルカリ分解を行なうことによってもアミノ酸やペプタイドのSH基と形成したメルカプタイドを損なわず，またこのメチル水銀はアルカリ性でアルコール含有率50%近い時でもクロロホルム層に移行しないことがわかった．

一方，不ケン化物等を除去するに当って，水層中のアルコール濃度が40%以下では両層にエマルジョンを生じ，二層の分離に長時間を要する．またこの分離が不十分なまま二層をわけ以下の操作を行なった場合，システィン・アセテート溶液転溶に当って再び強いエマルジョンを生じると共に回収率の低下を招く．従ってアルコール含有率は40～45%となるようにした．

(5) 添加回収率　この定量法に基づいて大脳および小脳についてメチル水銀の添加回収試験を行ない，直接法と比較検討したところ，ほぼ満足すべき結果であった．またこのときの試料のアルカリ分解前にシスティン5mg

Table 1 Recovery of Methylmercuric chloride on Adding L-Cysteine

Cysteine (mg)	No.	Added MMC (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	$\bar{x}$ [a] (%)	SD [b] (%)
5	1	0.4	0.3668	91.7	88.6	2.4
	2	0.4	0.3576	89.4		
	3	0.4	0.3456	86.4		
	4	0.4	0.3576	89.4		
	5	0.4	0.3436	85.9		
100 [c]	1	0.4	0.3500	87.5	88.5	
	2	0.4	0.3580	89.5		

a) Average
b) Standard Deviation
c) MMC was added to the L-cysteine solution digested with alkaline for 1 hour

Table 2 Comparison between the Recovery of Methylmercuric chloride Added to Brain by Method (A) and Method (W)

Sample	Sample amount(g)	Method[a]	Present (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	$\bar{x}$[b] (%)	SD[c] (%)
Cerebrum	3.0	A	0.206	0.4	0.539	83.3	83.2	1.3
	3.0	A	0.206	0.4	0.538	83.0		
	3.0	A	0.206	0.4	0.536	82.5		
	3.0	A	0.206	0.4	0.533	81.8		
	3.0	A	0.206	0.4	0.547	85.3		
Cerebellum	3.0	A	0.191	0.4	0.537	86.5	85.9	3.4
	3.0	A	0.191	0.4	0.524	83.3		
	3.0	A	0.191	0.4	0.524	83.3		
	3.0	A	0.191	0.4	0.553	90.5		
Cerebrum	3.0	W	0.020	0.4	0.339	79.8	77.4	19.0
	3.0	W	0.020	0.4	0.241	55.3		
	3.0	W	0.020	0.4	0.230	52.5		
	3.0	W	0.020	0.4	0.399	94.8		
	3.0	W	0.020	0.4	0.368	87.0		
	3.0	W	0.020	0.4	0.399	94.8		

a) A : Alkaline Digestion (A) W : Westöö[2]
b) Average
c) Standard Deviation

を加えることによって回収率を安定させることができた.

大脳および小脳の回収率にやや差の見られるのは，試料数の少ないためと考えられる. (Table 2)

肝臓および腎臓

以上検討した脳に比較して，肝臓および腎臓は塩酸々性下でのメチル水銀のクロロホルム抽出に当って，エマルジョンを生じる妨害物質がほとんどなく，アルカリ性での除去操作は不必要であった. 腎臓についてはシスティン・アセテート溶液転溶時にクロロホルム層とは容易に分離するが，水層に強いエマルジョンを生じる. しかしこのエマルジョンはクロロホルム層を捨てたのち，20～30m*l* のn-ヘキサンを用いて2～3回洗浄を繰り返すことによって容易に除去できた.

この定量法に基づいてメチル水銀の添加回収試験を行ない，直接法と比較したところ，ほぼ満足できる結果で

Table 3 Comparison between the Recovery of Methylmercuric chloride Added to Liver and Kidney by Method (B) and Method (W)

Sample	Sample amount(g)	Method[a]	Present (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	$\bar{x}$[b] (%)	SD[c] (%)
Liver	3.0	B	0.304	0.4	0.651	86.8	84.9	2.7
	3.0	B	0.304	0.4	0.631	81.8		
	3.0	B	0.304	0.4	0.648	86.0		
	3.0	W	0.440	0.4	0.700	65.0	52.5	15.6
	3.0	W	0.440	0.4	0.580	35.0		
	3.0	W	0.440	0.4	0.670	57.5		
Kidney	3.0	B	0.141	0.4	0.485	86.0	88.7	2.9
	3.0	B	0.141	0.4	0.494	88.3		
	3.0	B	0.141	0.4	0.508	91.8		
	3.0	W	0.120	0.4	0.550	100.8	73.6	24.1
	3.0	W	0.120	0.4	0.340	55.0		
	3.0	W	0.120	0.4	0.380	65.0		

a) B : Alkaline Digestion (B) W : Westöö[2]
b) Average
c) Standard Deviation

あった. (Table 3)

結　論

アルカリ分解によるメチル水銀定量法の人体臓器，特に大脳，小脳，肝臓および腎臓への適用性について検討したところ次の結果を得た.

(1) 脳については試料にシスティン5 mgを加えたのち，アルカリ分解し，この分解溶液のエタノール含有率を40～45%に調整し，アルカリ性の状態で不ケン化物等をクロロホルムで抽出除去した.

この操作によって，エマルジョンを形成することなく，メチル水銀の定量を可能とした.

この添加回収率は大脳では83.2%，小脳では85.9%，標準偏差はそれぞれ1.3%と3.4%であった.

(2) 肝臓および腎臓についてはクロロホルム抽出に対するエマルジョン等の妨害はなかった.

試料のアルカリ分解後，ただちに塩酸々性としメチル水銀を抽出，定量することが可能であった.

この添加回収率は肝臓では84.9%，腎臓では88.7%，標準偏差はそれぞれ2.7%と2.9%であった.

謝辞　本研究にあたり御指導をいただいた当所，理化学部長，松本茂博士に深謝致します.

文　献

1) 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，25，133，1974
2) Westöö, G.: *Acta Chem. Scand.*, 21, 1790, 1967
3) Westöö, G.: *Ibid.*, 22, 2277, 1968
4) 日本薬学会編：衛生試験法注解，339，1973 金原出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 115—122, 1975

セレンによるメチル水銀の毒性軽減作用（第1報）
メチル水銀およびセレン混合投与時におけるラット臓器中のメチル水銀およびセレンの含有量について

鈴木助治* 天川映子** 山野辺秀夫*
雨宮敬* 伊藤弘一* 竹内正博*
江波戸挙秀* 原田裕文* 戸谷哲也*

Effect of Selenium on the Toxicity of Methylmercury (I)
Methylmercury and Selenium Concentrations of Organs in Rats administered Methylmercury and Selenium

SUKEJI SUZUKI*, EIKO AMAKAWA**, HIDEO YAMANOBE*,
TAKASHI AMEMIYA*, KOICHI ITO*, MASAHIRO TAKEUCHI*,
KIYOHIDE EBATO*, HIROFUMI HARADA* and TETSUYA TOTANI*

The effect of selenium on the toxicity and distribution of methylmercury in wistar strain male rats was investigated. Selenium as sodium selenite with methylmercury added to vitamine E free purified diets prevented the marked weight loss observed on diets which contained 20, 30, 40 and 60 ppm of methylmercury alone. Selenium with methylmercury also reduced the mortality of rats fed diets contained 30 ppm of methylmercury alone. Methylmercury analysis of liver, kidney and brain of rats revealed that selenium increased the deposition of methylmercury in liver and brain, but in kidney methylmercury residues, when diets contained 2 ppm of selenium, were considerably lower than the group treated with 30 ppm of methylmercury alone before the onset of methylmercury intoxication.

緒　言

水銀の毒性におよぼすセレンの抑制作用が Parizek ら[1]によって報告されて以来，無機水銀および有機水銀とセレンの相互作用に強い関心がもたれている．生体内での水銀の貯留はセレンによって著しく増加し，[2,3] 逆に水銀が血液，腎などにおいてセレンの貯留を高めることが報告されている．[4] このことはセレンが生体内の SH 基と同様に水銀に対する親和性が強いためであろうと報告している．[2]

最近，Ganther ら[5]はマグロのセレンと水銀の含有量が1：1のモル比で増加することを認め，メチル水銀を 20ppm 添加したマグロをウズラに与えた実験によってマグロ中のセレンがメチル水銀の毒性を抑制することを報告し，無機水銀の場合と同様にセレンとメチル水銀はその親和性により complex を形成し毒性の低下を起すと論じている．また Koeman ら[6]はアザラシやイルカなどの肝，脳に水銀とセレンが高濃度に含まれ，そのモル比は 1：1 であり，これらの海獣における水銀の無毒化はセレンの存在に基づくものであると報告している．

このようなセレンの抑制効果は Iwata ら，[7] Stoewsand ら，[8] Stillings ら[9]あるいは上田ら[10]の動物実験によって，また加須屋[11]のラット小脳を用いた in vitro の神経線維発育実験によっても確認され，さらにメチル水銀の蓄積や排泄などについても報告されているが，その抑制効果の作用機序は未だ明らかではない．

今回われわれはその作用機序を解明することを目的にしてラットを用いてメチル水銀中毒に対するセレンの抑制効果を観察し，さらに臓器中のメチル水銀とセレンの

* 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
**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

蓄積量を測定したところ，二三の知見が得られたので報告する．

実験材料

実験動物：日本ラットK.K.より購入した Wistar 系の雄ラットを用いた．

飼　料：オリエンタル酵母工業K.K.製，ビタミンE無添加の精製粉末飼料A（以下飼料Aと略す）を使用した．

試　料：①塩化メチル水銀（以下 MeHg と略す），和光純薬K.K.製，CH_3HgCl 98.0%　②亜セレン酸ナトリウム（以下 SEL と略す），メルク社製，$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ 99.0%

実験方法

ラットはあらかじめ実験開始前に飼料Aで1週間飼育し，正常な体重の増加を示したものを実験に供した．

実験 1：平均体重 160 g のラットを各群8匹ずつにわけ，コントロール群には飼料Aのみを与え MeHg 単独投与群は飼料Aに MeHg を Hg として 20, 40, 60ppm の割合で添加した飼料を，また MeHg—SEL 混合投与群は単独投与群の3段階の飼料にさらに SELをNa_2SeO_3として 2 ppm および 6 ppm の割合でそれぞれ添加した6種類の飼料をいずれも自由に摂取させた。飲料水は給水瓶より水道水を自由に与え，ラットの体重と餌の摂取量は2日ごとに測定した．投与期間中は連日ラットの観察を行い，水俣病症状の特徴である後肢の麻痺と交叉現象の発現をもってメチル水銀中毒の発症を確認することとした．そして MeHg 60 ppm 単独投与群のすべてにメチル水銀中毒の発症を確認した時点で全群のラットを断首放血によって屠殺し，脳，肝臓，腎臓を摘出し，各臓器重量と MeHg および Se の含有量を測定した．

実験 2：平均体重 115 g のラットをコントロール群は5匹，MeHg単独投与群と MeHg—SEL 混合投与群はそれぞれ16匹ずつ用い，コントロール群には飼料Aのみを与え，MeHg 単独投与群は飼料Aに MeHg を Hg として 30ppmの割合で添加した飼料を，また MeHg—SEL 混合投与群は単独投与群の飼料にさらに SEL をNa_2SeO_3として 2ppm の割合で添加した飼料をいずれも自由に摂取させた．以下実験1と同様に飼育し，連日ラットを観察して死亡時期と死亡率を確認した．

別に MeHg 単独投与群と MeHg—SEL 混合投与群にはそれぞれ50匹ずつのラットを用い，上記の MeHg 30 ppm を添加した飼料とこれにさらに SEL 2 ppm を添加した飼料をそれぞれ自由に摂取させて飼育し，ラットを経日的に屠殺した．すなわちその屠殺時期は投与開始後2, 4, 6, 9, 12, 15, 19, 23日目として両群のラットを4－6匹ずつ屠殺し，さらに23日目以降もなお生存した MeHg—SEL 混合投与群を35と43日目にそれぞれ6匹ずつ屠殺した．屠殺したすべてのラットから脳，肝臓，腎臓を摘出し，実験1と同様に各臓器重量と MeHg および Se の含有量を測定した．

MeHg および Se の測定法：各臓器をそれぞれホモジナイズして均一化し，MeHg は脳 0.3 g，肝臓 1.0 g，腎臓 0.5 g をとり，植田ら[12]が本年報に報告しているア

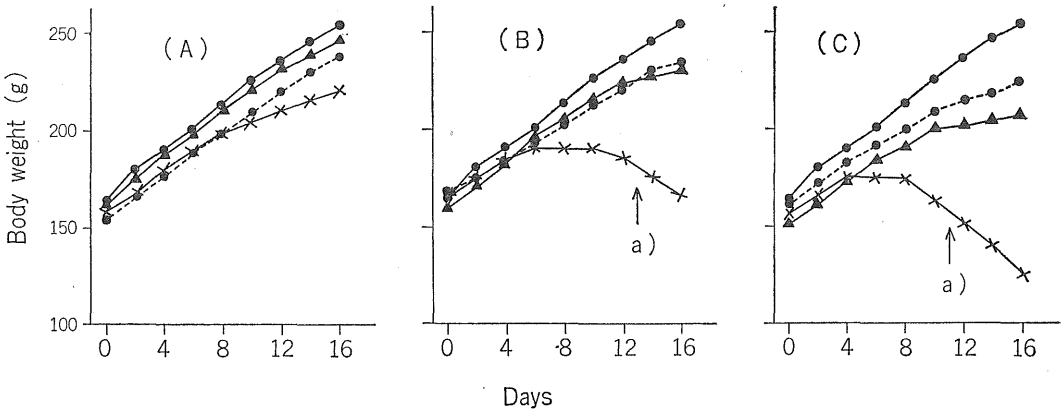


Fig. 1. Change in the mean body weight of rats fed diets containing methylmercury and selenium (expt. 1)
(A): Methylmercury 20 ppm, (B): Methylmercury 40 ppm, (C): Methylmercury 60 ppm, —●—: Control, —×—: Methylmercuty alone, —▲—: Mehtylmercury + selenium 2 ppm, ···●···: Methylmercury + selenium 6 ppm
a) Onset of methylmercury intoxication.

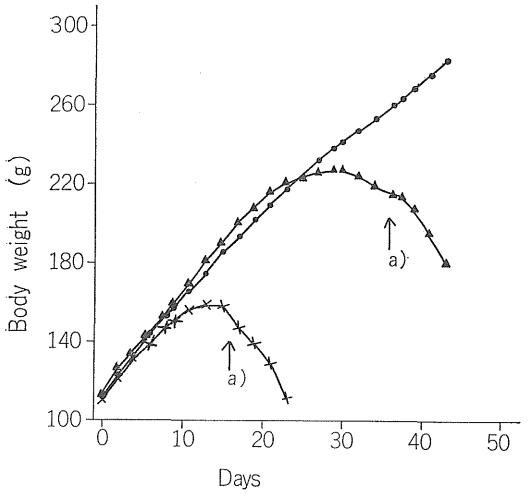


Fig. 2. Change in the mean body weight of rats fed diets containing methylmercury and selenium (expt. 2)
—●— : Control, —×— : Methylmercury 30 ppm, —▲— : Methylmercury 30 ppm + selenium 2 ppm
a) Onset of methylmercury intoxication

ルカリ分解—クロロホルム抽出法にしたがって検液を調製し，ECD ガスクロマトグラフィーによる測定を行った．また Se は各臓器 0.5 g をとり，2,3-ジアミノナフタレンを用いるけい光分析法[18]により測定を行った．

実験結果

1) **体重曲線**：実験1，実験2のラットの体重曲線を Fig. 1 と Fig. 2 に示す．Fig. 1 から明らかなように，MeHg 20, 40, 60 ppm の各単独投与群はいずれもコントロール群にくらべて体重の停滞または減少が投与後5—7日目より認められた．MeHg の体重におよぼす影響はその投与濃度の増加にともなって明確に現われ，MeHg 60 ppm 単独投与群が最も早く，投与後約5日目ですでに体重の減少がみられ，しかもその度合は著明であった．また MeHg 40 ppm と 60 ppm 単独投与群は Fig. 1 に示した矢印の時期よりメチル水銀中毒の発症が認められた．これに対して MeHg—SEL 混合投与群はいずれも体重の増加を示し，メチル水銀中毒の発症は認められなかった．しかし MeHg 60 ppm—SEL 混合投与群では多少成長の鈍化が観察された．一方 Fig. 2 に示すように実験2の MeHg 30 ppm 単独投与群は，投与後13日目より体重の減少を示し，約16日目よりメチル水銀中毒の発症が認められた。これに対して同時期における MeHg 30 ppm—SEL 2 ppm 混合投与群はコントロール群と同様に体重の増加を示したが，約25日目より MeHg の毒性が現われ成長が抑制された．

2) **MeHg と Se の摂取量および死亡率**：Table 1 と Fig. 3 にそれぞれ実験1および実験2における摂取量を示す．MeHg と Se の摂取量は各群の餌の摂取量から MeHg および Se として算出し，ラット1匹あたりの累積平均摂取量としてあらわした．

Table 1 に示すように実験1における MeHg 40 ppm と 60 ppm 単独投与群の MeHg 摂取量はいずれも約9 mg に相当し，この摂取量において体重の減少とメチル水銀中毒の発症が認められた．これに対して MeHg 40 ppm—SEL 混合投与群では約 13mg の MeHg を摂取してもほとんど成長に影響がみられなかった．しかしこの時点で MeHg 60ppm—SEL 混合投与群はすでに17—

Table 1. Average amount of diet, methylmercury and selenium ingested by each group during 17 days (expt. 1)

Treatment		Average diet intake (g)	Average methylmercury intake[a] (mg)	Average selenium intake[b] (mg)
Methylmercury (ppm)	Selenium (ppm)			
0	0	311.8	——	——
20	0	263.3	6.59	——
20	2	308.1	7.71	0.28
20	6	288.4	7.22	0.79
40	0	185.3	9.28	——
40	2	275.6	13.80	0.25
40	6	265.3	13.28	0.73
60	0	127.5	9.58	——
60	2	231.6	17.40	0.21
60	6	240.4	18.05	0.66

a) Expressed as amount of methylmercury chloride per rat.
b) Expressed as amount of selenium per rat.

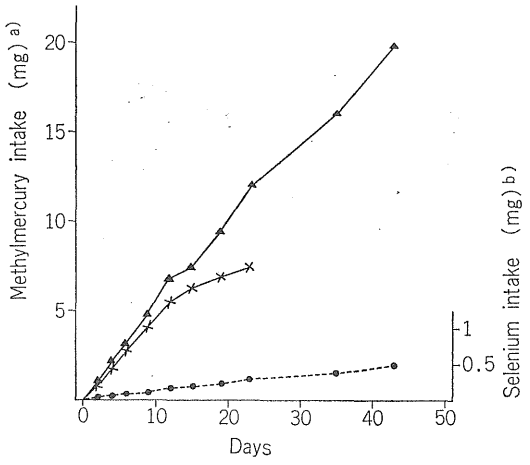


Fig. 3. Average amount of methylmercury and selenium ingested by each group treated with methylmercury 30 ppm or methylmercury 30 ppm + selenium 2 ppm (expt. 2)
—×— : Methylmercury 30 ppm
—▲— : Methylmercury 30 ppm + seleniun 2 ppm
···●··· : Average amount of selenium ingested by the group treated with methylmercury 30 ppm + selenium 2 ppm
a) Expressed as amount of methylmercury chloride per rat.
b) Expressed as amount of selenium per rat.

18mg の MeHg を摂取しており，このため成長に抑制が認められた．一方 Fig. 3 に示すように実験 2 のMeHg 30 ppm 単独投与群では投与後 13日目より餌の摂取が鈍り，MeHg 摂取量が約 6—6.5 mg に達したときに体重の減少とメチル水銀中毒の発症を示した．しかし SEL 2 ppm 混合投与群は 12—16mg まで MeHg の毒性発現が抑制され，屠殺時の累積摂取量は単独投与群の約 3 倍に達し，MeHg に対して耐容性を示した．Se の累積摂取量は実験 1，実験 2 いずれにおいても 1 mg 以下であった．

Se の延命効果は Fig. 4 に示すとおりその効果が明ら

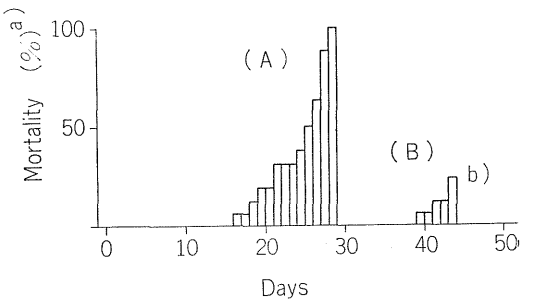


Fig. 4. Cumulative mortality (%) of rats in each group treated with methylmercury 30 ppm or methylmercury 30 ppm+selenium 2 ppm (expt. 2)
(A) : Methylmercury 30 ppm, (B) : Methylmercury 30 ppm + selenium 2 ppm
a) Mortality of 16 rats in each group.
b) Alive rats remained in the group were killed.

Table 2. Methylmercury and selenium concentrations in brain, liver and kidney of rats fed diets containing methylmercury and selenium during 17 days (expt. 1)

Treatment		Methylmercury concentration (ppm)			Selenium concentration (ppm)		
Methyl-mercury (ppm)	Selenium (ppm)	Brain	Liver	Kidney	Brain	Liver	Kidney
0	0	0.0	0.0	0.0	0.00	0.09±0.01	0.20±0.01
20	0	6.4±0.36[a)]	24.3±2.06	69.4±6.55	0.07±0.01	0.16±0.01	0.29±0.01
20	2	8.5±0.52*[b)]	25.4±4.20	80.2±5.89	0.12±0.01	0.57±0.01	1.39±0.13
20	6	11.4±0.38*	32.7±1.28	68.1±7.22	0.22±0.02	0.63±0.02	1.40±0.23
40	0	11.4±0.37	40.9±2.63	76.6±7.29	0.08±0.01	0.20±0.02	0.33±0.02
40	2	15.5±1.53*	51.4±3.76*	120.5±5.75*	0.19±0.02	0.72±0.03	1.55±0.09
40	6	15.5±1.07	60.9±3.72*	118.5±3.23*	0.17±0.01	0.61±0.03	1.97±0.36
60	0	16.6±1.43	60.6±8.34	87.2±7.28	0.09±0.01	0.31±0.03	0.39±0.04
60	2	14.7±1.22	80.2±3.80	115.0±5.41*	0.25±0.02	0.78±0.03	1.45±0.09
60	6	20.1±1.35*	75.3±3.89	125.1±6.73*	0.36±0.03	0.64±0.03	2.13±0.29

a) The data are represented as mean ± SE from 8 rats of each group.
b) *; Significant difference from the group fed diets containing 20, 40 or 60 ppm of methylmercury alone ($p<0.05$).

Table 3. Methylmercury concentrations (ppm) in brain, liver and kidney of rats fed diets containing methylmercury and selenium (expt. 2)

Days	No. of killed rats	Methylmercury 30 ppm			Methylmercury 30 ppm + Selenium 2 ppm		
		Brain	Liver	Kidney	Brain	Liver	Kidney
2	4	0.9±0.07[a)]	6.4±0.49	19.6±0.89	2.1±0.26*[b)]	9.8±0.94*	20.9±1.98
4	4	2.5±0.21	10.4±0.26	49.1±1.72	4.8±0.13*	16.8±0.41*	35.7±1.75*
6	4	4.3±0.32	13.4±0.62	60.4±6.37	6.3±0.65*	21.9±0.66*	51.5±4.87
9	4	5.7±0.22	19.5±1.13	95.9±9.18	8.3±0.54*	22.8±4.21*	86.4±2.30
12	4	7.6±0.40	23.5±1.91	111.8±2.81	11.0±0.85*	28.6±0.83	81.9±7.83*
15	4	11.9±1.10	33.3±4.26	67.5±14.21	14.9±1.00*	43.5±3.49	93.1±2.36
19	6	15.4±0.62	37.1±2.98	47.5±5.62	18.0±1.82	33.6±3.03	107.6±6.10*
23	6	15.7±1.32	45.6±2.27	71.8±1.71	18.4±2.84	43.0±3.41	112.2±2.72*
35	6	——	——	——	18.9±1.27	62.8±4.02	88.9±13.07
43	6	——	——	——	23.4±2.45	73.2±4.95	70.4±10.24

a) The data are represented as mean ± SE from 4 — 6 rats of each group treated with methylmercury 30 ppm or methylmercury 30 ppm + selenium 2 ppm.

b) * ; Significant difference from the group treated with methylmercury 30 ppm alone ($p<0.05$)

Table 4. Selenium concentrations (ppm) in brain, liver and kidney of rats fed diets containing methylmercury and selenium (expt. 2)

Days	No. of killed rats	Methylmercury 30 ppm			Methylmercury 30 ppm + Selenium 2 ppm		
		Brain	Liver	Kidney	Brain	Liver	Kidney
2	4	0.18±0.01[a)]	0.46±0.02	0.61±0.03	0.23±0.02	0.77±0.04	0.70±0.04
4	4	0.17±0.01	0.44±0.02	0.56±0.14	0.23±0.01	0.99±0.03	0.87±0.31
6	4	0.16±0.01	0.41±0.03	0.61±0.11	0.25±0.01	1.07±0.04	1.03±0.09
9	4	0.15±0.01	0.46±0.02	0.50±0.12	0.28±0.03	1.20±0.06	1.78±0.48
12	4	0.15±0.01	0.45±0.03	0.93±0.03	1.02±0.19	1.53±0.20	2.30±0.38
15	4	0.12±0.01	0.31±0.03	0.79±0.09	0.38±0.02	1.17±0.19	1.83±0.07
19	6	0.12±0.01	0.30±0.02	1.01±0.11	0.47±0.06	1.10±0.09	3.81±0.28
23	6	0.13±0.01	0.33±0.05	1.35±0.13	0.54±0.05	1.20±0.11	3.26±0.22
35	6	——	——	——	0.70±0.06	1.72±0.13	4.99±0.25
43	6	——	——	——	0.80±0.07	2.02±0.14	4.45±0.50

a) The data are represented as mean ± SE from 4—6 rats of each group treated with methylmercury 30 ppm or methylmercury 30 ppm + selenium 2 ppm.

かに認められた．MeHg 30 ppm 単独投与群は 17 日目より死亡例が観察され，投与後29日間で16匹全例が死亡した．これに対し MeHg—SEL 混合投与群は投与後39日間全例が生存していた．しかし MeHg—SEL 混合投与群においてもその後死亡例がみられ Se の延命効果に限界のあることがわかった．

3) **MeHg および Se の蓄積量**：実験 1，実験 2 における臓器中の MeHg および Se の測定結果をそれぞれ Table 2 と Table 3, Table 4 に示す．実験 1 における MeHg 蓄積量は，Table 2 に示すように MeHg 単独投与群と MeHg—SEL 混合投与群のいずれにおいても投与濃度に対応して増加した．このうち MeHg 単独投与群は Fig. 1 から明らかなように MeHg 蓄積量とメチル水銀中毒の発現との間に相関がみられた．これに対し MeHg—SEL 混合投与群はいずれもメチル水銀中毒の発症を示さず，MeHg の蓄積に対して耐容性が認められた．このことは実験 2 の結果 (Fig. 2, Table 3) においても同様に認められた．Table 2 において投与濃度に対応させながら MeHg 蓄積量の増加する割合を比較すると，臓器によって若干異なり，脳と肝はほぼ同じ割合で増加しているが，腎は 40 と 60 ppm 投与群がほとんど同じ値を示している．特に MeHg 単独投与群は 20, 40, 60ppm の投与濃度に対して脳の蓄積量が6.4, 11.4, 16.6 ppm であり，その比率は 1 : 1.8 : 2.6 と増

加し，肝でも1：1.7：2.5と増加している．しかし腎では1：1.1：1.3とその増加がわずかなものであることが観察された．これに対しMeHg—SEL混合投与群においては脳，肝，腎のいずれもほぼ同じ増加の傾向を示した．またMeHgの同一投与濃度においてMeHg蓄積量を比較すると，MeHg単独投与群よりもMeHg—SEL混合投与群の方が高い値を示した．MeHg 20 ppm投与群ではこの傾向はあまり明確でないが，MeHg 40と60 ppm投与群の場合はMeHg単独投与群よりもMeHg—SEL混合投与群の方が脳は約4 ppm，肝は10—20ppm，腎は30—40ppmと蓄積量の増加を示し，しかもMeHgの毒性発現を遅らせていることがわかった．腎に最もその差が大きいことは単独投与群の蓄積が低下したためと思われる．

Seの蓄積量はTable 2に示すように脳が0.1—0.36 ppm，肝が0.5—0.8 ppm，腎が1.3—2.1 ppm程度であり，MeHgにくらべて低い値であった．またMeHgの投与濃度を20，40，60ppmと高めても大きな増加を示さず，このことはSeの投与濃度を2から6 ppmに高めてもMeHg蓄積量はそれ程増加していないことと関連して，臓器へのMeHgの蓄積に対するSeの関与は無機水銀の場合と異なってあまり大きなものではないように思われる．

Table 3に示すように実験2のMeHg蓄積量の推移は実験1の結果と同様の傾向を示した．MeHg単独投与群では脳，肝のMeHg蓄積量が経日的に増加するのに対して腎は投与後12日目をピークにして明らかに減少する傾向が認められた．腎におけるこのような傾向はFig. 2, Fig. 4よりMeHgの毒性発現と相関しており，腎の代謝に影響を与えていることが推測された．Table 2に示した実験1の結果において，MeHgの投与濃度に対応させながら腎のMeHg蓄積量をみると，MeHg単独投与群はMeHg—SEL混合投与群にくらべて明らかにその増加の割合がわずかなものであることを示したが，実験1はラットの屠殺時期をメチル水銀中毒の発症の時点としたため投与後17日間経過しており，実験1における腎のMeHg蓄積量のこのような傾向は12日目以降減少を示した実験2の結果から容易に推定できる．また前述したTable 2の結果においてMeHg—SEL混合投与群はMeHg単独投与群より腎のMeHg蓄積量が30—40 ppmと脳，肝に比較して特に高い値であったが，これは見かけ上のことであって，単独投与群のMeHg蓄積量の減少に基づいていることがわかった．つぎにMeHg単独投与群とMeHg—SEL混合投与群を比較すると，脳と肝のMeHg蓄積量は実験1の結果と同様に単独投与群よりもSEL混合投与群の方が高い値を示し，しかもMeHgの毒性発現が抑制されていることがわかった．これに対し腎では逆にMeHg—SEL混合投与群の方が投与後12日目まで10—30ppm低い値を示した．Fig. 3に示すように単独と混合投与群ではMeHgの累積摂取量がかなり違ってくるので，この点を考慮して累積摂取量に対するMeHg蓄積量の比率をとってみた．その結果はFig. 5に示すとおりである．

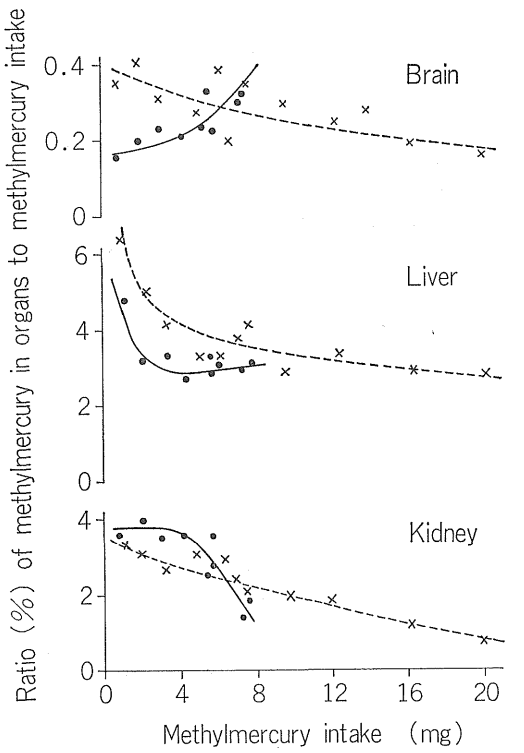


Fig. 5. Effect of selenium on deposition of methylmercury for rat organs (expt. 2)
—●— : Methylmercury 30 ppm
…×… : Methylmercury 30 ppm + selenium 2 ppm

この比率からも脳，肝の蓄積はMeHg—SEL混合投与群の方が大きく，腎はMeHg摂取量が約6 mg以下，すなわちMeHgの毒性が発現しない範囲内で脳，肝と異なってMeHg—SEL混合投与群の方がMeHg蓄積の小さいことがわかった．

実験2におけるSe蓄積量はTable 4に示してあるが，MeHg—SEL混合投与群のSeは実験1と同様にMeHgに比べて低い値であった．

考　察

今回われわれはつぎのような2つの理由からラットの

餌としてビタミンE無添加の粉末精製飼料を用いて実験を行った．すなわち第1に普通のラット用飼料は魚粉をはじめ種々の原料が配合されており，これらに由来するSeを含有していることが考えられる．事実われわれが測定したところ，オリエンタルNM飼料中からSeが0.26—0.3ppm(平均0.3ppm, Na_2SeO_3として0.6ppm)検出された．第2にビタミンEと微量のSeの間に相互作用が存在し，血中のSeの貯留をビタミンEが持続させることがわかっている．[14] またMeHg毒性に対するビタミンEの抑制効果が加須屋[15]によってすでに報告されている．そのためSeの毒性軽減作用を検討するにはビタミンEを含む飼料は適当でないと判断し，今回はビタミンEを添加しない粉末精製飼料(Se, 0.0ppm)を用いた．なおこの飼料にMeHg 30 ppmおよびSEL 2ppmを混合し，1週間後，1カ月間後にそれぞれMeHgを定量したところ，MeHgの含有量の経時変化は認められず，飼料中の組成成分によるMeHgの分解や揮散はほとんどないものと考えられる．またビタミンEの欠乏症発現が考えられるが，Ganther ら[5]の実験でその発症は認められていないので，欠乏症の発現の可能性はないものと思われる．

MeHg毒性におよぼすSeの抑制効果は明らかに認められるが，単独投与にくらべて投与期間あるいはMeHg累積摂取量が約2倍になった時期よりMgHg—SEL混合投与にもメチル水銀中毒が発現している．SeはMeHgよりも排泄が非常に早いことを考慮して，Seの投与量を多くすることによって抑制効果の増大を計ることも考えられるが，Seそれ自身にもかなり強い毒性を有しているため，投与量に限界があり，またMeHg毒性に対するSeの抑制作用そのものにも限界があると思われる．加須屋[11]の神経線維による in vitro の実験でもSeの毒性軽減作用に限界が認められている．

MeHg蓄積量は脳，肝において単独よりSEL混合投与の方が増加し，メチル水銀中毒の発症を抑制していることがわかったが，このことはStoewsand ら[8]によっても認められている．Seの毒性軽減作用に関するメカニズムは，Ganther ら[5]によるとHgとSeの相互作用と同様にMeHgに対するSeの親和性が強いことから，生体内でMeHgとSeの complex が形成され毒性の低いものになると考えられている．このことは魚類のHg/Seはモル比で1:1の割合で増加し，またKoeman ら[6]は海獣の肝，脳でそのモル比が1:1であることを証明していることからも支持されている．われわれの実験結果から臓器中のSe蓄積量はMeHgにくらべて極めて低い値であり，Se 1モルに対してHgは肝で14—37モル，脳で16—29モル，腎で15—25モルである．これらのモル比は投与濃度別にみても一様性は認められない．実験2において経日的に蓄積量を調べた結果からもそのモル比は3—15ぐらいで一様性はない．またMeHgとSeの間の相関係数rを調べたところ，いずれの投与群においてもほとんど相関性は認められない．したがってMeHgとSeの間に complex が形成されるにしても，その割合は少なく，直接的な complex の形成は考えにくい．すくなくとも今回のような急性実験では先に述べた魚類におけるHgとSeの存在比とちがっており，MeHgに対するSeの作用は無機水銀の場合とは異なっているものと考えられる．

腎のMeHg蓄積量についてみると，単独投与にメチル水銀中毒が発現するまではSe投与の方が単独投与よりもその蓄積量がかなり低い値を示し，メチル水銀中毒の発現後は単独投与の方が急激に減少して結果的にMeHgの量的関係が逆転する．したがってこのようなMeHg蓄積量の消長からみてSeは腎におけるMeHgの代謝に大きく関与していることが推察され，腎のMeHg蓄積量におよぼすSeの影響を評価する場合には実験動物の屠殺時期に留意しなければならない．Iwata ら[7]によれば，Seが臓器中のMeHgの蓄積を減少させることを報告し，その理由としてSeによってMeHgの排泄が促進されるのではないかと述べている．しかしStillings ら[9]は脳，肝では蓄積量に差がなく，腎においてSe投与の方が減少していることを報告し，このことはMeHgの排泄を促進しているものではないことを認めている．Seによる腎のMeHg蓄積量の減少は先に述べたようにわれわれの実験結果からも認められ，Stillings ら[9]が述べているように，このような現象はSeによるMeHgの脱メチル化反応によるものと考えられる．

MeHgに対するSeの毒性軽減作用に関するメカニズムは不明であるが，Seの蓄積量がMeHgにくらべて低いことから無機水銀に対するSeの作用は異なっていよう．微量のSeが蛋白質のSH基などと関連してMeHgを低毒化し，臓器への親和性を高めていることも考えられる．また脱メチル化反応がSeによって促進されるとすれば，慢性実験において低濃度のMeHgを投与し，MeHgの毒性が発現しない代謝的に正常な状態を維持させながらSeを投与する場合，今回のような急性実験とはSeの効果やMeHgおよびSeの蓄積量がちがってくる可能性があると思われるので，今後このような点を含めて慢性実験について検討する予定である．

要　結

1. Se 投与によって明らかに延命効果が認められたが，Se 2 ppm の投与では単独の約2倍の期間でメチル水銀中毒による死亡例が確認された．

2. 脳，肝臓の MeHg 蓄積量は Se 投与によって増加した．腎ではメチル水銀中毒の発症以前において，Se 投与は単独よりかなり低い値であった．しかし発症後は Se 投与の方が見かけ上著しく高い蓄積量を示した．これは単独が減少したためである．

3. 臓器中の Se 蓄積量は MeHg に比較して低い値であった．その Hg/Se のモル比は魚類とは全く異にする．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「セレンによるメチル水銀の毒性軽減作用に関する研究」として実施し，その概要は日本薬学会第95年会1975年4月で発表した）

文　献

1) Parizek, J. and Ostadalova, I.: *Experientia*, 23, 142, 1967
2) Eybl, V., Sykora, J. andMertl, F.: *Experientia*, 25, 504, 1969
3) 小宮和英，遠水淑子，河内佐十：日本薬学会第94年会，衛生 5 N 2—3，1974
4) Levander, O. A. and Argrett, L. C.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 14, 308, 1969
5) Ganther, H. E., Goude, C., Sunde, M. L. and Kopecky, M. J.: *Science*, 175, 1122, 1972
6) Koeman, J. H., Peeters, W. H. M. and Koudstaal-Hol, C. H. M.: *Nature*, 245, 385, 1973
7) Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y.: *Res. Communicat. Chem. Path. Pharmacol.*, 5, 673, 1973
8) Stoewsand, G. S., Bache, C. A. and Lisk, D. J.: *Bull. Environ. Contaminat. Toxicol.*, 11, 152, 1974
9) Stillings, B. R., Lagally, H., Bauersfeld, P. and Soares, J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243, 1974
10) 上田喜一，山中すみへ，河合正計，東条憲一：医学と生物学，90，15，1975
11) 加須屋実：医学のあゆみ，90，211，1974
12) 植田忠彦，山添律子，山野辺秀夫，戸谷哲也：東京衛研年報，26，110—114，1975
13) 鈴木助治，原田裕文，小泉清太郎，戸谷哲也：衛生化学，19，82，1973
14) Desai, I. D. and Scott, M. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 110, 309, 1965
15) 加須屋実：医学のあゆみ，90，33，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 123—128, 1975

セレンによるメチル水銀の毒性軽減作用（第2報）

メチル水銀，セレンおよびビタミンE投与時におけるラット臓器中のメチル水銀ならびに総水銀含有量について

原田裕文* 伊藤弘一* 江波戸挙秀* 竹内正博*
雨宮敬* 山野辺秀夫* 鈴木助治* 戸谷哲也*

Effect of Selenium on the Toxicity of Methylmercury (II)

Methylmercury and Total Mercury Concentrations of Organs in Rats administered Methylmercury, Selenium and Vitamin E

HIROFUMI HARADA*, KOICHI ITO*, KIYOHIDE EBATO*, MASAHIRO TAKEUCHI*, TAKASHI AMEMIYA*, HIDEO YAMANOBE*, SUKEJI SUZUKI* and TETSUYA TOTANI*

The effect of *dl*-α-tocopherol and selenium on the toxicity and the distribution of methylmercury administered to wistar strain rats was investigated.

The rats were fed the purified diets containing 30 ppm methylmercury with either no supplements, 100 ppm *dl*-α-tocopherol, 2 ppm selenium or 100 ppm *dl*-α-tocopherol and 2 ppm selenium. The toxicity of methylmercury were reduced with either *dl*-α-tocopherol or selenium, and the combination of *dl*-α-tocopherol and selenium produced a considerably greater additive effect for reduction of toxicity, as measured by increased growth and survival time.

The accumuration amount of methylmercury and total mercury in brain and liver increased with increasing the intake of methylmercury. In kidney, the accumuration amount of methylmercury held almost constant, but total mercury was 20 % higher in the groups administered selenium than the groups administered *dl*-α-tocopherol. So, it was considered that the reduction mechanisms of the toxicity of methylmercury with *dl*-α-tocopherol and selenium were different from each other.

緒　言

セレンの投与によって水銀の毒性が低下することはPařizek[1]をはじめ，多くの研究者[2-5]によって報告されているが，その作用機序に関しては，いまだ明らかにされていない．われわれは前報[6]で，塩化メチル水銀およびセレンをラットに投与した場合の毒性の発現ならびに臓器中のメチル水銀，セレンの蓄積量について報告した．今回はセレンと同様にメチル水銀の毒性を軽減させる作用があると報告されているビタミンE[7]と，セレン，あるいはセレンとビタミンEを混合投与した場合の軽減作用をラットによって比較するとともに，ラット臓器中のメチル水銀および総水銀蓄積量についても検討したので報告する．

実験材料および実験方法

実験動物：日本ラットK.K.より購入したWistar系の雄ラットを用いた．

飼料：オリエンタル酵母工業K.K.製のビタミンE無添加精製粉末飼料A（以下飼料Aと略す）を用いた．

試料：①塩化メチル水銀（以下MeHgと略す），CH_3HgCl，98.0%和光純薬製．②亜セレン酸ナトリウム(以下Seと略す)，$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$，99.0% メルク社製．③酢酸 *dl*-α-トコフェロール（以下V.Eと略す），東京化成工業K.K.製．

実験方法：購入したラットを実験開始前に飼料Aで10日間飼育し，このうち正常な体重の増加を示した110—130 gのものを用い，飼育はすべて空調の整った動物飼育室において行なった．このラットを5匹ずつ5群に分け，それぞれコントロール群，MeHg単独投与群（A群），MeHg-V.E混合投与群（B群），MeHg-Se混合投与群（C群），MeHg-V.E-Se 3者混合投与群（D群）

* 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

とした．そしてコントロール群には飼料Aをそのまま与え，他の群の飼料はそれぞれつぎのような処方で調整し，いずれも自由に摂取させた．

A群：飼料AにMeHgをHgとして30 ppmの割合で添加した．　B群：A群の飼料にさらにV.Eを100mg/kgの割合で添加した．　C群：A群の飼料にSeをNa_2SeO_3として2 ppmの割合で添加した．　D群：A群の飼料にV.Eを100 mg/kgおよびSeをNa_2SeO_3として2 ppmの割合でそれぞれ添加した．

上記の処方の飼料を用い，飲料水は水道水を自由に与えてラットを飼育し，その体重および餌の摂取量は2日ごとに測定した．そしてラットの体重が減少し，メチル水銀中毒の症状である歩行異常および後脚の交叉が明らかに認められた時点で断首放血によって屠殺し，脳，肝臓ならびに腎臓についてMeHgと総水銀（以下T-Hgと略す）の蓄積量をそれぞれ測定した．

MeHgおよびT-Hgの定量法：各臓器をそれぞれホモジナイズして均一化し，MeHgは0.2 g，T-Hgは0.1 gを試料とした．MeHgの定量は，前報と同様に植田[8]らが報告しているアルカリ分解クロロホルム抽出法に従って試験溶液を調製し，ECDガスクロマトグラフィーによって行なった．またT-Hgについては A.O.A.C.[9]に示された水銀測定用分解装置を用い，硫硝酸による湿式灰化法で調製した試験溶液について還元気化法[10]により，島津UV-201型水銀分析計を用いて定量を行なった．

実験結果

体重曲線およびMeHgの摂取量：各群のラットの平均体重によって得た体重曲線をFig. 1に示した．これによるとA群は投与後ほぼ15日目から体重の減少がみられているが，B，C群はともにA群より約2週間後の28日目から，またD群はさらに遅れて50日目前後から体重の減少が認められた．しかしながら，このうちのB群とC群を比較すると体重の増加率に大きな差がみられ，同じ体重から投与を開始して28日目の両者の平均体重は，それぞれ192 gと231 gで，約40 gのひらきが生じている．また，メチル水銀の中毒症状は，各群とも体重が減少しはじめてから約10日後に観察された．つぎに餌の摂取量からMeHgの摂取量を算出し，各群それぞれ一匹あたりの累積平均摂取量としてFig. 2に示した．ここにみられるように水銀中毒症状を呈するに要したMeHg量は，A群は約9 mgであったが，C群では約2倍の16 mgで，前報と全く同様な結果を示した．またB群は約13mgで発症し，C群と比較的近い値であったが，D群

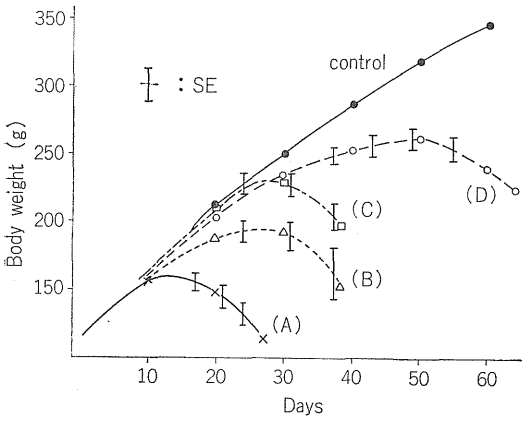


Fig. 1 Weight Gains of Rats fed Diets containing either no Mercury or 30 ppm Methylmercury with either no Supplements, Vitamin E, Selenium or Vitamin E and Selenium. (mean of 5 Rats)
(A)：30 ppm CH_3HgCl
(B)：30 ppm CH_3HgCl+100 ppm V.E
(C)：30 ppm CH_3HgCl+2 ppm Se
(D)：30 ppm CH_3HgCl+100 ppm V.E+2ppm Se

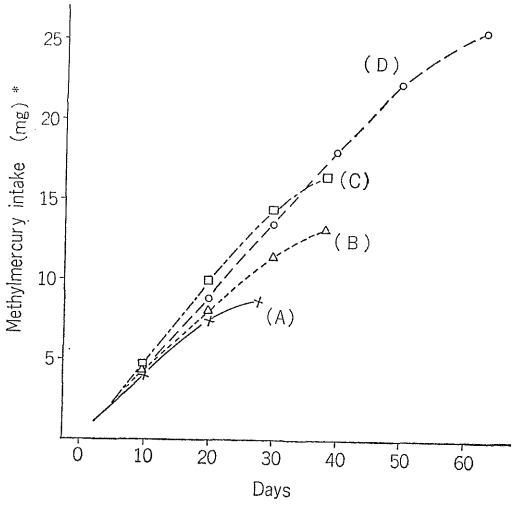


Fig. 2 Cumulative Amount of Methylmercury intake of Rats fed Diets containing 30 ppm Methylmercury with either no Supplements, Vitamin E, Selenium or Vitamin E and Selenium. (mean of 5 Rats)
*：amount of methylmercury per rat
(A)：30 ppm CH_3HgCl
(B)：30 ppm CH_3HgCl+100 ppm V.E
(C)：30 ppm CH_3HgCl+2 ppm Se
(D)：30 ppm CH_3HgCl+100 ppm V.E+2 ppm Se

Table 1 Concentrations of Methylmercury and Total Mercury in Organs of Rats fed Diets containing Methylmercury, Vitamin E and Selenium

			Methylmercury (ppm as CH_3HgCl)			Total Mercury (ppm as Hg)		
Group	Treatment	N	Brain	Liver	Kidney	Brain	Liver	Kidney
A	CH_3HgCl	5	23.6±0.59*	76.8±2.50	102.6±17.61	22.0±0.33	68.3±1.57	93.3±6.54
B	CH_3HgCl +V.E	5	26.4±1.38	94.9±6.75	90.3±4.12	25.4±1.70	90.8±5.52	93.6±4.48
C	CH_3HgCl +Se	5	28.6±3.27	86.9±7.90	92.9±5.93	30.7±3.55	92.2±4.53	114.4±3.96
D	CH_3HgCl +V.E+Se	5	42.7±3.80	155.2±17.34	87.6±8.43	40.5±2.90	136.4±11.59	113.9±9.69

*: The results are expressed as mean ± SE

は26mgを要し，A群の3倍，B群の2倍であった．

MeHg および T-Hg の蓄積量：各群の脳，肝臓および腎臓中の MeHg と T-Hg の平均蓄積濃度を Table 1に示した．なおコントロール群は各臓器とも T-Hg 含有量が 0.05ppm 以下であったため記載していない．この表から脳と肝臓は一部にわずかの例外はあるが，MeHg, T-Hg のいずれも MeHg 摂取量の増加に従って蓄積濃度の高まることがわかる．しかし腎臓はこれらと異なり，MeHg と T-Hg の蓄積パターンが相違している．すなわち MeHg の場合は摂取量が増加しても蓄積濃度はほとんど変化せず，むしろ若干の減少が認められた．一方 T-Hg の場合には，Se を投与しない A 群とB群がほぼ等しい蓄積濃度を，また Se を投与したC群とD群が等しい蓄積濃度をそれぞれ示しており，これらA，B両群に比してC，D両群はかなり高い値を示している．しかしながら MeHg の摂取量は各群それぞれ異なっているため，臓器への取り込み量を比較する場合に，このままの値では適当ではない．そこで各群の各臓器について，摂取量に対する蓄積量の比を求め Table 2 に示した．この表から，まず肝臓についてみると，Me Hg はA，B，C群いずれもほとんど同じ値を示し，D群のみが若干低値であるのに対して T-Hg は，A＜B＜Cと増加し，D群はやはりA群を下廻っている．これに反して脳，腎臓においては MeHg, T-Hg ともにA＞B＞C＞Dの順で減少の傾向を示し，このうち特にD群の腎臓に急激な減少がみられた．そこでさらにこのD群の腎臓における蓄積の減少を別の角度から確認するため，各群それぞれ同一ラットの臓器間における蓄積濃度の比を求めて比較することとし，脳の蓄積濃度を基準として，これに対する肝臓および腎臓の蓄積濃度の比を算出し，Table 3 に示した．この表から，やはりD群の腎臓は MeHg および T-Hg のいずれも他と異なって著しく低い値を示した．

つぎに各臓器における MeHg の T-Hg に対する比を百分率で求め Table 4 に示した．ここにみられるように，A群では各臓器とも T-Hg 中85%以上の MeHg が存在しており，このうちでも肝臓は約90%の値を示している．しかしA群以外のグループは，いずれも84%以下で，かつ同一グループ内の脳と肝臓はほぼ等しい値を示し，腎臓のみが低い値であることがわかる．特にC群

Table 2 Ratio (%) of Concentrations of Methylmercury and Total Mercury in Organs to Methylmercury Intake

			Methylmercury			Total Mercury		
Group	Treatment	N	Brain	Liver	Kidney	Brain	Liver	Kidney
A	CH_3HgCl	5	0.33*	3.55	2.41	0.39	3.95	2.76
B	CH_3HgCl+V.E	5	0.28	3.51	1.89	0.34	4.26	2.46
C	CH_3HgCl+Se	5	0.24	3.50	1.51	0.32	4.72	2.33
D	CH_3HgCl+V.E+Se	5	0.20	3.03	0.81	0.24	3.63	1.33

*: $\%=\frac{\text{concentration}\times\text{organ weight}}{\text{methylmercury intake}}$

Table 3 Ratio of the Mercury Concentration of Liver and Kidney to that of Brain in each Group

Group	Treatment	N	Methylmercury		Total Mercury	
			Liver／Brain	Kidney／Brain	Liver／Brain	Kidney／Brain
A	CH_3HgCl	5	3.25±0.05[a]	4.35±0.27	3.10±0.05	4.24±0.28
B	CH_3HgCl+V.E	5	3.59±0.28	3.42±0.28	3.57±0.30	3.69±0.25
C	CH_3HgCl+Se	5	3.04±0.19	3.25±0.30	3.00±0.26	3.73±0.48
D	CH_3HgCl+V.E+Se	5	3.63±0.21	2.05±0.26*	3.37±0.13	2.81±0.22*

a : The results are expressed as mean ± SE
* : Significant differences from A group ($p<0.05$)

Table 4 Ratio (%) of Concentration of Methylmercury (as Hg) to that of Total Mercury in each Organ

Group	Treatment	N	Brain	Liver	Kidney
A	CH_3HgCl	5	85.26±1.09*	90.04±1.62	86.74±1.47
B	CH_3HgCl+V.E	5	82.94±1.35	82.74±1.24	77.16±3.64
C	CH_3HgCl+Se	5	74.84±5.09	74.34±4.04	64.28±2.15[a]
D	CH_3HgCl+V.E+Se	5	83.42±4.08	82.50±3.36	60.96±3.07[a,b]

* : The results are expressed as mean ± SE
a : Significant differences from A or B group within vertical column ($p<0.05$)
b : Significant differences from liver or brain within horizontal column ($p<0.05$)

とD群の腎臓は，それぞれ約64%および61%で，A，B両群の腎臓に対し $p<0.05$ において明らかに有意の差を示し，このうちさらにD群の腎臓は同一グループの脳，肝臓に対しても有意の差を示した．

考　察

今回の実験においてMeHgおよびSeの投与量は，前回の実験と同様MeHg, 30ppm, Se, 2ppmとした．またV.Eについては，加須屋[7]の行なったin vitroの実験でMeHgと等モルのV.Eを用いて効果のあったことが報告されており，われわれはその約2倍量を用いることとし，V.Eを100ppmすなわち100mg/kg添加した．一般に *dl*-α-トコフェロールには，その骨格中6位がOH基であるfreeタイプと，このOH基がacetyl化されたacetateタイプとがあり，この両者の大きな差異として前者が空気中で酸化されやすく，強い抗酸化性を有するのに対し，後者は空気中でも安定で，ほとんど抗酸化性を持たないことがあげられる，さらにfreeタイプは生体内においても抗酸化性を示し，ミトコンドリアやリソゾーム膜の不飽和脂質が過酸化されることを防止し，膜安定性を有することが知られている．[11] そのため水銀毒性の軽減作用にも両者間に相違のあることが考えられたので，今回の実験でわれわれはV.Eとしてこれら両者を用い，MeHg投与ラットにおける体重曲線あるいは，各臓器中のMeHgおよびT-Hg分布量等におよぼす影響を比較したが，両者間にはほとんど差異が認められなかった．そこで今回は，報告する内容の繁雑化を避けるため，あえてacetateタイプについてのみ述べることとした．

今回の実験で，体重曲線あるいは水銀中毒症状の発現時期等においてV.EはSeと類似のパターンを示し，両者の水銀毒性軽減作用は一見同じように考えられるが，体重の増加率およびT-Hgの腎臓における蓄積量などに明らかな差のみられたことから，軽減作用のメカニズムに相違のあることが推定される．この作用機序に関してGanther ら[3]はSeがHgと結合し，さらに親和性の高いProteinのSと結合することによってHgの毒性を弱めると論じており，またStillings[12]はラットを用いた実験でCystineにもSeと同様，水銀の毒性に対する軽減作用を有することを認め，CystineのSがProteinのSと同じようにHgとcomplexを生ずるためであろうと述べている．しかしV.Eはその分子構造からみて直接Hgとcomplexを形成することは考えられず，この点においてCystineあるいはSeと同一には論じられない．一方，加須屋[5,7,13]はin vitroにおいて幼若ラットの小脳を用いた実験を行ない，MeHgによって発育を阻害される神経線維がSeを混合するこ

とによってほぼ正常に発育することを認め，さらにV.Eも全く同様の作用を有すると報告し，これらはいずれも生体膜安定作用によるものであろうと述べている．勿論この共通した作用は生体内にあっても否定できないが，やはりGanther[9]，Stillings[12]の報告あるいは今回の実験結果からみて，当然両者間に異なる作用のあることが考えられる．さらにV.EとSeの両者を混合してMeHgとともに投与した場合，予想どおりV.EあるいはSeをそれぞれ単独でMeHgに添加した場合の約2倍程度水銀の毒性発現時期が延長された．このことは当然V.EとSeの相加的効果と考えられるが，Desai[14]らはV.EとSeとの間には相互作用が存在するため，この両者は血中で相互に長時間保留されることを報告している．このことからV.E，Seの混合投与によってみられた毒性の大きな軽減作用は，単なる相加的な作用のみではなく，V.Eが排泄速度の大きいSeを血中に保留させることにより，Seの有するMeHg毒性への作用を長時間持続させることも一つの因子と推定される．

つぎにMeHgおよびT-Hgの測定を行なうため臓器を採取したが，前回の実験で臓器中のMeHg分布量は屠殺時期によって異なり，中毒の発症前と発症後では，特に腎臓中のMeHgの蓄積量に大きな変化のあることが認められた．したがって，発症の時期が異なるグループ間の臓器について比較を行なう場合は屠殺の時期に十分注意しなければならない．そこで今回は，各群のラットそれぞれに歩行異常，後脚の交叉が明らかに認められ，かつその外見的な所見もできるだけ統一した時点で臓器の採取を行なった．脳，肝臓におけるMeHgおよびT-Hgの蓄積量はMeHg単独投与よりSe混合投与の方が大きい値を示し，またV.E混合投与もSe混合と同様に単独より高い．Stoewsand[4]らはSe投与によってHg蓄積量の増加することについて報告し，また上田ら[15]はMeHgの摂取量の増加によって脳，肝臓中の蓄積量も増加することを報告している．そして今回のV.EあるいはSe混合は単独に比較してMeHg摂取量が多いことから，このような結果が得られたと考えられる．一方腎臓は脳，肝臓とは蓄積性が全く異なり，MeHgの場合はSeの摂取あるいはMeHg摂取量の増加に影響されず，ほとんど等しい蓄積量を示している．しかしT-Hgの場合はMeHgの摂取量には関係ないが，Seの摂取如何によって異なっている．すなわちSeを投与しないMeHg単独とV.E混合との間には蓄積量に差がなく，またSe混合とV.E，Se混合との間にも差がみられていない．しかしながら前の2群に比較して後の2群は明らかに蓄積量が多く，約20%の差が生じている．Norseth,[16] Takeda[17]らは生体中の無機水銀は腎臓に蓄積しやすいことを指摘しているが，この腎臓における20%の差が無機水銀によるものであるとすれば，Seの摂取が生体中の無機水銀量を増加させたことの裏づけになるといえる。そしてV.E混合投与群はSe混合投与群とほぼ同量のMeHgを摂取して同程度の軽減作用を示しているにもかかわらず，T-Hgの蓄積量がSe混合より低く，MeHg単独と全く同じであることは，前述したとおり毒性軽減作用のメカニズムはV.EとSeでは異なるものと考えられる．また各ラットごとに同一個体における脳，肝臓および腎臓の水銀蓄積濃度を比較すると，MeHgもT-HgもともにMeHg単独群，V.E混合群およびSe混合群の3グループは脳<肝臓<腎臓の順に高くなるが，投与期間の長いV.E Se混合群は脳<腎臓<肝臓と肝臓と腎臓が逆転している．前回の実験ではMeHgのみの測定ではあったが，やはり投与開始後43日付近で肝臓と腎臓の蓄積量に逆転が観察された．田口[18]によれば，生体に摂取された有機水銀は蓄積する一方ではなく，必ず分解，解毒され排泄されており，したがって連日長期間の暴露を受けた時でも，体内には一定の蓄積限界があり，それ以上蓄積は認められず平衡状態に達すると述べている．そして当然同一生体内においても，各臓器にそれぞれ異なる蓄積限界のあることが推定され，さらにまた水銀の取り込み速度にも臓器間に差のあることが知られている．[19] 事実，同一ラットの脳に対する肝臓，腎臓の蓄積濃度比はMeHg，T-Hgのいずれも腎臓において，投与期間の増加とともに減少し，またMeHg摂取量に対する蓄積量の比も腎臓は特異的である．このことは脳，肝臓，腎臓の3者間で最も水銀の取り込み速度の大きいものは腎臓であり，比較的すみやかに蓄積限界に達するものと考えられる．さらに腎臓は他の臓器と異なり，無機水銀を蓄積しやすいことがNorseth[16]，武田[19]，田口[18]らによって報告されていることは前にも述べた．生体におけるMeHgの一部は脱メチル化されて，MeHgとともに各臓器に蓄積されるが，その量的関係をみる指標としたMeHg/T-Hg%は，腎臓を除いた脳，肝臓では，各群それぞれ同一グループ内において等しい値を示し，さらに各群を比較しても有意の差はみられていない．しかし腎臓はこれらと異なり，Seを摂取したSe混合，V.E，Se混合の両群はそれぞれ他の群に対して明らかに小さい値であり，有意の差を示している．その原因として，Se摂取群におけるT-Hg蓄積量の増加があげられ，腎臓におけるT-Hgのうち MeHg以外はほとんど無機水銀であることも考えられる．そしてこのことは生体内におけ

る MeHg の無機化が Se によって促進されていることを裏づけている．しかし腎臓中の T-Hg 蓄積量の増加が無機水銀によるとしても，Takeda ら[17]が述べているように，結果として腎臓に蓄積したのであって，MeHg の無機化が腎臓によってなされるものか，あるいは他の器管でなされているかは不明であり，今後の検討を待ちたい．また，長期間生存した群に T-Hg が多い傾向もみられたため，短期間で発症しない程度に少量の MeHg を長期間投与した場合の蓄積量等についても今後検討する予定である．

要　結

今回の実験目的は Se による水銀の毒性軽減作用のメカニズムを解明する手段として，やはり水銀の毒性軽減作用を有すると報告されている V.E について検討し，両者を比較することである．すなわち MeHg を Hg として 30 ppm 添加した精製粉末飼料に V.E あるいは Se をそれぞれ 100ppm，2ppm の割合で添加し，この飼料でラットを飼育して，体重の消長，水銀中毒の発現時期を観察し，また中毒症状が明らかに認められた時点における脳，肝臓，腎臓中の MeHg および T-Hg 蓄積量を測定した．そして V.E は Se と同様に水銀の毒性軽減作用を有することが認められたが，体重の増加率あるいは T-Hg の分布量等において両者間に明らかな差がみられたことから，両者の作用機序は異なるものと考えられる．また V.E と Se を混合して添加した場合は，V.E，Se をそれぞれ単独で添加した場合より強い軽減作用が認められたが，これは単なる相加的効果のみではなく，V.E が水銀に対する Se の効果を助長していることも十分考えられる．また各臓器の MeHg と T-Hg の蓄積量についてみると，脳，肝臓は MeHg 摂取量の増加によって MeHg，T-Hg 蓄積量がともに増加するが，腎臓では MeHg 摂取量が増加しても MeHg 蓄積量は影響されず，ほぼ一定であることから，MeHg の取り込み速度は腎臓がもっとも大きいことがわかった．また腎臓の T-Hg 蓄積量は Se の存在に影響され，Se 摂取の有無によって約20%の差が生じたが，このことは生体中の MeHg が Se によって脱メチル化の促進されることを示唆している．今回の実験で V.E は Se と同様の軽減作用を示したが，生体内で Hg と complex を生成するといわれている Se と異なり，V.E は直接的に Hg に作用せず，膜安定作用等，間接的な働きによるものと考えられる．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「セレンによるメチル水銀の毒性軽減作用に関する研究」として実施したものである）

文　献

1) Parizek, J. and Ostadalova, I.: *Experientia*, 23, 142, 1967
2) Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y.: *Res. Communicat. Chem. Path. Pharmacol.*, 5, 673, 1973
3) Ganther, H. E., *et al.*: *Science*, 175, 1122, 1972
4) Stoewsand, G. S., Bache, C. A. and Lisk, D. J.: *Bull. Environ. Contaminat. Toxicol.*, 11, 152, 1974
5) 加須屋実：医学のあゆみ，90，211，1974
6) 鈴木助治，天川映子，山野辺秀夫，雨宮敬，伊藤弘一，竹内正博，江波戸挙秀，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，26，115，1975
7) 加須屋実：医学のあゆみ，90，33，1974
8) 植田忠彦，山添律子，山野辺秀夫，戸谷哲也：東京衛研年報，26，110，1975
9) A.O.A.C., 418, 1970
10) 日本薬学会編：衛生試験法注解，303，1973　東京金原出版
11) 日本公定書協会編：第8改正　日本薬局方第一部解説書，C—1189，1971　広川書店
12) Stillings, B. R., Lagally, H., Bauersfeld, P. and Soares, J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243, 1974
13) 加須屋実：産業医学，16，224，1974
14) Desai, I. D. and Scott, M. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 110, 309, 1965
15) 上田喜一，山中すみへ，河合正計，東条憲一：医学と生物学，90，15，1975
16) Norseth, T.: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 31, 138, 1972
17) Takeda, Y. and Ukita, T.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17, 181, 1970
18) 田口良雄：日衛誌，25，563，1971
19) 武田　寧：衛生化学，14，178，1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 129—133, 1975

東京都における水銀汚染の実態について（第2報）

魚介類中の水銀含有量について

雨宮 敬* 竹内正博* 伊藤弘一*
江波戸挙秀* 原田裕文* 戸谷哲也*

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (2)

Mercury Content of Fish and Shellfish

TAKASHI AMEMIYA*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KOICHI ITO*,
KIYOHIDE EBATO*, HIROFUMI HARADA* and TETSUYA TOTANI*

The content of total mercury and methylmercury in 405 samples of fish and shellfish collected from Tokyo central market were determined for the purpose of investigating pollution with them.

The results were summarized as follows:

In this research, deep-sea fishes had more amount of mercury than fishes of continental shelf.

The heighest amount of 2.60ppm of total mercury and that of 0.60ppm of methylmercury in Kurokawakajiki were found, but most of sample contained less than 0.10ppm of total mercury.

緒　言

水銀，カドミウムなどの有害性金属元素による食品汚染が魚介類，農作物等へ広範囲におよんだことは周知のとおりである．

われわれは，魚介類中の総水銀（以下 T-Hg）量およびメチル水銀（以下 Me-Hg）量を把握するため，すでに昭和48年6月から49年3月までの10ヵ月間に63種346検体について調査を行ない，前報[1]において報告した．

さらに今回は前年に引き続き，昭和49年4月から50年3月までの1年間に魚介類74種405検体について調査を行なったので報告する．

実験方法

試薬，装置および試料

1) 試薬

和光純薬K.K.の試薬特級を用い，硫酸および硝酸は精密分析用を使用した．

水銀標準溶液：塩化第二水銀（$HgCl_2$）0.135 g を少量のエタノールに溶解したのち 1N硝酸で 100m*l* とする．この液は Hg として 1 m*l* 中に 1,000 μg を含有し，これを標準原液とする．この液をさらに 0.5N 硝酸で希釈して 1 m*l* 中 0.1μg の Hg を含有する液を調製し，標準溶液とする．なお標準溶液は使用のつど調製する．

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 g をベンゼンに溶解して 100m*l* とし，標準原液とする．塩化メチル水銀標準原液 1 m*l* 中にメチル水銀 1,000μg を含有する．この原液をベンゼンで希釈し，1 m*l* 中 0.1 μg を含有する液を調製し標準溶液とする．

20%塩化第一スズ溶液：塩化第一スズ20 g に 0.5N 硫酸を加えて溶解し，100m*l* とする．この溶液は用時調製する．

20%塩酸ヒドロキシルアミン溶液：塩酸ヒドロキシルアミン20 g を水に溶解して 100m*l* 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 112.2 g を水 100 m*l* に溶解し，エタノールを加えて 1,000m*l* とする．

1 %L—システイン溶液：L—システイン塩酸塩（$HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$）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 12.5 g を水に溶解して 100m*l* とする．この溶液は用時調製する．

* 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

2) 装置

島津水銀分析計 UV-201 型

島津ガスクロマトグラフ GC-5AP$_3$EF 型 (^{3}H 線源使用 ECD 付)

3) 試料

昭和49年4月から50年3月までの1年間に東京築地市場に搬入された魚介類のうちから74種405検体をえらんだ.

試験操作

試料の調製

今回行なった試料の調製および測定は,厚生省通達[2]によった.

1) 小魚類 (体長 20cm 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30gずつをとって混和した約300gをもって1検体とする. 1匹の可食部が30g未満の小魚類にあっては,可食部の総量が約300gに相当する匹数をもって1検体とする. 貝類,たらこ,すじこ等は小魚類に準じる.

2) 中魚類 (体長約 20cm 以上 60cm 未満のもの)

無作為に5匹選び,それぞれの可食部から約60gずつをとって混和し,その約300gをもって1検体とする.

3) 大魚類 (体長約 60cm 以上のもの)

無作為に3匹選び,それぞれの可食部から約100gずつをとって混和し,その約300gをもって1検体とする.

試験溶液の調製

総水銀

均一にした試料5.0gを500ml分解フラスコにとり,硫酸 10ml および硝酸 20ml を加え,還流冷却器をつけておだやかに30分間加熱する. 放冷後,過マンガン酸カリウム1g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,冷後再び過マンガン酸カリウム2gを加えて加熱する. この操作を過マンカン酸カリウムの紫色が消失しなくなるまで繰り返す. 冷後過マンガン酸カリウムの紫色が消失するまで20%塩酸ヒドロキシルアミン溶液を加える. 水を加えて全量を 100.0ml とし,これを総水銀の試験溶液とする.

メチル水銀

均一にした試料10.0gをブレンダーカップにとり,水 55ml のうち適量を加えて3分間ホモジナイズし,この内容物を 300ml 分液ロートに移し,さらに残りの水を用いて洗いこむ. つぎに濃塩酸 14ml, 塩化ナトリウム 10gを加えて振り混ぜたのち, ベンゼン 70ml を加え,振とう機で5分間振とう抽出する. 内容物を 250ml 遠心分離管に移し,2,000rpm で10分間遠心分離する. ベンゼン層 50ml を分液ロートにとり,システイン溶液6ml を加えて振とう機で再び2分間振とう抽出する. 10分間静置後 35ml の遠心分離管に移し,3,000rpm で20分間遠心分離する. 水層2mlを 100ml 分液ロートにとり, 6N塩酸 1.2ml, ベンゼン 4.0ml を加えて2分間振とう機で振とうする. 10分間静置後,水層をすて無水硫酸ナトリウム少量を加え脱水してメチル水銀の試験溶液とする. しかし,ベンゼン抽出およびシステイン抽出時に強固なエマルジョン形成のため分析が困難となった試料の場合は,FDA法を若干改良した方法を用いた.[3] すなわち均一にした試料5.0gに2N水酸化カリウム・エタノール溶液 10ml を加え,還流冷却器をつけ,沸騰水浴上で30分間試料を分解する. 冷後1N塩酸 20ml で中和し, 1%硫酸銅溶液 5ml, 濃塩酸 5ml を加えて塩酸酸性とした後, クロロホルム 30ml ずつを用いて3回抽出を行なう. 以下前述のシステイン抽出以後の操作を準用する.

定量操作

総水銀

試験溶液 20ml をとり還元剤として20%塩化第一スズ溶液 2.5ml を用いて還元気化法によりフレームレス原子吸光分析を行なう. 水銀標準溶液を0.05μgから0.2μgまでの範囲でとり,検量線を作成して試料中の含有量を求める.

メチル水銀

試験溶液 5μl をとり, ガスクロマトグラフィーを行なってピーク高を測定し,別に塩化メチル水銀標準溶液をベンゼンで希釈して, 0.01ppm から 0.1ppm までの範囲で検量線を作成して試料中の含有量を求める.

測定条件は次のとおりである.

カラム: 10% DEGS on Chromosorb W (AW-DMCS) 80-120 mesh, glass column, 3mmϕ×1.5m

温度: カラム—160°, 注入口—180°, 検出器—200°

キャリアーガス: N_2 70ml/min

検出器: ^{3}H (300mci)

結果および考察

前述の方法に従って測定した結果を Table 1 に示す.

今回の調査に用いた試料のうちサメ, マグロ, マカジキ, メカジキ, シロカワカジキおよびクロカワカジキは切身で搬入された.

今回調査したすべての試料から水銀が検出された.

総水銀においては, クロカワカジキの 2.60ppm が今回の調査の最高値であった. これについでサメ1.45ppm マカジキ 1.10ppm, シロカワカジキ 0.57ppm, メカジキ 0.55ppm, マグロ 0.54ppm であった. これらは他の

Table 1 Mercury content of muscle in fishes and shellfishes

Sample Name	N	T-Hg (ppm)		MeHg (ppm)		MeHg/T-Hg(%)	
		Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
1. Aji (Horse-mackerel)	24	0.02—0.08	0.05	0.01—0.06	0.04	50.0—100	70.0
2. Ayu (Sweetfish)	1	0.04		0.03		75.0	
3. Anago (Conger eel)	9	0.04—0.13	0.08	0.02—0.10	0.06	50.0—83.3	71.1
4. Anko (Angler)	1	0.25		0.18		72.0	
5. Ara	2	0.15—0.21	0.18	0.09—0.11	0.10	52.4—60.0	56.2
6. Akaamadai	1	0.50		0.40		80.0	
7. Ainame	2	0.08—0.14	0.11	0.04—0.12	0.08	50.0—85.7	67.9
8. Isaki	10	0.04—0.11	0.08	0.03—0.08	0.05	71.0—88.9	75.0
9. Iwashi (Sardine)	20	0.01—0.04	0.02	0.01—0.02	0.01	33.3—100	60.0
10. Inada	5	0.04—0.11	0.07	0.02—0.10	0.06	50.0—90.9	75.8
11. Ishimochi	4	0.08—0.11	0.10	0.05—0.09	0.07	63.0—100	74.6
12. Unagi (Eel)	3	0.04—0.06	0.05	0.02—0.03	0.03	33.3—60.0	47.8
13. Kawahagi	3	0.03—0.07	0.04	0.03—0.07	0.03	75.0—100	91.7
14. Kanpachi	1	0.05		0.04		80.0	
15. Kasugo	2	0.03—0.04	0.04	0.02		50.0—66.7	58.4
16. Karei (Flatfish)	9	0.03—0.07	0.05	0.02—0.05	0.04	75.0—100	86.0
17. Katsuo (Bonito)	5	0.14—0.28	0.21	0.10—0.22	0.16	70.0—78.6	73.6
18. Kamasu (Barracuda)	9	0.04—0.13	0.08	0.02—0.10	0.06	50.0—100	75.0
19. Kisu (Sillago)	3	0.04—0.07	0.05	0.03—0.06	0.04	75.0—85.7	80.2
20. Kichiji	1	0.14		0.13		92.9	
21. Kinmedai	2	0.23—0.61	0.42	0.20—0.56	0.38	87.0—91.8	89.4
22. Konoshiro	7	0.01—0.07	0.04	0.01—0.06	0.03	33.3—100	56.8
23. Koi (Carp)	2	0.02		0.01		50.0	
24. Sake (Salmon)	3	0.02—0.03	0.03	0.02—0.03	0.02	66.7—100	88.9
25. Saba (Mackerel)	37	0.05—0.15	0.09	0.04—0.13	0.06	66.7—100	80.0
26. Same (Shark)	3	0.33—1.45	0.96	0.32—1.32	0.91	91.0—98.2	95.7
27. Sawara	4	0.02—0.03	0.03	0.01—0.04	0.02	50.0—100	70.9
28. Sayori (Halfbeak)	4	0.02—0.03	0.03	0.01—0.02	0.02	50.0—100	70.8
29. Shiroamadai	1	0.12		0.11		91.7	
30. Shiira (Dorado)	3	0.04—0.27	0.17	0.02—0.23	0.15	50.0—100	76.7
31. Shirokawakajiki	1	0.57		0.26		45.6	
32. Suzuki (Bass)	24	0.18—0.76	0.42	0.12—0.51	0.30	51.3—90.5	75.0
33. Surumeika (Cuttlefish)	27	0.01—0.13	0.05	0.01—0.05	0.03	20.0—100	60.0
34. Suketodara	8	0.03—0.04	0.04	0.03		66.7—100	80.0
35. Fukko (Young Bass)	20	0.09—0.90	0.27	0.08—0.56	0.20	56.7—100	74.0
36. Sodagatsuo	4	0.08—0.28	0.18	0.05—0.20	0.13	62.5—100	86.0
37. Tachiuo (Hair-tail)	2	0.07—0.09	0.08	0.05—0.06	0.06	66.7—71.4	69.1
38. Takabe	1	0.07		0.06		85.7	
39. Tobiuo (Flying-fish)	9	0.04—0.09	0.06	0.02—0.03	0·03	33.3—100	61.5

Sample Name	N	T-Hg (ppm)		MeHg (ppm)		MeHg/T-Hg(%)	
		Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
40. Dojo (Loack)	2	0.05—0.06	0.06	0.05		83.3—100	91.7
41. Nishin (Herring)	5	0.03—0.06	0.04	0.01—0.05	0.03	33.3—100	65.0
42. Hamachi	2	0.08—0.11	0.10	0.06—0.10	0.08	75.0—90.9	83.0
43. Hatahata	6	0.07—0.09	0.08	0.05—0.08	0.06	71.4—100	82.3
44. Hamo (Sea-eel)	6	0.06—0.09	0.08	0.06—0.09	0.07	75.0—100	88.0
45. Higedara	4	0.10—0.15	0.13	0.09—0.13	0.11	69.0—100	83.4
46. Hirame (Flounder)	5	0.04—0.08	0.06	0.03—0.06	0.05	75.0—100	86.0
47. Buri (Yellow tail)	2	0.11—0.14	0.13	0.11—0.12	0.12	85.7—100	92.9
48. Bora (Gray mullet)	2	0.01—0.03	0.02	0.01		33.3—100	66.7
49. Hobo	13	0.05—0.49	0.15	0.05—0.41	0.13	62.5—100	86.9
50. Hokke	6	0.05—0.14	0.08	0.03—0.11	0.06	60.0—87.5	78.6
51. Masu (Trout)	3	0.09—0.11	0.10	0.08—0.11	0.09	88.9—100	92.3
52. Madai (Sea bream)	7	0.02—0.38	0.13	0.02—0.26	0.09	68.4—100	80.0
53. Managatsuo	3	0.04—0.06	0.05	0.03—0.05	0.04	75.0—100	86.0
54. Maguro (Tuna)	1	0.54		0.51		94.4	
55. Mutsu	3	0.25—0.62	0.49	0.23—0.50	0.38	83.3—92.0	87.6
56. Medai	2	0.29—0.38	0.34	0.23—0.38	0.31	79.3—100	89.7
57. Menuke	2	0.57—0.63	0.60	0.48—0.60	0.54	84.2—95.2	89.7
58. Mebaru	4	0.03—0.08	0.05	0.02—0.06	0.04	66.7—80.0	72.5
59. Wakashi	1	0.02		0.02		100	
60. Sanma (Mackerel pike)	9	0.07—0.09	0.08	0.02—0.09	0.06	28.6—100	85.7
61. Kurokawakajiki	1	2.60		0.60		23.1	
62. Mekajiki	1	0.55		0.52		94.6	
63. Makajiki	1	1.10		0.98		89.1	
64. Tako (Octopus)	1	0.03		0.01		33.3	
65. Kani (Crab)	3	0.06—0.09	0.07	0.05—0.08	0.06	83.3—88.9	85.2
66. Sazae (Turbo)	1	0.03		0.01		33.3	
67. Awabi (Ear shell)	1	0.01		0.01		100	
68. Uni (Sea urchin)	1	0.01		0.01		100	
69. Akagai (Ark shell)	2	0.03—0.04	0.04	0.02		50.0—66.7	58.4
70. Kaki (Oyster)	3	0.01—0.03	0.02	0.01—0.02	0.02	66.7—100	89.0
71. Namako (Sea cucumber)	4	0.01		0.01		100	
72. Ebi (Lobster)	2	0.04—0.06	0.05	0.03—0.06	0.05	75.0—100	87.5
73. Asari	1	0.02		0.01		50.0	
74. Hamaguri (Clam)	4	0.02—0.41	0.16	0.01			

N : number of samples

魚類に比して体長および体重が大であり，中魚類，小魚類を食し，とくにメカジキは水銀含有量の多いメヌケ等を餌とすることもあり，そのため食物連鎖による高濃度の水銀を検出したものと思われる．

ついで高値を示したものはメヌケ，アカアマダイ，ムツ，キンメダイ，スズキ，フッコである．

前年度において総水銀で 1.10ppm という高値を示したメヌケは暫定基準の対象からはずされてはいるが，今回の調査でもその値を越えていた．メヌケを2検体測定したところ0.57ppm，0.63ppm，平均値0.60ppm であった．

アカアマダイについては1検体測定したところ 0.50 ppm であった．

スズキ，フッコはそれぞれ24，20検体について測定を行なった．平均値で 0.42ppm，0.27ppm であった．

ムツ，キンメダイも前回と同様高値を示し，0.49ppm，0.42ppm であった．

メヌケ，アカアマダイ，ムツ，キンメダイは深海性の魚類であり，今回もその含有量において高値を示した．

その他の中魚および小魚類では，殆んどが 0.10ppm 前後であった．

今回調査した74種の魚類の総水銀における平均値を0.10ppm ずつの範囲で5クラスに分類した．それによると0—0.10ppm のクラスでは，48種で全体の65%を占めた．殆んどの小魚，中魚類，タコ，イカ，カキ等の貝類はこのクラスに分類された．

0.1—0.2ppm の範囲に分類されたものは11種で全体の15%であった．

0.2—0.3ppm および 0.3—0.4 ppm のクラスに入るものはそれぞれ3種，1種で全体の4%，1%であった．

0.4ppm をこえるものはカジキ類をはじめとして11種であり，全体の15%を占めていた．

メチル水銀においても，カジキ類，サメ，マグロおよび前述のメヌケ，ムツ等の深海性魚類の含有量が高値であった．しかしクロカワカジキの含有量は総水銀に比して著しく低値で，2.60 ppm に対して 0.60 ppm であった．その結果は西垣らのそれと近似していた.[4]

中魚および小魚類は総水銀と同様低値であった．

また，総水銀量に対するメチル水銀量の比率は，一部を除いて80%前後に集中していた．

昭和50年度（4月以後）においても魚介類中の水銀含有量調査を継続して行なっているが，科別間の含有量の考察を実施すると有意義な結果が得られると思われる．しかし今回は科別間試料数のかたよりが大きかったので，行なわなかった．

要　結

1. 東京都築地市場から搬入された魚介類について，総水銀およびメチル水銀含有量を調査した．総検体数74種405検体である．総水銀の分析は，硫硝酸湿式分解の後，フレームレス原子吸光法，メチル水銀はＦＤＡ法ならびにアルカリ分解法を用いて，ガスクロマトグラフ法によって定量した．

2. 全試料より，水銀を検出したが，メヌケ，アカアマダイ，キンメダイ，ムツ，スズキ，フッコ，メダイおよびサメ，カジキ類の含有量は高値であった．その他は殆んど 0.10ppm 以下であった．

3. メチル水銀の総水銀量に対する比率は，平均で80%附近に集中していた．

4. 前回と同様に深海性魚は高値であった．

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乳肉衛生課，食品監視課ならびに市場衛生検査所の方々に深謝いたします．

文　献

1) 伊藤弘一，竹内正博，江波戸挙秀，雨宮敬，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，25，141，1974
2) 厚生省環境衛生局長通達：48衛環乳第423号昭和48年8月6日
3) 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，25，133，1974
4) 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，24，239，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 134—138, 1975

東京都における PCB 汚染の実態について（第3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 (III)

Polychlorinated Biphenyls Content of Foods

HIDEO YAMANOBE*, EIKO AMAKAWA**, SUKEJI SUZUKI*,
SEITARO KOIZUMI* and TETSUYA TOTANI*

During the period Apr., 1974 through Mar., 1975, total 218 samples of fish, shellfish, dairy product, meat and human's milk, which obtained in Tokyo, were studied of polychlorinated biphenyls (PCB).

The results obtained are summarized as follows:

1. The concentrations of PCB in fishes and shellfishes were as much as the 1973 survey. The maximum concentration of PCB in examined fish meats was recorded as 1.22 ppm of Saba (mackerel), and the mean concentration of the 7 samples of them was 0.27 ppm.
2. Dairy products and meats contained very small concentration of PCB, that tend to a decrease gradually, since the 1971 survey.
3. The concentrations of the 20 samples human's milk ranged from 0.009 ppm to 0.071 ppm with a mean of 0.029 ppm, and there were almost unchanged level since the 1971 survey.

緒　　言

環境汚染物質であるポリ塩化ビフェニール（以下ＰＣＢと略す）は，その製造および使用が禁止された今日においても，広く環境中に残留し，食品等をとおして人体にとり込まれているおそれがある．

そこで，第1報,[1] 第2報,[2] に引き続き食品，特に魚介類，乳製品，肉類，包装紙，母乳等についてＰＣＢ含有量を測定し，昭和49年度におけるＰＣＢ汚染の実態を把握することを目的として本調査を行なった．

実験方法

1） 試料

試料は，昭和49年4月から昭和50年3月までの1年間に，都内の市場および小売店で入手した．その内訳は，魚45種類86検体，貝類4種類4検体，食肉3種類32検体，乳製品4種類52検体，鶏卵20検体，包装紙4検体，母乳20検体，合計218検体である．

2） 操作および定量

操作および定量法については，第2報[2] に記述したとおりである．

結果および考察

1） 海水魚

Table 1 にその結果を示す．

海水魚42種類中32種類からＰＣＢを検出した．このうち最も高い測定値は，サバの 1.22 ppm，次いでボラの 1.02 ppm であった．平均では，ボラが 0.53 ppm と最も高く，コノシロ 0.41 ppm，サバ 0.27 ppm の順であった．今回の調査結果を第1報,[1] 第2報[2] と比較してみると，第1報[1] のように異常に高い値はなく，また第2報[2] の最高値を越えるものもなかった．すなわち，第1報[1] ではタチウオの 4.70 ppm，第2報[2] ではアナゴが 1.87 ppm を示したが，今回はサバの 1.22 ppm が最高値であった．平均値でみると第1報[1] では，魚種間の

* 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
**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

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*)	8	trace—0.12	0.03	8	trace—1.19	0.20
Anago (conger, *Astroconger myriaster*)	3	0.05—0.19	0.10	3	trace—0.06	0.03
Anko (angler, *Lophius litulon*)	1		trace	—		
Bora (gray mullet, *Mugil cephalus*)	2	0.03—1.02	0.53	2	0.22—4.23	2.23
Buri (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	2	0.04—0.09	0.07	1		0.34
Chidai (*Evynnis japonica*)	1		trace	1		trace
Hamo (sea eel, *Muraenesox cinereus*)	2		trace	—		
Hatahata (*Arctoscopus japonicas*)	1		0.06	1		trace
Houbou (gurnard, *Chelidonichthys kumu*)	2		trace	2	0.04—0.12	0.08
Hokke (*Pleurogrammus azonus*)	2		0.02	2	0.02—0.04	0.03
Isaki (*Parapriatipoma trilineatum*)	1		0.02	1		0.08
Inada (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	2		0.02	2	0.03—0.12	0.08
Ishimochi (*Argyrosomus argentatus*)	1		0.13	1		0.89
Iwashi (sardine, *Sardinosticta*)	6	0.01—0.20	0.08	6	trace—0.48	0.11
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	3	nd—0.03	0.01	3	nd—0.04	0.02
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonica*)	2	0.05—0.08	0.07	2	trace—0.19	0.10
Kanpachi (*Seriola purpurascens*)	1		0.29	1		0.31
Kasugo (*Chrysophrys major*)	1		0.01	1		0.01
Konoshiro (*Clupanodon punctatus*)	4	0.29—0.63	0.41	4	0.11—0.58	0.29
Madai (sea bream, *Chrysophrys major*)	1		nd	1		trace
Magarei (flat fish, *Limanda herzensteini*)	2		nd	2		trace
Masu (trout, *Oncorhynchus masou*)	1		nd	1		nd
Mebaru (*Sebastes inermis*)	1		trace	1		0.13
Mutsu (*Scombrops boops*)	1		0.28	1		0.59
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	1		0.01	1		trace
Saba (mackerel, *Pneumatophorus japonicus*)	7	0.01—1.22	0.27	6	trace—3.70	0.75
Sake (salmon, *Oncorhynchus kete*)	1		nd	1		nd
Same (shark)	1		0.33	—		
Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	3	trace—0.01	0.01	3	0.01—0.02	0.02
Sayori (halfbeak, *Hemirhamphus sajori*)	1		0.19	1		1.87
Shiira (*Coryphaena hippurus*)	1		nd	1		0 03
Seigo (parch, *Lateolabrax japonicus*)	1		0.04	1		0.17
Suketodara (*Theragra chalcogramma*)	1		trace	1		0.05
Surumeika (*Todarodes pacificus*)	3		nd	3	0.25—0.50	0.39
Sodagatsuo (*Auxis thazard*)	1		0.02	1		0.08
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	2	trace—0.17	0.09	2	0.01—0.55	0.28
Takabe (*Labracoglossa argentiventris*)	1		0.01	1		0.04
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	3		nd	3	nd—0.03	0.01
Torafugu (globefish, *Fugu rubripes rubripes*)	1		trace	—		
Yariika (*Doryteuthis bleekeri*)	1		nd	1		nd
Yoroiitachiuo (*Hoplobrotula armata*)	2		nd	2		nd
Watarigani (*Portunus trituberculatus*)	1		nd	—		

nd=not detectable.
N=no. of samples.

平均値の差が大きかったが，第2報[2]ではその差が小さくなり，今回の調査では第2報[2]とほぼ同じレベルを示した．たとえば，イワシ，第1報,[1] 1.12 ppm，第2報[2] 0.08 ppm，本報 0.08 ppm，ボラ，第1報[1] 1.85 ppm，第2報[2] 0.40 ppm，本報 0.53 ppm，アジ，第1報[1] 0.003 ppm，第2報[2] 0.03 ppm，本報 0.03 ppm，サバ，第1報[1] 0.013 ppm，第2報[2] 0.20 ppm，本報 0.27 ppm であった．また，横浜市ＰＣＢ問題連絡協議会[3]が東京湾内魚について昭和47年から行なった調査の結果として，ＰＣＢ汚染の度合は3年間ほぼ同程度持続しており，たとえば，ギンポは昭和47年 1.1 ppm，昭和48年 0.3 ppm，昭和49年 0.32 ppm であったと報告し，本報の結果とほぼ一致している．

内臓については，採取できた37種類中33種類からＰＣＢを検出した．このうち高値のものはボラ 4.23 ppm，サバ 3.70 ppm であり，それぞれの平均は 2.23 ppm，0.75 ppm であった．しかし内臓全体を検討すると，第1報,[1] 第2報[2]と比較しても高濃度に汚染された検体は少ない．平均値でみると，魚種によっては，第1報[1]で高い平均値を示しているが，第2報[2]では低下し，横バイの傾向を示すものもある．たとえば，イワシは第1報[1] 1.97 ppm，第2報[2] 0.10 ppm，本報 0.11 ppm であった．しかしながら，アジのごときは，第1報[1]が他報よりも低く 0.070 ppm，第2報[2] 0.14 ppm，本報 0.20 ppm と逆に上昇した．

このように魚の内臓は，魚の可食部より依然として高いＰＣＢを含有しており，内臓の摂取はさけるべきであると考えられる．

2) 淡水魚

淡水魚については，コイ，アユ，ウナギ3種類3検体のＰＣＢ含有量を測定した．その結果，コイ，アユ，ウナギそれぞれ trace，trace，0.02 ppm であり，各内臓は 0.26 ppm，0.03 ppm，0.01 ppm であった．第1報[1]でアユは平均 0.04 ppm，内臓 0.88 ppm で可食部，内臓ともにＰＣＢ含有量は低くなっている．立花ら[4]は，アユについて平均 0.13 ppm と報告しており，それに比べても今回の調査結果の方が低値であった．しかし，検体数が限られており，これをもって淡水魚の汚染度が低下したと判断することは困難である．

3) 貝類

カキ，ウニ，アワビ，アカ貝各1検体についてＰＣＢを測定した．結果はそれぞれ 0.07ppm，trace，nd，nd であった．カキは第1報[1]の平均 0.09 ppm，第2報[2]宮城県産平均 0.04 ppm，広島県産平均 0.15 ppm と比べて高い値ではないが，汚染度の明らかな低下を裏付けるものではない．また，アカ貝については第2報[2]で 1.32 ppm のＰＣＢを検出したが，本報では検出しなかった．

4) 乳製品

乳製品4種類52検体についてＰＣＢを測定した結果を Table 2 に示した．

Table 2 Concentrations of PCB in Dairy Products

Sample	N	PCB concetrations in wet material (ppm)		PCB concetrations in extractable fat (ppm)	
		Range	Mean	Range	Mean
Milk	25		trace	trace—0.05	0.01
Modified milk powder	6	nd—trace		nd—trace	
Butter	9	nd—0.01	0.00		
Process cheese	12	trace—0.01	0.00	trace—0.02	0.01

nd=not detectable.
N=no. of samples.

牛乳については，すべての検体から痕跡のＰＣＢを認めた．脂肪量あたりでは，牛乳25検体中7検体から0.01 ppm 以上のＰＣＢを検出し，その最高は 0.05 ppm であった．粉乳については6検体中1検体にＰＣＢの痕跡を認めた．

バターは，9検体中8検体から痕跡のＰＣＢを認め，0.01 ppm 以上のＰＣＢを検出したのは1検体であった．

チーズについては，全検体からＰＣＢを検出し，そのうち1検体から 0.01 ppm のＰＣＢを検出した．脂肪量あたりでは，5検体から 0.01 ppm 以上のＰＣＢを検出し，全平均は 0.01 ppm であった．第1報,[1]第2報[2]と比較すると，第1報[1]から順に検出する最高値が低くなっていることが注目される．たとえば，牛乳では，第1報[1] 0.014 ppm，第2報[2] trace，本報 trace，脂肪量あたりでは，それぞれ 0.42 ppm，0.21 ppm，0.05 ppm

という結果である．この傾向は他の乳製品にも共通である．また，これらの乳製品について横浜市ＰＣＢ問題連絡協議会の報告[3]でも，粉乳，バター，チーズそれぞれ nd，0.06ppm，0.01 ppm で今回われわれの行なった調査結果とほぼ一致する．したがって，乳製品のＰＣＢ汚染度は低下しつつあるといえる．

5) 肉類

肉類のＰＣＢ測定結果は Table 3 に示すとおりである．

Table 3 Concentrations of PCB in Meats

Sample	N	PCB concentration (ppm wet wt)	
		Range	Mean
Beef	12	nd—0.03	0.01
Pork	10		trace
Chicken	10	nd—0.02	0.00
Hen's egg	20	nd—0.02	0.00

nd=not detectable.
N=no. of samples.

牛肉は，12検体すべてからＰＣＢを検出し，そのうち 0.01 ppm 以上は3検体で，平均は 0.01 ppmであった．豚肉は，10検体中4検体に痕跡を認めた．鶏肉については，10検体中5検体に痕跡以上のＰＣＢを認め，このうちの1検体から 0.02 ppm を検出した．第1報,[1] 第2報[2]と本報を最高値で比較してみると，たとえば牛肉では第1報[1]±，第2報[2] 0.03 ppm，本報 0.03 ppm と，第2報[2]と同じ値を検出しており，また平均値では，牛肉は第2報[2]と同じ値であるが，豚肉，鶏肉は本報のほうが低くなっている．すなわち，豚肉，第2報[2] 0.01 ppm，本報 trace，鶏肉，第2報[2]0.02ppm，本報 0.00 ppm である．立花ら[4]も牛肉，豚肉，鶏肉の検出範囲はそれぞれ nd—0.01 ppm，0.01—0.02 ppm，0.01 ppm であったと報告しており，本報の結果とほぼ一致する．

鶏卵については，最高 0.02ppm，平均 0.00ppm であった．この結果は第2報[2]と同じであった．

本調査における肉類，すなわち，牛肉，豚肉，鶏肉および鶏卵中のＰＣＢ量の多くは，不検出あるいは痕跡を認める程度であり，牛肉では 75%，豚肉 100%，鶏肉90%，鶏卵の50%を占めていた．このことから肉類のＰＣＢ汚染度は非常に小さくなっているものと考えられる．

6) 容器包装紙

アメ用，ラーメン用，マヨネーズ用等3種類4検体についてＰＣＢを測定したところ，アメ用包装紙，ラーメン用包装紙各1検体から，それぞれ 0.08 ppm，0.06 ppm のＰＣＢを検出した．川名ら[5]はフィルム状包装紙から最高 8 ppm のＰＣＢを検出したと報告しているが，本

Table 4 Concentrations of PCB in Human's Milk

Name	Age	PCB concentrations in wet material (ppm)	PCB concentrations in extractable fat (ppm)	Fat (%)
N.M.		0.028	1.24	2.3
T.H.		0.030	0.53	5.7
K.K.	29	0.024	0.53	4.6
K.N.	28	0.011	0.25	4.4
M.K.	24	0.032	0.93	3.4
K.M.	26	0.014	0.35	4.9
S.I.	28	0.024	0.48	5.0
F.T.	27	0.019	0.42	4.5
M.N.	24	0.014	0.45	3.2
Y.S.	23	0.028	0.67	4.2
M.S.		0.026	0.96	2.7
Y.Y.		0.039	0.67	5.9
H.N.	33	0.034	0.84	4.0
T.T.	30	0.016	0.70	2.3
R.K.	33	0.050	0.78	6.4
K.I.	25	0.022	0.76	2.9
K.T.	32	0.071	1.52	4.7
T.S.	30	0.025	0.59	4.3
T.M.	28	0.058	0.94	6.2
K.S.	23	0.009	0.47	2.4
Mean		0.029	0.74	4.2

報ではその1/100であり，また，第1報[1]の最高値 89.69 ppm と比べても非常に低値であることから，包装紙のＰＣＢ汚染度は非常に小さいと考えられる．しかし，第2報[2]では1検体も検出していないにもかかわらず，本報では検出したことから，その汚染源の追求と継続調査の必要があるものと考えられる．

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 4 に示す．

全検体からＰＣＢを検出し，全量あたりの最高値は 0.071ppm，最低値 0.009 ppm，平均 0.029 ppm であった．脂肪量あたり最高値は 1.52 ppm，最低値は 0.25 ppm，平均 0.74 ppm であった．平均値について第1報,[1] 第2報[2]と比較してみると，全量あたりでは，第1報[1] 0.031 ppm，第2報[2] 0.030ppm，本報0.029ppm とほぼ一定であり，脂肪量あたりでは，それぞれ 0.92 ppm，0.63 ppm，0.74 ppmで，依然としてＰＣＢの汚染度が低下する傾向はみられない．浜野ら[6]も昭和47年から2年間調査した結果として同様の報告をしている．母乳中のＰＣＢのパターンはＫＣ—500にほぼ一致しており，最近宮田ら[7]はＫＣ—500標準品から強い毒性を有するポリ塩化ダイベンゾラン（ＰＣＢＦ）を検出している．ＰＣＢの汚染にともなって，このような微量の有毒物によっても母乳の汚染が考えられる．母体内のＰＣＢは，母乳をとおして乳児に摂取されることから，授乳者は特に魚介類等の多食連食をさける必要がある．

要　　結

1. 都内で入手した魚45種類86検体についてＰＣＢを測定した．可食部の最高値はサバの 1.22 ppm であった．このほかに1 ppm を越えたものはボラ 1.02ppm だけであった．また，昭和47年に厚生省が定めた暫定規制値，内海内湾魚介類 3.0ppm，遠洋沖合魚介類 0.5ppm を越えたものはなかった．

2. 貝類について，カキから 0.07 ppm のＰＣＢを検出した．

3. 乳製品および肉類のＰＣＢ検出値は低く，暫定規制値，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 を大きく下まわっており，ＰＣＢ規制の効果が表われているものと考えられる．

4. 包装紙2検体から 0.08ppm，0.06ppm のＰＣＢを検出した．これは暫定規制値 5.0 ppm の 1/50 以下であるが，包装紙は食品を包むことを目的としたものであるから監視を続ける必要がある．

5. 都内在住者20人が母乳について調査したところ，全検体からＰＣＢを検出し，全量あたり平均 0.029ppm，脂肪量あたり平均 0.74 ppm の結果を得た．第1報,[1] 第2報[2]と比較して，その汚染度はほとんど同じであり，なお母乳に対する汚染が続いていることを示している．

謝辞 本調査に御協力いただいた，東京都衛生局環境衛生部乳肉衛生課，食品監視課，母子衛生課ならびに東京都市場衛生検査所の方々に深謝致します．

（本研究は昭和49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) 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，23，111，1971
2) 山野辺秀夫，天川映子，鈴木助治，小泉清太郎，戸谷哲也：東京衛研年報，25，119，1973
3) 横浜市ＰＣＢ問題連絡協議会：横浜市におけるＰＣＢ水銀等対策と調査結果，第3報，昭和49年度
4) 立花敏弘，二村哲男，藤井幹久，工藤隆子，川島真知子，池辺秀人：大分県公害衛生センター年報，1，8，1973
5) 川名清子，貝瀬利一，山田利治，加藤クニ，中岡正吉，渡辺重信，和田裕，永野弘史，山分杜美子，淵上信也，黒井信義：神奈川衛研年報，23，89，1973
6) 浜野米一，薬師寺積，井上清，渡辺功，村田弘，吉田善彦，長谷川利雄，国田信治：大阪府立公衛研所報，食品衛生編第5号，13，昭和49年
7) 宮田秀明，中村彰夫，樫本隆：食衛誌，16，129，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 139—145, 1975

起炎性物質に関する衛生化学的研究（第1報）

化粧品中のベルガプテンの分離定量法

水石和子* 風間成孔* 中村義昭*
観照雄* 原田裕文* 戸谷哲也*

Hygienic Chemical Studies on Irritants (I)

Quantitative Determination of Bergapten in Cosmetics

KAZUKO MIZUISHI*, MASAYOSHI KAZAMA*, YOSHIAKI NAKAMURA*,
TERUO KAN*, HIROFUMI HARADA* and TETSUYA TOTANI*

This work describes the determining of the content of bergapten, photodermatitis substance, in cosmetics. The method utiliges extraction using Dichloromethane from cosmetics and clean up by florisil column chromatography. Bergapten was checked by thin layer chromatography with the plate coated with silicagel (Kieselgel H) and the developing solvent of cyclohexane and tetrahydrofuran (1 : 1). It coloured as a light yellowish green spot (Rf value 0.38) under UV light (254nm) and its minimum detection limit was 0.5μg. The mesurement of bergapten was carried out by gas-liquid chromatography (GLC).

The condition of GLC analysis was as follows.

Column : 2% PEG 20M on Chromosorb W AW DMCS, Column temp. : 220—240°, Injection temp. : 250—270°, Carrier Gas : N_2 60ml/min,

Internal Standard : Tedion (2, 4, 5, 4′-tetrachlorodiphenyl sulfone)

A calibration curve by GLC showed linearity in the range of 0.05μg-1μg of Bergapten.

In all the cosmetics examined, bergapten was not demonstrable.

緒　言

ベルガモット油は *Citrus Bergamia* Risso et Poit. の果皮から抽出される清涼感のある柑橘系の精油であり，香水，化粧水をはじめ種々の化粧品に広く使用されている．しかしながらベルガモット油の成分であるフロクマリン類に属するベルガプテンとベルガモッチンは日光性皮膚炎の原因物質として[1,2]以前より知られ，中でもベルガプテンはその作用の著明なことが認められている．

近年，ベルガプテンに起因する日光性皮膚炎の問題が改めて注目され，ベルガプテンをあらかじめ蒸留法か抽出法で除去し，精製したベルガモット油を使用するようになったといわれている．しかし，これらの精製操作による芳香性劣化の面から，ベルガプテンを十分に，あるいは全く除いていないおそれもある．

従来，ベルガモット油についての成分分析の報告[3,4]はみられるが，化粧品を対象としたベルガプテンの分析法についてはほとんど研究がなされていない．都民からの化粧品カブレの苦情の増加からみて，化粧品中からのベルガプテンの微量分析法を確立することを目的とし，検討を行なったので報告する．

実験の部

試料　ベルガモット油 Filippo Co. (Italy) コールドプレスタイプ

試薬　試薬類は，とくにことわりのないかぎり，市販の特級品をそのまま用いた．

1)　ベルガプテン標準溶液：ベルガプテン標準品（後記の実験操作の項“ベルガプテン標準品の調製”で得られたもの）10.0mg をはかり，アセトンに溶かして正確に 20ml とする．（冷暗所保存）

* 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

2) フロリジル：合成ケイ酸アルミニウム，フロリジン社，100—200メッシュのものを130°，5時間乾燥しデシケータ中に保存する．

3) 薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と略す）用シリカゲル：Kieselgel H (Merck)

4) 展開溶媒：シクロヘキサン—テトラヒドロフラン (1：1)

5) ガスクロマトグラフィー（以下 GLC と略す）用内部標準液：Tedion (2,4,5,4′-tetrachloro-diphenyl sulfone, Aldrich 製) 60mgをアセトンに溶かして正確に 100m*l* とする．

装置

1) Kuderna-Danish 濃縮器（KD 濃縮器）

2) クロマト管：内径20mm，高さ120mmのコック付ガラス管の下部にガラス綿をつめたもの．

3) 紫外線発生装置：254nm 付近の紫外線を照射でき8W程度の線量を有するもの．

4) ガスクロマトグラフ：島津製 GC-5AF

実験操作

ベルガプテン標準品の調製 ベルガモット油約 400gを減圧蒸留（4 mmHg）し，220—260°の留分を集め，無水エタノールを用いて3回再結晶を行ない単離した白色針状結晶を標準品として用いた．

フロリジルカラム柱の調整 フロリジル7gをはかり，1，2—ジクロルエタンに懸濁してクロマト管に充てんし，気泡が生じないよう注意しながらカラム柱を調整する．

試験溶液の調製 試料の一定量(ベルガプテン40—200 μgを含むもので通常1—5g）を正確にはかり，100m*l* のフラスコに入れ，エタノール25m*l*，10%硫酸 10m*l* を加え，還流冷却器をつけ，水浴上で1時間加熱する．放冷後分液ロートに移す．沈殿物のある場合はガラスろ過器（No. 3）でろ過し，沈殿をジクロルメタン5m*l* で洗い，ろ液と洗液を分液ロートに移す．10%塩化ナトリウム溶液 150m*l*，ジクロルメタン 100m*l* を加え，5分間振とうし，静置してジクロルメタン層を分取し，水層はさらにジクロルメタン 50m*l* ずつで2回抽出を行なう．ジクロルメタン層を合わせ，水 50m*l* で洗い，無水硫酸ナトリウムで脱水後，揮散防止のため n-ノナン 0.5m*l* を加え，KD 濃縮器で5—10m*l* に濃縮する．この濃縮液をフロリジルカラム柱に静かに加え，濃縮管を少量のジクロルメタンで洗い，洗液を加えたのち，カラム柱の上層の液がほとんどなくなるまで流下させる．つぎに1,2-ジクロルエタン 100m*l* を2 m*l*/min の流速で流してクリーンアップ後，同様の流速でギ酸メチル 40m*l* を流しベルガプテンを溶出させる．溶出液にふたたび n-ノナン 0.5m*l* を加え，KD 濃縮器で濃縮し，アセトンを加えて正確に 2 m*l* とし，これを試験溶液とする．

TLC による定性

薄層の調製——シリカゲル30gに，水約 65m*l* を加えて振り混ぜ，常法により約0.25mmの薄層を調製する．105—110°，30分間加熱し，乾燥箱中で放冷し，保存する．

操作 ——薄層の下端から2cm の位置を原点として，試験溶液およびベルガプテン標準溶液 5—25μ*l* を約1 cm の間隔をおいてそれぞれ塗布し，風乾したのち展開溶媒により上昇法で約 10cm 展開する．風乾後，紫外線照射下でスポットを観察し，試験溶液から得たスポットの色調および Rf 値をベルガプテン標準液のそれと比較して判定する．

GLC による定性，定量法

GLC の測定条件——

Column：2% PEG 20M, Chromosorb W AW DMCS, glass column 3mm×1m

Detector：FID (H_2 60m*l*/min, Air 1.1 liter/min)

Temperature：column 220—240°, injection, detector 250—270°　Carrier gas：N_2 60m*l*/min

Sensitivity：$10^2\times8$

定性——標準溶液 1 m*l* に内部標準溶液 0.5m*l* を加えた溶液5 μ*l* をとり，測定条件に従ってガスクロマトグラフィーをおこない，得られたガスクロマトグラムからベルガプテンの保持時間を求め，内部標準物質との相対保持時間を求める．同様に，試験溶液 1 m*l* に内部標準溶液 0.5m*l* を加えた溶液5 μ*l* をとり，ガスクロマトグラフィーを行ない，ピークの相対保持時間を測定し，標準溶液のそれと比較して同定を行なう．

定量——検量線の作製：内部標準溶液 0.5m*l* に，アセトンでうすめたベルガプテン標準溶液 1 m*l* を加え，1 m*l* あたりベルガプテン10，20，50，100，150 および 200μg を含む標準系列を調製し，各5 μ*l* を測定条件に従って操作しガスクロマトグラムを得る．それぞれのピークの高さを測定し，内部標準物質に対するピーク高比を求める．横軸に濃度，縦軸にピーク高比をとり検量線を作製する．　操作：試験溶液 1 m*l* に内部標準溶液 0.5m*l* を加えた溶液5 μ*l* について，検量線作製の項に従いガスクロマトグラムを得る．ベルガプテンのピークの高さと内部標準物質のそれとの比から，検量線によってその濃度を求め，試料中のベルガプテンの含有量を算出する．

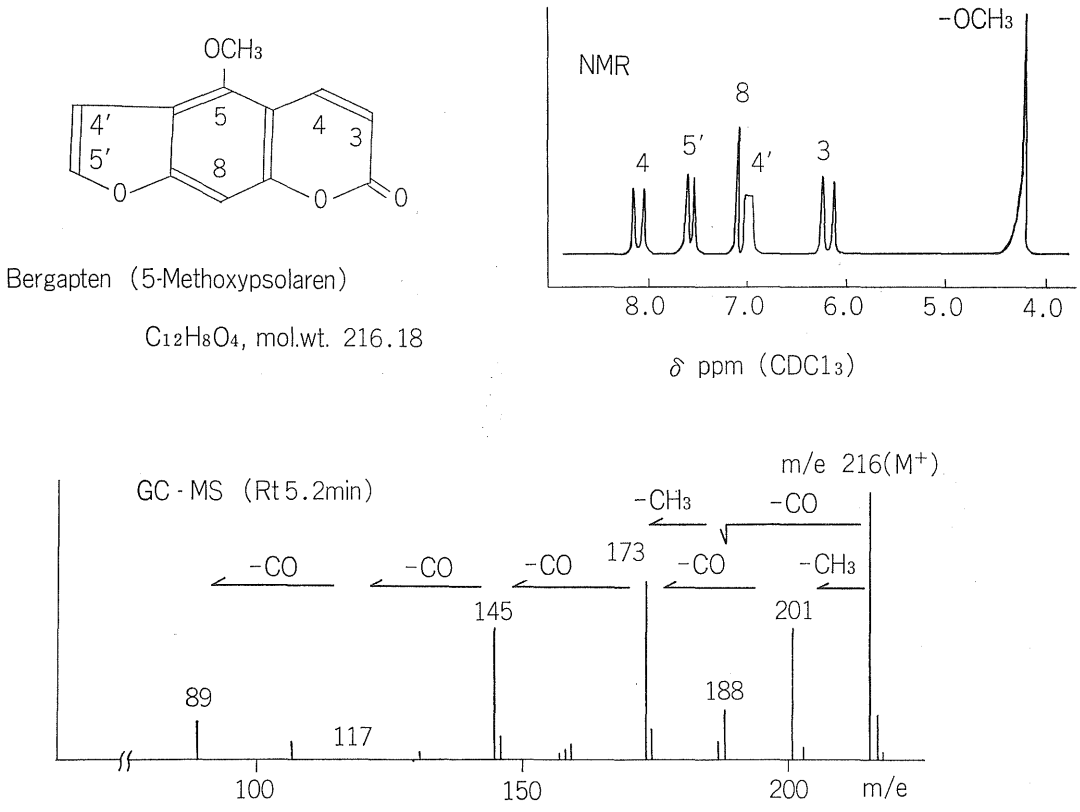


Fig. 1 Mass and NMR Spectrum of Bergapten

結果および考察

ベルガプテン標準品の同定 ベルガモット油から単離，精製して得た白色針状晶につきその確認試験を行なった結果を以下に示す．mp——187.5°（文献値[5] 188—190°），元素分析——$C_{12}H_8O_4$：実験値 C, 66.87；H, 3.65,（計算値C, 66.67；H, 3.73）IR ——ν_{max}^{KBr} cm^{-1}：1719, 1610, 1474, 1344, 1149, 1105, 880, 733, ガスクロマトグラフ—質量分析（GC-MS）および核磁気共鳴（NMR）の結果は Fig. 1 に示すとおりで，これらはいずれも文献[6,7]と一致し，ベルガプテンと確認した．

試料からのベルガプテンの抽出溶媒の検討 抽出溶媒としてジクロルメタン，クロロホルム，1,2-ジクロルエタン，n-ヘキサン等を用いて，ベルガプテン200μgを含有するエタノール25ml，10%硫酸10ml，10%塩化ナトリウム溶液 150ml の混液からのベルガプテンの抽出を行なった．各溶媒 100ml で5分間振とうして抽出し，さらに50mlで2回抽出を繰り返した結果，すべての溶媒でベルガプテンは100%近く抽出されることが認められた．しかし，これらをクリームなどの実際試料に適用した場合，ジクロルメタン以外はすべてエマルジョンを形成し，実用に適さないため，ジクロルメタンを抽出溶媒として用いることにした．

カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップおよび溶出 試料から抽出した溶液をクリーンアップする目的でフロリジル，アルミナ（Merck）の酸性，塩基性，中性タイプおよびシリカゲル（Davison）の5種のカラム吸着剤について検討した．これらの吸着剤を充てんしたカラム柱にベルガプテン 200 μg を含有するジクロルメタン 10ml を流し，その流出液について前記 GLC による定量法に従い，これらの吸着剤による捕捉が完全になされているか否かを調べた．その結果，フロリジルでは100%完全な吸着を示したが，アルミナの酸性タイプでは29.6%，塩基性タイプでは29.6%，中性タイプでは32.1%，シリカゲルでは18.6%の吸着しか認められなかった．

つぎに，クリーンアップのための洗浄溶媒とフロリジルに吸着したベルガプテンの溶離溶媒について検討した．洗浄溶媒はジクロルメタン，クロロホルム，1,2-ジクロルエタン，n-ヘキサン，シクロヘキサン，石油エーテルおよびベンゼンの7種類をえらび，これらの溶媒をそれぞれ 100 m*l* ずつフロリジルカラムに流して，カラム中のベルガプテンの残存量を調べたところ，ジクロルメタンでは全く残存がみられなかったが，クロロホルムでは73%の残存がみられた．他の5種の溶媒ではほぼ完全にベルガプテンの残存が認められたが，これらのうちクリーム基剤の溶解性が良い1,2-ジクロルエタンをクリーンアップ溶媒として選んだ．

一方，溶離溶媒としてギ酸メチル，酢酸メチル，酢酸エチル，アセトン，エタノールおよびメタノールなどについて検討した．これらの溶媒によるベルガプテンの溶離状態を Fig. 2 に示す．アルコール系溶媒による溶離は極めて悪いのに対して，エステル系は比較的良好な溶離を示し，そのうちでもギ酸メチルは約 40m*l* 以内でベルガプテンを定量的に溶離させることが出来た．

また，抽出溶媒，溶離溶媒の濃縮の際，ベルガプテンの揮散がみられたので（揮散による損失30—50%），n-ノナン 0.5 m*l* を添加することにより揮散を防ぐことができた．

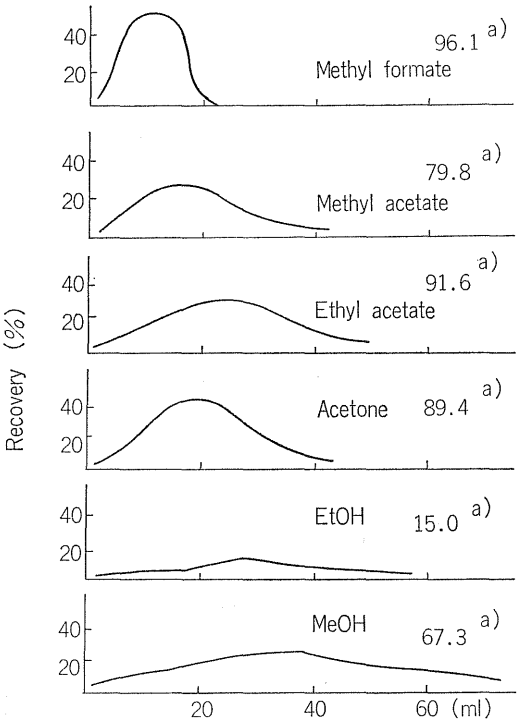


Fig. 2 Elution Patterns of Bergapten using various Solvents on Florisil Column
a) Recovery (%)

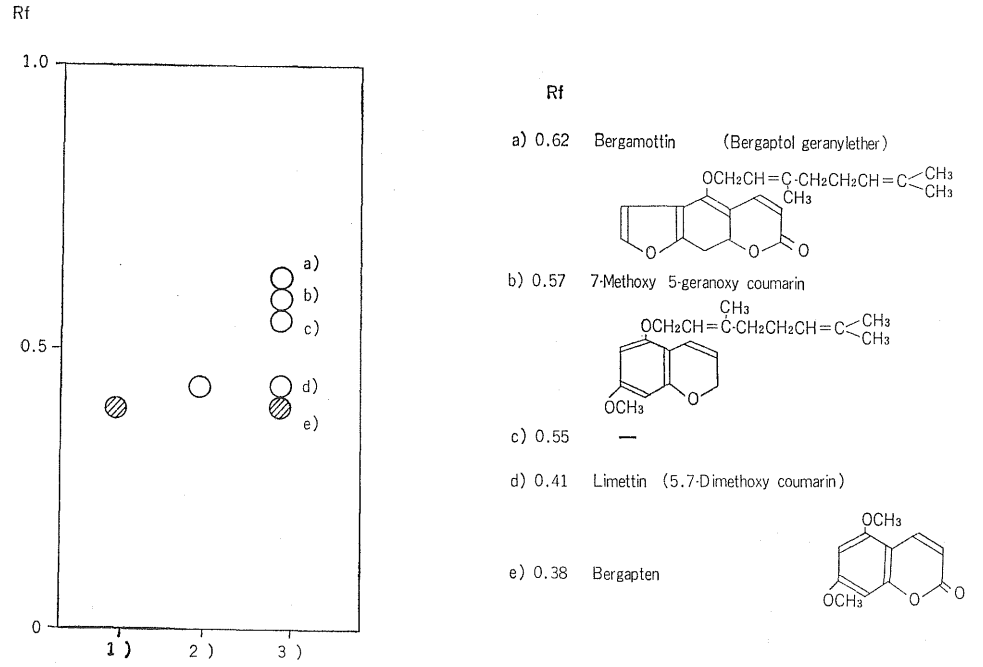


Fig. 3 Chromatograms of Bergapten and Bergamot Oil by TLC
Plate : Kieselgel H, Cyclohexane-Tetrahydrofuran 1 : 1, UV lamp 254nm
1) Bergapten 2) Limettin 3) Bergamot Oil

TLC の検討 シリカゲル薄層 (Kieselgel H), シクロヘキサン—テトラヒドロフラン (1：1) で展開を行なった．展開風乾後，薄層板に紫外線 254nm を照射したところ，ベルガプテンは Rf 値 0.38 の黄緑色スポットとして認められ，検出感度は 0.5μg であった．その結果を Fig. 3 に示す．

ベルガモット油はクマリンに属するリメチン (5, 7-Dimethoxy coumarin) がベルガプテンに近接した Rf 値0.41に青色スポットとして認められた．またベルガモッチン (Bergaptol geranylether) は Rf 値 0.64 の緑色スポットおよび 7-Methoxy-5-geranoxy coumarin が Rf 値 0.57 の青色スポットとして認められた．

現在までに，ベルガモット油成分に関する TLC については F.N. Marzulli[3]らによるトルエン—酢酸エチル—酢酸 (80：20：2), U.R. Cieri[4] による n-ヘキサン—酢酸エチル (75：25) を展開溶媒としている報告があるが，われわれが追試した結果，ベルガプテンとリメチンの分離は今回の条件によって多少改善がみられた．

GLC のカラム充てん剤の検討 カラム充てん剤 10 種類を用いて，ベルガプテンとベルガモット油中の共存物質リメチンとの分離能を検討した結果を Table 1 に示した．ベルガプテンとリメチン保持時間を各々測定し，両者の相対比としてあらわした．

一般に良く用いられる SE-30 ではテーリングがみられ，極性の強い 2% PEG 20M (on Chromosorb W AW DMCS) を用いた場合にベルガプテン，リメチンが完全に分離され (相対比：1.59)，ピーク形も良好であったので，充てん剤としては 2% PEG 20M を用いることにした．

Table 1 Retention Time of Bergapten and Limettin by FID Gas Chromatography

Columns	Retention time (min)			B/L
		Bergapten	Limettin	
1.5% SE-30	220°	2.9	2.3	(1.26)
1.0% OV-17	200°	2.1	1.6	(1.31)
1.5% OV-17 + 1.95% OF-1	240°	4.5	3.5	(1.28)
2.0% OV-210	230°	2.6	2.0	(1.30)
2.0% OV-225	230°	9.0	6.6	(1.50)
2.0% QF-1	240°	2.6	2.0	(1.30)
2.0% PEG 20M	220-240°	3.5	2.2	(1.59)
10% FFAP	230°	N.D	N.D	
5.0% DEGS	220°	N.D	31.0	
2.0% CHDA	250°	19.0	13.7	(1.38)

検量線 内部標準法 (内部標準物質として Tedion を用いた) により，ピーク高を求めて検量線を作製したところ，Fig. 4 に示すように，ガスクロ注入量 5 μl でベルガプテン濃度10—200ppm (ベルガプテン 0.05—1μg) に良好な直線関係が成り立つことを認めた．また Fig. 5 にベルガプテンのガスクロマトグラムを示す．

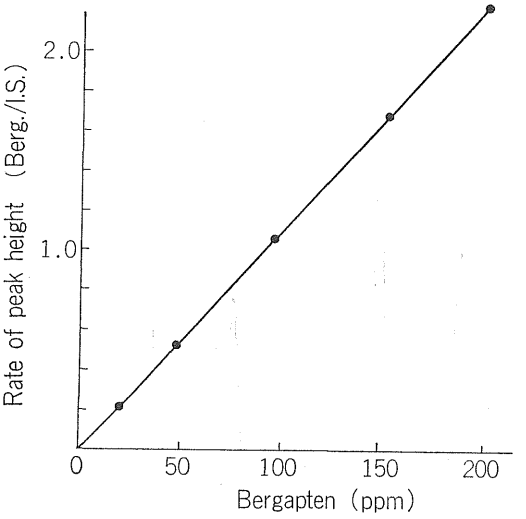


Fig. 4 Calibration Curve for Bergapten
Conditions :
2% PEG 20M on Chromosorb W AW DMCS, glass column 3mm×1m, column temp. 220—240°, injection and detector temp. 250—270°, N_2 60ml/min, detector FID, sensitivity 8×10^2, sample size 5μl, I.S. Tedion (2,4,5,4′ tetrachlorodi phenyl sulfone) 200ppm

添加回収実験 次記のような処方のクリームにベルガプテン 200μg を添加して回収実験を 5 回繰り返し行なったところ，回収率は平均 92.4%，変動係数 3.6%の結果が得られた．

Cream base	%
Bees wax	5.0
Glyceryl monostearate	5.0
Liquid paraffin	20.0
Stearic acid	1.0
Borax	0.2
Water	68.8

市販化粧品の添加回収実験ならびに分析結果 市販の化粧品 14 種についてベルガプテンの定量を行なった結果，ベルガプテンは今回対象とした化粧品からは検出されなかった．これらの化粧品にベルガプテン 200 μg を添加して分析したところ Table 2 に示すように，石ケンとポマードを除いては，81.1—103 %の回収率が得ら

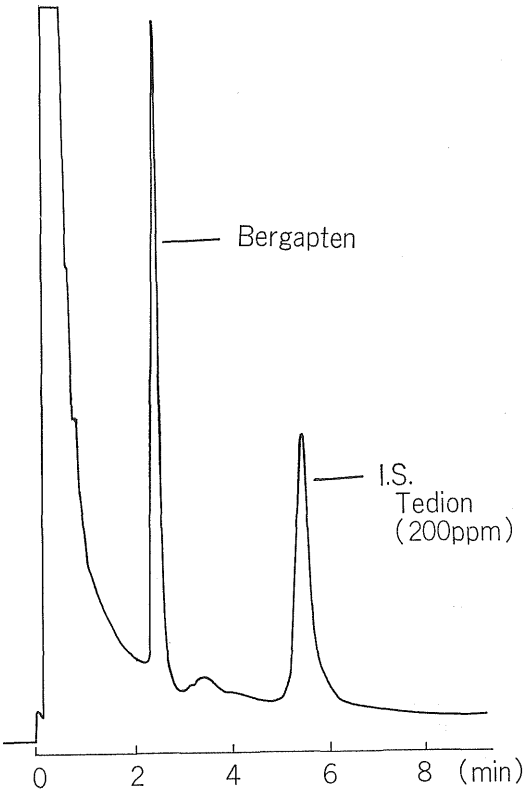


Fig. 5 Gas Chromatogram of Bergapten

れた.

石ケンとポマードについては，試料採取量ならびにクリーンアップ条件等についてなお検討中である.

要　結

ベルガプテンは柑橘系香料のベルガモット油の一成分であり，光過敏反応の原因物質として知られ，最近ではベルガプテンを除いたベルガモット油が用いられるようになったが，その判別の方法は報告されていない．そこで化粧品中からのベルガプテンの分離定量法について検討し，以下の試験法を確立した.

試料を硫酸酸性エタノール溶液に溶かして，ジクロルメタンで抽出を行ない，n-ノナンを加え，KD濃縮器で濃縮後，フロリジルカラムを用いて1,2-ジクロルエタンでクリーンアップ後，ギ酸メチルで溶離溶出させ，再びn-ノナンを加えて濃縮し，得られた濃縮液をアセトンで一定量にし，TLC および GLC による定性，定量試験を行なう.

本法を用い，クリームについて添加回収実験を行なったところ，平均91.1%の回収率を得た.

TLC による検出感度は 0.5μg で，GLC によって作成した検量線は 0.05—1 μg に直線関係を示した.

市販化粧品12種についてベルガプテンの定量試験を行なった結果，ベルガプテンはいずれの製品からも検出されなかった.

謝辞 本研究にあたり，御指導をいただいた当所理化学部長松本茂博士，また調査試料に関し御便宜をはかっ

Table 2 Recovery of Bergapten from Toilet and Perfumery Preparations

Cosmetic	Weight g	Bergapten content			Recovery (%)
		Original	Added μg	Found	
Cold cream—A	5	N.D	200	182.8	91.4
Cold cream—B	5	N.D	200	188.4	94.2
Vanishing cream	5	N.D	200	199.4	99.7
Foundation cream	5	N.D	200	206.0	103.0
Eau de cologne	1	N.D	200	178.4	89.2
Lipstick	2	N.D	200	173.2	86.6
Pan cake	5	N.D	200	185.0	92.5
Powder	5	N.D	200	180.0	90.0
Baby powder	5	N.D	200	175.6	87.8
Tooth paste	5	N.D	200	162.2	81.1
Hair liquid	5	N.D	200	172.0	86.0
Hair tonic	5	N.D	200	201.4	100.7
Soap	5	N.D	200	N.D	0
Pomade	5	N.D	200	N.D	0

ていただいた東京都薬務部ならびに Bergamot 油等を分与していただいた池田物産K.K., 曽田香料K.K., 小川香料K.K.および帝人パピリオK.K.の各社に深謝致します.

(本研究の概要は日本薬学大会第95年会1975年4月で発表した.)

文　献

1) Musajo, L,. Rodighiero, G. and Caporale, G.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 36, 1213, 1958
2) Pathak, M. A., Worden, L. R. and Kaufman, K. D.: *J. Invest. Darmatol.*, 48, 103, 1967
3) Marzulli, F. N. and Maibach, H.: *J. Soc. Cosmet. Chem.* 21, 695, 1970
4) Cieri, U. R.: *J. AOAC.* 52, 719, 1969
5) 奥田治：香料化学総覧, II, 1266, 1974, 広川書店
6) 三橋博, 野村太郎, 永井右近, 村松敏夫, 徳田都美：薬誌, 81, 464, 1961
7) 上原康男, 土門徹, 細川隼人, 浜下隆資：日本化粧品技術者連合会会誌, 9, 31, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 146—149, 1975

起炎性物質に関する衛生化学的研究（第2報）

ネイルエナメル皮膜中からのホルムアルデヒドの溶出

中村義昭* 風間成孔* 水石和子*
山添律子* 原田裕文* 戸谷哲也*

Hygienic Chemical Studies on Irritants (II)

Elution of Formaldehyde from Film of Nail Enamels

YOSHIAKI NAKAMURA*, MASAYOSHI KAZAMA*, KAZUKO MIZUISHI*,
RITSUKO YAMAZOE*, HIROFUMI HARADA* and TETSUYA TOTANI*

Elution of formaldehyde into water from a film of nail enamel coated two times over slide glass (10cm²) by hand with nylon brush was investigated.

The acetylacetone method was used for determination of formaldehyde.

The average weight of film was 0.164g and the average amount of eluted formaldehyde per film surface area was 8.51μg/cm².

It was found that this method was simpler than Tonomura's method which uses "doctor-blade" as a spreader of nail enamel coating over glass (50cm²).

Formaldehyde was detected in 18 samples out of 42 commercial samples. The maximum value was 20.8μg/cm² (1,207.9ppm).

緒　言

ホルムアルデヒドは接触性皮膚炎の代表的な起因物質として古くから知られているところであり，ホルムアルテヒドを含有し，あるいは遊離のホルムアルデヒドを溶出するような化粧品は衛生上多くの問題点がある．

事実ホルムアルデヒドは職業上これと接触することにより皮膚炎や湿疹を発生するとの報告[1-3]がみられ，また最近ではホルムアルデヒド樹脂加工を施した衣料下着類などの家庭用品による皮膚炎が問題視されている．元来化粧品では薬事法によってホルムアルデヒドの配合は認められていないが，ネイルエナメルにはそのすぐれた皮膜形成性と，しかも他の代替品が得難いとの理由から，いわゆるサントライトと称されるホルムアルデヒド樹脂が，かなり以前から使用されて来た．すなわちサントライト（アリルスルホンアミドホルムアルデヒド縮合樹脂）であるが，本品は加温することによって容易にホルムアルデヒドを分解遊離し，あるいははじめから遊離のホルムアルデヒドを含む場合も推定される．ネイルエナメルからホルムアルデヒドの溶出の問題はネイルエナメルの広範な需要とあいまって近年特に注目されている．

従って今回ネイルエナメルについて，ホルムアルデヒドの溶出条件に関し検討するとともに，都内市販品についてその実態を調査したので報告する．

実験の部

1. 試　薬

特にことわりのないかぎり，和光純薬K. K.の試薬特級を用いた．

(1) ホルムアルデヒド標準原液

ホルマリン 1ml を水で 100ml として標準原液とし，この液のホルムアルデヒド含有量をつぎの方法によって求める．

標準原液 10ml を正確にとり，0.1Nヨウ素液 50ml を正確に加え，さらに1N水酸化カリウム液 20ml を加えたのち，15分間常温で放置する．さらに希硫酸 15ml を加え，過剰のヨウ素を 0.1N チオ硫酸ナトリウム液で滴定する．（指示薬：デンプン試液 1 ml）

別に水 10ml を用いて同様の方法で空試験を行ない次

* 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

式によりホルムアルデヒド含有量を算出する．

0.1Nチオ硫酸ナトリウム 1 ml=1.5013mgHCHO

標準原液 1 ml=1.5013mg×(B−T)×f×1/10

B：空試験に要した0.1N チオ硫酸ナトリウム液の量（ml）

T：測定に要した0.1N チオ硫酸ナトリウム液の量（ml）

f：0.1Nチオ硫酸ナトリウムの力価

(2) ホルムアルデヒド標準溶液

標準原液を計算量とり水で希釈して 1 ml 中 10μg のホルムアルデヒドを含む溶液を調製し，標準溶液とする．（用時調製）

(3) アセチルアセトン溶液

酢酸アンモニウム 150 g を適量の水で溶解し氷酢酸 3 ml，アセチルアセトン 2 ml を加え，さらに水で全量を 1,000ml とする．（用時調製）

2. 装　置

日立自記分光光度計 323 型

Mettler 上皿直示天秤 P160N（秤量感度：0.001g）

ドクター・ブレード（UESHIMA SEISAKUSHO LTD, No. 850, 0.038cm）

3. 試　料

昭和49年10月28日から50年4月9日までに東京都衛生局薬務部が，東京都内のデパートおよび小売店から収去し本所に送付してきた14社42検体のネイルエナメルを対象試料とした．

実験操作

1. 試験溶液の調製

10cm^2 の面積にネイルエナメルを，あらかじめ水洗し乾燥したナイロン製の筆を用いてスライドグラスの表面に均一に2回塗布する．このときネイルエナメル中の溶媒揮散による損失が最少になるように塗布のつど迅速に天秤で皮膜重量を測定する．室温で2時間放置したのち，直径 8 cm のペトリシャーレに入れ，40°の水 20ml を加えてふたをし，40° の恒温水槽内でシャーレをときどきゆり動かしながら30分間抽出し，試験溶液とする．

2. 定量法

試験溶液 5 ml を正確に共栓試験管にとり，これにアセチルアセトン溶液 5 ml を加えたのち密栓して 60° の水浴中で10分間加温し，さらに室温で30分間放置する．一方対照として水 5 ml にアセチルアセトン溶液 5 ml を加えて同様に操作する．つぎに層長 1 cm のガラスセルにそれぞれ入れ，波長 413nm 付近における吸光度を測定し，別にホルムアルデヒド標準溶液を用いて作成した検量線からホルムアルデヒド量を求め，これより皮膜面積 1 cm^2 あたりおよび 1 g あたりの溶出ホルムアルデヒド量を算出する．

3. 検量線の作成

標準溶液 0, 0.5, 1, 2, 3ml をとり，それぞれ水を加えて 5 ml とし，以下アセチルアセトン比色法に従い，吸光度を測定し検量線を作成したところ Fig. 1 にみられるように良好な直線性を示した．

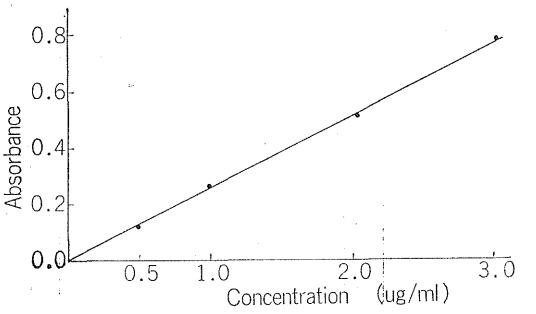


Fig. 1 Calibration Curve for Formaldehyde

実験結果および考察

1. 塗布条件の検討

外村ら[5]は平面ガラス板を用いてつぎのような操作条件について報告している．すなわちガラス板にマスキングテープを用いて面積 50cm^2 の枠を作り，この上に試料を流し，厚さ 300μ に調節したドクター・ブレードを使用して均一に塗布する．塗布膜が硬化しないうちに，注意してテープを取り去り，さらに2時間放置して乾燥したのち，40°に保った水 100ml 中に30分間浸漬する．この浸漬液 5 ml についてホルムアルデヒドの定量を行なった．また日本化粧品工業連合会もこの方法を準用して，試験を行なっている．しかしこの方法で使用しているドクター・ブレードは，現在市販されておらず入手が困難であり，また本法によれば試料の塗布面が大きいため浸漬に用いる容器も大きなものを必要とし，恒温水槽内で処理する関係から一度にわずかの検体しか試験できない．したがって本法は多数の検体を処理する必要のある日常業務の分析法としてやや難点があると思われる．そこでわれわれはドクター・ブレードを使用することなく，かつ小さい塗布面積で試料を塗布する試験方法を検討した．

すなわち幅 2.5cm のスライドグラスを用い，一端から 4 cm までの範囲でその表面にネイルエナメルを，ナイロン製の筆で均一に塗布する．風乾後さらにその上に同様に塗布し，1回塗布，2回塗布，3回塗布の3段階の塗布膜を調製する．この際塗布ごとに，直ちに塗布量の重量を測定する．またこれらと比較する意味でドクタ

ー・ブレードを用い，10cm×10cm にした TLC 用ガラス板上に塗布膜を調製した．これらを恒温水槽中で 40° に保った水 20ml に 30 分間浸漬し，（ただしドクター・ブレードを用いたものは 100ml とする）この浸出液について前項2の定量法に従ってホルムアルデヒドを定量した．このとき膜表面積あたりおよび膜重量あたりの溶出量ならびに塗布膜の重量を Table 1 に示した．

Table 1 Weight of Nail Enamel and Amount of Eluted Formaldehyde

Times of coating		Weight of film				Amount of eluted formaldehyde (μg/cm^2)				Amount of eluted formaldehyde (ppm)			
			$\bar{X}$ a)	S.D. b)	C.V. (%) c)		$\bar{X}$ a)	S.D. b)	C.V. (%) c)		$\bar{X}$ a)	S.D. b)	C.V. (%) c)
d)	1	0.034				4.64				1364.7			
		0.033	0.034	0.0006	1.7	4.72	4.69	0.0462	1.0	1430.3	1394.4	33.23	2.4
		0.034				4.72				1388.2			
	2	0.138				8.33				603.6			
		0.134	0.133	0.0061	4.6	7.92	7.99	0.3110	3.9	591.0	602.5	10.87	1.8
		0.126				7.72				612.7			
	3	0.248				12.68				510.6			
		0.224	0.234	0.0125	5.3	11.91	12.01	0.6306	5.3	531.7	513.1	17.50	3.4
		0.230				11.43				497.0			
e)	1	0.860				8.88				516.3			
		0.782	0.821	0.0390	4.8	8.64	8.51	0.4599	5.3	552.4	518.4	33.04	6.4
		0.822				8.00				486.4			

a) : average value
b) : standard deviation
c) : coefficient of variation
d) : coating over slideglass at 10cm^2 with nylon brush
e) : coating over glass at 50cm^2 with doctor blade

Table 1から明らかなように塗布回数の増加にともない単位面積あたりの溶出量は増加したが，これに反して単位重量あたりの溶出量は減少することが認められた．この理由として塗布膜平均重量は，1回目が0.034g，2回目が0.133g，3回目 0.234gで，1回目に対して2回目は3.9倍，3回目が6.9倍を示している．しかし単位面積あたりのホルムアルデヒド平均溶出量は，1回目に対して2回目は1.7倍，3回目は2.6倍である．このように膜重量の増加率に対して溶出量の増加率が極めて低いため，単位重量あたりのホルムアルデヒド溶出量は塗布回数の増加に従って減少することになる．このことから当然ではあるがホルムアルデヒドは主として塗布膜の表面から溶出し，内部にゆくに従ってその溶出量は少なくなることが考えられる．また一方塗布膜重量の変動係数は，塗布回数を増すにしたがい増加することが認められる．ここで筆を用いて調製した塗布膜とドクター・ブレードによって調製した塗布膜を比較すると，まず平均膜重量においてはドクター・ブレード法は 10cm^2 あたり 0.164gとなり，2回塗布にほぼ近似している．また単位面積あたりのホルムアルデヒド溶出量も2回塗布とドクター・ブレード法は，非常に近い値を示している．これらのことから，筆を用いて試料に塗布する回数を2回と定めた．

2. 市販ネイルエナメル中のホルムアルデヒド溶出量

本報で検討した試料溶液の調製方法に従い，42検体のネイルエナメルについてホルムアルデヒドの溶出量の測定を行なった結果を Table 2 に示す．

ここに示した42検体中18検体からホルムアルデヒドの溶出が認められたが，これらのうち最も高い値は F 社 No. 3 の 20.8μg/cm^2 (1,207.9ppm) であった．

今回ホルムアルデヒドを検出した試料の処方をみると，皮膜形成剤がピロキシリン，ロジンおよびサントライト（アリルスルホンアミドとホルムアルデヒドの縮合物）などで構成されており，このなかのサントライトからホルムアルデヒドが溶出したものと考えられる．しかしピロキシリン，ロジンのみを処方として示しているにもかかわらず，ホルムアルデヒドを検出した試料が15検体もあったが，その理由として同じくサントライトまた

Table 2 Amount of Eluted Formadehyde from Commercial Nail Enamels

Company	Number	$\mu g/cm^2$ a)	ppm b)	Company	Number	$\mu g/cm^2$ a)	ppm b)
A	1	N.D.	N.D.	F	2	N.D.	N.D.
	2	N.D.	N.D.		3	20.8	1,207.9
	3	N.D.	N.D.		4	N.D.	N.D.
	4	N.D.	N.D.		5	N.D.	N.D.
	5	N.D.	N.D.	G	1	N.D.	N.D.
	6	N.D.	N.D.		2	N.D.	N.D.
B	1	2.8	377.7		3	N.D.	N.D.
	2	3.1	442.9	H	1	N.D.	N.D.
	3	4.0	506.0		2	N.D.	N.D.
	4	3.6	391.8		3	N.D.	N.D.
	5	2.4	355.8		4	N.D.	N.D.
	6	2.8	333.5	I	1	2.6	196.3
	7	8.2	739.9	J	1	N.D.	N.D.
	8	2.4	291.5		2	N.D.	N.D.
	9	2.7	405.1	K	1	4.8	498.8
	10	3.1	270.4	L	1	N.D.	N.D.
	11	2.4	331.4		2	N.D.	N.D.
C	1	N.D.	N.D.		3	N.D.	N.D.
D	1	N.D.	N.D.	M	1	5.3	345.4
E	1	N.D.	N.D.		2	6.4	387.4
F	1	N.D.	N.D.	N	1	11.9	570.9

a) : amount of eluted formaldehyde per unit area
b) : amount of eluted formaldehyde per unit weight

は他のホルムアルデヒド縮合樹脂などが配合されていることが考えられる.

要　結

1. ホルムアルデヒドの溶出試験に供するネイルエナメルの塗布膜をドクター・ブレードによって調製し，その面積を 50cm^2 としている試験法に対し，われわれは塗布方法として 10cm^2 の面積になるように試料を水洗後乾燥したナイロン製の筆でスライドグラスに塗布したものを用いた．この両者について膜重量および単位面積あたりのホルムアルデヒド溶出量を比較したところ，前者に最も近い値を示したものは2回塗布によって得られた塗布膜であった．そこで試料溶液はスライドグラスにに筆を用いて2回塗布して得た膜から調製することとした.

2. 試料42検体中18検体からサントライトに起因するホルムアルデヒドが検出され，最高20.8$\mu g/cm^2$(1,207.9 ppm) であった．これらの検体のうち，処方中にサントライトを示してないにもかかわらず，ホルムアルデヒドを検出するものがあった．これらはサントライトあるいはホルムアルデヒド縮合樹脂の使用が疑われる.

謝辞　本調査に際し，試料の入手について御協力をたまわった東京都衛生局薬務部の方々に対し深甚なる謝意を表します.

文　献

1) 久保田重孝：労働科学，33，1，1957
2) 横堀栄，倉島撰子：労働科学，12，3，1959
3) 井本稔，垣内弘，黄慶雲・編：ホルムアルデヒドその化学と応用，36，1965，朝倉書店
4) 日本薬学会編：衛生試験法注解，223，1973，金原出版
5) 外村正治，小幡利勝，村松ひろみ，狩野静雄：衛生試験所報告，90，102，1972
6) 大場琢磨，中村晃忠，小鳩茂雄，毛利潤子：医薬品研究，6，196，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 150—154, 1975

ゴム製器具に関する衛生化学的研究（第2報）

医療用ゴム中の亜鉛の定量

西田茂一* 森 謙一郎*

Hygienic Chemical Studies on Rubber Devices (II)

Determination of Total Zinc in Rubber for Medical Supplies

SHIGEKAZU NISHIDA* and KENICHIRO MORI*

Rapid determination of total zinc in rubber for medical supplies was examined by use of flask-combustion procedure and atomic absorption spectrometry.

Reviews obtained were as follows:

1) This method reduced analysis time compare with other method.
2) Diverse (metal) ions gave little or no effect on the determination of zinc in rubber without using solvent-extraction procedure.
3) Average of recovery rate was 98.98-104.15% and coefficient of variation was 4.79-5.81%.
4) Great care must be taken in cutting, washing, drying, storaging and weighing of samples.
5) Sampling weight of 10mg was the most suitable for this method.

緒　言

医療用ゴムにしばしば含有される重金属のうち，亜鉛は代表的なものである．これは加硫助剤，加硫促進剤として，酸化亜鉛や亜鉛ジチオカーバメート等が添加されるためである．

著量の亜鉛の検出は，他の重金属や促進剤等の有機物の溶出も考えられ，有害性が憂慮される場合もある．したがってゴム中の亜鉛含有量を調査することは品質管理上重要な意義がある．

ゴム質中の重金属試験に関しては，石井らをはじめとする報告があり，[1-5] 分析上の前処理としては，湿式灰化法，通常の乾式灰化法，アルカリ添加燃焼法またはアセト酢酸エチル等を用いた抽出法がある．これらの方法はいずれも長時間を要することと，試薬による汚染や吸着による目的元素の損失にも注意しなければならない．

そこで，短時間に医療用ゴム中の亜鉛を定量することを目的として，酸素フラスコ燃焼法と原子吸光法を組合わせて行なったところ若干の知見が得られたので報告する．

実験の部

1. 試　料

試料のゴムは輸液セットに用いられるゴム管ならびにシート状ゴムで，原料ゴムおよび添加された亜鉛化合物はつぎのとおりである．

試料A(輸液用ゴム管)：ラテックスを素材ゴムとし酸化亜鉛が添加されている．

試料B(シート状ゴム)：塩素化ブチルゴムを素材とし酸化亜鉛，Zincdiethydithio carbamate（以下EZと略す）が添加されている．

試料C(シート状ゴム)：イソプレンゴムを素材とし酸化亜鉛，EZが添加されている．

試料D(シート状ゴム)：イソプレンゴムを素材としEZ，ステアリン酸亜鉛が添加されている．

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）を用いた．

亜鉛標準溶液：金属亜鉛1.000gをとり，1N硝酸100 m*l* を加え加温して溶かし，冷後1N硝酸を加えて1000 m*l* とし標準原液とする．この液10m*l* を正確にはかり，0.5N硝酸を加えて正確に1000m*l* とする．この液1m*l* は亜鉛（Zn）0.01mgを含む．

ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液：ジエチ

* 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

ルジチオカルバミン酸ナトリウム（以下DDTCと略す）1g を水に溶かして 100m*l* とする．

クエン酸二アンモニウム溶液：クエン酸二アンモニウム 25g を水約 60m*l* に溶かす．これにブロムチモールブルー試液を指示薬として，液の色が黄色から青色になるまで，アンモニア水を滴下したのち水を加えて100m*l* とする．これを分液ロートに入れ，DDTC 溶液 2 m*l* を加え振りまぜ 5 分間放置後メチルイソブチルケトン（以下MIBK と略す）10m*l* を加え振りまぜ静置する．クエン酸二アンモニウム層を分離し，ふたたび MIBK10m*l* を加え激しく振りまぜ静置し，クエン酸二アンモニウム層を分離し，乾いたろ紙でろ過し，MIBK の細かいあわを取り除く．

硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウム40 g を水約 70m*l* に溶かし，以下クエン酸二アンモニウム 溶液の調製と同様に操作する．

ろ紙：東洋ろ紙 No. 50

酸素：日本酸素K. K. 製圧縮酸素

3. 装 置

燃焼フラスコ：浜田理化株式会社製 FH01-A 型（容量 500m*l*）．

原子吸光分析装置：Perkin-Elmer 403型．

pHメーター：Beckman 東芝株式会社 Expand matic 76型．

ポーラログラフ装置：柳本製作所製P 8 型．

直示天秤：Mettler M5SA 読取限度 0.001mg.

4. 試験溶液の調製

試料 10mg を 0.01mg まで正確にはかる．これを短冊形ろ紙（8 mm×40mm）に包み，燃焼フラスコのバスケットに入れ，ろ紙の一端をコイルに巻きつける．フラスコ内を酸素置換後フラスコを氷水中に入れ内部を充分冷却し，常法により燃焼させる．燃焼後，フラスコの上部まで充分冷却したことをたしかめたのち，フラスコ上部のメジャーリングピペットに20%塩酸 5 m*l* を入れる．塩酸が白金バスケット内に滴下するように流入させ，灰分を溶解しながら落し入れる．ついでメジャーリングピペットに水 5 m*l* を入れ流下させ白金バスケットを洗浄する．フラスコを水浴上で加熱し，内容物を溶解させ，蒸発乾固後 105° で 1 時間乾燥したのち，0.5N硝酸を加え溶解し，あらかじめ 0.5N 硝酸で洗浄したろ紙を用いてろ過する．ろ液は 0.5N 硝酸を加えて正確に50～100m*l* とする．これを亜鉛定量用試験溶液とする．別に同様に操作した空試験溶液を調製する．

5. 定量操作

直接法：試験溶液と空試験溶液を試験管にとり，直接原子吸光分析装置に吸入させ吸光度を測定した．測定条件は Table 1 に示した．

別に亜鉛の 0，25，50，100，150，200，250μg を含む標準溶液を正確にとり，0.5N硝酸を加えて正確に100 m*l* とし，同様に操作して作成して得た検量線から試験溶液中の亜鉛の含有量を求めた．

Table 1 Operating Conditions

Wave Length (nm)	213.8
Lamp Current (Hollow Cathode Lamp, mA)	15
Slit	4(3mm, 20Å)
Range	U. V.
Acetylene Flow Rate (Liter/min)	6, 4*
Acetylene Pressure (Kg/cm²)	0.55
Air Flow Rate (Liter/min)	23
Air Pressure (Kg/cm²)	2
Burner	Three-Slot

*DDTC-MIBK extraction method

DDTC・MIBK 抽出法：試験溶液および空試験溶液10 m*l* をとり，それぞれクエン酸二アンモニウム溶液10m*l* を加え振りまぜ，これに硫酸アンモニウム溶液 10m*l*，ブロムチモールブルー試液 2 滴を加え，液の色が黄色から青緑色になるまでアンモニア水を加えて中和し，さらに pH メーターを用いて液の pH を正確に 9.0 に調整する．[6] 内容物を少量の水を用いて分液ロートに移し，さらに水を加えて 100m*l* とする．これに DDTC 溶液 10m*l* を加えて混和し 5 分間放置したのち，MIBK 20m*l* を加えて激しく振りまぜる．静置して MIBK 層を分取し，これについて原子吸光分析装置を用いて吸光度を測定した．

別に亜鉛 0，10，20，25，30，35，40μg を含む標準溶液をとり，同様に操作して作製した検量線から試験溶液中の亜鉛含有量を求めた．

結果および考察

1. 試料片の作成について

試料の 5 ケ所の各部分から0.5 g ずつとり，0.2%の陰イオン系界面活性剤溶液中に入れ，[7] 5 分間振りまぜたのち流水中で 5 分間洗い，さらに蒸留水で洗う．室温で乾燥したのち，錆等を有しないきれいな鋏で約 1 mmに細切する．ついで水で洗いガラスろ過器を用い吸引ろ過する．細切試料をろ紙上にひろげ室温で乾燥させる．これを円錐状に盛りあげながらよく混ぜ合わせ，つぎに平らにひろげ，四分法を繰り返し試料を均等にする．その一部を五酸化リンのデシケーターに入れ，24時間放置後供試試料とした．

2. 灰化法における試料採取量の検討

測定誤差を少なくするため試料採取量を多くするとゴムの材質によっては灰化しない場合がある．このような場合は過酸化ナトリウムを試料に付着させて行う報告もあるが,[8] 過酸化ナトリウム中の亜鉛等の不純物の影響が大きく適当でない．そこで助燃剤を用いないで試料を完全灰化する方法を検討した．また試料の至適採取量をもとめるために以下の実験を行なった．

細切試料 5.00～25.00mg をはかり，燃焼フラスコに入れ，一回の燃焼で完全に灰化が終了しているかどうかを定量値から比較検討を行なった．

細切試料5，10，15，20，25mg をとり，常法により燃焼させたところ，試料Aの20mg採取のものは，外観上は灰化されたが，一方試料Bの20mg採取のものはカーボンの残留が認められた．しかしこの不完全灰化試料を新たなろ紙片で注意して包み，再び酸素置換後点火すると容易に灰化する．ただし，新たなろ紙に移し変えることは操作上煩雑で測定誤差を招きやすい．

以上の結果より1回の燃焼で操作を行なう場合は試料採取量を10mgとするのが適当であると判断した．

試料A，B中の亜鉛の定量を直接法を用いて行なった．その結果を Table 2 に示す．

Table 2 Results of Determination and Appearance of Ash

Sample	Amount of sample (mg)	Number tested	Combustion times	Appearance	Zn found (%)
A	5	3	1	normal	0.11—0.12
A	10	3	1	〃	0.11—0.12
A	15	3	1	〃	0.11—0.12
A	20	3	1	〃	0.09—0.11
A	25	3	1	insufficiency	0.08—0.10
A	20	3	2	normal	0.11—0.12
A	25	3	2	〃	0.11—0.12
B	5	3	1	〃	0.60—1.62
B	10	3	1	〃	1.60—1.61
B	15	3	1	insufficiency	1.56—1.60
B	20	3	1	〃	1.45—1.50
B	25	3	1	〃	1.40—1.43
B	20	3	2	normal	1.59—1.60
B	25	3	2	insufficiency	1.50—1.53

灰化物の外観が不完全とみられるものは測定値も低値を示しているが，2回目の燃焼結果はおおむね良好である．しかし定量結果から1回の燃焼で完全灰化させた方が適当なことが認められた．

3. 他の灰化法との比較定量値

10mg の試料を灰化する場合に，当然のことながらフラスコ燃焼法では瞬間に灰化されるが，硫硝酸灰化法や乾式灰化法は数時間以上要する．また試薬による汚染や目的元素の吸着，揮散等の差を見るため灰化法のちがいによる測定値の変動をしらべた．

硫硝酸灰化法　細切試料 10.000mg をはかり，ケルダールフラスコに入れ，硝酸 3～5 m*l* を加え，わずかに加温したのち一昼夜放置後硫酸0.5～1 m*l* を加え加熱する．硫酸の白煙が認められるまで加熱し，内容液が淡黄色～無色になったら冷後水を加えて煮沸する．これに水を加えて正確に50～100m*l* とし試験溶液とした．

乾式灰化法　細切試料 10.000mg をはかり，石英皿に入れ，硫酸0.5m*l* を加え，砂浴上で加熱し，乾固する．これを電気炉に入れ 450～500° で灰化する．灰化後 1 N 硝酸 25～50m*l* を加えて溶解後ろ過し水を加えて正確に 50～100m*l* とし試験溶液とした．

フラスコ燃焼法　同様に試料 10.00mg をはかり，「試験溶液調製の項」により調製した，

Table 3 Results of Determination of Zinc by Various Digestion

Sample	flask-combustion method	wet digestive method	dry digestive method
	Zn (%)		
A	0.11	0.11	0.10
B	1.60	1.60	1.57
C	0.39	0.39	0.37
D	0.17	0.17	0.16

The datum represents mean value of three tests. by DDTC-MIBK extraction method

以上の灰化法によって得た試験溶液について DDTC-MIBK 抽出法により亜鉛を定量したところ，その成績は Table 3 のとおりである．

これによれば硫硝酸灰化法とフラスコ燃焼法との差は認められなかったが乾式灰化法では，前二法に対し僅かに負の値を示した．またこれらの測定値は直接法による値とほぼ一致した．

4. 共存イオンの影響

Platte, Marcy[9] らは 1 μg/ml の亜鉛に対して 1000 μg/ml の K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Pb^{2+}, その他 SO_4^{2-}, NO_3^-, NO_2^-, PO_4^{3-}, CO_2^{2-}, SiO_3^{2-}, Br^-, BO_3^{3-} を共存させた場合でも原子吸光法による亜鉛の定量値は 0.97μg/ml から 1.02μg/ml の範囲で測定されることを報告している．

ゴム試料中の亜鉛の量に比して1000倍をこえる陰イオン陽イオンは存在しないので通常の医療用ゴム中の亜鉛の定量に際して障害因子としてのイオンは考慮する必要はないと思われる．

しかしながらカテーテルのように多量の鉄を含む医療用ゴム製品もあるので Fe^{3+} の障害について検討した．

直接法による検討　試験溶液 A から亜鉛を 4.4μg ずつ含む液量をとる．試験溶液Bからは 16μg ずつをとり蒸発皿に入れ水浴上で蒸発乾固したのち，Fe^{3+} を 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000μg を加え 0.5N 硝酸を加えて溶解し，0.5N 硝酸を加えて正確に一定量とし，これを直接原子吸光分析装置に導入させて障害の有無をしらべた．

以上の結果を Table 4 に示した．

これによれば直接法，DDTC-MIBK 抽出法共に Fe^{3+} の共存は分析精度に影響しなかった．

Table 4 Influence of Iron on Recovery of Zinc

Zn(μg)	Fe added (μg)						
	500	1000	1500	2000	3000	4000	
	Recovery of Zinc (%)						
4.4	100.0	100.1	101.0	103.0			by Direct method
16.0	99.4	99.7	100.2	102.2	103.2	104.2	by Direct method
4.4	100.0	100.0	100.1	103.3	103.5	104.4	by DDTC-MIBK extraction method
16.0	99.8	99.9	100.1	101.2	102.1	103.5	by DDTC-MIBK extraction method

The datum represents mean value of three tests

5. 回収率

試料 10.00mg ずつをはかり，燃焼フラスコで灰化させたのち，塩酸を加えて溶解する．これに亜鉛標準溶液から亜鉛を 0～100μg とり，添加する．蒸発乾固後 0.5N硝酸に溶かし0.5N硝酸を加えて正確に 50～100ml とする．これを原子吸光分析装置に導入させ添加回収率を測定した．その結果を Table 5 に示した．

これによれば試料Aについては平均値104.15%，変動係数5.81%，試料Bでは平均値 98.98%，変動係数 4.79%であった．

Table 5 Recovery of Zinc Added to Digestive Solution of Rubber Sample

Present (μg)	Added (μg)	Found* (μg)	Recovery (%)
	Sample (A)		
11	10	22—23	110.0—120.0
11	20	32—34	105.0—110.0
11	30	41—42	100.0—103.3
11	40	50—51	100.0—102.5
11	50	60—61	98.0—100.0
	Sample (B)		
160	20	180—182	100.0—110.0
160	30	189—192	96.7—106.7
160	50	208—212	96.0—104.0
160	70	226—230	94.3—100.0
160	100	253—258	93.0— 98.0

* Three analyses

The average recovery and the standard deviation
Sample (A) : 104.15±6.06%　(C.V=5.81%)
Sample (B) : 98.98±4.75%　(C.V=4.79%)

6. ポーラログラフ法による全亜鉛の定量

他の分析法のうち，ポーラログラフ法は，亜鉛の定量法としてしばしば用いられている．[10,11] そこで本法による測定値との比較を目的として実施した．

供試試料約 1 g を精密にはかり，硫酸 1 ml を加え，水浴上で加熱し反応が止んだら砂浴上で加熱する．硫酸の白煙が発生したら電気炉に入れ450～500°で灰化する．灰分を少量の水で潤おし塩酸 1 ml を加え，水浴上で蒸発乾固し，更に塩酸 1 ml を加え同様に操作する．これに 1 N塩化アンモニウム・アンモニアを支持電解液とし

て加え溶解し，100mlとする．これを試験溶液とし，支持電解液で適宜希釈し，以下標準添加法によるポーラログラフ法を適用し，常法により亜鉛を定量した．[12]

その結果を Table 6 に示す．

Table 6 Results of Determination of Zinc in Rubber by Polarography

Sample	Zn (%)
A	0.12
B	1.62
C	0.40
D	0.18

The datum represents mean value of three tests.

これによれば，乾式灰化法とポーラログラフィーの組合わせによる定量結果は，本法とおおむね一致した．

結　語

ゴム質中の全亜鉛定量法として，酸素フラスコ燃焼法と原子吸光法を組合わせて注意して行なえば，迅速かつ簡便な方法として適用できることが認められた

試料の採取量は，1回の燃焼操作で完全に灰化できるように秤取する．その量はおおむね10mgが適当であるが，ゴム質によっては20mgでもよい場合がある．

灰化時における目的元素の吸着や，試薬による汚染を考慮する必要はほとんどなく，原子吸光法により溶媒抽出を行なうことなく精度よく定量できる．

ただし試料の細切，洗浄，乾燥，保存には充分注意する必要があり，特に試料のひょう量誤差には充分留意しなければならない．

謝辞　本研究にあたり，試料の提供をいただいた日本工業標準調査会専門委員会委員長国沢信太郎氏に深謝いたします．

文　献

1) 石井猛，武者宗一郎：分析化学，19，558，1970
2) 石井猛，武者宗一郎：*ibid.*，20，489，1970
3) Ostrmow, H. und Hoffman, W.: *Unteschung von Bendargenstanden aus Gummi*, 50, 1971, Bundes Gesundheits Amtes
4) 厚生省編：衛生検査指針，III—I—IX，15，1969，協同医書出版
5) 西田茂一，小林史尚：東京衛研年報，24，167，1972
6) 千葉盛人，渡辺欣愛：公害分析指針 4，水　土壌編 1—6，40，1972，共立出版
7) British Standard Institution: *British Standard*, 3263, 6, 1960
8) 倉橋一，野村秀明，山本慧介：日本ゴム協会誌，4，11，60，1974
9) Platte, J. A. and Marcy, V. M.: *Atomic Absorption News Letter*, 4, 289, 1965
10) 辰濃隆，神蔵美枝子，石田康雄，谷口尚樹：国立衛生試験所報告，88，107，1970
11) 藤永太一郎，丸山正生：化学の領域増刊号，50，143，1962
12) 日本薬学会編：衛生試験法注解，289，1973，金原出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 155—160, 1975

冷却生乳の細菌学的品質評価法に関する検討

松本昌雄* 神保勝彦* 北原康弘*
村上一* 春田三佐夫*

Studies on Assessment of the Bacterial Quality of Cooled Raw Milk

MASAO MATSUMOTO*, KATSUHIKO JINBO*, YASUHIRO KITAHARA**,
HAJIME MURAKAMI* and MISAO HARUTA*

During the period from November through December 1974, a total of 68 raw milk specimens was obtained from the two milk plants in Tokyo. In this study, the nitrate reduction procedure and a modified resazurin reduction procedure with ATP were subjected for their accuracy for the evaluation of bacteriological quality of raw milk. The modified resazurin reduction procedure with ATP was found to be more adequate than the nitrate reduction procedure, for the evaluation of the quality of domestic raw milk. Since in Japan, about a half of the domestic raw milk produced were found to be containing some amount of a naturally derived substance quite resembling to nitrate, when they were tested by the IDF procedure.

生乳の細菌学的品質評価法として，直接鏡検法やレサズリン色素還元法（以下レ法と略す）などが利用され，中でも迅速性，簡便性の点ですぐれているレ法が生乳生産管理の場で広く採用されている．また，本法は食品衛生検査指針[1]や日本薬学会協定衛生試験法[2]にも鮮度試験法の一つとして採用されている．

本法はたしかに従前のように生乳の衛生管理が不十分で，しかも冷蔵施設が普及していなかった状況の下では，いきおい生乳の細菌叢が中温菌優位の態勢にあるため，細菌数とレサズリン還元速度との間に高い相関性が認められたのは事実である．しかし，将来，生乳の生産管理，とくに搾乳衛生管理が進歩，徹底し，加えて冷蔵施設の普及にともない，生産から処理に至る間生乳の冷却，保冷の体系化が進むにつれて，必然的に中温菌にかわって低温菌が生乳中細菌叢の主位を占めるものと想像される．従って，このような試料に対して従来方式の色素還元法を適用しても信頼に足る結果は得られないと考えねばならないし，事実，各関係者の間で冷却生乳の細菌学的品質評価法としてレ法に代るべき新しいより簡易な検査法の開発が望まれている．例えば国際酪農連盟[3]は硝酸塩還元法をバルク冷却生乳の細菌学的評価法の一つとして提案している．

そこで，筆者らは国際酪農連盟提案の硝酸塩還元法の実用性について都内乳処理場に搬入された冷却生乳を試料として検討する一方，レ法の反応速度に及ぼす補酵素（ＡＴＰ，ニコチン酸アミド）の影響並びに補酵素添加レ法の実用性についても検討してみた．以下その成績について報告する．

試料および方法

1） 試料：都内の乳処理場にタンクローリで搬入された冷却生乳68例を対象とした．

2） 方法：硝酸塩基還元試験は Loane の方法[4]に準拠して行ない，レサズリン還元試験は食品衛生検査指針にもとづいて37°並びに30°で30分，60分（さらに15分および45分を追加）ごとに標準色調表（４等級区分）と比較して判定した．なお，検体によっては90分，120分まで観察した．供試補酵素としては，ろ過滅菌したＡＴＰ並びにニコチン酸アミド（以下ＮＡと略す）を用い，それぞれ0.1%および0.5%になるように検乳に添加した．

生菌数は定法に従い，グラム陰性低温菌数は Olson[5]らの方法に準拠して算定した．

成績および考察

硝酸塩還元法における発色試薬の検討

生乳試料17例（標準平板値 44万～4,400万/m*l*，25°—

* 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
**東京都衛生局日野牛乳検査室

表—1　生乳の細菌数と硝酸塩還元時間

1次培養温度	硝酸塩還元時間 (hr.)	標準寒天培地測定値 (×10⁴/ml) 35°—48hr. 培養 ≦20	21～100	110～400	410～1,000	≧1,100	平均値	範囲	25°—72hr. 培養 ≦20	21～100	110～400	410～1,000	≧1,000	平均値	範囲	CVT 寒天培地測定値 (×10⁴/ml) 25°—72hr. 培養 ≦20	21～100	110～400	410～1,000	≧1,100	平均値	範囲
15°	1																					
	2																					
	3			1例			130						1例	1,700					1例		520	
	4					1例	3,100						1例	8,800						1例	3,700	
	≧5		7例	3例	1例	1例	330	33～2,600		6例	2例	2例	2例	680	21～4,700	2例	5例	2例	2例	1例	250	7.5～1,400
25°	1																					
	2			1例	1例	1例	1,200	130～2,600					3例	4,100	1,700～8,800				2例	1例	1,700	520～3,700
	3					1例	2,600						1例	4,700						1例	1,400	
	4		4例	3例			520	44～3,100		3例	2例	1例	1例	1,500	60～8,800		4例	2例	1例		590	23～3,700
	≧5		3例				54	33～65		3例				57	21～93	2例	1例				16	7.5～23
30°	1					1例	3,100						1例	8,800						1例	3,700	
	2			1例	1例		300	130 470					2例	1,700	1,700 1,700				2例		700	520 870
	3		4例	3例		1例	330	44～2,600		3例	2例	1例	2例	880	60～4,700		4例	2例	1例	1例	310	23～1,400
	4																					
	≧5		3例				56	33～65		3例				57	21～93	2例	1例				18	7.5～23

72hr 測定値 67万～8,800万/ml, 25°—72hr CVT 寒天測定値 23 万～3,700万/ml）について硝酸塩還元試験を FR 試薬（FOLLET & RATCHLIFF 試薬）並びに GR 試薬（GRIESS-ROMIJN 亜硝酸試薬）の２種類の発色剤を用いて比較検討した．

その結果，FR 試薬を用いる定法では各試料とも硝酸塩還元陰性であったのに対して，GR 試薬を用いた変法（以下 GR 法と略す）では２次培養の直前に（すなわち，15°—22hr の１次培養直後），すでに陽性を示した．これは，FR 並びに GR 試薬の感度の違いによるものと考え，検討したところ，FR 試薬は GR 試薬にくらべて 1/300 程度感度が低いことが明らかとなった．

硝酸塩還元法における１次・２次培養温度の組合わせの検討

Loane[4] は，細菌数（標準平板値および低温菌数）と硝酸塩還元法（以下硝還法と略す）の相関度は，１次と２次培養温度の組合わせ（15°/15°, 15°/20°, 15°/25°および15°/30°）によって異なり，中でも15°/30°の組合わせの場合が最も高い相関を示すと述べている．

そこで，生乳17例（発色試薬の比較実験に供試した生乳と同一のもの）について追試検討を行なった．その結果このような細菌学的品質を示す生乳では，１次および２次培養温度のいかんにかかわらず硝還法（定法では２次培養５時間あるいはそれ以上の時間で判定することになっている）では，５時間判定でいずれも陽性を示し，Loane の実験成績とは一致しなかった．これは，おそらく，われわれの供試生乳が Loane のそれとは異なり中温菌が優位であったこと，発色試薬の感度の違いなどに起因するものと思われる．

１次培養における培養温度と硝酸塩還元速度の関係

前項の実験結果から，本試料は２次培養を行なうまでもなく，１次培養中にすでに硝酸塩還元反応が陽性を示すものと考えて，生乳14例（標準平板値33万～3,100万/ml, 25°—72hr 測定値21万～8,800万/ml, 25°—72hrCVT 寒天測定値7.5万～3,700万/ml）について15°，25°および30°の各温度で１次培養をしながら，１時間ごとにGR試薬による硝酸塩還元試験を行なった．その結果，硝酸塩の還元は各試料とも 30° の場合が最も早い傾向を示した．

次に，各細菌数と各温度における硝酸塩還元時間との関係を表—１に示したが，標準平板値は 30° における硝還法結果と，25°—72hr 測定値および ＣＶＴ 寒天測定値は30°並びに25°における硝還法結果との間にそれぞれ相関性があるように思われた．

今回の実験では供試例数が少ないので，これらの成績から直ちに結論することはできないまでも，硝還法の１次培養の結果だけで細菌学的な品質評価が可能な生乳では，硝還法を 30° で行なった場合に，各作用温度のうちでも比較的正確な低・中温菌の概数を迅速に推測できるものと考えられる．

硝酸塩還元法の実用性

前記の供試乳とは，異なる地域で生産された生乳24例（標準平板値 16万～780万/ml, 25°—72hr 測定値 22万～1,800万/ml, 25°—72hrＣＶＴ寒天測定値5.7万～560万/ml）について，ＧＲ試薬による硝還法を試みた．その結果，いずれの試料も１次培養１時間判定で陽性であった．これは試料中に添加された硝酸塩が，細菌によって還元された結果，陽性を示したものではなく，12/24例は供試前にすでにＧＲ試薬で検出可能な量の亜硝酸塩を含有していたことによるものであった．

残りの同陽性試料12/24例は，一般の生乳にくらべて，還元物質含有量が多いために，このような現象が起きたものと思われる．

このように，ＧＲ試薬を用いた場合，全試料が試験直

表—２　レサズリン還元試験従来法に対するＡＴＰ添加法の変色時間

培養温度	従来法に対するＡＴＰ添加法の変色時間の比	例数(%)	菌数平均値（範囲）$\times 10^4$/ml		
			標準寒天培地		ＣＶＴ寒天培地
			35°—48hr. 培養	25°—72hr. 培養	25°—72hr. 培養
37°	1/2 以上短縮	20 (61)	66 (16～510)	80 (22～440)	430 (10～5,500)
	1/2 未満短縮	11 (33)	79 (20～150)	130 (21～310)	52 (5.7～170)
	同　じ	2 (6)	(87, 280)	(60, 510)	(23, 420)
30°	1/2 以上短縮	18 (90)	130 (20～470)	330 (22～1,700)	110 (5.7～650)
	1/2 未満短縮	2 (10)	(54, 150)	(150, 230)	(32, 47)
	同　じ	0			

後に陽性を示したことから，GR試薬はこの種の試料に関する限り不適当と考えた．そこで，GR試薬よりも感度の低いFR試薬を用いて同生乳（ただし，4°—3日間保存試料であり細菌学的品質は表2のとおり）中の亜硝酸塩の検出を試みたところ，いずれも陰性であった．そこで，直ちにこれらの試料24例についてFR試薬による硝還法を定法に準じて行なった．

その結果，17/24 例は，1次培養直後（15°—22hr 保持）に，7/24例は2次培養で1～6時間にそれぞれ陽性を示したが，いずれも硝酸塩還元時間と細菌数との間に相関性は認められなかった．さらに，30°（この温度は前項の実験結果にもとづいて選択採用した）で1次培養を行ない，両者の関連性を求めたが，前記の場合と同様，相関性は認められなかった．

以上，硝還法について検討した結果，本邦の生乳は，中温菌および低温菌が共存するという実態，並びに当初から亜硝酸塩を比較的多量に含む生乳が存在するという事実等を考慮すると，本法を直ちに細菌学的乳質評価の方法として採用することは時期尚早であろうと思われる．

レサズリン色素還元速度におよぼす補酵素の影響

補酸素添加法のレサズリン変色所要時間は従来法のそれと比較して短縮された．NAの場合，それほど反応促進効果は認められなかったが，ATPの場合は表—2に示したように著しく反応が促進されて検体の90%以上が，その変色所要時間が短縮され，とくにグラム陰性低温菌において顕著であった．

このように，ATP添加法は反応の促進効果があるだけでなく，従来法よりも1桁少ないレベルの細菌数までも短時間で推測できることが明らかとなった．次に 37° 並びに 30° で従来法とATP添加法の比較実験を行なって，低温菌数（25°—72hr CVT平板測定値）との関係を求めて表3～4に示した．

これらの成績によると方法のいかんにかかわらず，37°よりも30°で試験する方が，より正確な低温菌数が推測できるようであり，しかも 30° で行なうATP添加法が，その中でも低レベルの菌数を推測することができた．しかし，低温菌が優位の態勢を示している生乳について，本法が直ちに実験成績どおりの少ない低温菌数を把握し得る方法であると結論することはできない．

表—3 生乳の低温細菌数と 37°C におけるレサズリン還元試験ATP添加法

判定時間（分）	方法	色調	低温細菌数 ×10⁴/ml					
			≦20	21～100	110～400	≧410	平均値	範囲
30	従来法	0	20例	1例	0	1例	35	0.75～550
		1	3例	8例	2例	1例	87	2.3～560
		2	0	6例	4例	0	97	36～270
		3	0	1例	2例	0	132	46～230
		4	0	0	2例	0	160	120, 200
	ATP添加法	0	3例	0	0	0	2	0.75～2.3
		1	19例	0	0	0	4	2.3～20
		2	1例	9例	4例	1例	107	23～550
		3	0	1例	0	0	52	52
		4	0	6例	6例	1例	134	36, 565
60	従来法	0	13例	0	0	0	7	0.75～20
		1	10例	2例	0	0	14	2.3～26
		2	1例	7例	3例	2例	145	5.7～560
		3	0	4例	2例	0	101	36～270
		4	0	3例	5例	0	116	37～230
	ATP添加法	0	0	0	0	0		
		1	11例	0	0	0	7	0.75～16
		2	11例	3例	0	1例	54	2.3～550
		3	0	1例	0	0	42	42
		4	1例	12例	10例	1例	115	5.7～560

表—4　生乳の低温細菌数と30°Cにおけるレサズリン還元試験ＡＴＰ添加法

判定時間（分）	方法	色調	低温細菌数 ×10⁴/ml					
			≦20	21～100	110～400	≧410	平均値	範囲
30	従来法	0	5例	8例	3例	1例	110	5.7～650
		1	0	8例	5例	1例	124	26～560
		2	0	3例	5例	3例	442	37～2,800
		3	0	0	0	2例	910	420, 1,400
		4	0	0	1例	1例	1,950	200, 3,700
	ＡＴＰ添加法	0	0	0	0	0		
		1	4例	13例	4例	2例	117	5.7～650
		2	0	5例	8例	2例	345	37～2,800
		3	0	1例	1例	0	147	43, 250
		4	0	1例	1例	4例	1,868	37～3,700
60	従来法	0	5例	4例	1例	0	48	5.7～270
		1	0	7例	4例	0	84	23～250
		2	0	4例	3例	2例	229	26～650
		3	0	2例	4例	1例	243	37～520
		4	0	2例	2例	5例	658	43～2,800
	ＡＴＰ添加法	0	0	0	0	0		
		1	4例	4例	1例	0	48	7.3～270
		2	1例	7例	7例	0	94	5.7～250
		3	0	0	0	1例	560	560
		4	0	7例	7例	7例	589	26～3,700

すなわち，前記の結果は各供試試料とも中温菌数が多いために低温菌よりも，むしろ中温菌の還元能に負うところが大きいからである．

このように，中温菌と低温菌の菌数が，ともに多く，しかも両者が正の相関を示すような生乳では従来のレ法を用いて中温菌数を測定し，その結果から低温菌の多寡を間接的に推測できるものと考えられる．しかし，低温菌並びに中温菌をあわせた概数をより正確に推測するにはレサズリン色素還元試験を従来の37°よりも30°で実施した方がよいと考える．

以上，ＡＴＰ添加法は従来法に比較して変色所要時間が短かく，しかも，低いレベルの菌数までも推測できることが明らかとなったとはいえ，現在これを直ちにわが国の生乳の細菌学的簡易検査法に採用しても，それほどの利点はないと考えられる．

すなわち，わが国の生乳のように貯乳時間が短かく，しかも中温菌数と低温菌数がともに多いような乳質では，中温菌を対象とする従来のレ法で十分，品質評価が可能であり，あえて補酵素（ＡＴＰ）を用いて試験判定の所要時間を短縮する必要はないと考えるからである．

ただし，従来法よりも低いレベルの菌数を推測したいと望む場合や，あるいは今後，わが国の生乳の細菌叢が低温菌で占められる場合には，検査の迅速性（判定所要時間短縮）並びに精度の点で従来法に優るＡＴＰ添加法の実用性が多いに期待できると考えられる．

結　論

昭和49年11月～12月に受入されたＡおよびＢ乳業㈱東京工場の原料乳を対象試料として硝酸塩還元法並びに補酵素（ニコチン酸アミドあるいはＡＴＰ）の利用によるレサズリン還元法の改良を行なって，生菌数および低温菌数などとの関連性を検討し，次のような成績を得た．

(1)細菌数と各温度（15°，25°，30°）で行なった硝還法の結果との相関性は，30°で行なった場合に最も高い傾向を示した．

しかし，生乳によっては当初から比較的多量の亜硝酸塩を含み，硝還法に支障をおよぼすものもあることから，直ちに本試験を低温菌簡易検査に利用することは，なお問題が残される．

(2)補酵素（ＮＡあるいはＡＴＰ），とくにＡＴＰの利用によって，レサズリン還元試験の反応速度は著しく促

進され，その結果，従来法よりも低いレベルの菌数をより短時間で推測できることがわかった．

(3)低温菌および中温菌のあわせた概数を，より正確に推測するにはレサズリン還元試験の作用温度を37°よりも30°に下げることが望ましい．

文　献

1) 厚生省編纂：衛生検査指針Ⅲ，食品衛生検査指針，1，1959，東京
2) 日本薬学会編：衛生試験法注解，1973，東京
3) 日本国際酪農連盟：第56回国際酪農連盟年次会議報告，24，1099，1972
4) Patrica, C. L.: *The Australian Journal of Dairy Technology*, 3, 18, 1972
5) Olson, H. C.: *J. Dairy Sci.*, 46, 362, 1963

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 161—164, 1975

加熱損傷 *S. anatum* におよぼす選択培地の影響ならびに修復について

神保勝彦* 神崎政子* 松本昌雄*

Effects of Selective Plating Media on the Growth of Heat-Injured *Salmonella anatum* and Its Resuscitation

KATSUHIKO JINBO*, MASAKO KANZAKI* and MASAO MATSUMOTO*

When *Salmonella anatum* cells were heated at 55°C for 10 minutes, more than 70% of the viable population was unable to reproduce on a selective plating media.

Heat-injured cells were failed to form colonies on a nonselective plating media, but could form colonies if they were supplementes with 1% of Tryptose and 0.1% of Glucose.

Resuscitation of heat-injured cells occurred more or less immediately after pre-enrichment treatment. When the injured cells were treated in the Sodium Pyruvate Solution, they were recovered and grew well to the level equal to that of normal cells. The recovery of the cells were also possible in Tryptose Broth and Tryptone Broth, but they required 2 more hours for their resuscitation than they were treated in the Sodium Pyruvate Solution.

加熱，凍結，乾燥，薬剤などによる被損傷菌の存在については，基礎並びに応用細菌学的分野で1960年頃から注目され，[1-4] 今日では分子レベルにおける解析の段階に至っている．[5-8]

一方，従来から衛生細菌学的分野で採用している検査法は，開発にあたって一応，非損傷菌を対象として検討されたものであると考えざるを得ない．ところが，今日のように加工食品が多様化し，しかも加工処理法が複雑化するにともなって各種損傷因子による被損傷菌の出現が当然想定され，さらにそれらが再び食品中で回復することも予測される．

そこで仮に，それら被損傷菌が伝染病原菌や食中毒起因菌で，漸次食品中で回復増殖することがあるとすれば，予防衛生上あるいは品質管理上，等閑視できない問題である．従って，これに対処する意味で被損傷菌の復活をはかるための検査法の開発が必要であると考える．

そこで，被損傷菌に関する基礎実験の一端として加熱損傷サルモネラ菌（*S.anatum*）の分離培地に対する発育態度並びに損傷修復物質の一部として知られているピルビン酸ナトリウム，Tryptose，ブドウ糖などの損傷菌に対する影響について検討を試みた．

実験材料および方法

1．**被損傷菌**：当研究科で食肉から分離した *S. anatum* を供試菌として用いた．本菌の35°—18hr トリプトースブイヨン培養菌液を遠沈して集菌し，これを滅菌生理食塩水で2回洗浄した後，55±1° の0.1Mリン酸緩衝液に菌量が10^8～10^9/m*l* になるように懸濁させ，同温度で10分間保持して加熱損傷菌を調製した．

2．**培地**：日水(株)製の標準寒天培地（ＰＣＡ）および普通寒天培地（ＮＡ），Difco 製の Tryptose Agar（ＴＡ），Tryptose Phosphate Agar (TPA)，Tryptic Soy Agar (TSA)，Heart Infusion Agar (HA) 並びに選択培地として日水(株)製のＳＳ寒天培地，ＭＬＣＢ寒天培地，ＤＨＬ寒天培地，栄研(株)製のＸＬＤ寒天培地などを用いた．なお，これらのほかに，前記の非選択培地についてはブドウ糖含有量0.1%にそろえたものと，逆にブドウ糖を除去したものをそれぞれ調製して対象とした．

3．**損傷菌修復処置液**：Tryptose，Tryptone，Peptone，肉エキス，酵母エキス，Cosamino acids（以上 Difco 製），Phytone（ＢＢＬ製）の各1%溶液ならびにブドウ糖，乳糖，蔗糖，マンニット，キシロース，ピルビン酸ナトリウム（以上和光純薬製）の各0.1% 溶液

* 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

を用いた.

被加熱損傷菌を25°の修復処置液に所定時間作用させてから平板培地に0.1m*l* 塗抹して，35°—18hr 培養後に菌数を測定した.

結果および考察

1. 選択培地の影響

非損傷 *S. anatum* のDHL測定値は，TAのそれにくらべて90%程度であるが，これに対して加熱損傷菌では加熱時間が長くなるにつれて，その差が顕著で，TAに対するDHL測定値は55°—1分加熱菌で50%，10分加熱菌で30%，12分加熱菌で0%であった（図—1）. これは損傷の著しい細菌ほど選択培地中の選択因子に強く影響されることを示すもので諸報告[3,5,9]の結果と一致している. この主因は，おそらく細胞膜の選択透過性が失われて培地中の胆汁酸塩が侵入する結果，感受性が高まったためと考えられる. 続いて，加熱損傷 *S. anatum* の各種非選択培地およびブドウ糖含有あるいは欠如自製非選択培地に対する発育態度を代表的な分離選択培地のそれと比較観察した.

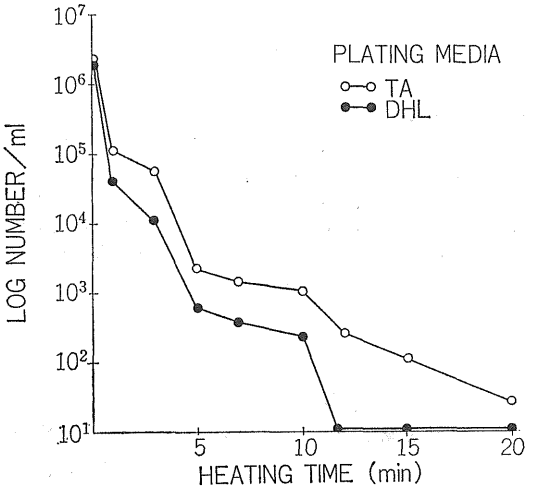


Fig. 1. Survior curves for *S. anatum* heated in 0.1M phosphate buffer, pH 7.0 at 55°.

Table 1. Effect of plating media on viability of heat-injured *S. anatum*.

Plating medium	Viable count	Percent
TA	1,200	100
TA−Glucose	800	67
TPA	1,200	100
TPA−Glucose	830	69
PCA	780	65
PCA−Glucose	600	50
NA	610	51
NA+Glucose	790	66
TSA	620	52
TSA+Glucose	830	69
HA	760	63
HA+Glucose	1,100	92
DHL	390	33
MLCB	350	29
XLD	240	20
SS	300	25

Note : Viable count on TA was taken as control.

その結果は表—1に示したように，既知あるいは調製のいかんを問わず非選択培地上の集落数は，いずれも選択培地上の集落数よりも70～80%多く，しかも非選択培地の中では Tryptose とブドウ糖を含んだ培地での集落数が最も多く計測され，他の供試培地の集落数にくらべて1桁高かった.

2. 蛋白質ならびに糖類の影響

培地組成のうちで Tryptose が，最も強く損傷菌の修復に関与していると考えられるので，培養前の修復処置液として Tryptose 以外に，従来から一般培地の窒素源に使用されている Tryptone, Peptone, Casamino acids, Phytone 液などについて検討を試みた.

なお，参考までに非選択培地成分に多用されている酵母エキスや肉エキス液などについてもその影響を観察して，結果を図—2に示した. すなわち各修復液処置後の菌数を比較してみると Tryptose, Tryptone, Peptone

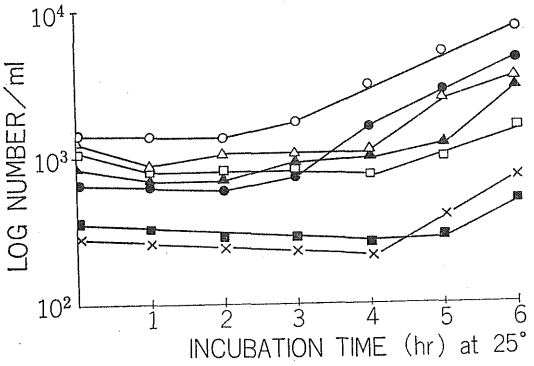


Fig. 2 Recovery and growth of heat-injured *S. anatum* in treatment media. The cells were heated in 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, at 55° for 10 min. The samples were plated on TA. Symbols : ○, incubated in Tryptose ; ●, incubated in Tryptone; △, incubated in Peptone; ▲, incubated in Yeast Extract ; □, incubated in Beef Extract ; ■, incubated in Phytone ; ×, incubated in Casamino Acids.

液の場合に菌数が最も多く，しかも三者間に大差は認められなかった．次いで，酵母エキス，肉エキス液処置の順に菌数が多く，Casamino acids と Phytone 液処置の菌数は前述の修復液のそれにくらべてかなり少なかった．この傾向は，処置3時間まで続き，4時間後には Tryptose や Tryptone 液処置の菌数と，その他の処置液の菌数との差が顕著となった．

次に，加熱損傷菌におよぼすブドウ糖，マンニット，キシロース，蔗糖および乳糖液の影響並びに従来からメタボライトの一部としてよく知られ，[10,11] しかも損傷菌の復活物質として利用されているピルビン酸ナトリウムを対象に比較検討を行なって，その結果を図―3に示した．

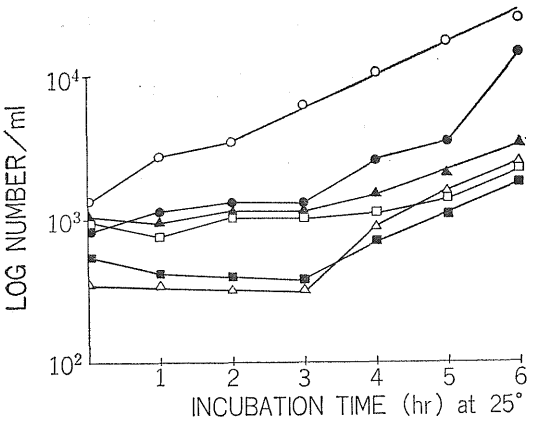


Fig. 3　Recovery and growth of heat-injured *S. anatum* in treatment media. The cells were heated in 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, at for 10 min. The samples were plated on TA. Symbols: ○, incubated in Pyruvate; ●, incubated in Mannitol; △, incubated in Saccharose; ▲, incubated in Glucose; □, incubated in Lactose; ■, incubated in Xylose.

処置直後の菌数は，ピルビン酸ナトリウムも各糖液で処置した場合もほとんど同じであったが，キシロースや蔗糖液の場合にやや菌数が少ない程度であった．処置1時間後，ピルビン酸ナトリウム液の修復促進効果は各種供試糖液のそれに比較して著しく顕著で，菌数は処理後の4倍にも達した．これに対して各糖処置による菌数は処置直後から3時間後まで変化なく推移し，4時間後にはじめて増加したが，各測定値間に大差なく，修復促進効果はマンニット，ブドウ糖，乳糖，蔗糖，キシロースの順であった．

このように，Tryptose やピルビン酸ナトリウムの発育促進効果が，非損傷菌では確認できず加熱損傷菌で顕著であったということは，諸報告[10-12]にもあるように，加熱損傷菌の栄養要求性が一時的に複雑化してある種の栄養素を必要としたり，あるいは酵素活性が一時的に低下したためと考えられる．

3.　修復処置と DHL 測定値

前項の成績から，Tryptose やピルビン酸ナトリウムが加熱損傷菌に対して復活促進効果を有することが明らかとなった．

そこで，加熱損傷 *S. anatum* をこれらの修復液で，前処置した後，DHL培地を用いて菌数を測定して，対照のTAのそれと比較した．その結果は図―4に示した

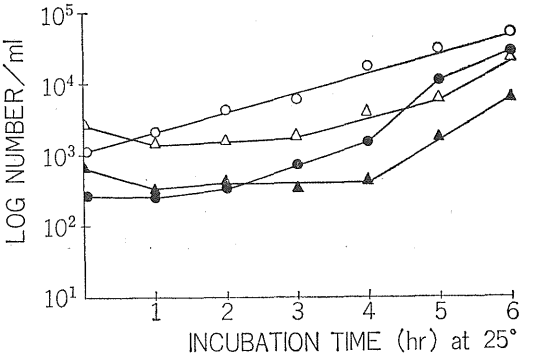


Fig. 4　Recovery and growth of heat-injured *S. anatum* in treatment media. The cells were heated in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, at 55° for 10 min. Symbols: ○, incubated in Pyruvate and plated on TA; ●, incubated in Pyruvate and plated on DHL; △, incubated in Tryptose and plated on TA; ▲, incubated in Tryptose and plated on DHL.

ように，ピルビン酸ナトリウム液の場合，処置直後から2時間後まで，Tryptose 液の場合は処置後4時間まで，菌数はほとんど増減を示さなかったが，それ以降は急増し6時間後には対象にほぼ近い菌数に達した．

このように，ピルビン酸ナトリウムで前処置した後DHLで培養した場合は，無処置で直接DHLに接種した場合に比べて，検出率が増加して90%以上の値を示すことが判った．

このように，ピルビン酸ナトリウムや Tryptose は，被加熱損傷 *S. anatum* の有力な修復促進物質の一つであることが明らかとなったが，これを食品衛生検査に応用するには，方法的にも技術的にもなお多くの解決されるべき問題が残されている．

要　約

食肉から分離した *S. anatum* の加熱損傷菌を用い

て，既存の分離培地並びに損傷菌の修復促進物質の一部として知られているピルビン酸ナトリウム，Tryptose，ブドウ糖および一般培地の窒素・炭素源あるいはその他の栄養源として多用されている数種類の物質などの修復効果について検討した結果，次のような成績を得た．

①Tryptose, Tryptone, Peptone, 酵母エキス，肉エキス，Casamino acids, Phytone などのうち，Tryptose 並びに Tryptone は他のものにくらべてきわめて著しい修復促進効果を示した．

②ピルビン酸ナトリウムの修復促進効果は，供試糖類と比較して顕著であり，糖類ではマンニット，ブドウ糖，乳糖，蔗糖，キシロースの順であった．

③ピルビン酸ナトリウム液で前処置した後，DHLで培養した場合は，無処置で直接DHLに接種した場合に比べて，検出率が増加して，90%以上の値を示した．

文　献

1) Iandolo, J. J. and Ordal, Z. J. : *J. Bacteriol.*, 91, 134, 1966
2) Allowood, M. C. and Rusell, A. D. : *J. Bacteriol.*, 95, 345, 1968
3) Clark, C. W. and Ordal, Z.J. : *Appl. Microbiol.*, 18, 332, 1969
4) 森地敏樹：化学と生物，7，400，1969
5) Ordal, Z. J. : *J. Milk Food Technol.*, 33, 1, 1970
6) Rosenthal, L. and Iandol, J. J. : *J. Bacteriol.*, 103, 833, 1970
7) Tomlins, R. I. and Ordnl, Z. J. : *J. Bacteriol.*, 107, 134, 1971
8) Tomlins, R. I., Pierson, M. D. and Ordal, Z.J. : *Can. J. Microbiol.*, 17, 759, 1971
9) Scheusner, D. L., Busta, F. F. and Speck, M. L. : *Appl. Bact.*, 28, 390, 1965
10) Baird-Parker, A.C. and Davenport, E. : *J. Appl. Bact.* 28. 390, 1965
11) 神保勝彦，松本昌雄，春田三佐夫：東京衛研年報，23，129，1971
12) 森地敏樹：食衛誌，13，173，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 165—167, 1975

食品細菌検査用試料調製のためのストマッカーとホモジナイザーの機能の比較評価

庭山邦子* 小久保弥太郎* 井草京子*

Comparative Evaluation of Suspending Ability of the Stomacher and of the Homogenizer for the Preparation of Bacteriological Food Specimens

KUNIKO NIWAYAMA*, YATARO KOKUBO* and KYOKO IGUSA*

For the evaluation of suspending ability of the Stomacher, food suspensions for the bacteriological examinations were prepared both by the Stomacher and the Homogenizer. Specimens used for this study were 237 of frozen foods, 122 fishpaste products, 69 raw oysters, 15 ground pork, and 66 hams and sausages. These two preparations for bacteriological tests were simultaneously tested by the Standard Plate Count (SPC) technique. Consequently, both of the SPCs/g obtained on each specimen were well agreed one-another, and statistically it was inferred that there was no significant differences between these two preparation techniques.

食品中の細菌数の検査を行なう際に，まず最初に実施しなければならない事は，一定量の検体を秤量して，その中に存在する細菌を効果的に一定量の希釈液中に，均一に分散懸濁させる作業である．この作業を独創的な方法で行う機械が，1972年に英国の Colworth[1] によって開発され，その懸濁方法が胃の消化作用に似ているところから，ストマッカーと呼ばれ，英国の Seward 社[2] から発売されている．

著者等は今回，最近欧米諸国の食品検査室で，広く使用され始めた[3]，このストマッカーによる食品検体の試料液作成を，日常検査法に採用することを企図した．その第一段階として，同一検体を2分して，一方をストマッカーで，他方をホモジナイザーで各々処理し，得られた両試料液をそれぞれ別個に混釈培養し，出現した細菌集落数を比較して，ストマッカーの試料液作成能を評価することを試みたので報告する．

材料および方法

1. 検体：1974年8月から12月までの間に，都内各保健所より，細菌検査の目的で当研究室に搬入された，市販食肉魚介類および同加工品計509検体で，運搬中10°以下に保持されたものを直ちに検査に供した．なお，これらの検体の内訳は，冷凍食品237件，魚肉ねり製品122件，生かき69件，ハム・ソーセージ66件，および豚挽肉15件である．

2. 希釈液：使用した希釈液は次の組成のものである．

A液：0.9%生理食塩液

B液：リン酸一カリウム　34g

1 N—水酸化ナトリウム175m*l*，蒸留水を加え，全量を1*l* とする．

A液800m*l* にB液1m*l* を加え，pH7.2に調整後，121°で15分間滅菌した．

3. 試料液の調製：同一検体から試料10g を2回ずつ秤量し，前記希釈液を90m*l* ずつ加え，一方は日本精機製ホモジナイザー（50～100m*l* 用）で，20,000rpm，2分間摩砕し，他方は，滅菌ポリ袋に入れたものを，ストマッカー400（80～400m*l* 用）に装着して，1分間作動させた．なお，これらの試料液は，必要に応じて9m*l* の希釈液を用いて10倍段階希釈を行なった．

4. 一般生菌数の測定：食品衛生検査指針に記載されている，「生菌数測定法」の項に準じて行なった．

成　績

今回調査の対象とした食肉魚介類および同加工品509検体の一般生菌数の分布を，処理方法別に集計比較したのが Table 1である．表から明らかなように，509検体中300以下に対応する部分を除いた，305検体中286検体（94%）は，1オーダー以内の誤差で，両法による処理

* 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

Table 1. Distribution of Viable Cell Counts Obtained on Various Food Suspensions Prepared Through Two Different Techniques

Viable cell counts/g, Stomacher \ Viable cell counts/g, Homogenizer	≦300	~10³	~10⁴	~10⁵	~10⁶	~10⁷	~10⁸	~10⁹
≦300	139	13	15		1			
~10³	17	8	11		1			
~10⁴	19	8	28	9		1		
~10⁵		2	20	73	12	3		
~10⁶			1	10	49	7	1	
~10⁷			1	9	31	3		
~10⁸						2	12	
~10⁹								3

Nose : Figures in the Table indicate the number of specimens.

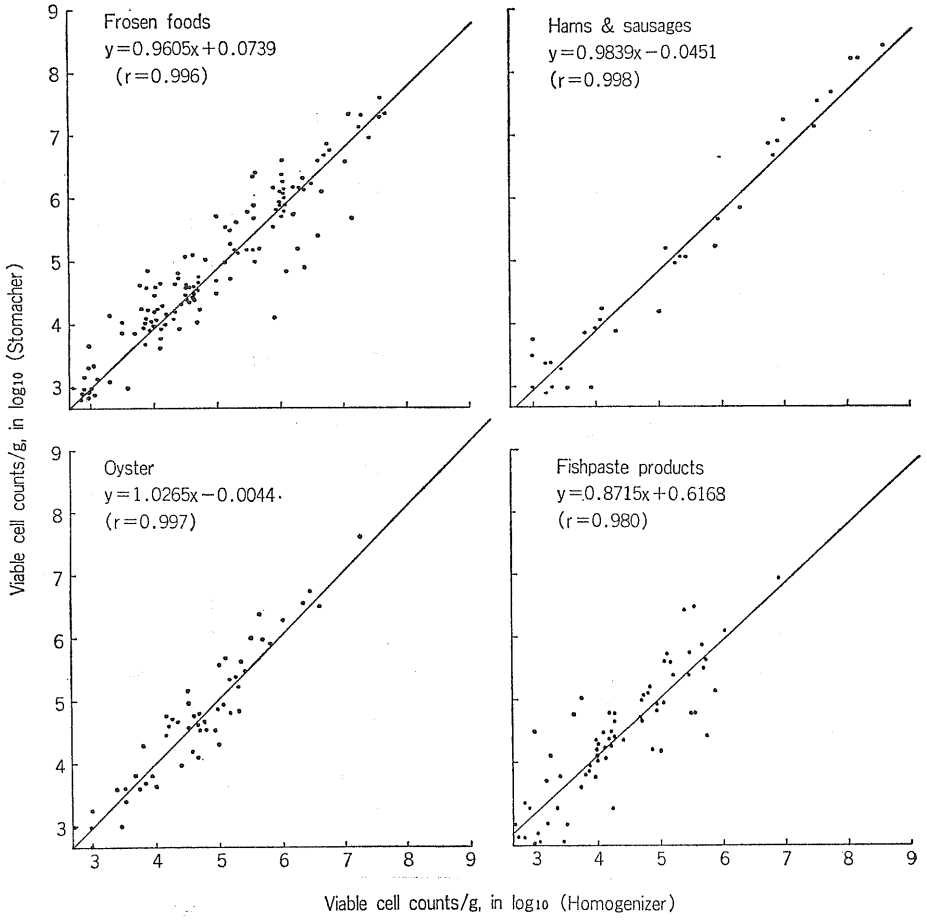


Fig. 1. Correlations observed on viable cell counts of various food suspensions prepared by the two techhiques.

液の成績が一致した.

Fig. 1は，両処理液またはそのいずれか一方で，生菌数300以下であったものを除いた4種類の食品284検体について，縦軸にストマッカー処理，横軸にホモジナイザー処理で得られた生菌数の対数値をプロットしたものである．各食品における両成績間の相関係数，回帰式は図に示した通りであった.

また，食品の形態別に次の3種類に大別し，それらの分散比（F）検定を行なったところ，1)生鮮食品である生かきおよび豚挽肉からなる66検体では，F＝0.0938，2)加工食品である魚肉ねり製品，ハム・ソーセージ，鯨ベーコンからなる108検体ではF＝0.0043，3)冷凍食品131検体では，F＝0.3855であり，両者の間に有意な差は認められなかった.

考察および結論

食肉魚介類および同加工品の細菌検査を，同時に多数の検体について実施する際，能率の良い試料液調製法を採用することが望ましいことは言うまでもない．この作業には，古くは滅菌乳鉢と乳棒で摩砕した食品を，希釈液中に懸濁する手工業的方法が用いられ，最近では，ホモジナイザーあるいはそれと同原理の機械が広く一般に用いられている．しかし，いずれの場合も検査しようとする検体数と同数の滅菌乳鉢，乳棒，あるいはホモジナイザーカップをあらかじめ準備しておかなければならないと言う難点が有る．特に後者の場合には，各部品間の互換性に多少問題が有り，騒音の発生や，故障の原因にもなっている．これに比して，ストマッカーによる試料液の調製には，あらかじめ準備しなければならない物は，滅菌ポリ袋だけと言う点，Sharpe等[1]が指摘しているように，労力と経費の節約になり，多数の検体の同時処理に大変便利である．また使用中の温度上昇も無視出来る位に小さいため，細菌検査には好都合であった.

そこでストマッカーの食品試料液調製能であるが，ストマッカーで消化された検体と，ホモジナイザーで調製された検体の，一般生菌数出現状況を比較したところ（Table 1およびFig. 1），両試料液調製法の間に，統計的な有意の差は認められなかった．このことは，今回調査の対象とした食品中の細菌が，ストマッカーで1分間消化させることにより，十分有効に懸濁し得たことを示すものと考える.

一方，ストマッカー消化の難点として挙げられた事は，1)魚介類の骨や貝殻片で，たまにポリ袋にピンホールが生じ，液漏れしたものが有った事，2)いか，かき等の場合に，消化された筋繊維がピペットに詰って，試料液の採取を困難にした事，および3)たこの場合は，あらかじめ検体に少し鋏を入れておかないと消化しなかったと言う点であった．これらの難点を解決するために，丈夫なラミネート袋（すでに試作品が出来ている）を外袋として二重に使用するとか，消化時間の調節，消化液量の変更等，何らかの工夫を必要とする．なお，今回は細菌検査用試料の調製のみについて検討したが，今回の試料のこなれ状態からも，試料袋からの妨害物質の溶出等，不都合な点を避ければ，化学的な食品検査の分野にも応用し得るものと考える.

文　献

1) Sharpe, A. N. and Jackson, A. K.: *Appl. Microbiol.*, 24, 175, 1972
2) Jackson, A. K.: A. J. Seward, UAC House, Reference 25, 1974
3) Mcmeekin, T. A.: *Appl.Microbiol.*, 29, 44, 1975
4) 厚生省環境衛生局監修：食品衛生検査指針Ⅰ，103, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 168—171, 1975

MPN法による食肉魚介加工品中の推定ウェルシュ菌数の測定

神崎政子* 神保勝彦* 村上 一* 春田三佐夫*

Enumeration of Presumptive *Cl. perfringens* in Meat and Fish Products by the Use of Most Probable Number Technique

MASAKO KANZAKI*, KATSUHIKO JINBO*,
HAJIME MURAKAMI* and MISAO HARUTA*

Duriug the period from May through June 1975, a total of 171 meat and fish products, which consisted of 50 hams, 109 sausages, 2 fish ham and sausage and 10 other products was subjected for the presence of *Clostridium perfringens*. All the specimens were obtained at each factory at the time of immediately after their procession. A simple multiple tube technique with a modified Shahidi-Ferguson Perfringens (SFP) medium was applied in comparison with the pouch method, for the enumeration of the presumptive organism in the products. Consequently, 103 (60.2%) out of 171 products examined were found to be contaminated with a greater than 0.3/g of the presumptive organism. Of them, 82 (53.8%) were being contaminated with 0.3~9.9/g of the presumptive organism, and solely detected by the MPN technique.

従来，嫌気性菌の検出同定には，特殊な設備と，複雑な手技を必要としたので，ある一定レベル以上の検査室でなければ，その検査ができないという難点があった．そのため，特に食品衛生分野での嫌気性菌研究が，臨床細菌分野のそれに比してやや立ちおくれている．まして，一般市販食品を対象にした，系統的な嫌気性菌汚染調査は，日本ではあまり試みられたことがなく，僅かに，ヨーロッパで，二，三の食品会社が，ウェルシュ菌を指標として，自主的な調査と規制[1]を行なっているに過ぎない．

今回，著者らは，フリルフラマイド（AF—2）使用禁止後の，食肉魚介加工品の嫌気性菌汚染を，製造直後の段階で，推定ウェルシュ菌を指標とした最確数（MPN）法で計測し，それらの製品の衛生細菌学的な品質評価をすることを試みたので報告する．

材料および方法

1. **使用菌株**：実験に用いたウェルシュ菌は，Hobbs 2型のNCTC8238株と，当所伊藤らが，食中毒患者糞便から分離したTW—6型株の2株である．なお，対照として，B型ボツリヌスBMN—2株と，E型ボツリヌスE—Iwanai株の2株を用いた．

2. **食肉魚介加工品およびその原料**：1975年5月～6月に，都内の食肉魚介加工品製造業から収去した，製造直後のハム50件，ソーセージ109件，魚肉ハム・ソーセージ2件，その他の製品10件および都内某水産加工業から提供された原料魚すり身10件の計181検体である．

3. **培地**

a) SFP半流動寒天：Shahidiら[2]によって報告された基礎培地の寒天量を0.05%に減じたものである．その組成は，トリプトース（Difco）15g，ソイトン（Difco）5g，イーストエキストラクト（Difco）5g，メタ重亜硫酸ナトリウム（和光純薬）1g，クエン酸鉄アンモニウム（和光純薬）1g，レサズリン酸ナトリウム塩（半井化学薬品）1mg，ポリミキシンB（台糖ファイザー）3万単位，カナマイシン12mg，寒天（Difco）0.5gを1,000m*l*の蒸留水に溶解し，pHを7.6に調製したものである．これを10m*l*ずつ中試験管（18×180mm）に分注し，121°で10分間滅菌した．なお，試料原液の培養用に，2倍濃度の培地も準備した．

b) LM半流動高層寒天：同じくShahidiら[2]によってウエルシュ菌の確認培地として開発されたものである．その組成は，トリプトース（Difco）15g，イーストエキストラクト（Difco）10g，ラクトース（純正化学）10g，燐酸二ナトリウム（和光純薬）5g，フェノールレ

* 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

ッド0.05g，寒天（Difco）3g，蒸留水1,000m*l* から成るものである．作成に当り，ラクトースとフェノールレッド以外のものを溶解し，pH を 7.5 に調整したのち，上記2試薬を加え，小試験管（13×96mm）に3m*l* ずつ分注し，118° で15分間滅菌した．

4. **希釈液**：試料原液の調整と希釈には，次の組成の希釈液を用いた．すなわち，0.9% 食塩液 800m*l* に，あらかじめ準備した pH7.2 燐酸緩衝液の原液 1m*l* を加え，試料原液の調製には 90m*l* ずつ，希釈用としては 9m*l* ずつを，それぞれ100m*l* 容希釈ビンまたは中試験管（18×180mm）に分注し，121° で 15 分間滅菌したもの

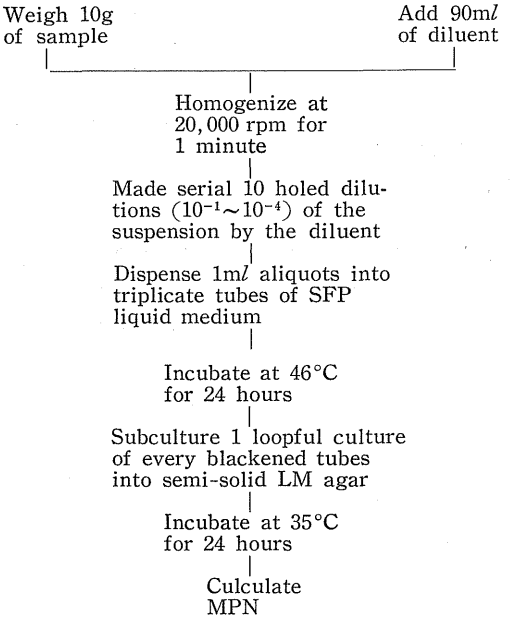


Fig. 1. Schematical presentation of the used enumeration technique for presumptive *Cl. perfringens* in food.

を用いた．なお，燐酸緩衝液の原液は，燐酸二水素カリウム（KH_2PO_4）34g を500m*l* の蒸留水に溶解し，これに約1Nの水酸化ナトリウム液175m*l* を加え，さらに蒸留水を加えて全量を1,000m*l* とし，pH を7.2に調整後，使用時まで冷暗所に保存したものである．

5. **推定ウェルシュ菌数の測定**：試料10g に希釈液90m*l* を加え，20,000rpm で1分間ホモジナイズし，これを試料原液とした．必要に応じて試料原液を10倍段階希釈し，試料原液は10m*l* ずつ，他の希釈試料は 1m*l* ずつ，それぞれ3本ずつのＳＦＰ半流動寒天に接種した．これらは，46° で24時間培養後，硫化水素の産生が認められ黒色の沈殿が生じたものを，ＬＭ半流動高層寒天にそれぞれ1白金耳ずつ移植した．接種の終った試験管は35° で24時間培養し，ラクトースの分解により培地色が黄変し，しかも運動性が認められなかったものを，推定ウェルシュ菌陽性として，各希釈列の陽性試験管数から，ＭＰＮ法により試料1g 当り推定ウェルシュ菌数を求めた．

成　績

1. **MPM 法と他の検出法の実験的比較**：前記実験室保存株を，炭酸ガス噴射下でＶＬ変法液体培地[3]に接種し，35° で24時間培養後，同じく炭酸ガス噴射下で，上記培地で10倍段階希釈を行なった．各希釈段階 1m*l* 中の菌数を，ガス噴射法（Roll tube culture method），[4] 平板法，[5] パウチ法，[6] およびＭＰＮ法により同時に計測した成績が Table 1 である．なお，菌数計測の際の培養は，ウェルシュ菌が46° 24時間，ボツリヌス菌が35° 24時間である．

表から明らかなように，培養液中のウェルシュ菌数は，いずれの検出法でも近似の値を示し，特に嫌気的な操作を必要としないＭＰＮ法で，十分その菌数測定の目的を達し得ることが判った．一方，対照として用いたＥ

Table 1. Comparative Recovery of *Cl. perfringens* and of *Cl. botulinum* by Four Different Isolation Techniques

Modified V. L. broth 24Hr. Culture of	Numbers of organisms/m*l* recovered by			
	Roll tube culture method	Plate culture method	Pouch culture method	MPN method
Cl. perfringens Hobbs' type 2 (NCTC 8238)	6.0×10^7	1.0×10^7	2.3×10^7	3.0×10^7
Cl. perfringens TW-6	8.0×10^8	1.9×10^6	1.7×10^7	4.5×10^8
Cl. botulinum type B (BMN 2)	3.2×10^7	—	—	2.5×10^1
Cl. botulinum type E (E-Iwanai)	2.2×10^5	1.5×10^4	3.0×10^4	1.1×10^5

Note : Dilution of the individual culture was made by the modified V. L. broth at an anaerobic condition. In the Table,—indicates not detectable.

Table 2. Sensitiveness of the MPN Procedure for the Detection of Presumptive *Cl. perfringens* in Raw Fish Meat

Fish-paste sample	Viable cell count/g	
	pouch method	MPN method
1. Codfish	$<10^1$	2.3×10^0
2. Codfish	5.5×10^2	$\geqq1.4\times10^2$
3. Codfish	$<10^1$	0.4×10^0
4. Shark	$<10^1$	1.5×10^0
5. Shark	$<10^1$	0.9×10^0
6. Tunny	$<10^1$	0.9×10^0
7. Miscellaneous fish	$<10^1$	0.4×10^0
8. Miscellaneous fish	1.0×10^1	4.5×10^0
9. Miscellaneous fish	5.0×10^1	4.5×10^1
10. Miscellaneous fish	1.0×10^1	9.5×10^0

型ボツリヌス菌も，ＳＦＰ培地で良く増殖し，ウェルシュ菌同様黒色の沈澱を産生したが，ＬＭ培地に二次培養した際，乳糖非分解で，運動性を示すので，容易にウェルシュ菌と区別できることも判った．

2. **MPN 法の推定ウェルシュ菌検出感度**：ウェルシュ菌汚染が，比較的高いことが予想された原料魚すり身10件について，それらの中の推定ウェルシュ菌数を，ＭＰＮ法とパウチ法で同時に測定した．ＭＰＮ法では，全例から0.4/g 以上の推定ウェルシュ菌を検出したのに対し，パウチ法では，４例のみから 10/g 以上の同菌を検出したに止まった．

3. **推定ウェルシュ菌数からみた食肉魚介加工品の衛生細菌学的品質**：製造直後の食肉魚介加工品の推定ウェルシュ菌による汚染度を調べたのが Table 3 である．パウチ法で，10/g 以上の同菌を検出したものは，11検体（6.4%）であったが，ＭＰＮ法では，103検体(60.2%)が0.3/g 以上の同菌によって，汚染されていたことを明らかにし得た．すなわち，82検体（53.8%）は，0.3～9.9/g という比較的低濃度の被汚染検体で，ＭＰＮ法のみによって，その汚染状況を把握することができた例である．また，今回調査の対象とした検体中，ソーセージ類が，109検体中86検体（78.9%）と特に高い汚染率を示していた．

Table 3. Evaluation of the Quality of a Variety of Processed Foods Made Through the Recovery of Presumptive *Cl. perfringens*

Specimen	Detection procedure	No. of tested	No. of presumptive *Cl. perfringens*/g			
			0.3～0.9	1.0～9.9	10～99	100～999
Hams	MPN	50	11(22.0%)	3(6.0%)	—	1(2.0%)
	pouch	50	—	—	—	1(2.0%)
Sausages	MPN	109	18(16.5%)	61(60.0%)	6(5.5%)	1(0.9%)
	pouch	109	—	—	10(9.2%)	—
Fish ham and sausage	MPN	2	—	—	—	—
	pouch	2	—	—	—	—
Others	MPM	10	1(10%)	1(10%)	—	—
	pouch	10	—	—	—	—

Note : Figure in the Table represents the number of specimen, and — indicates not detectable.

考　察

ウェルシュ菌は，自然界の何処にでもいる菌（ubiquitous organism)[7]であり，100°以下の，比較的緩慢な温度で，加工されることが多い食肉魚介加工品中から，本菌の芽胞を完全に排除することは期待しにくい．これは，今回調査を行なった，製造直後の食肉魚介加工品171件中103件（60.2%）の検体が，0.3/g 以上の推定ウェルシュ菌に汚染されていたことからもうなずける．

一方，ウェルシュ菌食中毒は，菌がヒトの腸管内で，

芽胞を形成する際に産生する毒素[8]による food intoxication であり，患者が発病するためには，ある一定量以上の菌が，食品中に存在する必要があることも事実である．また，加工原料食肉中等に存在した本菌芽胞は，製造工程での加熱衝撃により発芽し，以後の製品の取扱い如何によっては，急速な増殖を示すことも予想される．ちなみに，ウェルシュ菌が，1,000倍に増殖するのに要する時間は，45°で僅か3時間[7]であることから，殺菌料を含まない食肉魚介加工品の，製造後および流通過程での取扱いは，生のたん白食品同様特に慎重に行なうべきであると考える．消費者の安全を確保するために，食肉魚介加工品中の推定ウェルシュ菌数の，安全許容範囲を，どの程度のレベルに設定すべきであるかは，種々異論のあるところと思うが，少なくとも，製造直後の製品については，Goldenbergら[1]がミートパイについて設定している，10/g 以下に抑えるのが妥当であると思う．また，流通段階の製品については，100/g を越えるものは排除するよう努力することが望ましいと考える．

要　約

1975年5月から6月の間に，都内71個所の食肉魚介加工業から収去した，製造直後のハム50件，ソーセージ109件，魚肉ハム・ソーセージ2件およびその他の製品10件の計171件について，推定ウェルシュ菌の検出を試みた．検体中の推定ウェルシュ菌の検出は，Shahidi-Ferguson の変法液体培地を用いたMPN法により行ない，同時に実施したパウチ法による成績と比較した．その結果，今回調査の対象とした製品171件中103件（60.2%）が，0.3/g 以上の推定ウェルシュ菌に汚染されていた．その内，82件（53.8%）は，0.3～9.9/g と比較的低濃度の汚染を示したもので，MPN法によってのみ検出が可能であった．

文　献

1) Goldenberg, N. and Elliott, D. W.: *The Microbiological Safety of Food*, 359, 1973, Academic Press, London and New York
2) Shahidi S. A. and Ferguson, A. R. : *Applied Microbiology*, 21, 500, 1971
3) 小酒井望，鈴木祥一郎編：嫌気性菌症第1版，341，1968，医学書院，東京
4) 東量三：メディヤサークル，79，169，1966
5) 赤間清人，亀山昭一：メディヤサークル，56，15，1964
6) 村上一，神崎政子，春田三佐夫：メディヤサークル，20，167，1975
7) Hobbs, B. C.: *The Microbiological Safety of Food*, 132, 1973 Academic press, London and New York
8) Hauschild, A. H. W., Nilo, L. and Dorward, W. J.: *Can. J. Microbiol.*, 17, 987, 1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 172—178, 1975

走査型電子顕微鏡によるべん毛，線毛の観察

前 木 吾 市

Scanning Electron Microscopic Observation for Flagella and Fimbriae of *Enterobacteriaceae*

GOICHI MAEKI*

To obtain a good view of flagella and fimbriae of bacteria by a scanning electron microscope, an attempt was made to apply a Cr-shadowing, prior to the carbon, Au-Pd evaporation for the specimens placed on a collodion membrane. A high resolution scanning electron microscope used in this experiment is ASID attached to JEM-100B, and the organism principally used for the preparation of the specimen was *Escherichia coli* IAM 1239 strain.

Results obtained are as follows:

1) Both flagella and fimbriae of the organism were able to observe at a magnification of 20,000, on the specimen placed on a thin collodion membrane, though the membrane was easily torn off.

2) If the specimen was placed on a strong microgrid or a thick cupper mesh, a good view of fimbriae was no longer available due to the lowering of the resolving power.

緒　言

近時，走査型電子顕微鏡（以下ＳＥＭと略す）が，生物分野の研究にさかんに利用されるようになって来た．その原理[1-3]を具体的に示せば，細く絞った電子プローブで試料表面をテレビジョンのように走査し，試料から発生した形状情報をになった２次電子を利用し，検出器，増幅器を介してＣＲＴ（ブラウン管）上で拡大走査像を観察する仕組みである．ＳＥＭ像の特徴は焦点深度が大きいこと，そしてごく薄い試料表面の情報だけを与えることの２点であるが，欠点として透過型電子顕微鏡（以下ＴＥＭと略す）に比較して解像力が低く，像が暗いことがあげられる．解像力は電子プローブを細く絞ることによって向上するが，その限界は絞り得る電子プローブの径にはよらず，２次電子が放出される試料表層の深さによって制約されることを理解しておきたい．

機器と併行してＳＥＭの試料作製法の進歩も著しい．[4-7]しかしながら生物試料のうちで細菌のべん毛，線毛は未だに観察困難と云われる．生物試料のＳＥＭ高解像観察に難しい一面があることを示している．今回電子プローブを一段と絞り得るＳＥＭを用いて，べん毛，線毛の観察を試み好成績を得たので報告する．

実験材料及び試料作製

実験材料

供試菌株は大腸菌E. Coli ＩＡＭ1239で寒天濃度を0.15%に希釈した普通寒天培地を用い，37° 24時間培養で使用した．

試料作製

先ずＴＥＭ用のCrシャドウイングメッシュを作製し，この表面にＳＥＭ用試料作製の常法，カーボン，金パラジウムの廻転蒸着すなわち試料表面の導電性処理を施して試料を得た．メッシュ上の支持膜には通常のコロジオン膜と，自製トリヤホール・マイクログリッド[8]の２種類を用いた．マイクログリッドの上には更に菌を載せるためのコロジオン膜を張って使用するが，説明の便宜上，以後通常のコロジオン膜をコロジオン単膜，後者を単にマイクログリッドと呼ぶことにする．下地は銅製150メッシュである．なお，本実験に使用するマイクログリッドの理想としては，網目の中の丸い孔の部分に薄い残存膜がなく貫通していることが望ましい．しかし作製時の温度，湿度等のデリケートな条件により，トリヤホールの残存膜が張られ，後から張るコロジオン膜と重なって二重膜を構成している場合が考えられる．二重膜

* 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

上の菌を観察したのでは本来のマイクログリッドの使命を果せないことになるが，二重膜か否かの確認は難しく鑑別は特に行っていない．

試料作製の実際については次の通りとした．コロジオン単膜とマイクログリッドの間で，べん毛，線毛の観察結果を比較するため，Crシャドウイング，カーボン，金パラジウムの蒸着（量は0.3mmφのもの14cmを距離12cmから飛ばす）およびメッシュを裏返してのコロジオン膜に対するカーボン蒸着膜補強処理の各操作を何れも同じ条件で実施した．

SEMによる観察

機種は日本電子KK製 JEM-100B に取付けた走査像観察装置 EM-ASID（以下ASIDと略す）である．三段縮小レンズ系を使用し，電子線プローブの縮小率が高いため，解像力は2次電子像で100Aと公称されているが，NDS取付けのため試料交換がサイドエントリー方式に改められてからは，TEM同様に解像力の低下が認められ，その外に試料の廻転が不能となっている．本機の特長はTEM本体の螢光板上で電子プローブが見えるので，軸調整やプローブの非点補正がやり易い利点がある．

加速電圧はすべて，20kV，電子電流 20～60μA，撮影倍率はディスプレーのCRT上で60倍から3万倍の範囲で行った．ちなみに SEM の解像力を 100A，肉眼の解像力を 0.2mm とすれば，有効拡大の最低限度は 2万倍でよいことになる．試料の傾斜角度は先方側へ40°とした．傾斜をつけることで2次電子の発生が促進され像のコントラストを増すことができる．撮影フィルムはネオパンSS（J 120），現像は軟調なコニドールスーパーと，カテコール表面現像法を併用した．

観察所見

(1) 試料作製について

実験に先立ちべん毛，線毛の発育について寒天濃度を基準としてTEMにより検討したところ，濃度の低い培地の方が線毛の発育がよいことが判った．そこで薄い0.15%の培地表面から釣菌し試料作製を行った．

(2) コロジオン単膜法の結果

写真1はコロジオン単膜を用いたSEM試料作製済みのメッシュで，膜の破れは最も少い方に属する．便宜上A，B部に分けて説明すると，A部の菌は写真2のようにメッシュ孔の貫通した部位すなわちコロジオン単膜だけの上に載っており，B部の菌は載っているコロジオン単膜の下側を，厚い銅メッシュにぴったり支えられた恰好になっている．A部の菌はTEM像，SEM像を対応させて観察できる位置にあるが，SEM用試料作製完了後のメッシュでは，多重蒸着膜の層が厚くなり過ぎてTEMでは観察不可能であった．B部の菌はTEMで見ることは勿論不可能で，SEMによりはじめて観察可能となった視野中にある．

さて重要な結果を示すと，A部では写真3～5にみるようにCRT上の倍率2～3万倍でべん毛は勿論，線毛まで確認されるという好結果が得られた．写真3～5は何れも写真2の切れかかりの支持膜上の菌を撮影したもので，写真3，4はCRT上3万倍，写真5は2万倍の撮影である．写真3，5は写真2の中央付近の拡大像で，位置を対応させてみることができる．CRT上で2万倍までの撮影はさ程困難ではないが，3万倍になると非点収差の影響が急速に増大し，像の流れが顕著となることが判った．SEMでは粗い螢光板上の像をカメラレンズで近接撮影するので，TEMのようにネガフィルムの引伸しは効かず，高解像の像を望むにはどうしてもCRT上で倍率を上げる必要がある．写真3，4には写真2の支持膜のうねりの一部が拡大され下地の膜の平面性が失われているが，このような場合TEMでは撮影は殆ど絶望的であるに拘らず，本実験ではSEMの高倍率撮影が可能であった．

B部の銅メッシュ基板上の菌では，写真6のようにべん毛は観察可能であったが線毛は認められず，backに存在する銅メッシュ表面の凹凸が浮彫りされて独得のパターンが観察されるに至った．B部では写真2でみるように，視野全体が2次電子の放出過剰で明るくなり過ぎ，菌試料のコントラストだけをA部の菌のように強調することができなくなる．しかしB部を巨視的に観察すると菌試料以外の視野では，コロジオン膜上にCr，C，Au-Pd 三層の蒸着膜があるにも拘らず，澄んだ川底を透かしてみるような透明感が現れ，銅基板表面の不規則な凹凸像もかなり解像がよい．コロジオン支持膜が全面にわたり均一なので菌の捜索も比較的容易である．

(3) マイクログリッド支持膜法の結果

写真7は撮影に用いたマイクログリッドの一部拡大像で，説明の便宜上視野を，C，D部に分ける．

C部すなわちマイクログリッドのメッシュ孔上の菌試料では，視野を更に二分して厚い網目上の二重膜（網目の骨に相当する）の部（C_1）と，コロジオン一重膜と予想された部（C_2）とに分けて観察を進めてみた．C_1，C_2 視野共CRT上でべん毛は比較的容易に認めることができる一方，線毛の存在は漠然として好結果は得られず，コロジオン単膜法（A部）に比し解像の劣ることが認められた(写真9，10)．またC_1，C_2 視野の間でべん毛の見え具合にあまり差異は感じられなかった．C_1，C_2視野

のＳＥＭ像を巨視的な見地からみると，その境界はＴＥＭ像のような明暗の明かな差としてでなく，写真８のように凹凸のある丸い輪廓で仕切られ，二重膜か一重膜かの区別がつきかねる予想外のパターンを示した．

Ｄ部すなわちマイクログリッドメッシュの銅基板上に載った菌の観察では，写真11,12にみるように，background の銅基板表面の小さい凹凸構造がぼやけて白い斑紋（むら）となって生じ，コロジオン単膜法におけるＣ部（写真６）のモザイク模様とは大きくかけ離れた明状し難いパターンを示した．べん毛の存在は辛うじて認め得るが，線毛に至っては全く観察困難で，撮影のための focus 合せにも難渋する程の不成績となった．

考　察

べん毛，線毛が何故明瞭に撮影されたかについて焦点を絞り，理由を考察してみたい．

(1) 走査ビームに対して耐久性のある試料が作製できたこと．

本菌べん毛のＳＥＭ観察例については，３年前に今回と同じCrシャドウイング済みメッシュでＪＳＭ-Ｓ１機により撮影に成功している．[9] その際メッシュ孔上のコロジオン単膜の部分は，走査ビームの衝撃に対して甚だ弱く次々に膜切れが起きたことを経験している．それ故今回の実験に着手する前までは，ＳＥＭ観察に適する菌試料の部位は，銅メッシュ基板上の視野と，新たに登場させたマイクログリッド上の視野に期待していた．本筋に戻り本実験ではコロジオン単膜法における膜切れは，殆ど試料作製時の蒸着処理の段階で生じており，ＳＥＭ観察時の走査ビームによる膜切れは見掛け上軽微と判断された．既往の実験と比較して今回の試料作製上，特に進歩を自負し得る事柄はないが，蒸着物質として前回は金，今回は粒子の細かい金パラジウムを用い，その他では液体窒素による試料汚染防止装置を採用している．コロジオン単膜のビームに対する耐久性向上について敢て推測するならば，結果的にCr，カーボン，金パラジウムの各蒸着層が薄く，粒状性細かく強固に施され，コロジオン膜の補強に効果を発揮したものと解釈したい．

(2) 薄い支持膜の採用と，Crシャドウイングが効果をあげたこと．

線毛が薄いコロジオン単膜上（Ａ部）で明瞭に認められ，稍厚味の出たマイクログリッド上（Ｃ部）ではその解像が低下し，銅メッシュ基板上（Ｂ，Ｄ部）では遂に線毛が認められなくなったことから，薄い支持膜の使用が高解像の像をもたらした大きな理由の一つであることが実証された．又Crシャドウイングは，べん毛，線毛の微弱なコントラストを増強させることに相当効果があるものと推察される．ＴＥＭでみられるコントラスト増強効果が，SEMの場合にも当嵌めて考えられるからである．又シャドウイングはべん毛，線毛の直径を太らせる効果により，SEM自体のべん毛，線毛識別能力を向上させることが推定される．

マイクログリッド（Ｃ部）における線毛の解像が，本来同等の見え方を示して当然な筈のコロジオン単膜（Ａ部）に劣った理由については，明確な原因が指摘できず解釈に苦しむところである．思うに試料作製の項で述べたように自製マイクログリッドの出来が不如意で，トリヤホールの薄い残存膜を生じ，二重膜を構成させたことの公算が大きい．今後はガス処理法等で残存膜を除去する手段をテストする要がある．銅メッシュ基板上のＢ，Ｄ部にみられたべん毛，線毛の解像の低下については，SEM像形成の理論から考えて，支持体材料の銅表面から放出される２次電子，銅内部からの反射電子によって励起される２次電子等の影響によるものと推定される．

(3) ＡＳＩＤの性能を高度に発揮させたこと．

線毛の観察をＣＲＴ上で行うには，２万倍以上の倍率が必要であり，非点収差の補正が不十分では認めることができない．ＡＳＩＤでは非点補正の操作はＣＲＴ上の試料像をみて行うが，高倍率撮影における最大の難関である．focus 合せも非点補正同様，正確には撮影視野についてしか行うことができない．非点収差補正，focus 合せ共に迅速に行わないと試料にコンタミが生じて撮影は失敗する．SEM像の高倍率撮影のチャンスは一回限りと断じて過言でない．電子プローブ系の“絞り”の汚れは著しく非点収差を増大させ解像力を低下させるので，撮影前の鏡筒内部品のクリーニングは絶対に不可欠である．線毛の撮影はＡＳＩＤの性能の限界のレベルで行われるものと考えるゆえんである．

ま と め

高解像機種の JEM-100B 付属走査像観察装置 ASID を用い，大腸菌を対象にべん毛，線毛の観察を試み好結果を得た．試料は透過型電顕用に作ったCrシャドウイングメッシュに，走査型電顕試料用の表面導電性処理（カーボン，金パラジウム蒸着）を施して作製した．支持膜にはコロジオン単膜と，マイクログリッドを用いて比較した．結果を次に示す．

(1) 薄いコロジオン単膜上ではブラウン管上２～３万倍でべん毛，線毛が観察された．試料作製段階で膜が切れ易い欠点がある．

(2) 自製マイクログリッド支持膜上では線毛の解像が低下した．ただし支持膜は丈夫で安定している．

(3) 両支持膜の銅メッシュ上における菌の観察では，

コントラスト，解像共に低下するが，べん毛までは観察可能であった．

謝辞 本研究に当り校閲と指導を賜った当所乳肉衛生研究科長，村上一博士，菌培養で御援助戴いた微生物部潮田弘主任研究員に謝意を表します．

文 献

1) 紀本静雄：自然，23，58，1968
2) Everhart, T. E. and Hayes, T. L.: Scientific American 226, 55, 1972
3) 市ノ川竹男：菱光技報，11 (127)，3，1974
4) 坂口弘，太田次郎，紀本静雄：生物界の造形(1970) 講談社
5) 田中敬一：細胞 7(1)，2，1975
6) 天野保二：細胞 7(1)，80，1975
7) 徳永純一：細胞 7(1)，87，1975
8) Fukami, A. and Adachi, K.: J. Electron Microscopy, 14, 112, 1965
9) 前木吾市：東京衛研年報23，27，1972

写　真　説　明

写真はCr シャドウイングを施した大腸菌の同一菌株の走査型電顕像で，JEM-100B付属ＡＳＩＤで撮影したもので構成した．加速電圧20kV，電子電流20～60μA，傾斜角度はNo. 1を除き40°である．写真左肩の番号に続くＡ，Ｂ，Ｃ，Ｄの区分は，支持膜の種類および支持膜上の観察部位による分類である．

Ａ：コロジオン単膜使用の場合で，メッシュの孔上の視野を指す．(No. 1～5)

Ｂ：コロジオン単膜使用の場合で，銅メッシュ上の視野．(No. 6)

Ｃ：マイクログリッド支持膜使用の場合で，メッシュの孔上の視野．(No. 7～9)

Ｄ：マイクログリッド支持膜使用の場合で，銅メッシュ上の視野．(No.11, 12)

べん毛，線毛の解像の良さはＡ，Ｃ，Ｂ，Ｄの順位となった．なお掲載写真の倍率はＣＲＴ(ブラウン管)上の0.75倍の縮尺になっている．

写真No.

1：コロジオン単膜の試料作製完了メッシュ．膜の破れが生じ易い．(×45)

2：撮影に用いた視野で，この状態でNo. 3，4，5は撮影できた．(×750)

3：線毛のＣＲＴ上3万倍の高倍率撮影像．(×23,000)

4：同上．菌の片側が白く光るのは電子線の入射角度が浅くなったため起きたもの．(×23,000)

5：べん毛のよく見える視野．ＣＲＴ上2万倍撮影．(×15,000)

6：バックを銅メッシュに支えられたコロジオン膜上の菌．線毛は見えなくなる．銅メッシュ表面の凹凸が支持膜を透して見えている．(×15,000)

7：マイクログリッドの試料作製完了メッシュ．膜の破れは起きていない．孔上に網目の模様が窺える．(約×100)

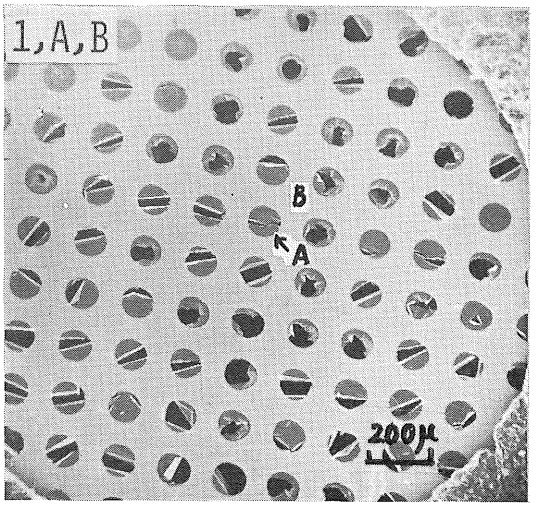
8：マイクログリッドのメッシュ孔上の菌と小さい網目の像．(×7.500)

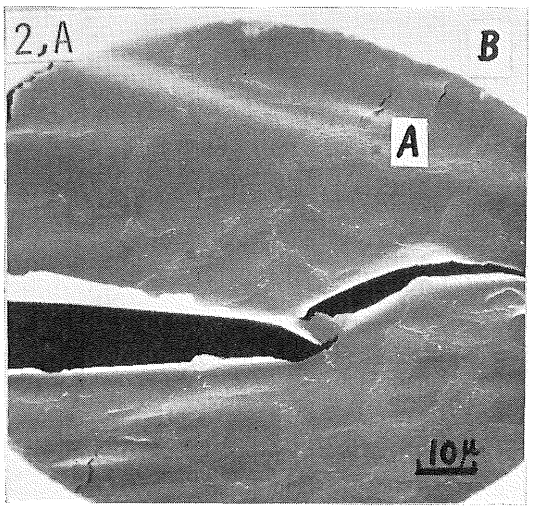
9：マイクログリッドのメッシュ孔上の菌．ＣＲＴ上2万倍撮影．線毛の見え方は漠然としている．(×15,000)

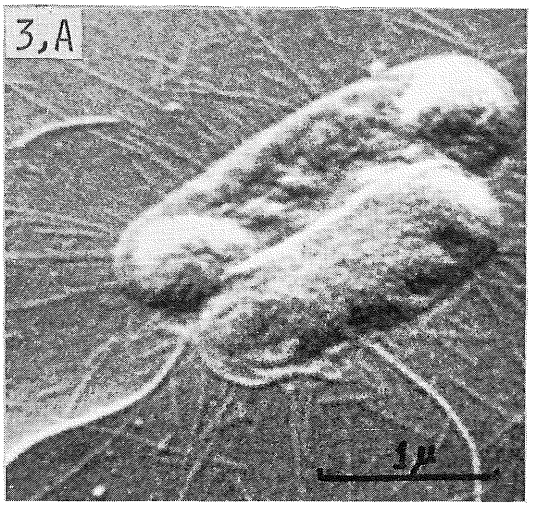
10：同上．ＣＲＴ上3万倍撮影．写真に撮ってみると線毛の存在が窺える．(×23,000)

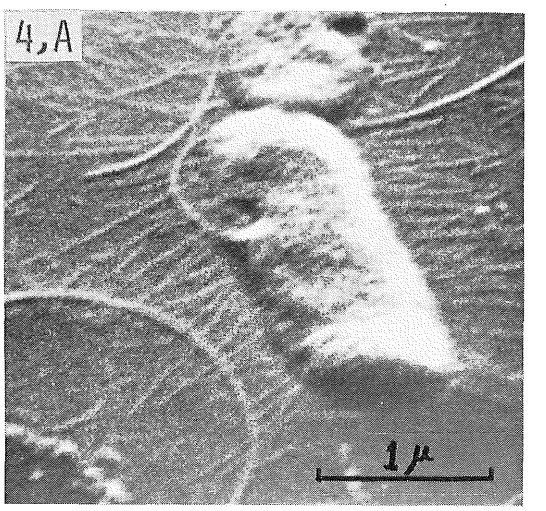
11：バックを銅メッシュに支えられたマイクログリッド上の菌．べん毛だけが見える．銅メッシュ上の細かい凹凸はぼけて，むらを生じ菌の観察を困難ならしめる．(×7,500)

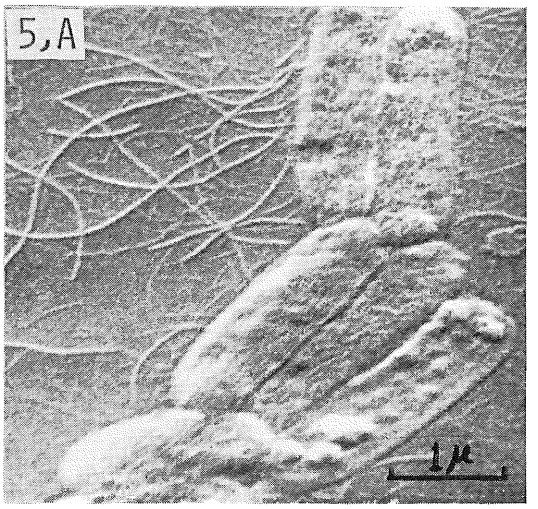
12：同上．ＣＲＴ上3万倍撮影像．解像が悪くなり focus 合せも困難となる．(×23,000)

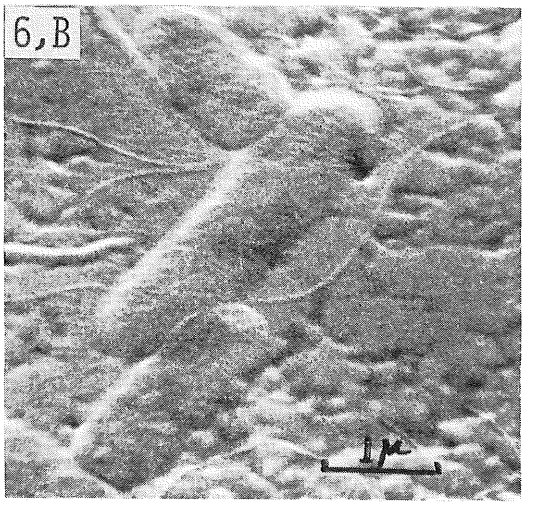

1,A,B
B
A
200μ

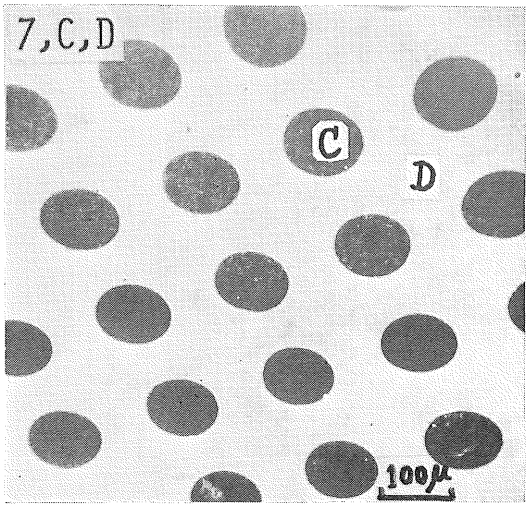

2,A
B
A
10μ

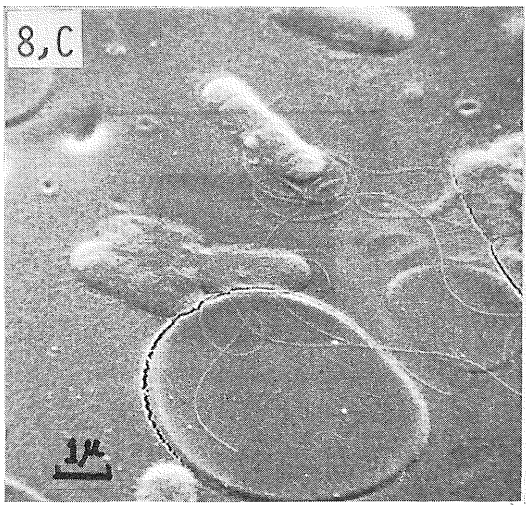

3,A
1μ

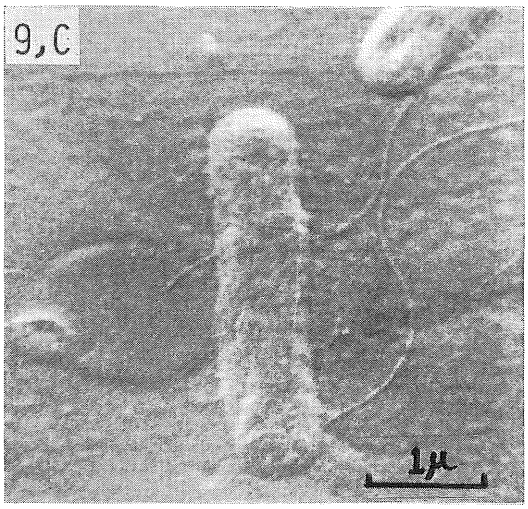

4,A
1μ

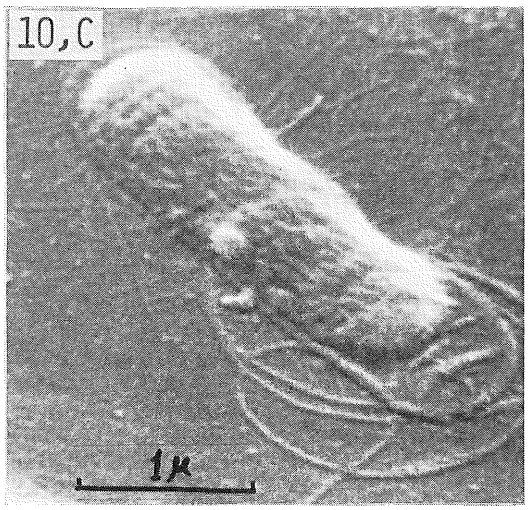

5,A
1μ

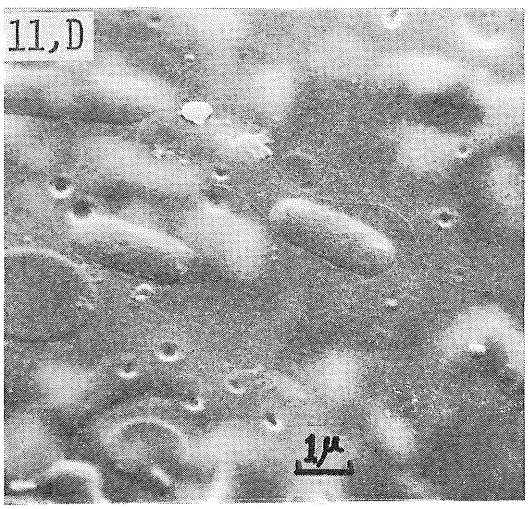

6,B
1μ

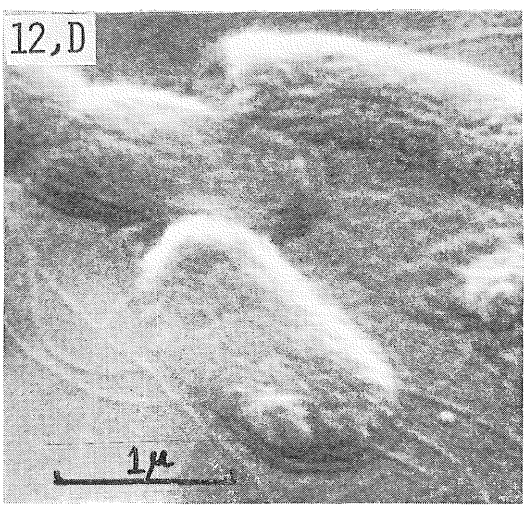

7,C,D
C
D
100μ


8,C
1μ


9,C
1μ


10,C
1μ


11,D
1μ


12,D
1μ

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 179—182, 1975

食品中のマイコトキシンに関する研究（第6報）——市販ピーナツ類及びピーナツ製品よりアフラトキシン B1 の検出

直井家寿太* 小川仁志* 風間栄治* 斉藤和夫*
観公子* 井部明広* 木村康夫*

Studies on Mycotoxins in Foods (VI) Detection of Aflatoxins in Peanut and Its Products

YASUTA NAOI*, HITOSHI OGAWA*, EIJI KAZAMA*, KAZUO SAITO*,
KIMIKO KAN*, AKIHIRO IBE* and YASUO KIMURA*

緒　言

1974年10月ローマにおいて，食品汚染のモニタリングプログラム作成を目的としたWHO，FAO合同の会議が召集された．この会議の席上に採りあげられたモニターされる汚染物質の中に各種マイコトキシンがあるが，特に優先順位の高いもののトップにアフラトキシン群がみられる．このことはアフラトキシン汚染の問題が世界各国において緊急に対策を立てる必要のあることを示唆するものである．わが国においては既にピーナツ，ピーナツ製品についての試験法が厚生省より出され，アフラトキシン B_1 については各試験研究機関において，常時チェックする体制がとられつつある．都において昨年10月に実施したナッツ類の一斉検査で，1試料からアフラトキシン B_1 及び B_2 を検出し必要な行政措置がとられた．われわれは市販食品中のマイコトキシン試験を恒常的に進めることの可能な唯一の地方試験研究機関としての都衛生研の役割を考え，この検出例について試験法の検討を中心にした考察を加え報告する．

実験の部

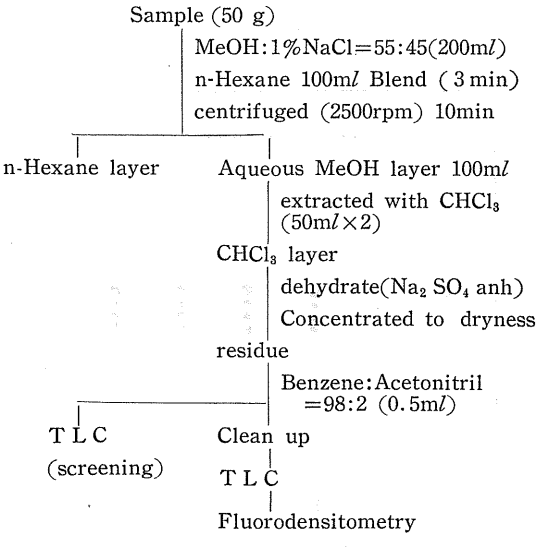
(1)試料

市販ピーナツ類65種，ピーナツ製品17種，他のナッツ類24種計 106 種

(2)試験法

(A) 抽出法および Clean up　試料 50g をブレンダーカップに精秤し，メタノールと1%塩化ナトリウム溶液の混液 (55：45)200m*l* と n-ヘキサン100m*l* を加えた後3分間ブレンドする．内容物は500m*l* の遠沈管に移し2500回転で10分間遠沈する．上清のメタノール水層 200 m*l* 中より100m*l* を分取しクロロホルム50m*l* で2回抽出する．クロロホルム層を合わせ無水硫酸ナトリウムで脱水した後沪過，沪液は濃縮乾固する．残渣をベンゼン—アセトニトリル混液（98：2）1m*l* に溶解し，TLCをおこなってUV照射下アフラトキシン及び類似螢光物質の有無を検する．すなわち大量の試料を迅速に処理するためこの段階でスクリーニングを実施する．疑いのあるものはすべて取りあげ，次のClean upの操作に移す．

Table 1



* 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

残余のベンゼン—アセトニトリル溶液は濃縮乾固した後クロロホルム約20ml に溶解し，シリカゲルカラムを用いて Clean up をおこなう．カラムに上記クロロホルム溶液を流した後，n-ヘキサン次にエチルエーテルでカラムを洗浄しメタノール—クロロホルム（3：97）で溶離する．多くの場合ピーナツ類においてはＴＬクロマトグラム上にアフラトキシン類似の妨害螢光物質は少ないので，シリカゲルカラムによる Clean up で目的を達する．しかし試験結果の正確を期するため，われわれは更に二段カラムで Clean up 操作をおこなっている．すなわちシリカゲルカラムの上に無水硫酸ナトリウムをはさんで酸性アルミナを積層し，更に無水硫酸ナトリウムでおさえた後上述のクロロホルム抽出溶液を通す．このカラムを使用すると例えば醸造食品におけるアフラトキシン試験において，類似螢光物質の除去に多大の効果があることをわれわれは報告しているが，この経験からアフラトキシン試験においては Clean up の時この二段カラムを必ず併用することにしている．

(B) 分離検出　ＴＬＣの展開溶媒は公定法どおりまずクロロホルム—アセトン＝９：１）を使用したが，更に他の２種の異なった溶媒系も使用して標準品と Rf の比較をおこなった．２種の展開溶媒の組成はエチルエーテル：メタノール：水＝94：4.5：1.5及びイソプロピルアルコール：アセトン：クロロホルム 5：10：85 である．又担体としてアドソルボジル-１のほかに，MN-キーゼルゲル G-HR とバイオシル-A を用いた．Fig. 1 から６までに示すように，各々の担体と３種の展開溶媒を使用した時の結果は完全に一致した．

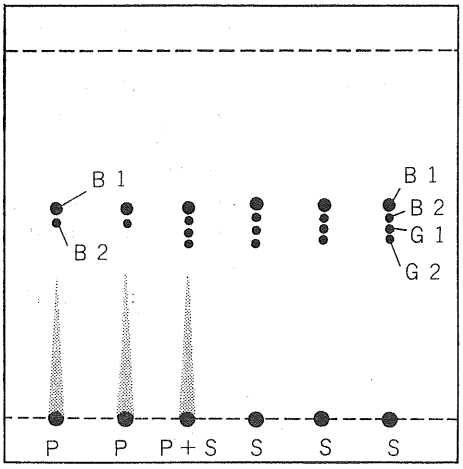


Fig. 1　Carrier : adsorbosil-1
Developer : $CHCl_3$: Acetone(9 : 1)
P=Sample　　S=Standard

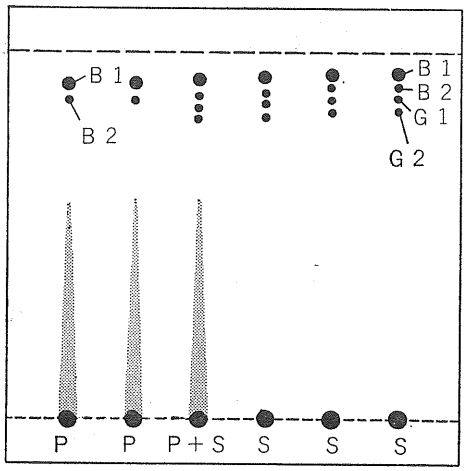


Fig. 2　Carrier : Biosil-A
Developer : $CHCl_3$: Acetone(9 : 1)
P=Sample　　S=Standard

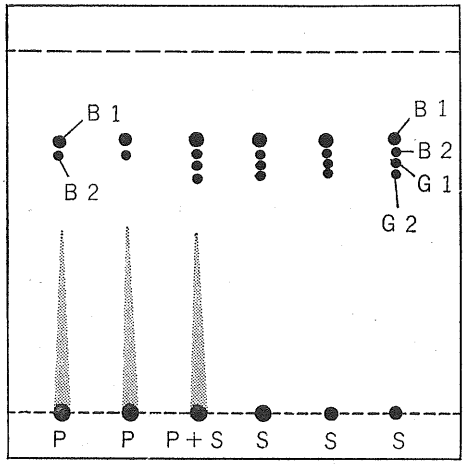


Fig. 3　Carrier : $CHCl_3$: MN-Kiesel gel G-HR
Developer : $CHCl_3$: Acetone(9 :1)
P=Sample　　S=Standard

(C) アフラトキシン B_1 の確認試験

Fig 7 に示したように試料抽出試験溶液一定量をＴＬＣプレート上にスポットして，クロロホルム—アセトン（9：1）混液により一次展開をおこなう．風乾後アフラトキシン B_1 を確認したならばその直上にアフラトキシン B_1 標準溶液を一定量スポットし風乾する．次に無水トリフルオル酢酸を滴下完全に風乾した後，クロロホルム—メタノール（95: 5）の展開溶媒で二次展開をおこなう．トリフルオル酢酸附加アフラトキシン B_1 は Rf

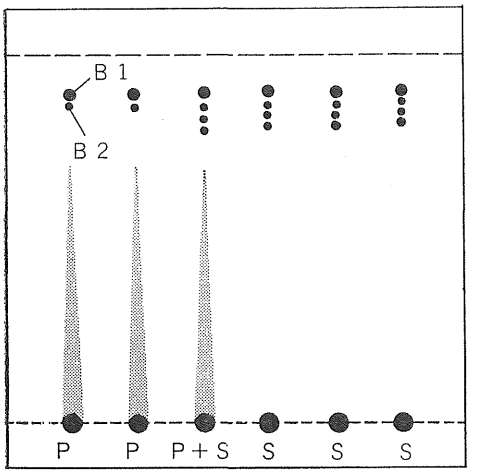


Fig. 4　Carrier : Adsorbosil-1
Developer : Ether : MeOH : H_2O
(94 : 4.5 : 1.5)

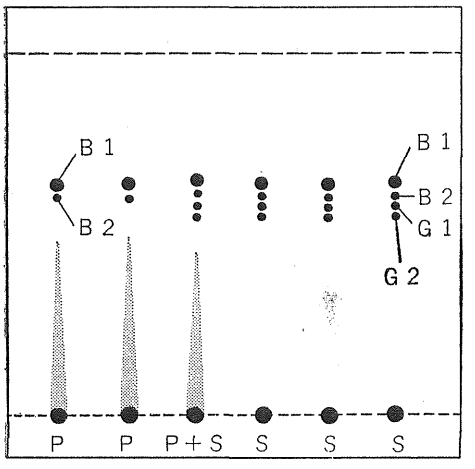


Fig. 5　Carrier : MN-Kiesel gel G-HR
Developer : Ether : MeOH : H_2O
(94 : 4.5 : 1.5)
P=Sample　　S=Standard

0.35附近に又 B_2 は附加物ができないので溶媒先端に移行する．附加物はＵＶ照射下紫青色のスポットとして確認できる．定性的に確認をおこなった後，螢光デンシトメトリーによって定量試験を実施した．Fig. 8 はアフラトキシン B_1 B_2 G_1 G_2 のデンシトグラムで(1)～(4)は標準品で(5)が試料中から抽出した B_1 と B_2 のデンシトグラムである．又 Fig. 9 は標準 B_1 の各濃度における検量線である．

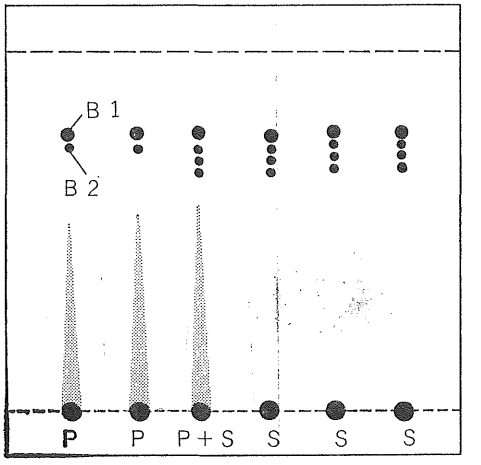


Fig. 6　Carrier : MN-Kiesel gel G-HR
Developer : iso-Propanol : Acetone : $CHCl_3$ (5 : 10 : 85)

結果と考察

Table 1の方法により調製した106試料からの試験溶液について，第1次のスクリーニングを実施したところ15試料の試験溶液について Clean up が必要となった．特に B_1 B_2 を検出したものはＴＬＣプレート上で強い明瞭な螢光を示した．シリカゲルカラムによる Clean up の結果3試料を残して他はすべて陰性となった．疑いのある試験液のうち2種はＴＬＣプレート上でアフラトキシン B_1 と若干異なる色調の螢光を示した．この段階で

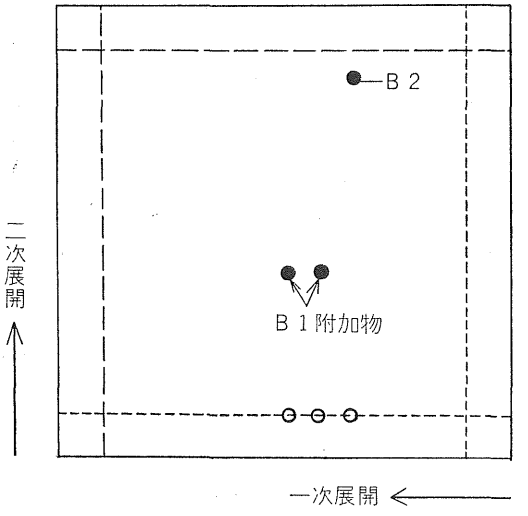


Fig. 7　Carrier : Adsorbosil-1
Developer : (1) $CHCl_3$: Acetone (9 : 1)
(2) MeOH : $CHCl_3$ (5 : 95)

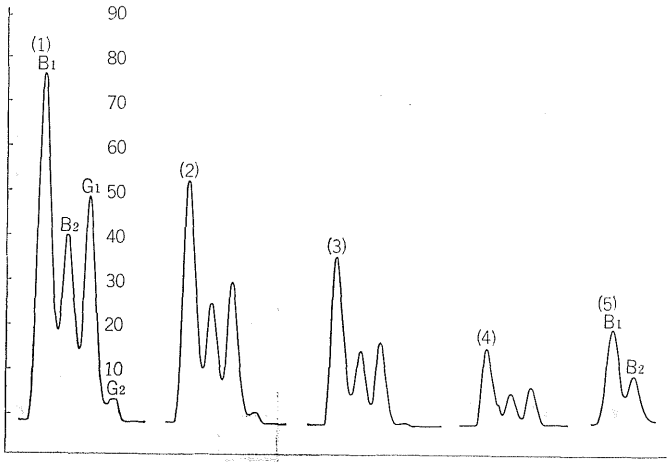


Fig. 8 Censitogram of Aflatoxin on TLC plate

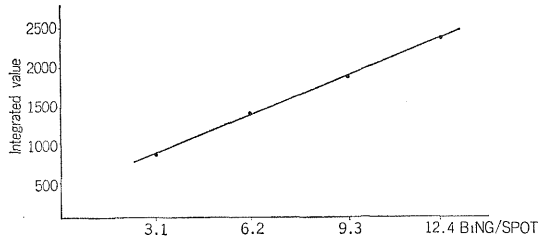


Fig. 9 Calibration curve of Aflatoxin Bl in TLC densitometry

陰性とする前に念のため二段カラム（アルミナシリカゲル）による Clean up を実施したところ，この2種の試験溶液は完全にアフラトキシン B_1 陰性となった．残る1種のみが標準品アフラトキシン B_1 と完全に一致する螢光と Rf を示すスポットがみられた．そこでＴＬＣプレート上でトリフルオル酢酸による附加物生成反応をおこなったのち，再度展開したところ Rf 0.35附近に標準品と試料アフラトキシン B_1 の附加物の明瞭なスポットが出現し両者は完全に一致した．直ちにアドソルボジル-Ⅰを担体としたＴＬＣプレート上のスポットについて螢光デンシトメトリーをおこなったところ，検量線よりアフラトキシン B_1 として92ppbの定量値を得た．

われわれはカビ毒汚染のおそれのある市販食品について今後更に広範なチェックを進める必要のあることを痛感しているが，なかでもアフラトキシン試験の場合試験結果の完全を期するためＴＬＣにおいて公定法以外の異なった2種の担体及び展開溶媒を用いた定性試験をも併せて実施し検討を加えた．特にMN-キーゼルゲルG-HRとバイオシル-Aを担体としたプレートはアドソルボジル-Ⅰよりもすぐれた分離能を示したので，最終判定をおこなう場合極めて有効であると思われる．又ここに使用した2種の展開溶媒は，B群，G群ともに適当な Rf 値を示した．尚今回は106試料についてすでに報告した試験法[2]を用いてステリグマトシステンの試験を実施したがいずれも陰性であった．

結　論

(1)ピーナツ，ピーナツ製品中のアフラトキシン B_1 試験法は公定法で一応良好な結果が得られるが，アフラトキシンが検出された場合あたえる社会的影響が多大であることから試験結果の正確を期するため，Clean up においては複数のカラムの使用又異なった担体及び展開溶媒を使用したＴＬＣなどを同時に実施した方がよいと考えられる．

(2)今回アフラトキシン B_1，B_2 を検出した試料はインドネシア産のピーナツであったが，過去における検出例からみてもアフリカ，東南アジア方面から輸入されるナッツ類及びその他の食品については厳重な監視が必要である．

（本研究の概要は食品衛生学会第29回学術講演会昭和50年5月で発表した）

文　献

1) 木村康夫，直井家寿太，友松俊夫，小川仁志，風間栄治，斉藤和夫，江口良子：東京衛研年報，22, 87, 1970

2) 直井家寿太，小川仁志，風間栄治，斉藤和夫，志村公子，木村康夫：東京衛研年報，24, 207, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26 - 1, 183—186, 1975

アーモンド中のシアンについて

西島基弘* 冠 政光* 高橋尚子* 上村 尚*
中里光男* 渡利優子* 木村康夫*

Survey of Cyanide in Almond

MOTOHIRO NISHIJIMA*, MASAMITSU KANMURI*, SHYOKO TAKAHASHI*,
HISASHI KAMIMURA*, MITSUO NAKAZATO*, YUKO WATARI* and YASUO KIMURA*

はじめに

食品中のシアンは梅や桃の仁に含有されているアミグダリン，ビルマ豆のリナマリン，とうもろこしのズリン等のシアン配糖体が酵素分解によって生じるが，微量でも鉄酵素をおかすため，食品中の常在量を知る必要がある．

食品中のシアンに関する研究としてはW. Sturn, E. Hanssen,[1,2] が硝酸銀法について回収率とpHの関係等を詳細に検討し，さらにD. R. Haisman 等[3] はアーモンド中に含有されるアミグダリン分解酵素，プルナシン分解酵素，およびハイドロオキシニトリル分解酵素が基質に連続的に作用することを報告している．

われわれは食用種子類のシアン含量を知る目的でピリジンピラゾロン法[4] によって調査を行ない，併せてアーモンド(スイート)を試料としてシアン配糖体の留液中での形，加熱処理によるシアンの挙動ならびに人工胃液，人工腸液中でのシアン配糖体の変化などについて検討を行なった．

実験方法

1. 試料，試薬

（i） 試料：市販品の調査は食品監視機動班が収去したものを用い，他はカリフォルニア産アーモンドを用いた．

(ii) 試 薬

① アミグダリン（ICN Pharmaceuticals. Inc.）
② マンデロニトリル（東京化成工業KK）
③ エムルシン（東京化成工業KK）
④ ベンツアルデヒド（半井化学薬品KK）
⑤ シアン標準液：シアン化カリウム約0.5g を精秤して，水で200m*l* とした．0.1N硝酸銀液を用いて規定度をもとめたのち，水酸化ナトリウム液でアルカリ性としてさらに水で100倍したものを原液とした．原液を10倍したものをシアン標準液として用いた．
⑥ クエン酸緩衝液（pH5.9）：クエン酸128.1gおよび水酸化ナトリウム64.4gを水に溶かして1,000m*l* とし，用時10倍にうすめpH5.9とした．
⑦ リン酸緩衝液（pH6.8）：リン酸一カリウム3.40gおよびリン酸二ナトリウム（無水）3.55gを水に溶かし，全量を1000m*l* とした．
⑧ ピリジンピラゾロン試液：1—フェニル—3—メチル—5—ピラゾロン0.25gを75°の温水100m*l* に溶かして，室温まで冷却し，これにビス（1—フェニル—3—メチル—5—ピラゾロン）0.02gをピリジン20m*l* に溶かした液を加えて混合した．（用時調製）
⑨ 人工胃液（局方第Ⅰ液）：塩化ナトリウム2.0gに希塩酸24m*l*，および水を加えて1000m*l* とした．（pH1.2）
⑩ 人工腸液（局方第Ⅱ液）：リン酸一水素ナトリウム35.8gに希塩酸6m*l* および水を加えて1000m*l* とした．（pH7.5）　他の試薬はすべて特級品を用いた．

2. 定性試験

食品衛生法，食品添加物の規格基準，豆類．1豆類の成分規格によった．

3. 定量試験

（i） 試験溶液の調製

粉砕した試料25gを500m*l* のフラスコにとりクエン酸緩衝液（pH5.9）200m*l* を加えて，3時間放置後，1％酒石酸液1m*l* を加えたのち蒸留を行なった．受器はあ

* 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

らかじめ1%水酸化カリウム液30m*l* を入れた100m*l* 共栓メスシリンダーを用いた．なお，蒸留装置の末端はボールフィルター（G—1）を付け，水酸化カリウム液中に浸しておき，留出速度3.0m*l*/min で約90m*l* になるまで蒸留したのち，ボールフィルター部分を少量の水で洗い，洗液を合わせ，留液を10%水酸化カリウム液および10%酢酸で中和（指示薬：フェノールフタレン）したのち，水で全量を100m*l* としたものを試験溶液とした．

(ii) 定　量

ＪＩＳ—K0101に従った．すなわち試験溶液 0.5～20 m*l*（1～5 γのシアンを含む）を50m*l* 共栓試験管にとり，水を加えて20m*l* とした．

さらにリン酸緩衝液（pH 6.8）10m*l* およびクロラミンT液 0.25m*l* を加え，ただちに密栓し，静かに振り混ぜて5分間放置後，ピリジンピラゾロン試液 15m*l* を加えて，室温で20分間放置したのち生じた紫青色の呈色液を試薬ブランクを対照として 620nm で測定した．また，同時に検量線を作成して定量を行なった．

4. ベンツアルデヒド，およびマンデロニトリルの同定

試験溶液の調製の項に準じた．ただし蒸留直後のシアン化合物の同定には蒸留装置の末端を水酸化カリウム液に積層させたエーテル層に導入して蒸留を行なった．また，2時間後の留液中におけるシアン化合物の同定は留液を等量のエーテルで抽出した．それぞれのエーテル層を水洗，脱水，濃縮したのち，紫外部吸収スペクトル法，赤外吸収スペクトル法を用い，標準品との比較により同定した．

(i) 紫外部吸収スペクトル法

装置は自記分光光度計．日立 EPS—3 Tを用いた．

(ii) 赤外吸収スペクトル法

装置は赤外分光光度計．日立285形（特殊固定セル 1.0mm）を用いた．

結果および考察

1. 種子および豆類中のシアンの含量について

市販されている食用種子25種類（56検体）についてシアンの含量を調査した結果は Table 1．に示したとおりであり，アーモンド以外からは検出されなかった．

アーモンドの市販形態としては主として油揚げしたものであり，シアン含量は0～0.2ppm 程度であった．他に生アーモンド（加熱処理をしていないもの）のスライスしたもの，生アーモンドを粉砕したもの，および菓子原料のアーモンドからは，いずれも 0.2～5 ppm のシアンが検出された．

2. 留液中におけるシアン化合物の形について

Bitter アーモンド中のシアンを定量する場合はシアン配糖体を酵素分解して蒸留する方法が一般に用いられている．アミグダリンの酵素分解による生成物は D. R.

Table 1. Contents of Cyanide in Commercial Edible-Seeds

Sample	Processing form	Content (ppm)
Almond	Raw	3.0, 5.0, 0.8
	Slice	1.3, 1.1, 0.3, 0.2
	Pulverization	2.0, 0.8
	Frying(6)	0.1, <0.1, ND, ND, ND, ND,
Soy Bean(2), Tora Bean, Big Broad Bean(2), Carabaruso(2), Mottled Kidney Bean, Walnut(3), Greenish Brown Bean, Pistachio, Black Soy Bean(2), Pine Nut, Gingko Nut(2), Peanut(2), White Kidney Bean, Cashewnut(2)	Raw	ND
Pumpkin Seed, Punpnut, Minicorn, Giantcorn, Furamenca, Spanish Peanut, Butter Peanut(2), Akadamianut, Coconut, Pine Nut, Cashewnut, Carabaruso, Gingko Nut, Sunflowerseed, Pistachio(3)	Frying	ND

( ) : number of sample
ND : none detect

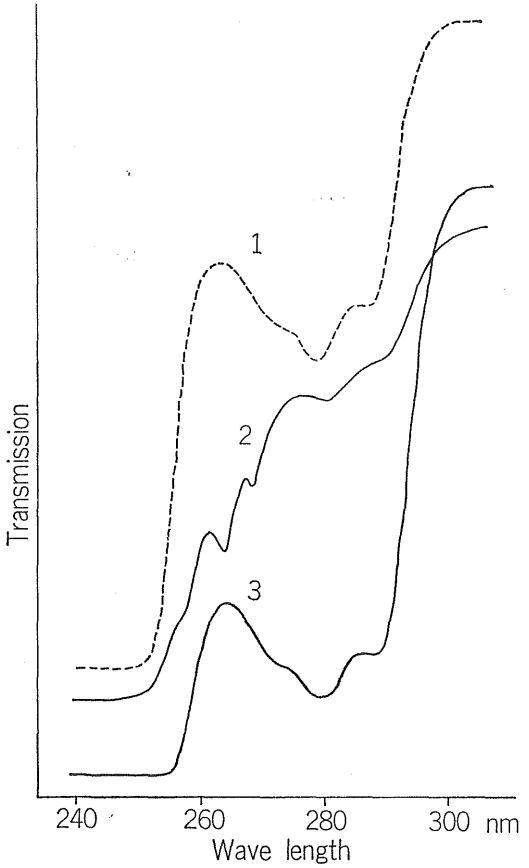


Fig. 1. Identification of Benzaldehyde by UV-Absorption Spectra
1 : Sample 2 : Mandelonitrile
3 : Benzaldehyde

Haisman 等[3] により詳細に検討されている．また，日本薬局方によると[5]，キョウニン水中ではマンデロニトリル⇌ベンツアルデヒド＋シアン化水素の平衡を保つ，といわれている．

われわれはシアンをピリジンピラゾロン法で定量するにあたり，留液中のシアンがマンデロニトリル又はシアン化水素のいずれの形で存在するか，あるいは両者の混合物として存在するかについて検討した．

一般にピリジンピラゾロン法の発色は蒸留後1時間以内で行われるが，蒸留直後ならびに2時間放置後におけるシアンの形を明らかにするために，マンデロニトリル，およびベンツアルデヒドをエーテルで捕集または抽出して紫外部吸収スペクトル法ならびに赤外吸収スペクトル法で測定した結果は Fig. 1., 2. に示したとおりであり，いずれもベンツアルデヒドと同一の吸収スペクトルが得られたことにより蒸留直後から蒸留後2時間後の留液中にはベンツアルデヒドと遊離シアンの形で存在していることが推定される．

以上の結果から，蒸留直後から2時間までに測定する場合は留液中の遊離のシアン化水素を定量しているものと考えられる．

3. 加熱処理によるシアン配糖体の消長

一般に市販されているアーモンドは加熱処理（油揚げ）したものが多く，また遊離シアンは酵素分解により生成することなどから考えて，加熱処理したアーモンド中では，シアン化合物が存在しているにもかかわらず，

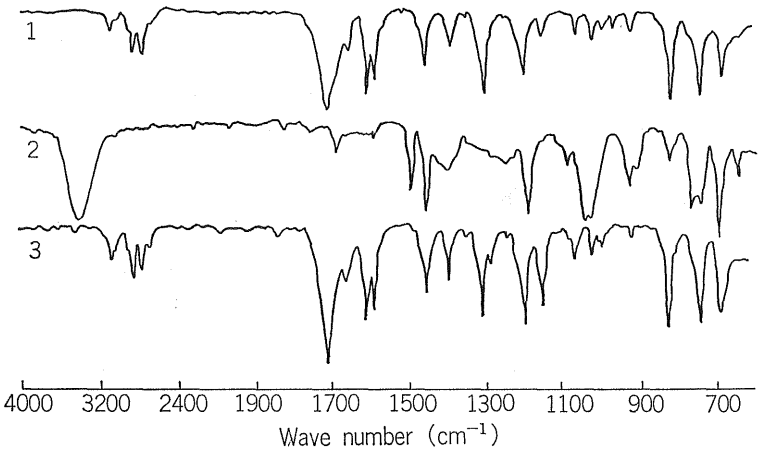


Fig. 2. Identification of Benzaldehyde by IR-Absorption Spectra
1 : Sample
2 : Mandelonitrile
3 : Benzaldehyde

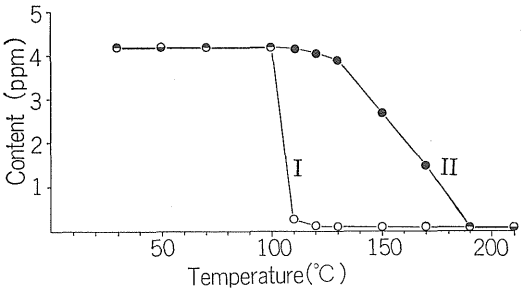


Fig. 3. Effect of temperature on amount of Cyanide

Ⅰ fried almond

Ⅱ fried almond added emulsin

熱により酵素が失活しているために検出されないことも考えられる．そこで生アーモンドを35°～190°までの各温度で10分間ずつ揚げたものを試料としてシアンを定量するとともに，試料に酵素（エムルシン）を添加したものについてシアンの定量を行なった結果は，Fig. 3．に示したとおりである．

35°～100°での加熱処理では，4.2ppmのシアンが検出された．110°以上で加熱処理したものは，ほとんどシアンは検出されないが，130°程度では酵素を添加することにより，4～4.2ppm のシアンが検出された．このことは，製品中には依然シアン配糖体が存在していて酵素だけが失活するものと考えられる．また，130°～190°では酵素を添加しても温度の上昇とともに検出するシアン量の低下が認められた．このことは130°以上の加熱処理によりシアン化合物が次第に分解し，揮散するものと考えられる．190°以上では，酵素を添加してもほとんどシアンは検出されなかった．

これらのことから，加熱処理後の食品中のシアン化合物を試験する場合は酵素を添加したものについて行なう必要があると考える．

4. 人工胃液および腸液におけるシアンの消長

生アーモンドならびに加熱処理したアーモンドが胃液，および腸液によりシアンを遊離する可能性を考えて，生のものと加熱処理したアーモンド，それぞれ20gを粉砕し，胃液，腸液に3時間浸潤したのちに蒸留した結果はTable 2．に示したとおりであり生アーモンドからは胃液で1.0ppm，腸液で1.6ppm 検出された．しかし，シアン配糖体を摂取した場合，腸内で加水分解されて徐々に青酸を遊離するが，[6] 常食となるアーモンドの量から考えて，青うめを摂取したほどの毒性は示さないと思われる．

Table 2. Amount of Liberated Cyanide in Almond

Artificial Juice	Amount of Cyanide (ppm)	
	Raw Almond	Fried Almond
Gastric Juice	1.0	0.1
Enteric Juice	1.6	0.1

ま と め

食用種子類中のシアン含量を調査した結果，生アーモンドから0.2～5ppm，また，加熱処理したものから0～0.1ppm のシアンが検出された．このシアンをピリジンピラゾロン法を用いて定量するにあたり，留液中のシアン化合物の形を調査したところ，蒸留後から2時間程度ではベンツアルデヒドとシアン化水素の形で存在することが推定された．またアーモンドを35°～190°で10分間加熱処理した場合，各温度がシアンの定量値に与える影響を調査したところ100°以下ではシアン量に変化がみられなかった．110°以上ではシアンは検出されないが，酵素を添加することにより再び100°以下と同程度のシアンが検出された．130°以上では酵素の添加によっても温度上昇とともにシアン量は減少し，190°になるとほとんど検出されなくなった．アーモンド（生および揚げたもの）を人工胃液，人工腸液中に浸潤して，シアン遊離試験を行なったところ0.1～2.0ppmの結果が得られたが，摂取量から考えて特に問題はないものと思われる．

文 献

1) Hanssen, E. und Sturn, W. : *Lebensmitt. Untersuch. Forsch.*, 134, 69, 1967

2) Hanssen, E. und Sturn, W. : *Ibid.*, 135, 249, 1967

3) Haisman, D. R. and Knight, D. J. : *Biochem. J.*, 103, 528, 1967

4) 日本工業規格：K0101

5) 第8改訂日本薬局方

6) 小柳達男：食品と解毒の化学，186，共立出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1., 187—191, 1975

天然由来による食品中の安息香酸に関する研究〔Ⅱ〕

豆およびその加工品について

西島基弘* 冠 政光* 高橋尚子* 上村 尚*
中里光男* 渡利優子* 木村康夫*

Studies on Naturally Derived Benzoic Acid in Food (Ⅱ)

Detection from Beans and Their Products

MOTOHIRO NISHIJIMA*, MASAMITSU KANMURI*, SHYOKO TAKAHASHI*,
HISASHI KAMIMURA*, MITSUO NAKAZATO*, YUKO WATARI* and YASUO KIMURA*

まえがき

合成保存料の一つである安息香酸は，天然物中にも広く分布しているため，[1,2] 添加の許可されていない食品から検出された場合，使用の有無についてしばしば問題となる．そこで元来食品中に含有されているバックグラウンドを知ることは必要である．前報でわれわれは，あんず，およびうめ中の安息香酸について報告した[3]．

今回は豆類，およびそれらの加工品中の安息香酸をガスクロマトグラフィー（GC），ガスクロマトーマススペクトル法（GC-MS），マスフラグメントグラフィー（MF），赤外吸収スペクトル法を用いて同定し，MFによる定量法を検討して，各種豆類，およびその加工品について含量をしらべるとともに味噌中の安息香酸の前駆物質について若干の検討を加えた．

実験の部

1. 試料，および試薬

（i） 豆類，およびその加工品は市販品を用いた．

(ii) 試薬はすべて特級品を用いた．

2. 試験操作

2—1 試験溶液の調製

豆の場合は粉砕器（三菱ミキサーベビーボトル）により粉砕したもの50g，加工品については，その50gを500mlの二頸フラスコに秤取し，リン酸1ml，水200ml，食塩約80gおよびシリコン樹脂2～3滴を加えたのち，水蒸気蒸留に付し，毎分約10mlの速度で留液500mlを取った．この留液100mlを300mlの分液ロートに移し，リン酸1ml，食塩10gを加え，エチルエーテル100mlで，3回抽出した．エチルエーテル層を合わせ，少量の水で水洗した．エーテル層は無水硫酸ナトリウムで脱水後，ロ過し，ロータリーエバポレーターにより約100mlに濃縮した．この濃縮液を200ml分液ロートに移し，1% $NaHCO_3$ 溶液20ml，20ml，10mlで3回抽出し，水層を合わせて，これをエーテル15mlで洗浄した．さらに水層をリン酸酸性として，食塩で飽和し，等量のエーテルで3回抽出した．エーテル層を合わせて水5mlで水洗した．エーテル層は無水硫酸ナトリウムで脱水したのち，ロ過し，ロータリーエバポレーターにより濃縮し，風乾したのち，残渣をアセトンに溶かし全量を5mlとしたものを試験溶液とした．

2—2 同定，および定量

（i） **紫外部吸収スペクトル法** 装置は自記分光光度計（日立 EPS-3T）を用いた．試験溶液3mlを秤取し，留去したのち，薬学会協定法（$KMnO_4$ 分解による方法）にしたがい試験をおこなった．

(ii) **ガスクロマトグラフィー** 装置は島津 GC-5AF を用いた．

測定条件 カラム：5% DEGS＋1% H_3PO_4 (Chromosorb W, AW-DMCS 60～80 mesh) 3m，温度：カラム180°，検出器220°，試料注入口220°，キャリアガス：窒素（50ml/min）．試験溶液の注入量は5 μl とした．

(iii) **ガスクロマト-マススペクトル法**

* 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

装置は島津 LKB-9,000 形（多重イオン検出器付）を用いた

GC-MS の測定条件　GC カラム：5% DEGS＋1% H_3PO_4 3 m　温度：カラム 180°，試料注入口 200°，セパレーター 200°，イオン源 290°，イオン加圧電圧：3.5KV，イオン化電圧：20 eV（TIC），70eV（MS），トラップ電流：60 μA，キャリアガス：ヘリウム（20ml/min），出口スリット：0.1mm，コレクターズスリット：0.1mm.

試験溶液 1 μl を注入した.

(iv)　マスフラグメントグラフィー

測定条件　m/e 122 のフラグメントグラフをもとめた.イオン化電圧：20eV，コレクタースリット：0.3mm，ビシグラフ：チャートスピード10mm/minとし，その他の条件はGC-MSの条件にしたがった．試験溶液 1 μl を注入した.

結果および考察

1.　分析法の検討

豆類，およびそれらの加工品中の安息香酸を同定し，

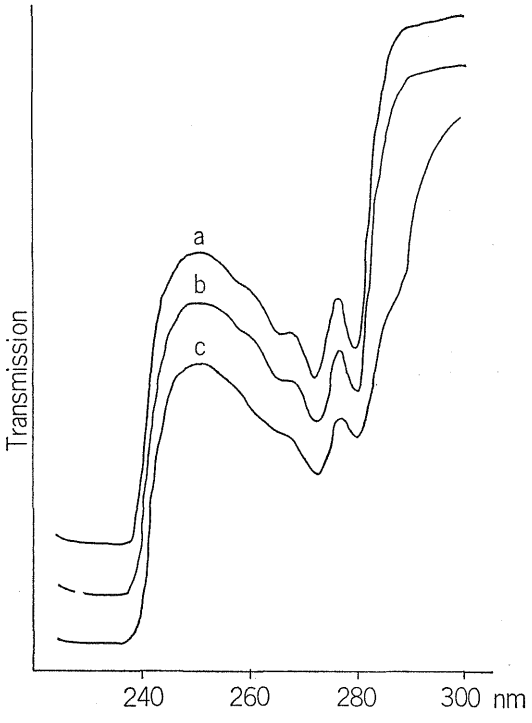


Fig. 1. Comparison of UV adsorption spectra of extracts of Soy bean and Miso with standard Benzoic acid
a：Standard Benzoic acid　b：Soy bean extract　c：Miso extract

かつ定量するために紫外部吸収スペクトル，GC，GC-MS，MF，IRについて検討をおこなった.

(i)紫外部吸収スペクトル法，およびクロマトグラフィーについて　食品中に添加された安息香酸を試験する場合は，紫外部吸収スペクトルによる方法は非常に有効であるが，味噌の抽出物を試験した場合はガスクロマトグラフィーに比べ，分析値が大きくなる傾向が見られた．これは Fig. 1. に示したとおり，味噌抽出物は安息香酸標準物質に比べ 287mμ にも吸収を示すことから他の物質が共存していることが考えられる．一方GCについては試験溶液は安息香酸標準物質と同じ保持時間にピークを示した．また粉砕した大豆ならびに味噌50 g に安息香酸 0.1mg を添加し，回収試験をおこなったところ，90～95%の回収率が得られた.

(ii)　GC-MS，およびマスフラグメントグラフィーについて　ガスクロマトグラフィーにおいて安息香酸と同一の保持時間を示した試験溶液のピークが安息香酸であることの確認を得るためにGC-MS を使用した．試験溶液について安息香酸標準溶液と同じ保持時間を示すピークのマススペクトルを GC-MASPAC-300 によりバックグラウンド消去処理したものは Fig. 2. に示したとおりであり，安息香酸と同一のマスパターンを示した．このGC-MS の結果をもとにマスフラグメントグラフィーを検討した．すなわち安息香酸の最高のフラグメントピークは M^+-OHのm/e105 であるが，ベンゾエート一般に共通して出現するため，分子イオンピークである m/e 122 に着目して，フラグメントグラムをもとめたところ，検出限度は0.5ng であり，また0.5ng 以上では検量線は直線性が得られた．またGCと同様の方法で添加回収試験をおこなったところ94%の回収率が得られた.

(iii)　赤外吸収スペクトル法について

大豆，味噌を前報と同様に処理したものについて測定したところ，Fig. 3. に示すとおり C＝O（1690cm^{-1}），$\begin{matrix}R\\O\end{matrix}\!\!>\!\!\!=$C—O—H，ベンゼン核の振動（1415 cm^{-1}，1285 cm^{-1}，1175cm^{-1}，1125cm^{-1}，1070 cm^{-1}）およびベンゼン核に隣接して存在する 2 個の水素原子が同時に同方向に動く面内振動（710cm^{-1}）などを示唆するそれぞれの吸収スペクトルが得られた.

以上の　(i)　(ii)　(iii)　の事実により，豆およびその加工品に安息香酸が含有されていることを確認し，定量はマスフラグメントグラフィーでおこなった.

2.　豆類およびその加工品中の安息香酸の定量

豆13種類31検体について安息香酸含有量を調査した．結果は Table 1 に示したとおりであった．生あんの原料

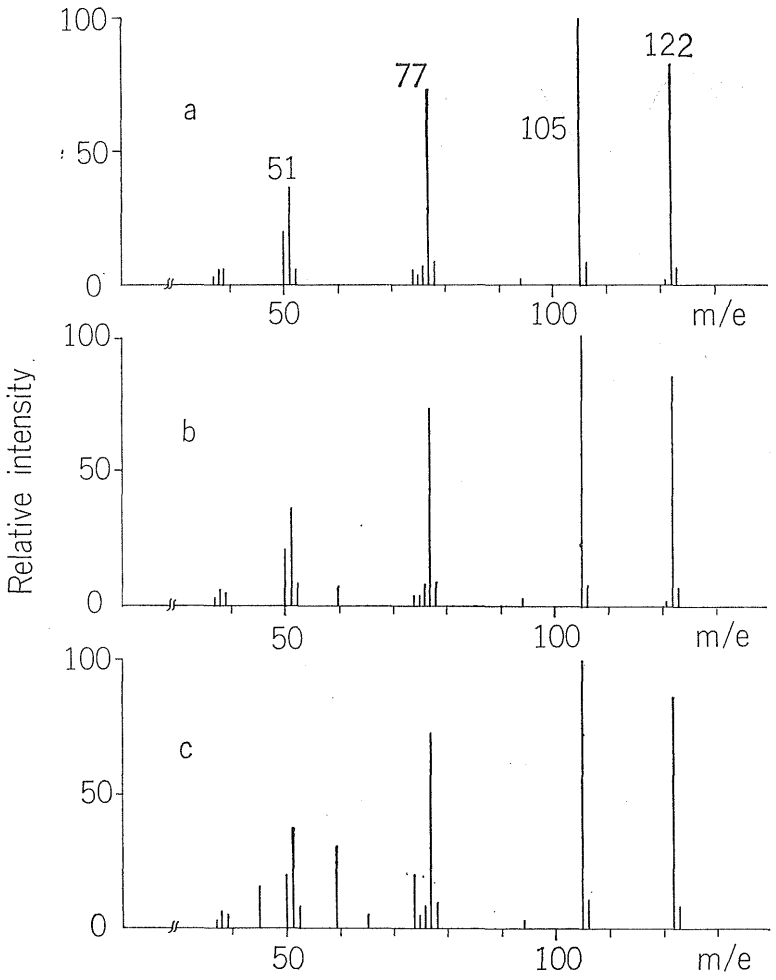


Fig. 2. Comparison of Mass Spectra of extracts of Soy bean and Miso with standard Benzoic acid
a : Standard Benzoic acid b : Soy bean extract c : Miso extract

として使用されるバター豆，サルタピア豆およびベビーライマ豆に3～5 ppm と比較的多く含有されていた．大豆は11検体について試験したところ平均 1.20 ppm (0.53～2.00ppm) であった．小豆は5検体調査したところ平均0.87ppm (0.58～1.09ppm) 含有していた．豆類に含有される安息香酸はその種類により異なると考えられるが，おおむね0.5～5 ppm含有されていると思われる．また，味噌，醤油，あん等のいわゆる加工品について安息香酸含量を調査した結果は Table 2．に示したとおりであった．

3. 味噌中の安息香酸の含有原因について

味噌および大豆中の個々の含量を比較すると，Table 3. に示したとおり，味噌中に存在する安息香酸の大半がその原料大豆に由来することはほぼ疑いない．しかし大豆に比べ，味噌中の含量が多いことは豆以外の原料由来の他に，熟成という過程を経ることから，微生物による作用等をうけ，生成する経路もあると考えられる．Moore[4]らは微生物による phenylalanine 分解の中間生成物として安息香酸を認めていることから構造的に近い Tyrosine も関与していることも考えられる．そこで，味噌の原料および生因について検討した．

（i） **原料について**　一般的な味噌は原料として，大豆，小麦，米および大麦等が用いられ，味噌の種類により混合割合は異なる．大豆の結果は Table 1. で示したが，米については 0.3ppm 大麦 0.1ppm，麹菌 0.7ppm で，比較的低い値が得られた．

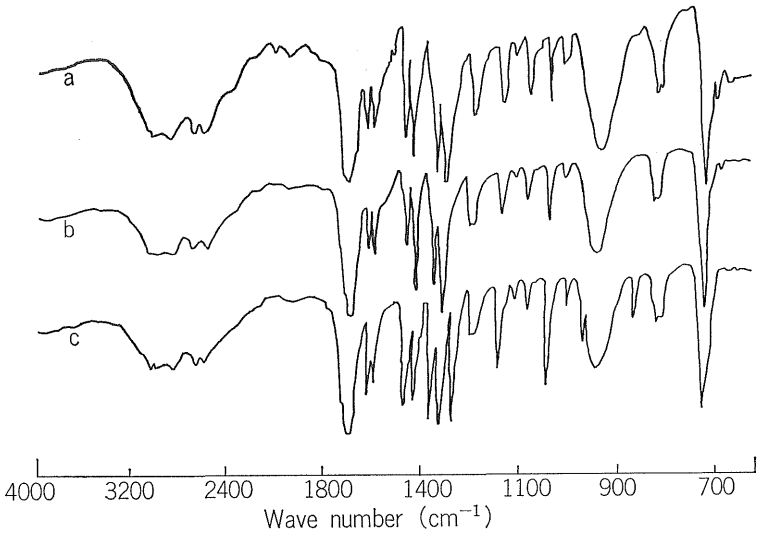


Fig. 3. Comparison of IR spectra of extracts of Soy bean and Miso with standard Benzoic acid
a : Standard Benzoic acid b : Soy bean extract c : Miso extract

Table 1. Amount of Benzoic Acid Detected from Beans

Sample	No. of Sample	Amount of Benzoic Acid Detected (ppm)
Soy Bean	11	1.40, 1.02, 1.88, 0.53, 2.00, 0.90, 1.20, 1.61, 1.07, 0.81, 1.05
Red Bean	5	0.88, 0.58, 1.09, 0.93, 0.88
French Bean	2	0.20, 0.92
Tora Bean	3	0.42, 0.20, 0.33
Green Peas	1	0.35
Kintoki Bean	2	0.20, 0.92
Broad Bean	1	0.57
Kidney Bean	1	0.76
Butter Bean	1	4.90
Sultapia Bean	1	3.50
Michigan	1	0.55
Tebo Bean	1	0.62
Baby Raima Bean	1	3.28

Table 2. Amount of Benzoic Acid Detected from Bean Products

Sample	No. of Sample	Amount of Benzoic Acid Detected (ppm)
Miso	41	0.35, 0.45, 2.87, 1.90, 3.32, 1.70, 2.05, 2.25, 1.60, 5.15, 6.52, 5.27, 1.85, 1.85, 3.57, 1.85, 1.60, 2.20, 3.70, 2.10, 3.00, 2.70, 1.70, 1.20, 1.50, 1.50, 5.00, 2.60, 2.10, 5.50, 0.70, 6.80, 1.70, 2.40, 6.10, 8.20, 7.10, 2.10, 11.6, 7.80, 5.70
An	2	0.05, 0.38
Soy-Sauce	1	4.30
Bean Curds	1	0.04
Kinako	1	1.58

Table 3. Amount of Benzoic Acid in Soy Bean and Miso

Sample	No. of Sample	Amount of Benzoic Acid Detected (ppm)						
		<1	1~2	2~3	3~4	4~5	5~10	10<
Soy Bean	11	3	7	1				
Miso	41	3	12	10	4	6	5	1

Table 4. Amount of Free Amino Acid in Miso

Free Amino Acid	Sample (%)		
	Shiro miso (1 month)	Aka miso (1 year)	Aka miso (7 years)
Asp.	0.36	0.37	0.37
Thr.	0.32	0.36	0.20
Ser.	0.17	0.18	0.24
Glu.	0.35	0.39	0.57
Pro.	0.18	0.19	0.20
Gly.	0.07	0.07	0.10
Alla.	0.30	0.28	0.26
Cys.	—	—	—
Val.	0.32	0.37	0.37
Met.	0.05	0.07	0.11
I. leu.	0.29	0.26	0.34
Leu.	0.39	0.37	0.58
Tyr.	0.16	0.15	0.23
Phe.	0.18	0.18	0.33

(ii) 味噌中のアミノ酸ならびに安息香酸の生因について 味噌中に Phenylalanine ならびに Tyrosine 等が含有しているかを知るためにいわゆる白味噌，赤味噌および7年間保存した味噌についてアミノ酸アナライザーによりアミノ酸の分析をおこなった結果は，Table 4. に示すとおりであり，約0.2%の phenylalanine および Tyrosine が含有されていた．そこで熟成期間中の安息香酸含量を調査したところ，Fig. 4. に示すとおりであり，熟成期間30日目現在，特に増加の現象は見られなかったが，今後調査を続ける予定である．

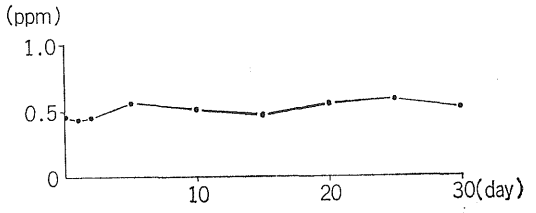


Fig. 4. Amount of Benzoic acid of Miso mash

ま と め

豆類およびその加工品中の安息香酸をUV，GC，GC-MS，MF，IRを用いて同定した．また，水蒸気蒸留，マスフラグメントグラフィーを用いて定量法を検討した結果94%の回収率を得た．

この方法で豆13種類31検体について検討した結果0.20~4.90ppm含有されていることが判明した．豆類を原料とした加工品では，0.05~11.6ppm検出された．また，加工品のうちで味噌に含有される安息香酸はその大部分は原料によると考えるが，今後調査を続ける予定である．

文 献

1) 児玉雅信，別所康守，久保進：食品工誌，20，228，1975
2) 栗崎純一，笹子謙治，津郷友吉，山内邦男：食衛誌，14，25，1973
3) 西島基弘，上田 工，大西 操，高橋尚子，上村尚，中里光男，木村康夫：東京衛研年報，24，249，1972
4) Moore, K., Subba Rao, P. U. and Towers, G. H. N.: *Biochem. J.*, 106, 507, 1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26 - 1, 192—195, 1975

食品中のフッ素の定量について（第2報）Market-Basket Study に準拠した摂取量の評価

友松俊夫* 鈴木二郎* 中沢久美子* 木村康夫*

Determination of Fluorine in Foods (II) Estimation of Fluorine Intake based on the Market-Basket Study

TOSHIO TOMOMATSU*, JIRO SUZUKI*, KUMIKO NAKAZAWA* and YASUO KIMURA*

The estimation of dietary intake of fluoride was made on the diets satisfying the nutritional requirement for pregnant women. Food materials representing 6-day diet were purchased from retail and department stores in Tokyo. Consequently, it was found that average daily fluoride intake from the diets subjected to the analysis was 2.5mg, ranging from 1.6mg to 5.4mg. The amount actually extracted in 100m*l* of tea from tea leaves ranged between 21～123μg, i. e., the average amount of fluoride intake from tea was quite resembling with that of one from other foodstuff, except fish and shellfish, though the tea leaves are known to have been containing a large amount of fluoride.

はじめに

最近各種の報告の中で，フッ素が公害原因物質として注目されており，筆者等も前報[1]で，フッ素イオン電極を用いた分析方法および数種の食品中のフッ素含有量について，報告している．

公害原因物質について考慮する場合に重要なことは，それがどの程度人体に取り込まれるかということであり，この摂取量を測定する一つの有効な方法として，market-basket study[2]がある．即ち，市販の食品を購入し，一定の献立にしたがって食事を用意したのち，これを混合して分析することによって，その食事より摂取されるフッ素量を評価する方法である．

今回我々は，この方法に準じて，妊娠後期女性の栄養所要量をみたす献立て6日分を作成し，摂取量の測定を行ったので報告する．

表1 献立

1日目		
朝食	飯	米110，押麦20
	ごま汁	みそ20，大根40，ごま2，けずり節1
	納豆	納豆40，卵10，ねぎ3
	つくだ煮	あみ20
	漬物	きゃべつ40
間食		牛乳100，カステラ50
昼食	スパゲッテーレバーソースかけ	スパゲッテー100，レバー20，玉ねぎ30，粉チーズ10，トマトケチャップ20
	フルーツサラダ	リンゴ80，干ぶどう10，おろし人参20，フレンチソース10
間食		牛乳110，ふかし芋50
夕食	飯	米110，押麦20
	冷やっこ	豆腐150，しそ実1
	精進あげ	ピーマン20，人参20，春菊10，鯵60，小麦粉20，油10
	おろし	大根50
2日目		
朝食	飯	米110，押麦20
	みそ汁	みそ20，わかめ20，油揚10，けずり節1

* 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

	おろしあえ	さつまあげ50，しらす干5，大根40
	漬物	なす40
間食		牛乳150，バナナ130
昼食	フレンチトースト	食パン130，牛乳5，卵30，サラダ油7，はちみつ20
	シチュー	じゃが芋70，玉ねぎ30，人参10，さやいんげん10，小麦粉10，トマト70，油5
間食		豆乳200，塩せんべい30
夕食	飯	米120，押麦20
	レバーやき	レバー60，油5，たれ17
	さつま汁	とり肉15，人参20，ごぼう10，こんにゃく30，大根40，しょうゆ10
	ごま酢あえ	きゅうり30，豆もやし30，ごま2，しょうゆ10
3日目		
朝食	ホットドッグ	パン120，ソーセージ40，マーガリン7，レタス20
	牛乳	牛乳200
	フレンチサラダ	きゃべつ40，きゅうり30，人参10，酢油ソース10
間食	くず餅	くず粉30，きな粉20，みつ30
昼食	みそ汁	みそ20，にら30，卵20，けずり節1
	流し焼き	小麦粉100，干えび10，長ねぎ30，卵20，青のり1，油5，ソース10
	生野菜	きゅうり30，きゃべつ40
間食		白桃200，おこし30
夕食	飯	米110，押麦20
	生鮭フライ	生鮭80，パン粉5，油7，玉ねぎ10，マヨネーズソース7
	粉ふき芋	じゃが芋70
	ほうれん草ソテー	ほうれん草40，バター5
	漬物	きゃべつ30
4日目		
朝食	むすび	米120，たらこ20，梅干10，干のり1，ふりかけ5
	みそ汁	みそ20，なす50，油揚20，けずり節1
	煮豆	うずら豆40
	漬物	きゅうり30
間食	ブラマンジー	牛乳200，くず粉20，いちごジャム30
昼食	五目そば	乾そば100，油揚30，長ねぎ10，かまぼこ15，生しいたけ10，だてまき20，小松菜20，つゆ10
間食	りんごと芋バター煮	りんご50，さつま芋100，砂糖10，バター5
夕食	うなぎ丼	米120，うなぎかば焼60
	吸物	うなぎきも5，青み少々
	野菜煮付	里芋80，さやいんげん20，砂糖7，しょうゆ20
	漬物	白菜40
5日目		
朝食	飯	米110，押麦20
	みそ汁	みそ20，じゃが芋50，玉ねぎ20，けずり節1
	つくだ煮	はぜ20
	漬物	きゃべつ50
間食	むし南瓜	南瓜100，マーガリン7
昼食	サンドイッチ	食パン130，きゅうり50，レバーペースト30，ゆで卵50，マーガリン10，トマト70
	牛乳	牛乳200
間食		すいか100，ビスケット30
夕食	飯	米120，押麦20
	肉団子甘酢あんかけ	豚ひき肉70，小麦粉7，じゃが芋30，玉ねぎ20，人参30，ピーマン20，生しいたけ10，油10，片栗粉5，甘酢10
	吸物	とろろ昆布5
	枝豆塩ゆで	枝豆30
	漬物	なす40
6日目		
朝食	トースト	食パン130，マーガリン8，オレンジマーマレード20
	いり卵	卵50，干えび10，ねぎ20，油3
	漬物	きゃべつ40
間食		牛乳200，ウエハース30
昼食	カレーうどん	乾うどん100，豚肉30，じゃが芋50，人参30，玉ねぎ50，カレールー10，らっきょう40，しょうゆ20
間食		トマト120，塩せんべい40
夕食	飯	米120，押麦20

みそ汁	みそ 20，豆腐 100，けずり節 1
煮魚	あこう鯛80，しょうゆ10，砂糖 7
ごまあえ	ほうれん草40，ごま 5，砂糖 5，しょうゆ10
漬物	なす40

表中の数字は食品の重量（g）である．

実験方法

装置および試薬 前報に準じた．

試料の調製 前記の献立表にしたがい，各材料の不可食部分を除去し，水洗を行い，水切りした後，秤量し，1)穀類，2)植物性食品類（調味料，海藻を含む），3)魚介類，4)畜産製品類（牛乳を含む）に分類したのち，均質の試料としたものを分析に供した．

食後に飲むお茶は，高フッ素含有食品であるといわれており，その使用方法も献立表の食品類とは異るため，葉，湯抽出液および出涸しの葉について，別に分析を行った．紅茶もこれに準じて分析した．コーヒーはインスタントのものを用いた．

操作 均質化された試料，お茶および紅茶の葉，そしてこれらの出涸しの葉については前報に準じた．お茶の抽出液は，陶製の急須を用いて，表２の条件[3]にしたがって３回浸出したのち，その液を硫酸々性で水蒸気蒸留し，留液を前報に準じて定量した．但し，お茶の葉，浸出液および出涸しの葉の場合には，濃縮操作は行わなかった．コーヒーは，インスタントの粉末２ｇを100m*l*の湯に溶かしたのち，前報にしたがい定量した．紅茶およびコーヒーは，５ｇと10ｇの砂糖（上白糖）を加えた．水道水は，ＴＩＳＡＢ．１：１で定量した．

表２ 茶の浸出条件

	分量（１人分）(g)	湯の量 (m*l*)	湯の温度 (℃)	浸出時間 (sec)
せん茶	2	100	80	60
ほうじ茶	2	100	90	30
紅茶	2	100	90	180

実験結果および考察

６日間の食物摂取量は 8,812ｇ，フッ素摂取量は 12,342.8μg であり，１日平均フッ素摂取量は 2,057.1 μg，範囲は１日当り 1,262.6～4,855.8μg である．穀類，植物性食品類および畜産製品類の平均フッ素濃度は，各々0.77，0.99および1.03ppmとほぼ同じレベルである．一方魚介類は平均 10.4ppm となり，前者の約10倍である．又献立表の１日目の食事からのフッ素摂取量は，その他の日の約３倍であり，魚介類からのフッ素が特に多い．この魚介類を構成している食品は，あみのつくだ煮と鯵であり，後者の調理状態は，３枚におろし，肋骨と稜鱗を除去したもので，皮および小骨（上椎体骨など）が附着したままのものである．その他の日の魚介類でも，皮および骨が含まれる食品の場合には，比較的フッ素濃度が高い．しかし，魚の筋肉だけの場合には，他の食品類と大差ない．これらのことは，前報の結果と良く一致している．

お茶由来のフッ素について，せん茶の場合，一番煎じでは，普通の湯飲茶碗１杯（約100m*l*）で平均84.7μg のフッ素を摂取することになり，３度の食事時および10時と15時の間食時に各々１杯づつ飲んだとしても，423.5 μg の摂取量となる．ほうじ茶の場合にも同様であると考えると，それぞれ 73.3μg および 336.3μg，紅茶では，100.9μg および504.3μg となり，コーヒーでは31.3μg，156.7μg となる．日本茶および紅茶の２番，３番煎じでは，順次フッ素溶出量は減少してゆき，飲む量が同じ場合には，２，３番浸出液を飲むことにより，フッ素摂取量に対するお茶の貢献度は減少する．お茶の葉中のフッ素含有量は，多い順に平均値でほうじ茶 476.8μg，せん

表３ 献立食品に関する分類別の重量，フッ素濃度およびフッ素含有量

日	食品重量（g）				食品中のフッ素濃度（ppm）				食品中のフッ素含有量（μg）			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	430	632	80	235	0.71	0.99	44.80	1.45	305.3	625.7	3584.0	340.8
2	440	868	56	305	0.67	0.99	1.79	0.94	294.8	859.3	100.2	286.7
3	355	757	100	281	0.89	0.89	3.27	1.00	316.0	673.7	327.0	281.0
4	360	608	106	225	0.68	1.27	0.64	0.79	244.8	772.2	67.8	177.8
5	442	682	21	350	0.76	0.92	8.40	1.03	335.9	627.4	176.4	360.5
6	440	668	91	280	0.93	0.89	3.47	0.95	409.2	594.5	315.8	266.0

A 穀類 B 植物性食品類 C 魚介類 D 畜産製品類

表4　お茶，紅茶，コーヒーおよび水道水中のフッ素含有量

	品名	葉中のフッ素量（μg/2g）	抽出液中のフッ素量（μg/100ml）			出涸し葉中のフッ素量（μg/2g）
			1回	2回	3回	
1	せん茶	122.5	57.5	36.5	20.0	29.5
2	〃	220.0	69.0	57.5	40.0	72.5
3	〃	217.5	80.0	24.0	21.0	74.0
4	〃	317.5	94.0	67.0	45.0	126.5
5	〃	307.8	123.0	78.0	84.5	171.5
1	ほうじ茶	450.0	62.5	55.6	46.3	253.0
2	〃	525.0	71.9	49.4	65.6	300.0
3	〃	519.0	76.9	61.3	48.8	335.0
4	〃	495.0	75.0	46.3	42.5	305.0
5	〃	395.0	80.0	51.0	36.5	215.0
1	紅茶	237.5	95.4	63.6	36.7	61.3
2	〃	228.1	91.1	63.6	36.7	58.8
3	〃	220.0	116.1	57.3	35.4	55.6

		（μg/100ml）
1	コーヒー（インスタント）	32.0
2	〃	30.7
3	〃	32.5
4	〃	31.0
5	〃	30.5

		（μg/100ml）
1	水道水	9.0
2	〃	9.0
3	〃	8.0

茶237.1μgおよび紅茶228.5μg であり，抽出液では，紅茶 100.9μg，せん茶 84.7μg およびほうじ茶 73.3μg である．葉の中のフッ素含有量の多少は，抽出される量にほとんど影響しないし，出涸しの葉の中には，なお，かなりの量が残留している．このような理由から，お茶の葉中のフッ素が湯で抽出されるためには，ある種の factor が必要であると考えられるけれども，今回は，それについては検討しなかった．

コーヒーについては，お茶類の半分以下のフッ素が摂取されるものと考えられる．

結　論

1）献立の食事およびその前後に飲むお茶からのフッ素摂取量は，1日平均約2.5mgであり，範囲は約1.6mgから5.4mgである．

2）献立表1日目のフッ素摂取量が示すように，それを構成する食品が異ると，フッ素濃度に大きな差ができ，食物に対する嗜好の違いが，摂取量に影響をあたえることを示している．

3）魚介類中，魚の皮，骨および甲殻類のからを含むものは，一般にフッ素濃度が高い．しかし，うなぎのかばやきが構成食品となっている場合には，フッ素濃度が低いという結果になっており，魚の皮および骨が含まれていても，フッ素含有濃度はかならずしも高くはない．このような理由から，海産，淡水産あるいは種類の違いにより，フッ素含有濃度に差があるものと思われる．

4）お茶は一般に高フッ素含有食品とされており，事実葉の中には，かなり多量のフッ素が含有されている．しかし，普通の方法で煎じた場合には，比較的少量しか浸出されず，500mlのお茶を飲むとしても，その摂取量は約360～500μg であり，この献立表の魚介類以外の食品類と比較しても，フッ素摂取量中にしめる割合に，大差がない．

謝辞　本研究にあたり，献立表の作成および試料の調製に，御指導ならびに御尽力いただいた，当所生活科学部栄養研究科道口正雄博士，西田甲子主任研究員，牛尾房雄氏に深謝いたします．

文　献

1）友松俊夫，鈴木二郎，中沢久美子，木村康夫：東京衛研年報，25，251，1974

2）Prival, M. J. and Fisher, F.: *Environment* June 29, 1974

3）井上吉之，日本食品事典，第1版，374，1973，医歯薬出版株式会社，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 196—199, 1975

魚介類中の微量元素に関する基礎的研究(第2報)
かつお体内の重金属分布

勝木康隆* 安田和男* 上田 工* 木村康夫*

Study on Amounts of Trace Elements in Marine Fishes (II)
Distribution of Heavy Metals in Bonito Tissue

YASUTAKA KATSUKI*, KAZUO YASUDA*, KOU UEDA* and YASUO KIMURA*

Eight freshly landed bonitos with 59～65 cm in their body length which caught at a coastal waters of Japan were subjected for the clarification of their normal level of heavy metal concentrations in their organs, such as muscle, liver, spleen, kidney, heart, digestive organs, pyloric caecum, spawn, spermatic sac, gill, blood, and stomach content. Concentrations of Mn, Pb, Co, Cd, Cu, Cr, Zn and total and methyl mercury in the specimens were measured by an atomic absorption spectrophotometory and a gasliquid chromatography.

Results obtained are as follows:

1) Concentration of heavy metals in bonito with a body length of 59～65 cm was in constant levels, and there was no significant variation in the season of their capture and body size, or areas where they have lived.

2) Contents of Cd in the liver was 13 ppm in average and, it was the highest amount among the specimens tested.

3) Pyloric caecum had contained 0.13 ppm of Pb, but less than 0.1 ppm in other specimens tested.

4) Total mercury was tended to be accumulate in muscle than in other viscera, and about 90% of them were found to be present in the form of methyl mercury.

5) Zn content in the specimens was relatively high, particularly in viscera 19～61 ppm of the one were present, and Cu content of liver was found to be 1.6～15 ppm respectively. Contents of Co and Cr in the specimens were quite low.

はじめに

第1報[1]で，人為汚染海域の影響を受けないかつおの各種重金属のコントロール値を知る目的で，春季のかつおの部位別調査を報告した．

今回，新たに2海域を加え，秋季に捕獲されたかつおについて同様の調査を行い，棲息海域，漁獲時季，魚体の大きさと重金属含有量との関連性を検討した．

その結果，前報との比較において総合的なコントロール値を正確に把握することができたので報告する．

試　料

Table 1に示したように，試験に供したかつおは，10月に東京中央卸売市場で入手した日本近海産のもの8尾である．平均全長62.0cm（尾叉長55.5cm）平均体重4.8 kgであり，前回のそれぞれ53.0cm，3.0kgにくらべ，ひとまわり大型である．

Table 1 Size of bonito and its area of capture

Area of capture	n	Length(cm)	Weight(kg)
Kesennuma offing (Miyagi)	3	62	5.1
		62	4.6
		63	5.3
Katsuura offing (Chiba)	1	60	3.9
Numazu offing (Shizuoka)	2	63	4.1
		63	4.2
Omaezaki offing (Shizuoka)	2	65	5.6
		59	4.3

かつおは組織別に背肉，血合肉，肝臓，腎臓，脾臓，心臓，消化管，幽門垂，卵巣，精巣，鰓の部位のほか血液，胃内容物をホモジナイズして試料を調製した．

* 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

Table 2 Concentration of heavy metals in viscera and muscle of bonito (wet base)

unit : ppm

	n	Cd	Pb	Cu	Zn	Mn	Cr	Co	T-Hg	Me-Hg	M/T(%)
White muscle	8	0.02 (0.01~0.02)	<0.01	0.75 (0.70~0.86)	7.2 (6.6~7.6)	0.04 (0.02~0.08)	0.02 (0.01~0.06)	0.02 (0.01~0.04)	0.27 (0.14~0.38)	0.24 (0.15~0.33)	89
Red muscle	8	0.03 (0.01~0.04)	<0.01	6.1 (5.0~7.0)	12 (11~14)	0.16 (0.11~0.19)	0.03 (0.01~0.07)	0.03 (0.02~0.05)	0.24 (0.12~0.35)	0.22 (0.11~0.33)	92
Pyloric caecum	8	1.6 (0.73~2.9)	0.13 (0.08~0.28)	1.7 (1.5~1.9)	60 (49~67)	0.15 (0.07~0.22)	0.10 (0.07~0.14)	0.02 (0.01~0.02)	0.12 (0.08~0.18)	0.08 (0.03~0.15)	67
Liver	8	13 (6.7~33)	0.03 (tr~0.06)	15 (7.5~29)	61 (52~84)	0.03 (tr~0.17)	0.08 (0.06~0.13)	0.03 (0.02~0.05)	0.12 (0.09~0.18)	0.08 (0.05~0.12)	67
Spleen	8	1.0 (0.33~1.8)	—	3.2 (1.0~7.1)	37 (14~64)	0.02 (tr~0.06)	<0.01	<0.01	0.10 (0.04~0.15)	0.09 (0.03~0.15)	90
Heart	8	0.21 (0.16~0.28)	<0.01	4.9 (4.2~6.6)	19 (15~21)	0.26 (0.18~0.32)	0.21 (0.05~0.42)	0.03 (0.01~0.07)	0.16 (0.07~0.22)	0.08 (0.04~0.11)	50
Kidney	8	5.5 (3.6~7.9)	<0.01	3.1 (2.6~4.0)	29 (24~36)	0.10 (0.01~0.27)	0.16 (0.05~0.23)	0.09 (0.04~0.20)	0.15 (0.07~0.24)	0.04 (0.01~0.07)	27
Digestive organs	8	0.81 (0.15~1.5)	<0.01	1.6 (0.71~2.5)	27 (13~40)	0.02 (0.01~0.03)	<0.01	0.03 (0.02~0.04)	0.08 (0.04~0.13)	0.04 (0.02~0.09)	50
Blood	8	0.38 (0.21~0.61)	<0.01	0.76 (0.28~2.1)	12 (9.0~16)	0.01 (tr~0.08)	0.15 (0.08~0.23)	0.04 (0.02~0.09)	0.06 (0.03~0.09)	0.03 (0.02~0.04)	50
Gill	8	0.05 (0.02~0.12)	<0.01	0.21 (0.12~0.27)	14 (6.8~27)	0.76 (0.32~1.21)	<0.01	0.01	0.04 (0.02~0.05)	0.02 (0.01~0.03)	50
Spawn	3	0.36 (0.18~0.70)	0.01	2.2 (1.7~2.9)	111 (107~114)	0.15 (0.04~0.49)	<0.01	0.01	0.10 (0.05~0.12)	0.07 (0.03~0.08)	70
Spermatic sac	4	0.54 (0.28~0.63)	—	1.1 (0.77~1.5)	44 (28~61)	0.32 (0.17~0.59)	<0.01	0.09 (0.02~0.11)	0.07 (0.03~0.12)	0.04 (0.01~0.08)	57
Stomach content	8	0.28 (0.21~0.63)	<0.01	1.2 (0.41~2.6)	49 (41~63)	0.53 (0.13~0.94)	0.21 (0.10~0.54)	0.04 (0.01~0.07)	0.04 (0.02~0.05)	0.02 (0.01~0.05)	50

分析法

第1報と同様，総水銀（以下T-Hgと略す）は分光光度計 UV-200 によるフレームレス原子吸光法，メチル水銀（以下Me-Hgと略す）はGC-4B ^{63}Ni ECD によるガスクロマトグラフィー，その他の金属は DDTC-MIBK 抽出ののち原子吸光分析で測定した．

結果および考察

調査の結果は Table 2 に各部位ごとの重金属含有量を，平均値と範囲で示した．

Cd；前報では肝臓からとくに高い平均12ppmの Cd が検出されたが，今回行ったひとまわり大きいかつおの肝臓から，最高33ppm，平均値は前回同様13ppmの高い値が得られた．肝臓についで高いのは腎臓の 5.5ppm であった．

食品では米にのみ Cd の基準が設けられており，厚生省の示した玄米の安全基準は 1 ppmであるが，魚の内臓から，基準を大幅に上回る Cd が検出された．いうまでもなく，玄米と魚の内臓とではそのまま比較することは適当ではなく，その摂取量のちがいからみて，直ちに有害であるとは考えられないが，食品衛生の面からも利用方法に検討が必要と思われる．ことに肝臓に高い蓄積がみられたことは，臓物の煮食あるいは塩辛等の加工原料に使用する場合に問題であるし，小魚を内臓ごと食用とする場合にも問題であり，肝臓に多い事実は衛生学上からも重要な意味をもつものと考えられる．

筋肉部は0.02～0.03ppm と低く，Cd は主として内臓に高濃度であることが観察された．横紋筋より成る心臓は内臓と筋肉部との中間の性状を示しており，その0.21 ppm は筋肉の10倍，内臓と比較すると肝臓の $^{1}/_{65}$，腎臓の $^{1}/_{20}$に相当する．

Pb；Pb については各部位のうち含有量の最も高いものは幽門垂の0.13ppmであり，ついで肝臓の0.03ppmであった．その他の内臓および筋肉部は0.01ppm以下の低い値であった．

幽門垂は魚の栄養器官あるいは消化器系とも言われ，その機能については十分説明されていないが，肝臓とともに大形でしかも主要な臓器であることから，Pb の様子に注目していく必要があると考えられる．

環境の有害元素のひとつである Pb の定常値は，マグロ[2] あるいはマス[3] の分析値では，0.1ppm 以下，水底魚[4] では0.2ppm 以下と報告されているが，人為汚染のないと想定されるかつおについても 0.1ppm ないしはそれ以下であることが確認された．

Hg；T-Hg は内臓よりも筋肉部に高濃度に蓄積することが確められ，背肉0.27ppm，血合肉0.24ppmと高く，内臓では心臓0.16ppm，腎臓0.15ppmであり，その他いずれの部位も筋肉より低く筋肉部のほぼ$^{1}/_{2}$であった．

Me-Hg は背肉0.24ppm，血合肉0.22ppm であり，その他の部位もT-Hg とまったく類似した分布状態を示している．

また，魚介類の暫定的規制値（かつおについては適用されていないが）T-Hg 0.4ppm，Me-Hg 0.3ppmを越えるものはみられなかった．

前報と比較して，体長59～65cmのかつおのHg の常在量は，体長 52～55cm のかつおとほぼ同程度であり，棲息海域に関係なく背肉の T-Hg 0.28±0.08ppm，Me-Hg 0.25±0.06ppm 血合肉の T-Hg 0.24±0.07ppm，Me-Hg 0.22±0.06ppmが得られた．

また，背肉は比較的容易に十分な試料が得られること，前処理の容易なこと，可食部であること等，水銀汚染の調査としては背肉のT-Hg，Me-Hgを測定するのが最適であると考えられる．

Me-Hg と T-Hgとの割合（以下M/T%と略す）は筋肉部で約90%であり，大部分が Me-Hg として存在することが確められ，マグロをはじめとする各種海産魚における報告[5-8] 80～100%と一致する結果が得られた．

内臓では，腎臓は最低値の27%であったが，脾臓は筋肉部と同じ90%を示した．筋肉部以外の M/T% は平均55%である．

Zn；Zn は自然環境中に多量に分布することが知られており，かつお体内でも，他の重金属にくらべ比較的含有レベルの高い金属である．

組織別に比較すると，筋肉部よりも内臓に高いことが確められた．卵巣に111ppm の最も高い値が測定されたほか，肝臓61ppm，幽門垂60ppm，精巣44ppmの順に高濃度であった．今回のかつおは人為汚染の考えられない外洋性のものであることから，この数値は生体の必要量であり，Zn の定常レベルはこのへんにあるものと考えられる．低い値のものは心臓 19ppm，背肉 7.2ppm，血合肉12ppm等筋肉系である．

Zn と Cd は地球化学的に密接な関係のあることが知られている．Table 2 から内臓と筋肉中のZnの含有量を濃度順に示し，同様に Cd の含有量を対比すると次のようになる．

Zn；肝臓＞幽門垂＞脾臓＞腎臓＞消化管＞心臓＞血合肉＞背肉

Cd；肝臓＞腎臓＞幽門垂＞脾臓＞消化管＞心臓＞血合肉＞背肉

Cd の腎臓がやや上位にあるほかはZn，Cdとも各組織の順位はかなりよく一致している．Zn は脱水素酵素の

必須元素として，またメタロチオネンとして肝臓中に多く存在する.[9,10] 肝臓の Zn チオネンは Cd と交換され，解毒機構の役割を果たしているといわれ,[9,11] Zn と Cd との間には大きな関連性の存在が推察される.

Cu；Zn に筋肉系よりも内臓に含有量が高いという臓器親和性があったのにくらべ，Cu にはそのようなはっきりした親和性はみられなかった．Cu は組織の生理機能と特異なつながりがあるため，同じ筋肉部でも，血合肉6.1ppmは背肉0.75ppmの８倍にも達する.

内臓では肝臓が最も高く15ppmであった．他の臓器では心臓4.9ppm脾臓3.2ppm腎臓3.1ppm がこれについで高い値を示したが，これらも Zn の場合と同様，正常な生理的必要量とみなすのが妥当である.

Mn；生化学反応の活性化に大きな役割を果たす Mn は，鰓が0.76ppmで最も高く，ついで精巣0.32ppm心臓0.26ppmであったほかはいずれの部位も 0.2ppm 以下であった.

筋肉部のうち，背肉の４倍に相当する0.16ppmが血合肉に測定されており，これは Cu の場合と同様その機能の違いのあらわれと思われる.

Co，Cr；Co，Cr はいずれも体内濃度の低い金属である．Cr は心臓に0.21ppmのほかは0.2ppm以下であり，筋肉部は0.02～0.03ppm と低い値であった．Co はいずれの部位も 0.1ppm 以下である．腎臓，精巣が 0.09ppm であるほかは，すべて0.01～0.03ppm程度であった.

まとめ

1) 第１報および本報の結果から，近海産のかつお体内の重金属含有量は棲息海域のちがいによる差異はみられなかった．また春と秋とでは脂量に数%の開きがあり，体重2.8～5.6kg（体長52～65cm）の幅があるが，重金属含有量はそれらとはかかわりなくほぼ一定である．Table 2 はこの条件のかつおの定常値とみなしてさしつかえないものと思われる.

2) Hg は内臓よりも筋肉に多く蓄積するが，暫定的規制値T-Hg 0.4ppm(Me-Hg 0.3ppm) を越えるものはみられなかった．M/T% は筋肉部でほぼ90%であり，大部分が Me-Hg として存在する．その他の部位は，平均55%であった.

3) Hg 以外の金属は内臓に比較的多く含有される．とりわけ肝臓，腎臓に Cd が高く，肝臓から最高33ppm が検出された．内臓は食品としてよく利用されるので注意が必要である.

Pb は幽門垂から平均 0.13ppm を検出したほかはすべて0.1ppm以下でありCo，Cr とともに体内濃度の低い金属である．比較的含有レベルの高い金属としては Zn があげられるが，110ppm 程度は生体の必要量と考えられる.

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) 勝木康隆，安田和男，上田工，木村康夫：東京衛研年報，25，257，1974
2) Chow, T. J., Patterson, C. C. and Settle, D.: *Nature*, 251, 159, 1974
3) Tong, S. S. C., Youngs, W. D., Gutenmann, W. H. and Lisk, D. J.: *J. Fish. Res. Board Can.*, 31, 238, 1974
4) Childs, E.A. and Gaffke, J. N.: *J. Food Sci.*, 39, 853, 1974
5) Westöö, G.: *Acta Chem. Scand.*, 21, 1790, 1967
6) Westöö, G.: *ibid.*, 22, 2277, 1968
7) 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, 1972
8) 伊藤弘一，竹内正博，江波戸挙秀，雨宮敬，原田裕文，戸谷哲也：*ibid.*, 25, 141, 1974
9) 木村正己：代謝，12，205，1975
10) 野崎光洋：*ibid.*, 12, 229, 1975
11) 厚生省環境衛生局食品化学課：食品衛生研究，24，764，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 200—204, 1975

魚介類への微量元素の蓄積挙動の研究（第Ⅲ報）
マグロ中の水銀およびセレンの体内分布

田村行弘* 真木俊夫* 山田 洋* 嶋村保洋*
落合節子* 西垣 進* 木村康夫*

Studies on the Behaviour of Accumulation of Trace Elements in Fishes (III)
Accumulation of Selenium and Mercury in Various Tissues of Tuna

YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*, HIROSHI YAMADA*, YASUHIRO SHIMAMURA*, SETSUKO OCHIAI*, SUSUMU NISHIGAKI* and YASUO KIMURA*

The organs and tissues of Tuna and Bonito, 13 samples of 5 species were analyzed on Se, Total-, and Methyl-Hg.

The results obtained were as follows :

1. The higher-levels of Se were in range of 10～15 ppm in liver, spleen, kidney and the lower-levels in white muscle were 0.5～1.3 ppm. The higher-levels of Total-Hg were in range of 0.1～0.7 ppm in spleen, liver, and muscle. The levels of Total-Hg in blood were less than 1/10 in white muscle.

2. The levels of Se apparently exceeded those of Hg in all tissues, and the least molar ratio was 5.8 : 1 in the muscle of the Tuna and those of the other organs showed >100 : 1. No correlation between accumulation of Total-Hg and of Se in organs was observed.

3. The higher-levels of Se in the various muscle tissues were in the side of the abdomen and in contrast, Total-Hg showed the tendency to be on somewhat higher levels in the back muscle, but not so clearly. The accumulation of Se in the true red muscle was 7-fold higher than in the white muscle.

4. The ratio of Methyl-Hg to Total-Hg was 93±6 % in average in the muscle of the Tuna, but lower in true red muscle and liver, showing ca. 55%.

緒　言

セレンが水銀毒性軽減に有効であるという報告[1-5]は数多くあり，またKoemanら[6]は海洋哺乳動物の臓器中で両元素の蓄積に高い相関があること，古くは氏岡[7]が水俣病患者や猫の臓器中にも同様な現象のあることを報告している．最近Kostaら[8]は水銀鉱山夫の臓器中で両元素の蓄積に高い相関のあることを観察している．このように，近年両元素間の生理学上の相関がクローズアップされてきている．

セレンと水銀の摂取源として，食生活上重要な影響をもたらす海洋魚介類のこれら元素の体内分布や蓄積挙動については知られていない．

著者らは，前報[9-12]で海産魚の筋肉中のセレンおよび水銀の蓄積挙動について調査したが，今回はマグロについて，総水銀，メチル水銀，セレンの体内分布を調べ，更にそれらの量比的関係について検討を加えたので報告する．

調査の部

試料

東京築地中央卸売市場に陸上げされたものを採取した．試料の内訳は5種13試料，メジマグロ7尾（体重2.2～4.2kg，体長47～63cm），ビンナガ2尾（体重11.7～11.8kg，体長82～84cm），キハダ2尾（体重2.6～3.3kg），メバチ1尾（11kg）およびカツオ1尾（3.3kg），であり，メジマグロは解体しないまま，その他のものは市場で解体され，内臓および組織に分けたものを，分析するまで−20°で凍結して貯蔵した．試料を解凍後，各臓器および組織別に解体分離し，ホモジナイズした試料

* 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 Concentration of total-, methyl-mercury and selenium levels in tissues or organs of fish

ppm : wet weight

Species	Bluefin tuna (n=7)			Albacore (n=2)			Bigeye tuna (n=1)			Yellowfin tuna (n=2)			Bonito (n=1)		
Body weight	2.2~4.2kg			11.7~11.8kg			11.0kg			2.6~3.3kg			3.3kg		
Body length	47~63cm			82~84cm											
Item	T-Hg	MeHg	Se	T-Hg	MeHg	Se	T-Hg	MeHg	Se	T-Hg	MeHg	Se	T-Hg	MeHg	Se
White muscle	0.29±0.06	0.26±0.05	0.62±0.11	0.34	0.34	0.50	0.23	0.24	1.3	0.11	0.10	0.63	0.07	0.07	0.98
True red muscle	0.29±0.05	0.19±0.07	4.7±2.1												
Liver	0.23±0.04	0.13±0.02	11±3	0.33	0.08	24	0.27	0.24	32	0.06	0.04	10	0.05	0.02	9.6
Kidney	0.18±0.01	0.14±0.02	12±3				0.27	0.20	18	0.06	0.06	11			
Spleen	0.24±0.05	0.19±0.03	8.0±2.3	0.72	0.16	33	0.66	0.17	14	0.08	0.07	18	0.02	0.01	9.5
Heart	0.23±0.04	0.20±0.04	8.5±2.0	0.27	0.15	4.1	0.34	0.21	19	0.08	0.08	10	0.11	0.04	8.8
Pyloric caecum	0.23±0.03	0.16±0.03	2.9±0.5	0.34	0.18	5.3	0.15	0.14		0.05	0.03	4.3	0.09	0.01	3.1
Stomach	0.17±0.02	0.13±0.03	2.9±0.4	0.30	0.12	6.5	0.15	0.15	10	0.04	0.03	4.8	0.01<0.01		3.1
Intestine	0.15±0.02	0.11±0.02	2.8±0.6	0.22	0.12	5.6	0.11	0.11	4.7	0.03	0.03	5.3	0.03	0.01	4.3
Gallbladder	0.08±0.04		2.9±0.6	0.19		3.6	0.07		5.5						
Testis				0.16									0.01	0.01	1.8
Brain	0.09		5.2												
Gill	0.08±0.01	0.06±0.01	4.5±1.6							0.02	0.02	7.9			
Blood	0.03±0.02	0.03±0.01	13±2.4												
Skin and Scale	0.09±0.01	0.03±0.01	0.82±0.15				0.03		5.3				0.03		1.2
Stomach content	0.10±0.07	0.05±0.01	1.6±0.9	0.04	0.04	2.4									

Note …… T-Hg : Total mercury MeHg : Methyl mercury (expressed as Hg)

について分析を行なった．筋肉部位の区分は血合肉を分け，更に白筋肉部をTable 3の図のように6部位に大別し，また内臓は肝臓，腎臓，脾臓，心臓，幽門垂，胃，胃内容，腸管，胆のう，精巣，脳，鰓，皮およびうろこ，更に血液は心臓内から採取し14部位に分けた．

分析法

第1報[12]の分析法に準じて行なった．なお本報の分析値はすべて Wet Weight で示した．

結果と考察

各臓器および組織中の総水銀，メチル水銀，セレンの蓄積分布をTable 1に，また総水銀とセレンのモル比および総水銀に対するメチル水銀の百分率をTable 2，更に筋肉の部位別分布をTable 3に示した．

1．水銀は魚類により体内分布が異なるが総水銀では，全般的に，脾臓，肝臓，心臓，筋肉部に高い傾向がみられ，0.3～0.7ppmの範囲にあった．また血液中のレベルは筋肉部の約 $^1/_{10}$ と最も低く，更に皮およびうろこもまた低い傾向を示した．メチル水銀の蓄積の最も高い部位は白筋肉部で，次いで血合肉，実質臓器の順であった．

一方，セレンは肝臓，脾臓，腎臓，血液に高い蓄積傾向が認められ，マグロ類の平均でそれぞれ 15±8，14±10，13±3，13±2 ppm，また白筋肉部は水銀と反対に他の臓器と比較して最も低く，実質臓器の $^1/_{20}$ 以下で0.5～1.3ppmを示し，第1報[12]で得られたレベルと同じであった．脾臓中のセレン，特にビンナガ，キハダにおいては，それらの肝臓値より高く1.4～1.7倍あり，メジマグロの脾臓中の平均より2～5倍高い蓄積を示した．

このように実質臓器に多量のセレンが存在し，また魚体の大小にかかわらず数10ppm存在していることは，Gultathion peroxidase がセレン酵素であること[13]やセレンの抗酸化効果[14]，ビタミンEの保護的作用[15]あるいは動物の疾患（筋ジストロフィー等）に対して有効であるなどから生理学上必須な量を保持しているものと考えられ，その量は胃内容物の約10倍，海水濃度の20万倍に濃縮されていることになる．

2．今回の調査で特に目立った知見は，どの部位においても，セレン量は水銀量を常にはるかに上回ってお

Table 2 Average % of Methyl mercury to Total mercury and molar ratio of Selenium to Total mercury in fish

Species	Bluefin tuna		Albacore		Bigeye tuna		Yellowfin tuna		Bonito	
	n = 7		n = 2		n = 1		n = 2		n = 1	
Body weight (kg)	2.2～4.2		11.7～11.8		11		2.6～3.3		3.3	
Body length (cm)	47～63		82～84		—		—		—	
Item	M/T	Se/T	M/T	Se/T	M/T	Se/T	M/T	Se/T	M/T	Se/T
White muscle	92± 6	5.5± 0.8	100	3.9	101	11	91	18	97	36
True red muscle	55±13	39±12								
Liver	58±12	134±32	23	194	86	297	67	438	48	486
Kidney	79±11	172±37			76	172	95	470		
Spleen	78±11	86±32	22	139	26	53	78	540	71	202
Heart	85±17	96±33	56	39	61	143	107	342	38	88
Pyloric caecum	68± 7	33± 6	55	39	90		62	226	13	780
Stomach	76±10	44± 4	40	57	97	174	69	285	44	364
Intestine	72±14	47± 9	50	65	100	108	104	462	35	
Gallbladder	91	102±34				200				455
Testis			67	93					100	
Brain		147								
Gill	78± 6	135±36					93	928		
Blood	75±29	981±518								
Skin and Scale	44±14	23± 2				450			103	
Stomach content	78±15	47±23	86	151						

note : M/T……Methyl mercury/Total mercury (%)
Se/T……Selenium/Total mercury (molar ratio)

り，そのモル比（セレン／総水銀）は，Table 2 に示したように水銀が高く，セレンが最も低い白筋肉中でもマグロ類の平均で5.8：1，次いで幽門垂および血合肉は，キハダ以外のマグロの平均でそれぞれ 34：1，39：1であった．また実質臓器はセレンが高いため 100：1 を上回り，その他の部位でも同様な傾向を示した．キハダとカツオでは総水銀が他のマグロより低く，セレンは他の魚種とほぼ同じレベルを保持しているので，筋肉を除いて，その比率は 200：1 以上と著しくかけはなれた値を示している．

このように Koeman ら[6]の報告する海洋哺乳動物とは違って，臓器中のモル比 1：1 の割合は観察されず，どの部位もセレンが水銀をはるかに上回っていた．

また，メジマグロについてセレン，総水銀の分析値と臓器，筋肉の実測重量からセレンと総水銀の魚体内総量を算出すると，そのモル比は10：1であった．

一方，メジマグロの水銀とセレン間の蓄積相関を求めたが，どの部位においても，その相関は認められなかった（$P>0.05$）．従って，セレンはいずれの臓器でも水銀に付随した蓄積はなく，それぞれ別々の蓄積挙動を持っていることが観察された．

体重あるいは体長と臓器蓄積との相関関係は，わずかに肝臓中のセレンと体長（$P<0.01$）および脾臓中の総水銀と体長あるいは体重（$P<0.01$）との間にのみ認められたが，他の部位では認められなかった（$P>0.05$）．魚齢は体長によく反映するため，肝臓中のセレンは成長に伴い必要量が多くなっていくものと考えられる．

3．総水銀に対するメチル水銀の比率は，Table 2 のように，白筋肉部が最も高くマグロ類の平均で93±6％血合肉部および肝臓が，最も低くそれぞれ55±13％，56±20％，その他の臓器では約70％であった．また脾臓は，魚種により異なるが，特にビンナガ，メバチではそれぞれ22％，26％と他に比較して著しく低かった．

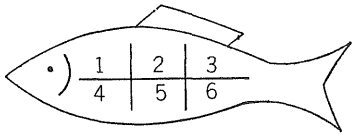
総水銀とメチル水銀の差を“無機水銀”と考えると，無機水銀の蓄積量の高い肝臓，脾臓，血合肉では，セレンもまた多量に存在しており，前報[9]で調査したクロカワカジキの筋肉も無機水銀の高いとき，セレンが 2 ppm 以上蓄積されていて，無機水銀とセレンとの間に量比的

Table 3　Distribution of total-, methyl-mercury, and selenium in various muscle tissues of Bluefin tuna

wet weight

No.	Size	Tissue	T-Hg (ppm)	MeHg (ppm)	Se (ppm)	M/T (%)	No.	Size	Tissue	T-Hg (ppm)	MeHg (ppm)	Se (ppm)	M/T (%)
1	2.24kg 47cm	W 1*	0.23	0.23	0.45	100	3	3.63kg 53cm	W1&4	0.26	0.28	0.56	108
		2	0.22	0.21	0.43	95			2&5	0.24	0.23	0.55	96
		4	0.20	0.18	0.61	90			3&6	0.25	0.24	0.70	96
		5	0.21	0.19	0.69	90			R	0.26	0.15	3.67	58
		3&6	0.20	0.19	0.62	95	4	2.40kg 46cm	W1&4	0.26	0.24	0.56	92
		R**	0.24	0.13	3.48	54			2&5	0.26	0.24	0.48	92
2	4.22kg 63cm	W 1	0.38	0.37	0.79	97			3&6	0.25	0.20	0.49	80
		2	0.35	0.31	0.69	89			R	0.29	0.13	2.60	45
		3	0.34	0.30	0.79	88	5	3.72kg 56cm	W1&4	0.35	0.34	0.70	97
		4	0.32	0.30	0.91	94			2&5	0.36	0.36	0.64	100
		5	0.32	0.27	0.90	84			3&6	0.32	0.29	0.64	91
		6	0.34	0.29	0.96	85			R	0.36	0.15	7.50	42
		R	0.32	0.24	6.06	75							

note：W——White muscle tissue



R——True red muscle tissue

関係はないが，無機水銀がセレンを伴って蓄積しているかのように観察される．

4．筋肉の部位別蓄積分布はTable 3に示されているが，総水銀およびメチル水銀は背肉部にやや高く，セレンは反対に腹肉部に高い傾向が認められた．また血合肉部のセレンは白筋肉部の約7倍も高い蓄積が認められた．

最近，山口ら[16]は大型マグロの筋肉部位の総水銀およびセレンを測定し著者らと同様な結果を報告している．更に水銀の分布については前報[9]あるいは田村ら[17]の報告したマグロ3試料中の2試料に同じ傾向が表われている．このほかキハダの後半身腹肉部において他の部位より総水銀蓄積が高い傾向を示したという報告[18]もある．

このような部位による蓄積の違いは，蛋白質あるいは-SH基に依存していると考えられるため著者らは，その一部について粗蛋白質および-SH基について測定し，それぞれ23%，6.3mM（腹肉部），26%，5.5mM（背肉部）という結果を得たが部位による差異を説明するには十分ではないため，今後更に検討する必要があると考えている．

総　括

1．セレンは，実質臓器および血液に高く，おおむね10ppm以上，白筋肉部は最も低く0.5～1.3ppmの範囲であった．総水銀は筋肉，肝臓，脾臓，心臓に高かった．

2．どの部位においてもセレンは水銀を常に上回って蓄積されており，セレンと総水銀のモル比は最低が筋肉で4：1，その他の実質臓器は＞100：1であった．またどの部位も両元素の蓄積相関はなく，それぞれ別々の蓄積挙動を持っている．

3．メチル水銀と総水銀の比率は白筋肉部が最も高く平均93±6%，血合肉部および肝臓が最も低く約55%であった．

4．筋肉の部位別分布は，白筋肉の腹肉部にセレンが高く，背肉部に水銀がやや高い傾向を示し，また血合肉部ではセレンが白筋肉部の約7倍高かった．

文　献

1) Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y.: *Res. Communi. in Chem. Pathology and Pharmacology*, 5, 673, 1973

2) Ganther, H. E. and Sunde, M. L.: *J.Food Sci.*, 39, 1, 1974

3) Stoewsand G. S., Bache, C. A. and Lisk, D. G.: *Bull. Env. Contami. Toxicol.*, 11, 152, 1974

4) Potter, S. and Matrone, G.: *J. Nutr.*, 104, 638, 1974

5) Ohi, G., Nishigaki, S., *et al.*: *Toxicol. and Appied Pharmacol.*, 32, 527, 1975

6) Koeman, J. H., Peeters, W. H. M. and Koudstaol-Hol, C. H. M., *et al.*: *Nature*, 245, 385, 1973

7) 氏岡威令：熊本医学会誌，34，補冊第2，119，1961

8) Kosta, L., Byrne, A. R. and Zelenki, 254, 238, 1975

9) 西垣進，田村行弘，真木俊夫ら：東京衛研年報，24，239，1973

10) 西垣進，田村行弘，真木俊夫ら：*ibid.*, 25, 245, 1974

11) 西垣進，田村行弘，山田洋ら：*ibid.*, 25, 235, 1974

12) 西垣進，田村行弘，真木俊夫ら：*ibid.*, 25, 241, 1974

13) Oh, Sang-Hwan, Ganther, H. E. and Hoekstra, W. G.: *Biochem.*, 13, 9, 1925, 1974

14) 日本化学会：環境防災ライブラリー“微量元素”栄養と毒性，333，1975

15) Bieri, J. G. and Andrews, E. L.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40, 365, 1963

16) 山口誠，下条信弘，広田良夫ら：水俣病に関する総合的研究会資料，16，1975

17) 田村征男，本多忠善，石原利克ら：名古屋市衛研年報，20，89，1973

18) 植山伸一，藤川和也，渡辺和典：水産大学年報，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 205—207, 1975

加工食品中のリン酸塩の使用実態調査

田村行弘* 真木俊夫* 山田 洋* 嶋村保洋*
落合節子* 西垣 進* 木村康夫*

Survey on the Actual Conditions of Phosphorates in the Processed Foods

YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*, HIROSHI YAMADA*, YASUHIRO SHIMAMURA*, SETSUKO OCHIAI*, SUSUMU NISHIGAKI* and YASUO KIMURA*

The total P in 170 samples of 22 species of food, chiefly meat-, fish- and wheat-products, were analyzed, and it was tried to estimate the added amounts of phosphates used as food additive for improvement of their quality.

The results obtained were as follows:

1) The total P levels in most of foods exception of the meatproducts showed less than 0.1% in average, which means that the addition of phosphate calculated as form of Sodium triphosphate is far below 1%.

2) A few folds of P levels, 0.32% in average, vs. those of the others were found in the meat products, and noted the highest value, 0.66% in one of the ham. It was assumed that added amounts of phosphate expressed as Sodium trimetaphosphate in this sample correspond to ca. 5%, when its level correct with natural occurred P.

3) In addition, the ratio of Ca to P in those foods was described.

緒　言

近年，リン酸塩は，その用途が増し，食品の種々の金属イオンによる変色や変質の防止，風味の改良，分散安定剤（結晶生成阻止等），pHの保持，保水性増強，清罐剤，更には庶糖の軟化剤などの目的で，[1-4] リン酸一ナトリウムのような単一化合物やポリリン酸塩を代表とする重合又は縮合化合物として，種々の加工食品に使用されている．その消費量は昭和44年度の調べで[1] 6,000t，リンとして1,400t，リン酸と合わせると年間8,500tであるが，最近は，加工食品の大幅な使用に伴い，その消費量もかなり増大しているものと思われる．しかし市販食品について，どの程度添加されているかの実態調査報告はない．

そこで，環境衛生部食品衛生課と共同で，加工食品中のリン酸塩について調査を行った．リン酸塩が比較的多量に使用されていると思われる食肉及び魚肉加工食品，小麦粉製品，漬物，味噌，清涼飲料水中の総リン含有量を測定し，個々の食品の天然保有リン量を差し引いて，その添加量を試算することにした．更に栄養学的見地からリンと密接な関係にあるカルシウムも同時に測定し，リンとの比率についても検討した．

調査の部

試料　昭和49年10月から11月までと，昭和50年2月から3月までの2回にわたり，食品衛生課及び機動班が小売店から22種，170検体を採取し，送付したものを試料とした．試料は，細切して，ホモジナイズを行い試験に供した．

分析法　試料10gを衛生試験法の乾式灰化法に準じて灰化する．灰化物を希塩酸（1：1）に溶かし，水浴上で蒸発乾固した後，10%塩酸を加え，温めて完全に溶解する．溶液は沪過し，ロ紙を10%塩酸で洗い，沪液と洗液を合せて20mlとし，供試液とする．

1　リン：衛生試験法記載のモリブデン青比色法に準拠して定量した．

2　カルシウム[5]：カルシウムとして50～250μgとなるように供試液を秤り，15%硝酸ランタン溶液2mlを加え，蒸留水で10mlとした後，原子吸光法で，λmax 4,226.7Åを用いて定量した．

* 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

Table 1 Contents of Total phosphorus and Calcium levels in the processed foods

main source	Food	n	Phosphorus (% wet weight)		Calcium (% wet weight)		P/Ca (molar ratio)		Daily* intakes for man (P. mg)
			Max.	$\bar{X}\pm$S. D.	Max.	$\bar{X}\pm$S. D.	Max.	$\bar{X}\pm$S. D.	
Meat	Ham	12	0.66	0.32±0.20	0.03	0.02±0.01	131	38±35	67
	(Loin roll ham)			(0.13)		(0.01)		(22)	
	(Pressed ham)			(0.21)		(0.01)		(40)	
	Sausage	10	0.29	0.20±0.03	0.07	0.04±0.02	20	10±6	31
				(0.14)		(0.02)		(12)	
	Vienna sausage	6	0.41	0.21±0.14	0.05	0.03±0.01	24	11±9	
				(0.14)		(0.03)		(8)	
	Corned beef	8	0.15	0.09±0.04	0.05	0.02±0.01	13	7±4	6
				(0.20)		(0.06)		(5)	
	Hamburg steak	5	0.15	0.11±0.04	0.13	0.09±0.05	3	2±1	
	(Meat)			(0.19)		(0.004)		(63)	
Fish meat	Ham	6	0.25	0.11±0.09	0.11	0.04±0.04	16	5±6	34
				(0.05)		(0.05)		(2)	
	Sausage	6	0.20	0.10±0.06	0.03	0.02±0.01	13	7±5	27
				(0.20)		(0.10)		(3)	
	Mix (Surimi)	6	0.19	0.10±0.06	0.27	0.07±0.10	6	4±2	21
	Kamaboko	10	0.26	0.10±0.07	0.90	0.16±0.28	6	2±2	30
	Agemono	8	0.14	0.11±0.05	0.19	0.07±0.06	8	4±3	30
	(Satsumaage)			(0.13)		(0.12)		(2)	
	Tsumire etc.	5	0.14	0.12±0.03	0.39	0.15±0.14	6	2±2	16
	(Tsumire)			(0.12)		(0.06)		(3)	
	(Fish meat)			(0.20)		(0.02)		(13)	
Wheat flour	Chuka-Soba	18	0.11	0.07±0.02	0.03	0.02±0.01	7	5±2	156
				(0.09)		(0.02)		(6)	
				(0.12)		(0.04)		(5)	
	Instant-Soba	6	0.22	0.13±0.06	0.04	0.03±0.01	17	7±1	220
				(0.08)		(0.02)		(4)	
	Coating of gyoza etc.	4	0.12	0.09±0.02	0.14	0.06±0.06	7	4±3	
	Yakigyoza	3	0.07	0.05±0.03	0.04	0.03±0.01	5	3±2	
	Shumai	13	0.12	0.06±0.03	0.08	0.04±0.02	11	3±3	
	(Wheat flour)			(0.10)		(0.02)		(8)	
Others	Fukuzinzuke	6	0.15	0.10±0.05	0.11	0.07±0.02	4	2±1	—
				(0.09)		(0.06)		(2)	
	Pickles	12	0.14	0.06±0.04	0.13	0.06±0.03	5	2±1	17
	Miso	14	0.26	0.14±0.08	0.15	0.07±0.13	5	3±1	55
				(0.16)		(0.09)		(2)	
	Non-alcoholic beverages	10	0.004	0.003±0.006	0.006	0.003±0.002	5	2±2	1
	(Soda pop)			(NON)		(0.002)		(—)	
	(Tea infusion)			(0.003)		(0.002)		(0.2)	
	Wheat-protein	1		0.07		0.08		1	
	Soybean-protein	1		0.52		0.08		9	
	Starch	1		0.02		0.02		1	

note : ( ) ····· Reference data quoted from the 3rd edition of Food Composition Table for Japan Use.

* ····· Highest Contents of P × Standard daily intakes of the foods for Japanese, which the Ministry of Public Welfare investigated.

結果と考察

調査結果をまとめてTable 1に示した．今回調査した加工食品の原料から4種類に大別し，それぞれ食品別に総リン（以下Pと略す）及びカルシウム（以下Caと略す）の含有量を示し，PとCaのモル比，更には同種の加工食品中のP最大含有量について，厚生省の昭和43年度に調査した各食品の平均摂取量から，[6] 1人1日当り摂取mg量を換算した．また（ ）内の数値は調査した食品のPとCa含有量の参考値であり，日本食品標準成分表[7]の数値から引用し，表示した．但し，この参考値はP添加の食品も含まれている可能性があり，食品本来の天然保有量の値として引用できないものもある．そこで，正確な原料の使用量がつかめないため，一般的に使われている量とさきの成分表に表わされている原料のP

含有量から天然保有量を算出し，食肉加工食品，魚肉加工食品，小麦粉製品について，各々0.2，0.1，0.1%とした．他のものは参考値をその食品の天然保有量とした．またCaについては，参考値を，更に参考値のないものは原料中のCa量を天然保有量とした．

調査した食品の内，最も高いP含有量を示したものは，食肉ハムであり，平均及び最高値は各々0.32±0.2%，0.66%であった．この他に食肉製品のウインナーソーセージの中に，0.41%と高い値を示すものがあった．しかし，他の食肉加工食品の場合P含有量はTable 1のように大きな幅が認められても，試算した天然保有量（食肉製品0.2%）を大きく上回るPを認める加工食品はなかった．最高値の0.66%のP含有量を示したハムから，Pの天然保有量0.2%を差し引いて，リン酸塩の添加量を推定すると，トリメタリン酸ソーダとして約5%であり，この他ハム中にこの値に近いものが3試料あった．他の食肉加工品は通常添加されているリン酸塩の使用量0.1%（Pとして）の範囲内に留まっていた．

一般的にリン酸塩が使用されていると考えられる魚肉加工品中のP含有量は，平均0.11±0.06%であり天然含有量0.1%を大きく上回るものはなかった．その他の食品についても通常の使用量0.1%（Pとして）の範囲内にあり，一般的使用量を逸脱したリン酸塩が添加されているような事実は認められなかった．

一方，Ca含有量は，カマボコ及び餃子の皮に各々0.9%，0.14%という天然由来量（0.05%，0.03%）をはるかに越えるものがそれぞれ1試料ずつあった．前者は弾力性の強化の目的[8]で添加される．すなわち炭酸カルシウムはリン酸塩と併用すると相乗効果があるためである．後者は特にCa塩を添加する理由はなく，小麦粉の天然保有量（0.09%）からみて，取り粉として少量の炭酸カルシウムの添加があったものと思われる．上記2者を除く他の食品中のCa量は，参考値と比較して差がないため天然由来と推定される範囲内に留まっていた．

PとCaのモル比についてみると，各加工食品により異なるが，食肉製品がその比からみて最もアンバランスの傾向を示した．しかし，これら加工食品の原料は，それ自体非常にアンバランスであり，成分表から引用した値をP/Caのモル比で表わすと，豚肉及び牛肉で約63：1，魚肉13：1，小麦粉8：1となり，今回調査した加工食品の結果から推定されるリン酸塩の添加は，本来これら食品が持っているP/Caのアンバランスな比率を大きく変えることはないと考えられる．

リン酸塩が添加された食品によるP摂取量を推定すると，Table 1に示したようにPの最大含有量0.66%を示したハムの場合，その1日平均摂取量10.1g（昭和43年度国民栄養調査）から試算すると67mg/日/人となる．昭和38年度の国民栄養調査[9]によれば，我国民の1人1日当たりのリン摂取量は1,323mgであり，またその後の五島ら[10]の調査では934mg/日/人を摂取していると報告している．上記試算値は五島らの平均摂取量の約7%に相当し，更にFAO/WHOのリン酸塩の許容摂取量[11] 3.5g/日/人（Pとして）の約3%の関与に過ぎず，副食物として摂取する他のものも含めてPの摂取量に影響を与えることはないと考えられる．また主食として摂取される麺類では，Pの最大含有量0.22%を示したインスタントラーメンを100g 1日1回食べると220mg/日/人となり五島らの1日摂取量の24%であり，毎食摂取したとしてもFAO/WHOの許容摂取量を越えることはない．

以上のようにリン酸塩の添加は一般的な使用量を著しく逸脱したものがなく，また，Pの1日平均摂取量及びCa/Pの比の均衡に対して，添加されたリン酸塩はほとんど影響を及ぼすことはないと考えられる．

文　献

1) *New Food Industry*, 15, 増刊, 1973
2) 梅田真男：*ibid.*, 13, 3, 24, 1970
3) 堀省一郎：化学工業別冊, 12, 5, 1968
4) 食品添加物公定書　解説書第3版, 1973, 広川書店
5) Willis, J. B.：*Anal. Chem.*, 33, 556, 1961
6) 厚生省環境衛生局　食品化学課：食品衛生研究, 18, 10, 17, 1968
7) 科学技術庁資源調査会：三訂日本食品標準成分表, 1965, 医歯薬出版
8) 山本常治：*New Food Industry*, 5 (6), 32, 1963
9) 厚生省公衆衛生局栄養課：日本人の栄養所要量, 1969, 第一出版
10) 五島孜郎, 関博磨：日本栄養食糧学会第7回関東支部大会講演要旨, 1971
11) *7th Report of FAO/WHO Expert Committee in Food Additives*, 1963, Rome

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 208—213, 1975

食品用洗剤の成分分析

(1) 界面活性成分

遠藤英美* 広門雅子* 宇佐美博幸*
半田八十三** 藤居瑛*

Analysis of the Synthetic Detergent for Kitchen

(1) Surface Active Agent

FUSAYOSHI ENDO*, MASAKO HIROKADO*, HIROYUKI USAMI*,
YASOMI HANDA** and TERU FUJII*

During the period from 1973 to 1974, a total of 48 kinds of synthetic detergents for the kitchen use in market was studied for their ingredients. Since the amount of surface active agents in the synthetic detergents have been regulated by the Japanese Industrial Standard (JIS) as greater than 15 % by the weight. Consequently, it was found that 8 (22.2%) out of 36 the products tested in 1973 and 4 (36.4%) of 11 in 1974 were found to be containing less than 15% of surface active agents. The products not containing anion surface active agents in 1974 were remarkably increased as 5 (45.5%) of 11, while there were 3 (8.3%) of 36 in 1973.

緒言

昭和48年4月28日食品衛生法の一部改正により，飲食器，野菜果実用洗浄剤の成分規格および使用基準が新たに制定され11月1日より施行されることになった.[1] 今回新たに制定された規格内容は，ほぼＪＩＳ規格台所用合成洗剤[2] を準用したものであるが，ＪＩＳ規格では界面活性剤相当分が15%以上となっているのに対して，食品衛生法では界面活性剤相当分の含量規定が示されていない．この点は含有量と洗浄効果とが深いかかわりを有する関係から考えて問題である.

筆者らは，昭和48年度と49年度の2ケ年にわたって市販品を対象にＪＩＳ規格合成洗剤試験法[3] および日本薬学会協定衛生試験法中の食品，飲食物器具用合成洗剤試験法[4] を準用して界面活性剤配合量および界面活性成分を測定し，その配合割合および年度別活性成分配合比の変動傾向につき調査したので報告する.

実験の部

実験1において合成洗剤中の界面活性剤相当分の測定を行ない，実験2において界面活性剤相当分中のアニオン界面活性剤，非イオン界面活性剤およびせっけん分の定量を行なった.

器具および試薬

ＪＩＳ規格合成洗剤試験法に記載されているものを用いた.

試料

昭和48年度市販品：都食品衛生課収去品および当研究室で購入したもの，13社製品36品目.

昭和49年度市販品：都食品監視課および当研究室で購入したもの，7社製品11品目.

測定方法

実験1 界面活性剤相当分の定量

ＪＩＳ規格合成洗剤試験法では界面活性剤相当分を，アルコール可溶分より石油エーテル可溶分および尿素の量をさし引いたもので示すことになっている.

$$P = A - (B + C)$$

P……界面活性剤相当分（%）
A……アルコール可溶分（%）
B……石油エーテル可溶分（%）
C……尿素（%）

1-1 アルコール可溶分の定量法

ＪＩＳ K3362 5-2を準用した.

試料約5 gを内容300m*l* の三角フラスコ中に精密に秤取し，無水エタノールを加え，長さ100cmのガラス管を付け，水浴上で1時間ときどき振りまぜながら煮沸溶解

* 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
**徳島文理大学薬学部

させ，温時ガラスろ過器（G 4）を用いてろ過し，熱無水エタノールで三角フラスコおよびろ過器上の残留物をよく洗い，洗液はろ液に合わせ，冷後250mlメスフラスコに移し，無水エタノールで全量を250mlとする（この液を試験溶液として1-1アルコール可溶分，1-3尿素および2-3非イオン界面活性剤の定量を行なう）．この液100mlを正確に重量既知の蒸発皿にとり，水浴上で加熱してエタノールを留去し，105°で1時間乾燥したのち，冷後秤取し，次式によってアルコール可溶分(A)を算出する．

$$A=\frac{W}{S\times\frac{100}{250}}\times100$$

A……アルコール可溶分（%）
W……乾燥残量（g）
S……試料採取量（g）

1-2 石油エーテル可溶分

ＪＩＳ規格K3362　5-1を準用した．

試料約10 gを内容300ml三角フラスコに精密に秤取し，水100mlおよび95%エタノール100mlを加えて溶かす．不溶物あらばろ過し，N/2 NaOH 5 mlを加えてアルカリ性とし（指示薬フェノールフタレイン），分液口斗に移し，石油エーテル50mlずつで3回繰り返し抽出を行ない，抽出液は合わせ，水100mlずつで2回水洗する．（抽出残液のアルカリ水溶液および水洗液は合わせ，2-2せっけん相当分の試験溶液とする．）水洗した石油エーテル抽出液は，無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し，乾燥ろ紙を用いてろ過する．分液口斗およびろ紙上の残留物は少量の石油エーテルで洗い，洗液はろ液に合わせ，水浴上で約50mlまで濃縮したのち，重量既知の蒸発皿に移し，再び水浴上で加熱して蒸発乾固し，冷後送風して残留する石油エーテルを追い出したのち，デシケーター中に一夜放置し，秤量し，次式によって石油エーテル可溶物（B）を算出する．

$$B=\frac{W}{S}\times100$$

B……石油エーテル可溶分（%）
W……石油エーテル抽出量（g）
S……試料採取量（g）

1-3 尿素の定量法

ＪＩＳ規格K3362　5-5～6を準用した．

アルコール可溶分の定量法で得たエタノール抽出液100mlを正確にとり，この液を予め強酸性カチオンイオン交換樹脂（H型）を高さ20cmにつめたガラスカラム（径1×高さ30cm）内にゆっくりと流し，無水エタノール250mlを用いてカラム内を洗ったのち（このエタノール流出液は合わせて，2-3非イオン界面活性剤の試験溶液とする）．このカラムに水200mlを上部から流し，流出液はビーカーに集め，水浴上で約30mlとなるまで濃縮したのち，重量既知の蒸発皿に移し，ビーカーは少量の水で洗い，洗液は濃縮液に合わせ，再び水浴上で蒸発乾固し，約70°で1時間乾燥したのち，デシケーター中に放冷し，冷後秤量し，次式によって尿素量(C)を算出する．

Table 1　Content of Surface active agent and Alcohol soluble matter in the Specimens

1973									1974		
No	A	P	No	A	P	No	A	P	No	A	P
1	26.60	21.35	13	22.40	20.19	25	18.23	14.00	1	33.63	23.78
2	33.03	27.50	14	11.82	10.46	26	25.43	14.02	2	32.89	25.31
3	36.27	31.22	15	18.96	15.30	27	17.85	17.24	3	37.39	22.55
4	35.64	28.98	16	20.32	18.95	28	23.25	22.29	4	10.05	9.56
5	15.05	12.59	17	17.07	15.83	29	24.81	23.16	5	13.90	12.96
6	21.39	20.13	18	18.50	17.73	30	20.57	18.38	6	25.09	23.42
7	27.76	15.62	19	14.67	14.00	31	20.74	18.59	7	14.75	12.07
8	16.74	13.06	20	21.82	15.04	32	18.95	17.01	8	23.04	20.92
9	23.49	19.66	21	14.21	13.84	33	18.92	17.15	9	20.98	19.18
10	22.00	16.31	22	20.26	18.56	34	21.23	18.11	10	20.96	20.19
11	13.66	12.35	23	21.42	20.51	35	25.27	20.58	11	13.38	11.70
12	18.64	17.54	24	19.35	16.93	36	32.31	27.67			

A……Alcohol soluble matter (%)
P……Surface active agent (%)

Table 2 Ratio of the Surface active agent content

year	1973		1974	
Content %	36	(100%)	11	(100%)
<15	8	22.2	4	36.4
15～20	17	47.3	1	9.1
20～30	10	27.8	6	54.5
30<	1	2.8		

$$C=\frac{W}{S\times\frac{100}{250}}\times 100$$

実験結果

昭和48年，49年度市販洗剤中の界面活性剤含量の測定は，上記の方法に従って行ない算出すると表1のごとくになる．

考察および結論

表1はアルコール可溶物および界面活性剤相当分の測定値を年度別に分類したものであるが，これを界面活性剤含量別に48年，49年度別に分類しなおしてみると，表2のごとくになり，この表から年度別に界面活性剤含量の変移を考察すると，界面活性剤相当分が15%以下（ＪＩＳ規格不合格）のものが昭和48年度は22.2%であったが49年度は36.4%と増加しており，48年には含有量が15～30%のものが75.1%であったが，49年は63.6%と減少している．わずか一年間でこのように合成洗剤の活性成分配合量に変化が認められるのであるが，活性剤相当分だけでは，ＡＢＳ，ＬＡＳなどのアニオン系界面活性剤の配合量の推移を知ることができないので実験2を引き続き行ない，界面活性剤相当分中の各界面活性剤配合割合を調査することとした．

実験2 界面活性剤相当分中の活性成分分析

界面活性剤を分類すると表3のごとくであり，筆者らはＪＩＳ規格合成洗剤試験法を適用して表3にかかげた各活性成分の定量を行なった．

測定法

2-1 全アニオン界面活性剤中結合硫酸の定量法

ＪＩＳ K3362 5-3-3-（4）を準用した．

結合硫酸として約1.4ｇを含むよう試料を精密に秤取し，水を加えて100m*l*とし試験溶液とする．その10m*l*を滴定用シリンダーに正確に秤取し，メチレンブルー溶液25m*l*およびクロロホルム15m*l*を加え，N/250セチルピリジニウムブロマイド溶液（カチオン界面活性剤標準溶液）20m*l*を精密に秤取し，よく振りまぜて混和させたのち，N/250スルホコハク酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウム溶液（アニオン界面活性剤標準溶液）で滴定する．滴定方法は，はじめ2m*l*ずつ加え，そのつど栓をして激しく振りまぜたのち静置し，二層の分離が早くなれば逐次滴定m*l*数を減じ，終点近くでは，0.02～0.03m*l*刻みで滴定を行ない，白色板を背景として両層の青さが同一となった点を終点とする．同時に空試験を行ない，次式によって全アニオン界面活性剤中結合硫酸（ＴＡＳ）を算出する．

$$TAS=\frac{(B-A)\times\frac{1}{250}\times f\times 80}{S\times 100\times\frac{10}{100}}\times 100$$

ＴＡＳ…全アニオン界面活性剤中結合硫酸（%）
Ｂ……空試験に要した標準溶液の滴定数（m*l*）
Ａ……試料試験に要した標準溶液の滴定数（m*l*）
ｆ……N/250スルホコハク酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウム溶液のファクター

Table 3 Classification of Surface active agent

- Surface active agent
  - Anion
    - Alkylsulphate
      - Alcoholic alkyl sulphate
      - Alkylaryl sulphate
    - Soap — Salt of fatty acid
  - Cation
    - Aliphatic amine
    - Tetra ammonium salt
    - Alkylamine
  - Nonion
    - Polyoxyethylene fatty acid ester
    - Sorbitan fatty acid ester
    - Sugar fatty acid ester
    - Glycerin fatty acid ester

S……試料採取量（g）

2-2 せっけん相当分の定量法

ＪＩＳ K3362 5-3-4を準用した.

1-2の石油エーテル可溶分の定量時における石油エーテル抽出残液およびその洗液を集め，N/2硫酸を加えて酸性とし（指示薬メチルオレンジ），分液口斗中で石油エーテル50m*l* ずつを用いて3回繰り返し抽出を行ない，その抽出液を合わせ水100m*l* ずつで2回水洗し，無水硫酸ナトリウムを用いて脱水したのち乾燥ろ紙で内容300m*l* の三角フラスコ中にろ過し，水浴上で液が約30m*l* となるまで濃縮したのち，重量既知の蒸発皿に移し，少量の石油エーテルでフラスコ内を洗う．洗液は濃縮液に合わせ，再び水浴上で石油エーテルを蒸発乾固し，冷後送風して残留する石油エーテルを追い出したのち，デシケーター中に一夜放置し，ついで秤量し，つぎの式によってせっけん相当分（Sp）を算出する．

$$Sp=\frac{W}{S}\times 100$$

Sp……せっけん相当分（%）

W……石油エーテル抽出量（g）

S……試料採取量（g）

2-3 非イオン界面活性剤の定量法

Table 4 Content of each surface active agent in total surface active agent

1973

No	P	TAS	Sp	N	No	P	TAS	Sp	N
1	21.35	4.85	0.44	3.98	28	22.29	4.35	0	2.26
2	27.50	5.81	0.24	2.31	29	23.16	3.15	0.42	3.41
3	31.22	4.97	0.18	0	30	18.28	2.84	0.22	6.44
4	28.98	5.02	0	1.35	31	18.95	3.05	0.67	3.91
5	12.59	0	1.01	5.84	32	17.01	3.91	0.20	4.04
6	20.13	1.55	0.62	9.29	33	17.15	3.29	0.18	3.65
7	15.62	2.57	0	1.14	34	18.11	2.47	0.34	6.33
8	13.06	0	0.98	0	35	20.58	3.96	0.22	0
9	19.66	3.51	0	1.35	36	27.67	7.26	0.42	1.25
10	16.31	3.64	0.71	3.45					
11	12.35	2.11	0.38	4.31					
12	17.54	2.54	0.38	4.83					
13	20.19	3.37	0.51	11.66					
14	10.46	1.58	0.62	3.74					
15	15.30	2.15	0.27	2.77					
16	18.95	2.87	0.17	4.87					
17	15.83	1.22	0.39	9.00					
18	17.73	3.40	0.27	7.98					
19	14.00	2.23	0.12	1.83					
20	15.04	2.82	0	4.19					
21	13.84	3.10	0	1.10					
22	18.56	0	0.84	13.78					
23	20.51	4.39	0	3.60					
24	16.93	2.77	0.19	3.00					
25	14.00	4.84	0.28	3.67					
26	14.02	1.13	6.23	6.21					
27	17.24	2.27	0.36	6.86					

1974

No	P	TAS	Sp	N
1	23.78	3.89	0.71	0.71
2	25.31	4.84	0.55	0
3	22.55	3.37	0.85	1.58
4	9.56	0	0	0
5	12.96	0	0	1.15
6	23.42	0	1.57	21.84
7	12.07	0	1.35	6.77
8	20.92	1.06	0.92	1.73
9	19.18	0.63	0.53	9.03
10	20.19	1.28	0.44	9.60
11	11.70	0	1.25	0

P……Surface active agent (%)

TAS……Total Anion SO_3 (%)

Sp ……Soap (%)

N……Nonion (%)

Table 5 Ratio of the each surface active agent content

P	TAS				Soap				Nonion			
year	1973		1974		1973		1974		1973		1974	
%	36 (100%)		11 (100%)		36 (100%)		11 (100%)		36 (100%)		11 (100%)	
0	3	8.3	5	45.5	7	19.4	2	18.3	3	8.3	3	27.3
0—1	0	0	0	0	27	75.0	6	54.5	0	0	1	9.0
1—2	4	11.1	2	18.2	2	5.6	3	27.3	6	16.7	3	27.3
2—3	11	30.6	0	0					3	8.3	0	0
3—4	10	27.8	2	18.2					9	25.0	0	0
4—5	5	13.9	1	9.1					9	25.0	0	0
5	3	8.3	0	0					10	27.8	4	36.4

TAS……Total Anion SO_3　　P……Surface active agent

ＪＩＳ K3362　5-5-3を準用した.

1-3の尿素定量法の際カチオン交換樹脂カラムを通過したエタノール流出液およびエタノール洗液を試験溶液とする. 予め強塩基性アニオン交換樹脂（ＯＨ型）を高さ20cmに充めたガラスカラム（径1×高さ30cm）内にゆっくりと流し，溶出液を内容500mlのビーカーに集める. ついでエタノール250mlを用いてカラム内を洗い，洗液は同一ビーカー内に受け，この液を水浴上で約50mlまで濃縮したのち，重量既知の蒸発皿に移し，ビーカー内を少量のエタノールで洗い，洗液は濃縮液に合わせ，再び水浴上で蒸発乾固させ，105°で恒量になるまで乾燥し，デシケーター中に放冷したのち秤量しつぎの式によって非イオン界面活性剤の量（N）を算出する.

$$N=\left(\frac{W\times\frac{250}{100}}{S}\times 100\right)-B$$

N……非イオン界面活性剤の量（%）
W……溶出量（g）
S……試料採取量（g）
B……石油エーテル可溶分（%）

測定結果

以上の測定法によってアニオン，せっけん，非イオン活性剤を定量した結果は表4のごとくである.

考察および結論

表4の結果を各活性剤含量別に48年，49年製品を分類してみると表5のごとくになり，この表を棒グラフになおしてみると図1のごとくになる.

表5，図1より48年，49年度市販洗剤中の各活性剤配合割合の推移を考察すると，43年品はアニオン活性剤を含まない製品が8.3%しかなかったのに49年品はその割合が45.5%と増大し，しかも48年品のアニオン配合量は結合硫酸として1～5%のものが約80%であったが49年品では54.5%と減少している（結合硫酸塩1～5%はアニオン活性剤標準品として用いたスルホコハク酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウムに換算すると5.56～27.8%と

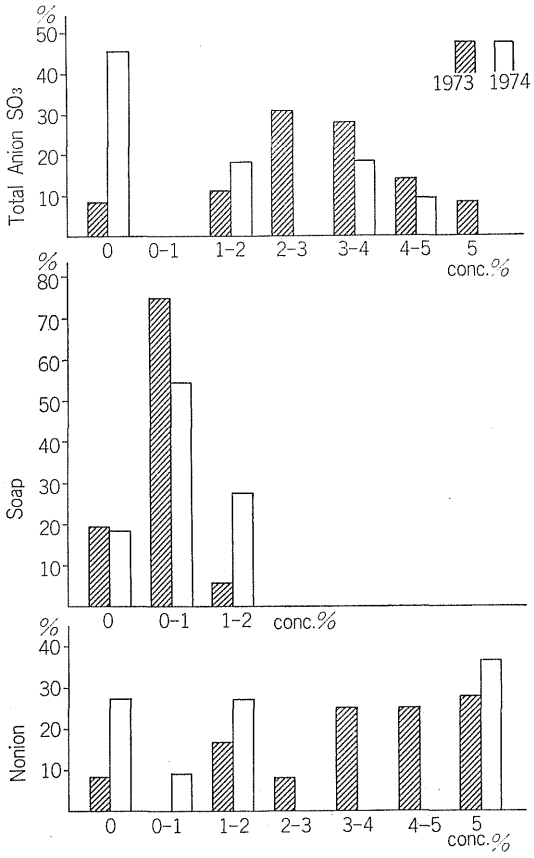


Fig. 1 Distribution of the surface active agent content from 1973 to 1974

なる).

一方せっけん相当分は有意な変動は認められなかった．この理由は，合成洗剤中のせっけん分は洗浄剤としての効果よりも洗濯時における泡の抑制剤として加えられるためであり，２％以上の配合は行なわれていないようである．

非イオンについては，使われていないものが48年品では8.3%であったが49年品では 27.3% と増加している．一方，泡の抑制剤として１～５％添加したものの推移をみると63.9%から27.3%へと著しく減少している．しかし，いわゆる食べられる洗剤として宣伝されている非イオンを主体とした洗剤が増加し，49 年度品では前年が27.8%であったのに対して36.4%と増加している．

総　括

合成洗剤に対する世論はいぜんとして厳しい情況であり，各メーカーにおいてもその配合については気をつかっているようである．以上の結果からも類推されるように，ＡＢＳ，ＬＡＳのようなアニオン活性剤の配合が減少し，非イオン活性剤，その他との併用または非イオン活性剤主体の配合に変わりつつあることがうかがわれる．

謝辞　本調査に当り，都食品衛生課および食品監視課の方々の御協力を戴いたことを感謝いたします．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「市販食品用洗浄剤の成分分析に関する研究」として実施したものである.）

文　献

1) 厚生省告示第98号（昭和48年４月28日）
2) ＪＩＳ規格K3370-1973台所用合成洗剤
3) ＪＩＳ規格K3362-1970合成洗剤試験法
4) 日本薬学会編　衛生試験法注解，549，1973
5) 高橋越民，難波義郎，小池基生，小林正雄：界面活性剤ハンドブック，1972，工学図書
6) 荻野圭三：合成洗剤の知識，1974，幸書房

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 214—219, 1975

D-ソルビットの液性について

遠藤英美* 広門雅子* 宇佐美博幸* 藤居 瑛*

Study on the pH Value of D-Sorbite

FUSAYOSHI ENDO*, MASAKO HIROKADO*, HIROYUKI USAMI* and TERU FUJII*

Four out of 20 D-sorbitol specimens tested in Tokyo in 1974 were found to be unsuitable for food additives because of their acidity. Thus, further investigations on pH value of the products were made on 20 powdered and 25 liquid ones, by the use of electric pH meter. Consequently, it was found that all of them were acidic, as they produced 2~3 organic acids mainly composed of gluconic acid by their air oxidation after the procession.

はしがき

昭和49年度食品添加物一斉取締検査の際，D-ソルビット収去検体20件中4件が，食品添加物公定書規格純度試験[1]（1）液性の項で，酸性を呈するという理由から不合格となった．

D-ソルビットの10～20%水溶液は，解離恒数 $Ka^{17.5}$ 2.5×10^{-14} pH 7とされており，中性のものである．規格試験において液性を調べるのは，精製のとき用いるイオン交換樹脂の性能の是非をチェックするためとされている．

著者らは，不合格品の液性について再検討を行った結果，ソルビットの液性は単にイオン交換樹脂精製能を検査しているだけではなく，製造後の本品の酸化の度合をも知りうる重要な試験項目であることが判明したので報告する．

実験の部

試料

都食品監視課より昭和49年以前に当所へ送付されたものおよび新たに日研化学，東和化成より試料として提供を受けたもの．ソルビット末20種，ソルビット液25種 計45種．

試薬および器具

溶解水：ヤマト科学器械製 Autostill W-5 型蒸留水製造装置を用いて得た精製蒸留水を新たに煮沸し冷却した水．

塩酸：和光純薬超特級 20%

0.5N塩酸：塩酸85.5m*l* を水を加えて全量を1000m*l* とする．

エタノール（無水）：試薬特級

ニッケル標準溶液：和光純薬原子吸光用ニッケル標準溶液1 mg/m*l* Ni を含む．

0.01N水酸化ナトリウム：水酸化ナトリウム（試薬特級）約0.4gを精密にはかり，溶解水を加えて全量を1000m*l* とし，0.01N 塩酸を用いて力価を標定する．

1N炭酸ナトリウム：無水炭酸ナトリウム（試薬特級）を300°で3時間乾燥し，冷後その6.25gを精密にはかり，水を加えて全量を 1000m*l* とする．

陰イオン交換樹脂カラム：Amberite IR-400（OH型）をガラスカラム（径2×高さ30cm）内に高さ20cm の樹脂柱となるよう1N水酸化ナトリウム100m*l* を用いて流し込み，洗液がフェノールフタレインによって微紅色を呈さなくなるまで精製水で水洗する．

陽イオン交換樹脂カラム：Amberite IR-120（H型）をガラスカラム（径2×高さ30cm）内に高さ20cm の樹脂柱となるよう1N塩酸100m*l* を用いて流し込み，洗液が塩化物の反応を呈さなくなるまで精製水で水洗する．

有機酸標準液：D-グルクロン酸（和光純薬），タルトロン酸（東京化成TCI-GR），グルコン酸（藤沢薬品食品添加物用），シュウ酸（和光純薬試薬特級），レブリン酸（和光純薬），グリオキシル酸（和光純薬試薬一級）各1gを水10m*l* に溶かし標準液とする．

展開溶媒：n-ヘキサン・氷酢酸・水（4：2：1）

* 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

発色液：0.1%ブロムクレゾールグリーン希アルコール溶液

ペーパークロマト用ろ紙：東洋ろ紙No.50　20×20cm

ガラス電極pH計：日立-堀場 pHメーターM-7 型

原子吸光装置：日本ジャレールアッシュ製AA-I-MK-Ⅱ型

ニッケル用ランプ：浜松テレビ製ホローカソードランプ　波長232.02nm

測定法

1　pH

試料10gを内容100mℓ共せん三角フラスコにはかりとり，溶解水50mℓを加えて溶かしたのち，この液20～30mℓをpH測定用ビーカーに移し，速かにガラス電極pH計でpHを測定する．

別に溶解水のpHを測定し，試料溶液のpHとの差δpHを求める．

2　塩化物および硫酸塩

試料1gをとり，食品添加物公定書中一般試験法塩化物および硝酸塩の試験を準用，ただし標準溶液は，0.01N塩酸，0.13mℓ，0.01N硫酸0.2mℓを用いた．

3　ニッケル[2)]

試料10gを精密にはかり，硫酸1mℓを滴加し，550°一夜強熱し，残留物に塩酸5mℓを加えて溶かし，水浴上で加温して蒸発乾固し，その残留物に0.5N塩酸3mℓを加えて溶かし，エタノール5mℓおよび0.5N塩酸を加えて全量を10mℓとし，原子吸光用試験溶液とする．

ニッケル標準溶液はニッケル標準液1mℓをはかり，0.5N塩酸を加えて100mℓとし，この液0，1.0，1.5，3.0，6.0，10.0mℓを精確にとり，それぞれエタノール50mℓおよび0.5N塩酸を加えて全量100mℓとし，標準溶液0，0.1，0.15，0.3，0.6，1.0μg/mℓ Niを作成し，この標準溶液および試験溶液を用いて，ニッケルホローカソードランプを光源として原子吸光を測定し，標準溶液の吸光度から検量線を作成し，試験溶液の吸光度から，次式によって試料中の含量を算出する．

$$A = b \times \frac{V}{S} \times d$$

A：試料中のニッケル含量（ppm）

b：試験溶液中のニッケル含量（ppm）

V：試験溶液の全量（mℓ）

S：試料採取量（g）

d：試料の希釈倍率

4　アルカリ消費量

試料約1gを精密にはかり，溶解水20mℓに溶かし，フェノールフタレインを指示薬とし，ミクロビュレットを用いて0.01N水酸化ナトリウムで滴定し，次式によってアルカリ消費量を求める．

$$A = \frac{a \times f}{S}$$

A：0.01N NaOH 消費量（mℓ）

a：試料溶液の0.01 NaOH 滴定数（mℓ）

f：0.01N NaOH の力価

S：試料採取量（g）

5　有機酸の定性

試料は最大のアルカリ消費量を示したソルビット末No.7を選び，ろ紙クロマトグラフィーにより定性を行った．

試料10gをはかり，水100mℓに溶かし，この液を陰イオン交換樹脂カラム内にゆっくりと流し，ついで水100mℓを用い樹脂を洗い，1N 炭酸ナトリウム30mℓをゆっくりと注ぎ，溶出液は陽イオン交換樹脂カラム内に注ぐ．この流出液を集め，水浴上で2mℓとなるまで濃縮し，試験溶液とする．この液10μℓおよび標準溶液10μℓずつをろ紙上にスポットし，風乾したのち，n-ヘキサン・氷酢酸・水（4：2：1）で展開し，溶媒が約10cm上昇したときろ紙をとり出し風乾後，発色液を噴霧し，認められるはん点のRf値を比較する．

結果および考察

1　pH

試料45種のpH実測値およびδpH値は表1のごとくである．この表1より δpH 値別に末および液を分類し考察してみると表2のごとくなり，末ではδpHが0.5以下のもの 4/20(20%)，0.5～1.0のもの2/20(10%)，1.0～2.0のもの10/20 (50%)，2.0以上のもの4/20(20%)で，δpH値の最大は3.3であった．一方，液ではδpH 0.5以下のもの21/25 (84%)，0.5～1.0のもの1/25 (4%)，1.0～2.0のもの3/25 (12%) であった．

食品添加物公定書通則15では，微酸性を pH 5～6.5，弱酸性を pH 3～5，強酸性を pH 3 以下と規定している．表2の結果を通則に当てはめると，末では微酸性が60%，弱酸性が20%，液では微酸性16%である．試験結果は末が液に較べて酸性のものが多いことを示している．

現在食品添加物公定書では，別段の規定のないものは，液性をリトマス試験紙で測定してよいことになっているが，リトマス試験紙では微酸性程度では変色せず，微妙な液性の判定は困難である．したがって最近では規格試験の液性は，ガラス電極法が用いられるように改訂されるものが多く，本品についても液性の測定にはガラス電極法を用いたほうがより精密であるということがい

Table 1 Measured pH value and δpH of Sorbite

No.	Blank	Sample	δpH
Sorbite Powder			
1	6.00	3.65	+2.35
2	6.23	6.55	−0.32
3	6.50	6.55	−0.05
4	6.60	5.20	+1.40
	6.25	4.30	+1.95
	6.05	2.80	+3.25
7	5.95	2.65	+3.30
8	5.90	4.85	−1.05
9	6.15	5.00	+1.15
10	6.45	5.82	+0.63
11	6.05	5.25	+0.80
12	6.30	6.10	+0.20
13	5.85	4.80	+1.05
14	5.85	4.15	+1.70
15	5.85	4.15	+1.45
16	5.95	3.85	+2.10
17	6.40	5.25	+1.15
18	6.40	6.10	+0.30
19	6.50	4.65	+1.85
20	6.70	5.20	+1.50
Sorbite Solution			
1	6.25	6.52	−0.30
2	6.40	6.70	−0.30
3	6.50	6.65	−0.15
4	5.95	6.10	−0.15
5	6.15	6.05	+0.10
6	6.00	6.15	−0.15
7	6.50	5.95	+0.55
8	6.30	5.90	+0.40
9	6.42	5.10	+1.32
10	6.30	6.80	−0.50
11	5.90	4.30	+1.60
12	6.31	6.40	−0.06
13	6.15	4.55	+1.60
14	5.95	5.95	0
15	6.20	6.65	−0.45
16	5.95	5.80	+0.15
17	6.00	5.90	+0.10
18	6.38	6.30	+0.08
19	6.40	6.40	0
20	5.62	5.55	+0.07
21	5.75	5.35	+0.40
22	6.25	6.50	−0.25
23	5.60	5.95	−0.35
24	6.50	6.50	0
25	6.40	6.50	−0.10

δpH=A−B

A : Value of Blank pH

B : Value of Sample pH

Table 2 Distribution with δpH value

Sample / δpH	Powder		Solution	
	20	(100%)	25	(100%)
0.5>	4	(20.0)	21	(84.0)
0.5—1.0	2	(10.0)	1	(4.0)
1.0—2.0	10	(50.0)	3	(12.0)
2.0<	4	(20.0)		

えるのであるが，本品は非電解質であるため溶解水のpHに左右され易くなるので，δpHとして測定する必要がある．

しかし，たとえδpH値が大であっても必ずしもソルビット中の酸の量を示すことにならないので，本品の液性の項はむしろ0.01N水酸化ナトリウム消費量として規定するのが適切であると考えられる．

2 塩化物，硫酸塩およびニッケル

塩化物，硫酸塩およびニッケルについての試料中の測定結果は表3のごとくであり，塩化物は全て 50ppm 以下，硫酸塩は全て100ppm 以下，ニッケルは1 ppm 以下であった．

これら試験項目はいずれもイオン交換樹脂の性能をみるためのものであり，米国食品添加物公定書，[3] 日本薬局方[4] および米国薬局方[5] などでは，塩化物 50ppm 以下，硫酸塩100ppm 以下と規定し，日本食品添加物公定書，日本薬局方，ＪＩＳ規格[6] および化粧品原料規格[7] ではニッケルを3 ppm以下と規定している．

これらの規定を参考にすると試料はいずれもこれら規格に適合することになり，イオン交換樹脂の性能は充分であったと考えられる．

したがって試料中酸性を呈するものは，製造時には，中性または微酸性程度であったものが，酸性化したものと考えられる．

3 アルカリ消費量

0.01N 水酸化ナトリウム消費量と δpH 値を表4に，δpH値と0.01N水酸化ナトリウム消費量との関係を表5に示す．

表4より結果を考察すると末No. 6は，δpH 3.25に対し，アルカリ消費量5.45m*l*，末 No. 7は δpH 3.30 に対しアルカリ消費量10.83m*l*で，δpH が大きいと同時にアルカリ消費量もふえている．その反面末No.16 のごとくδpH 2.10に対しアルカリ消費量 0.08m*l* と少ないものもある．

この理由は生成する酸の種類および生成量に起因するものと考えられ，今後さらに検討する予定である．

Table 3 Relation of δpH and other contaminates in sorbite

No.	δpH	Ni ppm	Cl	SO_4
Sorbite Powder				
1	+2.35	0.13	—	—
2	−0.32	0.10	—	—
3	−0.05	0.10	—	—
4	+1.40	0.10	—	—
5	+1.95	0.40	—	—
6	+3.25	0.11	—	—
7	+3.30	0.10	—	—
8	+1.05	0.13	—	—
9	+1.15	0.10	—	—
10	+0.63	0.10	—	—
11	+0.80	0.10	—	—
12	+0.20	0.10	—	—
13	+1.05	0.10	—	—
14	+1.70	0.10	—	—
15	+1.45	0.10	—	—
16	+2.10	0.10	—	—
17	+1.15	0.10	—	—
18	+0.30	0.10	—	—
19	+1.85	0.10	—	—
20	+1.50	0.10	—	—
Sorbite Solution				
1	−0.27	0.10	—	—
2	−0.30	0.10	—	—
3	−0.15	0.33	—	—
4	−0.15	0.35	—	—
5	+0.10	0.10	—	—
6	−0.15	0.10	—	—
7	+0.55	0.20	—	—
8	+0.40	0.10	—	—
9	+1.32	0.10	—	—
10	−0.50	0.10	—	—
11	+1.60	0.10	—	—
12	−0.09	0.10	—	—
13	+1.60	0.10	—	—
14	0	0.10	—	—
15	−0.45	0.70	—	—
16	+0.15	0.10	—	—
17	+0.10	0.10	—	—
18	+0.08	0.15	—	—
19	0	0.10	—	—
20	+0.07	0.10	—	—
21	+0.40	0.10	—	—
22	−0.25	0.41	—	—
23	−0.35	0.10	—	—
24	0	0.10	—	—
25	−0.10	0.10	—	—

Table 4 Relation of δpH and alkali demand

No.	δpH	0.01N NaOH m*l*
Sorbite Powder		
1	+2.35	0.12
2	+0.32	0.07
3	−0.05	0.09
4	+1.40	0.54
5	+1.95	0.54
6	+3.25	5.45
7	+3.30	10.83
8	+1.05	0.06
9	+1.15	0.06
10	+0.63	0.08
11	+0.80	0.09
12	+0.20	0.11
13	+1.05	0.10
14	+1.70	0.07
15	+1.45	0.08
16	+2.10	0.08
17	+1.15	0.08
18	+0.30	0.08
19	+1.85	0.08
20	+1.50	0.07
Sorbite Solution		
1	−0.27	0.06
2	−0.30	0.06
3	−0.15	0.06
4	−0.15	0.06
5	+0.10	0.07
6	−0.15	0.04
7	+0.55	0.06
8	+0.40	0.08
9	+1.32	0.08
10	−0.51	0.06
11	+1.60	0.53
12	−0.09	0.06
13	+1.60	0.14
14	0	0.04
15	−0.45	0.06
16	+0.15	0.06
17	+0.10	0.07
18	+0.08	0.08
19	0	0.07
20	+0.07	0.07
21	+0.40	0.08
22	−0.25	0.08
23	−0.35	0.08
24	0	0.06
25	−0.10	0.08

Table 5 Distribution on the relation of δpH and alkali demand

0.01N NaOH(ml) / Sample / δpH	0.1>		0.1 — 1.0		1.0<	
	P 20 (100%)	S 25 (100%)	P 20 (100%)	S 25 (100%)	P 20 (100%)	S 25 (100%)
0.5>	3 (15)	25 (80)	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)
0.5 — 1.0	2 (10)	2 (8)	1 (5)	— (—)	— (—)	— (—)
1.0 — 1.5	4 (20)	— (—)	2 (10)	3 (12)	— (—)	— (—)
1.5— 2.0	3 (15)	— (—)	1 (5)	— (—)	— (—)	— (—)
2.0<	— (—)	— (—)	— (—)	— (—)	2 (10)	— (—)

P : Sorbite powder S : Sorbite solution

表5より結果を考察すると，末は δpH が0.5～1.0のものから，アルカリ消費量が 0.1ml を超え，漸次 δpH が大きくなるにつれてアルカリ消費量が増す傾向がみられる．一方，液では δpH が1.0～1.5のもの3件が，アルカリ消費量 0.1ml を超す結果となっている．

このように δpH とアルカリ消費量の関係は末において明瞭である．英国薬局方[8]では，末と液の規格が作られているが，アルカリ消費量の規定が末だけに定められており，その限度は，5％水溶液 10ml はフェノールフタレインを指示薬として水酸化ナトリウムを加えたとき，液の色は紅色を呈さなければいけない，としている．この限度を本実験結果に当てはめると，末ではNo.4, 5, 6, 7, が，液ではNo.11 が限度を超えることになる．

この方法は，液性を検査するよりも合理的であると考えられる．

4 有機酸の定性

有機酸標準溶液およびソルビット試料末 No. 7 のろ紙クロマトグラムを図1に示す．

この結果，試料から3個のはん点が認められ，Rf 0.3 付近の黄色はん点がグルコン酸の標準溶液に近似している．青色はん点および原点近くの黄色はん点は，今回予想して調整したいずれの標準物質とも一致せず，これらの確認は今後検討する予定である．

結　論

D-ソルビットの液性は，ガラス電極法で測定するとき，末では中性～弱酸性，液では中性～微酸性であり，液状のものに較べて粉末状のもののほうが酸性が高い傾向が認められた．

これら試料のうち，いちじるしく酸性を呈するものについて検討したところ，その酸性物質はグルコン酸に近似する有機酸であった．

ソルビット中に有機酸が混入する経過は，1) 原料ブ

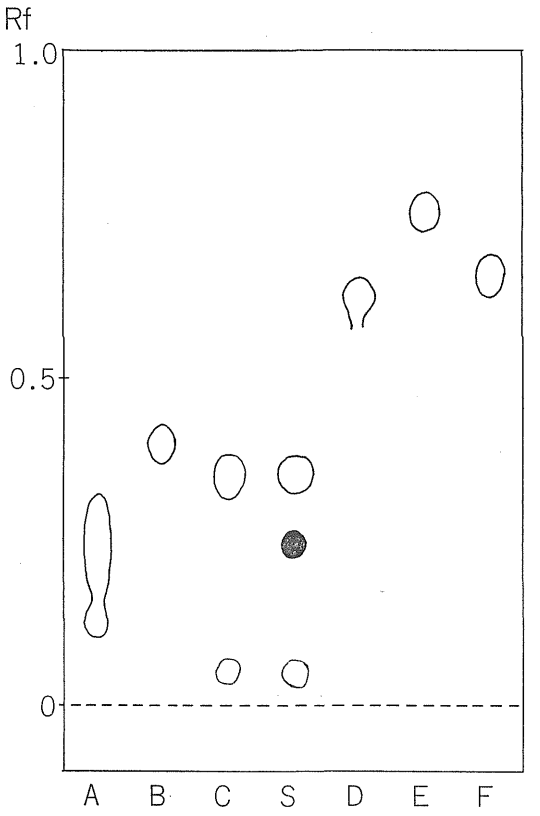


Fig. 1 Paperchromatogram of organic acid
Solvent : n-hexane-Ac OH-H_2O(4 : 2 : 1)
Detection : bromcresolgreen
A : D-glucuronic acid B : tartoronic acid
C : gulconic acid D : oxalic acid
E : levulinic acid F : glyoxylic acid
S : contaminates in sorbite powder
○ : yellow spot ● : blue spot

ドー糖の純度，2） 水素添加の不充分，3） イオン交換樹脂による精製不充分，4） ソルビット末製造の際結晶方法，5） 製造後保存法（場所，包装型態，経時日数）などが考えられるが，今回の調査結果では，3)の理由によるものでないことが判明したが，他の要因についての検討は今後調査する予定である．

食品添加物公定書中D-ソルビットの液性は，イオン交換樹脂精製能の適否を判定するだけでなく，本品の酸化度をも検査しうることが今回判明したが，今回の調査結果よりみて液性よりも酸度として規定するのが妥当といえる．

謝辞 試料の収集および資料の提供を載いた都食品監視課機動班各位並びに日研化学，東和化成の方々の御協力に深謝致します．

文 献

1) 食品添加物公定書注解，第Ⅲ版，538，1974，金原出版
2) *Analytical Methods for Flame Spectroscopy*, 1972, Varian Techtron, Australia
3) *Food Chemicals Codex*, Ⅱ, 658, 1972, NAX—NRC
4) 第八改正日本薬局方第二部解説書，416，1972，広川書店
5) *USP*, XXI, 573
6) JIS規格K-1509, 1956
7) 化粧品用原料標準規格，59，1971，日本化粧品工業連合会
8) *BP*, 441, 1973, HMSO, England

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 220—224, 1975

食品添加物中の多核芳香族炭化水素（ベンズ（a）ピレン）について

(2) 流動パラフィンおよびクン液

広門雅子* 遠藤英美* 宇佐美博幸* 藤居 瑛*

Survey for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (Benzo(*a*)pyrene) in Food Additives

(2) Liquid Paraffin and Liquid Smoke Flavor

MASAKO HIROKADO*, FUSAYOSHI ENDO*, HIROYUKI USAMI* and TERU FUJII*

For the quantitative determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in liquid paraffin and liquid smoke flavor, a modified clean-up method of Shiraisi was developed and adopted a liquid-liquid partition and an alumina column chromatography. Determination of the amount of benzo(*a*)pyrene(B*a*P) in the specimens was made spectrophotofluorometrically. Recovery of 50ng of B*a*P added experimentally in 100m*l* of liquid paraffin and of liquid smoke flavor was 76.8～82.8% and 47.0～55.2% respectively. It was also found that the contents of B*a*P in 4 commercial liquid paraffins were ranged from 0.1 to 0.18ppb, while none of the 11 liquid smoke flavors had contained greater than 0.1ppb (minimum detection level) of B*a*P.

緒　言

前報ではクエン酸中の 3,4-ベンズピレン（B*a*P）について報告したが，今回はひき続き流動パラフィンおよびクン液中の B*a*P について検討した．食品の加工技術の進歩にともなって，クン液がクン製食品のクン煙法に代るものとして，魚介類の氷蔵貯蔵の鮮度保持のために，また魚肉，食肉の脱臭の目的などに使用されるようになってきた．しかしクン液は木材を乾留し発生する煙を冷却してつくられるので，その際，衛生上問題となる物質（多核芳香族炭化水素など）の混入する可能性があるため，その規格を定める必要性が生じ，現在その準備が進められつつある．流動パラフィンについては，石油の一成分でもあり，調味料や単細胞蛋白（ＳＣＰ）などの原料として，また製パンの際の離型剤など多方面に使用されており，食品添加物規格では B*a*P として 0.14ppm 以下と規定されている．そこで筆者らは市販品クン液11種，および流動パラフィン４種中の B*a*P の分析を行なった．なおクン液中からの B*a*P の分析法として，1966年に白石[1] および1970年に城代[2] らが行なった方法をさらに改良のうえ採用した．流動パラフィンの分析では固型パラフィン中の B*a*P の分析法[3] および食品添加物公定書中の「流動パラフィン」の純度試験[4] を適用した．

実験の部

試薬

1）n-ヘキサン，エーテル：特級品，再蒸留．2）リン酸：85%以上．3）20%水酸化ナトリウム溶液．4）硫酸ナトリウム（無水）：特級品．105°，１時間乾燥．5）B*a*P 標準液：ベンズ(*a*)ピレン0.010gを正確に秤りn-ヘキサンに溶解，1000m*l* とした．標準液１m*l* は10μg の B*a*P を含む．6）カラムクロマト用アルミナ：Aluminiumoxide standardisiert（メルク社製）を約５倍量の１N塩酸で洗浄後，蒸留水で洗液の液性が pH 4.5～５になるまで洗浄し，105°で２時間乾燥，さらに電気炉中で約500°，２～３時間加熱したのちデシケーター中で放冷．この乾燥アルミナに１%v/w の水を加え，共センびんに入れ，よくふりまぜ２～３時間放置．7）薄層用展開溶媒：n-ヘキサン，o-ジクロロベンゼンおよびピリジンを10：１：0.5の割合に混合．なお特にこ

* 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

とわりのない限り，ＪＩＳ規格の特級試薬を用いた．

装置，器具

1) 日立ＭＰＦ—４型けい光分光光度計　2) 紫外線灯（マナスル工業製）：365nm　3) クロマト用カラム管：内径１cm，長さ30cm．4) ロータリーエバポレーター

分析試料

1) 流動パラフィン（ＪＩＳ試薬特級）１種　食品添加物用流動パラフィン市販品４種　2) クン液市販品11種，いずれも淡黄色～褐色の液状のもの．

実験操作

1)　カラムの調整

カラムＡ：１％含水アルミナをイソオクタンを用いてカラムに流し込んで充てんし，20cmの高さにする．

カラムＢ：１％含水アルミナをn-ヘキサン—エーテル（１：１）の溶媒でカラムに流し込んで充てんし，15cmの高さにする．

2)　試験液の調製

Ａ）流動パラフィン100m*l* をとり，n-ヘキサン100m*l* を加え，かき混ぜて溶かし，ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）50m*l* を加え，30分間ふりまぜた後静置し，そのＤＭＳＯ層をとった．同様の操作を３回行ない，合わせたＤＭＳＯ抽出液に水180m*l* および塩化ナトリウム10ｇを加え，室温まで放冷した後，n-ヘキサン50m*l* を加え10分間ふりまぜた．n-ヘキサン抽出操作を３回行ない，n-ヘキサン抽出液は水50m*l* で３回洗浄しＤＭＳＯを完全に除去した後，無水硫酸ナトリウム10ｇを入れて30分間放置した．あらかじめn-ヘキサンでよく洗ったろ紙を用いてろ過し，そのろ液をエバポレーターで１～２m*l* まで濃縮した．この濃縮液をカラムＡ内に注ぎ，ついでイソオクタン 50m*l* を用いてカラム内を洗い，流動パラフィンを除去したのち，ベンゼン 50m*l* を流しこみ溶出するベンゼン 50m*l* を分取した．この液を再びエバポレーターで濃縮し，この濃縮液にn-ヘキサン５m*l* を加えてよく混和させたのち，再び １～２m*l* まで濃縮して徐々にベンゼンを留去する操作を３回繰りかえした．完全にベンゼンを除去した濃縮液をカラムＢ内に注ぎ，n-ヘキサン—エーテル（１：１）液でＢ*a*Ｐを溶出し，15～75m*l* 範囲の溶出液を分取してエバポレーターで濃縮し，２～３m*l* としたのち，n-ヘキサンを加えて ５m*l* とし，これを試験液とした．対照液は水100m*l* を用いて試料の場合と同様に操作した．この試験液および対照液をそれぞれ2.5m*l* ずつとり，Ｂ*a*Ｐ標準液５μl を添加しn-ヘキサンで全量５m*l* とし，これを定量用とした．残りの2.5m*l* は定性用とした．

Ｂ）クン液100m*l* を分液ロートにとり，n-ヘキサン20m*l* を用いて３回抽出し，この抽出したn-ヘキサン層をあわせ，20％水酸化ナトリウム液50m*l* を用いてアルカリ層がいちじるしく混濁および黄色を呈さなくなるまで抽出をくりかえした（約５回）．つぎにリン酸20m*l* を加えて振り混ぜ，リン酸層が紫外線（365nm）によって強いけい光をみとめなくなるまでリン酸抽出をくりかえした（約５回）．n-ヘキサン層に50m*l* の水を加えて３回洗ったのち，無水硫酸ナトリウムを少量加えて脱水したのちろ過し，n-ヘキサン抽出液はエバポレーターを用いて濃縮し，１～２m*l* とした．この濃縮液をカラムＢ内に注ぎ，n-ヘキサン—エーテル（１：１）液でＢ*a*Ｐを溶出し，15～60m*l* 範囲の溶出液を分取し，これをエバポレーターで濃縮した．溶出液が着色していた場合はもう一度このカラムを通し，同様の操作を行なった．濃縮液にn-ヘキサンを加えて全量５m*l* とし，以後は流動パラフィンの場合と同様に行なった．

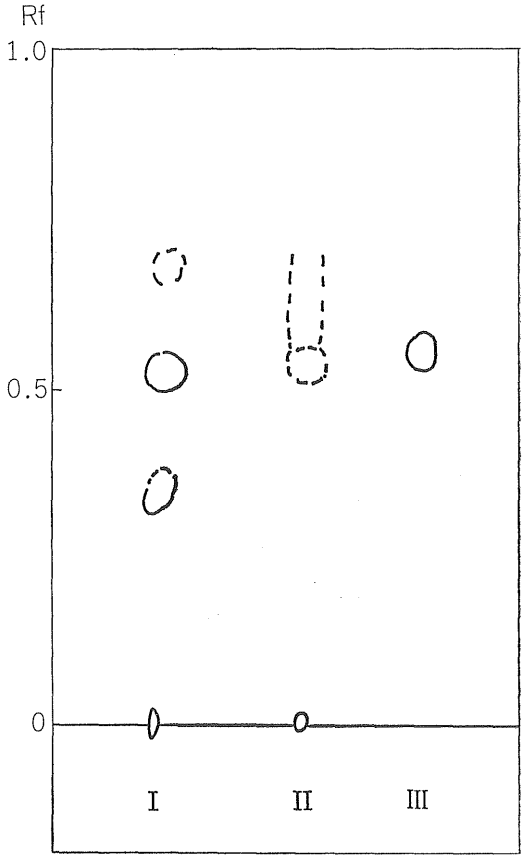


Fig. 1　TLC of n-hexane extract from liquid paraffin, (Ⅰ), n-hexane extract from liquid smoke flavor, (Ⅱ), and benzo-(*a*)pyrene, (Ⅲ)

3) 薄層クロマトグラフィおよびけい光スペクトルによる定性

前報[5]に準じて行なった.

4) けい光測定による定量

けい光光度計を用い励起波長383nmにおいて，400，403，410nmの3点のけい光強度を測定し，以後は前報のクエン酸の方法に準じて定量した.

実験結果および考察

薄層およびけい光スペクトルによる定性

流動パラフィンおよびクン液の薄層クロマトグラフはFig. 1のごとくであった．クン液の場合は黄色のスポットが，流動パラフィンの場合は青紫色のけい光のスポットがBaPと同位置に検出された．またおのおののけい光スペクトルを測定した結果，流動パラフィン5種のうち2種はFig. 2およびFig. 3に示したとおりBaPと同じ特異的けい光（366nmで励起したとき428nmに，383nmで励起したとき403mmに）を示した．クン液の場合は11種ともBaPとは異なるけい光，つまり366nmで励起すると415nmに，383nmで励起すると430nmにピークがあった．したがって，この物質が最終のけい光測定用溶液に存在したとしても，ベースライン法で定量するかぎりBaPのけい光測定は妨害されない事実を認めた.

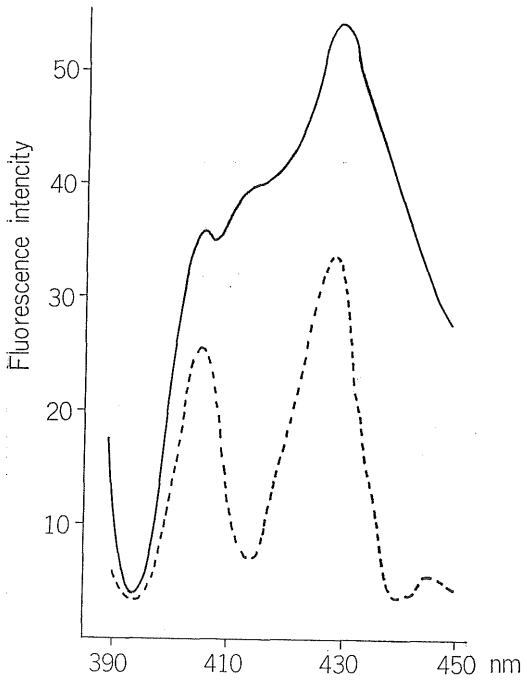


Fig. 2 Fluorecence spectra of benzo(a)pyrene isolated from liquid paraffin at excitation 383 nm
—— n-hexane extract from liquid paraffin
····· benzo(a)pyrene

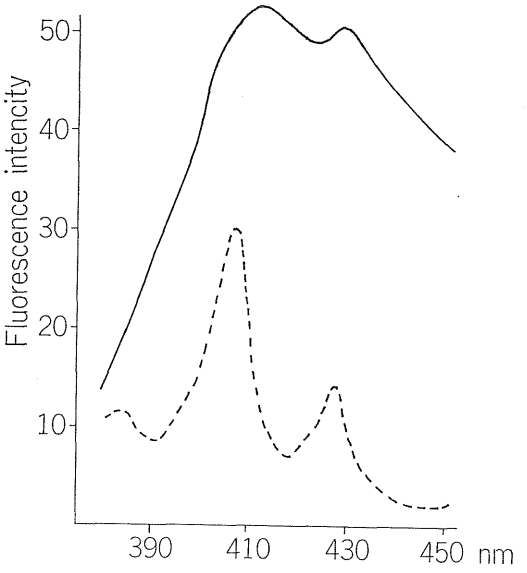


Fig. 3 Fluorecence spectra of benzo(a)pyrene isolated from liquid paraffin at excitation 366 nm
—— n-hexane extract from liquid paraffin
····· benzo(a)pyrene

市販流動パラフィンおよびクン液中のBaPの分析結果

市販流動パラフィン4種を分析した結果，Table 1に示したごとく，0.1～0.18ppbのBaPが検出された．なおクン液11種からはすべて検出されなかった．なお回収実験の結果はTable 2およびTable 3に示した．流動パラフィンの平均回収率は78.3%で変動係数5.1%，クン液の平均回収率は51.9%で変動係数7.7%であり，特にクン液からの回収率が低かった．そこで，つぎにクン液のBaPの分析に際し，白石法の改良および黄色物質とBaPのカラムによる分離法について検討した.

Table 1 Concentration of benzo(*a*) pyrene in liquid paraffin

Samples		Benzo(*a*)pyrene(ppb)		
Food additive	1	0.10	<0.10	<0.10
	2	0.10	0.10	<0.10
	3	0.12	0.14	0.18
	4	0.10	0.10	0.10
JIS guaranteed Reagent	1	0.10	<0.10	<0.10

Table 2 Recovery of benzo(*a*)pyrene added to liquid paraffin

Added (ng)	Recovered(ng)	Recovery(%)
50	38.4	76.8
〃	37.4	75.2
〃	41.4	82.8
Av.	39.1	78.3
S.D.	2.0	
C.V.	5.1(%)	

Table 3 Recovery of benzo(*a*)pyrene added to liquid smoke flavor

Added (ng)	Recovered(ng)	Recovery(%)
50	27.6	55.2
〃	23.5	47.0
〃	27.6	55.2
〃	25.0	50.0
Av.	25.9	51.9
S.D.	2.0	
C.V.	7.7(%)	

液-液分配抽出の際の酸アルカリ洗いの検討

白石法[1]では，酸アルカリ洗いの際，5％水酸化ナトリウム溶液および10％塩酸を用いているが，それぞれ10～20回もの洗浄操作をくりかえさなければ，妨害物質を除去できなかった．しかし，5％水酸化ナトリウム溶液を20％水酸化ナトリウム溶液に，また10％塩酸をリン酸にかえることで洗浄回数がおのおの4～5回と少なくなった．しかし原法でも改良法でも黄色物質は除去できなかった．

カラムクロマトグラフィーによるクン液中の妨害性物質の分離の検討

クン液中の黄色物質は，酸アルカリ洗いにより大部分除かれるが，除去されない中性区分には強い緑黄色の

Table 4 Chromatographic behavior of benzo(*a*)pyrene's R* and yellow substance's

Adsorbent	Developing solvent	R*	
		Benzo(*a*)pyrene	yellow substance
Al_2O_3 contained 1%H_2O	n-Hexane-Ether (1 : 1)	0.90	0.50
Al_2O_3 contained 2%H_2O	〃	1.18	1.17
Al_2O_3 contained 5%H_2O	〃	1.60	1.50
〃	n-Hexane-Acetone (1 : 1)	1.20	1.40
〃	n-Hexane-Acetone (2 : 1)	1.30	1.06
〃	Acetone	1.53	1.44
〃	Ethanol	1.47	1.09
〃	Methanol	1.26	1.50
〃	Chloroform-Ethanol (50 : 1)	1.70	1.70
〃	Chloroform-Ethanol (1 : 1)	1.43	1.60
Mg O	n-Hexane	0.98	0.98
〃	n-Hexane-Ether (1 : 1)	0.60	1.02
〃	Acetone	0.62	1.18
〃	Acetone-Ether (1 : 1)	0.44	1.16
〃	Ether	0.10	1.10

R* : Mobilities of the adsorbed compounds relative to that of the developing solvent

けい光をもつ黄色物質が存在する．この妨害性の黄色物質を除くため，カラムクロマトグラフィーによる分離を検討した．白石の用いた1％含水アルミナ1.0×15cmのカラムを使用し，n-ヘキサン—エーテル（1：1）液で展開したところ，1回の操作で大部分の黄色物質およびけい光物質を除くことができたが，移動度の早い黄色物質は除去できなかったので，再度このカラムを通し同様の操作を行なったが，やはり11種中，6種が着色していた．しかし定性結果で記述したようにこの物質はけい光測定を妨害しないので，回収率を低下する原因は，おそらくBaPが黄色物質の影響をうけアルミナに吸着されたためと思われる．

上記のカラム法の他に種々のカラム分離法について検討した結果をTable 4に示した．Table 4中の黄色物質とBaPのおのおのの移動度から考えると，酸化マグネシウムを吸着剤に用い，最初エーテルで展開すれば，BaPが吸着され黄色物質が移動するのでこれを流去し，つづいてn-ヘキサンかアセトンでBaPを溶出すれば，両者を分離できるものと考えたが，BaP単独の場合と異なり黄色物質が共存する場合は，回収率が著るしく低下する．このことはおそらくBaPがエーテル溶出の際，吸着されずに黄色物質にともなって移動したものと思われる．この点については今後さらに検討したいと考える．

まとめ

市販流動パラフィン4種について分析した結果，公定法に定める限度試験では検出されない量であるが，著者らの方法では0.1～0.18ppbのBaPが検出された．市販クン液11種について分析した結果は，すべて検出限界の0.1ppb以下であった．前報のクエン酸，流動パラフィンおよびクン液中のBaPがすべて0.18ppb以下であった事実を考慮すると，公定法の純度試験として採用されている低感度の吸収スペクトル法をけい光法にあらためることにより精度を高め，BaPの許容限度を低く設定すべきであると考える．

流動パラフィン中からのBaPの分析は，けい光妨害物質が存在しないために，DMSOからn-ヘキサンに転溶した後，ヘキサン層をよく水洗してDMSOを完全に除去すれば容易である．なお流動パラフィン100mlに50ngのBaPを添加し，3回の回収実験を行なったときの平均回収率は78.3％，変動係数5.1％と，バラツキも少く信頼度の高い結果が得られた．

クン液中からのBaPの分析では，酸アルカリ洗いで除去できない黄色物質とBaPを分離するために，1％含水アルミナカラムを使用して，n-ヘキサン—エーテル（1：1）で展開する白石の操作を2度くりかえし行なったところ回収率が51.9％ときわめて低い結果を得た．これはカラムに問題があると考えられたので，他の方法を種々検討してみたが適当な方法が見あたらなかった．なおクン液には液状のものの他に粉末状のものおよびペースト状のものがあるが，これらについては目下検討中である．

謝辞 本調査研究にあたり，ご指導をいただいた国立公衆衛生院の白石慶子先生に深謝するとともに，試料の提供に御協力いただいた各社に謝意を表します．

文献

1) 白石慶子：衛生化学，12，183，1966
2) 城代　進：工業化学，73，2718，1970
3) 白石慶子，高島英伍：日本食品衛生学会講演要旨，26，33，1972
4) 食品添加物公定書注解，Ⅲ，950，1974
5) 遠藤英美，広門雅子：東京衛研年報，25，271，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 225—229, 1975

ケイソウ土の成分規格について

遠藤英美* 小野綾子* 安野哲子*
荻野周三* 大畠敏子* 藤居瑛*

Studies on the Japanese Standard of Diatomaceous Earth

FUSAYOSHI ENDO*, AYAKO ONO*, TETSUKO YASUNO*,
SHUZO OGINO*, TOSHIKO OHATA* and TERU FUJII*

緒　言

昭和49年度食品添加物一斉取締検査において，収去したケイソウ土19検体中14検体（73.7%）が食品添加物公定書成分規格[1]に不合格であったので，市販ケイソウ土の現状につき研究を行った結果現行規格試験法に改正すべき点が見出されたので報告する．

調　査

1. 市販品の品種　市販品について日本ろ過助剤協会および輸入業者に問い合せたところ，現在市販されているケイソウ土の品種[2]はつぎの3種類であることがわかった．

a）半焼成品（Natural，以下*N*と略す）天然ケイソウ土を800°以下で処理し乾燥および有機物その他を焼成したもので，外観は白～類白色の粉末である．

b）焼成品（Calcined，以下*C*と略す）天然ケイソウ土を約1000～1300°で焼成したもので外観は淡赤かっ色の粉末である．

c）融剤焼成品（Flux-Calcined，以下*F.C*と略す）天然ケイソウ土に融剤として食塩，炭酸ナトリウムなどを約5%添加し，1000～1300°で焼成したもので，外観は殆ど白色（融剤の添加量の少ないものは淡赤かっ色）の粉末である．

2. 現行成分規格制定のいきさつ　ケイソウ土は，昭和41年2月に天然の不溶性鉱物質として，食品添加物公定書に成分規格が収載されたものであるが，その規格内容は当時最も多く市販されていた*C*を対象としたものであった．その後，輸入品の *N* もろ過助剤として使用されるようになったところから，昭和43年3月成分規格の一部改訂が行われ現在に至っている．しかし現行規格では *F.C* についての成分規格は考慮されていない．

3. 市販ケイソウ土の品種別現行成分規格適合状態

ケイソウ土には品種表示の義務づけがないため，一斉検査に際して品種の区別なく収去および試験が行われ，収去試験の結果から品種別に考察することが困難であったので，業界より品種の判明している *N*, *C*, *F.C* 3種の試料提供を受けて現行成分規格の品種別適合状態を検討したところ表1のごとき結果であった．

この結果から現行成分規格について *N* では強熱減量の項に，*F.C* については水可溶物および液性，フッ化水素酸残留物の項に適合しないものが集中していることがわかり，*F.C* は現行成分規格に殆ど適合しないこと，*N* は強熱減量の限度に問題があることが考えられる．

これらの調査結果をもとにして著者らは現行成分規格試験法中，水可溶物および液性，塩酸可溶物，フッ化水素酸残留物，強熱減量の4項目について検討を行うこととした．

実験の部

装置　ガラス電極 pH メーター：日立一堀場製 M-5型

吸引ろ過器：桐山ロート，バリテール吸引鐘

発光分光分析装置：島津製ＱＦ-60型

原子吸光分析装置：日本ジャーレル・アッシュ製ＡＡ-1 MARKⅡ型，ＤＬ-1付

試薬　希塩酸（23.6v/v%）：塩酸 23.6m*l* に水を加えて100m*l* とする．

塩化ランタン溶液（5%La^{3+}）：酸化ランタン（純度99.99%以上，三津和化学製）58.6gを塩酸（20v/v%）に加温して溶かし全量を1,000m*l* とする．

* 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

表1 市販ケイソウ土の品種別現行成分規格適合状態

品種	No.	液性(pH)	水可溶物 (mg)	塩酸可溶物 (mg)	フッ化水素酸残留物 (mg)	強熱減量(%)
	1	7.45	6.7	×11.7	27.6	×6.97
	2	6.60	9.9	9.5	37.3	×8.66
N	3	× 9.95	×44.3	×11.8	30.7	1.55
	4	7.10	10.0	9.0	31.4	×8.28
	5	6.85	9.6	7.9	26.9	×8.14
	6	5.30	×36.2	×11.0	42.9	×5.15
	7	7.40	1.7	4.4	40.0	0.13
	8	×10.70	×47.1	5.5	37.2	0.71
	9	×10.70	×45.3	5.8	34.3	0.77
	10	×10.50	×49.9	6.0	23.0	0.78
	11	7.00	5.7	4.5	30.0	1.09
	12	7.80	5.7	×21.9	43.7	0.33
	13	6.88	4.7	2.9	50.0	0.41
C	14	6.80	7.0	2.0	38.5	0.43
	15	6.80	7.5	1.9	45.1	0.31
	16	7.50	4.7	1.1	40.3	0.42
	17	7.50	4.5	1.6	×59.1	0.41
	18	7.50	2.0	1.3	49.1	0.19
	19	7.40	3.2	3.0	48.4	0.52
	20	6.70	4.6	3.1	33.5	0.71
	21	7.10	4.4	4.8	47.3	0.51
	22	× 9.95	×16.8	5.1	42.5	0.74
	23	× 9.35	10.4	1.5	46.0	0.04
	24	× 9.65	8.5	1.9	46.0	0.12
	25	8.92	8.6	1.6	42.0	0.13
	26	×10.30	×20.2	4.5	×61.1	0.17
	27	× 9.10	7.7	4.0	35.4	0.21
	28	× 9.08	7.6	3.6	36.8	0.30
F.C	29	× 9.05	4.1	×11.0	×51.6	0.13
	30	8.40	4.4	6.8	×53.9	0.01
	31	× 9.20	×20.0	7.6	×64.4	0.26
	32	8.70	13.2	3.9	×72.7	0.18
	33	× 9.20	11.5	3.1	×50.8	1.06
	34	× 9.60	11.7	4.1	×50.8	0.52
	35	× 9.10	10.7	4.8	44.4	0.18

（×の付してある数値は限度以上の値である）

ホウ酸溶液（4 w/v%）：ホウ酸40 g を水に加温して溶かし全量を1,000m*l* とする．

フッ化水素酸：特級，東京芝浦電気製

鉄，ナトリウム，マグネシウム，カルシウム，アルミニウム，ケイ素，クロム，銅，チタン，カリウムの各標準溶液は和光製原子吸光分析用標準溶液を適宜希釈して使用した．

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．

試験

1. 水可溶物および液性 第三版食品添加物公定書（以下食添三と略す）中，「ケイソウ土」の純度試験(1)では，「本品10 g に水100m*l* を加え，蒸発する水を補いながら30分間煮沸し，冷後水を加えて100m*l* とし，ガラスろ過器（3 G 4）でろ過するとき，ろ液の液性は pH 5.5～9でなければならない．またこのろ液 50m*l* をとり，蒸発乾固し，残留物を105°で1時間乾燥するとき，その残留物は15mg以下でなければならない．」とされている．この試験法は，水可溶物および液性を測定する上においてつぎの点に問題がある．まず加熱条件であるが，不溶性鉱物質であるケイソウ土を10 g も秤取して30分間直火で加熱すると突沸が激しい．またろ過前にメス

表2　加熱条件と液性，水可溶物の関係

回数	30分間煮沸 pH	30分間煮沸 水可溶物	水浴上1時間 pH	水浴上1時間 水可溶物	水浴上2時間 pH	水浴上2時間 水可溶物
1	8.12	9.45(mg)	8.24	7.45(mg)	8.72	9.35(mg)
2	8.08	9.20	8.10	7.55	8.68	9.75
3	8.05	9.60	8.02	6.40	8.56	9.25
4	8.08	9.00	8.06	7.55	8.28	8.30
5	8.04	8.75	8.00	7.10	8.20	8.50
6	8.02	7.95	7.99	7.05	8.30	9.20
7			8.08	8.60	8.68	8.15
n	6	6	7	7	7	7
$\bar{x}$	8.065	8.992	8.070	7.386	8.489	8.929
s	±0.033	±0.543	±0.079	±0.621	±0.205	±0.562

アップを行っているが，ケイソウ土は容積の大きいものは10gを秤り水を加えて100mlにした時に，そのろ液は70ml ぐらいしか採取できないものもある．つぎにろ過条件であるが，ガラスろ過器（3G4）での吸引ろ過では目づまりを起こし，ろ過に時間を要する．以上の問題点について著者らは検討を行った．

1.1　加熱条件と液性，水可溶物の関係　*F.C*の同一ロットについて熱板上30分間煮沸と沸騰水浴上1時間，および同2時間加熱による液性および水可溶物の実験結果を表2に記す．

表2より，水浴上1時間加熱と2時間加熱の差による液性および水可溶物の有意差を求めると，pHは $t=4.665>3$，水可溶物では $t=4.511>3$ となり，両方とも有意差が認められ1時間加熱では不充分であることが推定される．水浴上2時間加熱と熱板上30分間煮沸との液性および水可溶物の有意差を求めるとpHの場合 $t=4.606>3$ で有意差はあるが，水可溶物では $t=0.188<3$ となり99.7%信頼限界において有意差を認められない．

1.2　ろ過条件による水可溶物の差　ガラスろ過器（3G4）とろ紙5種Cを用いた吸引ろ過について，同一ロットのもので有意差を実測したところ表3の如くであった．99.7%信頼限界の有意差を求めると $t=2.393<3$ で有意差が認められない．

表3　ろ過条件による水可溶物の差

回数	ガラスろ過器	ろ紙5種C
1	5.35(mg)	8.85(mg)
2	6.35	7.60
3	7.80	7.40
4	6.30	8.85
5	6.05	6.55
6	6.75	7.00
7	5.85	6.40
8	7.35	7.10
n	8	8
$\bar{x}$	6.49	7.59
s	±1.01	±1.12

1.3　水可溶物の成分　ケイソウ土を発光分光によって定性した結果から鉄，ナトリウム，マグネシウム，カルシウム，アルミニウム，ケイ素，クロム，銅，チタン，カリウムを原子吸光分析法により測定することにした．

試料として表1より *N* のNo1～3，*C* のNo7～9，*F.C* のNo22～24の各品種をえらび，その25gを精秤し水250mlを加え，沸騰水浴上で時々攪拌しつつ蒸発する水を補いながら2時間加熱する．冷後ろ紙5種Cを用いて吸引ろ過し，再び水浴上で濃縮して塩化ランタン溶液[3,4] 10mlおよび水を加え全量を100mlとしこれを検液とする．この検液について原子吸光分析法によって測定した値を表4に記す．

全体としてナトリウム，ケイ素，カリウムの占める割合が大きく，品種別では *N* が *C*，*F.C* に比して溶出量が多い．同品種間においても各試料により値に差があるのは原鉱に由来するものと思われる．

2.　塩酸可溶物　食添三中，「ケイソウ土」の純度試験(2)では「本品2gに希塩酸40mlを加え，約50°で15分間振り混ぜながら加熱し，冷後水を加えて40mlとしろ過する．そのろ液10mlをとり，希硫酸1mlを加えて蒸発乾固し，さらに恒量になるまで強熱するときその残留物は10mg以下でなければならない．」とあるが条文では40mlの特殊なメスフラスコを必要とするのでこれを50mlに改め，またろ過後メスアップする方法で行った．50mlに改めると残留物の限度は8mgとなる．

2.1　塩酸可溶物の成分　試料および測定元素は水可溶物の場合と同様である．

試料4gを精秤し，希塩酸80mlを加え約50°で15分間

表4 水可溶物の成分 (ppm)

品種	No.	Fe	Na	Mg	Ca	Al	Si	Cr	Cu	Ti	K
	1	2.0	400	23.6	39.6	2.4	277.4	ND	ND	ND	47.2
N	2	2.1	244	12.4	28.0	4.0	452.0	ND	ND	ND	40.0
	3	0.6	2,020	1.0	18.4	ND	1,356	4.9	ND	ND	8.5
	7	0.3	92	1.8	4.8	ND	90.4	ND	ND	ND	14.8
C	8	2.1	2,160	1.7	6.4	ND	1,984	ND	ND	ND	9.3
	9	2.0	2,640	1.4	6.4	ND	2,130	ND	ND	ND	13.0
	22	0.7	569	1.3	4.4	0.8	577.6	9.2	ND	ND	25.0
F.C	23	ND	348	0.3	4.8	ND	258.4	0.8	ND	ND	2.5
	24	0.6	394	0.9	15.2	4.0	314.2	1.2	ND	ND	6.2

(ND……0.1ppm以下)

表5 塩酸可溶物の成分 (ppm)

品種	No.	Fe	Na	Mg	Ca	Al	Si	Cr	Cu	Ti	K
	1	1,135	1,109	838	788	1,088	1,048	5.6	8.1	20	399
N	2	1,349	937	800	1,024	1,157	979	6.0	8.5	62	472
	3	305	3,640	99	1,126	456	611	ND	1.5	23	95
	7	103	682	79	557	399	270	ND	2.0	23	227
C	8	179	2,828	55	391	707	403	ND	ND	ND	112
	9	200	2,749	55	385	720	404	ND	ND	18	98
	22	160	1,932	125	791	311	341	11.0	1.8	28	115
F.C	23	75	1,306	20	145	180	135	1.0	1.7	18	85
	24	75	1,763	20	152	180	135	1.0	1.5	18	75

(ND……0.1ppm以下)

振り混ぜながら加熱し，冷後ろ紙5種Cを用いてろ過し少量の水でろ紙上の残査を洗いろ液，洗液をあわせてこれに塩化ランタン溶液[3,4]10m*l* および水を加え全量を100m*l* とし検液とする．この検液について原子吸光分析法によって測定した値を表5に記す．

原鉱による差は多少あるが*N*の溶出分が*C*, *F.C*に比べ特に多い．

3. フッ化水素酸残留物 食添三では，「本品約0.2gを白金ルツボに精密にはかり，フッ化水素酸 5m*l* および硫酸（1→2）2滴を加え，静かに砂浴上でほとんど蒸発乾固し，冷後残留物にフッ化水素酸5m*l* を加え，再び静かに砂浴上で蒸発乾固した後強熱するとき，その残留物は50mg 以下でなければならない.」とある．この項の問題点はフッ化ケイ素の揮発条件と強熱条件および品種別の規格化の必要性にあると考えられ，以上の点について検討した．

3.1 揮発条件と強熱条件 フッ化水素酸を加えフッ化ケイ素としてケイ素を揮散させるためには硫酸酸性でなければならない．また共存金属を硫酸塩として残留させるためにも不用意に強熱することはさけ，はじめは水浴上で行う必要がある．蒸発乾固後の強熱は食添三には450～550° と規定されているがこの条件では残留物中に硫酸塩，酸化物等の割合が一定せず混在しているため恒量となるのに10～15時間もかかる．これを1000° で強熱した場合は表6の如く1時間で恒量となる．

3.2 品種別規格化 品種別におけるフッ化水素酸残留物の測定値は表1で明らかなように*F.C*に多く，これは融剤により融塊を作るため残留物が多いものと考えられる．しかし前出の水可溶物，塩酸可溶物としての溶出量は少ないので問題はないと思う．

表6 強熱条件による差 (mg)

試料 No.	550°, 恒量	1000°, 1 hr	1000°, 2 hr
1	29.3	13.5	13.8
2	41.4	31.0	31.0
3	64.9	42.2	42.1

表7　フッ化水素酸残留物の成分（ppm）

品種	No.	Fe	Na	Mg	Ca	Al	Si	Cr	Cu	Ti	K
	1	9,780	5,200	4,290	3,640	23,800	ND	84	58	1,230	7,240
N	2	7,160	4,200	3,320	3,240	19,600	ND	52	41	960	4,660
	3	8,280	21,800	1,900	6,260	12,800	ND	ND	34	600	1,720
	7	10,760	4,800	4,790	3,100	23,600	ND	96	100	1,360	6,510
C	8	8,360	21,600	1,500	3,920	16,400	ND	ND	164	820	1,560
	9	8,130	17,400	1,450	3,920	15,100	ND	ND	148	640	1,500
	22	7,760	21,600	4,000	3,400	20,500	ND	64	60	980	5,480
F.C	23	9,700	28,450	1,670	4,800	18,200	ND	ND	34	650	2,200
	24	9,330	28,300	1,640	4,720	18,200	ND	ND	40	720	2,220

（ND……0.1ppm以下）

3.3　フッ化水素酸残留物の成分　試料および測定元素は前項の水可溶物，塩酸可溶物の場合と同様である．

試料0.5gを精秤し食添三のフッ化水素酸残留物の項の方法に準じて処理した残留物（強熱は約30分間とし，フッ化ケイ素および過剰のフッ化水素酸を揮散させるにとどめたもの）を塩酸20m*l* に溶解し，塩化ランタン溶液[3,4] 10m*l*，ホウ酸溶液[3,4]25m*l* を加え水で全量を100m*l* としたものを検液として測定する．

4.　強熱減量　市販品の *N* の強熱減量は規定限度の3％をこえるものがほとんどである．これは *N* が半焼成品であるためで，文献[2]によれば *N* は一般に5～10％の付着水分があるといわれる．また *C*，*F.C* についても空気中の湿気により通常3％ぐらいの水分を吸収しているという．FCC（アメリカ食品添加物規格）では *N* について12％以下，*C* および *F.C* については5％以下とされており，いちじるしい規格の差が認められる．

結　論

ケイソウ土の成分規格について各試験項目別に検討した結果，次のように改めるのがよいと考えられる．

性状として *N* は白～淡灰色，*C* は淡赤かっ色，*F.C* は白～淡赤かっ色の粉末とする．

水可溶物および液性の項は，沸騰水浴上2時間加熱とし，ろ過は定量ろ紙5種Cを用いて吸引ろ過とし，全量を100m*l* としてその50m*l* の残留物を秤量することに改める．残留物の限度は *N* で15mg以下，*C* は10mg以下，*F. C* は25mg以下とする．液性については *N* は pH5.5～7.5. *C* は pH5.5～8，*F.C* は pH8～11 としてガラス電極法で測定するように明文化したい．加熱条件もろ過助剤として使用される場合，直火で煮沸するという条件よりも水浴上2時間の方が適当であると考える．

塩酸可溶物はメスアップのさいの40m*l* を50m*l* に改め，残留物の限度は *N* 10mg 以下，*C*，*F.C* 共に8mg 以下とする．

フッ化水素酸残留物も，はじめは水浴上で次に砂浴上でと改め，強熱温度もはじめ550° でついで1000～1200° と幅をもたせ，残留物の限度はN，*C* は40mg以下，*F.C* は50mg 以下とする．

強熱減量は，*N* に不合格品が集中しているがこれは製造上の問題で品質には関係がないと思う．限度は *N* 10％以下，*C*, *F.C* は3％以下に定めるのがよいと思う．

謝辞　協力を頂いた衛生局食品監視課，日本ろ過助剤協会の各位に謝意を表します．

文　献

1）食品添加物公定書注解編集委員会：第三版食品添加物公定書注解，1974，金原出版
2）杉本泰治：沪過と沪過助剤，第3版，1971，地人書館
3）鈴木正巳，武内次夫，田村正平，不破敬一郎，武者宗一郎：原子吸光分析の実際，111，1973，南江堂
4）Roos, J. T.H. and Price, W. J.: *Analyst*, 94, 89, 1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26 - 1, 230—235, 1975

塩化ビニル樹脂製容器包装の衛生化学的研究

渡辺悠二* 佐藤憲一* 吉田令子*
諏訪世津子* 藤居瑛*

Hygienic Chemical Studies on Polyvinylchloride Container-Package

YUJI WATANABE*, KENICHI SATO*, REIKO YOSHIDA*,
SETSUKO SUWA* and TERU FUJII*

緒　言

合成樹脂製の食品用器具および容器包装の規格は，昭和41年にユリア樹脂製品のホルムアルデヒド溶出問題を契機として全面的に改定されたが，その後における多種多様な合成樹脂の開発普及にともない，材質別の規格を定める必要が生じ，先ず，昭和48年6月塩化ビニル樹脂製品について規格が制定された（厚生省告示第178号）．この規格試験では従来の溶出試験のほかに，新たに材質試験として，安定剤である鉛，カドミウムおよびジブチルスズ化合物および可塑剤であるクレゾールリン酸エステルの規制が加えられ，また溶出試験に用いる食品疑似溶媒として，4％酢酸の他20％エタノールおよびn-ヘプタンが加えられた．

東京都では告示施行以来，数回にわたり一斉検査を行ったが，これにあわせて著者らはフタル酸エステル等の可塑剤についても調査を行い，一方，塩化ビニル樹脂の原料である塩化ビニルモノマーの発がん性が確認され，アメリカではアルコール飲料に同樹脂製容器の使用が禁止されたことなどもあって，今回塩化ビニル樹脂製器具および容器包装の衛生性に関し，規格試験に基づく一斉検査，可塑剤，残留塩化ビニルモノマーについてそれぞれ調査を行った．以下その成績について報告する．

実験の部

規格試験について

1. 試料

行政検体135検体（内訳：菓子用34，豆腐用26，ソース用15，酒類用6，のり用6，しょうゆ用5，漬物用5，そう菜用5，油脂類用4，包材3，その他26）．

2. 試験法

食品，添加物等の規格基準第3・A6の2（厚生省告示第178号）に基づいて行った．

なお鉛，カドミウムは限度試験であるが，銅，亜鉛もあわせてポーラログラフィーによる定量を行った．またジブチルスズ化合物の試験と同時に，ジオクチルスズ化合物の定性を行った．

3. ジブチルスズ化合物の確認，定量

2の規格試験の中，ジブチルスズ化合物のろ紙クロマトグラフィーの試験において，標準液とほぼ同じ位置に青いはん点を認めた場合は，塩ビ食品衛生協議会法[1]に従って薄層クロマトグラフィーおよびポーラログラフィーによる確認，定量を行った．

1）薄層クロマトグラフィー　薄層板（メルク製キーセルゲル60）に試験溶液，標準液，試験溶液に標準液を添加したものそれぞれ 20μl をスポットし，展開溶媒a：水飽和n-ブタノール・酢酸（100：2），b：水・n-ブタノール・エタノール・酢酸（2：5：5：0.15），c：n-ヘキサン・酢酸（12：1），d：イソプロパノール・N-酢酸ナトリウム・N-酢酸（100：50：50），e：テトラヒドロフラン・ベンゼン・酢酸（90：10：1.6），f：イソプロピルエーテル・酢酸（酢酸1.5％）の6種を用いて約15cm展開する．風乾後，呈色試薬（0.1％ピロカテコールバイオレット液）を噴霧し確認を行った．

2）ポーラログラフィー　ろ紙クロマトグラフィー用ろ紙（規格試験用）に試験溶液20～200μl を塗布し，展開溶媒メチルアルコール・N-塩酸（3：1）を用いて約13cm展開する．風乾後，両端1cmを切り取って呈色試薬を噴霧して位置の確認を行い，その部位に相当する部分約4cm を切り取るか，またはろ紙全体に呈色試薬

* 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

を噴霧して呈色する部分を切り取って細切する．これに0.1N塩酸1 m*l* およびエタノール2 m*l* を加えて数時間放置し，ジブチルスズ化合物を溶出させる．放置後，水7 m*l* を加えろ過する．ろ液を試験溶液としてく形波ポーラログラム（柳本ポーラログラフP8形使用）をとり，定性定量を行った（半波電位約−0.7V）．検量線は標準液を同様に操作して作成した．

可塑剤について

1. 試料

行政検体106検体（内訳：菓子用27，豆腐用17，ソース用17，しょうゆ用4，酒類用4，油脂類用6，ストロー5，その他26）

2. 標準可塑剤

フタル酸エステル19，アジピン酸エステル4，セバシン酸エステル2，アゼライン酸エステル1，クエン酸エステル4（試薬）30種．

3. 装置

日本分光IR—G形赤外分光光度計

日立023形ガスクロマトグラフ，FID検出器付

4. 試験法

1）試験溶液の調製　試料をよく水洗し乾燥後，5 gを精秤し細切する．試料をソックスレー抽出器に入れ，エチルエーテル150m*l* を加え4時間加熱還流する．冷後ろ過し，KD濃縮器を用いてエチルエーテルを除去した後残留物にアセトンを加え，全量 5 m*l* としたものを試験溶液とした．

2）可塑剤標準液の調製　標準可塑剤をアセトンに溶かし，それぞれ0.1および1.0%液を調製した．

3）可塑剤の定性および定量　試験溶液および可塑剤標準液を用い，赤外吸収スペクトル法(以下IRと略す)，ガスクロマトグラフィー（GC）および薄層クロマトグラフィー（TLC）によって定性，定量を行った．

i）IR　薄膜法（KBr板使用）[2]による定性を行った．

ii）GC　次の条件で試験を行い，ピークの保持時間と高さから定性，定量を行った．

操作条件　カラム：Silicone SE-30（5%)/Chromosorb W-AW (60～80mesh)，ステンレスカラム：3mm×2m，カラム温度：230°，キャリヤーガス：N_2 25m*l*/min，感度：2×10^2，注入量：2 μl

標準可塑剤の保持時間を表1に示す．

iii）TLC　薄層板（メルク製キーセルゲルHF254）に試験溶液5～20μl および標準液5 μl をスポットし，展開溶媒a：イソオクタン・酢酸エチル（9：1），b：メチレンクロライド，c：ジブチルエーテル・n-ヘキ

Table 1 Retention Time (GC) and Rx Values (TLC) of Plasticizer

Plasticizer	t_R (min)	Rx values a	b	c
Dimethyl phthalate	1.0	37	84	33
Diethyl 〃	0.2	51	92	55
Di-n-propyl 〃	1.7	70	105	74
Di-iso-propyl 〃	1.4	70	98	71
Di-n-butyl 〃	2.6	79	113	88
Di-iso-butyl 〃	2.1	84	111	91
Dicyclohexyl 〃	11.1	85	109	93
Diheptyl 〃	9.4	105	121	110
Di-n-octyl 〃	20.9	107	124	111
Di-2-ethylhexyl 〃	12.5	120	127	118
Dinonyl 〃	16.9	112	127	118
Di-iso-decyl 〃	—	120	129	119
Dilauryl 〃	—	122	129	118
Ditridecyl 〃	—	137	132	125
Benzyl-n-butyl 〃	7.1	59	104	83
Dibutoxyethyl 〃	9.8	23	36	31
Butyl phthalyl butyl glycolate	6.3	41	96	96
Di-2-ethylhexyl tetrahydro phthalate	11.1	141	116	125
Di-n-octyl tetrahydro phthalate	17.7	137	117	121
Di-iso-butyl adipate	1.4	79	80	79
Di-2-ethylhexyl 〃	8.6	114	103	110
Di-iso-decyl 〃	23.2	111	105	110
Dibenzyl 〃	11.8	41	92	68
Di-n-butyl sebacate	4.4	100	100	100
Di-2-ethylhexyl 〃	27.4	137	118	125
Di-2-ethylhexyl azelate	20.3	132	112	127
Triethyl citrate	1.3	9	13	9
Tributyl 〃	4.7	28	33	33
Triethyl o-acetyl citrate	1.5	17	33	20
Tributyl 〃 〃	5.6	44	45	60

GC conditions :
Column : 5%SE-30 on Chromosorb W(Stainless 3mm×2m)
Column temp : 230°
Carrier gas : N_2 25m*l*/min
Rx values : Rf values relative to di-n-butyl sebacate=100
Solvent a : Isooctane・Ethyl acetate (9 : 1)
b : Methylenechloride
c : n-Butylether・n-Hexane (4 : 1)

サン（4：1）[3]を用いて約15cm展開する．風乾後，ヨウ素ガスにさらしたのちけい光下でスポットを確認した．

ＴＬＣを行うとき，同時にセバシン酸ジ-n-ブチルを展開し，このRf値を100とした相対Rf値（Rx）を求めた（表1に示す）．またＩＲ，ＧＣで見当をつけてからＴＬＣを行った．

残留塩化ビニルモノマーについて

1. 試料

行政検体36検体（内訳：容器16，ボトル10，フタ4，その他6）．

2. 装置

日立163形ガスクロマトグラフ，ＦＩＤ検出器付

3. 試薬

1）塩化ビニルモノマー（以下ＶＣＭと略す）：市販のＶＣＭ（99.95%）を用いた．

2）テトラヒドロフラン（以下ＴＨＦと略す）：ドータイトスペクトロゾール用を用いた．ＴＨＦはガスクロマトグラムでＶＣＭと同じ位置にピークを示すものがあるので，精製する必要がある．ＴＨＦに水酸化カリウムを加え1～2日乾燥後，適量の水素化リチウムアルミニウムを加え蒸留する．蒸留したＴＨＦは窒素ガスを1～2時間通じ，ガスクロマトグラムで妨害ピークのない事を確認してから使用する．なお窒素ガスを封入して冷蔵庫で保存すると1～2日は使用できる．

3）エタノール：和光純薬精密分析用エタノールを用いた．ＶＣＭに対し妨害ピークのない事を確認する．

4. 試験法

1）試験溶液の調製　試料0.5gを10m*l*の目盛付小試験管にとり，ＴＨＦを加えて10m*l*とする．この際，試料は溶解しにくいが，振盪加温しないで，試料を短冊形に切り，ＴＨＦを10m*l*より少なめに加えて一夜冷暗所に置き，翌日10m*l*とした．

2）ＶＣＭ標準液の調製　i）ＶＣＭの液化[4]：ＶＣＭは沸点−13.9°と極めて低いので，図1のような装置を組立て，エタノール・ドライアイスで約−70°に冷却しながら液化を行った．液化したＶＣＭはバイエルビンに入れ約−70°に冷却しておく．

ii）約1,000ppmのエタノール溶液：100m*l*のメスフラスコに標線から2～3m*l*少な目にエタノールを入れ，シリコンゴム栓をして重量を正確に測定する．重量測定後，冷却しておいた注射器でi）のバイエルビンからＶＣＭをとり，約100mgをシリコンゴム栓を通してエタノールに溶解させる．次いでこのメスフラスコの重量を正確に量った後，ゴム栓を通してエタノールで100m*l*定容にする．こうしてできたＶＣＭ約1,000ppmのエタノール溶液を，エタノール・ドライアイスで約−70°に冷却し，冷却した時点でガラスの栓にかえる．この溶液は−20°以下に保存する．

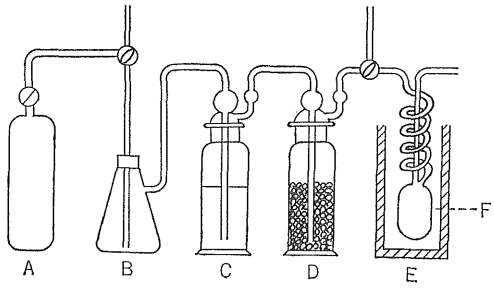


Fig. 1 Liquefactive Apparatus of Vinylchloride

A：Gas cylinder	D：$CaSO_4$ anhydrous
B：Trap	E：Dewar bottle
C：20% NaOH soln.	F：Collector

iii）約10ppmのエタノール溶液：100m*l*のメスフラスコに標線から2～3m*l*少な目にエタノールを入れ，ii）で冷却してある約1,000ppmのエタノール溶液1m*l*をホールピペットで加え，エタノールで100m*l*とする．これで約10ppmのＶＣＭ標準液が得られるが，この場合約−70°の溶液を1m*l*とる関係で，常温での容積に換算する必要がある．これには約−70°のエタノール溶液を一定量とって重量を測定し，常温でのエタノール同量との重量を比較して補正した．この溶液は−20°以下の暗所に保存する．

iv）定量用標準液：検量線用の標準液はiii）で得た約10ppmの標準液をエタノールで希釈して，0.5, 1.0, 1.5 ppmの標準液を調製した．この溶液は用時調製する．

3）カラム充てん剤の検討　充てん剤イ）Ucon oil ＬＢ-550Ｘ(10%)/Anakrom ＳＤ（60～80mesh）ロ）Silicone DC-550（10%)/Gasport A（60～80mesh）ハ）PEG 20M（20%）/ Chromosorb W-AW（60～80 mesh）

操作条件　カラム：ガラス3mm×2m　カラム温度：70°　注入口温度：180°　キャリヤーガス：N_2 22m*l*/min　H_2, Air：最高感度に調整　注入量：4 μl

イ）は溶媒（ＴＨＦ，エタノール）の流出しはじめるまでの時間が長く，溶媒の妨害ピークが少ない．また試料での疑似ピークの分離がよい．ロ）は感度がイ），ハ）に比べてよいが溶媒の妨害ピークがみられる．また溶媒の流出しはじめるまでの時間が短い．ハ）は溶媒の妨害ピークがＶＣＭのピークと重なる．

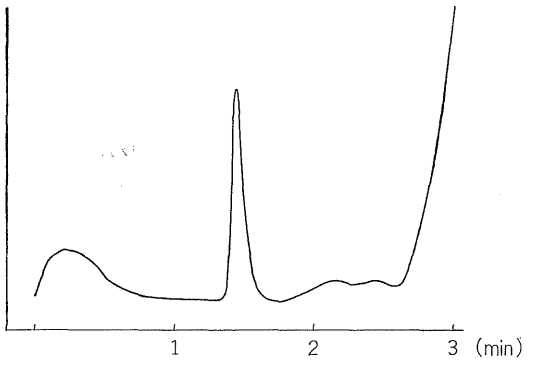


Fig. 2 Gas Chromatogram of Vinylchloride
Conditions :
Column : 10% Ucon oil LB-550X on Anakrom SD 60-80 mesh, glass column 3 mm ×2 m
Column temp : 70°
Carrier gas : N_2 22ml/min
Standard soln. : 0.5ppm 4μl

このようなことから，溶媒の妨害ピークの少ないUcon oil LB-550Xのカラムを使用した（図2）．

4）検量線の作成　定量用標準液(0.5, 1.0, 1.5ppm)のガスクロマトグラムをとり，そのピーク高から検量線を作成した．

5）残留ＶＣＭの測定　試験溶液4 μlを注入してガスクロマトグラムをとり，そのピーク高を測定した．この際，標準液を時折注入してＶＣＭの保持時間をチェックする．疑わしいものについてはSilicone DC-550のカラムも使用する．

結果と考察

1. 規格試験について

1）行政検体の試験結果

試料135検体中規格試験で不適格のものは表2に示すように22検体（16%）あり，溶出試験には合格していたが材質試験で不適格であった．用途別にみると菓子容器10/34検体，豆腐容器6/26検体，ソース容器1/15検体，のり容器1/6検体，漬物容器1/5検体，そう菜容器1/5検体およびその他2/26検体であり，菓子と豆腐容器に不適格のものが多かった（73%）．

溶出試験において，重金属試験ではほとんど鉛として0.1ppm以下であったが，カドミウム0.6ppmを検出したものが2検体あった．過マンガン酸カリウム消費量はほとんどが1.0ppm前後，蒸発残留物は最高9.2ppmで，ほとんどが3.0ppm以下であった．

材質試験において，クレゾールリン酸エステルの検出されたものは1例もなかったが，ＧＣの規定の操作条件1または2のうち一方にだけ，o-クレゾールと同じ位置にピークの出る検体が約20%もあった．しかし，mおよびp-クレゾールのピークがない点と，もう一方の操作条件によってo-クレゾールの位置からずれる点から，判定の上では問題はなかった．

重金属の試験では，鉛を限度以上に含むもの3検体（豆腐容器2，その他1），カドミウム検出6検体（豆腐容器3，菓子容器3）あった．これらはその濃度からみて安定剤として配合されたものと思われる．また限度以下ではあるが鉛を検出したものは14検体，カドミウムで7検体あった．なおこの試験で銅を検出したものが20検体（100ppm以上のもの13検体）あり，これは着色剤として青色色素（銅フタロシアニンブルー）が配合されたためと思われる．また亜鉛を検出したもの104検体（100ppm以上のもの57検体）あり，これはステアリン酸亜鉛等の安定剤配合によるものと思われる．

ジブチルスズ化合物の試験では，限度以上検出で不適格のものが17検体（菓子容器8，豆腐容器4，ソース容器，のり容器，漬物容器，そう菜容器，その他各1）あり，その濃度（最高1.57%）から推測して配合によるもの12検体，再生利用または成形機の汚染等に起因する濃度の70～160ppmのもの5検体，限度以下ではあるが2検体からは38，41ppm検出され，この7検体の中5検体は菓子容器であった．また56/135検体（41%）からジオクチルスズ化合物が検出されており，ジオクチルスズ化合物の含まれていない検体からは亜鉛を検出していることから，食品用容器包装の塩化ビニル樹脂製品には安定剤として，ＦＤＡで認可されているジオクチルスズ化合物，亜鉛化合物の使用，またはこれらの併用がかなり行われているものと思われる．

2）ジブチルスズ化合物の確認，定量

公定法は，ＰＰＣにより，ジブチルスズクロライド標準液3 μl と比べてほぼ同じ位置に青いはん点を認めてはならないという限度試験で，その限度値は50ppmが示されているが，熟練すれば30ppm程度から青いはん点が認められるため，行政的な面からもジブチルスズ化合物の定量を行う必要があった．また疑似スポットの出るものが約10%もあったため，ＴＬＣで分離したのちポーラログラフィーによる確認と定量を行った．

ＴＬＣでは，6種の展開溶媒を用いて行ったところ，展開溶媒b，c，dについては分離が悪く，またテーリングがある等の点で実用上問題があり，展開溶媒a，e，fではジブチルスズ化合物とジオクチルスズ化合物との

Table 2 Result of unfitted Specimens by the Standard Procedure of Polyvinylchloride Container-Package

Specimen		Material test			
		Cd	Pb	Dibutyltin compound	TCP
Confectionery container	1	180	37	70	N.D
	2	N.D	N.D	12,100	N.D
	3	N.D	N.D	135	N.D
	4	N.D	N.D	900	N.D
	5	557	9	N.D	N.D
	6	511	23	N.D	N.D
	7	N.D	N.D	1,450	N.D
	8	N.D	N.D	160	N.D
	9	N.D	N.D	15,700	N.D
	10	N.D	N.D	10,500	N.D
Bean curd container	1	96	3,760	N.D	N.D
	2	N.D	N.D	6,970	N.D
	3	656	N.D	4,020	N.D
	4	654	N.D	1,700	N.D
	5	141	712	N.D	N.D
	6	N.D	N.D	11,830	N.D
Sauce container		N.D	N.D	9,100	N.D
Laver container		N.D	N.D	1,280	N.D
Pickles container		N.D	N.D	80	N.D
Daily dishes container		7	19	100	N.D
Others	1	10	N.D	765	N.D
	2	6	357	N.D	N.D

分離もよく，ジブチルスズ化合物の判別に十分利用できることがわかった．

ペーラログラフィーによる定量を行う場合，PPC操作後の回収率は約70%であり，定量には標準液を同様に操作して得られた検量線を用いなければならない．またろ紙を展開し，相当する部分を切り取る際，ろ紙全体に呈色試薬を噴霧し，呈色した部分を切り取って操作した方が切り損じによるロスを防ぐことができた．

2. 可塑剤について

試料106検体について試験した結果，60検体から以下のような可塑剤の存在を確認した．

1）アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル（以下DEHAと略す）

0.1～11.0%の範囲で40/106検体(38%)から検出した．含有量は豆腐容器では2～4%，菓子容器では1%以下のものが多く，ソース，しょうゆ，酒類等の硬質容器（24検体）はすべて0.4%以下であった．使用されている度合は，豆腐容器11/17検体(65%)，菓子容器11/27検体（41%），ソース，しょうゆ，酒類容器10/24検体（42%）であった．

2）フタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）

0.1～4.6%の範囲で20/106検体(19%)から検出した．含有量は豆腐容器では0.6～2.2%，菓子容器0.22～4.6%，油脂類容器0.36～1.02%であった．本剤の使用度合は豆腐容器4/17検体（24%），菓子容8/27器検体(30%)，油脂類容器3/6検体（50%）であった．

3）フタル酸ジ-n-ブチル（DBP）

0.1～11.8%の範囲で14/106検体（13%）から検出した．含有量の大きいのはストローで5検体から8.9～11.8%検出され，他は豆腐容器1，ソース容器1，菓子容器3，その他4検体とかなりのバラツキがみられた．

4）セバシン酸ジ-n-ブチル（DBS）

サラダ油容器1検体（含有量0.26%），包装資材1検体（1.25%）より検出した．

5）フタル酸ジヘプチル（DHP）

豆腐容器1検体（含有量3.05%）より検出した．

6）フタル酸ジエチル（DEP）

包装資材1検体（含有量0.07%）より検出した．

7）ブチルフタリルグリコール酸ブチル（BPBG）

包装資材1検体（含有量1.5%）より検出した．

可塑剤の同定を行う場合，GCでDEHAの位置にピークが現れても，TLCでスポットが認められなかったり，逆にGCでピークは現れないが，TLCでDBPのスポットが認められたりすることがあるため，一種類の分析法で同定することは危険である．まずIRで系統を見分けたのち，GCで見当をつけTLCで確認する方法がよい．また今回行った試料はGCにおいて保持時間4分以内にピークの数が多かったが，標準可塑剤と同じ保持時間を示すものについてTLCで確認した結果，一致したのはDBPとDEPの一部であった．IR，GC，TLCの組合せにより，ほぼ定性定量はできるが，更に確認のためにGC-マススペクトル法を行った．

使用されている可塑剤は DEHA が最も多く，豆腐容器，ソース容器，菓子容器，酒類容器，その他と用途の如何を問わず配合されている．豆腐容器に量的に多いのは，ソース容器などに比べ軟質であることからうなづける．次いで多いのは DEHA で，菓子容器に多く認められた．ソース，しょうゆ，酒類等の硬質容器には，可塑剤は DEHA に限らずほとんど配合されていないか極く少量であった．今回行った試料でみる限り，メイン(0.1%以上）として検出されている可塑剤は，標準可塑剤30

種中の6種と偏っていることから，実際に食品容器用に使用されているのは，数種類にしぼられるのではないかと思われる．

3. 残留塩化ビニルモノマーについて

ＶＣＭを検出したものは16/36検体(44%)あり，10ppm以上のものは6検体で最高は清酒容器の 142.0ppm，プリンカップ49.0ppm，しょうゆ容器45.0ppm，サラダ油容器29.6ppm，みりん容器11.2ppm，シート10.4ppmであり，10ppm以下のものは10検体で菓子容器 5.2ppm，すきやきのたれ容器4.8ppm，リキュール容器1.8ppm，容器のフタ1.4ppm，フードパック1.0ppm，そう菜容器0.8ppm，マーガリンのフタ0.6ppm，容器，ソフトクリームのフタ，キャンディー用パイプ各 0.4ppm であった．また容器の形態については，ボトル系の容器に残留が多いようであった．今回の調査でＶＣＭを検出しなかったものが20検体あり，検出されたものについても約5ppm以下のものが2/3を占めていることから，製造，加工の際，ＶＣＭの残留をより少なくすることも可能であると思われる．

ま と め

食品用の容器包装に多用される塩化ビニル樹脂製品における新規格試験適否の実態，可塑剤の使用状況および残留ＶＣＭについて，収去検体を試料として調査を行った．

その結果，規格試験では22/135検体（16%）が不適格で，菓子および豆腐容器に目立って多かった．なお不適理由は材質中から鉛，カドミウムまたはジブチルスズ化合物が検出されたものであるが，その濃度から推定して，大部分は食品用容器包装に禁止されている安定剤を配合したことによるものであった．なお塩ビ食品衛生協議会の推奨マークであるＪＨＰマーク付きの検体では，不適格になったものはなかった．また規格試験のジブチルスズ化合物の試験における判定の際には，ＴＬＣおよびポーラログラフィーによる確認，定量が必要と思われる．

規格試験が施行されて一年半を経過したが，今回の実態調査で明らかなように，食品用以外の材料を使用している容器包装がいまだに出まわっている．この点，食品用容器包装に対する衛生指導をなお一層強化する必要があると思われる．

塩化ビニル樹脂製品106検体中の可塑剤の使用状況を調査した結果，アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルを配合しているもの41検体（38%），フタル酸ジ-2-エチルヘキシル20検体（19%），フタル酸ジ-n-ブチル14検体(13%)で，その使用濃度はそれぞれ 0.1～11.0%，0.1～4.6%，0.1～11.8%であった．可塑剤の種類は多いが，今回の調査からも明らかなように，硬質系の食品容器に繁用されている可塑剤は数種類であることがわかった．なお軟質系等の包装材料については，今回は例数が少なく使用可塑剤の傾向を把握することができなかった．

残留ＶＣＭについては，材質中0.5ppm程度から測定でき，検出したものは16/36検体（44%），その中10ppm以上検出したものはは6検体で最高は142ppmであった．材質中とはいえ高濃度のモノマーが残留するおそれもあり得るので今後とも監視を続ける必要がある．

文　献

1) 辰濃隆：食品衛生研究，24，4，19，1974
2) 神原周，井本稔：プラスチックおよびゴム用添加剤実用便覧，140，1970，化学工業社
3) 村井孝一：可塑剤，627，1973，幸書房
4) 岩井信次：高分子材料，373，1968，朝倉書店

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 236—240, 1975

うに製品の品質検査

西田甲子* 深野駿一* 牛尾房雄*
道口正雄* 可児利朗*

Quality of the Paste of Seasoned Sea Urchin Eggs

KOKO NISHIDA*, SHUN-ICHI FUKANO*, FUSAO USHIO*,
MASAO DOGUCHI* and TOSHIRO KANI*

緒　言

昭和47年に「うにいか」と称して，にせのうにでいかを和えた物が市販され，翌年公正取引委員会より排除命令が出された．この製品は酒粕に調味料，香料および着色料を添加し，いかを和えたのであり，当然不当表示防止法の規定に違反するものである．そこで当時これらうに製品の品質再検討の目的で，粒うにおよびねりうにについて，日本農林規格[1]（以下ＪＡＳと略す）に定められた検査を行ったが，その結果はすべての項目に適合していた．

うに製品の品質チェックをする場合，ＪＡＳ試験だけでは不充分であり，うに成分量を示す他の検査項目が必要である．たまたま，磯野ら[2,3]の報告に，うに配偶子中に糖脂質として，glycero glyco lipid および sialo glyco lipid が存在することが述べられており，今回は市販各種うに製品について糖脂質含量を測定し，あわせてＪＡＳ試験も行ったので報告する．

試験材料および試料調製

試料は昭和49年11月，食品機動監視班により収去されたもので，粒うに14検体，ねりうに16検体，うに和えもの21検体（くらげうに８検体，数の子うに８検体，他にいかうに，貝柱うに，帆立うに，さざえうに等５検体）である．

うに食品等の表示に関する公正競争規約によると，「粒うに」とは，うにの生殖巣に食塩を加えたもの（以下「塩うに」という）およびこれにエタノール，調味料を加えたものであり，塩うに含有率が65%以上のものをいう．「ねりうに」とは，塩うにをねりつぶしたものおよび塩うににエタノール，調味料などを加えてねりつぶしたものであり，塩うに含有率が65%以上のものをいう．また「うに和えもの」とは，くらげ，数の子，あわび，いか，しいたけその他の農水産物を粒うに，ねりうにまたは混合うに（塩うに含有率が50%以上65%未満のもの）で和えたものであり，塩うに含有率が15%以上のものをいうとされている．

ＪＡＳの表示規定では，品名，内容量，製造月日，添加物の名称または効果，効能，でんぷんなどの添加の有無，製造者または販売者の住所氏名，製造工場名または略号などを明記することになっている．

うに和えものについては，含有割合の多い順に材料名の記載がなされねばならず，たとえば塩うに，酒かす，でん粉，その他のでんぷん質およびくらげなどとなる．

粒うに，ねりうにびん詰の規格は下記のとおりである．

（昭和45年７月15日農林省告示第973号）

事項＼等級	特級	並級
水分およびアルコール分	60%以下のものであること	65%以下のものであること
でんぷん含有量	よう度・よう度カリ溶液反応で検出されないものであること	８%以下のものであること
内容量	内容量が表示重量以上であること	同上

ＪＡＳマークのある製品は，各項目の規格に適合したものであり，また特級マークの付された製品は，特級の規格に合格したものである．

ＪＡＳ認定品でないうに製品にＪＡＳの検査法を適用

* 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

することは不都合とも思われるが，検査結果によってその実態を知ることが出来，今後の検査態勢上参考になると考えられる．

試料調製は，粒うに，ねりうにはそのままかきまぜ混合し，充分すりつぶし，均一にした．うに和えものは，必要な塩うに部分だけを分別するため，くらげ，いか，貝類を取り除いた．数の子うにには，ほぐした魚卵がまんべんなく混入されており，分別が困難なためやむを得ずそのまま試料とした．

試験方法

水分およびアルコール分

試料3gをはかりとり，105°で5時間乾燥後ひよう量し，乾燥前と乾燥後の重量差を試料重量に対する100分比で表わした．

でんぷん含有量

ＪＡＳでは，特級品はよう度・よう度カリ溶液反応（以下よう度反応と略す）をおこない，並級はＪＡＳ規定のソモギー法によりでんぷん含有量を測定すると定められている．今回はすべての試料に対して特級品に適用されるよう度反応を試み，結果が（＋）のものは勿論，（±）（反応が顕著でないもの）の試料についてもでんぷん含有量を測定した．

糖脂質

調製試料3gをはかりとり，これにアセトン30m*l* を加えかきまぜ，グラスフィルターでろ過した．この操作をさらに2回くり返し，単純脂質および色素を除いた後，フィルター上の残渣にクロロホルム・メタノール混液（2：1）30m*l* を加え，かきまぜろ過し，ろ液を回収した．この操作をくり返し糖脂質をすべて抽出した．この抽出液を60m*l* に定容し，Folch[4] の分配法に従って，クロロホルム：メタノール：水が8：4：3になるように水15m*l* を加え，分液ロートに移し，振り混ぜ水溶性分を水層に移行させる．一夜放置し，下層液を集め計量し，その5～10m*l* をとりロータリーエバポレーターを用い溶媒を溜去した．残渣に水1m*l* を加えよく分散させた後，アンスロン試薬[5] 10m*l* を加え沸とう水浴中で15分間加熱発色させ，冷却し，20分後の吸光度（610 nm）を測定した．別にグルコース標準液（100μg/m*l*）1m*l* をとりアンスロン試薬で発色させスタンダードとした．

糖脂質含量は，試料うに1gより抽出された糖脂質がグルコース何mgの発色率に相当するかを比較した数値である．

粗脂肪

ソックスレー法では脂肪浸出が困難であったため，クロロホルム・メタノールを用い，Forch 法により脂肪抽出し測定した．

灰分

直接灰化法によった．ひよう取した試料を乾燥器内であらかじめ乾燥したのち，電気炉で灰化（550°）した．

結果および考察

供試品はＪＡＳマークを付けたもの5試料，付けてないもの25試料であるが，後者についてはＪＡＳの適用を除外されるのでＪＡＳ試験法による判定はできない．し

表1　粒うにの成分測定値

No.	水分およびアルコール分* %	よう度反応*	でんぷん* %	糖脂質 mg Geq	粗脂肪 %	灰分 %	備考
1	51.3	−		0.75	3.7	12.8	ＪＡＳ特級
2	51.0	−		1.05	3.3	12.5	〃
3	51.3	−		0.66	3.1	12.1	〃
4	55.1	−		1.18	5.1	11.0	
5	60.4	±	2.4	1.08	5.2	10.9	
6	57.8	±	1.4	1.57	5.3	11.8	
7	59.2	±	0.7	0.99	4.5	12.2	
8	57.4	−		1.53	5.0	14.0	
9	54.1	−		1.27	4.8	15.9	
10	41.1	＋	10.5	1.28	8.9	13.1	
11	51.9	−		0.55	2.5	12.2	
12	60.1	±	1.1	1.45	4.3	13.8	
13	55.1	−		1.44	7.9	11.2	
14	56.3	−		1.26	7.4	14.4	
平均	54.4			1.15	5.1	12.7	

＊印は日本農林規格試験

表 2　ねりうにの成分測定値

No.	水分および*アルコール分 %	よう度反応*	でんぷん* %	糖脂質 mg G eq	粗脂肪 %	灰分 %	備考
1	52.5	−		0.66	3.3	11.3	ＪＡＳ特級
2	52.7	−		0.55	3.5	11.7	〃
3	59.0	−		0.99	4.2	10.6	
4	58.0	±	2.6	1.07	3.6	11.1	
5	56.8	±	3.2	0.71	3.3	9.6	
6	57.0	+	4.8	0.80	3.9	11.5	
7	58.3	+	5.4	0.85	3.8	11.7	
8	59.9	+	2.3	0.66	2.8	9.0	
9	54.9	±	1.9	0.95	5.9	10.7	
10	56.7	+	2.7	0.29	4.5	7.9	
11	53.8	+	10.6	0.44	3.4	8.3	
12	55.7	+	8.3	0.50	3.1	6.5	
13	49.8	±	3.1	0.58	4.1	10.8	
14	63.9	−		0.96	2.9	11.6	
15	52.1	±	1.4	0.22	2.1	14.2	
16	61.4	+	2.6	0.68	4.6	10.6	
平均	56.4			0.68	3.7	10.4	

* 印は日本農林規格試験

かしながらうに製品の実態を知るため，両者にＪＡＳ試験を課し比較検討した．

粒うに（表１）

水分およびアルコール分については，最高 60.4%(No. 5)，最低 41.4% (No.10)，平均 54.4%であり，ＪＡＳ並級規格に適合した．

よう度反応陽性のNo.10 および疑陽性を示した数試料につき，でんぷん含有量を測定したところ，陽性の No. は10.5%を示し，ＪＡＳ規格外と判定されるが，ＪＡＳマーク品ではない．他はすべて８%以下であった．

糖脂質は，最高が1.57mg G eq (No. 6)，最低 0.55mg G eq (No.11)，平均1.15mg G eq であった．

粗脂肪は，最高 8.9% (No.10)，最低 2.5% (No.11)，平均5.1%であった．

灰分については，原料に塩うにを使用しているので，いずれも10%以上で最高 15.9% (No. 9)，最低 10.9% (No. 5)，平均12.7%であった．

内容量は，びん詰製品についてはすべて表示量以上であったが，No. 7，No.10 (合成樹脂製容器入りのもの) は量目不足であった．

ねりうに（表２）

水分およびアルコール分は，最高63.9% (No.14)，最低 49.8% (No.13)，平均 56.4% であり，いずれも規格値に適合であった．

よう度反応は７試料が（＋）で，他の疑わしい５試料と共にでんぷん含量測定を行った結果，２試料の10.6% (No.11)，8.3% (No.12) が規格に適合しなかった．しかし共にＪＡＳマーク品ではない．

糖脂質は最高1.07mg G eq(No. 4)，最低0.22mg G eq (No.15)，平均 0.68mg G eqであり，No.10，No.11についても数値が低いように思われる．ちなみに No.15は，表１のNo.11 と同一業者の製品であった．

粗脂肪は，最高 5.9% (No. 9)，最低 2.1%(No.15)，平均 3.7% であった．

灰分は，最高 14.2% (No.15)，最低 6.5%(No.12)，平均10.4%であった．

内容量については，No.15 (びん詰)，No. 6，No. 7 (合成樹脂製容器) が表示量以下であった．

うに和えもの（表 3_1，表 3_2）

和えもの製品について，その塩うに分のみの品質判定を行うことは，はなはだ困難なことである．たとえば，数の子うにのように，塩うに分と数の子との分離が不可能なものや，いかうになどはいかより水分が放出され，塩うに分組成に変化をきたすからである．しかし他に方法がないため前記の検査法を適用し，その結果から綜合的判断を下すことによりある程度の品質推測は可能である．

表 3_1 の No. 1～No. 8 はくらげうにの塩うに分，No. 9～No.13 はいかうに，さざえうになどの塩うに分，表 3_2 はすべて数の子うにである．

表 3_1　うに和えもの（塩うに分）の成分測定値

No.	水分およびアルコール分* %	よう度反応*	でんぷん* %	糖脂質 mg G eq	粗脂肪 %	灰分 %	備考
1	52.0	−	1.3	0.45	3.9	9.3	くらげうに
2	64.9	−		0.50	3.3	7.7	〃
3	57.7	−		0.52	1.9	9.1	〃
4	62.4	±	0.9	0.43	1.6	10.7	〃
5	58.4	+	1.3	0.31	2.6	5.9	〃
6	58.5	−		0.21	2.1	3.2	〃
7	63.1	±	0.1	0.10	1.6	9.9	〃
8	60.2	+	1.7	0.19	2.9	7.8	〃
9	69.5	+	4.8	0.32	2.9	5.1	
10	63.6	−			3.8		
11	60.8	−		0.48	3.1	7.7	
12	52.0	−		0.26	1.9	7.5	
13	60.4	−		0.48	3.4	7.4	
平均	60.3			0.35	2.6	7.6	

表 3_2　数の子うにの成分測定値

1	47.9	+	0.8		3.2	10.9	
2	59.7	±	0.8		6.1	7.5	
3	54.8	−			2.6	7.8	
4	47.1	±	0.8		3.2	9.5	
5	58.9	±	0.6		2.5	7.7	
6	58.8	±	0.4		2.9	7.2	
7	48.3	±	1.4		2.9	11.6	
8	60.4	+	1.2		3.3	5.6	
平均	54.5				3.3	8.5	

* 印は日本農林規格試験

水分およびアルコール分は（表 3_1）ではほとんどが60%前後であった．これは前述のように，いか，くらげなどの水分が塩うに分に移行したものと考えられる．最高は 69.5%（No. 9）で外観上からも粗悪品の様相を呈していた．またでんぷん含有量も，この試料が最高の 4.8%であり，原料には表 2，No.12 のねりうにが使用されていることが調査により判明した．水分の平均は60.3%で，粒うに，ねりうにに比較し 4～6%多い．

糖脂質含量はNo. 6，No. 7，No. 8 が他に比較して低く，平均は0.35mg G eq であった．

粗脂肪の平均は2.6%であった．

灰分は最高 10.7%（No. 4），最低 3.2%（No. 6），平均 7.6%であった．粒うに，ねりうにのそれと比較すると，1/2または1/3に当る．これは食味の上から食塩含量の少いことを示し，また保存性は，食塩に代って保存料，殺菌料の添加が表示されていた．

内容量は No. 6，No. 8，No.12（合成樹脂容器入り）が量目不足であった．

数の子うに（表 3_2）については，内容量不足が 1 検体（合成樹脂容器入り）あり，水分アルコール分の平均は54.5%，粗脂肪は3.3%，灰分8.5%であった．

和えものの塩うに分の検査結果は，水分およびアルコール分が，粒うにあるいはねりうによりやや多く，糖脂質，粗脂肪，灰分が少いことであった．

結　論

1）ＪＡＳマークをつけた製品については各検査項目いずれにも不適合はなく，品質が保証されていることを示している．

2）ＪＡＳマークをつけていない粒うに，ねりうにについて，ＪＡＳによる判定を試みた結果，でんぷん含有量が多すぎるものが 3/25，内容量不足が 1/25 あった．

3）糖脂質平均含有量について，粒うに 1.15mg G eq，ねりうに 0.68mg G eq，和えものの塩うに分について 0.35mg G eq であり，それらの比 1：0.59：0.31をえた．これらをただちにうに成分比とするのは軽率であるが，何らかの差を示すものであろう．脂肪含有量比は 1：

0.72：0.51をえており，ＪＡＳ試験では3者に差は現われなかったが，糖脂質に格段の差が現われている．

4）糖脂質含有量とうに食品の品質との関係については，さらに検討を要するところである．

5）表1のNo.1～No.3，表2のNo.1，No.2の5検体には特級マークがあり，ロット番号は異るが同一業者の製品であり，その成分組成は安定した配合と見うけられる．また表1のNo.4，No.5，表2のNo.3～No.5の5検体は特級マークはないが，成分内容はいずれも安定しており，両者とも生産管理のゆきとどいていることを示唆している．

謝辞 本実験にあたって御協力いただいた食品監視課桑田辰男調整係長，大野靖朗主事ならびに食品機動監視班の方々に深謝致します．

文　献

1) 日本農林規格協会：ＪＡＳ，水産物びん詰の日本農林規格（昭和45年7月15日農林省告示第973号）
2) Isono, Y. and Nagai, Y.: *Japan J. Exp. Med.*, 36, 461, 1966
3) Isono, Y.: *Ibid*, 37, 87, 1967
4) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: *J. Biol chem.*, 226, 497, 1957
5) Roe, J. H.: *J. Biol. chem*, 212, 335, 1955

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 241—245, 1975

日本食品標準成分値の検討（I）

アイスクリーム類および即席めん類の各栄養素成分値について

友成正臣* 塚越ヤス* 古内正孝*
武士俣邦雄* 可児利朗*

Investigation on the Standard Tables of Food Composition in Japan（I）

The Nutritive Composition of Ice Cream and Sokuseki-Men

MASAOMI TOMONARI*, YASU TSUKAGOSHI*, MASATAKA FURUUCHI*,
KUNIO BUSHIMATA* and TOSHIRO KANI*

はじめに

わが国の経済成長に伴い食生活にも改変が起り，また一方食品の加工・貯蔵技術の進歩・加工原料の変化は，加工食品の種類・品質に大きな影響を与えている．

このようなことから科学技術庁は，国民栄養調査あるいは国民の食生活の指導上の基礎データである現行三訂日本食品標準成分表[1]を改訂する仕事を始めた．その作業への協力および都民の栄養指導の基礎資料を得るため，関心の高いアイスクリーム類および即席めん類について栄養素成分値の測定を行いあわせて食生活上および栄養学的に若干の検討を加えた．

供試試料および分析方法

供試試料は表1のとおりである．これらを店舗より購入し，その2～3容器内容および2～3包装分について栄養素の分析を行なった．分析試料は可食部分全部とし，たとえばアイスモナカの場合には皮の部分を，マロン入りのものはこれを内容物によく混ぜ合せてペースト状とし試料にした．なお種子(イチゴ)・小豆の皮も分析試料に入れた．即席中華めんの場合，めんおよび調味料（液状の場合も粉末の場合も）・具類を混合粉砕し分析試料とした．

水分：常圧加熱乾燥法に従った．たんぱく質：ケルダール法により，総窒素を求め，たんぱく換算係数として，アイスクリーム類は6.38，その他は6.25を用いた．

脂質：アイスクリーム類はリヨーゼ・ゴットリーブ法，その他はソックスレー法（エーテル抽出）に従った．

炭水化物：差引き法による．

灰分：熱灼残査．

カルシウム：灰化後，ＥＤＴＡ法による．

リン：灰化後，モリブデンブルー比色法による．

ナトリウム：灰化後，炎光分析による．

カリウム：灰化後，炎光分析による．

ビタミンB_1：チオクロム法による．

ビタミンB_2：ルミフラビン螢光法による．

熱量：アイスクリーム類は，ＦＡＯのカロリー換算係数．その他は Atwater のカロリー換算係数を採用した．

%，mg%の示し方：アイスクリーム類は内容物100ｇ中の成分重量．その他はめんおよび添付調味料など可食部100ｇ中の各成分重量．

平均値，標準偏差，最大値，最小値の求め方：各測定項目について供試品別の平均値を求め，つぎに，危険率１%以上におけるスミルノフの棄却検定に基づいて棄却測定値を棄却し，再び各測定項目ごとに求めた．

結果および考察

アイスクリームの栄養成分値を表(A)に示した．これらは高脂肪で脂肪量平均11.6%含有し熱量は208Cal であった．アイスミルクの成分値を表(B)に示した．これらの多くは乳脂肪および植物性脂肪が含まれていることを表示しており，脂肪量平均6.2%・熱量174Cal であった．ラクトアイスのうち脂肪分の多いもの（乳固形分が多くかつ植物性脂肪10%以上を含む表示）の栄養成分値を表

* 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 供 試 試 料 商 品 名

アイスクリーム	アイスミルク	ラクトアイス	即席中華めん	スナックめん	即席ワンタン	即席和風めん
雪印バニラ	雪印バニラブルー	雪印マーブルチョコ	出前一丁	日清カップヌードル	マルチャンワンタン	天ぷらそば
雪印カスタード	雪印三色果汁10%	雪印メロリー	日清焼そば	カレーヌードル	マルチャンカップ入りホットワンタン	
明治バニラ	雪印フルーツアイス	雪印小倉	サッポロ一番塩らーめん	シュリンプヌードル		
明治デキシーバニラ	明治もなか	ロッテイタリアーノ	サッポロ一番みそラーメン	カップヌードル（天そば）		
森永デラックスバニラ	森永バニラ	ロッテデラクシー	サッポロ一番しょうゆ味			
森永バニラエイト	名糖コーヒー	明治アンシエラ	マルチャン冷しラーメン			
不二家フレンチバニラ	グリコアーモンドカスタード	不二家小倉ラクト	出前一丁みそラーメン			
中村屋バニラ		富士乳業チェック	明星チャルメラ			
レディボーデン		森永ストロベリー	明星劉昌麺			
名糖ハイブロ		森永デリカ	明星鉄板焼そば			
ヒロタのナポリタン		森永デザートパックトリオ	サッポロ一番ソース焼そば			
ヒロタのマロン		カネボウバニラアイス	サッポロ一番えぞ味ラーメン			
ヒロタのバニラ		カネボウマロン	マルチャンリャンタンメン			
		三光乳業ローンフレアソフト	エースコックワンタンメン			
		名糖バニラ	ハウスシャンメン塩味			
		グリコスカイ	ハウスシャンメンしょうゆ味			
			丸泰ラーメン			
			もやしラーメン			
			カレーうどん			
			うめしおラーメン			

(C-1)に示した．これらの脂肪分について乳脂肪分と植物性脂肪分の分離測定は行っていないが，栄養成分的にさきのアイスクリームとほぼ類似した成分を示し，脂質11.4%・熱量 208Cal であった．ラクトアイスのうち前記脂肪分の多いものを除いたものの栄養成分値を表(C-2）に示した．これらのものは前者などに比べて成分値は，脂質・たんぱく質・カルシウム・リンならびに熱量のいずれも劣っており，また，固形分量の少ないことが示されている．ラクトアイスのうち小倉アイスは脂肪量は少ないが（1.5%）炭水化物量（37.6%）が多いため熱量は比較的高い177Cal を示した．

たんぱく質について，その含有量が低いもの（3%以下）はアイスクリームおよびアイスミルクのうちにもたまにみられ，ラクトアイスには2%以下のものもある．乳固形分が少ない（3～4%以下）ことが表示されている品のたんぱく質は少ない．

無機質含有量は，日本産原料乳の分析結果[2]から，Ca：P：Na：K比はおおよそ 1.2：1：0.7：1.6 が示され，また国際酪農連盟が粉乳のこれらの測定法を示した案の無機塩類標準液[3] についてもおおよそこのような値（ただし Na については0.7より低い）が示されており，検査試料の Ca/P 比は多くのものが1.2と格段に離れていない．ただこの比が1に近いものが（P値が高いものにNa 値が高い142mg%174mg%170mg%）あった．

ビタミンB_1は，各種とも低い値（0.03mg%～0.05mg%）であったが，ビタミン B_2 は割合高い値（0.08mg%～0.19mg%)を示し，ビタミンB_2の給源にもなり得る．アイスミルクおよびラクトアイスに異常に高い値（0.58mg%0.30mg%）を示したものがあったが，原料に使用されているナッツ類に起因していると推定される．

表(A)　アイスクリーム……13例

	水分 %	たんぱく質 %	脂質 %	炭水化物 %	灰分 %	カルシウム mg%	リン mg%	ナトリウム mg%	カリウム mg%	ビタミンB_1 mg%	ビタミンB_2 mg%	熱量 Cal
平均値	61.9	3.5	11.6	22.5	0.7	129	107	79	136	0.04	0.15	208
標準偏差	2.90	0.41	1.85	1.94	0.13	13.81	18.59	28.33	15.9	0.01	0.02	17.8
最大値	68.0	4.4	14.8	26.2	0.9	160	153	142	169	0.06	0.17	240
最小値	56.9	2.8	8.7	19.6	0.5	110	85	24	104	0.03	0.12	181
棄却測定値	—	5.6	—	16.9	1.1	—	166	174	—	—	0.20	—

表(B)　アイスミルク……7例

	水分 %	たんぱく質 %	脂質 %	炭水化物 %	灰分 %	カルシウム mg%	リン mg%	ナトリウム mg%	カリウム mg%	ビタミンB_1 mg%	ビタミンB_2 mg%	熱量 Cal
平均値	64.7	3.4	6.2	24.6	0.7	134	104	70	133	0.04	0.14	174
標準偏差	1.09	0.30	0.50	1.06	0.10	14.07	12.11	12.31	11.4	0.01	0.04	9.63
最大値	65.9	3.7	7.1	25.8	0.9	150	128	85	150	0.04	0.21	190
最小値	63.1	2.9	5.7	23.1	0.6	115	86	56	111	0.02	0.09	164
棄却測定値	59.0	—	8.5	30.8	—	—	—	170	—	0.06	0.58	—

表(C-1）　ラクトアイス（脂肪分10%以上のもの）……4例

	水分 %	たんぱく質 %	脂質 %	炭水化物 %	灰分 %	カルシウム mg%	リン mg%	ナトリウム mg%	カリウム mg%	ビタミンB_1 mg%	ビタミンB_2 mg%	熱量 Cal
平均値	61.5	4.0	11.4	22.3	0.8	144	113	84	148	0.05	0.19	208
標準偏差	0.47	0.26	1.68	1.47	0.07	7.4	4.2	17.2	6.9	0.01	0.07	8.6
最大値	61.9	4.3	14.3	23.4	0.9	155	117	95	156	0.06	0.30	222
最小値	60.7	3.6	10.1	19.8	0.7	135	107	54	137	0.04	0.10	200
棄却測定値	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表(C-2) ラクトアイス……12例

	水分 %	たんぱく質 %	脂質 %	炭水化物 %	灰分 %	カルシウム mg%	リン mg%	ナトリウム mg%	カリウム mg%	ビタミンB_1 mg%	ビタミンB_2 mg%	熱量 Cal
平均値	64.9	2.8	4.1	26.7	0.6	90	75	73	108	0.03	0.08	159
標準偏差	3.94	0.69	2.05	2.43	0.10	19.52	21.10	31.91	21.5	0.01	0.02	19.61
最大値	71.5	3.7	7.1	31.3	0.8	125	107	120	137	0.04	0.11	188
最小値	57.3	1.6	1.5	22.7	0.4	65	46	16	72	0.02	0.04	128
棄却測定値	—	—	—	37.6	0.3	—	—	—	—	—	0.17	—

表2 各食品の一包装重量

	即席中華めん	スナックめん	即席ワンタン	即席和風めん
平均値 g	105.4	85.0	50.4	105.0
標準偏差 g	10.1	4.3		

表(D), (E), (F), (G)は，即席めん類それぞれの一包装のめんおよび調味料など100 g当りの各栄養素成分の百分率であって，これらから一包装を一食分とみなした場合の栄養素摂取量を推測する必要がある．つぎに掲げる表2は，それぞれの食品の一包装重量を示すものである．

従って，おおよその見当として即席中華めん・即席和風めんは1.05を，スナックめんは0.85，即席ワンタンは0.5を乗じた値が一食分の栄養摂取量となる．

即席中華めんおよびスナックめんについて一食当りの摂取栄養素量を検討すると，成人を対象としてこれだけでは不満足である．たんぱく質として動物性たんぱく質を，ビタミン源として着色野菜を，また，労働量の多い人に対してはさらに脂肪分などによる熱量増をはからねばならない．また，一般にこれを間食として用いた場合には熱量摂取量が多くなろう．幼児・低学年児童を対象にした場合にはたんぱく質量は足りるが，植物性たんぱく質が主なことに注意しなければならない．そのほか熱量が過剰になる心配もある．とくに間食として用いた場合は注意を要する．成人病を心配する人達にとっては食塩量が多いものが多く，一食当りNaCl 約5.5 gが摂取される．

即席中華めんは，主として「油処理α化めん・調味料別添」の形態で一食分として包装され，めん重量平均91 gでこのほかは調味料として粉末スープ・液体ソース・油脂・香辛料および具などであった．スナックめんは，「油処理α化めん・調味料および具添加」の形態で一食分として一カップに入れたものであった．

両者の分析値上の大きな相違点として，まず，水分含有量の差があるが，これは即席中華めんに添加された液状の調味料によるものであって，粉末調味料を添付したものの水分はスナックめんと大差はない．ついで，たんぱく質の差は，スナックめんには具として乾燥えびが加えられており，これがたんぱく質値を高めている．また，灰分・ナトリウム値は即席中華めんのほうが低いが，これは添付調味料によるものであって液体ソースを用いた焼そば風のものがナトリウム値が低いためである．即席ワンタンは，分析値の上からとくに目につくことは，脂質およびナトリウム値が高いことである．乾物換算した場合，前者は1.7倍（対即席中華めんおよびスナックめん），後者は1.35倍（対スナックめん）である．ワンタンの特質からいって脂質の多いことは当然であり，ナトリウム（主として食塩分）の多いことは，スナックめんよりも食用時に加える熱湯量が多いため塩味としては同じになるのだろう．即席和風めんは，「蒸気処理α化めん・調味料別添」の形態であり，めん85 gにえび天および粉末スープが添付されていた．たんぱく質およびカルシウムの高いことは添付の干えびが起因していると思われる．このほか，脂質が前者らに比べて低いことは熱量が低い値となり，また，リン含有量は多くこれはめんがそばであるためである．ビタミンB_1値が高く（0.24mg%）給源となると考えられる．

即席中華めんに例外的な栄養素成分値を示す製品が数点あった．それはめんα化処理工程で油脂を使用せずに水蒸気を使用した場合のものであり，脂質含有量が極めて低く，20例の平均値は19.2%（乾物当り）に対しこれらの製品は1.3%および3.5%（いずれも乾物当り）であった．このような品は外見的に区別しうる．なお，ナトリウム含有量が異常に低いものがあり，このものは平均値2340mg%（乾物当り）に対しその$^1/_2$の1320mg%（乾物当り）であり，きわめてうす味のものであった．この外見は区別しにくいが添加調味料が液体ソースであった．また，分析値の上で異常な値を示す例があり，これはめん90 gに生もやし25 gおよびみそ味スープ9 gを添加したものであって，分析試料の調製時にこれらをす

表(D) 即席中華めん……20例

	水分 %	たんぱく質 %	脂質 %	炭水化物 %	灰分 %	カルシウム %	リン mg%	ナトリウム mg%	ビタミンB_1 mg%	ビタミンB_2 mg%	熱量 Cal
平均値	7.6	10.1	17.7	60.1	5.7	63	104	2157	0.08	0.02	436
標準偏差	3.0	0.4	2.1	2.3	1.1	23.9	7.0	408.61	0.02	0.01	21.4
最大値	15.8	10.6	20.8	65.1	7.5	145	118	2945	0.14	0.05	464
最小値	3.8	9.2	14.5	56.4	3.2	34	90	1402	0.06	0.01	370
棄却	21.9	12.8	1.1	46.8	2.9	200	130	1062	0.36	0.50	323
測定値			3.1	68.5			133		0.40		340

表(E) スナックめん……4例

	水分 %	たんぱく質 %	脂質 %	炭水化物 %	灰分 %	カルシウム mg%	リン mg%	ナトリウム mg%	ビタミンB_1 mg%	ビタミンB_2 mg%	熱量 Cal
平均値	4.5	12.7	18.0	57.7	7.2	78	130	2770	0.10	0.04	443
標準偏差	0.6	0.9	2.9	2.7	0.6	32.2	40.0	252.3	0.02	0.01	14.8
最大値	5.1	14.3	22.9	60.3	8.1	130	199	3148	0.12	0.05	468
最小値	3.9	12.0	15.4	53.4	6.7	44	104	2480	0.08	0.03	429
棄却											
測定値	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表(F) 即席ワンタン……2例

	水分 %	たんぱく質 %	脂質 %	炭水化物 %	灰分 %	カルシウム mg%	リン mg%	ナトリウム mg%	ビタミンB_1 mg%	ビタミンB_2 mg%	熱量 Cal
No. 1	6.4	10.5	29.4	42.6	11.1	68	101	3859	0.10	0.03	477
No. 2	6.8	10.0	30.8	43.2	9.2	100	44	3582	0.12	0.03	490
平均値	6.6	10.3	30.1	42.9	10.2	84	73	3721	0.11	0.03	484

表(G) 即席和風めん……1例

水分 %	たんぱく質 %	脂質 %	炭水化物 %	灰分 %	カルシウム mg%	リン mg%	ナトリウム mg%	ビタミンB_1 mg%	ビタミンB_2 mg%	熱量 Cal
8.4	12.3	5.6	66.8	6.9	103	198	2630	0.24	0.04	367

べて混合したために水分が異常に多くなり20%を示す結果となった．しかし乾物100g当りに換算すると特別異常な成分値を示すものではない．

あとがき

アイスクリーム類は，その栄養素成分値から適当な嗜好食品といえる．アイスクリームに，表示に適合しないものが2例あった．その内容は，乳固形分22%に対したんぱく質量より求めた乳固形分19.6%，乳脂肪16%に対し総脂質14.8%であった．

即席めん類は，炭水化物・食塩・熱量の高い食品といえるが栄養のバランスを考え，肉類・卵・野菜などの添加や牛乳を補う配慮が望ましい．また，幼児・学童・肥満者・成人病を心配する人・老人などは，食生活におけるこれらの食品の位置づけを考えて摂取する必要がある．

謝辞　本調査にご協力と助言をいただいた東京都衛生局栄養課の職員各位に深謝いたします．

文　献

1) 科学技術庁資源調査会編：三訂日本食品標準成分表，10版
2) 可児利朗：食衛誌，12(2)，116，1971
3) Proposed Draft IDF Standard Dried Milk : *Determination of sodium, potasium and calcium content*, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 246—251, 1975

ポルフィリン代謝系成分に関する調査およびその生化学的研究 (第Ⅰ報)

δ-アミノレブリン酸の尿中排泄の実態

小笠原　公*　武士俣　邦　雄*　霜　田　さと子*

Investigations and Biochemical Studies on the Porphyrin Metabolites (Ⅰ)
The Actual State of Urinary δ-Aminolevulinic Acid Excretion in Tokyoites

KIMI OGASAWARA*, KUNIO BUSHIMATA* and SATOKO SHIMODA*

はじめに

重金属，化学物質の影響または疾病によってヘムを合成するポルフィリン代謝系が乱されると，中間代謝成分のデルタ・アミノレブリン酸（以下 δ-ＡＬＡと略す），ポルホビリノーゲン，コプロポルフィリン等が異常に尿中排泄する.[1-5]そのためこれらの成分は鉛害をスクリーニングする指標として測定される.

環境汚染に基因する公害の一つに鉛害がある．従来からガソリンにはアンチノック剤として四アルキル鉛を添加したものが使用されてきた．昭和42年４月に鉛中毒予防法，同43年４月四アルキル鉛中毒予防規則が公布され，取り扱い指導がなされてきたのであるが，一般住民に関しては昭和45年５月東京都新宿区牛込柳町住民により鉛害問題が提起されたため，鉛の大気汚染による人体影響の調査が必要となった．東京都衛生局はただちに住民の鉛害検診を行い，その結果鉛による直接障害の疑いはなかったとの発表[6]がすでになされた．以来東京都全域の住民を対象に今日も鉛害検診並びに公害検診が続けられている.

われわれは公害の人体におよぼす影響を解明する資料とするため，ポルフィリン代謝系成分に関する生化学的研究を行っている．尿中に排泄するポルフィリン代謝系成分量によって健康障害の有無をスクリーニングするには，住民の尿中δ-ＡＬＡ量はいかなる水準にあるかの現状を把握することが保健対策上重要であると思考する.

そこでポルフィリン代謝系諸成分のうち，まず尿中δ-ＡＬＡにつき調査研究を進めることとし，その正常値を定め，東京都住民の居住地域ごとの δ-ＡＬＡ尿中排泄状況と季節ごとの尿中排泄差異の検討を行った．δ-ＡＬＡの尿中異常排泄は高濃度鉛暴露と関係が深いが，一般生活環境の低濃度鉛汚染では相互関係が明らかでない．早期に鉛害をスクリーニングできる関係を生じるδ-ＡＬＡの尿中異常排泄水準の解明資料とするため，尿中排泄鉛並びに血液中鉛との相互関係についても検討を行ったので報告する.

調査方法

1. 調査期間と検査対象

昭和46年５月～50年１月の約４年間を調査期間とし，都内主要道路近辺に居住する49保健所管内住民のうち，鉛害検診あるいは公害検診の受診を希望するものを対象とした．受診者のうち尿中 δ-ＡＬＡ 測定は一地区50～100名を目標に年間を通じ毎月実施した.

検査人員は年度別に46年度　男364名・女424名，47年度　男352名・女505名，48年度　男188名・女396名，49年度　男185名・女415名であり，このうちに20歳未満と80歳代のものを少数含むが，おもに20歳代～70歳代の男1,089名・女1,740名の計2,829名である.

2. 検査方法

検診実施地区ごとに午後２時前後の一時尿を採取し，同日のうちにつぎに記す種目の試験検査を行った.

ウロビリノーゲン，糖およびタンパク定性試験：常法[7]による.

尿中 δ-ＡＬＡ測定：和田らの方法[8]の改良法[9]

3. 推測統計手法について

尿中δ-ＡＬＡ値の年齢別差異，居住地域別水準差，季節の影響さらには疾病との関係を吟味するための比較基

* 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

準となる値を必要とする．そのため尿中 δ-ＡＬＡ正常値決定についてのデータ処理は，すべての測定値からあらかじめ尿定性試験による異常陽性のものを除いたのち性別にＦ分布にもとづいた危険率１％水準での棄却限界値を求め，[10] この値以上のデータを含まなくなるまで演算を行い，異常データ削除をした信頼限界範囲のもののみについて平均値を求め，これを正常値とした．年齢別の尿中δ-ＡＬＡ正常値決定も同様の統計手法によった．しかし地域別並びに季節別の尿中δ-ＡＬＡ値水準の算定についてはすべてのデータを統計処理対象とした．

検査成績および考察

1. 尿中 δ-ＡＬＡの正常値について

尿中 δ-ＡＬＡ の正常値は表１に示すごとく男1.99±0.82mg/l，女1.76±0.76mg/l であって性差があり，男が高い値である．

尿中 δ-ＡＬＡ 測定は昭和46年５月～50年１月に男1,089名・女1,740名について行ったのであるが，全例について尿定性試験を行い，検査総数から男314例（28.8％)・女360例（20.7％）の異常陽性者を除外した．さらに統計法に従って男８例・女26例の異常値棄却をした男767名・女1,354名につき性別に正常値を定めたものである．また調査期間を単年度ごととせず約４年間の一括調査としたことについては，年度ごとの検査数によって尿中 δ-ＡＬＡ 値の年齢別，居住地域別あるいは季節別排泄差異を考察すると，対象例数が少いことで正確性を欠くおそれがあるためである．

すべての検査対象者の尿中 δ-ＡＬＡ 単純平均値は男2.19mg/l・女1.94mg/l であった．この値は尿定性試験による異常陽性のものを含み，さきに求めた正常値との差の検定により有意差が認められるので，尿中δ-ＡＬＡ値と尿ウロビリノーゲン，糖，タンパク定性試験から推察する有病性との関係を検討中である．

東京都地域住民の尿中 δ-ＡＬＡ 値は他府県住民のそれと比較していかなる水準であろうか．地域住民についての報告は散見されるが，そのいずれも対象例数が少いこと，対象集団が特殊であること，またその平均値算定方法が不明確であることのために比較するには問題がある．従って二三の報告例について比較してみる．東京都地域住民の検査対象者全例から得られた尿中 δ-ALA 単純平均値並びに統計処理によって定めた正常値は，1965年に報告[11]された大阪市民232名の平均値1.15mg/l より高値であり，1973年に報告[12]された名古屋市民および東海市民232名の平均値1.60～3.48mg/l，1973年に報告[13]された横浜市の小学生272名の平均値2.37±1.07mg/l よりもやや低値であるように思われる．

尿中 δ-ＡＬＡ は年齢の相違による排泄量に差異があるか否かの検討をした．10歳間隔で表現した各年齢層ごとに尿定性試験異常陽性者と，性別に異常値棄却を行い，表１に示すごとく年齢層ごとの正常値を算定した．性別の正常値と各年齢層ごとの尿中 δ-ＡＬＡ 値との危険率１％における差の検定を行ったところ，男の40歳代～50歳代と女の50歳代は差が認められず，正常値に近似した値であった．しかし男女ともに20歳代～30歳代は有意に差があり高値であった．男の60歳以上と女の50歳代～60歳代では有意に低い値を示し，性差および年齢差がみられた．20歳未満の若年層は例数が少いために統計的

表１　性別および年齢別の尿中排泄 δ-アミノレブリン酸正常値

年　齢	性別	検査数	尿定性検査異常陽性数	異常値棄却数	正　常　値 (mg/l)	*,**に対する有意差の検定
-19	男	22	6	0	2.29±1.33	
	女	4	0	0	2.63±0.59	P＜0.05
20-	男	136	51	1	2.26±0.91	P＜0.05
	女	138	37	2	2.13±0.81	P＜0.001
30-	男	188	47	0	2.28±0.79	P＜0.001
	女	449	91	3	1.95±0.81	P＜0.001
40-	男	248	63	1	1.96±0.80	
	女	458	89	8	1.71±0.73	
50-	男	197	45	2	1.97±0.84	
	女	403	66	8	1.62±0.71	P＜0.01
60-	男	214	73	3	1.73±0.75	P＜0.001
	女	238	64	5	1.58±0.67	P＜0.01
70-	男	84	29	1	1.65±0.66	P＜0.001
	女	50	13	0	1.66±0.67	
全例	男	1089	314	8	1.99±0.82*	
	女	1740	360	26	1.76±0.76**	

有意性が認められなかったが，男女ともに60歳代の値より高値であった．

2. 居住地域ごとの住民尿中 δ-ALA量

居住地域ごとの住民尿中δ-ALA値の差異を検討することは，大気汚染等の影響の有無を考察するのに重要である．尿中δ-ALA測定は東京都の49保健所管内に居住する男1,089名・女1,740名について行ったのであるが，地域別観察を各保健所管区ごととせず，広場と青空の東京構想による10地域区分[14]とした．

尿中δ-ALAを測定した総数のうちから統計法に従ってあらかじめ異常値として棄却したデータが男女おのおの2%(男22例・女35例)あった．このなかに労基法規則の鉛中毒認定基準値[15] 6 mg/l を超えるものが2例，東京都の公害検診再検査値 5 mg/l を超すものが5例あった．これらについては後日再検した結果いずれも東京都の定める精密検査値以下の値であった．

居住地域ごとの住民尿中δ-ALA測定結果を図1に示す．男女それぞれの正常値と各地域住民尿中δ-ALA平均値との差の検定を行ったところ，男において城北地域が危険率5%，城東地域が危険率1%，都心・下町・城南地域が危険率0.1%で有意差があり高値であった．女では都心地域が危険率5%，城東・下町・城南地域が危険率0.1%以下で有意差があり高値であった．他の地域については男において多摩郊外Ⅰ地域と山手地域，女では多摩郊外Ⅱ地域が危険率0.1%以下で有意に低値を示した以外は正常値に近似した値であった．このように居住地域によってδ-ALAの尿中排泄水準に差異がみられたことは，鉛やその他の化学物質による大気汚染の影響があったためか，被検者の有病性に基因するのか，また年齢構成あるいは検査実施季節の差異などの関連が考えられる．

まず鉛の人体汚染による影響の吟味として，尿中排泄鉛および血液中鉛と尿中δ-ALAの量的相互関係の項で述べるごとく，東京都住民の尿中排泄鉛量および血液中鉛量ともに比較的低値であり，鉛中毒を現わすほどの危険量ではなかった．これらの鉛量が低レベルであるときの尿中δ-ALA量との相互関係を吟味してみると，鉛の量的区分に従ったδ-ALAの尿中排泄増加関係が成立していない．このことから考察して，居住地域により尿中δ-ALA値に差異があるのは，大気中鉛の人体汚染のためと考えるよりむしろほかの大気汚染物質の影響かあるいは被検者の有病性との関連があるように思われる．

つぎに大気汚染程度と尿中排泄δ-ALA量との関連について考察するに，東京都大気汚染観測データ[16]によると，尿中δ-ALA量が正常値に比較して高水準であった地域は，それが低水準であった地域よりも空中降下ばいじん，亜硫酸ガス等による大気汚染度が強い．従って複合大気汚染物質の人体影響として，δ-ALA等ポルフィリン代謝系成分の尿中排泄とは関係があると考えたい．昭和49年11月末公害健康被害補償法にもとづいて江東，千代田，港，品川，大田，文京，新宿および渋谷の8区は大気汚染地域に指定された区域でもある．住民保健のために居住地域ごとの住民の尿中排泄δ-ALA値の水準を把握しておくことが重要であり，今後大気汚染等の生活環境改善の評価を行う資料としても価値あるものと信ずる．

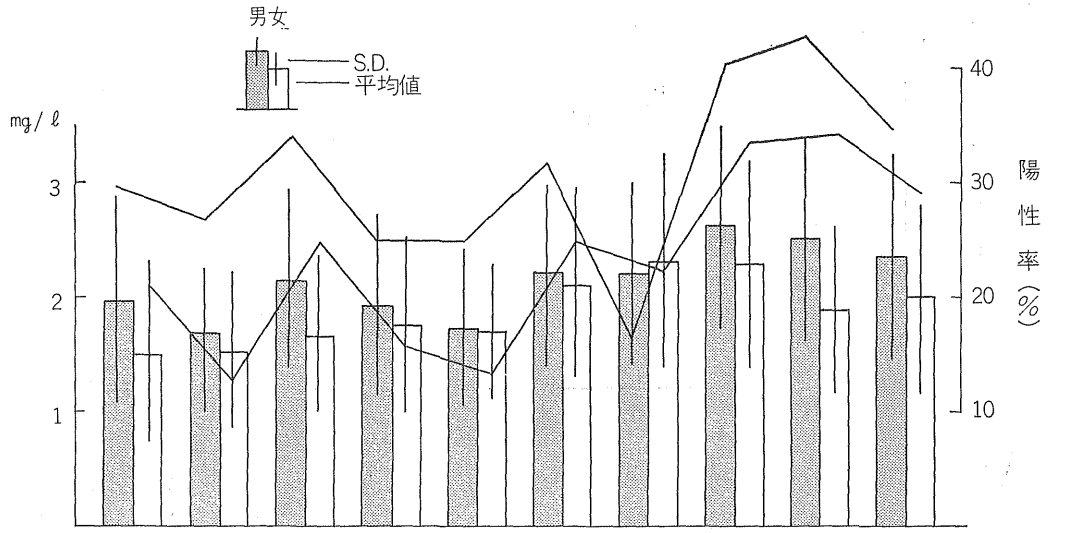
前項で尿中排泄δ-ALA量は高齢者よりも若年層が高値であることを述べた．地域ごとに尿中排泄δ-ALA値に差異があったことの吟味として，被検者の地域別年齢構成も考慮する必要がある．尿中排泄δ-ALA量が高値であった地域の被検者平均年齢は，それが低値であった地域の被検者平均年齢と比べて概して差がなかった．

地域別に尿中排泄δ-ALA量に差があったことの吟味として，検査を行った季節の関係も考慮する必要がある．このことについては次項に述べるが，δ-ALAは冬季より夏季に尿中排泄量が多い．そこで各地域についての検査月をしらべてみると，尿中排泄δ-ALA量が高値であった地域のうち城東，下町，都心地域の検査が夏季に偏っているが，城北および城南地域は夏冬ほぼ同数の検査であった．しかし尿中排泄δ-ALA量が低値であった多摩郊外ⅠおよびⅡ地域の検査は夏季に行ったものである．したがって単に季節差のみで地域による差異を生じたとは考えられない．

被検者の有病性を推測する尿定性試験成績については，昭和46年5月～47年3月の約1年間の結果を報告[17]したが，保健所管区ごとにみて千住，向島，中央，赤坂および牛込は尿ウロビリノーゲンの陽性率が高率であった．尿定性試験検査はその後も継続しているが，尿ウロビリノーゲン，糖，タンパクを含めた異常陽性率を地域ごとに検討してみると，男女とも多摩近郊，城北，都心，下町および城南地域が高率であった．すなわちδ-ALA尿中排泄水準が高い地域が尿定性試験による3成分の異常陽性率が高く，有病性との関係が深い結果であった．複合大気汚染の人体影響があったとして，ポルフィリン代謝系成分の尿中排泄増加と機能障害を推測する尿定性試験を行った成分の異常陽性との関連については詳細に検討する必要がある．

3. 季節によるδ-ALA尿中排泄差異

尿は生理的に濃縮や希釈を生ずるので，一時尿を検査材料とする場合δ-ALAは季節により尿中排泄量に差異



地域	多摩郊外II	多摩郊外I	多摩近郊	城西	山手	城北	城東	下町	都心	城南
〔検査数〕 男	126	56	62	150	140	105	130	141	51	106
女	154	65	139	417	233	141	160	144	93	159

図1　居住地域ごとの尿中排泄 δ-アミノレブリン酸量と尿定性検査異常陽性率の関係

があるか否かの検討をする必要がある．そこで尿中δ-ＡＬＡを測定した全例について検査した月ごとに区分し，性別に危険率１％水準における異常値の棄却を行った信頼範囲のもののみについて，月ごとのδ-ＡＬＡ尿中排泄レベルを図２に示す．

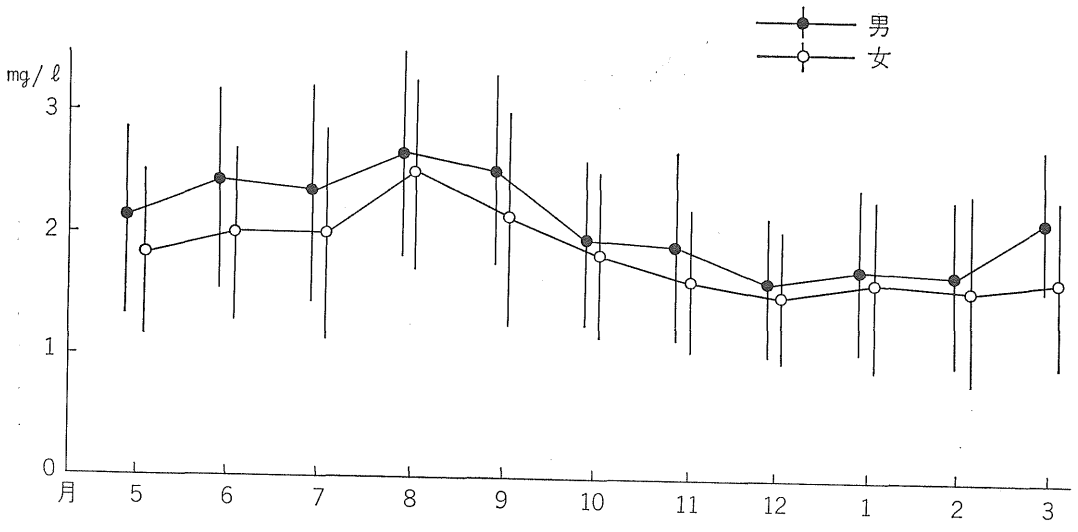
性別の尿中δ-ＡＬＡ正常値に対し，各月の尿中排泄レベルとの差の検定を行ったところ，男女とも６月，７月，８月および９月は危険率0.1% で有意に差があり，夏期は高値であった．10月と11月は正常値に近似した値であるが，１月，２月，３月，５月と12月は危険率0.1% で有意差があり，冬期は低値であった．すなわちδ-ＡＬＡの尿中排泄量は季節による差異があり，男女ともにそれが最も高値であった８月と最も低値であった12月の値の差は１mg/ℓ 程度であった．

δ-ＡＬＡの尿中排泄増加は大気汚染とも関係があるので，尿中δ-ＡＬＡを測定することによって大気汚染等生活環境改善の評価ができる可能性について前述したのであるが，δ-ＡＬＡの尿中排泄量は季節によって差異があるので，地区的に行う検診を同じ季節に実施する経年観察が望ましい．

4.　尿中排泄鉛量並びに血液中鉛量と尿中δ-ＡＬＡ量の関係

高濃度鉛汚染が考えられる鉛作業関係者と異なる通常の環境で生活する一般住民について，鉛汚染による健康障害の有無をしらべるため尿中排泄鉛量，血液中鉛量と尿中δ-ＡＬＡ量を測定した．検査対象は尿中排泄鉛量と尿中δ-ＡＬＡ量の測定について東京都内20保健所管内に居住する18歳以上の男286名・女400名，血液中鉛量と尿中δ-ＡＬＡ量測定の対象者は36保健所管内に居住する男515名・女779名である．調査した期間は昭和46年９月～48年２月で，鉛量の測定は当所環境衛生研究科が行ったものである．

東京都住民の尿中排泄鉛量の平均値は男 6.5μg/ℓ・女 5.9μg/ℓ であり，危険率１％水準における統計的棄却限界上限値は男13.3μg/ℓ・女 13.1μg/ℓ であった．血液中鉛量の平均値は男 10.8μg/100ｇ・女 7.9μg/100ｇ であ



〔検査数〕	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
男	98	110	208	60	142	108	88	44	78	116	18
女	144	211	262	68	280	313	170	52	67	107	40

図2　季節による尿中排泄 δ-アミノレブリン酸量の変動

り，この棄却上限値は男19.3μg/100g・女14.7μg/100gであった．これらの値は原子吸光法による鉛分析の誤差を考慮して3μg以下の値を除いて得たものであるのにもかかわらず，比較的低い水準であった．

はじめに述べたように，ポルフィリン代謝系は高濃度の鉛汚染があったとき，その乱れを生じてδ-ＡＬＡが尿中に異常に排泄されるが，低濃度鉛汚染では相互関係が明確でない．そこで尿と血液中の鉛量に従ったδ-ＡＬＡの尿中排泄増加関係が成立するか否かを吟味するため，尿および血液中鉛量を，１）すべての調査対象者から得た全例鉛群，２）危険率１％水準における異常値の棄却を行って得た平均値以上の鉛群，３）統計処理的に異常値とする棄却値以上の鉛群の３群に区分し，それぞれ尿中δ-ＡＬＡ値を対応させて相関係数を算出した．さらにこの相関係数の有意性についてＦ検定をした．

結果をまず尿について考察すると，鉛量がもっとも低い水準である全例鉛群（男233例・女286例）の相関係数は男0.2238・女0.2403であり，そのＦ検定の結果は危険率0.1％以下で有意であった．しかし鉛量が高値になる平均値以上の鉛群（男122例・女128例）の相関係数は男0.0865・女0.1043であり，棄却値以上の鉛群（男23例・女14例）の相関係数は男−0.3681・女0.1843となり，鉛量の増加とは逆に小さい係数となった．これらについてのＦ検定の結果は相関の有意性が認められなかった．[18]

つぎに血液について考察すると，全例鉛群(男503例・女735例）の相関係数は男0.0772・女0.0725，平均値以上の鉛群（男271例・女410例）の相関係数は男0.0863・女0.0204，棄却値以上の鉛群（男27名・女27名）の相関係数は男−0.1184・女0.1421を得たがいずれも非常に小さい係数であった．またそれらのＦ検定においても有意性がなかった．[19]

尿中排泄鉛量について統計的に異常値として棄却したデータが男に23例，女に14例あったが，このいずれも労基法施行規則第35条14号に定める鉛中毒認定基準値に該当する例はなかった．尿・血液鉛量と尿中δ-ＡＬＡ量の個々のデータを対応させた散布図からみた相互関係についても報告[18,19]したが，個々のデータについてみると鉛量が10μg/l以下の低値であっても，尿中δ-ＡＬＡ量が棄却限界を越える例があった．血液中鉛量についても異常値として棄却したデータが男女おのおの27例あった．しかしこのいずれも鉛中毒認定基準値以下の値であり，これらの尿中δ-ＡＬＡ値は低値であった．また尿中δ-ＡＬＡ値からみて鉛中毒認定基準値の 6 mg/l を越す例が女に１例あったが，血液中鉛量は 10μg/100g であった．

これらのことから東京都住民のように尿と血液中鉛が低値のいわゆる低濃度鉛汚染の範囲では，鉛量に応じたδ-ＡＬＡの尿中排泄関係は認められない結果であった．従って地域によって住民尿中δ-ＡＬＡ量に有意差があった理由としては，鉛汚染の影響によるものとは考えられないので，複合大気汚染の影響等につき検討する必要が

ある。

結　論

昭和46年5月～50年1月の約4年間に，東京都住民男1,089名・女1,740名について年齢，居住地域および季節ごとのδ-ＡＬＡの尿中排泄状況をしらべ，さらに尿中排泄鉛量並びに血液中鉛量との相互関係をも検討した．

1）尿中排泄 δ-ＡＬＡ正常値は男 1.99±0.82mg/l・女 1.76±0.76mg/l であり，高齢に従って低値になる．

2）尿中排泄δ-ＡＬＡ量は城北，城東，下町，都心並びに城南地域が高値であり，居住地域による差異があった．

3）尿中排泄δ-ＡＬＡ量は6月～9月が高値，冬季は低値である．

4）東京都住民の尿中排泄鉛量の平均値は男 6.5μg/l・女5.9μg/l，血液中鉛量の平均値は男10.8μg/100ｇ・女 7.9μg/100ｇであった．これらの量が低レベルでは尿中排泄 δ-ＡＬＡ量との相関は認められない．

謝辞　本研究に当りご指導をいただいた野牛　弘環境保健部長に深謝いたします．

（本研究は昭和49年度当研究所研究課題「ポルフィリン代謝系成分に関する調査およびその生化学的研究」として実施したものである．）

文　献

1）久保田重孝ほか：労働の科学，22，19，1967
2）和田　攻：内科，21，929，1968
3）原田　昭：臨床病理，18，699，1970
4）松本久男：臨床病理，19，1，1971
5）三浦　創ほか：産業医学，279，4，1972
6）東京都衛生局：公害研究資料，43，1970
7）金井　泉：臨床検査提要，20版，1961，金原出版
8）Wada, O. *et al.* : *British J. Ind.*, 26, 240, 1969
9）武士俣邦雄ほか：東京衛研年報，24，303，1972
10）農林省畜産局衛生課：家畜衛生に必要な調査・統計の知識，1970，日本獣医師会
11）Kasahara, A.: *Osaka City Medical J.*: 11, 99, 1965
12）奥谷博俊ほか：産業医学，15，5，1973
13）小林義隆ほか：日衛誌，28，95，1973
14）東京都衛生局総務部統計調査課：東京都の医療施設昭和46年医療施設調査結果報告書，3号，1972
15）労働省労働基準局長通達：労働の科学，26，54，1971
16）東京都公害局監視部：大気汚染常時測定室測定データ処理結果報告，昭和48年度　その1，その2，1974
17）小笠原　公ほか：東京衛研年報，24，311，1972
18）武士俣邦雄ほか：東京衛研年報，25，313，1974
19）武士俣邦雄ほか：東京衛研年報，25，321，1974

京東衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 252—258, 1975

ポルフィリン体の生化学的研究 (VI) 尿中排泄δ-ALA, Cp および Ug の相互関係

武士俣 邦 雄* 霜 田 さと子* 小笠原 公*

Biochemical Studies on the Porphyrins (VI) Mutual Relationship of Urinary Output δ-ALA, Cp and Ug

KUNIO BUSHIMATA*, SATOKO SHIMODA* and KIMI OGASAWARA*

A δ-aminolevulinic acid (δ-ALA) and coproporphyrin (Cp) are haem-anabolites, and of urobilinogen (Ug) is haem-catabolite. Because of the paucity of comprehensive statistical information in these components in temporary urine of human, the mutual relationship of urinary output value in Tokyoites were examined.

The results were obtained as follows:

The coefficients of correlation between δ-ALA and Cp are: $r=0.4214$ ($P<0.001$) in the men and $r=0.4696$ ($P<0.001$) in the women; and of between Ug and δ-ALA are: $r=0.4211$ ($P<0.001$) in the men and $r=0.5460$ ($P<0.001$) in the women; and of between Ug and Cp are: $r=0.4518$ ($P<0.001$) in the men and $r=0.5492$ ($P<0.001$) in the women.

The confidence of correlation coefficients were obtained highly in statistically ($P<0.001$), but the spotted diagrams showed none correlate. Because many abnormal values are found in normal values with one another component on the spotted diagrams. Therefore, examination of each medical technologic item is cognizable in respectively at the diagnosis and screening test of the disease or impediment.

赤血球は動物が生息してゆく上でもっとも重要なガス交換，すなわち組織での代謝によって生成されたCO_2を肺で遊離し，外気のO_2を結合して各組織に運搬することをその主要な機能としている．この赤血球細胞は，水分70%，ヘモグロビン（血色素）25%およびその他5%で構成されており，ガス交換のメカニズムはヘモグロビンの主骨格であるヘム分子のもつ鉄原子とO_2またはCO_2が可逆的に結合することによって成り立っている．

この重要な役割りを担うヘム部分の代謝は，ポルフィリン骨格の生合成，すなわちＴＣＡサイクルあるいはコハク酸—グリシンサイクルから生じたδ-アミノレブリン酸（以下δ-ＡＬＡと記す）が脱水縮合してピロール誘導体であるポルフォビリノーゲンとなり，さらに4個のピロール核が環状に重合してポルフィリン骨格を形成することが主体であり，その中間代謝機構は熱力学的に逆反応のない一方通行の化学反応である.[1,2]

尿中に排泄されるポルフィリン代謝系成分，中でもδ-ＡＬＡ，ポルフォビリノーゲンおよびコプロポルフィリン（以下Cpと記す）の分析検査価値は，とりわけポルフィリン症や鉛中毒者のスクリーニングテストなどの面で高く評価されている.[3-9]

また，人赤血球細胞の寿命は約120日であって，肝臓あるいは脾臓の細網内皮系の細胞の作用または流血中で破壊が起り，個人の赤血球細胞の$^1/_{120}$が毎日あたらしい細胞に代っている．

赤血球が破壊した場合に，その主有機成分であるヘモグロビンのヘム部分を構成するポルフィリン骨格は開裂してビリルビンとなり，胆汁とともに腸管内に排泄される．ビリルビン代謝産物の一部分は再び吸収されて肝臓に運ばれ，いわゆる腸肝循環を繰り返し，その一部分は血流中に入り，ついで尿中に現われる．赤血球の破壊が大きいときに，ウロビリン体生成も多くなり，必然的に尿中へのウロビリン体とくにウロビリノーゲン（以下Ugと記す）の排泄も増加してくる．

このような赤血球細胞の製造および破壊にかかわる代謝過程は，一日約$^1/_{120}$の細胞の更新とその細胞破壊（外

* 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

的要因を含めた）の速度に関連してくることになるが，それら代謝成分について複合的に詳細な検討を行っている文献は少ない．

よって著者らは，直接的な鉛障害がなかった東京都住民の一時尿を用いて，ヘム合成系成分であるδ-ＡＬＡおよびCpならびにヘム分解産物であるUgの測定を行い，これらの物質の相互関係を推測統計的に解析した．また，個人尿と少量鉛暴露環境下の労働者の尿についても分析測定を行ったので，その解析結果も併せて報告をする．

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民に対して実施した，鉛害および公害検診の受診を希望した住民，男性535名および女性805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月から48年2月までの期間に，都内32保健所管轄内で合計38回の検診を行った．

3. 検査項目と定量分析方法

ｉ）尿中排泄δ-ＡＬＡ

和田らの方法[10]を一部改良[11]して分析を行った．

ii）尿中排泄 Cp

著者らが研究開発した微量けい光法[12]に従って分析を行った．

iii）尿中排泄Ug

採尿当日に試料の還元操作をなし，約15時間経過後（翌日）に，佐藤法[13,14]にもとづいて分析を行った．

4. 推測統計手法について[15]

各測定値を性別に分け，ミニコンピューターを使用して，相関係数ｒと回帰方程式 $y=ax+b$ を求めた．また相関係数ｒの有意性は，$F_0=\frac{r^2}{1-r^2}(n-2)$ なる式に従って求めた F_0 値に対してＦ検定を行った．

Table 1 Coefficients of Correlation on Urinary Output δ-ALA, Cp and Ug in a Normal Adult Man (n=8)

	δ-ＡＬＡ	Cp	Ug	
δ-ALA		0.7060 (P<0.10)	0.9185 (P<0.001)	Absolute Quantity
Cp	0.9646 (P<0.001)		0.8538 (P<0.01)	
Ug	0.9775 (P<0.001)	0.9888 (P<0.001)		
	Observed Value			

結果および考察

1. 個人尿での排泄成分の相互関係について

健康な成人男子の個人尿を終日定時的に採取し，δ-ＡＬＡ，Cp および Ug の定量分析を行い，得られた値についての測定値間および絶対排泄量間における相関係数をTable 1 に示す．

相関係数ｒの大きさの順序は，測定値間では，Ug：Cp(r=0.9888)＞Ug：δ-ALA(r=0.9775)＞δ-ALA：Cp(r=0.9646) であり，いずれも危険率 0.1%以下という高い水準で有意であった．また絶対排泄量間では，Ug：δ-ALA (r=0.9185)＞Ug：Cp (r=0.8538)＞δ-ALA：Cp(r=0.7060) の順序となり，相関係数ｒの有意性は，係数の大きい方から 0.1%以下，1％以下および10％以下という水準で危険率が順次増大した．また，測定値間および絶対排泄量間ともにδ-ＡＬＡと Cp 間の相関係数が一番小さかった．このように，測定値間および絶対排泄量間で，対応する係数の大きさが違ったり順序が入れ代るのは，各成分の排泄変動に時間的ずれが加わることによって生じる．なお，測定値間での相関係数ｒは，排泄絶対量間での場合よりも大きく，その有意性もすべて0.1% 以下という低い危険率である．この現象は，単なる測定値間では尿の濃淡，すなわち溶質と溶媒の関係を含めた相関性を求めているために，見かけ上の数値表現として有意に大きくなっている．なぜならば，尿量と測定値間の相関係数ｒは，δ-ＡＬＡ(r=−0.8539)，Cp (r=−0.8163) および Ug (r=−0.8121) という非常に近似した係数が得られたのに対し，1時間あたりの排泄尿量と三成分の絶対排泄量間での相関係数ｒは，δ-ＡＬＡ(r=0.9714)，Cp(r=0.6590) および Ug (r=0.9229) であり，前者の場合よりも大きな違いが生じていることから説明出来る．また，尿量と比例した排泄変動を示しにくい成分は Cp であり，前述した相関係数の大きさを決定する因子となっている．

なお，排泄絶対量間での係数が小さいのは，尿の濃淡によって物質間に排泄の時間的ずれや腎糸球体でのろ過競合が生じ，その影響を受けた変動が係数に現われたためと考える．

これらのことから，尿成分の排泄相互関係を調べるには，一時尿を被検体とすると尿の濃淡による影響を強くうけるので，排泄絶対量にもとづいて比較検討をする必要がある．

2. δ-ＡＬＡと Cp の相互関係について

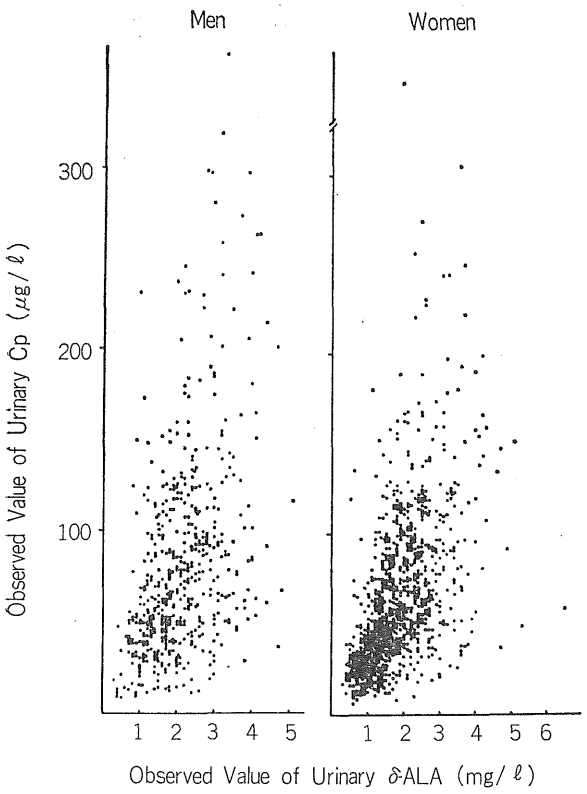


Fig. 1 Urinary Levels of Cp Plotted against Those of δ-ALA

Men : n=497, r=0.4214(P<0.001)
$y=26.11x+26.75$

Women : n=772, r=0.4696(P<0.001)
$y=24.57x+22.60$

東京都住民（以下住民と記す）の一時尿によるδ-ＡＬＡおよび Cp の測定値を性別に分け，δ-ＡＬＡ測定値に対応する Cp 測定値のバラツキ方を表わした散布図を Fig. 1 に示す．

相関係数 r について検討をすると，男性 (n=497)r=0.4214 および女性 (n=772)r=0.4696 はどちらも危険率 0.1% 以下でその有意性が得られ，女性の方が少し大きかった．

しかし，プロットの分散状態を観察すると，住民の一時尿での測定値からＦ分布で求めた棄却限界上限値（δ-ＡＬＡ：男性4.55mg/ℓ，女性 3.98mg/ℓ および Cp：男性 163.5μg/ℓ，女性148.2μg/ℓ）を越える例数は，δ-ＡＬＡ：男性４例，女性20例および Cp：男性 38 例，女性45例であった．δ-ＡＬＡと Cp の両方で棄却される区分の例数の一成分のみが棄却される例数に対する出現比率は，男性2.50%および女性1.59%であった．

Kasahara[16]は，健康な男子215人の δ-ＡＬＡと Cp 間の相関係数 r=0.493(P<0.001) を報告しているが，これは著者らの得た結果とおおむね似た値である．また，山本ら[6]は，某鉛ガラス工場の労働者11人の追跡調査結果 (n=29)にもとづいて，相関係数 r=0.67(P<0.001) を報告するとともに，浜見らの鉛電池工場の労働者に見られた相関係数 r=0.77 (P<0.001) を文献引用している．さらに大橋ら[7]は，白メタル溶解作業者57人についての相関係数 r=0.85 (P<0.001) を報告している．なお，著者も某社で有機鉛の配合やワイヤーロープ焼入れ作業などに従事している労働者57人について，相関係数 r=0.7612(P<0.001) を得ている．

住民の一時尿中に排泄されるδ-ＡＬＡおよび Cp の濃度程度では，二者間の相関係数は小さいが，鉛暴露環境下にある労働者では相関係数が大きくなることが示された．よって，尿中両成分の測定は，鉛によるポルフィリン代謝障害（鉛中毒）のスクリーニングテストの臨床検査として価値がある．

山本ら[17]は，動物実験による鉛暴露の影響について，尿中コプロポルフィリンの排泄増加は著明で相乗的であるのに対し，尿中δ-ＡＬＡの排泄増加は相加的であったと報告している．また，著者ら[18]は住民の一時尿中鉛測定値に対するδ-ＡＬＡ測定値の相関係数は，男性 (n=233)r=0.2238(P<0.01)および女性 (n=286)r=0.2403 (P<0.01)であったが，Cp測定値との相関係数は，男性 (n=197)r=0.3169 (P<0.01) および女性 (n=267)r=0.2723(P<0.01) であり，鉛とδ-ＡＬＡの相関係数よりも鉛と Cp の相関係数が微小ながら大きかったことを報告した．

鉛中毒者では，Cp よりもδ-ＡＬＡの方が尿中排泄増加が早いということで，δ-ＡＬＡの測定は早期の発見および診断に役立つといわれている．しかし，一般生活環境下にある住民が受ける環境汚染による障害は，非常にゆっくりと進行するものであり，その点では相乗的変化を示す成分を測定する方が早くに影響を捕えられると考える．このことについては，さらに調査および研究を続ける必要がある．

3. Ug と δ-ALA の相互関係について

住民の一時尿によるUg および δ-ALA の測定値を性別に分けUg 測定値に対応する δ-ALA 測定値のバラツキ方を表わした散布図をFig. 2 に示す．

両者間の相関係数 r について吟味をすると，男性 (n=535) r=0.4211および女性 (n=805) r=0.5460は，男女とも危険率 0.1% 以下という高い水準で有意性が得ら

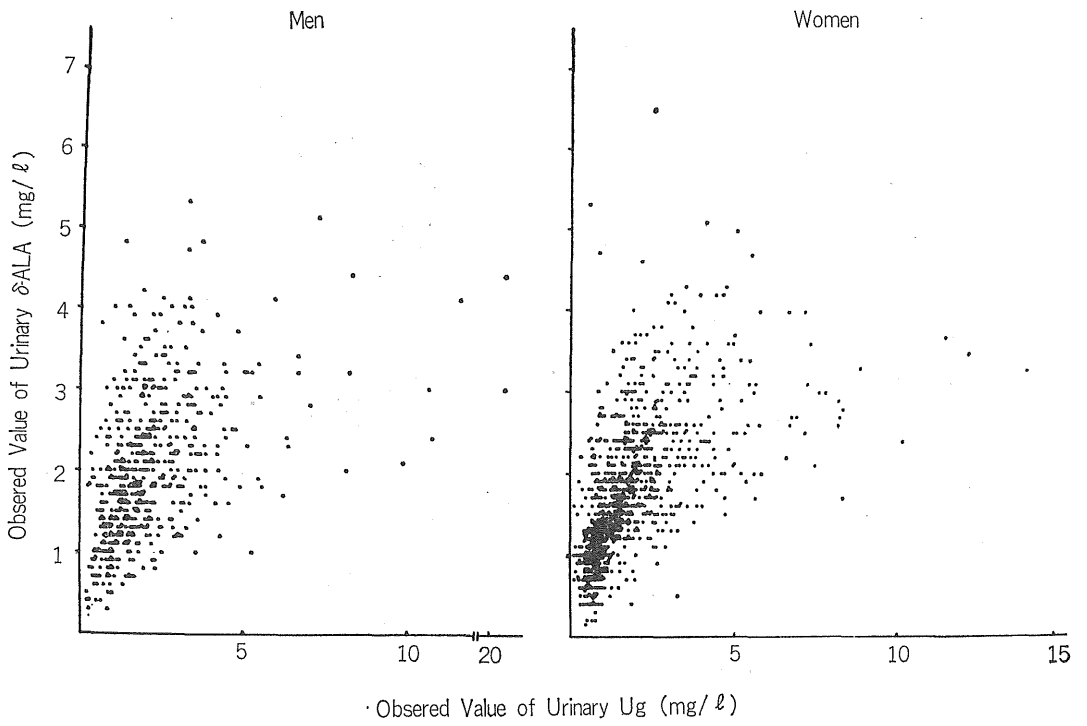


Fig. 2 Urinary Levels of δ-ALA Plotted against Those of Ug
Men : n=535, r=0.4211(P<0.001), $y=0.19x+1.59$
Women : n=805, r=0.5460(P<0.001), $y=0.298x+1.29$

れ，前述した δ-ALA と Cp の場合と同じように女性の係数の方が少し大きくなっている．

しかし，実際のプロットの分散状態をよく観察すると，住民の一時尿によるF分布にもとづいた棄却限界上限値，Ug（男性4.29mg/l および女性3.91mg/l)を越える例数は，男性41例および女性77例であり，δ-ALA の棄却限界上限値（前述）を越える例数は，男性5例および女性20例であった．また，Ug および δ-ALA の両方ともに棄却限界上限値を越える場合の例数は，男性1例および女性10例にすぎなかった．この両方で棄却される区分の例数の一成分のみが棄却される例数に対する出現比率は，男性2.27%および女性12.99%であった．

男性の相関係数の方が少し小さいのは，Ug の濃度がきわめて高い二例（20.8mg/l および 23.5mg/l）に対し，δ-ALA（3.0mg/l および4.4mg/l）は正常濃度であったためと考えられる．

金子ら[19]は，肝性ポルフィリン症患者について，トランスアミナーゼ活性上昇などの軽度の肝機能障害を認めたと報告している．しかし，尿中に排泄されるUgの異常濃度が生ずることを肝機能障害のみによるとすれば，住民の一時尿における相関係数とそのプロットの分散から考えて，δ-ALAの尿中排泄量が肝機能障害によって直接的な影響を受けることはきわめて小さいといえる．すなわち，肝機能障害では必ずしも δ-ALAの著明な尿中排泄増加が起るものではないということが明らかになった．

また著者は，某社で有機鉛の配合やワイヤーロープ焼入れなどに従事している労働者55人についての相関係数 r=0.2334（p<0.10）を得ている．これは前述した δ-ALAと Cp の場合のような高い相関性を示さなかった．

このように，住民および鉛暴露環境下の労働者ともにその相関係数は小さく，ヘム代謝機能が肝機能障害による影響を受けるとしても，ごく軽度であることを示している．

4. Ug と Cp の相互関係について

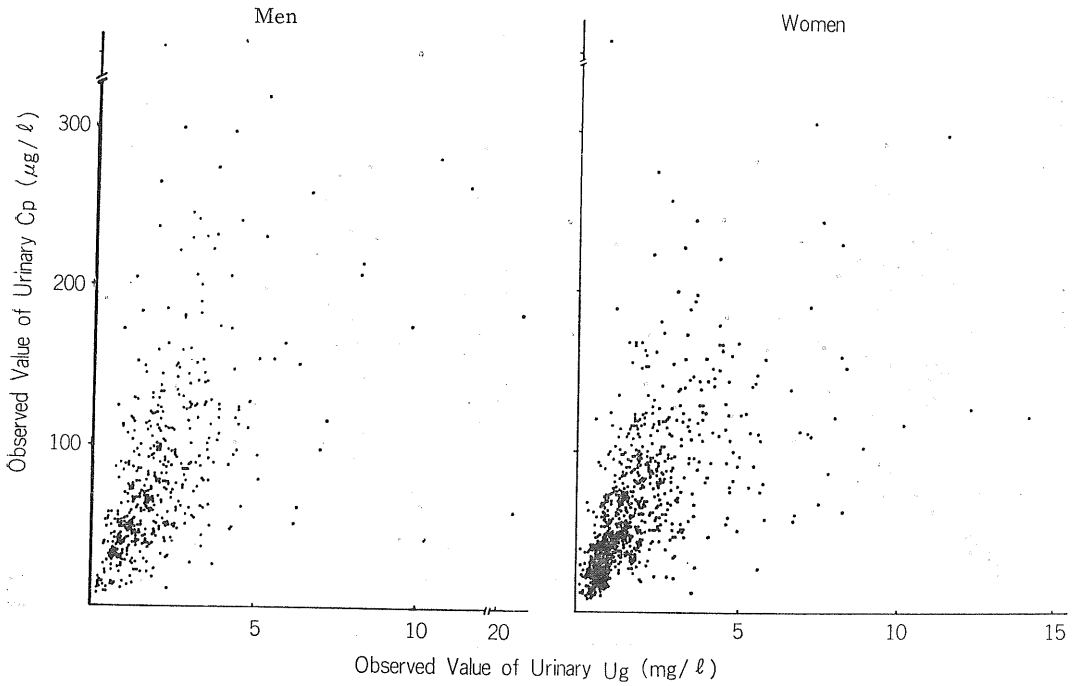


Fig. 3 Urinary Levels of Cp Plotted against Those of Ug
Men : n=466, r=0.4518(P<0.001), $y=12.98x+54.33$
Women : n=729, r=0.5492(P<0.001), $y=15.73x+39.33$

住民の一時尿による Ug および Cp の測定値を性別に分け，Ug 測定値に対応する Cp 測定値のバラツキ方を表わした散布図を Fig. 3 に示す．

両者間の相関係数 r について吟味をすると，男性(n=466) r=0.4518および女性 (n=729) r=0.5492 はどちらも危険率 0.1% 以下の高い水準で有意性が得られ，前述した δ-ALA と Cp の相互関係および Ug と δ-ALA の相互関係の場合と同様に，女性の方が大きい係数を示した．

しかし，実際のプロットの分散状態を観察すると，前述した F 分布にもとづく棄却限界上限値を越える例数は，Ug は男性33例および女性 70 例であり，Cp では男性38例および女性45例であった．また，Ug および Cp の両方ともに棄却限界上限値を越える場合は，男性10例および女性17例であった．この両方で棄却される区分の例数の一成分のみが棄却される例数に対する出現比率は，男性 19.61% および女性 20.99% となり，前述した δ-ALA と Cp，Ug と δ-ALA の 2 事例よりも高いパーセンテージを示し，プロットの分散状態からも相関性が高いことが示された．この関連性の高さは，一般に肝機能異常を伴う疾患では尿中コプロポルフィリンが増加しがちである，[2] といわれていることの裏付けとして理解される．

なお著者は，某社で有機鉛の配合やワイヤーロープ焼入れ作業などに従事している労働者55人について，相関係数 r=0.3266(P<0.05) を得ている．これは前述した δ-ALA と Cp 間の相関係数 r=0.7612(P<0.001) に比べると非常に小さかった．

以上のように一時尿中に排泄される δ-ALA，Cp および Ug の相関係数が住民と鉛暴露環境下者とでは異なっており，各相関係数 r の大きさおよびその有意性さらには各測定値の分散状態から考えると，鉛は肝機能よりもヘム代謝機能を阻害することが強調される．また，非鉛暴露と考えられる一般生活環境下にある住民では，尿中

に排泄される δ-ALA, Cp および Ug の臨床検査価値は障害や疾患などの診断およびスクリーニングテストの際に個別または関連性として認められる.

まとめ

健康な個人および鉛による直接的障害がなかった東京都住民さらに少量鉛暴露環境下の労働者の一時尿を主体にして，ヘム代謝中間尿中成分（δ-ALA, Cp）およびヘム代謝終末尿中成分（Ug）の尿中排泄相互関係を調べた.

1. 個人尿を経時的に採取して得た，δ-ALA, Cp および Ug の各8測定値にもとづいた相関係数 r の大きさの順序は，測定値間においては，Ug : Cp, r=0.9888 (P<0.001)>Ug : δ-ALA, r=0.9775 (P<0.001)>δ-ALA : Cp, r=0.9646 (P<0.001) であったが，1時間あたりの排泄絶対量間では，Ug : δ-ALA, r=0.9185 (P<0.001)>Ug : Cp, r=0.8538(P<0.01)>δ-ALA : Cp, r=0.7060(P<0.10) であった．測定値間では 0.1%以下の低い危険率でその係数の有意性が得られているが，排泄絶対量間では係数も小さくなると同時にその有意性も係数の大きさと比例して10倍ずつ危険率が変った．これは，測定値間では尿の濃淡による因子にもとづいた相関性を示したものであり，個人尿で排泄相互関係を調べるには，その排泄絶対量で比較検討する必要があることを示唆している.

2. 東京都住民の一時尿にみる δ-ALA, Cp および Ug の各相関係数 r の大きさの順序は，

男性；Ug : Cp(n=466), r=0.4518 (P<0.001)>δ-ALA : Cp(n=497), r=0.4214(P<0.001)>Ug : δ-ALA(n=535), r=0.4211(P<0.001)

女性；Ug : Cp (n=729), r=0.5492(P<0.001)>Ug : δ-ALA(n=805), r=0.5460 (P<0.001)>δ-ALA : Cp(n=772), r=0.4696(P<0.001)であった.

また，東京都住民のF分布にもとづいた棄却限界上限値を越える例数について調べると，両方で棄却されるような異常測定値の出現率は，

男性；Ug : Cp(19.61%)>δ-ALA : Cp(2.5%)>Ug: δ-ALA(2.27%)

女性；Ug : Cp (20.99%)>Ug : δ-ALA (12.99%)>δ-ALA : Cp(1.59%)であり，Ug と Cp の両方で棄却される異常値出現率は男女とも極めて高かった.

相関係数 r の大きさと，棄却される測定値の分散状態から考えると，尿中排泄の関連性が高い成分は Ug と Cp であり，Cp は肝機能障害によっても尿中排泄増加が起りうることがわかった.

3. 少量鉛暴露環境下の労働者の一時尿中に排泄されるδ-ALA, Cp および Ug の相関係数 r の大きさの順序は，

δ-ALA : Cp(n=57), r=0.7612 (P<0.001) >Ug : Cp (n=55), r=0.3226 (P<0.05)>Ug : δ-ALA (n=55), r=0.2334(P<0.10)

であった.

少量鉛暴露環境下の労働者の尿中 δ-ALA と Cp 間の相関係数 r=0.7612は，鉛による直接的な障害のなかった東京都住民の尿中 δ-ALA と Cp 間の相関係数，男性 r=0.4214 および女性 r=0.4696 に比べるときわめて大きくなっている．従って鉛によるヘム代謝障害を観察する指標としては，尿中に排泄される δ-ALA の濃度測定に加え，尿中 Cp の濃度をも測定するような検診を行う必要があると判断される.

以上の点をまとめると，一般生活環境下にある住民ていどの鉛被暴では，尿中に排泄される δ-ALA, Cp および Ug の濃度は個々別々の態様を示しているが，少量鉛暴露以上の被暴を受ける環境下にある人々の鉛によるヘム代謝障害のスクリーニングテストの臨床検査項目としては，尿中に排泄される δ-ALA および Cp の濃度を測定することであると認識される.

謝辞 本研究を行うにあたり，少量鉛暴露作業労働者の尿の分与をうけた当研究所環境保健部環境衛生研究科二島太一郎氏に深謝いたします.

（本研究の概要は日本衛生検査学会第23回大会：昭和49年4月28日で発表した．なお，本研究は当研究所研究課題「ポルフィリン体の代謝系成分に関する調査およびその生化学的研究」として実施している一部である.）

文献

1) 佐野晴洋：生体の科学，13(3)，12，1962
2) 島薗順雄，林 醰，山田弘三，山村雄一，吉利 和編集：病気の生化学，第20巻C，代謝異常Ⅲ，132，1973，中山書店
3) 久保田重孝，北山孝允：労働の科学，22(12)，19，1967
4) 堀口俊一：現代医学，20(3)，291，1973
5) 松本久男：臨床病理，19(1)，56，1971
6) 山本丈夫，祐田泰延，青木 稔，高橋亮司：産業医学，12(7)，341，1970
7) 大橋 誠，塚本博康，酒井恒美：鉄道労働科学研究資料，69—12，1969
8) 和田 攻 編：公害による疾患，192，1971，南山堂
9) 山村雄一 監修：病態生化学1，154，1968，朝倉

書店
10) Wada, O., Toyokawa, K., Urata, G., Yano, Y. and Nakao, K. : *Brit. J. Industr. Med.*, 26, 240, 1969
11) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，野牛　弘：東京衛研年報，24，303，1972
12) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，24，297，1972
13) 陳　敏馨：臨床検査，6(7)，497，1962
14) 陳　敏馨：臨床病理，11(4)，207，1963
15) 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，60，1970，日本獣医師会
16) Kasahara, A. : *Osaka City University Medical J.*, 11(1), 99, 1965
17) 山本丈夫，山口正義，祐田泰延：衛生化学，20(5)，261，1974
18) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，野牛　弘：東京衛研年報，25，313，1974
19) 金子兼三，常山秀夫，佐々木英夫：臨床科学，9(7)，863，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 259—264, 1975

ポルフィリン代謝系尿中成分の統計的観察

武士俣 邦 雄* 霜 田 さと子* 小笠原 公*

Statistical Observations on the Porphyrin Metabolites in Urine

KUNIO BUSHIMATA*, SATOKO SHIMODA* and KIMI OGASAWARA*

Tokyo Metropolitan Health Bureau is performing the health examination as to the lead poisoning against the inhabitants. The degree of influence by lead on haem-metabolites in the inhabitants were described in Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H. 25, 1974. However, the average and abnormality of urinary output δ-aminolevulinic acid (δ-ALA), coproporphyrin (Cp) and urobilinogen (Ug) in the inhabitants are not clear as a comprehensive observations. Therefore, these data in health examination were calculated in statistically.

The following results were obtained :

The averages in Tokoites of urinary output δ-ALA, Cp and Ug were shown a tendency to decrease following add to age, especially in δ-ALA. These averages were higher in men.

The appearances of abnormality in more than the upper rejection limit were Ug>Cp>δ-ALA, and about which have not with sex.

The abnormal percentage in Cp was higher than δ-ALA, thus further studies into this problem are necessary, because it is said that the δ-ALA excretion in urine is more influenced by lead than Cp.

昭和45年に自動車などの排気ガス中に含まれる鉛が大気を汚染し，住民の健康に重大な影響をおよぼしているというセンセーショナルな提起が行われて以来，東京都衛生局は鉛中毒を主体として，鉛害および公害検診を行ってきた．鉛中毒のスクリーニングテストには，主として尿中に排泄されるδ-アミノレブリン酸（以下 δ-ALA と記す）やコプロポルフィリン（以下Cp と記す）の濃度を測定することが，臨床検査として採用されている．

しかし，一般住民の生活環境下の汚染程度で鉛中毒がおこる可能性はきわめて乏しいといわれている[1]し，著者らも東京都住民の一時尿中に排泄される δ-ALA および Cp の濃度を調べ，尿中および血液中の鉛との相関係数を求め，鉛による障害としての直接的因果関係が認められなかったことを報告した.[2,3]

また，東京都住民について光化学スモッグによる血清ビリルビンの増加が報告[4]されているが，その代謝産物であるウロビリノーゲン（以下 Ug と記す）の尿中排泄実態を把握しておくことは，肝疾患者のスクリーニングテストとともに，大気汚染の影響を追跡するのに役立つものと考える．

赤血球細胞の製造および破壊にかかわる代謝成分の尿中排泄水準は，その環境下におかれた住民の健康推移の一つのパラメーターになると思う．そこで，今後の動態を追跡する場合の比較データとするため，ポルフィリン代謝系成分である δ-ALA，Cp およびその終末産物である Ug の尿中排泄濃度を測定し，それら尿成分の排泄濃度水準ならびに異常値出現状況の把握さらには成分相互の濃度水準の関連性を推測統計的にまとめたので報告をする．

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民に対して実施している鉛害および公害検診の受診を希望した20歳以上の成人，男性 740 名および女性 983 名の午後 2 時前後の一時尿を用いた．

2. 検査期間について

δ-ALA は昭和46年 5 月～48年 2 月の間に37保健所管内で46回の検診を行った．また，CpおよびUg は昭和46

* 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

Table 1 Average of Urinary Output δ-ALA, Cp and Ug in Tokyoites upon the Statistical Analysis in the F-Distribution

Item	Sex	Remarks of Column	Division of Ages						
			20-	30-	40-	50-	60-	70-	All
δ-ALA (mg/l)	Men	Number of Subjects	112	121	153	141	161	52	740
		Mean	2.56	2.4	2.21	2.07	1.96	1.87	2.19
		Standard Deviation	1.06	0.83	0.93	0.85	0.89	0.72	0.92
		Coefficient of Variation	0.415	0.347	0.418	0.410	0.453	0.384	0.419
		Rejection Limit(upper)	5.37	4.6	4.64	4.30	4.28	3.83	4.55
	Women	Number of Subjects	69	251	253	235	143	32	983
		Mean	2.20	1.99	1.89	1.87	1.86	1.67	1.89
		Standard Deviation	0.85	0.89	0.85	0.80	0.75	0.70	0.81
		Coefficient of Variation	0.387	0.449	0.450	0.429	0.402	0.42	0.426
		Rejection Limit(upper)	4.5	4.32	4.11	3.96	3.82	3.65	3.98
Cp (μg/l)	Men	Number of Subjects	70	82	104	104	111	38	509
		Mean	84.5	91.5	74.3	66.3	55.3	63.3	69.5
		Standard Deviation	43.9	50.7	35.7	35.7	28.1	37.7	36.2
		Coefficient of Variation	0.519	0.554	0.480	0.538	0.507	0.595	0.522
		Rejection Limit(upper)	202.8	226.9	169.	161.2	129.7	168.7	163.5
	Women	Number of Subjects	51	203	197	182	108	25	766
		Mean	73.0	62.1	65.5	60.5	63.9	62.	62.2
		Standard Deviation	37.3	32.0	37.8	31.	38.0	34.9	33.2
		Coefficient of Variation	0.510	0.516	0.577	0.512	0.596	0.563	0.533
		Rejection Limit(upper)	175.	145.8	164.5	141.6	164.7	164.1	148.2
Ug (mg/l)	Men	Number of Subjects	78	90	109	113	110	46	546
		Mean	1.98	2.1	1.74	2.02	1.79	2.16	1.87
		Standard Deviation	0.99	1.04	0.85	1.06	0.95	1.21	0.93
		Coefficient of Variation	0.500	0.496	0.485	0.527	0.529	0.561	0.498
		Rejection Limit(upper)	4.64	4.87	3.98	4.83	4.29	5.51	4.29
	Women	Number of Subjects	54	219	203	179	113	31	799
		Mean	1.95	1.75	1.49	1.49	1.65	1.49	1.62
		Standard Deviation	0.91	1.04	0.76	0.79	0.91	0.91	0.89
		Coefficient of Variation	0.466	0.593	0.512	0.531	0.549	0.609	0.549
		Rejection Limit(upper)	4.42	4.46	3.48	3.58	4.05	4.09	3.91

年9月～48年2月の間に，Cpは31保健所，Ugは30保健所の各管内において合計36回の検診を行った．

3. 検査項目と定量分析方法

i) 尿中 δ-ALA：和田らの方法[5]の一部改良法[6]

ii) 尿中 Cp：著者らの微量けい光法[7]

iii) 尿中 Ug：採尿日に試料の還元操作をし，約15時間後に佐藤法[8,9]にもとづいて分析を行った．

4. 推計統計手法について[10,11]

東京都住民（以下住民と記す）の一時尿中 δ-ALA, CpおよびUgの測定値を性別かつ年齢層別に区分けを行い，各年齢層群および全測定値群における棄却限界値をF分布の公式に従って危険率1％水準で求めた．また，各群で棄却値を含んでいた場合には棄却値を全く含まなくなるまで繰り返して演算を行い，信頼範囲内の測定値のみについて，平均値，標準偏差および棄却限界上限値ならびに変動係数を求めた．

さらに，δ-ALAとCpについて信頼範囲内の測定値から，尿定性試験によるUgおよびタンパク陽性異常の測定値を除外し，前述の演算と全く同じ方法で平均値および標準偏差を求めた．これを“正常濃度”とする．そしてこの値に対する住民の一時尿中排泄水準を比較するためにWelchの差の検定を行った．

結果および考察

住民の一時尿中に排泄されるδ-ALA, Cpおよび Ugそれぞれの推測統計的排泄濃度水準の数値をTable 1に示す．

1. δ-ALAの尿中排泄濃度水準について

各年齢層群での尿中 δ-ALA の平均濃度は，性別にかかわらず20歳代の男性 2.56mg/l および女性2.20mg/l から70歳以上の群の男性1.87mg/l および女性1.67mg/l まで高齢化に伴って低下していることが認められた．また，性別には男性の排泄濃度水準は女性よりも高かった．

さらに，正常濃度に対する各群の排泄濃度水準の差の検定結果は，男性では20歳代5％以下，40歳代1％以下および60歳代の2％以下という各危険率で差は有意であったが，女性では40歳代1％以下，50歳代および60歳代では0.1％以下の各危険率で高く有意差が得られた．また，全測定値群の排泄濃度水準を正常濃度に比べると，男女ともに0.1％以下の危険率で住民の排泄濃度水準は有意に高いことが推測統計的に得られた．

統計的に求められた一時尿中排泄 δ-ALA の正常値あるいは健康者および非鉛作業従事者の排泄濃度などに関しては，次に示すような値が報告されている．

Nakaoら[12]は正常値を 2.9±1.4mg/l とし，田口ら[13]は職業的に鉛暴露のない男女からのスポット尿について，男性(n=38) 2.05±0.96mg/l および女性(n=49) 1.59±0.90mg/l を，また久保田ら[14]は非鉛作業者20名における2.7±0.88mg/l という値を報告している．さらに，大橋ら[15]は非鉛作業者である健康な成年男子37名の平均値2.05mg/l を報告している．磯貝らは非鉛暴露の健康人96名について3.01±1.26mg/l[16]および 2.3±1.9 mg/l[17]という値を発表している．その他外国人におけるデータなど多くの記述[18-20]もあるが，体格や食生活様式などの違いがあり，直接比較することは出来ない．

住民男性の全測定値群での一時尿中排泄濃度水準2.19±0.92mg/l は，田口らの成績[13]および大橋らの求めた平均値に近似的であるが，女性の排泄濃度水準に該当するような適当な既報数値は見つからなかった．

なお，住民の一時尿による推測統計的な棄却限界上限値は，男性4.55mg/l および女性3.97mg/l であった．これらの値を，大橋ら[15]が非鉛作業者である健康な成年男子37名から求めた危険率5％における統計的上限値4.19 mg/l に比べると，住民男性は高いが女性は低い値である．また，住民の女性の棄却限界上限値3.97mg/l は，Kasahara[20]が求めた危険率5％における統計上限値4.0 mg/l とほぼ一致する値である．

さらに，労働基準法施行規則第35条第14号（以下労基法施則と記す）に掲げる鉛中毒認定基準[21]は，6.0mg/l 以上を検出することとなっている．しかし，住民の一時尿におけるF分布にもとづいた危険率1％の推測統計的上限値，男性4.55mg/l および女性 3.97mg/l はがいして低い．ゆえに，住民の鉛など環境汚染物による健康推移の観察あるいは現時点での障害の程度を判定することに，鉛取り扱い者を対象とした認定基準値を適用することは大いに疑問である．なぜならば，一般生活環境下にある住民が鉛などの環境汚染物質による障害を受けるのは，直接に障害物質の被暴をうけている労働環境下の人達のような所見にはならず，年月をかけて徐々に進むものであるからである．

よってスクリーニングテストなどには，放射線被暴に関する規定[22]で設けているような，直接的取り扱い者（職業上）と非取り扱い者とを区別しているカテゴリーという考え方を導入して，尿中排泄基準を設ける試みが必要であろう．

以上のように既報の数値あるいは基準値に比べると，住民の一時尿中 δ-ALA の排泄濃度は必ずしも高いとはいえないが，尿定性試験による肝機能および腎機能異常者を除外して求めた正常濃度との差の検定では有意に高いという検定結果であり，その原因を探るためさらに調査研究を継続する必要がある．

2. Cp の尿中排泄濃度水準について

各年齢層群での尿中 Cp の平均濃度は，年齢層間に変動があり，前述した δ-ALA の場合ほど明瞭ではないが，やはり高齢化に伴う排泄減少傾向がうかがわれる．また，女性の60歳代を除けば，δ-ALA の場合と同じように男性が高値を示した．

なお，前述の方法で求めた一時尿中 Cp の正常濃度と住民の一時尿中排泄濃度水準をWelchの差の検定に従って比較すると，男性では有意に高い排泄濃度を示したものは一つもなく，女性では40歳代2％以下および全測定値群の10％以下という危険率で住民は高いという有意性が得られたが，δ-ALA の場合に比べるとその差は認められなかった．

統計的に求められた一時尿中排泄 Cp の正常値については，Nakaoら[12]の70±40μg/l，高久[19]の50～200μg/l，金井[23]の60～180μg/day および久保田[14]の150μg/l以下（英国基準）などの記述がある．また，大橋ら[15]は非鉛作業従事者の対数値から求めた平均値31.9μg/lを報告している．

住民の一時尿中排泄 Cp の濃度水準は，男性 69.5±36.2μg/l および女性62.2±33.2μg/l であり，これはNakaoら[12]の値に近似しているが，大橋ら[15]の得た平均値 31.9μg/l に比べると2倍強の排泄濃度水準である．

また，労基法施則では鉛中毒認定基準値[21]を 150μg/l 以上の検出と規定しているが，住民のF分布にもとづいた危険率1％水準での棄却限界上限値は，男性 163.5

$\mu g/l$ および女性 148.2$\mu g/l$ であった．この住民の一時尿中に排泄される Cp の統計的上限値は，男性では鉛中毒認定基準値を越えているし，女性も認定基準値に匹敵する排泄濃度水準であった．

しかし著者らは，住民の一時尿中排泄 δ-ALA および Cp の測定値と，尿中および血液中の鉛測定値との相関係数を求め，直接的な因果関係がなかったことを報告した．[2,3] また，住民の一時尿中排泄 δ-ALA と Cp との相関係数 r は，男性 r=0.4214および女性 r=0.4696と低かったことについても報告を行った．[24] さらに，住民の一時尿中に排泄される δ-ALA の推測統計的棄却限界上限値は，労基法施則に掲げる鉛中毒認定基準値[21]よりもかなり低かったが，住民の一時尿中排泄 Cp の推測統計的棄却限界上限値は，鉛中毒認定基準値にほぼ匹敵する実態であった．

したがって，鉛中毒としての検診ではなく，一般生活環境下で尿中 Cp の排泄増加をきたす環境汚染物質の検索と継続的調査研究が必要である．

3. Ug の尿中排泄濃度水準について

尿中排泄 Ug の平均濃度水準は，年齢層間に変動があるがおおむね一定した水準を示した．

住民の一時尿中に排泄される Ug の平均排泄濃度は，男性 1.87±0.93mg/l および女性 1.62±0.89mg/l であり，δ-ALA および Cp の場合と同じように男性の方が女性より高い排泄水準であった．

Ug の正常値については，柴田[25]の 0～4.0mg/day，斉藤[26]の0.2～3.0mg/dayおよび金井[23]の 0.5～2.0mg/day などの記述がある．また，陳[9]は健康者のUg正常値

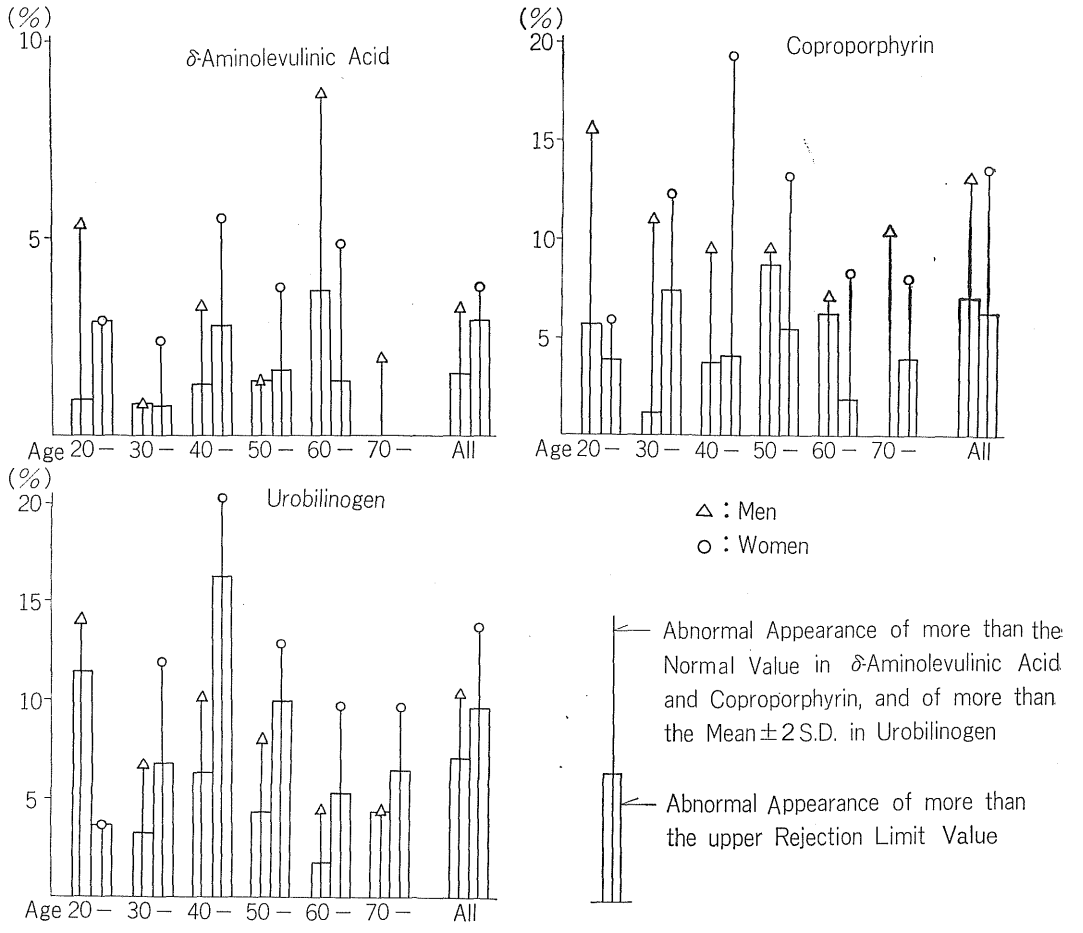


Fig. 1 Abnormal Appearances of Urinary Output δ-aminolevulinic acid, Coproporphyrin and Urobilinogen in Tokyoites divided into Age Groups

を文献的にまとめると同時に自らも0.6～4mg/dayを報告している．以上のように尿中排泄Ugの正常値の単位はいずれも一日あたりの排泄量として表示されている．したがって，住民の一時尿中排泄濃度水準の比較検討は困難であり，しかも臨床的に異常者を除外して正常値を求めることも出来ないので，今後の検診や健康推移の参考資料となることと考えて記述をした．

4. 異常値出現状況について

住民の一時尿にもとづくδ-ALA，CpおよびUgの各測定値について，F分布における危険率1％水準の棄却限界上限値以上の異常値出現率を縦棒グラフで，また当所栄養研究科生化学研究室で求めた正常濃度（Ugは平均値＋2×標準偏差）以上の異常値出現率を縦線グラフで表わしたものをFig. 1に示す．

住民の一時尿中排泄δ-ＡＬＡ，CpおよびUgの各年齢層における正常濃度（Ugは平均値＋2×標準偏差以上）に対する異常値出現率が最も高い項目を調べると，δ-ＡＬＡについては男性60歳代の8.69％および女性40歳代5.53％，またCpについては男性20歳代15.71％および女性40歳代19.29％である．またUgについては男性20歳代14.10％および女性40歳代20.19％であった．女性では40歳代において三成分ともに異常値出現率が高かった．

各年齢層における棄却限界上限値以上であるために棄却された測定値の数を加算して，被検総数に対する異常値出現率として求めたところ，δ-ＡＬＡ：男性1.62％および女性1.73％，Cp：男性4.91％および女性4.96％であり，さらにUgついては男性5.13％および女性9.51％であった．また，全測定値にもとづいて求めた棄却限界上限値以上であるために棄却された測定値の例数の比率は，δ-ＡＬＡ：男性3.24％および女性3.76％，Cp：男性13.16％および女性13.57％であり，Ugでは男性10.25％および女性13.76％であった．これは前述した各年齢層ごとの棄却例数を加算した場合の異常値出現率に比べると高い出現率を示した．なお，住民一時尿の被検総数群における棄却限界上限値以上であるために棄却した異常値の出現率を項目順に並べると，

男性：Cp(13.2％)＞Ug (10.3％)＞δ-ＡＬＡ (3.2％)

女性：Ug (13.8％)＞Cp(13.6％)＞δ-ＡＬＡ (3.8％)

の順序であった．男女ともCpとUgはおおむね同率であるが，それに比べδ-ＡＬＡはきわめて低い異常値出現率であった．これは，一般に肝機能異常を伴う疾患では尿中Cpが増加しがちである[27]ということを裏付けている．また，著者らも鉛による直接的な因果関係のなかった住民の一時尿について，対応測定値の分散状態と相関係数を吟味した結果，Ugとδ-ＡＬＡの場合に比べUgとCpの相関性の方が高いことを報告した．[24]

尿中Ugの還元操作を行って得た測定値にもとづいた実態調査報告は見あたらないが，陳[7]は定性試験と同一尿を還元して得た測定値とを比較して，正常値は4.0mg/l以下であることを報告している．また，住民の一時尿における測定値のF分布にもとづいた危険率1％の棄却限界上限値は，男性4.29mg/lおよび女性3.91mg/lであり，おおむね陳の上限値[7]と近似的であった．

さらに，尿中Ugの定性検査成績については，尾立ら[28]の兵庫県和田山保健所管轄内の住民に対して行った健康診断（1970年7～9月）における異常陽性出現率，男性（n＝202)13.4％および女性（n＝765)14.8％という成績や，大塚ら[29]の徳島県加茂町の住民（n＝66）30.3％および美郷村の住民（n＝59)4.7％などの成績発表がある．また，石館ら[30]は東京都内の定時制高校生（n＝635）11.2％，大学生（n＝600)15.2％および製造関係会社員（n＝263)27.0％という報告，さらに小笠原ら[31]による東京都内の交通量の多い地域に居住する都民について，男性（n＝390)31.27％および女性（n＝452)17.47％という成績報告がある．

尿中Ugの定性試験ではエールリッヒ試薬陽性物質がすべて反応するために，定量検査成績と直接的に比較することは難しいといわれている．また，定量分析でも還元操作の有無で測定値が異り，著者は，還元操作を行うことによって，おおむね1/2の濃度になる成績を得ている．これらのことから，尿中に排泄されるUg検査で肝機能異常のスクリーニングテストあるいは住民の実態調査を行う時は，尿試料を還元して定量分析を行うことが必要であるといえる．

住民の一時尿におけるδ-ＡＬＡ，CpおよびUgの異常値出現状況を総合的に考えると，鉛障害の指標として尿中δ-ＡＬＡ濃度を測定することよりも，尿中CpおよびUgの異常値出現率が同程度に高かったことおよび尿中Cpの棄却限界上限値が労基法施則の鉛中毒認定基準値[19]に匹敵していたことに着目し，CpおよびUgの尿中排泄増加を生じさせている原因を検索する必要があると考える．

まとめ

東京都内の自動車交通量の多い主要道路交叉点近辺居住者の鉛による直接的なヘム代謝障害がなかったことはすでに報告してあり，今後は尿中排泄δ-ＡＬＡ，CpおよびUgの濃度水準の推移を観察することが必要である．よって，住民の一時尿中δ-ＡＬＡ，CpおよびUgの排泄濃度水準を性別かつ年齢層別に分けて推測統計的に求め，さらに異常値出現状況についても考察を行った．

1. 住民の一時尿中δ-ALAのF分布にもとづいた危険率1%における平均排泄濃度は，男女ともに高齢化に伴って低下した．また，危険率1%における信頼範囲内の全測定値から求めた排泄濃度水準は，男性2.19±0.92 mg/l および女性 1.89±0.81mg/l であった．さらに，危険率1%における推測統計的棄却限界上限値は，男性4.55mg/l および女性3.98mg/l であった．

2. 住民の一時尿中 Cp のF分布にもとづいた危険率1%における平均排泄濃度は，男女ともに変動はあるが，高齢化に伴って低下する傾向を示した．また，危険率1%における信頼範囲内の全測定値での排泄濃度水準は，男性69.5±36.2μg/l および女性62.2±33.2μg/l であった．さらに，危険率1%における推測統計的棄却限界上限値は，男性163.5μg/l および女性148.2μg/l であった．

3. 住民の一時尿中 Ug のF分布にもとづいた危険率1%における平均排泄濃度は，年齢層間に変動があるがおおむね一定であった．また，危険率1%における信頼範囲内の全測定値での排泄濃度水準は，男性1.87±0.93 mg/l および女性1.62±0.89mg/l であった．さらに，危険率1%における推測統計的棄却限界上限値は，男性4.29mg/l および女性3.91mg/l であった．

4. 住民の一時尿中に排泄される δ-ALA および Cp について，尿定性試験による Ug およびタンパク陽性異常の測定値を除外して，F分布にもとづいた危険率1%における信頼範囲内の全測定値から求めた推測統計的棄却限界上限値を越える異常値の出現率は，δ-ALAでは男性3.24%および女性3.76%であり，Cpでは男性13.16%および女性13.57%であった．さらに Ug については，危険率1%における信頼範囲内の全測定値から求めた推測統計的値(平均値＋2×標準偏差)を越える異常値出現率は，男性10.25%および女性13.76%であった．男女とも尿中Cpと尿中Ugの異常値出現率はおおむね同率であったが尿中δ-ALAは前二者に比べて約 1/3 であった．

(本研究の概要は東京都衛生局学会第53回：昭和49年5月8日で発表した．なお，本研究は当研究所研究課題「ポルフィリン体の代謝系成分に関する調査およびその生化学的研究」として実施している一部である．)

文　献

1) 堀口俊一：現代医学，20，291，1973
2) 武士俣邦雄ほか：東京衛研年報，25，313，1974
3) 武士俣邦雄ほか：東京衛研年報，25，321，1974
4) 三上理一郎：日胸疾会誌，11，723，1973
5) Wada, O. *et al*: *Brit. J. industr. Med.*, 26, 240, 1969
6) 武士俣邦雄ほか：東京衛研年報，24，303，1972
7) 武士俣邦雄ほか：東京衛研年報，24，297，1972
8) 陳　敏馨：臨床検査，6，497，1962
9) 陳　敏馨：臨床病理，11，207，1963
10) 鳥居敏雄，高橋昭正，土肥一郎：医学生物学のための推計学，第4版，1962，東大出版会
11) 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
12) Nakao, K. *et al*: *Clinica. Chim. Acta.*, 19, 319, 1968
13) 田口徹也ほか：産業医学，12，18，1970
14) 久保田重孝ほか：労働の科学，22，19，1967
15) 大橋　誠ほか：鉄道労働科学研究資料，69-12，1969
16) 磯貝元男ほか：臨床病理，18，182，1970
17) 大場康寛，磯貝元男ほか：臨床病理，19，186，1971
18) Davis, J. R. *et al*: *Arch. Environ. Health*, 17, 164, 1968
19) 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号，1973
20) Kasahara A.: *Osaka City Univ. Med.* J., 11, 99, 1965
21) 労働省労働基準局長通達：労働の科学，26，54，1971
22) 日本放射性同位元素協会：アイソトープ便覧，525，1970，新版，丸善KK，東京
23) 金井　泉：臨床検査法提要，金原出版，東京
24) 武士俣邦雄ほか：東京衛研年報，26，252，1975
25) 柴田　進，高橋　浩：臨床化学の技術，1963，金原出版，東京
26) 斉藤正行：光電比色計による臨床化学検査，1952，南山堂
27) 島薗順雄ほか編集：病気の生化学，代謝異常Ⅲ，132，1973，中山書店
28) 尾立源二ほか：日本公衛誌，18，240，1971
29) 大塚博康ほか：日本公衛誌，18，241，1971
30) 石館敬三ほか：公衆衛生，33，360，1969
31) 小笠原　公ほか：東京衛研年報，24，311，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 265—271, 1975

東京都における降下煤塵及び亜硫酸ガス等の動態について

佐藤泰仁* 牧野国義* 狩野文雄* 大沢誠喜*
福田雅夫* 多田宇宏* 青木実* 溝口勲*
野牛弘*

Changes Noted in the Amount of Falldust and Sulfurous Acid Gas in Tokyo Area

YASUHITO SATO*, KUNIYOSHI MAKINO*, FUMIO KANO*, MASANOBU OSAWA*,
MASAO FUKUDA*, TAKAHIRO TADA*, MINORU AOKI*,
ISAO MIZOGUCHI* and HIROSHI YAGYU*

We have studied on changing of amounts of fall dust and sulfurous acid gas, and changing of PH value of solution which was poured into dust jar in Tokyo area.

The amounts of fall dust and sulfurous acid gas have decreased in Tokyo and other cities in the last few years, but, these amounts are still concentrated in an industrial area even these days. The PH value of the solution was recently changed somewhat to neutrality, comparing with the PH value which we got five years ago. The changes were caused by decreasing the amounts of sulfurous acid gas.

はじめに

今日では公害という言葉が日常語となり，ほとんどの都市の共通した課題となって，大気汚染だけに限っても，その測定資料は枚挙にいとまがなく，すでに効果的な対策が立てられているところもある．東京都における大気汚染調査は，現在連続自動分析装置により，種々の汚染質の濃度測定がなされている．

今回報告する降下煤塵量，アルカリ沪紙法による亜硫酸ガス濃度は前述の方法とは異なり，1ケ月の平均的濃度をみるためのものである．降下煤塵量の測定は，大気汚染調査として日本国内のみならず，諸外国各都市においても古くから行なわれており，当部では昭和29年12月より開始し，今までにも斉藤等[1-8]脇坂等[9-11]中野等[12]によって報告がなされている．また，亜硫酸ガスの濃度調査については，1ケ月間の概略的な平均濃度を測定する目的で，昭和32年より建築局及び首都整備局で二酸化鉛法を採用し，測定を続けて来ていたが，昭和41年より当所が担当し，昭和47年4月より測定方法をアルカリ沪紙法に切り換え継続中である．

また，最近問題となっている酸性雨に関連して，降下煤塵計に捕集された溶液のPH値の測定は，3年間の中断があったが，昭和41年より行なっている．

そこで我々は，最近5ケ年間のデータをもとに降下煤塵量，亜硫酸ガス濃度等の動態について解析を試み，若干の考察を得たので報告する．

測定場所及び測定方法

降下煤塵等の測定場所はFig. 1に示す如く1区1地点の割合で現在28ケ所で行なっており，測定位置は主として保健所や区役所等の公共建造物の屋上である．

降下煤塵量の測定は簡易降下煤塵計（口径15cmの広口ビン）を使用し，このビンの底部に予め少量の硫酸銅を加えた蒸留水を入れて藻類の発生を防ぎ，1ケ月毎に回収し，これについて不溶性成分，可溶性成分，更に熱灼減量（有機成分），灰分（無機成分）をそれぞれ分析定量して，これを1 km^2 当り30日間の降下煤塵量（ton）に換算し，表示している．

また，亜硫酸ガスの測定場所は降下煤塵と同じ位置であり，測定方法としてはアルカリ沪紙法で行なっている．これは5 cm×13cmの沪紙に30%炭酸カリウムを浸漬して乾燥させた捕集紙を，ブリキ製シェルター内に垂

* 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

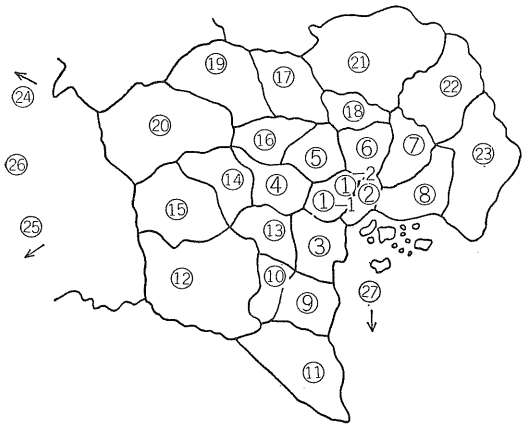


Fig. 1 Sampling place

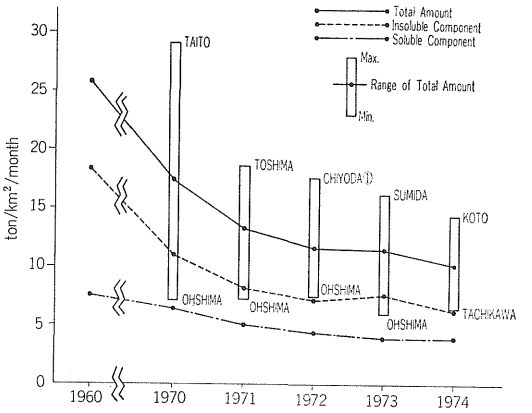


Fig. 2 Chronological transition of Fall dust Amount

No.	WARD	NAME OF SAMPLING POINT
①—1	CHIYODA	KOJIMACHI Health Center
①—2	CHIYODA	KANDA Health Center
②	CHUO	CHUO Health Center
③	MINATO	MINATO Ward office AZABU Branch Office
④	SHINJUKU	Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
⑤	BUNKYO	KOISHIKAWA Health Center
⑥	TAITO	TAITO Childrens Welfare Office
⑦	SUMIDA	SUMIDA Ward Office MUKOJIMA Branch Office
⑧	KOTO	JOTO Health Center
⑨	SHINAGAWA	OSAKI Junior School
⑩	MEGURO	HIMONYA Health Center
⑪	OHTA	KOJIYA Health Center
⑫	SETAGAYA	SETAGAYA Maternity and Child Health Institute
⑬	SHIBUYA	SHIBUYA Health Center
⑭	NAKANO	NAKANO Metropolitan Taxation Office
⑮	SUGINAMI	SUGINAMI-NISHI Health Center
⑯	TOSHIMA	IKEBUKURO Health Center
⑰	KITA	AKABANE Health Center
⑱	ARAKAWA	ARAKAWA Science Laboratory
⑲	ITABASHI	DAINIHON INK Co Ltd.
⑳	NERIMA	NERIMA Bureau of Public Cleansing
㉑	ADACHI	ADACHI Agricultural Corporation
㉒	KATSUSHIKA	KATSUSHIKA Citizens Center
㉓	EDOGAWA	EDOGAWA Social Insurance Branch Office
㉔	OHME	OHME Health Center
㉕	HACHIOJI	HACHIOJI The First Elementary School
㉖	TACHIKAWA	TACHIKAWA Health Center
㉗	OHSHIMA	CHUO Health Center Ohshima Branch Office

下し，大気中に放置，暴露する．これについても１ケ月後に回収し，クロラニル酸バリウムの発色（吸光度530 nm）を比色定量分析して，沪紙100cm² 当り，１日に付着する亜硫酸ガスを無水硫酸の重量として計算式により求め，mg SO_3/day/100cm² を単位として表示する．

更にＰＨ値については，降下煤塵計に捕集された溶液を沪過し，その沪液についてＰＨメーターにより測定を行なっている．

結果及び考察

1) 降下煤塵量について

東京都における年度別の降下煤塵の推移をみるために，最近5年間における，28測定地点の平均値でプロットしてみたのがFig.2である．そして最近5年間の量と比較する意味で1960年における降下煤塵量を示してあるが，この時期は日本における燃料革命の時であり，石炭から石油への移行により，その使用比率が5：5になって，この頃より，降下煤塵が減少する兆をみせている．

最近においても降下煤塵は年々，減少傾向にあり，あまり増減がなく，なお漸減している．そして図からも明らかなように，可溶性成分よりも不溶性成分が激減しており，不溶性成分と可溶性成分の比率が1960年代では7：3であった[10]が，最近のそれは6：4になっている．そして不溶性成分に占める無機分，有機分の比率は7：3でどの測定点でもほぼ同じ比率であるが，可溶性成分においては，場所によっては無機分の占める割合が少ないところが城西地区にみられるが，その比率は5：5となっている．

又，総量における最大値と最小値の差，つまりRangeについてみてみると，年々小さくなっており，最大値を示す地区は年々変っているが，最小値の地区は1974年は立川地区に変っているが，大島地区と大差がない．

そして降下煤塵の総量としてのプラトー値はこの最小値であると推定される．

このように東京における降下煤塵は量的には十数年前の1/2程度になっているものの，まだ10ton前後はあり，又，不溶性成分と可溶性成分の割合において，その比率が変化していることは，降下煤塵の質的変化（大気中の

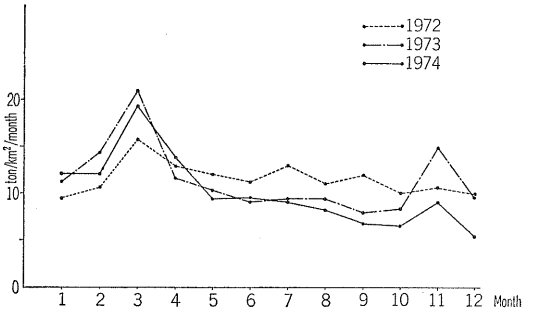


Fig. 3　Monthly transition of Fall dust amount in 1972, 1973 and 1974

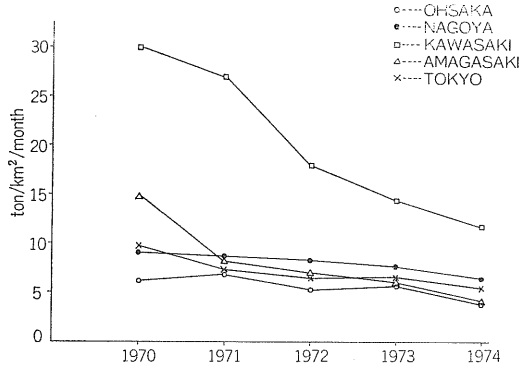


Fig.4　Chronological transition of Fall dust amount in each city

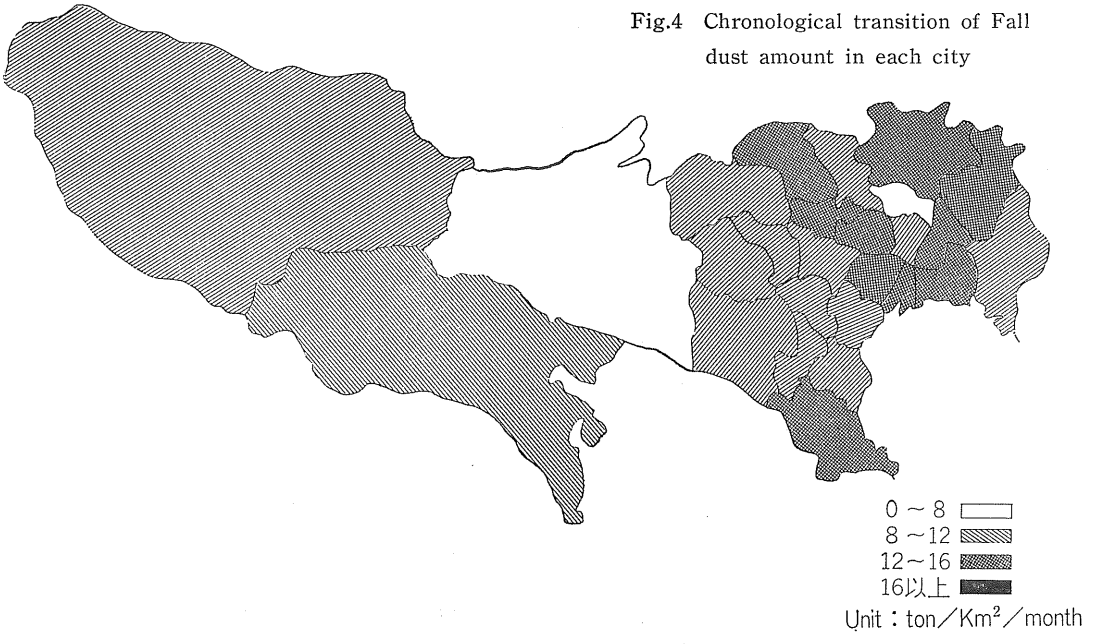


Fig. 5　Distribution of Fall dust amount　—Average of Total amount in 1972, 1973 and 1974—

Table. 1 Correlation coefficient between Fall dust factor and Weather Index

Weather Index	Fall dust Factor	1970	1971	1972	1973	1974
Humidity	Total Amount	—0.590*	—0.161	0.098	—0.588*	0.348
	Insoluble Component	—0.645*	—0.466	—0.415	—0.659*	—0.553
	Soluble Component	—0.032	0.689**	0.745**	0.340	0.527
Wind velocity (Average)	Total Amount	0.588*	0.601*	0.658*	0.482	0.541
	Insoluble Component	0.639*	0.633*	0.565	0.502	0.598*
	Soluble Component	0.043	0.179*	—0.033	—0.082	0.046
Wind velocity (Maximum)	Total Amount	0.322	0.552	0.540	0.293	0.755**
	Insoluble Component	0.356	0.383	0.322	0.376	0.683**
	Soluble Component	0.003	0.655*	0.191	—0.411	0.565
Precipitation	Total Amount	—0.289	—0.108	0.138	—0.461	—0.171
	Insoluble Component	—0.483	—0.371	—0.408	—0.581*	—0.376
	Soluble Component	0.488	0.607*	0.785**	0.592*	0.600*

n=12 Significant Level
1 %……**
5 %……*

水溶性粒状物の増加）によるものと思われる．

次に，経年変化をみるために，最近3年間のデータをプロットしてみるとFig. 3 の如くである．これからみて明らかに春の時期及び冬にピークがみられ，これは後述するように気象条件によるものと推察された．つまり，風速等による影響で，春は“春一番”といわれるように強風の日が多く，地上等の堆積物が舞い上げられ，捕集されるためである．

そして月変化の傾向は十数年前の報告[10,11]と変らず，最近は総量は減ってきたが，月変化は同じパターンで動いていると言えよう．

東京都における測定地点の分布は，特別区いわゆる23区内に集中し，特別区より面積が広い三多摩地区にそれぞれ1ケ所であり，更に，工業地区として代表的な地区が少ないために，平均値＝東京都全体の平均とみなすには多少無理があるが，この値を我が国主要都市における降下煤塵量と比べたのがFig .4 である．東京，大阪はダストジャー法，その他の都市はデポジット法と，測定法の相異からくる差異を考慮しなければならない．

斉藤[8,13]によればダストジャー法はデポジット法より1.8倍程値が大きく出るとしている．従って，東京都及び大阪の値は1.8で割って用いている．

各都市とも年々減少傾向にあることは図からも明らかであり，川崎を除く他の諸都市は，総量として同じ位であることがわかる．

次に，東京都における濃度分布をみるために，最近3年間の総量の平均値を用いて濃度分布を Fig. 5 に示した．図より汚染地区をあげれば，都心部及び城東地区，城北地区の一部と大田区である．東京は用途地域制が明確でない混在地域であるが，工場が比較的多い地区及び交通量の多い地区等が降下煤塵の多い地域であるといえよう．

更に以前の報告[12]により関係あるとみられる気象因子と降下煤塵量の関係について，相関係数により解析したのが Table. 1 である．

この表から，降下煤塵中の可溶性成分は，降雨量との関係が各年とも強いことがみられ，また，降下煤塵の総量及び不溶性成分は，平均風速に対して相関があるが，1974年においては最大風速とも強い相関を示しており，降下煤塵というものは，降雨量及び風速に左右される汚染指標であると言える．

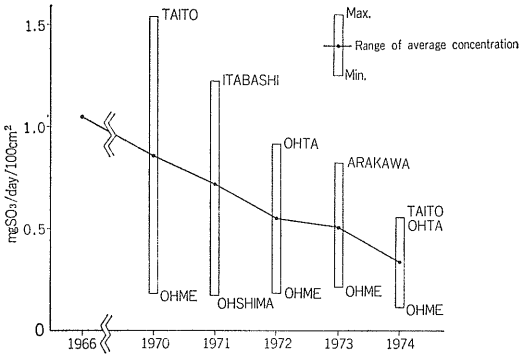


Fig. 6 Chronological transition of Sulfurous acid gas concentration

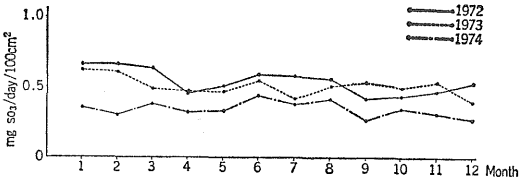


Fig. 7　Monthly transition of Sulfurous acid gas concentration in 1972, 1973 and 1974

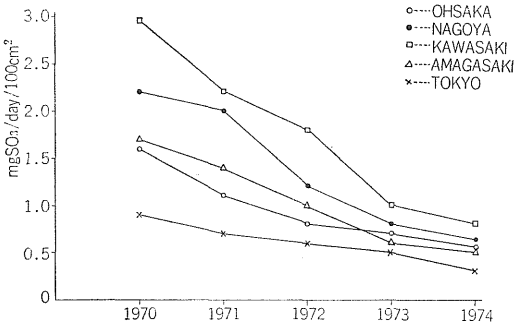


Fig. 8　Chronological transition of Sulfurous acid gas concentration in each city

2)　亜硫酸ガス濃度について

降下煤塵量と同様に，最近5年間の推移をみるために，27地点の平均値をプロットしたのがFig. 6である．亜硫酸ガス濃度についても年々減少傾向にあり，10年前の $^1/_3$ 程度になっている．ちなみに亜硫酸ガス濃度の単位 mg SO_3/day/100cm² が1の時は，月平均値0.05ppmに相当することが以前の調査の結果[14]から得られており，ppm濃度に換算すると0.02ppm前後であり，東京都公害局が行なっている電気伝導度法の調査結果[15]と大差ない濃度である．

そして濃度の Range から判断する地区別の動向については，降下煤塵と同様の傾向を示している．Fig. 7は経年変化をみたものであるが，顕著なピークはみられなく，一年間ほぼ一定の濃度を示している．これには，この測定法が1ケ月間の平均値を示すものであり，瞬時の変化がとらえにくいため，月平均では地域差が clear であるが，seasonal variation はあまり一定していないことを示すものと考えられる．

次に，他の諸都市と比べてみたのがFig. 8である．これについても東京以外は二酸化鉛法であり測定法の相異からくる差異が考えられたが，菅野等[16]の報告及び，我々が測定方法を切り換える際の調査[17]により十分な互換性が確かめられているので，そのままの値を用いて比較を行なった．これをみると，他都市においても減少傾向にあり，東京はその中でも一番低い．そして，最近2，3年は各都市とも低い値を示しており，各都市間の差が少なくなりつつある．これは各都市とも硫黄酸化物濃度の低減につとめ，低硫黄の重油等を使用しているためと思われる．

次に，濃度分布をみるために，最近3年間の平均値により Fig. 9 に示したが，ほとんどが 0.6mg SO_3/day/100cm² 以下であるが，この中で高い地区としては，大

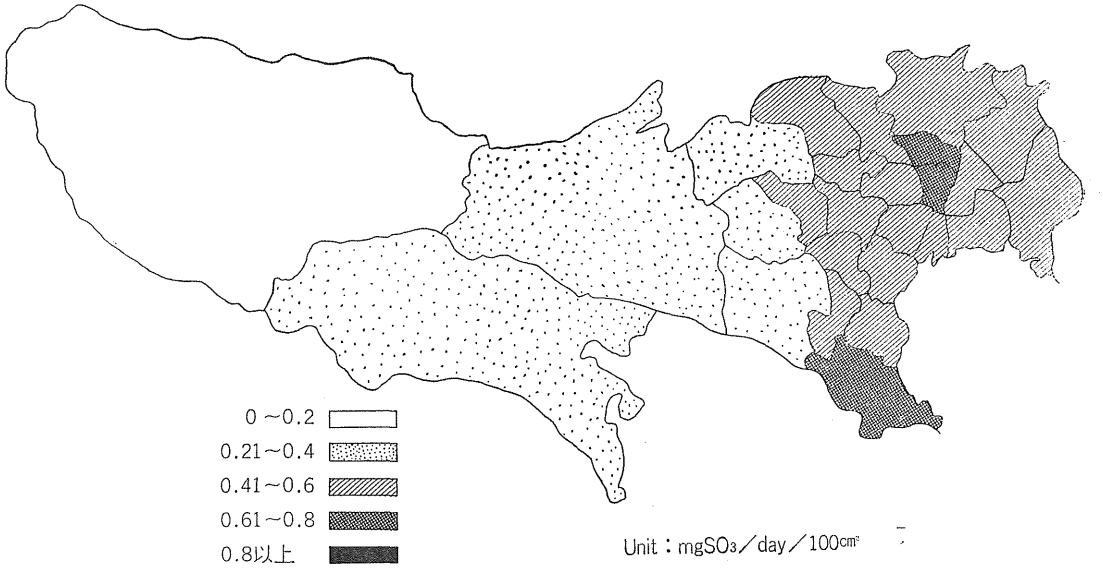


Fig. 9　Distribution of Sulfurous acid gas concentration　—Average concentration in 1972, 1973 and 1974—

Table. 2 Correlation coefficient between measurement using Alkali paper method and Electric conductivity method

Place	1972	1973	1974
CHIYODA-1	0.791**	0.197	—0.095
SHINJUKU	—0.531	—0.392	—0.308
KOTO	—0.053	—0.156	—0.031
OHTA	0.145	0.723**	—0.590*
SETAGAYA	0.026	0.385	0.096
SHIBUYA	0.273	0.117	0.605*
ITABASHI	0.793**	0.311	—0.380
ARAKAWA	—0.062	0.500	0.324
EDOGAWA	0.264	—0.051	—0.494
HACHIOJI	0.423	—0.449	0.043
TACHIKAWA	0.371	0.557*	—0.434
OHME	—	0.407	0.121
NERIMA	—	0.158	0.139
NAKANO	—	—0.836**	0.406

n=12 Significant Level
**..... 1 % *..... 5 %

田，台東，荒川地区である．この地区は東京における工場等が多く混在しており，工場からの排出ガスの影響と推察される．

我々の測定は，前述したようにアルカリ沪紙法であり，大きな機材の必要がなく，手法としては容易であり，多点の測定が可能である利点があるので，東京都公害局が行なっている電気伝導度法との値[15]の比較をするために相関係数により，その関係をみたのがTable. 2である．これによると，全測定点では両者にあまり関係がなくみられるが，工場等が多い汚染地域及び商業地域においては，両者間に有意な相関が認められており，比較的汚染の進んでいる地域の測定として，アルカリ沪紙法がより有効であると言えよう．

3) PH値について

昨今，酸性雨等が問題となっているが，雨水のPH値を継続測定した報告はない．我々は降下煤塵計に捕集された溶液について，PH値の測定を行なっているが，以前のデーターと比較してみたのがTable. 3である．

降下煤塵計設置前の溶液のPH値は5.6前後にあり，1ケ月間の放置の間に，各種の酸性ガス，ミスト，エアロゾル等が捕集され，変化するのであるが，5年前に比べPH値が若干高くなっていることがみられ，PH値4.0以上に属する地域がふえていることがわかる．しかし，場所によっては最近の方が低くなっているところもあり，より長期間測定することにより地域特性がつかめるものと思われる．PH値の変化に強く影響していることの原因として，前述したように低硫黄重油の使用による亜硫酸ガス濃度の逓減であろうと思われたので，亜硫酸ガス濃度とPH値の相関をTable. 4に示した．

これをみると，両者の間が負相関であるのは当然であるが，8，9月を除くすべての月において有意水準5％以上の相関を示していることから，亜硫酸ガスをはじめ，その他の酸性ガスに影響されていると言える．

又，PH値の変動を左右していると思われた降下煤塵の可溶性成分量との間には，有意な相関を示していない．

結　語

今回の解析の結果，降下煤塵等の動向は大要次の如くである．

1) 降下煤塵量及び亜硫酸ガス濃度は年々減少傾向にあり，降下煤塵量についてはプラトーに近づいている．そして，昭和49年の平均降下煤塵量は 10.1ton/km²/month であり，平均亜硫酸ガス濃度は0.34mg SO_3/day/100cm² である．

2) 不溶性成分の減り方が大きいために，降下煤塵に占める可溶性成分の割合が増えている．

3) 都内での汚染地域としては，従来よりの工場密集地域及び商業地域（都心部）である．

4) 亜硫酸ガス濃度については季節変化がみられないが，降下煤塵量は季節的には春及び冬に高いパターンを示しているが，工場地域の一部には夏にも高い値を示している．

5) 都内におけるPH値の平均は4.1にあり，5年前より若干上がっている．これには，亜硫酸ガス濃度の低

Table. 3 Comparison of PH value between 1969 and 1974

1969		1974	
PH	WARD	PH	WARD
3.5	ARAKAWA	3.7	OHTA
3.6	CHIYODA-2		ARAKAWA
3.7	OHTA	3.8	SUMIDA
	KITA	3.9	KOTO
	CHIYODA-1		SHINAGAWA
	CHUO		ADACHI
	MEGURO		SHIBUYA
3.8	TAITO		MEGURO
	SHIBUYA	4.0	KITA
	SHINJUKU		CHIYODA-2
3.9	ADACHI		CHUO
	EDOGAWA		NAKANO
	MINATO		SETAGAYA
	BUNKYO	4.1	ITABASHI
	TOSHIMA		EDOGAWA
	SETAGAYA		MINATO
4.0	SHINAGAWA		SHINJUKU
	ITABASHI		SUGINAMI
	NAKANO		TACHIKAWA
4.1	SUMIDA	4.2	BUNKYO
	KATSUSHIKA		NERIMA
	SUGINAMI	4.3	CHIYODA-1
4.2	KOTO		TAITO
4.3	OHSHIMA		HACHIOJI
4.4	NERIMA	4.4	TOSHIMA
	TACHIKAWA		OHSHIMA
4.6	OHME	4.5	KATSUSHIKA
4.9	HACHIOJI	5.0	OHME

Table. 4 Correlation coefficient between Sulfurous acid gas and PH value

MOnth		
1974		
6	—0.423	*
7	—0.639	**
8	—0.170	
9	—0.226	
10	—0.416	*
11	—0.705	**
12	—0.834	**
1975		
1	—0.656	**
2	—0.582	**
3	—0.491	**
4	—0.471	**
5	—0.408	*

n=27 Significant Level
1 %……**
5 %……*

下が原因と考えられる.

(本研究の概要は大気汚染研究全国協議会第16回大会1975年11月で発表した.)

文　献

1) 斉藤功, 両角清, 小林正武, 中山袈裟典, 大坪正一：東京衛研年報, 6, 51, 1954
2) 斉藤功, 両角清, 小林正武, 中山袈裟典：東京衛研年報, 7, 30, 1955
3) 斉藤功, 両角清, 小林正武：東京衛研年報, 8, 35, 1956
4) 斉藤功, 小林正武, 斉藤喜佐夫, 鈴木堯子：東京衛研年報, 9, 59, 1957
5) 斉藤功, 小林正武, 中山袈裟典, 斉藤喜佐夫, 鈴木堯子：東京衛研年報, 10, 45, 1958
6) 斉藤功, 両角清, 小林正武, 中山袈裟典, 鈴木堯子：東京衛研年報, 11, 60, 1959
7) 斉藤功, 両角清, 小林正武, 中山袈裟典, 鈴木堯子：東京衛研年報, 12, 71, 1960
8) 斉藤功, 両角清, 小林正武, 中山袈裟典, 加納堯子中野欣嗣, 瀬戸孝博, 林貞雄, 青木実：東京衛研年報, 13, 55, 1961
9) 脇坂一郎, 両角清, 小林正武, 中山袈裟典, 加納堯子, 中野欣嗣, 瀬戸孝博, 林貞雄, 青木実：東京衛研年報, 14, 62, 1962
10) 脇坂一郎, 瀬戸孝博, 両角清, 小林正武, 中野欣嗣, 中山袈裟典, 加納堯子：東京衛研年報, 15, 66, 1963
11) 脇坂一郎, 両角清, 小林正武, 中野欣嗣, 瀬戸孝博中山袈裟典：東京衛研年報, 16, 72, 1964
12) 中野欣嗣, 瀬戸孝博, 山崎爽治, 泉川碩雄, 東京衛研年報, 18, 121, 1966
13) 斉藤功：公衆衛生, 26(3), 48, 1962
14) 野牛弘：未発表資料
15) 東京都公害局監視部：大気汚染常時測定室測定結果報告（昭和47年度版, 昭和48年度版, 昭和49年度版）
16) 日本公衆衛生協会：大気汚染測定法研究報告書第3報, 25, 1964.3
17) 狩野文雄：未発表資料

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 272—276, 1975

大気中浮遊粉塵の EDX による組成分析（第1報）

佐藤泰仁* 溝口 勲*

Component Analysis of Suspended Particulate Matters in Atmosphere by EDXI

YASUHITO SATO* and ISAO MIZOGUCHI*

We tried to analyze suspended particulate matters in atmosphere using Electron microscope with Energy Dispersive X-ray Analyser (E.D.X.). Not only the components of matters but also those shapes could be studied without destroying them.

Using this method, we found that suspended sulfureous particulate matter was the most common in atmosphere over Tokyo area, and also found that this analytical method was great in a component analysis of particules.

はじめに

大気汚染において，現在最も問題視されているのは，主としてガス状物質についてであるが，粒子状物質の人体に対する障害は，諸外国における事例（ロンドン事件，ドノラ事件）[1,2]や実験[3,4]によっても知られている．我が国において，重金属の汚染問題が提起された1970年以来，大気汚染としての浮遊微粒子中に含まれている重金属等の汚染状況の把握のため，重金属の地域分布[5-10]やカスケードインパクターやアンダーセンサンプラーを用いた粒度分布と含有重金属の関係をみた研究[7-10]などがある．

しかし，大気汚染として有害作用をもつと考えられる粒子状物質の組成を粒子の形態と共に，系統的に研究した報告[11]は少ない．

近年，電子顕微鏡（Electron Microscope 以下略して E.M. と記す）とX線検出用半導体素子を用いた，エネルギー分散形X線分析装置（Energy Dispersive X-Ray Analyser 以下略して EDX と記す）との組み合わせによって，超微粒子の元素組成分析が可能になったので，著者らは，浮遊粉塵の解析に有効な手法であるかについて確認するために，これらの装置を用いて，浮遊粉塵の組成分析及び形態，粒径の観察を行なった．

測定方法

1） 試料の捕集及び作成

前もってクリーニングしておいたカバーグラスを約40度に傾け，その上部より2％コロジオン溶液をスポイトにて滴下してコロジオン膜を張った．この場合のコロジオン膜の厚さは800～1000Å位である．そしてこのカバーグラスを労研式塵埃計（慣性衝突捕集式サンプラー）に装着して，大気を 1.5～3 *l* 吸引し浮遊粉塵を捕集する．

次にサンプリングしたカバーグラスから水の表面張力を利用して，コロジオン膜をはがし，水面上に浮かせた後，シートメッシュをつけたスライドグラスですくって，試料をシートメッシュ上に移し，37°C の乾燥器に1時間入れて乾燥させる．更に，乾燥したシートメッシュのコロジオン膜補強のために，真空蒸着装置を用い，カーボンを試料の裏面よりコーティングして電顕用試料とした。

2） 分析方法

分析に用いた装置は，㈱日本電子製走査透過形電子顕微鏡 100B にエネルギー分散形X線検出器（EDX）を取り付けたものである．

Fig. 1 にこの装置のブロックダイヤグラムを示したが，EDXのX線検知部は Si の純度の高い単結晶に Li をドリフトしたものであり，分解能と S/N 比をよくするため－170°C に冷却してある．

上記により作成した試料について，透過及び透過走査像で粒径及び形態について観察し，次に個々の粒子に電子線を照射し，それから得られる各元素の特性X線スペクトルにより組成分析を行なった．尚，試料は試料からの特性X線を有効に Detector で捕えるため，電子線に

* 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

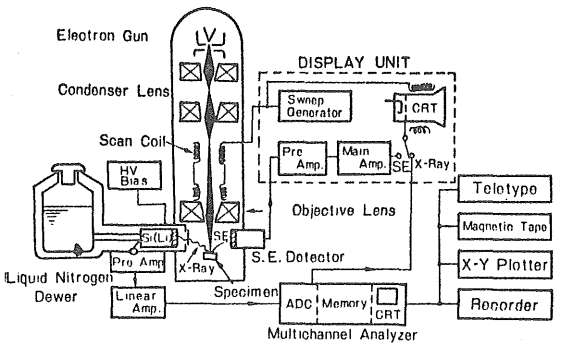


Fig. 1　Block diagram of EDX

対して30度の傾きをつけて行ない，EMの加速電圧は40 kV 及び 60kV である．

観察結果及び考察

今回のEMの使用条件及び試料作成条件で，EMの倍率は透過像においては1万倍の観察が可能であったが，透過走査像では1万倍にして電子線を Spot 照射すると，コロジオン膜が破れてしまい，カーボンコーティングの厚さを増すか，トリアホール等での膜補強を考えねばならないと思われた．しかし，上述の試料作成条件でも可能な方法として，5千倍及び1万倍の透過像で粒状物の形態を観察し，3千倍の透過走査像についてEDX分析を試み，特性X線のエネルギー表により，その定性を行なった．

分析例の中からいくつかの電顕像及び矢印の粒子のEDX分析スペクトルを示したのが Fig. 2 から Fig. 5 である．

今回は地域差等をみたわけではないが，Fig. 2 は葛飾区でサンプリングしたものであり，矢印の粒子からはS，Cl，Ni，Zn のスペクトルが得られた．EDXスペクトルの写真中，VS:とは Vertical Scale を示しており，同じ高さにおいては，その数字が小さいほどスペクトルエネルギーが大きいことを意味している．更に，写真の右上に 27285INT とあるのは，ある分析時間における特性X線エネルギーの積分値を示している．従って，分析時間を同じくすることによりエネルギーの積分値から，元素組成の相対的な濃度（強度）が推定される．尚 Fig. 3 は八王子市でのサンプル，Fig. 4 は杉並区，Fig. 5 は練馬区でのサンプルで，写真倍率は5千倍である．

今回の分析では，特性X線の Kα，Kβ 線が 10KeV 下の元素，つまり Na から Zn までの確認しかしなかったが，ミクロン以上の粒子の組成は単一というのは少なく，図に示すように数種の元素より構成されていることがわかった．そして，全サンプルから検出された元素は，Na，Mg，Al，Si，S，Cl，K，Ca，Fe，Ni，Zn 等であり，地殻の元素存在度（クラーク数）より判断して Si，Fe，Al が多いものと思われたが，多くの試料にみられたのがSのスペクトルであった．このことは粉塵中には硫黄化合物としての粒子状物質が多いことを示しているものと思われる．又，形態については，Fig.4，Fig. 5 にもみられるように，排気ガスからと思われるカーボンブラックの粒子は判断しやすいが，その他の粒状物については既存の資料[12]とも違う色々の形状を示しており，高倍率での可能性を検討し，解析したいと思っている．

今回の試料においては，通常分析時間が5分あればよく，更に倍率を高くすれば1～3分でも十分なスペクトルが得られたが，ミクロン以下の粒子についてのX線エネルギースペクトルの分布を得るには，10分程度の分析時間が必要であり，途中でコロジオン膜が破れてしまうこともあり，今後の検討課題となった．又，今回の試料作成条件では，走査透過像においては3千倍が限度で，1万倍にすると像が不鮮明になり，形態についての詳細な観察は不可能であった．

尚，E.M.の加速電圧を 40kV に下げて観察を行ない良好な結果が得られたので Fig. 6, Fig. 7 として掲載しておくが，これは試料の作成条件は今回の報告と同じで，高倍の透過走査像についてEDXスペクトルを撮ったものである．加速電圧が高いことは，試料に対する電子線の透過能には利点であるが，今回のように膜の安定性を重視する場合は，むしろ 40kV の方が好ましいと言える．

最後に今回の観察においては，電顕用のシートメッシュに銅を使用したため，粉塵中の銅の定性は行なえなかった．そこで一部ステンレス製のシートメッシュによる観察を試みたが，ステンレスメッシュは表面が平らでなく，鋼を交叉した織物様になっており，コロジオン膜がうまく張れず，また張れても凹凸があるため焦点がとれなく観察不可能であった．これらについては，今後別のメッシュ（Ni，Mo，W，Nylon，Carbon）等を使って検討したい．以上，今までの組成分析は破壊分析が主であったのに比べ，EDX分析は，まだ感度及び分解能に問題は残すものの，粉塵の形態そのままの状態で元素分析が可能であることの確認ができ，今後，多くのデータの積みかさねにより検討したいと思っている．

結　語

今回の観察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)　試料作成において，コロジオン膜補強のカーボン

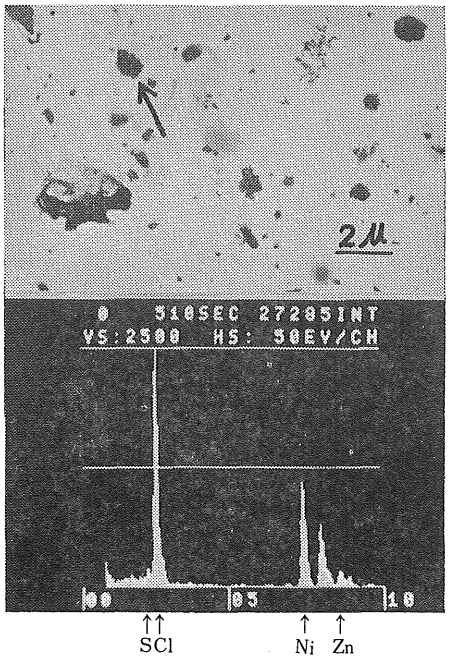


Fig. 2 Spectrum of EDX
→ Analyzed particle

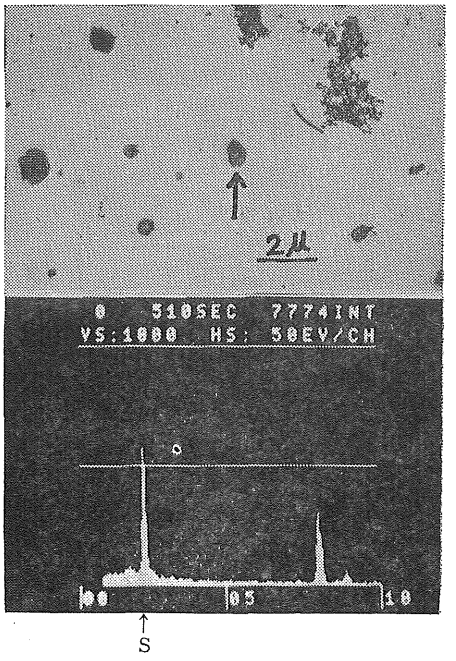


Fig. 3 Spectrum of EDX
→ Analyzed particle

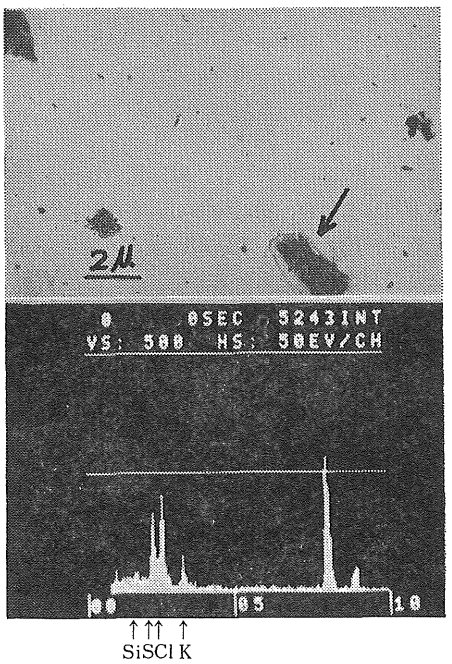


Fig. 4 Spectrum of EDX
→ Analyzed particle

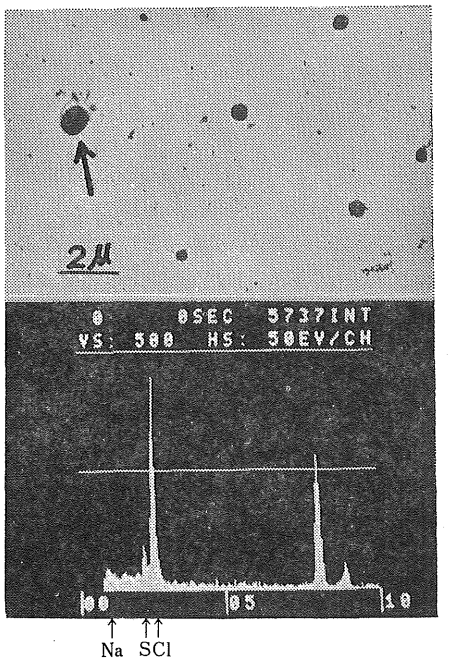
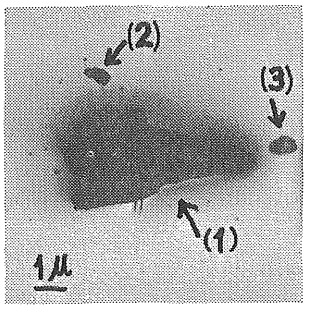
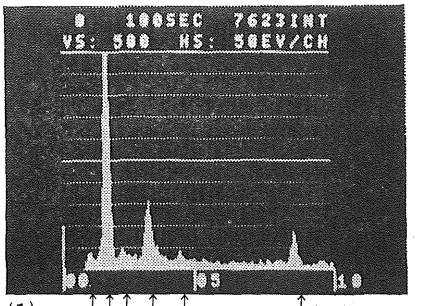


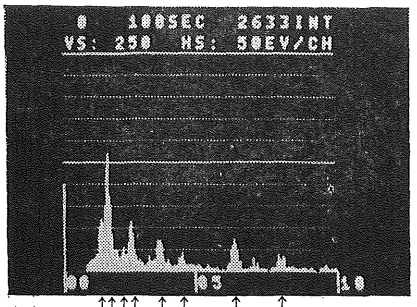
Fig. 5 Spectrum of EDX
→Analyzed particle



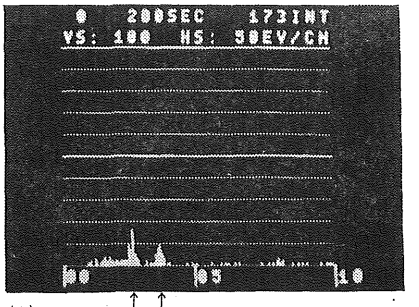
(×5000)



(1) NaSiS K Ti Zn

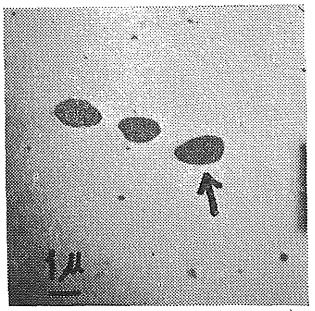


(2) AlSiSCl K Ti Fe Zn

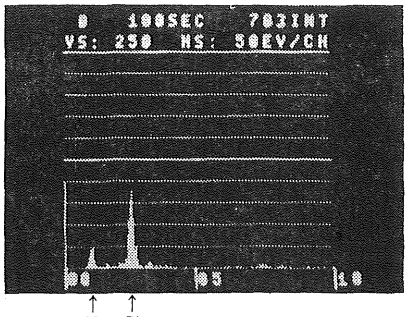


(3) Cl Ca

Fig. 6 Spectrum of EDX → Analyzed particle (1).(2).(3)



(×5000)



Na Cl

Fig. 7 Spectrum of EDX → Analyzed particle

は，試料の表面よりコーティングすると，シャドウイングになるとともに，カーボン膜が破れ，粒状物の観察には適当でなかった．

(2) 今回の分析条件では，特性X線のエネルギーが10KeV 以下の組成については，比較的ＥＤＸスペクトルが得やすい．

(3) 大気中浮遊粉塵の組成としては，Sをはじめ Si, Cl が多く存在している．

(4) ミクロン以上の粒子の組成は単一というのは少なく，数種の元素より構成されている．

謝辞 本研究にあたり，多大の御指導をいただいた，当所乳肉衛生研究科前木吾市主任研究員に深謝いたします．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「大気中の浮遊粉塵に関する調査研究」の一部として実施し，概要は大気汚染研究全国協議会第15回大会1974年11月で発表した．）

参考文献

1) Stern, A. C.: *Air Pollution*, volume I, 1968, Academic press
2) 三浦豊彦：大気汚染からみた環境破壊の歴史，労働科学叢書39，労働科学研究所
3) 外山敏夫：光化学反応による大気汚染に関する学術講演会講演集，97，1972
4) 大気汚染研究全国協議会：大気汚染研究，8(1)，19，1973
5) 永田倫子，広野富雄，山崎博，朝来野国彦，中野欣嗣，大平俊男：東京都公害研究所年報，3，3，1972
6) 舟島正直，朝来野国彦，広野富雄，大平俊男：東京都公害研究所年報，5，11，1974
7) 大気汚染研究全国協議会：大気汚染研究，6(1)，83，213，1971
8) 大気汚染研究全国協議会：大気汚染研究，7(2)，81，1972
9) 大気汚染研究全国協議会：大気汚染研究，8(3)，184，392，1973
10) 大気汚染研究全国協議会：大気汚染研究，9(2)，185，1972
11) 本間克典：*The Hitachi Scientific Instrument News*, 16(6)，28—32，1973
12) McCrone, W. C. and Delly, J. G.: *The Particle Atlas*, Edition Two, volume Ⅲ, ann arbor science publishers
13) 内山郁，渡辺融，紀本静雄著：X線マイクロアナライザ，第4版，日刊工業
14) 日本電子顕微鏡学会関東支部：電子顕微鏡試料技術集，初版，誠文堂新光社
15) 電子顕微鏡学会編：電子顕微鏡の理論と応用(Ⅰ)，1966，丸善
16) 高橋幹二：基礎エアロゾル工学，1972，養賢堂
17) 串田弘：電子顕微鏡の試料作成法，6，1971，ニューサイエンス社
18) 水渡英二，滝山一善：電子顕微鏡分析，30，1971，東京化学同人

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.* 26-1, 277—279, 1975

母体血および臍帯血中 PCB の測定

秋山和幸* 藤谷和正* 高橋利恵子*
大井玄* 野牛弘*

Polychlorinated Biphenyl Residues in Maternal and Cord Blood

KAZUYUKI AKIYAMA*, KAZUMASA FUJITANI*, RIEKO TAKAHASHI*,
GEN OHI* and HIROSHI YAGYU*

PCB levels were determined with maternal and cord blood at the time of delivery.

Gas Chromatographic patterns of PCB residues found in the samples of mother-baby pair were almost identical, and this suggests that the placenta permits rather indiscriminate transmission of the organochlorine compounds of closely related chemical structure.

The cord blood in general showed lower PCB levels on both whole and fat basis than those in the maternal blood. No correlation was noticeable on statistical basis as regards the concentrations of PCBs between the cord and maternal blood.

緒　言

ポリ塩化ビフェニール（以下 PCB と略す）による環境汚染は，Jensen[1]，日本では立川[2]らの報告以来，数多くの調査により，広範囲で一般人の身体[3-5]にも及んでいる事が明らかになっている．

現在の日本の人体汚染レベルは血液中約 0.003ppm，脂肪組織中約 3ppm，母乳では 0.03ppm 前後の値が一般的である．

胎児の場合は胎盤を通して母体から栄養を摂り入れており，その際有害物質は胎盤関門によりある程度移行が制限され，生体の防衛機構が働いている．しかしこの関門は必ずしも有効ではなく，既に胎児の段階から化学物質による汚染を受けていることが報告されている[6]．

PCB が現在の汚染レベルでどの程度の人体影響を及ぼすか明らかではないが，胎児は一般に酵素系，薬物代謝系や感受性が母体とは異なり抵抗性も弱いと考えられ，胎内での化学物質による汚染は油症患者における "black baby" の問題[7,8]にも見られるように母子衛生上大きな問題である．

この調査は都民の母子衛生上の基礎資料として母体と胎児の PCB 汚染レベルを把握し，併せて胎盤などにおける物質移動等に関する知見を得ることを目的として，母体血および臍帯血中の PCB を測定したものである．

試料および方法

調査は1973年12月より74年2月の間，都内のある病院で出産した一般人から採取した母体静脈血と臍帯血24組を対象とした．試料は測定時まで約1個月間，約5°に保存した．

分析方法

厚生省分析研究班の方法[9]に準拠し，試薬は主に関東化学KK製の PCB 測定用のものを用いた．フロリジルは 60～100mesh のものを 600°で24時間加熱活性化し，シリカゲルは Wakogel S-1 を 140°，72時間加熱活性化し，デシケータ中室温で保存したものを使用した．

先ず，試料約 20g を 50ml の遠沈管に採り，エタノール 20ml を加えて振り混ぜ，苛性カリ 5g を加え，水浴上で1時間加熱還流して加水分解後，n-ヘキサン 20ml で抽出を3回繰り返し，n-ヘキサン層を合わせ，水 20 ml で3回洗い，硫酸ナトリウムカラムを通して乾燥した後，Kuderna-Danish 濃縮装置で 1～2 ml まで濃縮した．

次に，直径 10mm，長さ 40cm のクロマトカラムにフロリジル 2g とシリカゲル 3g および硫酸ナトリウム 1g を n-ヘキサン中で重層し，試料液 1～2ml を載せ，n-ヘキサンで溶出し，最初のフラクション180ml を採り，KD 濃縮装置で濃縮，1ml にした．

* 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

これに濃硫酸約1 m*l* を加え，振盪後 n-ヘキサン層を取り，苛性カリ1粒を加えて中和した後，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条件： 機種：島津5A型，検出器：ECD (^{63}Ni) Puls 500Hz 8μsec 50V，カラム：2% OV-1 on Gas Chrom Q 80/100mesh 2m×3 mm (glass)，注入温度：220°，カラム温度：200°，検出器温度：250°，キャリアーガス：N_2 60m*l*/min.

濃度の数値化は鵜川らの方法[10]によった．尚，計算は1～3，12，13および26番の各ピークを除外して行ない残りのピークを100%として換算した．

血液中脂質の測定は，Bragdon の方法[11]に準拠した．即ち，試料約2 gをクロロホルム—メタノール (2：1) で抽出し，水洗後溶媒を揮散させ重量を秤り，総脂質量とした．

結果および考察

得られた結果を図および表に示したが，ガスクロパターンは体脂肪中のものと類似しており，KC-500乃至600に相当する．塩素含有量は約53%と計算されKC-500の54%に近似している．

母体血と臍帯血の組合わせでガスクロパターンは良く一致し，従って個々の PCB の化学構造の違いによる胎盤透過性の差は認められない．

全血基準の PCB 濃度は，母体血中平均2.8ppb，臍帯中平均1.1ppb で母体血中が約3倍と高く，危険率1%以下で有意差が認められた．

PCB は周知のように親油性の難分解性物質であるから体内では脂質と行動を共にするところが多いと思われ，血中脂質濃度を同時に測定したところ，血液中脂質量は母体血が臍帯血の約2倍で，これから血液脂質基準の PCB 濃度は，母体血中平均0.36ppm，臍帯血中平均0.22ppmとなり，やはり危険率1%以下で有意差が認められた．

ここに得られた測定値をこれまでの報告と比較すると，母体血中濃度は増田[12]，高松[13]，阿部[14]，中島[15]，道口[16]の一般人の値と一致し，母体血中および臍帯血中濃度は共に楢府[17]と同程度であった．

楢府は母体血および臍帯血の PCB 濃度に高い相関 ($r=0.972$) を認めているが，われわれのこの度の調査では相関は認められなかった．(全血基準 $r=-0.177$，脂質基準 $r=-0.039$) この点について BHC，DDT など他の有機塩素化合物[6,18]の場合も一定の結果は得られていない．

血液中 PCB 濃度に母子間の差がみられ，ある程度胎盤関門が働いているものと思われるが，量的な面はこの調査では明らかでない．これについて喜多村ら[19]はマウ

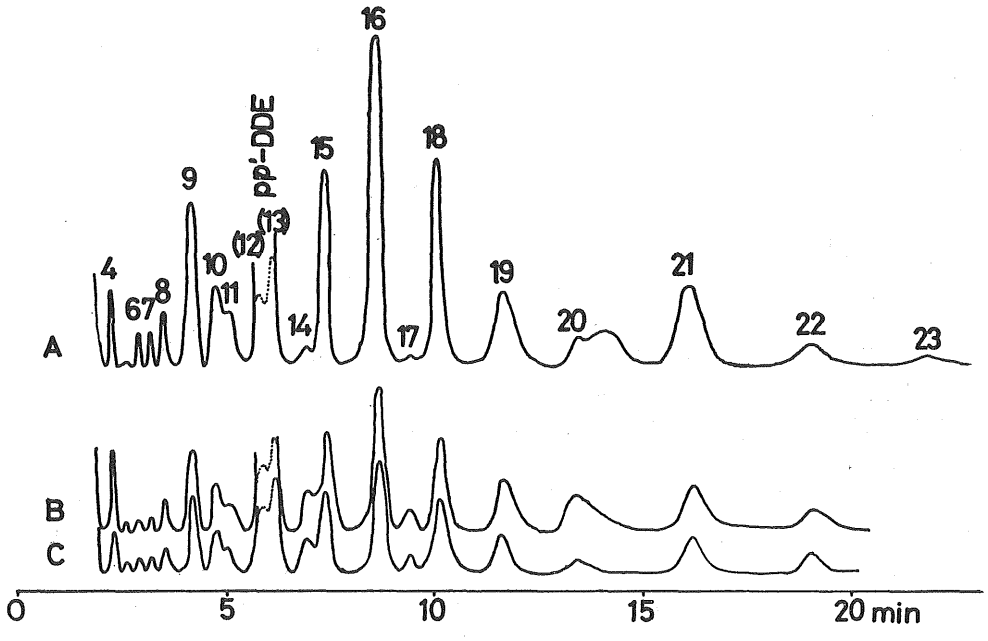


Fig. 1 Gas Chromatographic Patterns of PCB Residues
A : Maternal blood
B, C : Cord blood of twins

Table 1 PCB Levels of Maternal and Cord Blood

Case	Whole Blood Basis (ppb)		Fat Basis (ppm)	
	M.	C.	M.	C.
1	3.5	——	0.42	——
2	2.6	1.5	0.18	0.31
3	2.0	0.9	——	0.23
4	3.3	——	0.35	——
5	3.9	0.3	0.41	0.06
6	4.5	1.6	0.53	0.33
7	1.6	0.7	0.25	0.13
8	2.4	0.7	0.30	0.14
9	2.1	0.9*	0.23	0.22*
		0.6*		0.16*
10	4.2	0.6	0.57	0.17
11	0.3	1.4	0.05	——
12	3.0	0.9	——	0.22
13	1.8	1.2	0.29	0.24
14	1.4	0.8	0.19	0.13
15	1.0	0.4	0.14	0.06
16	1.9	0.8	0.28	0.25
17	2.9	1.3	0.39	0.24
18	——	1.2	——	0.36
19	3.6	1.2	0.43	0.17
20	——	0.8	——	0.22
21	2.6	3.3	0.65	0.35
22	7.6	0.3	0.80	0.08
23	1.8	1.6	0.23	0.49
24	3.5	0.8	0.43	0.21
Av.	2.8	1.1	0.36	0.22
S.D.	1.5	0.6	0.18	0.10

* Twins

スへの投与実験により，母の体内量の約10%，投与量の0.9%が胎仔に移行することを報告している．PCB など化学物質による生体汚染は，かなり長期にわたることが予想され，今後も推移を見守って行く必要があろう．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「PCB による環境汚染に関する調査研究」の一部として実施し，その概要は日本衛生学会第45回総会，1975年4月，で発表した．）

文　献

1) Jensen, S.: *New Scientist*, 32, 612, 1966
2) 立川涼，磯野直秀：自然，26, 30, 1971
3) 水谷民雄，松本正義，藤原邦達：医学のあゆみ，81, 666, 1972
4) 日高公雄，大江武，藤原邦達：食衛誌，13, 227, 1972
5) 小林寛，大浦敏，千田逸郎：食衛誌，13, 523, 1972
6) O'Leary, J. A., Davies, J. E., Reich, G. A. and Edmundson, W. F.: Amer. *J. Obster. Gynec.*, 107, 65, 1970
7) 船津維一郎，山下文雄，吉兼尚，他13名：日本新生児学会雑誌，5, (4), 250, 1969
8) 山口敦子，吉村健清，倉恒匡徳：福岡医学雑誌，62, (1), 117, 1971
9) 厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班報告，1972
10) 鵜川昌弘，中村彰夫，樫本隆：食衛誌，14, 415, 1973
11) 日本臨床病理学会編：脂質定量法の実際，41, 1972 金原出版
12) 増田義人，高田真由美，倉恒匡徳：日衛誌，28,79, 1973
13) 高松誠，井上義人，阿部純子：日衛誌，28, 78, 1973
14) 阿部純子，井上義人，高松誠：日衛誌，29, 93, 1974
15) 中島裕而，星出道代，梅田玄勝，奥田孝範，八木邦子，天野松男：第47回日本産業衛生学会，第16回日本産業医協議会講演集，258, 1974
16) Doguchi, M. and Fukano, S.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 13, 57, 1975
17) 楢府直大：愛知県衛生研究所報，23, 1, 1973
18) 山岸達典，竹葉和江，藤本千鶴，吉岡政雄，森本キミ，春田三佐夫：臨床栄養，41, 209, 1972
19) 喜田村正次，早川清子，柴田孝子，平野郁雄：日衛誌，28, 70, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 280—288, 1975

都内興行場で集められたゴミの中のダニ，昆虫相

中田英吉* 千種 翠*

Mite and Insect Fauna in Dusts collected from Seats and Floors of Theaters in Tokyo

EIKICHI NAKADA* and MIDORI CHIGUSA*

Dust samples were collected from seats and floors of ten theaters in Tokyo for examinations of mites and insects. The samples were collected with a vacuum sweeper, separated into fine parts and coarse parts with a sieve (No. 28 of Tyler mesh, opening : 0.59mm). The insects on the coarse parts were collected directly under a magnifying glass, while mites and insects in the fine dust were first washed with a small amount of detergent, and then separated by the floatation method with saturated sodium chloride solution using Wildman-flask or the centrifuging-apparatus. The mites and insects isolated on the surface of the solution were collected on filter papers and picked up on slide glasses with a needle. The species and numbers of mites and insects found in these dust samples are as shown in Table 4 and 5.

At least 31 species belonging to 18 families of mites were identified to be contained in the dust of theaters. The most common species were *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus*, *Tarsonemus* sp. and *Cosmochthonius* sp.. Considerable numbers of the tropical rat mite, *Ornithonyssus bacoti*, were recovered from one of the theaters. The mites of the families Pyroglyphidae and Tarsonemidae were more abundant on the seats than on the floors, while Psocoptera insects were collected mostly from the floors.

A statistical analysis was made on the mite and insect fauna of various localities using the method of Sokal and Sneath (1963). The dendrograms of correlation coefficients and distance coefficients of seats and floors showed that the seats of the inside and the outside of show-halls had somewhat similar characters. All underground theaters formed a group on the dendrogram of correlation coefficients of ten theaters.

室内塵の中には，皮膚炎の原因となる吸血性のイエダニ，気管支喘息および皮膚炎の原因と考えられるチリダニ類などが存在することが知られている．日本では，全国各地，台湾の家屋内の室内塵につき，有機溶媒分画法によってダニ相をしらべ，統計分析した研究（大島，1970)[1]があり，各種学校（大島，1964)，コンクリートアパートの家屋（大島，1967）などの室内塵の研究をまとめた総説（大島，1971 a)[2]，新築団地についての調査（大島ら，1971 b)[3]などが報告されている．

筆者らは，1973年に都内の興行場でゴミを集め，その中のダニ，昆虫をしらべた．それらをまとめ，大島（1968，1970）の統計分析法を参考にして，多少変えた解析を試みた．今後の調査への資料の意味も含めて報告する．

1. ゴミの採集と検査

1.1 材料と方法

昭和48年1月中旬に都内10ケ所の興行場で，映写場内の客席，床，映写場外の客席，床および売店附近の床の計5ケ所について，日立電気掃除機R—H1300 (550W，集塵用紙袋を用いて集めるもの）で，各個所について2袋ずつゴミを採集した．採集時間はゴミの量により変動があり，例外的に長いものがあったが，各個所について掃除機の実動時間は5分程度であった．採集したゴミは持ち帰って約6°Cの冷蔵室に保存した．

検査時に，28メッシュ篩（目の開き0.59mm）で大ゴミと小ゴミに分け，大ゴミは肉眼，拡大鏡で検査した．小ゴミは，1袋はワイルドマンフラスコを使用して，ゴミに中性洗剤（ライポンF粉剤）の0.2% 以下の水溶液

* 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

Table 1. Taxa and numbers of Acarina collected from dusts of seats and floors in ten theaters, Tokyo, January 1973.

No. of theater	Inside of show-hall		Outside of show-hall		Floor of food-stand
	Seat	Floor	Seat	Floor	
1	*D. pteronyssinus* ♀ 2 ♂ 1 P 1	*T. putrescentiae* ♀ 1	Tarsonemidae ♀ 13 **D. pteronyssinus* D 1 *Dermato.* sp. L 2 *E. maynei* ♂ 1 unknown 1	*Haplochthonius* sp. 3 Oppiidae 1	Parasitoidea ♂ 1
2	**D. pteronyssinus* ♀ 1		*O. bacoti* ♀ 1 *K. plumosus* ♀ 1 Tarsonemidae ♀ 1 *T. putrescentiae* ♀ 2 *Saproglyphus* sp. ♂ 1 *D. pteronyssinus* ♀ 1, ♂ 2, D 1 *D. farinae* ♀ 8, ♂ 14, D 2, P 6 *Cosmochthonius* sp. 1	*M. (B.) keegani* ♀ 1 *?Proctolaelaps hypudaei* ♀ 1 *?T. putrescentiae* ?♀ 1	*Typhlodromus (A.)* sp. ♀ 1 unknown L 1
3				Tarsonemidae ♀ 1 *D. pteronyssinus* ♂ 1	*Typhlodromus (A.)* sp. ♀ 1 ?Tenuipalpidae 1
4			*D. farinae* D 1	*D. pteronyssinus* ♂ 1, D 1 *Haplochthonius* sp. 1	
5	Tarsonemidae ♀ 4 *D. pteronyssinus* ♀ 2 ♂ 1, D 1, P 1 *D. farinae* ♂ 1, P 1 *E. maynei* D 1, N 1				*Kleemania* sp. ♀ 1 Tydeidae N 1 **T. putrescentiae* ♀ 1, ♂ 1
6	Tarsonemidae ♀ 1 *T. putrescentiae* ♂ 1 *D. pteronyssinus* ♂ 1 *D. farinae* ♂ 1 *Dermato.* sp. L 1		*O. bacoti* P 1 *T. putrescentiae* ♂ 1	*Cosmochthonius* sp. 2	*Oribatula* sp. 1
7	*O. bacoti* P 1 Tarsonemidae ♀ 1 **D. pteronyssinus* ♀ 1 *D. farinae* P 1	*Cosmochthonius* sp. 1	*O. bacoti* ♂ 1, P 1 *M. (B.) keegani* ♀ 1 Ascidae ♀ 1 *Histiostoma* sp. 1	*O. bacoti* * ♀ 1, ♂ 2 Tydeidae N 1 **Histiostoma* sp. ?♀ 1 *Chorto. arcuatus* ♂ 1	*O. bacoti* ♀ 2, ♂ 1 *M. (B.) keegani* ♀ 1 *Melichares (B.)* sp. ♀ 1 Phytoseiidae ♀ 1

			T. putrescentiae ♀ 1 *Cosmochthonius* sp. 2	*D. farinae* ♂ 1 *Cosmochthonius* sp. 1 Oribatei 1	Cheyletidae ♂ 1 *D. pteronyssinus* ♀ 1 *D. farinae* ♂ 1 *E. maynei* ♂ 1 *Cosmochthonius* sp. 11 *Peloribates* sp. 1
8	?*Hemitarsonemus latus* ♀ 1 Tarsonemidae ♀ 4 *Histiostoma* sp. 1 *Chorto. arcuatus* ♂ 1, N 2 *D. pteronyssinus* ♀ 2 ♂ 7, D 3 *D. farinae* ♂ 3, D 1, P 4, N 2 *Dermato.* sp. D 1, L 1 *Cosmochthonius* sp. 1		Tarsonemidae ♀ 2 *D. pteronyssinus* ♂ 1		*M. (B.) keegani* ♀ 4 *Melichares (B.)* sp. ♀ 1 *Lasioseius* sp. ♀ 3 ?*P. hypudaei* ♀ 1 *Phytoseiidae* ♀ 1 Tydeidae 7 *C. lepidopterorum* ♀ 1 *L. konoi* hypopus 1 *D. pteronyssinus* ♀ 1, ♂ 1 *D. farinae* P 1, N 1 *Cosmochthonius* sp. 1 *Haplochthonius* sp. 1 Oribatei P 1
9	Tarsonemidae ♀ 1 ?*Cheyletus* sp. 1 *D. pteronyssinus* ♂ 6, P 1 *D. farinae* P 1 *E. maynei* ♀ 1, ♂ 1	*Typhlodromus (A.)* sp. ♀ 1 *D. pteronyssinus* ♂ 1 *D. farinae* ♂ 2, P 1		Phytoseiidae ♂ 1 *Cheyletus* sp. ♀ 1 *E. maynei* ♀ 1 *Cosmochthonius* sp. 4	*Laelapidae P 1
10	Tarsonemidae ♀ 22, ♂ 1 *Chorto. arcuatus* ♂ 1 *D. pteronyssinus* ♀ 3, ♂ 2, D 3, P 2 *D. farinae* ♀ 1, ♂ 6, D 2, P 3 *Dermato.* sp. N 2, L 1 *Hirstia domicola* ♂ 1 *E. maynei* ♀ 1, P 1	?*Panonychus citri* ♀ 1 *Cheyletus malaccensis* ♂ 1 Cheyletidae ♂ 1 *D. farinae* ♀ 1, ♂ 1 *Cosmochthonius* sp. 1	*K. plumosus* ♂ 1 *T. putrescentiae* ♀ 1 *D. pteronyssinus* ♀ 1 *D. farinae* P 2	*K. plumosus* ♀ 1	*O. bacoti* P 1 *Typhlodromus (A.)* sp. ♀ 1, L 1 *Cheyletus* sp. ♂ 1 *C. lepidopterorum* ♀ 1 *D. pteronyssinus* ♀ 1, D 1, P 1 *D. farinae* P 1, N 1

Note : *……Individuals regarded as living.
D……Deutonymph, being not hypopus P……Protonymph L……Larva N……Nymph
D.……Dermatophagoides T.……Tyrophagus E.……Euroglyphus K.……Kleemania O.……Ornithonyssus
M. (B.)……Melichares (Blattisocius) Typhlodromus (A.)……Typhlodromus (Amblyseius) Chorto.……Chortoglyphus
P.……Proctolaelaps C.……Cheletomorpha L.……Lardoglyphus

を加えて混合し，10～20分程度放置した後，沈澱物を残して液を全部吸引濾過して浮遊物を取出し，残りの沈澱物には飽和食塩水を加えて攪拌し，30分以上放置して液の上部を吸引濾過して浮遊物を取出した．それぞれの浮遊物から実体顕微鏡により虫を採取した．他の1袋は，容量 50c.c. の遠心管を用いてゴミをライポンF 0.2%以下の水溶液と混合し，遠心分離機により 1500 rpm 10分，2500 rpm 10分の割合で遠心分離し，沈澱物を残して液を吸引濾過し，沈澱物には飽和食塩水を加えて混合し，同様の操作で遠心分離し，液を吸引濾過し，それぞれの浮遊物を実体顕微鏡で検査した．

1.2 結果

採取されたダニを詳しく示したものが表1である．横の項目は映写場内の客席，床，映写場外の客席，床および売店床を示し，縦の項目は10ケ所の興行場の No.を示す．生きていると見なされたダニを＊印で示したが，これらは数が少なく，大部分が死骸であった．死骸の多くは，脚のないもの，毛の落ちたものなど不完全なものが多く，未成熟の幼若期のダニも多く取れた．表2，3に示す特徴のほかに，8番目の興行場の売店床で，中気門類，その他のダニの種類がやや多く取れた．

表2は，イエダニの数を10ケ所の興行場別に示したもので，7番の興行場がもっとも多くとれ，生きていると見なされたもの1匹と死骸8匹が発見された．

表3は，チリダニ科 Pyroglyphidae，ホコリダニ科 Tarsonemidae，チヤタテムシ Psocoptera の数について，客席，床別に示したものである．チリダニ類，ホコリダニ類が映写場内外の客席に多くとれ，チヤタテムシが売店附近の床，映写場外の床に多くとれた．

その他の昆虫類もまた，売店床，映写場外の床に多く見られた．

表4 aは生きていると見なされたダニの種類を表にしたもので，イエダニ *Ornithonyssus bacoti*，トゲダニ科 Laelapidae，ヒゲダニ属の1種 *Histiostoma* sp.，ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae*，ヤケヒヨウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* の合計9匹が採取された．

表4 b は，ダニの死骸についての表である．イエダニ11匹，*Melichares* (*Blattisocius*) *keegani* 7匹，*Proctolaelaps hypudaei* と思われるもの2匹，*Kleemania plumosus* 3匹，コハリダニ科 Tydeidae 9匹，ミカンハダニ *Panonychus citri* と思われるもの1匹，ツメダニ類には *Cheyletus malaccensis* 1匹，アシナガツメダニ *Cheletomorpha lepidopterorum* 2匹があり，ケナガコナダニ6～7匹，コウノホシカダニ *Lardoglyphus konoi* 1匹，*Chortoglyphus arcuatus* 5匹，チリダニ類にはヤケヒヨウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* 55匹，コナヒヨウヒダニ *D. farinae* 71匹，イエチリダニ *Hirstia domicola* 1匹，シワダニ *Euroglyphus maynei* 9匹，ササラダニ類にはカザリヒワダニの1種 *Cosmochthonius* sp. 25匹，ヒワダニ類の *Haplochthonius* sp. 5匹などが採取された．全部を合計すると307匹となった．

表5は，採取された昆虫，クモの種類を示し，すべて死骸であった．チヤバネゴキブリ *Blattella germanica* 8匹以上，ノコギリヒラタムシ *Oryzaephilus surina-*

Table 2. Numbers of *Ornithonyssus bacoti* in ten theaters, Tokyo, January 1973.

No. of theaters										Total
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	1	0	0	0	1	1*+8	0	0	1	12

*……An individual regarded as living.

Table 3. Distribution of Pyroglyphidae, Tarsonemidae and Psocoptera at seats and floors of ten theaters, Tokyo, January 1973.

	Inside of show-hall		Outside of show-hall		Floor of food-stand	Total
	Seat	Floor	Seat	Floor		
Pyroglyphidae	2*+79	6	1*+42	5	12	147
Tarsonemidae	35	0	16	1	0	52
Psocoptera	0	14～	6～	46～	51～	117～

*……Individuals regarded as living.

Table 4. List of Acarina collected from dusts of ten theaters, Tokyo, January 1973.

a) Acarina, regarded as living

Ornithonyssus bacoti	1
Laelapidae	1
Histiostoma sp.	1
Tyrophagus putrescentiae	3
Dermatophagoides pteronyssinus	3
Total	9

b) Acarina, regarded as dead

Ornithonyssus bacoti	11
Melichares (Blattisocius) keegani	7
Melichares (Blattisocius) sp.	2
Lasioseius sp.	3
? *Proctolaelaps hypudaei*	2
Ascidae	1
Kleemania plumosus	3
Kleemania sp.	1
Typhlodromus (Amblyseius) sp.	5
Phytoseiidae	3
Parasitoidea	1
? *Hemitarsonemus latus*	1
Tarsonemidae	51
Tydeidae	9
? *Panonychus citri*	1
? Tenuipalpidae	1
Cheyletus malaccensis	1
Cheyletus sp.	2~3
Cheletomorpha lepidopterorum	2
Cheyletidae	2
Histiostoma sp.	2
Tyrophagus putrescentiae	6~7
Lardoglyphus konoi	1
Saproglyphus sp.	1
Chortoglyphus arcuatus	5
Dermatophagoides pteronyssinus	55
Dermatophagoides farinae	71
Dermatophagoides sp.	8
Hirstia domicola	1
Euroglyphus maynei	9
Cosmochthonius sp.	25
Haplochthonius sp.	5
Oppiidae	1
Oribatula sp.	1
Peloribates sp.	1
Oribatei	2
Unknown	2
Total	307

Table 5. List of Insecta* and Araneina*, collected from dusts of ten theaters, Tokyo, January 1973.

Blattella germanica	8~
Blattella germanica egg capsule	3
Blattidae, larva	3
Blattidae, egg capsule	1~
Oryzaephilus surinamensis, adult	17~
Tribolium castaneum, adult	8~
Gibbium psylloides, adult	22~
Pseudeurostus hilleri, adult	7
Ptinidae, adult	2
Coleoptera, larva	2
Tinea pellionella, larva	2
Tinea pellionella, silken case	(1)
Lepidoptera, larva	26~
Liposcelis bostrychophilus	1
? *Liposcelis subfuscus*	1
? *Liposcelis* sp.	1
Psocoptera	114~
? *Culex pipiens pallens*, adult	2
Culicidae, adult	15~
Psychodidae, adult	1
Collembola	1
Araneina	1
Total	238~

*……All were regarded as dead.

mensis 17匹以上，コクヌストモドキ *Tribolium castaneum* 8匹以上，セマルヒヨウホンムシ *Gibbium psylloides* 22匹以上，カバイロヒヨウホンムシ *Pseudeurostus hilleri* 7匹，イガ *Tinea pellionella* の幼虫2匹，鱗翅目 Lepidoptera の幼虫（頭の部分のみが採取され，イガまたはノシメマダラメイガと思われる）26匹以上，ヒラタチヤタテ *Liposcelis bostrychophilus* 1匹，Psocoptera（頭，体の断片が採取され，ヒラタチヤタテの類と思われる）114匹以上，その他アカイエカ成虫と思われるもの2匹，粘管目 Collembola 1匹，真正クモ目 Araneina 1匹などが発見された．

2. ダニ，昆虫全体についての統計学的分析

2.1 分析計算方法

Sokal and Sneath (1963, p. 290—312)[4] の計算方法に従い，今泉 (1969)[5]，大島ら (1968)[6] を参考にした．Original data matrix の OTU (operational taxonomic unit, 操作上の分類単位) には客席，床別または興行場別をとり，character (形質) にはダニ，昆虫の種類をとった．ただし1～2匹しかとれなかった数の少ない種類は除いた．数値は，ダニ，昆虫の発見された場所の数で現わした．場所は各興行場の客席，床別の

区分場所を意味する．この original data matrix から，それぞれ平均値，標準偏差を求め，数値を標準化し，それらについて correlation coefficient（相関係数），average distance coefficient（平均距離係数，distance coefficient 距離係数とも言い，平均の相違距離を現わす）を求めた．

相関係数については，Spearman's sums of variables formula を用い，WVGM（weighted variable-group method）によって分類群を形成し，距離係数については，それらの平均を用い，WPGM（weighted pair-group method）によって分類群を形成し，それぞれデンドログラムを作成した．

Table 6. Original data matrix for operational taxonomic units of five places (seats and floors) of theaters and twenty-six characters of Acarina and Insecta.

Characters	OTU				
Acarina & Insecta	A	B	C	D	E
O. bacoti	1	0	3	1	2
M. (B.) keegani	0	0	1	1	2
Others of Ascidae	0	0	1	1	2
Kleemania spp.	0	0	2	1	1
Phytoseiidae	0	1	0	1	5
Tarsonemidae	6	0	3	1	0
Tydeidae	0	0	0	1	2
Tetranychoidea	0	1	0	0	1
Cheyletidae	1	1	0	1	3
Histiostoma sp.	1	0	1	1	0
T. putrescentiae	1	1	4	1	1
C. arcuatus	2	0	0	1	0
D. pteronyssinus	8	1	4	2	3
D. farinae	6	2	3	1	3
E. maynei	3	0	1	1	1
Cosmochthonius sp.	1	2	2	3	2
Haplochthonius sp.	0	0	0	2	1
Others of Oribatei	0	0	0	2	3
Blattidae	0	1	2	4	4
O. surinamensis	0	0	0	3	4
T. castaneum	0	0	0	2	1
G. psylloides	0	1	0	6	3
P. hilleri	0	0	0	0	1
Lepidoptera	0	0	2	1	1～
Psocoptera	0	7～	5	8～	8
Culicidae	0	0	1	2	2

No.……Numbers of theaters in which Acarina and Insecta were discovered.
OTU……Operational taxonomic units
A……Seats of the inside of show-hall
B……Floors of the inside of show-hall
C……Seats of the outside of show-hall
D……Floors of the outside of show-hall
E……Floors of food-stands

Table 7. Correlation coefficients and distance coefficients between all pairs of OTU's of table 6.

	A	B	C	D	E
A	×	1.30	1.30	1.64	1.86
B	−0.31	×	1.23	1.30	1.45
C	0.01	−0.42	×	1.27	1.50
D	−0.50	−0.08	−0.28	×	1.12
E	−0.60	0.24	−0.46	0.03	×

Correlation coefficients are shown below principal diagonal, and distance coefficients above principal diagonal.　A, B, C, D, E……The same marks as in table 6.

2.2 結　果

OTU を客席，床別とした場合の original data matrix が表6である．

表6から計算によってえられた相関係数および距離係数の一覧表が表7である．強い相関が見られなかったが，映写場内の床（B）と売店床(E)の間の相関係数が0.24の値を示し，もっとも高く，次いで映写場外床(D)と売店床（E）が0.03，映写場内外の客席（A，C）が0.01の値を示した．距離係数では，値の小さいほど類似していることになるが，売店床（E）と場外床（D）が1.12でもっとも類似し，次いで場外客席（C）と場内床（B）が1.23となった．

Clustering method によりデンドログラムを作成したものが図1，2である．相関係数では，場内外の客席（A，C）が1群となり，売店床，場内床，場外床（E B，D）が大きな1群となった．距離係数では，売店床と場外床（E，D）が類似の1群，その他が大きな1群となった．

OTU を興行場別とした場合についても，同様の方法により，デンドログラムを作成した(図3，4)．相関係数（図3）では，地下興行場5ケ所全部と，No. 10 の興行場が大きな1群となる特徴を示した．距離係数(図4)では，はっきりした特徴が見られなかった．

3. 考　察

3.1 検査方法の考察

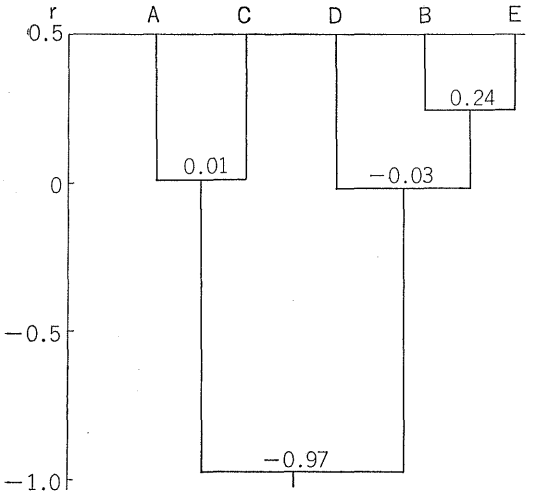


Fig. 1. Dendrogram of correlation coefficients (r) among seats and floors of theaters.
(Based on the WVGM clustering procedure, using Spearman's sums of variables method for calculating.)
A, B, C, D, E……The same marks as in table 6.

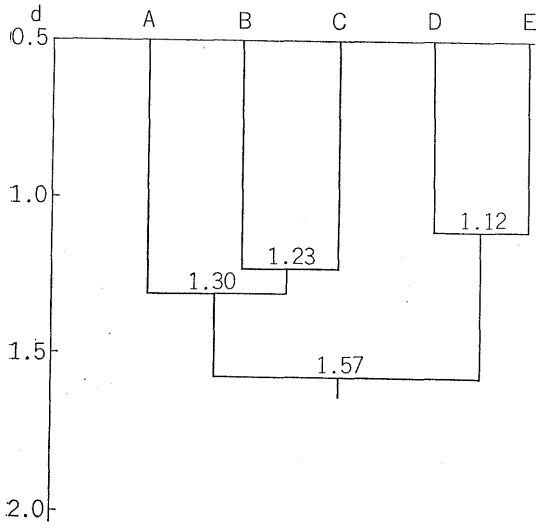


Fig. 2. Dendrogram of distance coefficients (d) among seats and floors of theaters.
(Based on the WPGM clustering procedure, using simple averages of distance coefficients for calculating.)
A, B, C, D, E……The same marks as in table 6.

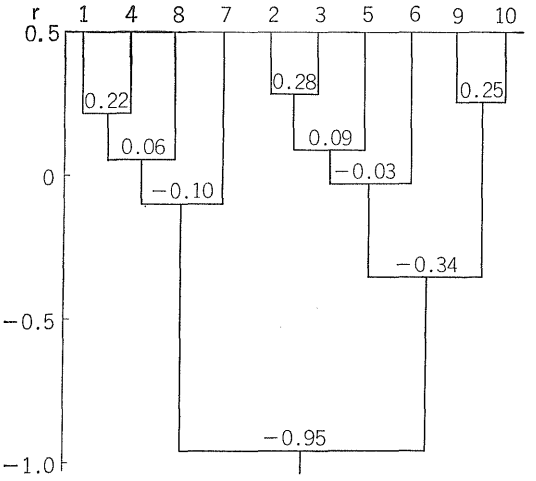


Fig. 3. Dendrogram of correlation coefficients (r) among ten theaters.
(The calculating method is the same as fig. 1's.)
No. 1, 4, 7, 8, 10……Theaters on the first floor or above.
No. 2, 3, 5, 6, 9……Underground theaters.

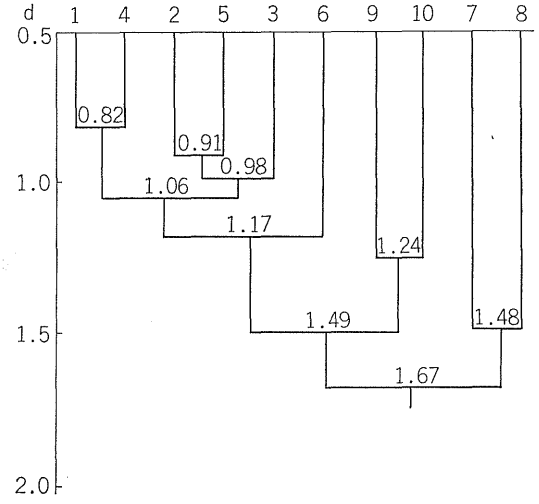


Fig. 4. Dendrogram of distance coefficients (d) among ten theaters.
(The calculating method is the same as fig. 2's.)
No. 1, 4, 7, 8, 10……Theaters on the first floor or above.
No. 2, 3, 5, 6, 9……Underground theaters.

28メッシュ篩で，大ゴミと小ゴミに分けたが，繊維性の綿状ゴミなどに付着した小型のダニおよび大型のダニが篩の上の大ゴミの方に残り，見落しのあったことは考えられる（Spieksma et al 1967[7]，大島1970，1971 a）.

またその他の検査工程の途中での若干のダニの紛失，顕微鏡下でのダニの検出の見落しが考えられる．

大島（1970, 1973[8]）の有機溶媒分画法では，高い比重（1.3～1.6）のところで多くのダニが検出されている．筆者らが中性洗剤ライポンF0.2%以下の水溶液(比重1.004以下）および飽和食塩水（比重1.2）を使用して検査した結果では，ライポンFの水溶液の浮遊物からも多量のダニが検出され，飽和食塩水の浮遊物よりも，より多くダニ，昆虫の死骸が検出される場合がしばしばあった．これはダニ，昆虫の死骸が気泡を含むためと思われる．ライポンF水溶液は煙草の吸殻などで茶色に濁る場合があったが，比重はあまり上がらないと思われる．後に多量の煙草の吸殻を中性洗剤の水溶液と混合して比重を測定したところ，1.016となった．飽和食塩水の沈澱物は捨てられたが，その中にダニ，昆虫の死骸が若干含まれることは，篠原ら（1970）[9]の報告からも考えられる．

筆者らの検査方法は一定の方式に従っているので，若干の見落しがあっても，各採集場所についてのダニ，昆虫の量的比較はある程度可能と考えられる．

3.2 検査結果についての考察

表2で，イエダニが7番の興行場に特に多くとれているが，これは虫の実数および虫の発見された場所数についての χ^2 検定で有意差となった．イエダニの宿主であるネズミがこの興行場にいることが考えられる．

表3で，ホコリダニ類が映写場内外の客席に多くとれたことは，虫の実数および虫の発見された場所数についての χ^2 検定で有意差となった．チリダニ類が映写場内外の客席に多いことおよびチヤタテムシが売店附近の床，映写場外の床に多いことは，虫の実数については有意差となったが，虫の発見された場所数については5%の危険率で有意差とならなかった．これは虫が上記の場所以外の所でも採取されたことを示す．

チヤタテムシを含めた昆虫類が，売店床，映写場外の床に多く見られたが，これは菓子，食品類，食品屑などが多いためと思われる．

3.3 ダニ，昆虫全体の統計分析についての考察

Character（形質）の項目で，1～2匹の数の少ない種類を除いたが，これは数の少ない種類に weight が強くかかりすぎるのを除くためである．また，数値に，ダニ，昆虫の発見された場所の数をとり，ダニ，昆虫の採取された実数を用いなかったが，これは1個所に多量のダニ，昆虫がとれたものの影響が過大になるのを防ぐためである．

売店床（E）と場外床（D）が，距離係数では，もっとも類似しているが，相関係数では，あまり相関が高くないのは，相関の逆転している部分があるためと思われる（表6）．

OTU 間の類似性，近親性をしらべるには，相関係数により相関を比較すると同時に，距離係数によって相互の相違の程度を比較し，両者を綜合して判断することが必要と思われる．

4. 総括

(1) 昭和48年1月中旬に，都内10ケ所の興行場において，映写場内の客席，床，映写場外の客席，床および売店附近の床の計5ケ所について，電気掃除機によりゴミを採集した．

(2) 検査方法は，28メッシュ篩で大ゴミと小ゴミに分け，大ゴミは肉眼，拡大鏡で検査し，小ゴミはワイルドマンフラスコおよび遠心分離機を用いて，水および飽和食塩水の浮遊物を取出し，それらを実体顕微鏡でしらべた．

(3) 採取されたダニおよび昆虫は，ほとんど死骸であり，生きていると見なされたものは少数のダニだけであった．ダニ類については，18科に属する少なくとも31種が採取された．

もっとも多く取れたものはチリダニ類，チヤタテムシ，ホコリダニであり，ササラダニ類の *Cosmochthonius* もやや多く見られた．食品や畳などに多いケナガコナダニは比較的少なかった．

イエダニが特定の1興行場に多く見られ，ホコリダニが客席に多いことは統計上の有意差として認められた．チリダニ類が客席に多いこと，チヤタテムシが売店床，映写場外の床に多いことは，虫の実数についての検定で有意差となった．

(4) ダニ，昆虫全体について，Sokal and Sneath（1963）の方法により統計学的分析を試みた．客席，床別についての相関係数および距離係数のデンドログラム（図1，2）から，映写場内外の客席がやや類似した性質をもち，売店床と映写場外の床がやや類似した性質をもつと考えられる．興行場別についての相関係数のデンドログラム（図3）では，1例外を含んで，地下の興行場が1群となる相関があった．

謝辞 本調査計画につき，援助をいただいた都立衛生研究所環境保健部長野牛弘博士，校閲の労をとられた東京大学医科学研究所佐々学教授，若干のダニの同定について援助をいただいた国立科学博物館浅沼靖博士，筑波大学大島司郎博士，横浜国立大学青木淳一博士に厚く感謝する．またゴミの採集について協力をいただいた保健所の方々に厚く感謝する．

(本研究の概要は第26回日本衛生動物学会東日本支部大会1974年11月で発表した.)

文　献

1) Oshima, S.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 21 (1), 1, 1970
2) 大島司郎：衛生動物学の進歩，第1集，203，1971 a，学術書出版会，東京
3) 大島司郎，杉田和子，中村譲，山本皎：横浜市衛生研究所年報，9，63，1971 b
4) Sokal, R. R. and Sneath, P. H. A.: *Principles of numerical taxonomy*, 1963, W. H. Freeman and Co., San Francisco
5) 今泉吉典：動物の分類，理論と実際，1969，第一法規出版，東京
6) 大島司郎，杉田和子，中村譲：横浜市衛生研究所年報，7，55，1968
7) Spieksma, F. Th. M. and Spieksma-Boezeman, M. I. A.: *Acarologia*, 9 (1), 226, 1967
8) 大島司郎：都市設備研究，4，20，1973
9) 篠原茂文，佐々学，宮本詢子，白坂昭子：衛生動物，21 (3)，166，1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 289—293, 1975

光化学スモッグによる自覚症状の変動
素因との関連における一考察

溝口 勲*

Changes of Subjective Signs caused by Photochemical Smog
A Study Concerning Predispositions of Students

ISAO MIZOGUCHI*

Changes in subjective signs of junior high school students related to photochemical smog were investigated. Frequencies of eye complaints, throat complaints, coughing, shortness of breath and headaches were significantly correlated with oxidants concentrations. In addition, orthostatic dysregulation group, allergic group and asthmatic group were picked out of these students. Respective percentages of complaints of these three groups were compared with each other in different ambient air conditions. Orthostatic dysregultion group was particular in having considerably more complaints than those of other groups. Allergic and asthmatic groups had a little more complaints of coughing and phlegm.

In order to carry forward the investigation, health diary survey methods and their sampling sizes were discussed.

光化学スモッグ時に目や咽頭の痛みや刺激感，咳や息苦しさ，さらには頭痛，だるさなどの自覚症状の訴えが増加することはロスアンゼルスでの調査[1]や，近年わが国でも行われはじめた調査[2-5]などであきらかにされてきている．そしてこれらの訴えの増加ともっとも関連の深い大気汚染物質は光化学オキシダントであり，次いで二酸化硫黄，浮遊粉じんおよび温度も一定の相関をもって特に急性的な影響を与えていることが統計学的検討から推測されている[2,6,7]．

一方光化学スモッグの呼吸機能に及ぼす実験疫学的な研究から，10乃至20パーセントの児童がオキシダントおよび温度に極めて敏感である ことが指摘されている[7]．しかしこの敏感なグループの特性はあきらかにされていない．またいわゆる光化学スモッグの重症被害者の臨床的調査から，重症被害者の相当部分は本人もしくは家族にアレルギー素因をもっていたことが報告されている[8-9]．

光化学スモッグの影響をうけやすい．すなわち敏感な集団の特性がつかまれれば，被害をより少なくするうえで対策樹立の一助ともなり得る．また被害のメカニズムを考えるうえで示唆するものが大きいと思われる．筆者は1974年5月から7月にかけて，世田谷区のある中学校で全校生徒515名の健康日記と大気汚染物質，気象要素の調査を行ない，資料を得た．光化学スモッグ時に自覚症状の訴えが増加する場合，素因や既往歴がどのように関連しているかという観点で解析して興味ある結果を得たので報告する．

調査方法

調査対象 世田谷区立八幡中学校生徒515名が調査対象として選ばれた．この学校は東京都心から西南に約13 km はなれた住宅街にある．北500mおよび南1kmに幹線道路があるのみで付近には工場などは全くなく，東京での典型的住宅地域の公立中学校で，生徒の90パーセントは学校から 1.5km 以内に居住している

自覚症状 自覚症状は健康日記に各生徒が毎日記入する方法で集め，その集計から訴症率を出して，調査期間における変動をみた．健康日記には表3にあるような眼が痛かった，眼が充血した，涙が出た，咳がでた，たんがでた，くしゃみがでた，息苦しかった，声がかれた，咽頭が痛かった，めまいがした，頭が痛かった，はきけがした，だるかった，腹が痛かった，下痢をしたの15項目の欄にチェックして記入させ，またその時間および場

* 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

所も記入するようになっている．したがって，この自覚症状の変動は日中におこったもののみを採っており，夜間のものは除外してある．健康日記は1月1冊で担任の先生に配布回収して頂いた．各生徒は2カ月間で2冊，61日間の日記のチェックを行なったわけである．

グループ分けの方法 調査対象515名に表1に示すような既往歴，素因などに関するアンケートを行なった．その各項目について Yes と答えた者の全校生徒にたいする比率は表1に示す通りである．このアンケートにもとづいて，アレルギー素因をもつものとしては，じんましんにかかったことがある，湿疹がよくできる喘息にかかったことがあるのいずれかに Yes と答えたものをまとめた．このなかで喘息の既往のあった者はまた別個にも一グループとして取りあつかった．さらに自律神経失調の一種である起立性調節障害（Orthostatic Dysregulation 以下 O.D.と略す）のグループ分けに表2のクライテリア[10]を用いた．これらは各人にあたっての診断は行なってなく，アンケートにもとづいたものであり基礎疾患のありなしはチェックされていない．

Table 1. Yes Ratios to All Students

Questionaires	%
1. Having fastidium	24
2. Liable to be tired	22
3. Liable to get carsick	19
4. Frequently having headaches	18
5. Frequently having sleep disturbance	14
6. Liable to feel ill under hateful circumstances	13
7. Liable to be irritated	12
8. Liable not to feel refreshed in the morning	11
9. Liable to feel dizzy	10
10. Having be attacked by urticaria	9
11. Liable to be looked pale	6
12. Frequently having eczema	5
13. Having be attacked asthma	4
14. Liable to feel ill in a long erect posture	3
15. Liable to palpitate or be short of breath after light exercises	3
16. Having loss of appetite	3

Table 2. Criteria for Grouping of Orthostatic Dysregulation Group

Major Signs		Minor Signs
3		0
or 2	+	1
or 1	+	3

Major signs : No. 6, 8, 9, 14 and 15 in questionnaires of Table 1. Minor signs : No. 2, 3, 4, 11 and 16.

環境要素 大気汚染物質としてはオゾン，オキシダント，二酸化窒素，一酸化窒素，二酸化硫黄，浮遊粉塵（光散乱法およびハイボリュームエアサンプラー法），

Table 3. Respective Complaints Percentages per Day of Each Groups

*P<0.05 **P<0.01

	All Students			O. D Group			Allergy Group			Asthma Group		
	Av.	High Ox	June 7.	Av.	High Ox	June 7.	Av.	High Ox	June 7.	Av.	High Ox	June 7.
Eye irritation	2.3	7.6**	21.9**	3.4	10.3**	31.9**	2.8	7.9**	20.5**	3.5	9.0	15.0*
Redness of Conjunctiva	0.3	0.4	0.6	1.3*	0.9	2.1	0.8	0.8	1.3	1.0	0.0	0.0
Watering of eye	0.5	1.1*	4.7**	1.5*	3.5	17.0**	0.7	1.1	5.3*	1.1	0.0	0.0
Cough	1.6	2.1	6.8**	9.1**	7.3	17.0*	3.1*	3.4	10.3**	6.0*	6.0	15.0
Phlegm	0.7	0.8	2.3	5.9**	6.0	8.5	2.1*	2.1	5.1*	4.3*	4.0	10.0
Sneeze	2.0	1.7	3.3	8.9**	7.3	6.4	3.1	2.7	2.6	6.7*	4.0	5.0
Shortness of breath	0.8	2.8*	8.4**	3.2**	6.0	12.8**	1.5	3.4	10.3**	2.0	3.0	5.0
Hoarseness	0.6	0.8	2.3*	3.4*	3.0	4.3	1.7	2.1	2.6	2.7*	4.0	5.0
Sore throat	1.2	3.5*	10.7**	3.7*	6.5	14.9**	2.0	2.7	6.4**	3.4	3.0	0.0
Vertigo	0.4	0.7	1.2	2.4**	1.3	0.0	1.2*	2.4	2.7	1.1	3.0	0.0
Headache	1.8	2.9	6.2**	9.0**	9.5	19.2*	3.5*	4.5	9.0*	3.1	3.0	0.0
Nausea	0.3	0.2	0.4	2.0**	1.7	2.1	0.8	0.5	2.6	1.0	0.0	0.0
Feeling of tired	1.1	1.3	1.9	5.8**	4.7	6.4	2.0	1.6	2.6	3.5	4.0	10.0
Abdominal pain	0.5	0.6	0.4	2.3*	2.1	2.6	0.7	0.8	1.3	0.8	0.0	0.0
Diarrhea	0.1	0.2	0.2	0.8	0.9	0.0	0.5	1.1	1.3	0.7	1.0	5.0

Av. : All examined days (May 20, '74——July 19, '74). High Ox : Days when Ox. Conc. rose above 0.15ppm (June 7, 15, 25, July 3, 9). On June 7, '74, Ox. Conc. in Tokyo exceeded 0.23ppm.

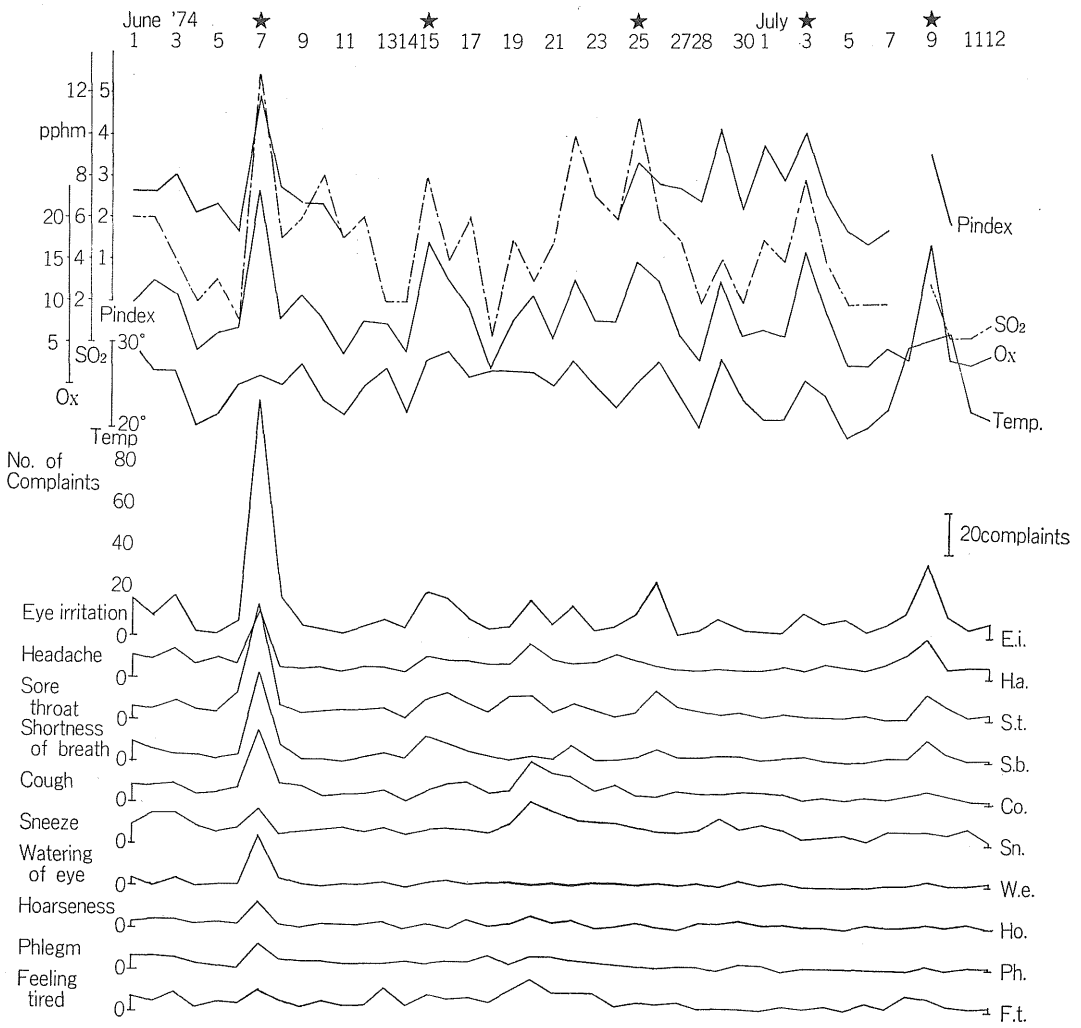


Fig. 1. Correspondence of Changes in Subjective Signs with Oxidants Concentrations

一酸化炭素，炭化水素，総アルデヒド，硫酸塩，硝酸塩を同校におかれた測定室で連日測定した．気象要素としては温度，湿度，日射量，風向，風速，視程を同時に同じ測定室で観測した．これらの測定データは原則として午前8時から午後5時までの一時間値の最高濃度を用いている．湿度と視程は日中の最低値を用いた．ハイボリュームエアサンプラーを使った浮遊粉塵，硫酸塩，硝酸塩は午前，午後の二回測定値のうちの高い値を用いた．

また汚染物質の総合指標としての Pindex[11] や不快指数も計算して用いた．

データ解析　健康日記に記入された各項目，各日のチェックを各々総計し，全調査期間を通じての1日当りの平均訴症率を計算した．またオキシダントが 0.15ppm をこえた5日間を高オキシダント日として，これらの日1日当りの平均訴症率を算出した．さらにオキシダントが一時間値で最高 0.23ppm に達した6月7日の訴症率も計算し，それぞれの間で X^2 検定を行った．

結　果

自覚症状と大気汚染との対応　全対象生徒515名の全体の調査期間の自覚症状有訴者数とオキシダント値の対応は図1に示すような結果である．本報告の主題ではないが，各症状とオキシダントの相関分析では $P<0.001$ というきびしい検定水準ですら有意な項目も多いことが知られる．ここではこのような直視的対応関係が以下の解析の背影にあることを示すに止める．オキシダントが最高だった6月7日のピークの一致はきわめてあざやか

である．図1上段星印のついた6月7日，15日，25日，7月3日，9日の5日がオキシダント注意報レベルすなわち 0.15ppm をこえた日である．

素因・既往症と自覚症状訴症率　表3に全校生徒および各グループ別の各環境条件1日当りの訴症率の表を示した．全校生徒は515名，O．D．グループは9.13パーセント47名，アレルギーグループは14.76パーセント74名，喘息グループは3.88パーセント20名であった．全般的に目の痛み，流涙，息苦しい，咽頭の痛み，咳がオキシダント高濃度時に X^2 検定（$P<0.01$）で有意に増加し，次いで頭痛，嗄声も関連ありとの結果である．

O．D．グループ　このグループはやはり特異な反応パターンを示すことが表3から読みとれる．すなわち61日間の全調査期間の平均訴症率を全校生徒のそれと比較してみると目の痛みと下痢をのぞいての13項目すべてが有意の差を示していることである．このグループは多訴グループであることがわかる．また目の痛み，流涙，咽頭の痛み，息苦しいの4症状をのぞいて他の11症状は高オキシダント日よりも61日全調査期間の平均訴症率の方が高いという特異な結果を示した．しかし6月7日をみるとほとんどの項目で全校生徒，他のグループをはるかに上回る訴症率を示している．図2，図3にそれを対比しやすい形で図示した．

アレルギーグループ　このグループは全日平均訴症率で全校生徒のそれと比べてみて咳，たん，頭痛，めまいなどで有意な増加がある程度で特にことなった応答パターンは示していない．高オキシダント日の訴症率をみると目の痛み，咽頭の痛み，涙の三症状をのぞいては可成り高い訴症率を示すことがわかる．しかし前項のO．D．グループと比べると全校生徒と似た変動といえよう．ただし咳，たん，頭痛などの症状にこのグループの特徴が示されている．

喘息の既往を有するグループ　このグループの全日平均訴症率では咳，たん，くしゃみ，嗄声である．このグループは数が少ないため統計的に有意の差のでる症状は少なかったが，喘息の既往のあるこれらの中学生のなかには，現在なお喘息に罹患しているものも含まれていると考えられ，この者たちの影響が訴症のなかに加わっていることが推察される．また咳，たんという呼吸器感染症の主要症状がアレルギーグループと比べてもさらに高い比率であることをみると呼吸器系の感染への抵抗性が弱いことも考えられる．残念なことに総数で20名という数では不足であって十分な比較検討は行えないといわざるを得ない．

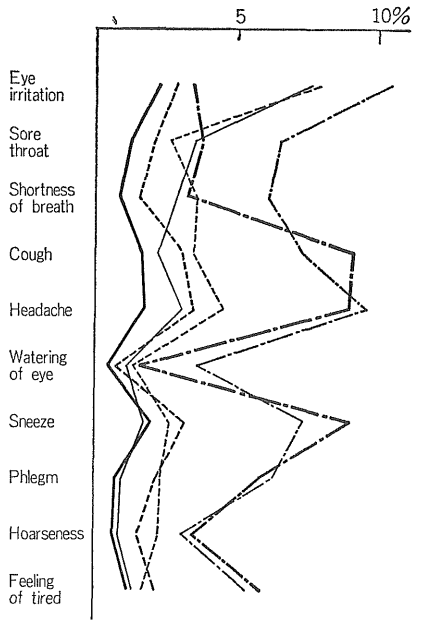


Fig. 2. Changes in Subjective Signs Related to Oxidants Concentrations (1)
—— All students
…… Allergic Group　Dick lines : Av. of all days
--- O.D. Group　Thin lines : Av. of high oxidants days

考　察

この調査でO．D．グループが特異的に高い自覚症状の訴症率を示した．これについてはO．D．グルッピングの際アンケートのみにより行って，基礎疾患をチェックしていないための影響もある程度は考慮しなければならないが，しかし多訴であることは疑う余地がない．このグループが，さらに高濃度のオキシダントやあるいは他の汚染物質，温度，湿度さらに運動などの負荷がかかった場合に何等かの重い被害を受けやすいのかどうか，むしろ軽い被害で感知するために重い被害とならない可能性が強いのかどうかは今後の調査にまたなければならない．

臨床的に知られた重症被害者でのアレルギー素因が多いとのことは，この調査とは直ちに結びつかなかった．ここでは全生徒との比較で呼吸器感染症の徴候である咳，たんの訴えが多かったことは今後さらに検討してみる価値がある．大気汚染とアレルギー疾患との関連は臨床諸分野でも特に注目されている分野であり，大気中の化学物質がどのような形でアレルゲンとなりうるか，あるいは遅延反応という形で症状発現と関連しているのかなど今後解明しなければならない問題は多い．喘息グループは20名であって，この数では少なすぎて統計的処理

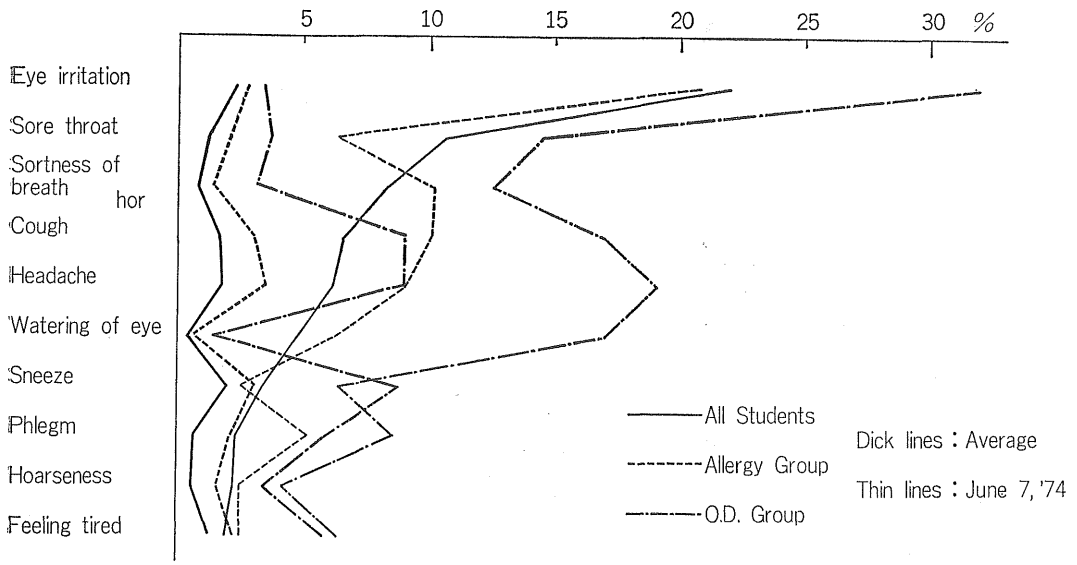


Fig. 3. Changes in Subjective Signs Related to Oxidants Concentrations (2).
On June 7. '74, Oxidants Concentrations in Tokyo Rose above 0.23ppm.

でほとんど有意な結論が出せなかった．今後もう少し例数を多くして検討してみたい．

このような健康日記を用いて，光化学スモッグ（および大気汚染）の急性影響を調べる方法は有効であることがたしかめられているが，これについていくつかの問題はのこされている．一つは対象が中学生であり，調査する側が真面目にアプローチすれば真面目に応えてくれる条件をもっていることである．裏返せば調査側のアプローチ如何によって結果の信頼性がゆらぐことのあることを深い注意をもって銘記しなければならない．

次にサンプルサイズの問題である．一般的に自覚症状と汚染物質の相関解析を行おうとするならば4～500名という対象数は十分な数となる．しかし，これらの生徒の中から素因なり既往歴で分けて自覚症状をみようとするなら一グループが最低50名というのが，統計的処理を行うために必要な数になってくる．またアンケート調査においては刺激が加わることによって Over Response が生ずる恐れがある．この止むを得ざる一例として日記帳の回収新配布がある．今回はすべての調査期間を用いたが，より厳密を期すならば，日記帳を配布してから5日間はデータからカットするようにすればそのバイアスは大部分消去される．今後の調査に当っては検討を要する事項である．

今後素因と被害あるいは自覚症状の変動との関連をさらに例数をふやし，またグループ分けももっと精密にして調査を行う必要がある．またこのアプローチとは逆な重症被害者の臨床疫学的アプローチと相まって，光化学スモッグ被害のメカニズム究明に寄与して行く努力が強く要請されている．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「オキシダントの人体および生物影響調査研究」の一部として実施したものである）

文　献

1) Hausknecht, R. : *Air Pollution: Effects reported by California Residents*, Publ. California State Dept. Public Health, California, 1959
2) 宍戸昌夫，杉田暉道：公害と対策，8(4)，377, 1972
3) 関沢理子，遠藤立一，長岡滋，吉田作松：東京都公害研究所年報，5，206，1974
4) 牧野国義，溝口勲：日本公衆衛生雑誌，22(8)，421 1975
5) 一杉正治：昭和48年度光化学反応による大気汚染健康影響調査，359，1974　環境庁大気保全局
6) 溝口勲：未発表論文
7) Kagawa, J. and Toyama, T. : *Archives of Environmental Health*, 30(3)，117，1975
8) 三上理一郎，工藤翔二：日本臨床，31，2039，1973
9) 三上理一郎：日本胸部疾患学会誌，11，723，1973
10) 市橋保雄，宇尾野公義編：起立性調節障害，1974，中外医学社，東京
11) Babcock, L. R. : *J. Air Pollution Control Assoc.* 20(10)，653，1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 294—300, 1975

メチル水銀中毒修正因子としてのマグロ由来セレンの有効率

関　比呂伸* 西垣　進** 田村行弘** 真木俊夫**
山田　洋** 嶋村保洋** 今野ヒロ子* 落合節子**
湯目邦雄* 溝口　勲* 野牛　弘* 大井　玄*

Effectiveness of Selenium in Tuna Meat in Modifying Methylmercury Toxicity

HIRONOBU SEKI*, SUSUMU NISHIGAKI**, YUKIHIRO TAMURA**, TOSHIO MAKI**, HIROSHI YAMADA**, YASUHIRO SHIMAMURA**, HIROKO KONNO*, SETSUKO OCHIAI**, KUNIO YUNOME*, ISAO MIZOGUCHI*, HIROSHI YAGYU* and GEN OHI*

Effectiveness of selenium naturally occurring in tuna was compared to that of selenium in selenite with respect to protection against the toxicity of methylmercury.

Male weaning rats were fed diet for 70 days which contained 20 ppm methylmercury chloride (MMC) and graded concentrations of selenium originating from either tuna or sodium selenite. Regardless of its origin, selenium showed protective effect, generally corresponding to the added levels (0.5, 1.0, 1.5 ppm) in terms of length of survival, morbidity and growth rate. Efficacy of selenium in tuna, as compared to that of selenium in selenite was roughly equivalent in growth rate but approximately half as effective in preventing neurological manifestations.

Possible mechanisms were discussed as regards protective effect of selenium and the discrepancy of efficacy between tuna selenium and selenite selenium in modifying neurological signs.

This study appears to warrant further investigation upon the protective activity of naturally occuring selenium against methylmercury toxicity, particularly in those fish known to contain high concentrations of both methylmercury and selenium.

緒　言

セレンがメチル水銀毒性を減毒する事実は，1972年Ganther 等[1]により報告されて以来，多くの研究者によって確認された.[2-7]

このセレンによってなされる保護効果のメカニズムは，いまだ明らかではないが，この事実は，動物性蛋白を主に魚類から摂取する日本人，特にマグロ漁船員やタスマニア人にとって実際的な重要性を持っている.

ところで，いくつかの魚類，特にマグロや遠海魚には高濃度のメチル水銀を含むことが知られている．一方，これらの食用部分にもやはりかなりの量のセレンが含まれている.[8]

しかし，動物由来のセレンは，ニワトリヒナにおけるセレン欠乏症の予防効果において，植物由来セレンやセレンの無機化合物よりも働きが悪いことが知られている.[9]

これらの事実にもとづいて，我々は，メチル水銀毒性の減毒作用について，マグロ由来セレンと亜セレン酸ナトリウム由来セレンとの有効率を比較し，興味ある知見を観察したので報告する.

方法・材料

離乳期のウィスター系雄ラット（体重43±1g）は，70日間表1のような飼料を与えられた．ラットは各群33匹からなり，週2回の体重測定と毎日死亡数や健康状態（例えば，粗毛，後肢の交差と麻痺で表わされる神経症状の発現[10]）を観察した.

飼料の調整は，表1の如く，動物性蛋白源として，Ⅰ（A，B，C）群はそれぞれ10,20,30%のマグロ肉を，Ⅱ（A，B，C）とⅢ（A，B，C）はそれぞれ10,20,30%のカゼインを用いた．セレン源として，Ⅰ群はマグロ肉より，Ⅲ群は亜セレン酸ナトリウムより供給しA：0.5 B：1.0，C：1.5 ppm Seになるように調整した．各飼

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　** 同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 Selenium and Methylmercury Concentrations in Experimental Diets

Group	MMC	Se		Tuna	Casein
Ⅰ—A	20ppm Hg	0.5ppm Se	a	10%	
Ⅰ—B	20	1.0	a	20	
Ⅰ—C	20	1.5	a	30	
Ⅱ—A	20		b		10%
Ⅱ—B	20		b		20
Ⅱ—C	20		b		30
Ⅲ—A	20	0.5	c		10
Ⅲ—B	20	1.0	c		20
Ⅲ—C	20	1.5	c		30

a : Selenium originates from tuna meat.
b : Concentration of selenium in the basal diet is 0.1 ppm.
c : Added as sodium selenite.

料成分中の Se 量は，表2に示した．セレンが加えられなかったⅡ群（A，B，C）は，測定結果，各々 0.10，0.11，0.11 ppm Se であった．メチル水銀は，塩化メチル水銀をアセトンでとかし，粉末飼料と混合し，ペレットにした．

70日間の投与後，ラットは採血され，断頭放血後，脳・肝・腎が摘出され，血液と共に，すぐに凍結した．そして，これらは総水銀，メチル水銀，セレンの分析時まで−25°Cで保存された．

Table 2 Selenium Levels in the Constituent of the Diet

Tuna meal	5.0 ppm Se
Casein	0.12
Corn	0.05
Soybean meal (45% protein)	0.43
Rice bran	0.13
Kaoliang	0.12
Alfalfa	0.73
$CaCO_3$	0.01
CaCl	0.01
Yeast	0.02
Vitamine complex	0.04

総水銀は，五酸化バナジウムを触媒とする硫酸硝酸分解法[11]と還元気化注入方式よりフレームレス原子吸光光度計にて測定された．[12]

メチル水銀は，Westöö[13]の変法により測定された．[8]

セレンは，過塩素酸，硝酸で分解し，2，3-ジアミノ

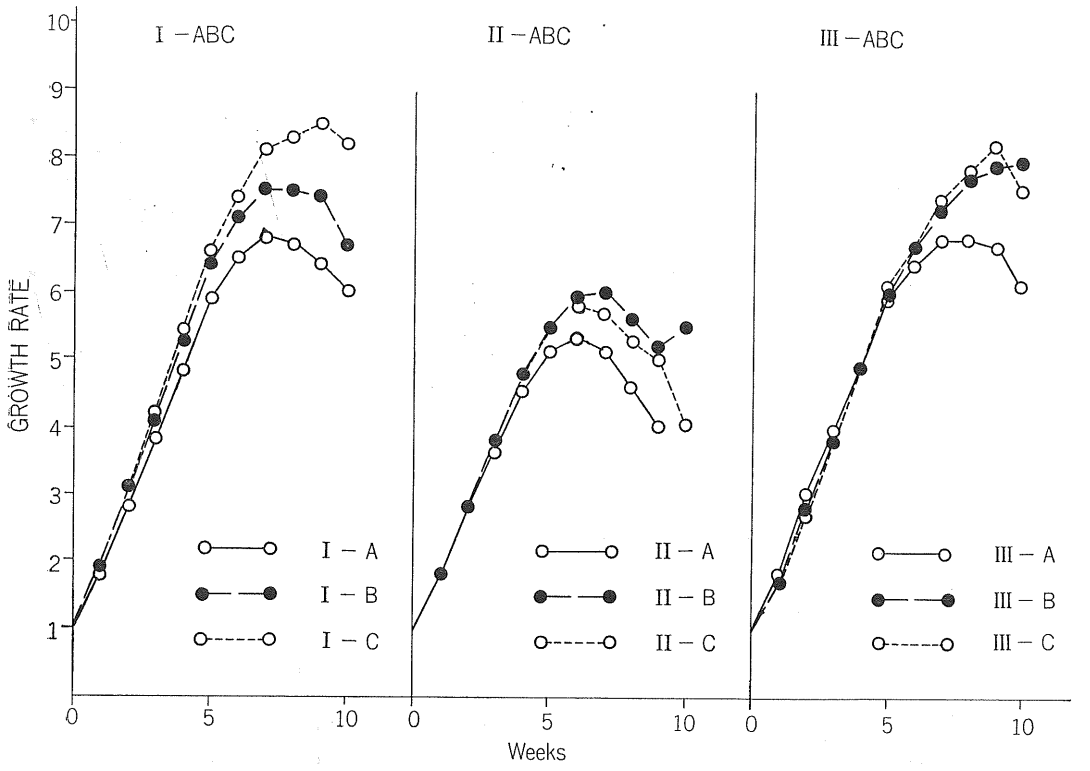


Fig. 1

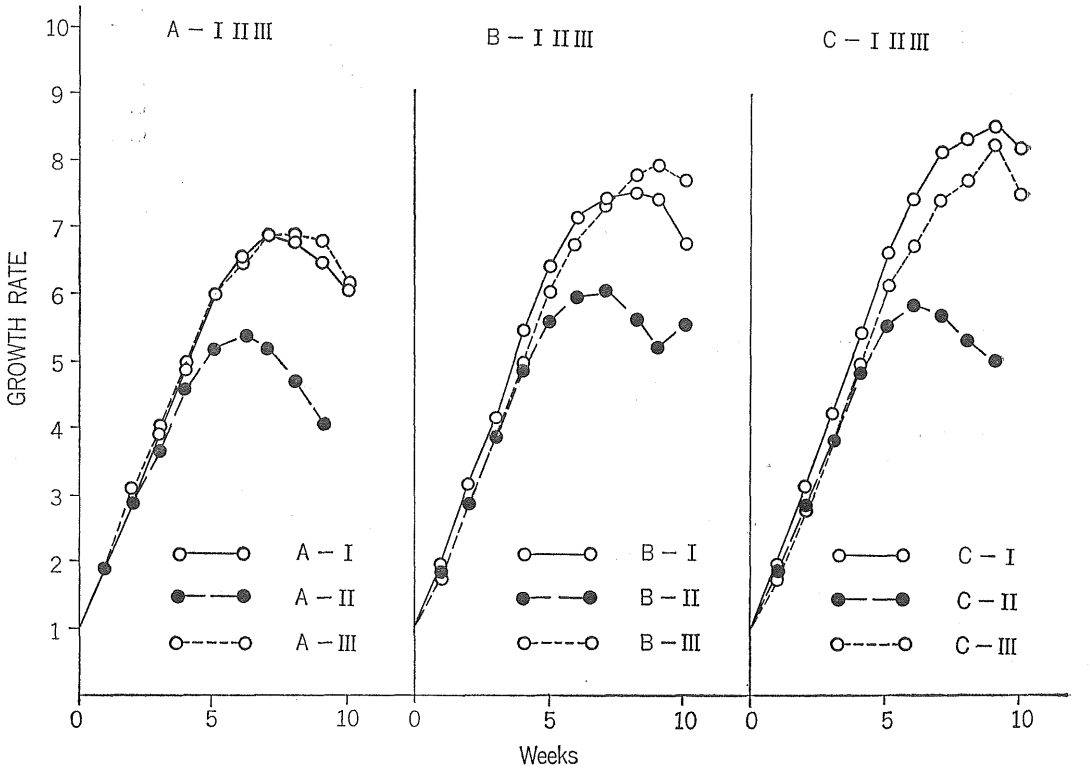


Fig. 2

ナフタレンを使用した螢光光度法で測定された.[14]

得られた結果については，t検定により統計処理された.

結　　果

1. 成長率

各群の成長曲線は，図1，2に示されている．これらの図で，塩化メチル水銀の毒性は，成長率の抑制，体重の損失や生存期間の短縮化として現われている．そして，マグロ由来セレンであろうと亜セレン酸ナトリウム由来のセレンであろうと加えられたセレンは，はっきりと成長率を改善していた.

一般に，マグロ由来セレンのⅠ群において，飼料中セレン濃度の上昇とともに成長率は良くなった（図1）．成長率の面から，マグロ及び亜セレン酸ナトリウムともセレンの保護効果は，ほぼ等しいように見えた(図2)．セレンの加えられなかったⅡ群において，カゼイン濃度20%以上では，有意（$P<0.01$）に成長率が良くなっていた.

2. 神経症状の発現

図3に示された如く，神経症状の発現曲線は，S字型である．そして，保護効果は，右方への移行として現わ

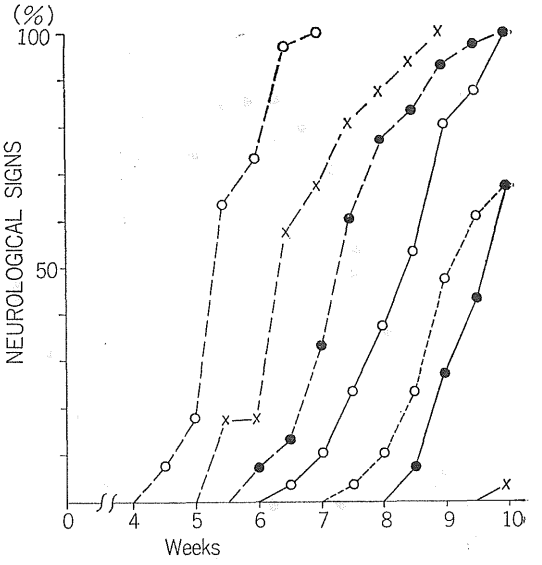


Fig. 3

Ⅰ—A　Ⅱ—B
Ⅰ—B　Ⅱ—C
Ⅰ—C　Ⅲ—A
Ⅱ—A

されている．

セレンを添加しない時，神経症状は4～5週目から発現した．そして，9週の終りには全てが神経症状を呈した．Ⅱ群において，カゼイン濃度の増加は，神経症状の発現を遅らしていた．しかし，カゼイン20%群は，30%群よりも効果的であった．

我々が成長率で得た観察と対照的に，マグロ肉と亜セレン酸ナトリウムの間に神経症状発現の予防におけるセレンの効果は，はっきりと異なっていた．例えば，マグロ由来セレン 1.0 ppm は，亜セレン酸ナトリウム由来セレン 0.5 ppm とほぼ同じ効果であった．

3. 死亡率

死亡率曲線の上昇は，神経症状の発現のそれとかなり良く似ていた(図4)．しかし，死亡の開始は，2～3週間遅れた．

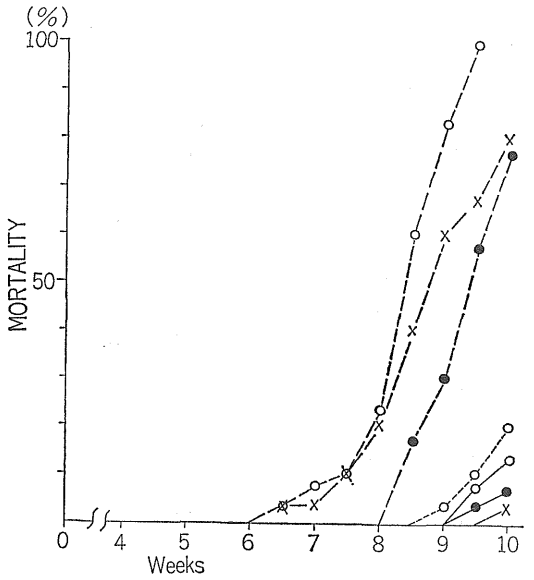


Fig. 4

○——○ Ⅰ—A　●— —● Ⅱ—B
●——● Ⅰ—B　×— —× Ⅱ—C
×——× Ⅰ—C　○……○ Ⅲ—A
○— —○ Ⅱ—A

亜セレン酸ナトリウム由来のセレンの効果は，0.5 ppm のセレンレベルの時，マグロ由来セレンの効果とほぼ等しかった．しかし，亜セレン酸ナトリウム由来セレン群において，セレン量が増えるにつれて効果がました．

4. 臓器中総水銀・メチル水銀・セレン濃度

分析結果は，表3に示す．添加した飼料中セレンは，臓器内で2～5倍の蓄積増加をきたした．そして，亜セレン酸ナトリウム由来セレンは，マグロ由来セレンよりも脳において一貫してより効果的に蓄積していた（Ⅰ—A，0.27対Ⅲ—A0.30；Ⅰ—B，0.33対Ⅲ—B，0.57；Ⅰ—C，0.30対Ⅲ—C，0.45)．一方，他の臓器内蓄積は，明らかな傾向を示さなかった．

総水銀，メチル水銀ともに，セレンの添加の有無にかかわらず，各群の間に違いが認められなかった．

このようなことから，総水銀，メチル水銀の蓄積は，神経症状の発現や成長率と関係がないようである．しかしながら，非常に興味深いことに，脳中総水銀とメチル水銀の間の濃度の違いが，添加セレン量の増加とともに次第にました．これは，又，生存率の改良と平行しているようである（図5)．

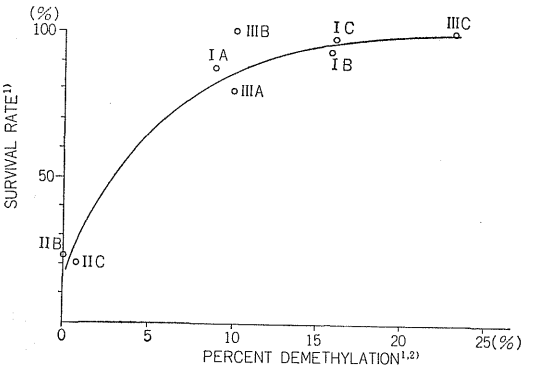


Fig. 5

1) Data at day 70

2) Percent demethylation $=\frac{\text{T-Hg—Me-Hg}}{\text{T-Hg}}\times 100$

考　察

24種類の食用海産魚の279検体を分析した西垣等は，[8] 一般にメチル水銀のレベルの高い魚は，やはりまたセレンを高く含有していることを観た．しかし，大部分のものでは，セレンのレベルは比較的一定であって 0.5ppm ～1.0ppm の間に落ち着き，なおかつ，メチル水銀の濃度をこえていた．

我々の実験は，このように実際に魚の中に含まれているレベルのセレンが，はるかに高濃度のメチル水銀の毒性に対して明瞭に保護的効果をもつことを示している．しかし，更にマグロ中に自然に含まれているセレンは，亜セレン酸ナトリウムに比べて神経症状発現抑制という点で，効果において劣るものがあった．

現在において，メチル水銀の毒性を減毒するセレンのメカニズムは，不明である．しかし我々の観察は，以下の点について今まで報告された観察と一致するものであった．[4,5,15] すなわち，分析された臓器中の総水銀あるいはメチル水銀の濃度は，セレンを同時投与することに

Table 3

	Tissue	T-Hg (ppm)	Me-Hg (ppm)	Se (ppm)
I A	Brain	10.6 ± 1.1	10.0 ± 1.3	0.27 ± 0.03
	Kidney	60.1 ± 11.4	33.0 ± 10.2	5.8 ± 0.6
	Liver	52.3 ± 10.6	39.1 ± 8.4	2.4 ± 0.4
	Blood	147 ± 25	136 ± 26	0.43 ± 0.05
I B	Brain	12.6 ± 2.6	11.0 ± 2.0	0.33 ± 0.05
	Kidney	68.2 ± 13.9	38.8 ± 12.1	7.5 ± 1.2
	Liver	52.5 ± 5.4	39.7 ± 4.0	3.0 ± 0.4
	Blood	137 ± 16	122 ± 14	0.49 ± 0.04
I C	Brain	10.3 ± 0.9	9.0 ± 1.0	0.30 ± 0.04
	Kidney	68.2 ± 9.7	42.6 ± 7.7	7.7 ± 1.0
	Liver	49.1 ± 5.5	36.7 ± 9.5	2.7 ± 0.4
	Blood	131 ± 21	114 ± 20	0.59 ± 0.03
III A	Brain	12.1 ± 1.0	11.5 ± 1.2	0.30 ± 0.05
	Kiduey	63.8 ± 11.5	35.8 ± 11.1	10.0 ± 1.6
	Liver	52.1 ± 7.9	40.1 ± 10.6	2.7 ± 0.3
	Blood	152 ± 32	130 ± 30	0.45 ± 0.05
III B	Brain	12.7 ± 1.1	11.8 ± 1.6	0.57 ± 0.14
	Kidney	63.0 ± 11.2	42.8 ± 10.2	7.8 ± 1.5
	Liver	51.8 ± 8.5	40.9 ± 11.3	2.4 ± 0.7
	Blood	144 ± 21	125 ± 24	0.77 ± 0.11
III C	Brain	12.3 ± 1.0	10.3 ± 1.3	0.45 ± 0.04
	Kidney	77.5 ± 14.1	48.1 ± 13.0	9.6 ± 1.4
	Liver	57.4 ± 8.2	44.7 ± 12.1	2.3 ± 0.3
	Blood	142 ± 24	123 ± 22	0.63 ± 0.04
II B	Brain	9.1 ± 0.5	9.2 ± 0.1	0.16 ± 0.00
	Kidney	46.4 ± 4.7	25 ± 5	1.62 ± 0.38
	Liver	38.7 ± 1.0	30.5 ± 2.5	0.65 ± 0.06
	Blood	132 ± 18	113 ± 11	0.32 ± 0.04
II C	Brain	13.1 ± 3.3	13 ± 3	0.14 ± 0.00
	Kidney	43.3 ± 11.6	23 ± 2	3.3 ± 0.25
	Liver	47.9 ± 1.6	32 ± 7	0.89 ± 0.07
	Blood	166 ± 66	146 ± 84	0.19 ± 0.04

よって減少していないし，また中毒症状の発現の程度には全く関係していない．

セレンが及ぼす保護効果については，いままで2種類の仮説が提出されている．一つは，セレンは，重金属に対して大きな親和力をもつ，いわゆる non toxic binding sites をますため，重金属の通常の標的器官からそれらを転ずるという作用である．[1] 第二には，セレンは，メチル水銀をより無毒な形のものへの転換を促進するという説である．[4]

フェノバルビタールのような小胞体系を刺激することで知られている物質は，以上の2様の解毒経路を与えるものであるかもしれない．[16] これに反して，疫学的調査によれば，海洋の食物連鎖の頂点に近い生物では（もちろん，これらは魚の中に含有されるメチル水銀を極めて大量に消費するものであるが），後者のメカニズムが働いているかもしれないということを示唆する証拠がある．すなわち，これらの生物の分析された器官においては，水銀はもし非常に高濃度に存在する場合にはメチル水銀として存在するのではないという．[17-20] 更に，臓器中のセレンも同時に調べられた研究では，メチル水銀は少なくても同濃度あるいはそれ以上のセレンと共に存在する．[18-20]

以上のような知見から考えてみて，総水銀とメチル水銀濃度との間の差が，あるいは，いわゆるジメチル化された部分が，指数関数的にふえるようにみえたことは興味深い．そして，それは，セレンの恩恵をこうむった動

物の脳においてみられ，しかも生存率が改善されるに従って以上の事実は，つまり，総水銀とメチル水銀との差はふえる傾向がある．

しかしながら，前にも述べた如く，メチル水銀の脳中濃度それ自体は中毒症状の発現とは相関していないのであるから，このような非常に劇的な生存率の改善化が，単に10%や15%のメチル水銀がより無毒な形にかえられたというだけで説明をすることは難しいであろう．そして，この見かけ上のジメチル化は，メチル水銀の毒性に対して単に複数の保護的機序，その中にはもちろんセレンが一番重要な役割を占めるものであるが，そういうようなものの2次的な表現かもしれない．

種々の食物中のセレンやセレン化合物のニワトリ及び他の家畜動物にみられるセレン欠乏症に対する薬理的効果がいろいろ異なったものであるということは，実験的にも示され，また実際的な問題としても認識されてきている．[21-25] 最近になって，Cantor 等の報告によれば，動物由来セレンのいわゆる "Biological Availability" というものは，ニワトリヒナの浮腫病を防止するにあたって極めて低く，亜セレン酸ナトリウムの25%，あるいはそれ以下であった．ところが，植物由来のものは，極めてその有効度が高いということがわかった．[9] 更にまた彼等の観察によれば，セレンメチオニンは，ニワトリヒナの膵臓線維化症の予防には亜セレン酸ナトリウムよりもはるかに有効である[26]にもかかわらず，同じヒナの浮腫病を予防するという点については，逆に亜セレン酸ナトリウムの方がセレノメチオニンよりも効力が高った．[9] つまり，彼等の知見は，セレン化合物の薬理効果というものはその化学構造及びどのようなセレン欠乏症であるかというそのタイプによって変ってくるのである．

我々の観察によれば，マグロ由来セレンの薬理効果は，成長率に関して亜セレン酸ナトリウムと同様に有効であるが，しかしながら，神経症状の発現を抑えるという点では，半分ぐらいしか有効でない．その事実は，メチル水銀中毒をセレンによって緩和するにあたっても前述と同様の複雑さが存在することを意味するものである．このような反応の起り方の差というものが，つまり全体的な身体の反応及び神経症状の反応の差のあることについての理由は，明らかでない．しかしながら，考えられることは，マグロ由来セレンは，その化学構造のために亜セレン酸ナトリウム由来セレンに比べて，血管脳関門を通りぬけることが少ないのではないかということである．Steinwall 等は，1969年に血管—脳関門は，メチル水銀によって傷害されると報告した．[27] そして，我々はすでにこのような傷害が存在する場合には，通常ならば脳中に蓄積されない亜セレン酸ナトリウムのセレンが，[28,29] おそらく血漿浸出する際に脳中へ漏出していき（あるいは血管—脳関門を通りこえ），そして脳に蓄積されることを観た．[15]

このような意味あいからみると，それは，亜セレン酸ナトリウムを投与された動物の方が，常に同じ濃度のマグロ由来セレンを投与された動物よりも脳中へ多くセレンを蓄積し，なおかつ神経学的症状の発現を抑える点についてもすぐれていることで意義のあることかもしれない．

いうまでもないことであるが，ここで用いられた神経学的な指標は，後肢の交差にせよ麻痺にせよ中枢神経というよりもむしろ末梢神経の傷害の発現で，従って脳中に認められたような蓄積傾向というものが末梢神経においても同様に存在するかどうかということを明らかにしなければそれが真に意義のあるものであるかどうかは，ここでは言明することは不可能であり，今後の課題として残されている。

要　約

マグロ中に自然に含まれるセレンの有効率がメチル水銀毒性に対しての保護効果に関して，亜セレン酸ナトリウムのセレンの有効率と比較された．

離乳期の雄ラットは，塩化メチル水銀として 20 ppm Hg とマグロあるいは亜セレン酸ナトリウムから由来する各濃度のセレンを含む飼料を70日間与えられた．

その結果として，セレンの由来にかかわらず，生存の長さや神経症状の発現及び成長率の面において，塩化メチル水銀の毒性に対して，加えられたセレン濃度の増加に従って（0.5, 1.0, 1.5 ppm），より大きな保護効果が示された．亜セレン酸ナトリウム由来セレンと比較した時のマグロ由来セレンの有効率は，成長率においてほぼ等しいが，神経症状の発現防止では約半分であった．

マグロ由来セレンと亜セレン酸ナトリウム由来セレンとの間のセレンの保護的効果や神経症状発現の防止の有効性の矛盾に関して，可能なメカニズムが論議された．

この研究は，メチル水銀毒性に対して自然に含まれるセレンの保護的に働く活性度，特に，メチル水銀とセレンの両方を高濃度含む魚において，更に十分な調査を行なう必要性を示すものである．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「重金属の複合汚染の生体影響に関する研究」の一部として実施し，その概要は日本衛生学会第45回総会昭和50年4月で発表した）

文　献

1) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L., Kopecky, M. J., Wagner, P., Oh, Sang-Hwan and Hoekstra, W. G. : *Science*, 175, 1122, 1972
2) Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y. : *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.*, 5, 673, 1973
3) Potter, S. and Matrone, G. : *J. Nutr.*, 104, 638, 1974
4) Stillings, B. R., Lagally, H., Bauersfeld, P. and Soares, J. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243, 1974
5) Stoewand, G. S., Bache, C. A. and Lisk, D. J. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 11, 152, 1974
6) Ganther, H. E. and Sunde, M. L. : *J. Food Sci*, 39, 1, 1974
7) 上田喜一，山中すみへ，河合正計，東条憲一：医学と生物学. 90, 15, 1975
8) 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：東京衛研年報，25, 235, 1974
9) Cantor, A. H., Scott, M. L. and Noguchi, T. : *J. Nutr.*, 105, 96, 1975
10) 武内忠男，松本英世，白石幸明，高屋豪螢，佐々木光雄，平田康哉，藤本孝一，宮崎泰起，小城順：熊本医学会雑誌，36, 713, 1962
11) Deitz, F. D., Sell, J. L. and Bristol, D. : *J. AOAC*, 56, 378, 1973
12) 田村行弘，真木俊夫，山田洋，嶋村保洋，西垣進，木村康夫：東京衛研年報，25, 227, 1974
13) Westöö, G. : *Acta Chemica Scand.*, 22, 2277, 1968
14) Watkinson, J. H. : *Anal. Chem.*, 38, 92, 1966
15) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., Tamura, Y., Maki, T., Maeda, H., Ochiai, S., Yamada, H., Shimamura, Y. and Yagyu, H. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 527 1975
16) Fowler, B. A., Lucier, G. W. and Mushak, P: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149, 75, 1975
17) Rivers, J. B., Pearson, J. E. and Shultz, C. D. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 8, 257, 1972
18) Koeman, J. H., Peeters, W. H. M., Koudstaal-Hol, C. H. M., Tjioe, P. S. and DE Goeij, J. J. M. : *Nature*, 245, 385, 1973
19) 萩原建三：東京水産大学卒論，1975
20) 田村行弘，真木俊夫，山田洋，嶋村保洋，落合節子，西垣進，木村康夫：東京衛研年報，26, 200, 1975
21) Schwarts, K. and Fortz, C. M. : *J. Biol. Chem.*, 233, 245, 1958
22) Schwarts, K. and Fregda, A. : *ibid.*, 244, 2103, 1969
23) Scott, M. L. and Thompson, J. N. : *Poultry Sci.*, 50, 1742, 1971
24) Mathias, M. M., Allaway, W. H., Hogue, D. E., Marion, M. V. and Gardner, R. W. : *J. Nutr.*, 86, 213, 1965
25) Mathias, M. M., Hogue, D. E. and Loosli, J. K. : *ibid.*, 93, 14, 1967
26) Cantor, A. H., Langevin, M. L., Noguchi, T. and Scott, M. L. : *ibid.*, 105, 106, 1975
27) Steinwall, O. and Olsson, Y. : *Acta Neurol. Scand.*, 45, 351, 1969
28) Smith, M. I. : *U. S. Pub. Health Rep.*, 53, 1199, 1938
29) 上田京二：熊本医学会雑誌，34 (補刷1), 144, 1960

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 301—304, 1975

メチル水銀中毒に対しセレンが保護的効果を示すためのいくつかの条件

今野 ヒロ子* 関 比呂伸* 野牛 弘* 大井 玄*

Protective Effect of Selenite against Methylmercury Toxicity; Observation Concerning Time, Dose and Route Factors in the Development of Methylmercury Poisoning

HIROKO KONNO*, HIRONOBU SEKI*, HIROSHI YAGYU* and GEN OHI*

Protective effect of selenite against methylmercury toxicity was observed in experimentally induced acute and subacute methylmercury poisoning of rats. The protective effect became more evident as the acuteness of methylmercury poisoning decreased in terms of the total methylmercury dosage administered and the number of survival days after the last dosing, and there appeared to be present an optimal dose relationship between the two substances which would give rise to selenium induced protection.

Protective effect of selenium was likewise clear in subacute methylmercury poisoning in regard to growth rate, incidence of neurological signs and mortality. There was no significant difference in protective effect when administration route was changed.

緒　言

1972年 Ganther 等は,[1] マグロ肉がウズラのメチル水銀中毒を軽減すると報告し，その保護物質がセレンであることを示した．この事実は，多くの研究者[2-6]によって確認されている．しかしながら，この保護効果は常に認められるものではなく，或期間内におけるメチル水銀・セレンの投与量，両者の投与量比，急性・亜急性の問題，投与経路などの条件を充たさなければならず，我々は以上の因子についていくつかの知見を得たので，これを報告する．

方法・材料

急性メチル水銀中毒に関するすべての実験には，ウィスター系雄ラット8週齢，体重240±7 gを用いた．亜急性メチル水銀中毒実験には，ウィスター系雄ラット5週齢，体重120±5 gを用いた．室温25±5°，湿度60±5％の室で飼料，水を自由に摂取させ，飼育した．

予備実験

1) メチル水銀投与終了後の生存日数

1群10匹とし，ラットを9群に分け，塩化メチル水銀10mgHg／kg／日をそれぞれ6，7，8，9，10，11，12，14，16日間連続経口投与し，最終投与時からの生存日数を観た．なお，塩化メチル水銀(以下MMCと略す)は，サラダオイルに溶かし，胃ゾンデを用いて投与した．結果は Fig. 1 及び表1をみてもわかるように，投与期間が短い程，つまり，総MMC投与量が少ない程生存期間が長く，14，16日間連続投与群については，最終投与終了する1，2日前に全匹死亡した．最高12日投与群まで生存できた．

2) 亜セレン酸ナトリウムとMMCの量的関係

1群10匹とし，ラットを6群に分け，MMC 10mgHg

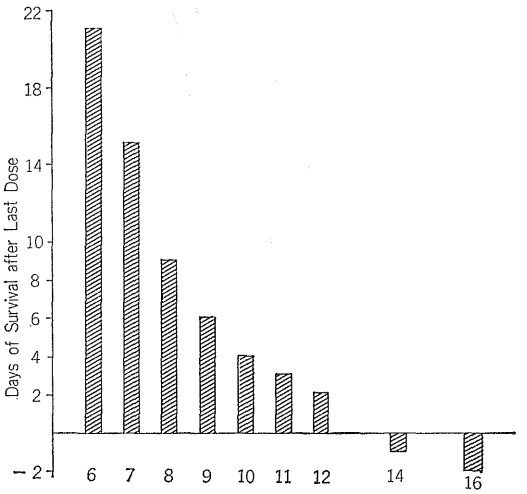


Fig. 1 Days of Administration

* 東京都立衛生研究所環境保健部　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 1

Group	Total Dosage of MMC	Day of 100% Death after Last Dosing
1	60mgHg/kg	21 day
2	70	15
3	80	9
4	90	6
5	100	4
6	110	3
7	120	2
8	140	−1
9	160	−2

／kg／日を8日間連続経口投与した．同時に，生理的食塩水に溶かした亜セレン酸ナトリウムを0，0.05，0.1，0.5，1.0，5.0 mgSe／kg／日それぞれ8日間経皮投与した．そして，最終投与時からの生存日数を観た．その結果，最終投与時からの100%死亡日数は，MMC単独投与群及び亜セレン酸ナトリウム0.05mgSe／kg／日，0.1 mg Se／kg／日投与群は9日目であった．また，亜セレン酸ナトリウム5 mg Se／kg／日投与群は投与開始して3日以内に全匹死亡した．つまり，急性セレン中毒は，急性MMC中毒よりも毒性が強いことがわかった．亜セレン酸ナトリウム0.5mg Se／kg／日，1.0mg Se／kg／日投与群はそれぞれMMC最終投与してから11，12日目に全匹死亡した（Fig. 2参照）．これらの2つの予備実験から，我々は次の事を推測した．

1）もし，急性メチル水銀中毒において，MMC総投与量が少なければ（Fig. 1），亜セレン酸ナトリウムの保護効果がもっとはっきりわかるのではないか．

2）MMC 10mgHg／kg／日を8日間連続投与した時，亜セレン酸ナトリウム0.5，1.0mg Se／kg／日同時投与群について，延命効果がある傾向がみられたことから，MMCと亜セレン酸ナトリウムの両物質において最適な量的関係があるのではないか．

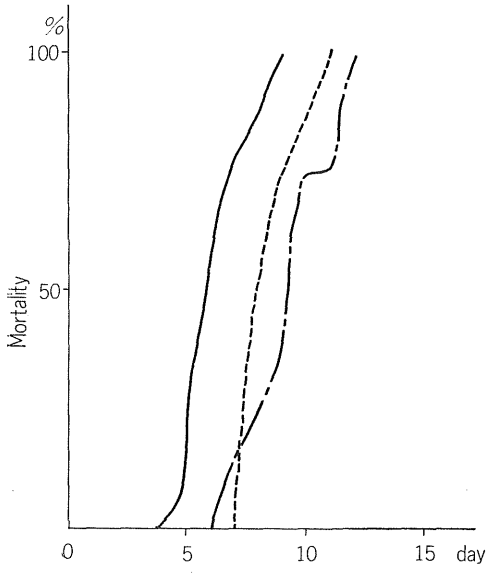


Fig. 2 Hg : 10 mg/kg×8 days
——— Se : 0 mg/kg×8 days
----- Se : 0.5 mg/kg×8 days
— · — Se : 1.0 mg/kg×8 days

急性メチル水銀中毒におけるセレンの保護効果

(a) MMC 10mgHg／kg／日×7日間

10匹を1群とし，ラットにMMC 10mgHg／kg／日を7日間連続経口投与し，亜セレン酸ナトリウム0，0.5，1.0mgSe／kg／日をそれぞれ同時に経皮投与した．方法は予備実験と同様で，最終投与後から100%死亡するまでの日数を観た．

(b) MMC 10mgHg／kg／日×6日間

MMC，亜セレン酸ナトリウムを(a)と同様な方法で，6日間連続投与した．

(a)，(b)の実験は開始してから3ケ月程観察した．

亜急性メチル水銀中毒における亜セレン酸ナトリウムの保護効果

(a) MMCと亜セレン酸ナトリウムを経口投与した場合

24匹を1群とし，ラットを4群に分け，下記の様な飼料及び水を40日間与え，その後普通飼料及び水を3週間自由に摂取させた．

グループ	飼料	水
A	20ppm	MMC
B	20ppm	MMC＋3ppm Se
C		3ppm Se
D		コントロール

MMCはアセトンに溶かし，飼料とよく混ぜ，ペレットして，固型飼料として与え，亜セレン酸ナトリウムはSeとして飲水中に与えた．週2回体重測定，後肢の交差と麻痺により判定した神経症状の発現数，死亡数を観察した．

(b) MMCを経口投与，亜セレン酸ナトリウムを経皮投与した場合

25匹を1群とし，ラットを4群に分け，下記の様なグループで，(a)と同様の方法で観察した．亜セレン酸ナトリウムはSeとして生理的食塩水に溶かしたものを使用した．

グループ	飼料
A	20ppmMMC
B	20ppmMMC＋0.15mg／kg／日 Se
C	0.15mg／kg／日 Se
D	コントロール

結果及び考察

Fig. 2，3，4から明らかに亜セレン酸ナトリウムの急性メチル水銀中毒に対する保護効果があり，それも8日間投与群よりも7日間，6日間投与群とMMCの投与期間が短い程はっきりと亜セレン酸ナトリウムの保護効果がみられた．この保護効果はMMC・亜セレン酸ナトリウムを最終投与してから生存日数の延長として表わすことができた．例えば，MMC 8日間投与群（総MMC投与量80mgHg／kg）では亜セレン酸ナトリウム同時投与(0.5mgSe／kg／日，1.0mgSe／kg／日）しても2～3日の生存日数の延長であった．しかし7日間投与群では亜セレン酸ナトリウム1.0 mg Se／kg／日を同時に投与すると少なくとも3ケ月の延命がみられた（1/10匹）．さらに6日間投与群（Fig. 4）においては，亜セレン酸ナトリウム1.0 mg Se／kg／日投与群は3ケ月経過しても死亡率が50%，つまり50%(5/10匹）は生存していた．これらの急性メチル水銀中毒実験からMMC10mgHg／kg／日に対し，亜セレン酸ナトリウム1.0mg Se／kg／日の付近が両物質の最適な量であろうと思われる．モル比でSe：Hg＝1：3である．一方，亜急性あるいは亜慢性の実験では[7]両物質の最適な量はモル比で1：1と思われる．亜急性メチル水銀中毒において亜セレン酸ナトリウムの保護効果は成長率（Fig. 5，6），神経症状の発現，死亡数について観られた．実験(a)においてMMCの投与群（AG）は5週目に体重減少，神経症状の（9/25匹）がみられたが，MMC＋Se，Se投与群においては体重の増加があり，神経症状の発現は1匹もみられなかった．その後8週目にMMC投与群は2匹死亡したが，

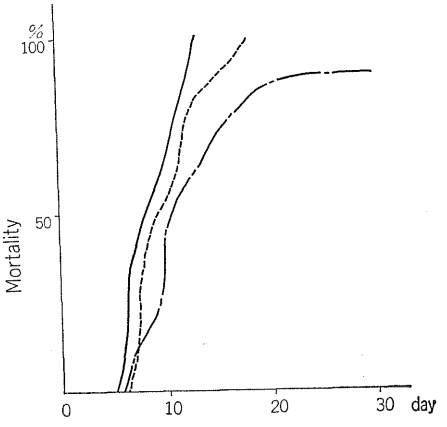


Fig. 3　Hg：10 mg/kg×7 days
——— Se：0 mg/kg×7 days
----- Se：0.5 mg/kg×7 days
—·— Se：1.0 mg/kg×7 days

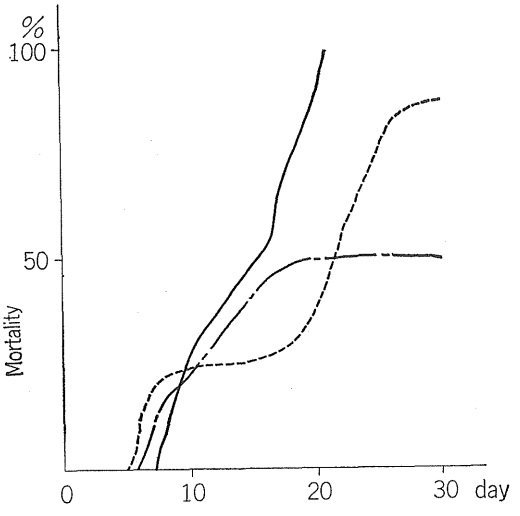


Fig. 4　Hg：10 mg/kg×6 days
——— Se：0 mg/kg×6 days
----- Se：0.5 mg/kg×6 days
—·— Se：1.0 mg/kg×6 days

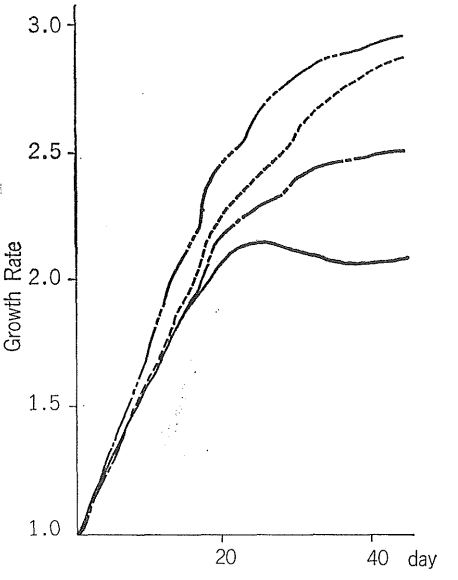


Fig. 5　Hg, Se：PO Administration
——— Hg：20 ppm
—·— Hg：20 ppm＋Se：3 ppm
----- Se：3 ppm
—··— Control

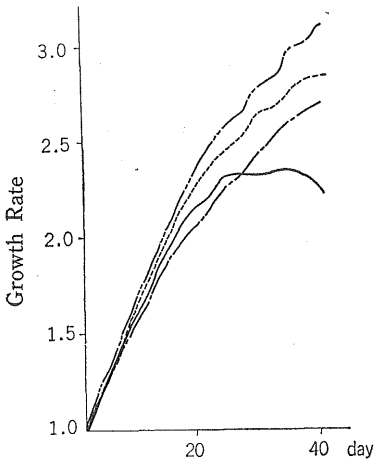


Fig. 6 Hg : PO, Se : SC Administration
——— Hg : 20 ppm
— · — Hg : 20 ppm+Se : 0.15 mg/kg/day
----- Se : 0.15 mg/kg/day
—··— Control

他の3群については死亡しなかった．なお実験(a)についての観察は，他の雑誌にもっと詳しく報告している．[8] また，亜セレン酸ナトリウムとMMCが胃腸内で結合している可能性を避けるため，亜セレン酸ナトリウムを経皮投与した時の保護効果をみた．成長率においてはFig. 5と同様の傾向を示している (Fig. 6)．また，死亡数については8週間観察中A，B，C，D群0匹であった．神経症状の発現についてはMMC投与群は7週目にみられたが，MMC+Se 経皮投与群については実験期間中1匹もみられなかった．このようにセレンの投与経路を変えてもセレンのMMCに対する保護効果には影響がないと思われる．これは，セレンがMMCと消化管内において毒性の少ない型の結合体（例えば錯塩）を作ることによりMMCの毒性を緩和するものでないであろうことを示唆している．

要　約

メチル水銀中毒に対するセレンの保護効果が急性・亜急性の時間因子，投与量関係，投与経路によりどのように変化するかを観察した．セレンの保護作用は急性メチル水銀中毒においては，実験あたりのメチル水銀総投与量と最終投与期日後の生存日数によって表現された．この中毒の“acuteness”が減少するにつれて延命効果がはっきりみられた．また，セレンと水銀の両物質の間には最適な量的関係がある．亜急性メチル水銀中毒においてセレンの保護効果は成長率，神経症状の発現，死亡数についてはっきりとみられたが，投与経路の違いによるセレンの保護効果の違いはみられなかった．

（本研究は昭和49年度衛生局調査研究「メチル水銀プロジェクト研究」の一部として実施しその概要は日本公衆衛生学会第33回総会昭和49年10月で発表した．）

文　献

1) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L., Kopecky, M. J., Wagner, P., Oh, Sang-Hwan and Hoekstra, W. G. : *Science*, 175, 1122, 1972
2) Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y. : *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.*, 5, 673, 1973
3) Ganther, H. E. and Sunde, M. L. : *J. Food Sci.*, 39, 1, 1974
4) Stoewsand, G. S., Bache, C. A. and Lisk, D. J. : *Bull. Environ. Contam. Toxicicol.*, 11, 152, 1974
5) Potter, S. and Matrone, G. : *J. Nutr.*, 104, 638, 1974
6) Stillinge, B. R., Lagally, H., Bauersfeld, P. and Soares, J. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243, 1974
7) 上田喜一，山中すみえ，河合正計，東条憲一：医学と生物，90，15，1975
8) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., Tamura, Y., Maki, T., Maeda, H., Ochiai, S., Yamada, H., Shimamura, Y. and Yagyu, H. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 527, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 305—311, 1975

メチル水銀のラット臓器別半減期の試算

野牛　弘* 大井　玄* 関　比呂伸*
西垣　進** 田村行弘**

Biological Half Lives of Methylmercury in the Organ Compartments of a Rat

HIROSHI YAGYU*, GEN OHI*, HIRONOBU SEKI*,
SUSUMU NISHIGAKI** and YUKIHIRO TAMURA**

Biological half lives of methyl-mercury in the organ compartments based upon experiment in which rats were fed 20 ppm dietary methyl-mercury chloride (MMC) for 40 days, were found unexpectedly brief : alimentary tract, 23 min. ; blood, 1 h 54 min. ; liver, 36 min. ; kidney, 27 h and the carcass, 12 h. Ninety five percent of MMC was absorbed in the alimentary tract and 5% was lost in the feces. A constant chronic dairy intake would give rise to a fixed excretion ratio (1.244) between feces and urine. Apparent half lives of MMC in organs and a biological half life of MMC in the whole body were estimated as 20.1 days.

先に Kopple[1] らは鉛の生体内代謝を放射性同位元素を使用しての人体実験により臓器別に濃度を測定し，その測定値から人体を3つの部分（Compartment）にわけて，それぞれの半減期を試算し，骨は1万日，血液・腎では27日，その他の臓器では30日で半減すると報告している．著者らはメチル水銀のラット経口投与実験の測定値を得ていたので，この測定値を使用して臓器別半減期試算を試みた．ラット体組織を5つの部分に分けて解析を試み，興味ある知見を得たので報告する．

1. 使用した動物実験成績

1. 動物実験の概要[2]：メチル水銀 20 ppm 含有飼料でラット（ウイスター系雄）5週令を40日間飼育（亜急性実験）．41日目より61日目までは普通飼料で飼育した．実験40日目には実験初期体重の2.2倍に成長し，300 g に達した．本解析では成長による修正は行わなかった．

2. 臓器内総水銀（Total Hg）濃度測定

臓器内メチル水銀濃度測定も同時に行われているが，総水銀濃度とほぼ同様な増減傾向を示している．しかし総水銀濃度測定値の方が安定し，信頼性がやや高いので解析には総水銀の値を使用した．

(1) 測定方法：Deitz 等の方法[3]により，五酸化バナジウムの触媒で硫酸硝酸疎解して，フレームレス原子吸光計により測定した．

(2) 測定値：表1のとおり

各臓器濃度は5匹の平均値である．解析初期には脳はその他の臓器を代表するものと考えたが，解析後期にはこの値を無視した．

表1　ラット臓器内総水銀濃度測定値

Total Hg	臓器重量 Q g	実験日各臓器総水銀濃度（ppm）					
		0 日	20 日	41 日	47 日	54 日	61 日
消化管	15						
血液	20	0.02	110	147	132	82	65
肝	9	0.04	33.6	44	38	34.4	24.2
腎	3	0.08	116	83	78	63.8	75.2
脳（その他）	253	0.01	9	14	12	8.4	6.1

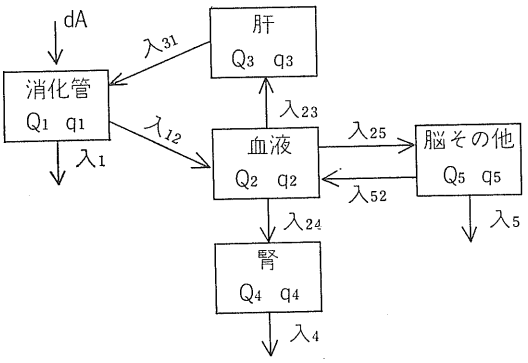
* 東京都立衛生研究所環境保健部　160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都立衛生研究所生活科学部

2. 解析方法

1. 体内代謝機構

メチル水銀の体内における代謝は図1のごとく，5つの部分を想定し，物質の流れは矢印の方向を考えた．また流れの速さは臓器濃度に比例し，その速さの値はそれぞれの臓器固有のものであるとし，これを移行係数と呼ぶことにする．（図1）

図1 メチル水銀体内代謝図



dA＝単位時間内に投与されたメチル水銀量
Q＝各 Compartment の容量（g）
$q_{i,t}$＝i Compartment の t時における Total Hg 濃度（ppm）
$\lambda_{i,j}$＝i Compartment —— j Compartment への移行係数

2. 各 Compartment における総水銀の増減式

$$\frac{dQ_1q_1}{dt}=dA+\lambda_{31}Q_3q_3-(\lambda_1+\lambda_{12})Q_1q_1 \quad \cdots\cdots①$$

$$\frac{dQ_2q_2}{dt}=\lambda_{12}Q_1q_1+\lambda_{52}Q_5q_5-(\lambda_{23}+\lambda_{24}+\lambda_{25})Q_2q_2 \quad \cdots②$$

$$\frac{dQ_3q_3}{dt}=\lambda_{23}Q_2q_2-\lambda_{31}Q_3q_3 \quad \cdots\cdots③$$

$$\frac{dQ_4q_4}{dt}=\lambda_{24}Q_2q_2-\lambda_4Q_4q_4 \quad \cdots\cdots④$$

$$\frac{dQ_5q_5}{dt}=\lambda_{25}Q_2q_2-(\lambda_5+\lambda_{52})Q_5q_5 \quad \cdots\cdots⑤$$

3. 恒常状態の試算式

常に一定量の物質を生物に投与を続けるといつかは体内の物質量は一定となり，増減のない状態になる．つまり恒常状態であるが，普通自然界にある生物は多くはこの状態にあると考えられる．

この恒常状態時の各臓器内物質の動きを式で表わせば下記のとおりである．

$$0=dA+\lambda_{31}Q_3q_{3\infty}-(\lambda_1+\lambda_{12})Q_1q_{1\infty} \quad \cdots\cdots⑥$$

$$0=\lambda_{12}Q_1q_{1\infty}+\lambda_{52}Q_5q_{5\infty}-(\lambda_{23}+\lambda_{24}+\lambda_{25})Q_2q_{2\infty} \quad \cdots⑦$$

$$0=\lambda_{23}Q_2q_{2\infty}-\lambda_{31}Q_3q_{3\infty} \quad \cdots\cdots⑧$$

$$0=\lambda_{24}Q_2q_{2\infty}-\lambda_4Q_4q_{4\infty} \quad \cdots\cdots⑨$$

$$0=\lambda_{25}Q_2q_{2\infty}-(\lambda_5+\lambda_{52})Q_5q_{5\infty} \quad \cdots\cdots⑩$$

4. 補足方程式

消化管からの吸収率をCとするといま吸収時間がt時間とすれば

$$(1-\lambda_1)^t=1-(1-\lambda_{12})^t=C \quad \cdots\cdots⑪$$

となる．

$\lambda_{23}=\lambda_{25}$ とする．…⑫ この場合 $\lambda_{24}=\lambda_{25}$ とするとその他の Compartment の減衰期の減衰速度が遅くなり理論値と実験値の相違が大きくなるので，血液から肝への移行係数と血液からその他への移行係数が等しいと仮定した．

5. 各臓器移行係数（λ）の算出

⑪より

$$\begin{cases}\lambda_1=1-10^{\left(\frac{\log C}{t}\right)} & \cdots\cdots⑬\\ \lambda_{12}=1-10^{\left(\frac{\log(1-C)}{t}\right)} & \cdots\cdots⑭\end{cases}$$

⑥より $$\lambda_{31}=\frac{(\lambda_1+\lambda_{12})Q_1q_{1\infty}-dA}{Q_3q_{3\infty}} \quad \cdots\cdots⑮$$

⑧より $$\lambda_{23}=\frac{\lambda_{31}Q_3q_{3\infty}}{Q_2q_{2\infty}} \quad \cdots\cdots⑯$$

⑦と⑩より

$$\lambda_{24}=\frac{\lambda_{12}Q_1q_{1\infty}}{Q_2q_{2\infty}}-\lambda_{23} \quad \cdots\cdots⑰$$

⑨より $$\lambda_4=\frac{\lambda_{24}Q_2q_{2\infty}}{Q_4q_{4\infty}} \quad \cdots\cdots⑱$$

⑫より $\lambda_{25}=\lambda_{23}$ ……⑲

⑩より $$\lambda_{52}=\frac{\lambda_{25}Q_2q_{2\infty}}{Q_5q_{5\infty}} \quad \cdots\cdots⑳$$

6. 各臓器の総水銀の濃度増減式は下記のごとく変換される．

$$q_{1,t+1}=\frac{dA+\lambda_{31}Q_3q_{3,t}}{Q_1}+(1-\lambda_1-\lambda_{12})q_{1,t} \quad \cdots\cdots㉑$$

$$q_{2,t+1}=\frac{\lambda_{12}Q_1q_{1,t}+\lambda_{52}Q_5q_{5,t}}{Q_2}+(1-\lambda_{23}-\lambda_{24}-\lambda_{25})q_{2,t} \quad \cdots\cdots㉒$$

$$q_{3,t+1}=\frac{\lambda_{23}Q_2q_{2,t}}{Q_3}+(1-\lambda_{31})q_{3,t} \quad \cdots\cdots㉓$$

$$q_{4,t+1}=\frac{\lambda_{24}Q_2q_{2,t}}{Q_4}+(1-\lambda_4)q_{4,t} \quad \cdots\cdots㉔$$

$$q_{5,t+1}=\frac{\lambda_{25}Q_2q_{2,t}}{Q_5}+(1-\lambda_5-\lambda_{52})q_{5,t} \quad \cdots\cdots㉕$$

$$q_{T,t+1}=\frac{Q_1q_{1,t+1}+Q_2q_{2,t+1}+Q_3q_{3,t+1}+Q_4q_{4,t+1}+Q_5q_{5,t+1}}{Q_T} \quad \cdots\cdots㉖$$

（T＝全体）

7. 恒常状態の各臓器の濃度計算

(1)減衰期測定値より減衰指数曲線，半減期を求める．

指数曲線と測定値の適合度をｔ検定する．

減衰期濃度をＣとする．時間をＴとする．減衰指数曲線は

$C=ae^{-bT}$

$\ln C=\ln a+bT$

$b=\dfrac{\sum(T\ln C)-\sum C\sum\ln C}{n\sum T^2-(\sum T)^2}$

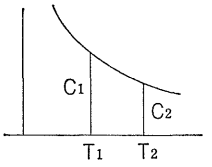
$a=e^A$ …… 但し $A=\dfrac{\sum\ln C-b\sum T}{n}$

$r=\dfrac{n\sum(T\ln C)-\sum T\sum\ln C}{\sqrt{\{n\sum T^2-(\sum T)^2\}\{n\sum(\ln C)^2-(\sum\ln C)^2\}}}$

$t=\dfrac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$　　$\phi=n-2$

$\tau=\dfrac{-(\ln 2)\times(T_2-T_1)}{\ln\dfrac{C_2}{C_1}}$

＝半減期……㉗



40日以降の測定値を利用し，各臓器半減期を計算する．この半減期は著者の求める半減期とは異なるので，みかけの半減期と呼ぶことにする．

血液・肝・脳は指数曲線に適合しているが腎は適合していない．しかし腎の適合しないのは測定上の誤差あるいは生体差と考え，一応適合するものとして下記計算を続行する．（表２）

表２　減衰指数曲線より算出したみかけ半減期と理論臓器濃度

臓器別	みかけ半減期	実験41日目	47日目	54日目	61日目
血　液	15.8日*	155ppm	119ppm	87ppm	64ppm
肝	24.5日*	45	38	31	26
腎	95.4日	80	77	73	69
脳	16.2日**	15	11	8	6

指数曲線への適合度　＊＝危険率５％で適合する
＊＊＝　〃　１％で適合する

⑵求まった半減期は喜田村[4]の説によればいづれ等しくなる筈である．しかしここに算出された半減期は臓器によりやや差がある．これは動物実験には常に大きな変動があることによって起ったものと考え，各臓器内の総水銀蓄積量を重みとして乗じて平均をとって総合半減期とした．

総合半減期は20.1日となった．

⑶総合半減期より恒常状態臓器濃度を求める．

$dA=\underset{(ppm)}{20\mu g}\times\underset{(摂取量)}{30g}\div 1日$

$=6.25\mu g/\text{quarter}$（15分）

理論蓄積曲線

$A=\dfrac{A_0\tau}{\ln 2}\times\left\{1-\left(\dfrac{1}{2}\right)^{\frac{t}{\tau}}\right\}$

τ＝半減期

A_0＝単位時間の摂取量＝dA

40日目の各臓器濃度を求める．$=q_{i,40}$

$q_\infty=q_{i,40}\times\left\{1-\left(\dfrac{1}{2}\right)^{\frac{40}{\tau}}\right\}$

$=q_{i,40}\times\left(1-0.5^{\frac{40}{20.1}}\right)=q_{i,40}\times 1.3367$

恒常状態の各臓器濃度が求まる．

消化管　濃度　$q_{1,\infty}=517$ppm
血液　　濃度　$q_{2,\infty}=195$ppm
肝　　濃度　$q_{3,\infty}=66$ppm
腎　　濃度　$q_{4,\infty}=145$ppm
脳その他濃度　$q_{5,\infty}=19$ppm

8.　移行係数の算出（第１回）

投与メチル水銀は1.5日で１％が尿中に排泄され，99％が消化管から血中に吸収されるとする．計算の単位は15分単位とする．

$\lambda_1=0.697916\times10^{-4}$

$\lambda_{12}=0.0314744$

$\lambda_{23}=0.0610537$

$\lambda_{24}=0.00146195$

$\lambda_{25}=0.0610537$

$\lambda_{31}=0.398347$

$\lambda_4=0.0131657$

$\lambda_5=0$

$\lambda_{52}=0.0505323$

半減期$=\dfrac{\ln 2}{\lambda}$(単位 quarter)$=\dfrac{\ln 2}{\lambda\times4}$（単位時間）

消化管$=\dfrac{\ln 2}{(\lambda_1+\lambda_{12})}=5$時間30分

血　液$=\dfrac{\ln 2}{(\lambda_{23}+\lambda_{24}+\lambda_{25})\times4}=1$時間24分

肝　　$=\dfrac{\ln 2}{\lambda_{31}\times4}=24$分

腎　　$=\dfrac{\ln 2}{\lambda_4\times4}=13$時間12分

脳その他$=\dfrac{\ln 2}{(\lambda_5+\lambda_{52})\times4}=3$時間24分

求まった移行係数で実験日の各臓器濃度理論値を算出すると，20日腎 116ppm の実験値を除くとよく適合していることになる．しかし同時に尿尿中総排泄量を算出すると，メチル水銀の殆んどは尿中に排泄されると算出されて来る．（表３）

表3 第1回理論値算出

実験日		20日	41日	47日	54日	61日
実験 quarter		1920	3936	4512	5184	5856
メチル水銀濃度	消化管	265ppm	375ppm	303ppm	236ppm	184ppm
	血液	99	143	116	90	71
	肝	34	49	40	31	24
	腎	71	108	88	69	54
	脳	9.4	13.8	11.2	8.7	6.8
	全体	29	42	34	27	21
尿中総排泄量		0.3mg	1.0mg	1.2mg	1.4mg	1.6mg
尿中総排泄量		2.9mg	10.2mg	12.5mg	14.6mg	16.2mg

29日腎濃度を除くとよく適合している。
尿中排泄量が多いことが疑問点である。

9. 消化管濃度測定

消化管濃度が非常に高いことが理論的に求まったので，その確認のため再度動物実験を行った．他の臓器濃度はよく適合したが 消化管濃度は理論値では5日目で81.9ppm となることになっているが，実験値では 4.3 ppmに過ぎなかった．そこで消化管濃度を減じ実験値に合せ，余った総水銀量を脳その他に包含せしめた．従って今後はこの第5の Compartment はその他と称する．消化管の濃度が低くなれば，当然のことながら，流速をそれだけ早くしなければならない．即ち濃度は81.9ppm を4.3ppm へ，移行係数は 81.9÷4.3=19.0 倍する必要がある．

先に求まった移行係数 λ_1 及び λ_{12} を19.0倍する．新しい $\lambda_1=0.00132856$, 新しい $\lambda_{12}=0.599150$ となる．
しかるに
$(1-\lambda_1)^t=1-(1-\lambda_{12})^t$ であるから
$t=5.4034$ となる．

10. 移行係数の算出（第2回）

新しい移行係数および各臓器半減期は下記の如く λ_1, λ_{12}, λ_{52}, 消化管半減期，その他半減期が変更される．

$\lambda_1=0.00132856$
$\lambda_{12}=0.599150$
} 0.600479 消化管半減期 17分

$\lambda_{52}=0.0197544$ その他半減期 8時間46分

11. 尿尿中への排泄比

以上の計算では実験値と理論値がよく適合しているが，メチル水銀は尿中へ主として排泄されることとなる．しかし，一般的に尿中への排泄が信じられているので，尿尿中への排泄比の修正を行った．

使用した実験値には 尿尿中への排泄量が測定されていないので，Cikrt[5] の実験値および浮田[6]の実験値を使用した．

Cikrt は 88μg を静脈内注射したところ24時間内尿尿中排泄比は 4.9 となっている．一方浮田は 3mg を皮下注射したところ5日目に1.35となっている．いま恒常状態時の尿尿中排泄比を α とすると，Cikrt の実験でも浮田の実験でも尿尿中の排泄比は α の函数である．即ち

$4.9=f_1(\alpha)$
$1.35=f_2(\alpha)$ である．

そこで 尿尿排泄比 α 及びその他尿排泄比 β を使用して各臓器移行係数を算出することにする．

$$\lambda_1=\frac{dA\times\alpha}{Q_1q_{1\infty}\times(1+\alpha+\beta)}$$

$$\lambda_5=\frac{\beta\lambda_1Q_1q_{1\infty}}{\alpha Q_5q_{5\infty}}$$

$$\lambda_4=\frac{\lambda_1Q_1q_{1\infty}}{\alpha Q_4q_{4\infty}}$$

$$\lambda_{24}=\frac{\lambda_4Q_4q_{4\infty}}{Q_2q_{2\infty}}$$

$$\lambda_{12}=1-10^{\left[\frac{\log\{1-(1-\lambda_1)\}t}{t}\right]}$$

$$\lambda_{31}=\frac{(\lambda_1+\lambda_{12})Q_1q_{1\infty}-dA}{Q_3q_{3\infty}}$$

$$\lambda_{23}=\frac{\lambda_{31}Q_3q_{3\infty}}{Q_2q_{2\infty}}$$

$$\lambda_{52}=\frac{\lambda_{25}Q_2q_{2\infty}}{Q_5q_{5\infty}}-\lambda_5$$

$$\lambda_{25}=\lambda_{23}$$

Newton 法[7]により α の近似値を計算すれば Cikrt の実験にあっては $\alpha=1.472$ となり，浮田の実験にあっては $\alpha=1.016$ となった．この2つの値の平均を取れば $\alpha=1.244$ となる．

表4　実験の各臓器総水銀濃度・尿尿総排泄量理論値

実験日	15分単位	消化管濃度	血 液 q_2	肝 q_3	腎 q_4	その他q_5	全 体 q_T	尿総排泄量 μg	尿総排泄量 μg
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	μg	μg
5日	480	5.4	33.4	11.3	18.0	7.2	9.1	207	74
10日	960	8.8	58.8	20.0	37.6	13.5	16.7	644	333
15日	1440	11.7	80.2	27.3	54.4	18.9	23.2	1273	760
20日	1920	14.1	98.3	33.4	68.5	23.4	28.7	2065	1331
25日	2400	16.2	113.5	38.6	80.5	27.2	33.3	2993	2021
30日	2880	17.9	126.3	43.0	90.5	30.4	37.2	4036	2813
35日	3360	19.3	137.1	46.7	99.0	33.1	40.4	5177	3690
40日	3840	20.6	146.2	49.8	106.1	35.4	43.2	6399	4640
41日	3936	18.6	138.2	47.1	105.3	34.6	41.8	6633	4836
47日	4512	15.1	112.5	38.4	88.1	28.2	34.1	7868	5914
54日	5184	11.9	88.6	30.2	69.5	22.2	26.8	9023	6929
61日	5856	9.4	69.8	23.8	54.7	17.5	21.1	9933	7730

実験値との適合性検定の結果20日目の腎測定値を除きよく適合している

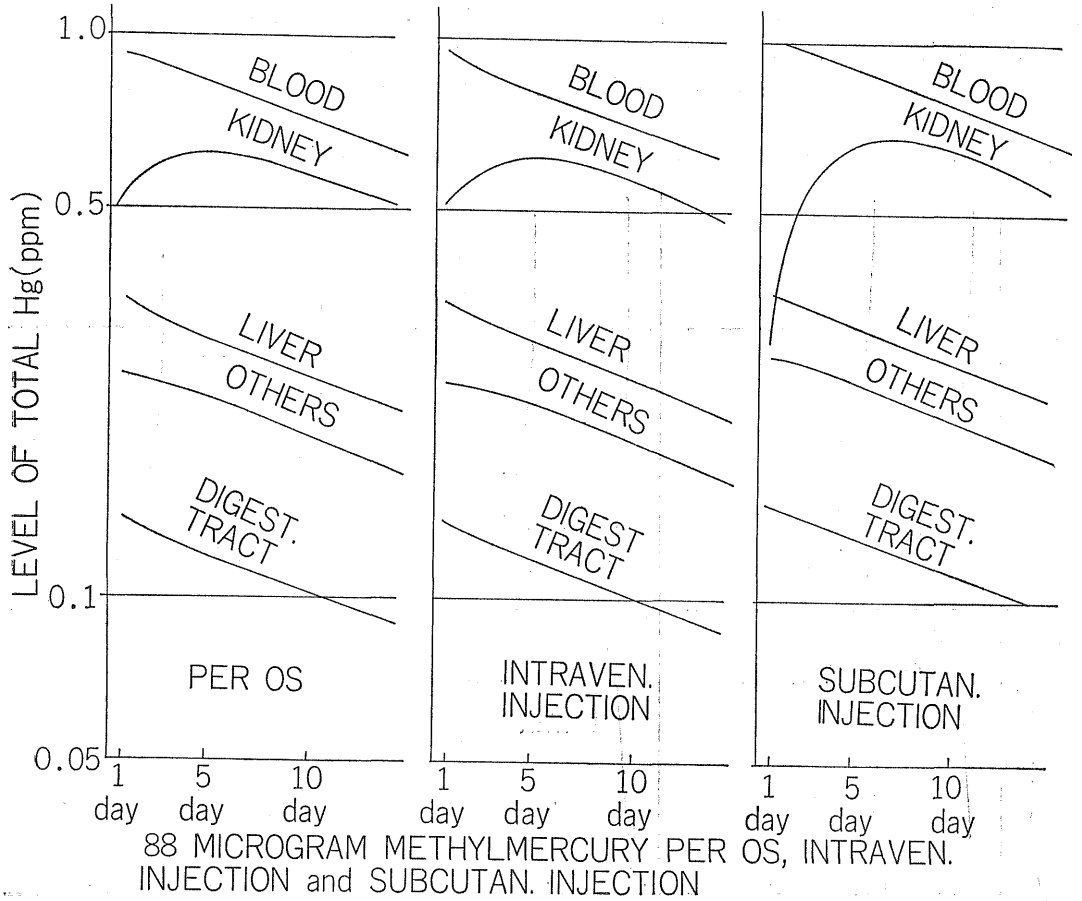


Fig. 2　Total mercury level of organs in rat

恒常状態時におけるその他より排泄される量対尿中排泄比 $\beta=0$ とする．

12. 移行係数の算出（第3回）

新たな移行係数を算出する．（単位15分）

$\lambda_1 = 0.0085$, $\lambda_{12} = 0.44$ } 0.4485 消化管半減期 23分

$\lambda_{23} = 0.045$, $\lambda_{24} = 0.00071$, $\lambda_{25} = 0.045$ } 0.09071 血液半減期1時間54分

$\lambda_{31} = 0.29$ 肝半減期 36分

$\lambda_4 = 0.0064$ 腎半減期 27時間

$\lambda_5 = 0$, $\lambda_{52} = 0.015$ } その他半減期 12時間

13. 実験理論値の算出

算出された移行係数をもちいて実験の理論値を算出すれば，表4となる．

χ^2 検定によれば，実験値20日目の腎濃度 116ppm を除くと，良く理論値と適合していることが認められる．

尿尿中総排泄量も実験初期には尿中に排泄される量は尿中に排泄されるものの約3倍であるが，実験の最後の61日目には約1.2倍と比率が下って来る．メチル水銀は殆んど尿中に排泄されるものと信じられているが，実験が短期間であると，大半は尿中に排泄されるとの結論をうることとなる．しかし，長期間観察すれば尿中と同じ程度まで，排泄されるのが認められる筈である．

更らに消化管吸収率を計算すると

$(1-\lambda_1)^{5.4084} = C = (1-0.0085)^{5.4084} = 0.95$

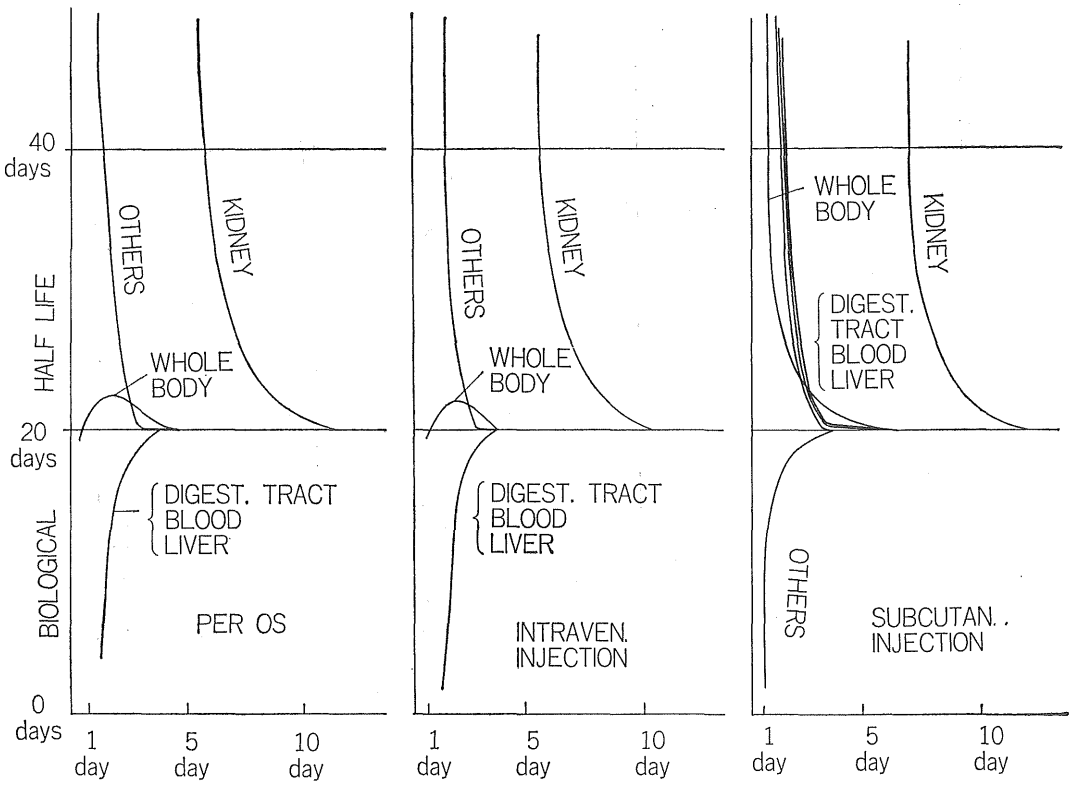
となり，消化管でのメチル水銀の吸収は投与量の95%であると計算される．

Ⅲ．移行係数を使用しての各種投与実験

求まった移行係数をもちいて，一回投与実験の各臓器の濃度増減曲線を算出した．（図2）

経口投与・静脈注射・皮下注射の3法の比較を行った．経口投与と静脈注射は非常によく似た経過をとるが，これはメチル水銀は消化管から急速に吸収されて血中に入り，血液濃度を高めるためと考えられる．一方皮下注射にあっては，体外への排泄がやや遅く，消化管・血液・肝およびその他の濃度は前2者に比して高い．腎については蓄積はやや遅くはじまり，前2者に比して高濃度となる．体外への排泄すなわち尿尿中への排泄は，経口投与では尿中への排泄が多く，尿中への排泄は静脈注射・皮下注射に比して少くなっている．また皮下注射は前2者に比して尿中への排泄が遅れている．

各臓器の総水銀濃度の減衰曲線よりみかけの半減期を



AFTER AN ADMINISTRATION OF METHYLMERCURY

Fig. 3 Biological half lives of organs in rat

算出すれば図3のごとく変化する．

経口投与および静脈注射はほぼ同様な曲線を画き，消化管・血液・肝はメチル水銀投与後次第に半減期は長くなり，4日目でみかけ半減期は20.1日となる．腎の半減期は次第に短くなり11日～12日目で20.1日になる．全体をみると2日位では21日になるが，4日目には20.1日になった．一方皮下注射は消化管・血液・肝・全体は次第に減少して5日目には20.1日となる．その他の臓器は次第に増加して4日目に20.1日になり，腎は次第に減少して12日目に20.1日となる．つまり投与2週間をすぎると体内のいづれの臓器も一定のみかけ半減期になる．これすなわち喜田村の説は理論的に正しいことが証明される．メチル水銀に限らず，すべての物質の体内代謝も同じ理論からいづれの臓器をとってもみかけの半減期は同じとなる．ただし，メチル水銀は体内臓器の代謝が時間単位の速さで行われるので，投与後2週間程で一定のみかけの半減期（先に述べた綜合半減期）に到達するが，体内代謝の遅い物質にあっては，実験日数を相当延長しなければ，一定のみかけの半減期に到達しないものと考えられる．

Ⅳ．結　　語

メチル水銀のラット臓器別半減期は極めて短く，消化管は23分，血液は1時間54分，肝は36分，腎は27時間，その他の臓器は12時間である．メチル水銀の消化吸収率は95%であり，5%が尿中に排泄される．メチル水銀を恒常的に一定量毎日投与すると屎尿中排泄比は1.244となる．各臓器のみかけの半減期およびラット全体の綜合半減期は20.1日である．

本理論はメチル水銀に限らずすべての物質に適用されうるが，特に環境汚染物質として注目されている物質は生体内での分解が起こり難いので最も適用出来るものと考えられる．

今後メチル水銀以外についても，試算を試みる所存である．

（本研究は昭和49年度衛生局調査研究「メチル水銀プロジェクト研究」の一部として実施し，その概要は第45回日本衛生学会昭和50年4月で発表した）

文　　献

1) Kopple, J. D., Rabinowitz, M. B. and Wetherill, G. W.: *Science*, 182, 725, 1973
2) Ohi, G., Nishigaki, S., Seki, H., Tamura, Y., Maki, T., Maeda, H., Ochiai, S., Yamada, H., Shimamura, Y. and Yagyu, H.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 527, 1975
3) Deitz, F. D., Sell, J. L. and Bristol, D.: *J. AOAC*, 56, 378, 1973
4) 喜田村正次，早川清，柴田孝子，飯田幸男，住野公昭：日衛誌，26, 35, 1971
5) Cikrt, M. and Tichy, M.: *Environ. Res.*, 8, 71, 1974
6) 浮田忠之進：科学，41, 557, 1971
7) Sony, *Micro Computer Sobax Icc-2700, Basic Program Library, Mathematics*, Program No. M-2035

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26 - 1, 312—318, 1975

防火用貯水槽水の衛生学的研究

中村　弘* 斉藤庄次* 高橋正博*
大橋則雄* 山崎堅吉* 三村秀一*

Hygienic Studies on the Water of Fire Cisterns

HIROSHI NAKAMURA*, SHOJI SAITO*, MASAHIRO TAKAHASHI*,
NORIO OHASHI*, KENKICHI YAMAZAKI* and SHUICHI MIMURA*

The water samples from 250 fire-cisterns in Tokyo Metropolis were tested whether they are good to drink or not in cases of such disasters as earthquakes. Further, a water treatment and a preventive method for dissolving of alkaline substances were examined.

Some informations were obtained as follows:

(1) Most of the water samples have been contaminated by rain or soiled water, iron, or alkaline substances, which seem to be due to the structure, the iron accessories, or the concrete walls of the fire-cisterns. However, we have found that the water samples of 27 fire-cisterns are good to drink after chlorination.

(2) The above contaminators were considerably removed by the addition of aluminium sulfate and the filtration.

(3) A soaking test of concrete blocks coated with epoxy resin paints for water supply use indicated that these paints were effective for the prevention of alkaline dissolution from the concrete.

However, phenols were found in two samples and other organic matters showed a tendency to increase in all three samples.

緒　言

この過密な大都市に関東大震災に匹敵する大災害が発生したとき，上水道の配水管や水道施設は大きく破壊され，我々の飲料水の大部分は絶たれることになるであろう．そして，道路の破壊などにより応急給水も不可能となると考えられる．昭和47年2月，八丈島沖地震があった．このとき，八丈島は震度5の強震であったが，水道施設は大きく被害をうけ，同島の一部は約一週間断水した．幸にして，家屋倒壊や火災がなく，市街地の道路破壊も少なかったため，応急給水や配水調整がスムーズに行なわれた.[1] また，近時，多摩川下流域の地震の可能性が地震予知連絡会によって発表され，種々な対策がとられている.[2] このような災害時における飲料水の確保の問題は困難な面も多いが，いま多くの自治体で真剣に取組まれている．

現在，緊急時における飲料水として考えられているものには，(1)ビル等における受水槽水あるいは高架水槽水，(2)井戸水などがあるが，(1)は都会のビル街に限られ，(2)も水質悪化により飲料水として使用できるものは少なくなってきている．また，学校などにおけるプール水，あるいは池，堀，川などの水を災害時用沪過機などにより浄化して飲料水とすること，あるいは特別に災害時用貯水槽を設置し，これを飲料水とすることなども考えられている．

現在，東京都の区部には約5000ヶ所の防火用貯水槽があるが，これらの約5％に相当する250ヶ所の貯水槽水の水質について衛生学的見地より調査した．また，これら貯水槽水の処理法および貯水槽のコンクリート壁からのアルカリ溶出防止法についても検討した．

実験方法

1. 防火用貯水槽水の水質　都区内の防火用貯水槽250ヶ所の槽内の水について，次に示す試験を行なった．カッコ内は水道法水質基準を示す．

濁度（2度以下），色度（5度以下），臭味（異常があってはならない），水素イオン濃度（pH として 5.8～8.6），アンモニア性窒素および亜硝酸性窒素（同時に検

* 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

出してはならない），硝酸性窒素（10ppm 以下），塩素イオン（200ppm 以下），過マンガン酸カリウム消費量（10ppm 以下），総鉄（0.3ppm 以下），大腸菌群（50m*l* 中検出してはならない），一般細菌数（1 m*l* 中 100以下）

試験方法は水道法水質基準に関する厚生省令に基づく検査方法によった．ただし，硝酸性窒素についてはGR硝酸試薬による比色定量法を，鉄については硫シアンカリ法[4]によった．

なお，水質試験を行なった防火用貯水槽の概要は次の通りである．

(イ)設置場所　車道下，歩道下，公有地，民有地内に設置されたもので，採取場所（区）は次の通りである．（　）内は採取件数を示す．

千代田（8），中央（7），港（14），品川（11），大田（16），目黒（7），世田谷（16），渋谷（8），新宿(13)，中野（10），杉並（11），文京（10），豊島（8），北(12)，板橋（14），練馬（11），台東（11），荒川（10），足立（10），墨田（9），江東（15），葛飾（10），江戸川(9)，合計 250

(ロ)容量　40 t 槽　215（86%）
　　100 t 槽　35（14%）

(ハ)環境　雨水・汚水の流入するもの（水槽の位置が低所にあり，雨水等が蓋から流入するものおよび排水不良により冠水するもの）97(38.8%)，雨水・汚水の流入しないもの（鉄蓋の鍵穴などから直接雨が降り込むものを含む）153（61.2%）

(ニ)使用状況　過去1年以内に半量以上の水を使用したもの　57(22.8%)，過去1年以内に半量以上使用しないもの 193（77.2%）

(ホ)設置年度　1945年以前　112（44.8%），1946～1954年　18（7.2%），1955～1964年　71（28.4%），1965年以降　49（19.6%）

2. 貯水槽内での水質の変動　上記貯水槽から4貯水槽水を選び，その原水と考えられる水道水と共に，次に示す陽イオンおよび陰イオンを測定し，貯水槽内における水質の変化を調べた．

ナトリウムイオン，カリウムイオン，カルシウムイオン，マグネシウムイオン，塩素イオン，硫酸イオン，重炭酸イオン，炭酸および炭酸イオン（但し，炭酸，重炭酸イオンおよび炭酸イオンについては水温，pH およびアルカリ度より算出した）

3. 貯水槽水の処理　貯水槽水に硫酸バンド$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ を 10，20，40，80 および 120ppm 添加して，pH の変化を調べ，更にこの水を素焼沪過器（Chamberland Filter）で沪過したときの水質の変化をみた．

4. アルカリ溶出防止法の検討　水道用エポキシ樹脂塗料をコンクリート片（10×5×2 cm）の全面に塗布し，乾燥後，この2片を2*l* の水道水に浸漬し，30 日間室温に放置した．この水について，水道水を対照として水質の変化を調べた．塗料は三つのメーカーのものをそれぞれ1種類ずつ使用した．

結果および考察

1. 貯水槽水の水質　250 の貯水槽水の試験の結果，水道法水質基準に適合するものは2ケ所であり，他は不適合であった．各試験項目別に水質基準不適合率および測定結果を図1に示す．最初に各試験項目別に考察する．

濁度：水質基準の2度を超えるものは 42.4 % であった．原因は主として汚濁水の混入および鉄によるものと考えられる．鉄との相関性を調べた結果，かなりの相関性が認められた（r=0.553，1 %の危険率で有意）．

色度：全項目中，最も水質基準不適合率が高く78.4%に達した．過マンガン酸カリウム消費量，鉄および一般細菌数との相関性を調べた結果，過マンガン酸カリウム消費量との相関性が最も強く（r=0.624），次に鉄（r=0.477），一般細菌数（r=0.338）の順であった．いずれの相関係数 r も1 %の危険率で有意であった．従って色度の原因は主として有機物質および鉄と考えられる．

臭味：濁度，色度，過マンガン酸カリウム消費量および鉄との関連性が認められた．原因は汚濁水の混入および鉄によるものと考えられる．

水素イオン濃度（pH）：大部分（98.8%）はアルカリ性を示し，水質基準の 8.6 を超えたものは全体の55.6%に達した．原因は貯水槽のコンクリート壁よりアルカリが溶出するためと考えられる．後述するが，設置年度の新しいものほど，pH 値は高い傾向を示した．

アンモニア性窒素・亜硝酸性窒素：共に50%以上の貯水槽水から検出され，両者が同時に検出されたものは 37.6%であった．原因は主として汚濁水の混入によるものと考えられるが，硝酸性窒素の還元によるものも考えられた．

硝酸性窒素：平均 4.9ppm，最大値 9.7ppm で水質基準を超えるものは認められず，特に汚染との関連性は見出せなかった．

塩素イオン：平均値 20.7ppm で貯水槽水の汚染度に比較して，値はあまり高くない．水質基準の 200ppmを超えるものは1件であった．

過マンガン酸カリウム消費量：平均値 7.4ppm で，通常の水道水（1～2 ppm）に比較して，かなり高い値を示した．水質基準の 10ppm を超えるものは 20.8 %であった．原因は色度との相関性が高いことより，汚濁水の

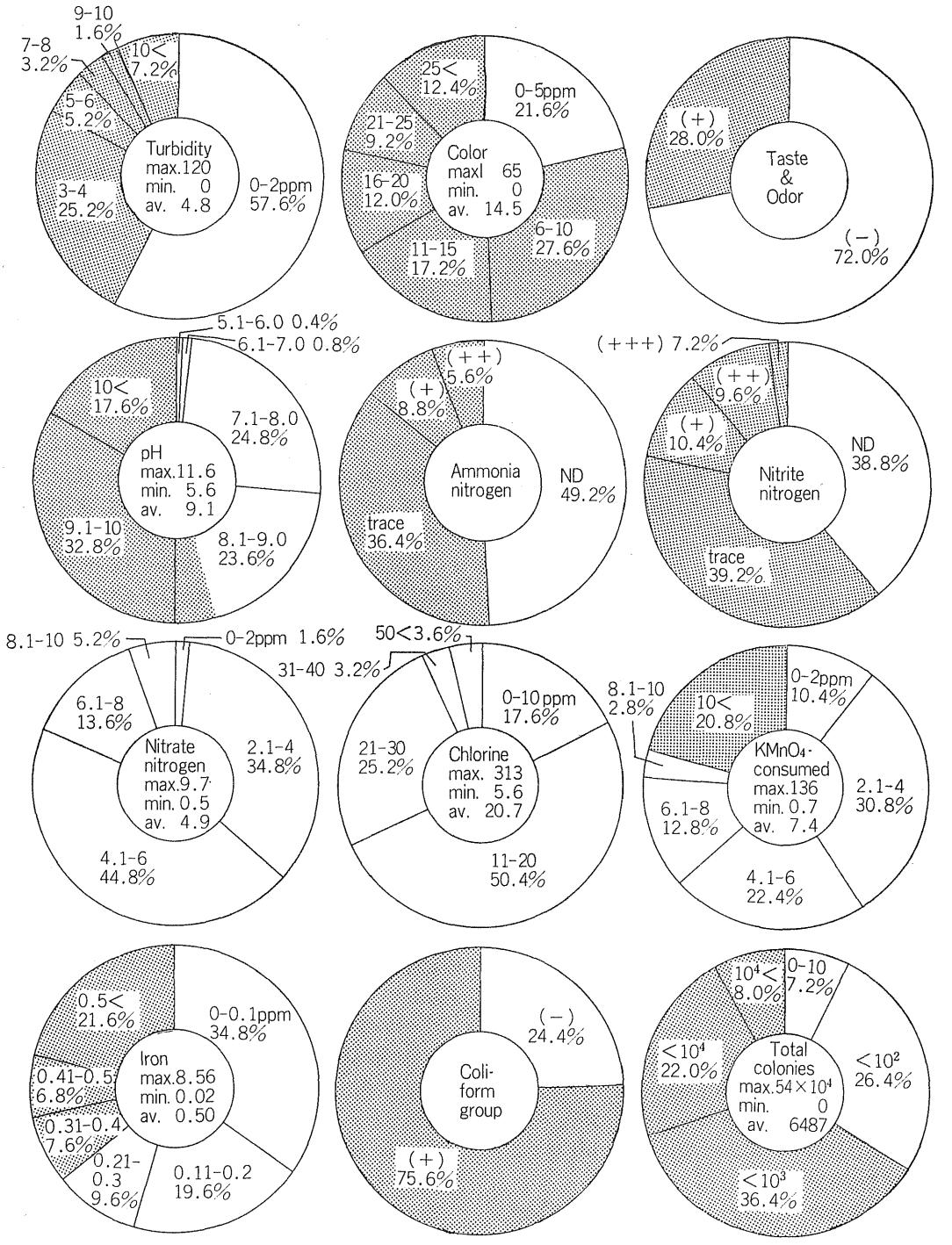


Fig. 1. Sanitary characteristics of the water samples from fire-cisterns
Stippled areas show unfitness for the drinking water criteria.

Table 1. Percentages of unfitness for the drinking water criteria on the water samples from 250 fire-cisterns

Samples (No. of sample)	Turb. % (ppm)	Color % (ppm)	Taste & Odor %	pH % (value)	NO_3-N % (ppm)	NO_2-N %	NH_3-N %	Cl^- % (ppm)	$KMnO_4$-consum. % (ppm)	Fe % (ppm)	Coli-form group %	Total colonies % (no./ml)
Total (250)	42.4 (4.8)	78.4 (14.5)	28.0	55.6 (9.1)	0.0 (4.9)	61.2	50.8	0.4 (20.7)	20.8 (7.4)	36.0 (0.50)	75.6	66.4 (6,487)
a (122)	35.7 (3.7)	74.1 (14)	26.8	43.8 (8.7)	0.0 (4.5)	55.4	50.0	0.0 (19)	22.3 (7.2)	30.4 (0.44)	88.4	75.0 (9,556)
b (18)	33.3 (5.0)	66.7 (12)	16.7	44.4 (8.7)	0.0 (5.2)	66.7	38.9	0.0 (17)	11.1 (5.3)	22.2 (0.22)	83.3	72.2 (10,063)
c (71)	49.3 (6.0)	85.9 (17)	35.2	59.2 (9.1)	0.0 (4.8)	57.7	50.7	1.4 (22)	25.4 (9.0)	47.9 (0.69)	74.6	66.2 (5,146)
d (49)	46.9 (5.3)	83.7 (13)	24.5	81.6 (9.5)	0.0 (5.3)	77.6	57.1	0.0 (23)	32.7 (6.3)	32.7 (0.52)	44.9	44.9 (1,542)
R (97)	54.4 (6.3)	80.4 (17)	34.0	51.5 (8.8)	0.0 (4.6)	63.9	53.6	1.0 (24)	24.7 (7.8)	39.2 (0.52)	81.4	76.3 (11,350)
NR	39.2 (3.8)	77.8 (13)	24.2	58.2 (9.0)	0.0 (5.0)	59.5	49.0	0.0 (19)	18.3 (7.2)	32.7 (0.50)	71.9	60.1 (3,865)
A (193)	43.5 (4.9)	79.3 (15)	28.0	57.0 (9.0)	0.0 (4.8)	63.2	53.4	0.0 (19)	21.2 (7.7)	34.2 (0.46)	73.1	64.2 (6,951)
B (57)	35.1 (4.3)	77.2 (16)	28.1	50.9 (8.9)	0.0 (5.0)	54.4	42.1	1.8 (26)	19.3 (6.5)	38.6 (0.65)	84.2	73.7 (6,154)

( ) mean value

Construction year...a : before 1945, b : 1946-1954, c : 1955-1964, d : after 1965
Circumstances...R : Fire-cisterns contaminated by rain or soiled water
NR : Fire-cisterns not contaminated by rain or soiled water
Exchange of water...B : Fire-cisterns exchanged the water of half quantity or more within a year
A : Fire-cisterns not exchanged the water, or under half quantity within a year

混入および鉄の溶解によるものと考えられる.

総鉄：比較的高く，最高 8.6ppm，平均 0.50ppm を示し，水質基準の 0.3ppm をこえるものは 36％であった．原因は鉄蓋など鉄製部分からの鉄さびなどが溶解するものと汚濁水と共に流入するものが考えられる.

大腸菌群：検出率高く全体の75.6%より検出された．原因は主として汚濁水の混入によるものと考えられる.

一般細菌数：水質基準の 1 ml 中 100 を超えるものは66%に達した．原因は主として雨水等汚濁水の混入によるものと考えられるが，換気口などからの汚染も考えられる.

次に，「貯水槽の設置年代別」，「雨水・汚水の流入の有無」，「過去1年以内に半量以上の水の交換の有無」に分けて水質を比較した（表1）.

設置年代別：それぞれの試験項目の平均値で比較するとその差はあまり顕著ではないが，水質基準不適合率で比較すると，図2に示すように，濁度，色度，pH，大腸菌群および一般細菌数に相違が認められ，前三者は設置年代の新しいものほど，後二者は古いものほど，不適合率が高かった．濁度，色度はコロイド粒子の沈降性，[7] pH 値はコンクリートからのアルカリ溶出量，[6] 大腸菌群と一般細菌数は汚染の進行性とそれぞれ関連しているためと考えられる.

雨水，汚水の流入の有無：表1に示すように水質基準不適合率および平均値は雨水等の流入するものの方が水質的に悪い傾向を示した．これらの平均値の差の検定（t 検定）を行なったところ，いずれの項目においても，5％の危険率で有意差は認められなかった．これは防火用貯水槽という性質上，衛生的配慮が全くなされていないためであると考えられ，たとえ雨水等汚濁水の流入がなくとも，貯水槽の建設時，あるいはその後の使用時の汚染，さらに，貯水槽の材質からくる汚染がかなりの割合を占めているためと考えられる.

過去1年以内に水の使用の有無：表1に示すように，過去1年以内に半量以上の水の交換の有無に分けた場合，水質の差は殆んど認められない．また，二つの平均値の差の検定においても有意差は認められなかった．これは水の使用時に槽内の清掃等が全く行なわれないた

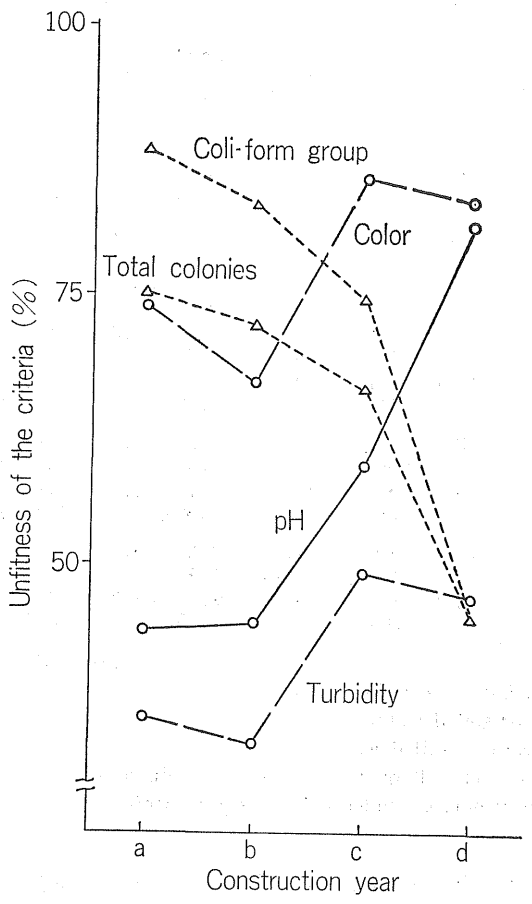


Fig. 2. Percentages of unfitness for the Drinking Water Criteria on construction year of fire-cisterns
a : before 1945 c : 1955-1964
b : 1946-1954 d : after 1965

め，底部に土砂や汚染物質が沈降し，かなりの水量が交換されても，特に水質がよくならないものと考えられる．

以上の結果，これらの貯水槽水の汚染の原因は主として(1)雨水等汚濁水の混入，(2)コンクリートからのアルカリの溶出，(3)鉄蓋等鉄製部分からの鉄の溶解，(4)建設時または使用時の汚染が考えられる．

災害時に，これらの水を何らかの処理をして飲料水とすることを考えるとすれば，次のように，貯水槽水を分けることができる．

消毒のみ（水質基準適合を含む）	27ヶ所（10.8%）
沪過，消毒	59 〃 （23.6%）
pH 調整のみ	9 〃 （ 3.6%）
pH 調整，消毒	14ヶ所（ 5.6%）
pH 調整，沪過	28 〃 （11.2%）
pH 調整，沪過，消毒	49 〃 （19.6%）
上記以外の処理	64 〃 （25.6%）

ただし，大腸菌群，一般細菌数が水質基準に不適のものを「消毒」，濁度，色度，鉄が不適のものを「沪過」，pH が不適のものを「pH 調整」，その他の項目で不適のものを「他の処理」を要するとして分けた．災害時にこれらの水を飲料水とするならば，消毒薬の他に沪過機なども必要と考える．

2. 貯水槽内での水質の変動 4つの防火用貯水槽水とその原水と考えられる水道水の各成分の分析結果から，図3に示すようなキーダイヤグラムを作成した．この図に示されるように，貯水槽内の水は原水の水道水に比較し，陽イオンではそれぞれナトリウムイオンおよびカリウムイオンが増加のカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンは減少の傾向を示した．また，陰イオンでは重炭酸イオンおよび炭酸イオンが著しく増加し，硫酸イオンは減少の傾向を示した．これらの事はコンクリートからアルカリが溶出し重炭酸イオンや炭酸イオンが増加し，一方，水中のカルシウムイオンやマグネシウムイオンは炭酸塩となって沈降するものと考えられる．また，硫酸イオンは長期にわたる水の停滞のため，水中が還元状態となり，その一部が還元されて，減少するものと考えられる．

3. 貯水槽水の処理 貯水槽水の汚染の原因は主として汚濁水の混入，鉄さびの溶解，コンクリートからのアルカリの溶出が考えられる．しかし，前二者は沪過することにより，かなり除去可能である[8]が，pH の調整が比較的難かしい．塩酸，酢酸など酸類で中和することも考えられるが，貯水槽水はかなりの緩衝性があり，その投入量も多量になる．pH 10.7 の貯水槽水に硫酸バンドを投入したところ，図4に示すような pH の低下をみた．よって，pH の高い水については硫酸バンドを 10 ppm 程度添加したのち沪過することにより，かなりの水質改良が期待できる．この処理例を表2に示す．

4. アルカリ溶出防止法の検討 貯水槽のコンクリート壁からのアルカリの溶出を防止するため，何らかの方法がとられることが望ましい．これらの方法としては，コンクリート壁を炭酸ガスで処理する方法，[6] 塩ビ板を張付ける方法，[8] 内面に塗料などを塗る方法等が考えられる．我々は現在水道用として用いられているエポキシ系樹脂塗料について検討した．結果は表3に示す．今回実験に使用した三つの塗料はいずれも水に臭気をつけ，過マンガン酸カリウム消費量も増加させた．また，フエノ

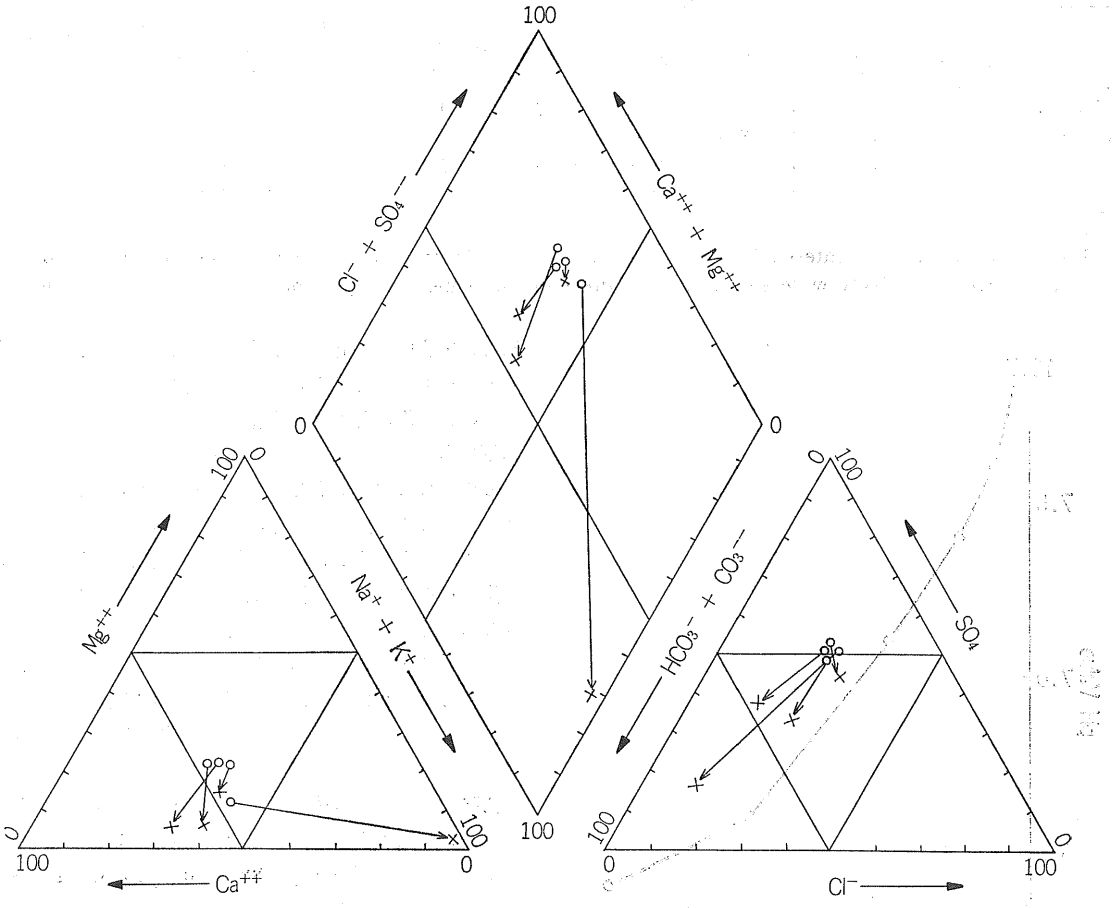


Fig. 3. Key-diagram of cistern waters (×) and their original waters (○)

Table 2. Results of a water treatment

	Samples	Turb. (ppm)	Color (ppm)	Taste & Odor	pH	NO_3-N (ppm)	NO_2-N	NH_3-N	Cl^- (ppm)	$KMnO_4$-consum. (ppm)	Fe (ppm)
Before	1	100	25	(+)	10.0	0.5	(+)	(±)	11	14.0	1.5
	2	2	8	(−)	9.2	0.5	(−)	(+)	24	3.2	0.1
	3	6	50	(+)	10.7	3.0	(卄)	(+)	13	12.2	1.0
	4	0	3	(−)	7.5	1.0	(−)	(±)	20	2.1	0.2
After	1	0	5	(−)	7.1	1.0	(±)	(−)	9	2.9	0.0
	2	0	3	(−)	7.3	1.0	(±)	(−)	21	3.0	0.0
	3	0	17	(−)	7.7	0.5	(±)	(−)	12	7.8	0.0
	4	0	0	(−)	6.9	1.0	(±)	(−)	19	2.8	0.0

The water samples of fire-cisterns were filtered by Chamberland filter, after addition of 10 ppm aluminium sulfate.

Table 3. Results of soaking test of painted concrete blocks

		Turb. (ppm)	Color (ppm)	Taste & Odor	pH	NO_3-N (ppm)	NO_2-N	NH_3-N	Cl^- (ppm)	$KMnO_4$ consum. (ppm)	Fe (ppm)	Alkalinity (ppm)	Phenols (ppm)
Control		0	0	(−)	7.3	0.6	(−)	(−)	11	0.7	0.05	30	0.00
Sample	A	0	2	(+)	9.4	0.4	(±)	(±)	11	3.6	0.06	66	0.00
	B	0	2	(+)	7.3	0.5	(−)	(±)	11	17.5	0.32	32	1.14
	C	1	2	(+)	7.7	0.7	(±)	(−)	11	7.0	0.06	30	0.02

Control : Tap water

Preparation of sample waters : Two concrete blocks (10×5×2cm) coated with three different epoxy resin paints respectively were soaked in two liters of tap water during 30 days on room temperature.

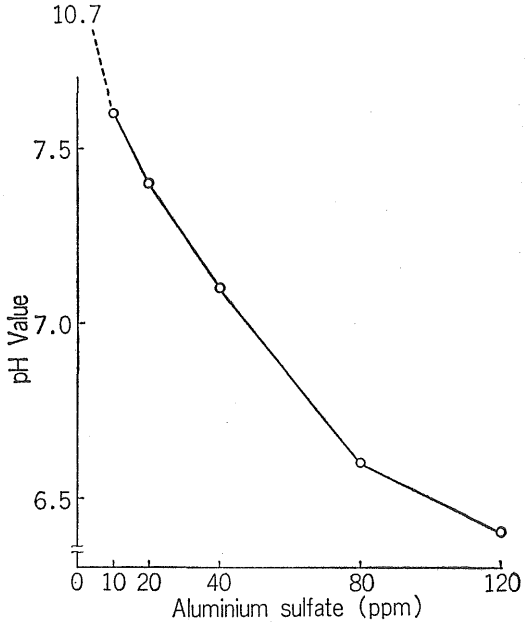


Fig. 4. Variation of pH value by addition of aluminium sulfate

ール類の溶出をみたものもあった．この様な結果を得たのは30日間という比較的長期にわたる実験であったためと考えられるが，塗料の乾燥条件に比較的難しい面もあるので，今後とも充分に検討を加えていきたい．

むすび

現存する防火用貯水槽水を災害時の飲料水とすることはかなり難しい問題を含んでいる．第一に貯水槽は構造的にもあるいは使用時においても衛生的配慮が全くなされていない．第二に現在の槽内の水はかなり汚染されており，災害時といえども飲料水とするには不向きなものが多い．市販の災害時用沪過機をそれぞれの貯水槽に常備し，災害時に沪過後，消毒すれば，飲料水とすることもある程度可能と考えられるが，あまりよい方法とは思えない．今後，防火用貯水槽水を災害時用飲料水として真剣に考えるならば，少なくとも，(1)貯水槽は雨水や汚水の流入しない構造とし，かつ密閉式とすること．(2)現在の槽内の水を排出し，槽内を充分に清掃したのち，新しい水と交換すること．(3)定期的に水質試験を行ない，塩素消毒をするなど，衛生的な管理を行なうことなどを実施し，非常時には少なくとも消毒薬の投入のみにより飲料水とできるようにしておくことが必要であろう．また，新しく貯水槽を設置する場合には耐震構造とすること，コンクリートからアルカリの溶出がないように工夫することなども必要と考える．

謝辞 防火用貯水槽水およびその他の資料を提供して下さいました東京消防庁の方々，ならびに塗料の提供を心よく引受けて下さいましたメーカー三社の方々に深謝いたします．

(本研究の一部は第33回日本公衆衛生学会総会昭和49年10月および第54回東京都衛生局学会昭和49年11月に発表した.)

文献

1) 細田：水道ニュース（東京都水道局），79，1，1972
2) 東京都総務局災害対策部：多摩川下流域地震，1975
3) 毎日新聞：昭和49年8月21日付（夕刊）
4) 水道協会：飲料水の判定標準とその試験方法（1955年版），1951，東京
5) 猿橋勝子：日化誌，76(11)，100，1955
6) 近藤安治他：衛生化学，9，22，1963
7) 安部喜也，半谷高久訳：一般水質化学（下），457，1974，共立出版，東京
8) 都立衛生研究所水質研究科：池水・プール水の沪過実験（未発表）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 319—322, 1975

逆相液—液分配クロマトグラフ法による有機塩素系化合物の分析法

小輪瀬 勉* 土屋悦輝* 山崎堅吉* 三村秀一*

Analysis of Chlorinated Biphenyls (PCBs) and Chlorinated Pesticides in Water by Reversed Liquid-Liquid Partition Chromatography

TSUTOMU KOWASE*, YOSHITERU TSUCHIYA*, KENKICHI YAMAZAKI* and SHUICHI MIMURA*

Recently many methods have been taken for the determination of such environmental hazards as PCBs and chlorinated pesticides in water. The most often used methods have been based on the continuous extraction with organic solvents and adsorption into a filter containing activated carbon. We, however, tried a reversed liquid-liquid partition chromatography method for the extraction and recovery of PCBs and chlorinated pesticides in water.

In this method water was passed through a filter containing a mixture of n-undecane and diethylene glycol succinate on chromosorb W AW HMDS. The adsorbed PCBs and chlorinated pesticides were efficiently desorbed by eluting with n-hexane. The recoveries of added PCBs and chlorinated pesticides at a water flow rate of 65m*l*/min were as follows ;

		chlorinated pesticide			
PCB KC-300	92.7%	p-p′ DDD	90.0%	α-BHC	90.4%
KC-400	96.7%	p-p′ DDE	91.6%	β-BHC	80.7%
KC-500	95.5%	p-p′ DDT	97.5%	γ-BHC	82.2%
KC-600	93.6%	Heptachlor	77.1%	Heptachlor Epoxide	75.9%

まえがき

現在，水中の有機塩素系化合物の分析法には，その含有量が極めて微量な為，多量の試料を用い，有機溶剤で振盪抽出[1,2]するか，あるいは，活性炭，[3,4] 樹脂等[5] に多量の試料を吸着させた後，溶剤で脱離させる方法等が用いられている．しかしこれらの方法は，抽出による回収率の低下，及び溶剤を多量に用いることに基づく不純物の混入による妨害ピークの出現等の問題がある．

今回我々は，固定相に液相をコーティングしたカラム剤を用い，水中の有機塩素系化合物をカラム剤に吸着させ，再び少量の溶剤で脱離させる逆相液—液分配クロマトグラフ法（Ahling 及び Jensen らの報告[6]）を追試し改良を加え良好な結果を得たので報告する．

実験の部

1. 試薬

n-ヘキサン（PCB 分析用），無水硫酸ナトリウム（PCB 分析用），クロモソルブ W（AW HMDS），n-ウンデカン（濃硫酸で硫酸層が着色しなくなるまで振盪した後，アルミナ(250° 12時間活性化）を通過させ，減圧蒸留して精製する）ジエチレングリコールサクシネート，ジエチレングリコールステアレート，ポリエチレングリコールサクシネート，プロピレングリコールサクシネート，ブタンジオールサクシネートポリエステル，メトオキシポリエチレングリコール750，カーボワックス4000モノステアレート．

2. カラム剤作成

n-ウンデカン 30g，液相 10g を適当な溶剤で溶かした後，クロモソルブ W 100g を加え，充分振盪した後，ロータリーエバポレーターで溶剤を除去し，カラム剤をフラスコ内より取り出して風乾する．このような方法で上記の7種類の液相についてカラム剤を作成する．尚，作成したカラム剤は，冷蔵庫内に保存する．

3. 液相の選択

標準試料として，KC-500，p-p′ DDT 各々 1ppb 溶液を用いて，図—1のような装置（内径 1.8cm の G—1ガラスフィルター付ガラスカラム）で，上記の方法で

* 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

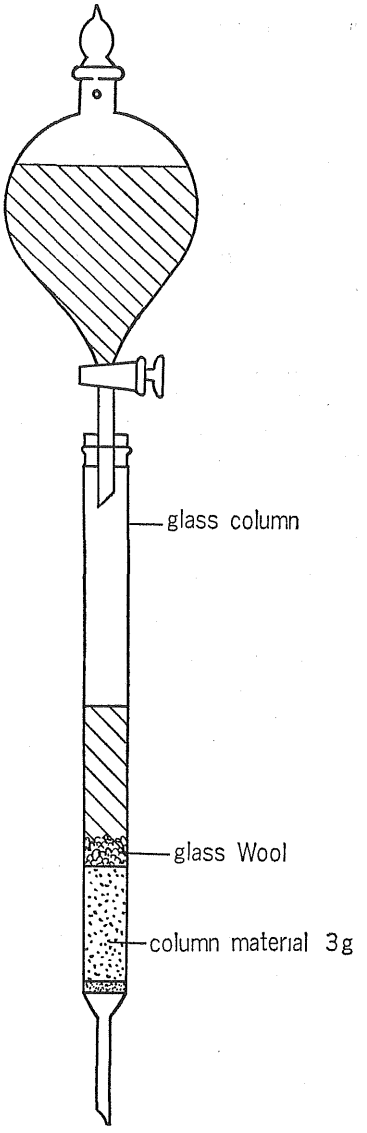


Fig. 1 Apparatus for Reversed Liquid-Liquid Partition Chromatograph

作成した各々のカラム剤について回収実験を行なった．

実験方法は，カラム剤3gをそのままカラムに充填し，その上部にガラスウールを少量つめ，これに上記の標準試料を自然滴下の状態で1分間に65～70m*l* 位の割合で通過させる．通過後アスピレーターで2～3分間吸引し，水分を除去した後，n-ヘキサン 50m*l* で抽出する．さらに 25m*l* で抽出し，全ての抽出液は合わせて，脱水，濃縮後クリンアップをしてガスクロマトグラフに注入する．

各々の液相を用いたカラム剤の回収実験の結果を表1に示した．（数値は2回の平均）これらの液相のうちジエチレングリコールサクシネートを用いたカラム剤が最も良い回収率を示す事が判明した．

尚，KC-500 の標準物質を用い，逆相液—液分配クロマトグラフ法により回収実験を行なったガスクロマトグラムのパターンを図—2に示した．

4. 有機塩素系化合物の回収実験

液相として，ジエチレングリコールサクシネートを用いたカラム剤について，PCB については，KC-300, 400, 500, 600の各1ppb 溶液，農薬は，p-p′ DDD, DDE, DDT, ヘプタクロール及びヘプタクロールエポキシドの各 0.1ppb 溶液，さらに α,β,γ-BHC 各 0.01 ppb 溶液について検討した結果を表2に示した．（数値は3回の平均，KC-500 は10回の平均）

5. 下水中の PCB

2ケ所の下水処理場の流入水，放流水について抽出法及び，逆相液—液分配クロマトグラフ法により測定した結果について表3に示す．尚，流入水については，浮遊物をガラスウールでロ過した試料について分析を行なった．

6. 河川水の PCB 及び農薬

河川水については，PCB，農薬共に検出されなかったので，標準物質を添加して回収実験を試みた結果を表4に示した．

Table 1 Recovery of PCB, p-p′ DDT

LIQUID PHASE	KC-500 Recovery (%)	p-p′ DDT Recovery (%)
DIETHYLENE GLYCOL STEARATE	76.3	82.3
POLYETHLENE GLYCOL SUCCINATE	72.8	52.9
PROPYLENE GLYCOL SUCCINATE	78.6	80.8
DIETHYLENE GLYCOL SUCCINATE	96.2	97.7
BUTANDIOL SUCCINATE POLYESTER	56.8	47.8
METHOXY POLYETHYLENE GLYCOL 750	76.7	66.2
CARBOWAX 4000 MONOSTEARATE	77.3	78.7

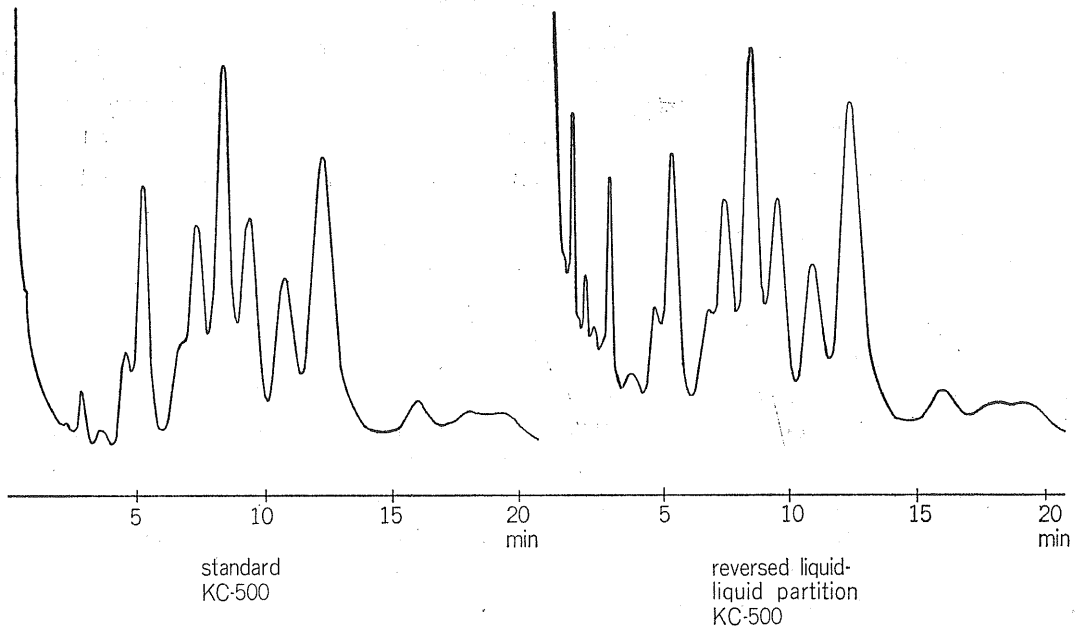


Fig. 2 Gas Chromatograms of PCB

Table 2 Recovery of Organic Chlorinated Compounds

ORGANIC CHLORINATED COMPOUNDS	Recovery (%)	ORGANIC CHLORINATED COMPOUNDS	Recovery (%)
KC-300	92.7	p-p′ DDT	97.5
KC-400	96.7	α-BHC	90.4
KC-500	95.5	β-BHC	80.7
KC-600	93.6	γ-BHC	82.2
p-p′ DDD	90.0	Heptachlor	77.1
p-p′ DDE	91.6	Heptachlor Epoxide	75.9

Table 3 Concentration of PCB in Influent and Effluent of Sewage Plant

PLACE	METHOD	PCB
S-Sewage Plant influent	reversed liquid-liquid partition	2.0 ppb
	extraction	1.6 ppb
S-Sewage Plant effluent	reversed liquid-liquid partition	0.15ppb
	extraction	0.17ppb
O-Sewage Plant influent	reversed liquid-liquid partition	0.10ppb
	extraction	0.18ppb

7. ガスクロマトグラフ条件

①検出器：ECD^{63}Ni，カラム：1.95%QF-1+1.5% OV-17，1.2m，カラム温度：190° 検出器温度：190°

②検出器：ECD^{3}H，カラム：2% OV-210，1.2m，カラム温度：145°，検出器温度 145°

Table 4 Concentration of PCB, Chlorinated Pesticides

PLACE	METHOD	PCB 2ppb	α-BHC 0.01 ppb	β-BHC 0.01 ppb	γ-BHC 0.01 ppb	DDD 0.1 ppb	DDE 0.1 ppb	DDT 0.1 ppb	HEPC, 0.1ppb
E-River Water	reversed liquid-liquid partition	92.5%	85.7%	71.7%	80.7%	84.5%	98.2%	98.7%	66.7%
	extraction	95.5%	70.4%	70.9%	74.3%	70.0%	90.0%	94.5%	76.6%
O-Sewage Plant effluent	reversed liquid-liquid partition	92.2%							
	extraction	100.5%							

結果及び考察

1．液相の選択実験の結果，ジエチレングリコールサクシネートを用いたものが，KC-500 97.2%，p-p′ DDT 97.7%と最高の回収率を示した．他の液相については，KC-500 56.8～77.3%，p-p′ DDT は 47.8～82.3 %の回収率しか得られなかった．

2．液相ジエチレングリコールサクシネートを用いて，PCB，DDT 系農薬及び α—BHC について回収実験をした結果 90 %以上の回収率が得られたが，β，γ—BHCは，80.7～82.2%，ヘプタクロールとヘプタクロールエポキシドについては，75.9～77.1%の回収率しか得られなかった．尚，KC-500 における回収実験値の変動係数は2.3%であった．

3．下水中の PCB について，抽出法と逆相液—液分配クロマトグラフ法を比較した結果流入水の値は若干の差が見られたが，放流水についてはほぼ同程度の数値を示した．

4．河川水の添加回収実験では，PCB，DDE，DDT については，回収率90%と満足な結果が得られたが，ヘプタクロールについては，66.7%と回収率が悪かった．

5．尚，Ahling 及び Jensen らの用いたカーボワックス4000モノステアレートを使用してカラム剤を作成しPCBの回収実験を行なった結果では，77.3%の回収率であった．

おわりに

逆相液—液分配クロマトグラフ法については，他の分析方法に比べ使用溶剤の量が少量で済むと共に，操作も簡便で，多量の試料を短時間に処理するのに適している．しかし，浮遊物の多い試料については，今後の研究課題と考えられるので，継続して実験を行なう計画である．

（本研究の概要は日本薬学会第95回西宮大会1975年４月で発表した）

文　献

1) Musty, P. R. and Nickless, G. : *J of Chromatography*, 100, 83, 1974
2) Grob, K. : *J of Chromatography*, 255, 84, 1973
3) Buelow, R. W., Carswell, J. K. and Symons, J. M. : *JWWA*, 65, 57, 1973
4) Buelow, R. W., Carswell, J. K. and Symons, J. M. : *JWWA*, 65, 57, 1973
5) Kennedy, D. C. : *Environmental Science & Technology*, 7, 138, 1973
6) Ahling, B. and Jensen, S. : *Analytical Chemistry*, 42, 1483, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 323—328, 1975

東京都内の工場周辺井戸水の重金属汚染調査

高橋保雄* 大橋則雄* 小輪瀬勉*
山崎堅吉* 三村秀一*

Heavy Metal Pollution of Well Water in Tokyo Metropolitan Area

YASUO TAKAHASHI*, NORIO OHASHI*, TSUTOMU KOWASE*,
KENKICHI YAMAZAKI* and SHUICHI MIMURA*

Researches on the pollution of well water around factories due to several harmful heavy metals such as copper, zinc, nickel, chromium, lead, cadmium and total cyanide ion have been made for the purpose of protecting the health of the citizens of Tokyo since 1975. Now we tried to make a convenient pollution map for showing the distribution range of pollution in the districts of 37 health centers. The most polluted areas were those of three health centers, namely, Shimura, Akabane and Tamagawa. In most cases the pollution is regarded to be due to pollutants discharged by metal plating factories.

はじめに

東京都を公害から衛るために計画された防衛10ヵ年計画の一環として，昭和46年度から現在まで，井戸水の重金属汚染の調査を実施している．深刻化しつつある環境汚染のさなかに，未だに水道がなく飲料に供するために使われている井戸が，都内には約20万本ほどあると推定される．本調査の目的は，これらの井戸水が有害な物質を含む工場排水によって，どの程度汚染されているか，その実態を調査し，その汚染地域には優先的に上水道，下水道の完備を計ると共に，また，たれ流しの工場を早く発見して厳しく取締る等，環境汚染を防ぐための適切な公害行政を推進するためである．今回，筆者らは今までの調査結果にもとづいて，総合評価法により各地域別の汚染図の作成を試みた．

調査及び実験法

都内の工場（主としてメッキ）周辺約100m（100m以内に井戸がなかったり，顕著な汚染が見られる地域は約300m以内とする.）の井戸を対象に昭和46年4月から50年3月まで4ヵ年，シアン，六価クロム，銅，亜鉛，ニッケル，鉛，カドミウムの項目について上水試験法にもとづいて検査した．

シアン：ピリジン-ピラゾロン法

ただし，昭和47年中頃までフェノールフタリン法で定性試験を行い，検出した検体のみをピリジン-ピラゾロン法で定量試験を行なった．

六価クロム：ジフェニルカルバジッド法

銅，亜鉛：原子吸光法（検体を塩酸でpH 2にして直接測定）

ただし，銅は昭和47年3月までジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムの比色法，昭和48年6月までジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムで錯体にし，メチルイソブチルケトンで抽出し，原子吸光で測定

ニッケル，鉛，カドミウム：原子吸光法

資料の解析法

従来から一般に重金属の汚染調査では，各項目別平均値濃度にもとづいて比較や判定がなされる場合が多い．しかし，この手法を用いた場合，一項目についての汚染度の比較は出来るが，各項目の相互関連性について充分総合評価出来ない．というのは，重金属汚染の総合評価を考える場合一汚染因子だけでなく，汚染因子全部を考慮する必要があるからである．そこで，筆者らは次のような総合評価の判定法を案した．まず最初に，検査結果を保健所別かつ項目別にまとめ表1を作成した．次に，各項目を水道法第四条の水質基準を用いて表2のような五段階の濃度ランクに分け，各濃度ランクと汚染度合との間に係数を定めた.[1] 更に，各項目別に総井戸数に対しての各濃度ランクにおける陽性率（x_1～x_4）を求めた．そして，工場周辺の井戸水がどの程度の重金属汚染であ

* 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 東京都内の工場周辺

保健所 ＼ 項目	シアン (ppm)						六価クロム (ppm)						銅 (ppm)					
	件数	マイナス	～0.005	～0.01	～0.03	以上	件数	マイナス	～0.025	～0.05	～0.10	以上	件数	マイナス	～0.5	～1.0	～2.0	以上
城東	15	8	6	1			12	12										
小岩	20	20					17	17					7	7				
葛飾	8	8					8	8										
北葛飾	5	5					5	5										
足立	63	53	8		2		56	56					52	52				
千住	46	46					47	47					29	29				
滝野川	29	29					22	22					15	15				
王子	39	39					30	29			1		7	6	1			
赤羽	26	16	8	1		1	19	17	1			1	4	4				
板橋東	85	77	5	2		1	75	72	1	1		1	22	19	3			
志村	410	324	41	6	8	31	305	258	22	5	1	19	60	58	1			1
板橋西	62	60	1	1			45	40	3			2	40	39	1			
練馬	52	49	3				23	23					5	5				
石神井	28	27	1				10	9	1				28	28				
豊島長崎	1	1					1	1					1	1				
中野北	23	21	2				17	17					23	20	3			
中野	35	28	7				35	29	3	1	1	1						
杉並東	26	26					14	13	1				22	21	1			
杉並西	33	33					30	30					30	30				
高井戸	48	43	2		1	2	33	33					7	7				
梅ヶ丘	29	25	4				28	28					15	15				
世田谷	73	73					66	62	2			2	38	36	2			
砧	5	5					2	2					2	2				
玉川	45	39		1	1	4	45	42				3	18	18				
目黒	20	16	4				20	20					14	10	4			
碑文谷	53	44	5		1	3	47	46	1				39	39				
雪谷	29	26	1	1	1		23	23					4	3	1			
大森	2	2																
蒲田	49	46	1	2			49	49					47	47				
糀谷	10	10					10	10					2	2				
荏原	127	119	6		2		105	104	1				39	39				
品川	68	67	1				65	61	2	2			59	59				
青梅	21	21					19	19					5	5				
五日市	1	1					1	1										
東村山	12	12					12	12					12	11	1			
日野	17	16	1				30	27	3									
八王子	56	55	1				44	41	2	1			18	18				
府中	22	22					22	21	1									
町田	18	18					15	14		1			15	15				
三鷹	5	5					3	3					2	2				
田無	33	33					16	16					26	24	2			
小金井	4	4					3	3					3	3				
小平	41	41					34	34					18	18				
武蔵調布	106	87	15	4			100	96	4				82	82				
立川	55	52	3				39	38	1				16	16				

井戸水の検査結果

亜鉛 (ppm)						ニッケル (ppm)						鉛 (ppm)						カドミウム (ppm)					
件数	マイナス	～0.5	～1.0	～2.0	以上	件数	マイナス	～0.05	～0.10	～0.30	以上	件数	マイナス	～0.05	～0.10	～0.30	以上	件数	マイナス	～0.005	～0.01	～0.03	以上
2	2											4	4					8	8				
16	16					5	5					1	1					1	1				
						3	3																
32	22	9	1			45	44	1				32	31	1									
27	21	4	1	1		25	21	4				21	21					26	25		1		
8	8					14	12	1			1												
5	4	1										4	4					4	4				
19	11	8																1	1				
17	15	2				35	31	4				1	1					1	1				
27	26	1				27	24	1			2												
36	21	15				36	32	2	2									1	1				
6	6					12	12					19	19					25	25				
						10	10																
8	5	2	1			23	20	3															
19	17	2				22	19	3															
						30	30																
23	16	7																2	2				
15	15					21	20	1															
40	37	1		2		42	35	7															
						2	2					2	2										
						27	20	7															
18	13	5				12	8	3	1														
46	43	2			1	28	26	1		1													
26	24	2				7	5	2															
29	28				1	22	13	9															
2	2					2	1	1				1	1					1	1				
45	39	4	2			57	48	7	2														
57	51	4	1	1		68	63	1	3		1							6	6				
						3	3					22	22					21	20	1			
						12	12																
30	22	8																					
												3	3					3	3				
5	4			1		11	10	1															
						3	3					2	2										
20	12	8				9	8	1				1	1					5	5				
2	2					3	3					3	3										
17	16	1				18	17	1															
78	67	6	4	1		42	33	9				10	10					48	47	1			
25	24	1				13	8	5				16	16					4	4				

表 2 汚染度合と係数

区　分	係数	シアン	六価クロム	銅，亜鉛	ニッケル，鉛	カドミウム
検出されず	0	検出せず	検出せず	0.1ppm未満	0.01ppm未満	0.001ppm未満
～水質基準値×1/2以下	1	0.005ppm以下	0.025ppm以下	0.5ppm以下	0.05ppm以下	0.005ppm以下
～水質基準値×1 以下	2	0.01 ppm以下	0.05 ppm以下	1.0ppm以下	0.10ppm以下	0.010ppm以下
～水質基準値×2 以下	4	0.02 ppm以下	0.10 ppm以下	2.0ppm以下	0.20ppm以下	0.020ppm以下
～以上	8	0.02ppmより大	0.10ppmより大	2.0ppmより大	0.20ppmより大	0.020ppmより大

るかは，項目別の各濃度ランク（係数）×陽性率の総和（$x_1+2x_2+4x_3+8x_4$）を求め，この項目別評価数値を加算した値で表示し，比較評価した．同時に総合評価点に与える各汚染因子の寄与率も，項目別評価数値から推定できる．即ち，表1，表2の数値を利用して，表3を作成した．ただし，一保健所管内の井戸数が10未満の時，データの信頼性が低いと思われるので抹消した．また，汚染源と見なされる工場で使用していない金属は，すべてその工場周辺の井戸水から検出しないと言う前提条件で処理した．この総合評価数値の算出の一例を示すと次の通りである．

計算例　志村保健所（表1の数値利用）

シアン　$\left(1\times\frac{41}{410}+2\times\frac{6}{410}+4\times\frac{8}{410}+8\times\frac{31}{410}\right)\times100\fallingdotseq84$

六価クロム　$\left(1\times\frac{22}{410}+2\times\frac{5}{410}+4\times\frac{1}{410}+8\times\frac{19}{410}\right)\times100\fallingdotseq47$

銅　$\left(1\times\frac{1}{410}+8\times\frac{1}{410}\right)\times100\fallingdotseq2$

亜鉛　$\left(1\times\frac{1}{410}\right)\times100\fallingdotseq0$

ニッケル　$\left(1\times\frac{1}{410}+8\times\frac{2}{410}\right)\times100\fallingdotseq8$

鉛，カドミウムともに0

84+47+2+8=141 が志村保健所管内の重金属汚染の程度を示す総合評価数値である．

次に，総合評価数値をヨコ軸，累積度数分%をタテ軸にして，対数確率紙にプロットすると図1のような直線が認められた．このことから，各保健所の総合評価数値の分布は対数正規型とみなしてさしつかえない．そこで総合評価数値10未満（1点），20未満（2点），35未満（3点），69未満（4点），69以上（5点）の五段階に分類し，評価ランクを定めた．この総合評価数値10，20，35，69は累積度数分布の20，40，60，80%値である．以上のような手法で全地域の評価ランクを図2に作成した．

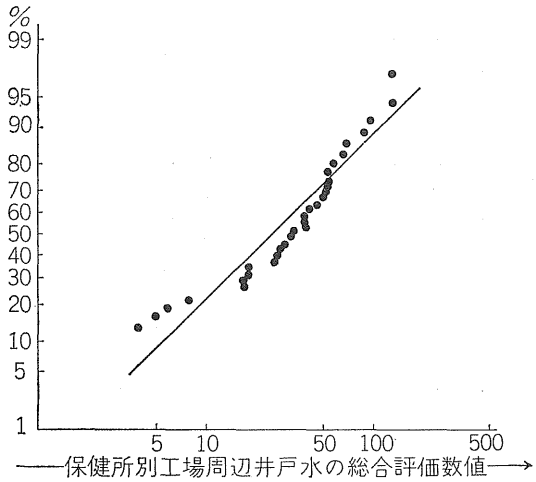


図 1　保健所別工場周辺井戸水の総合評価数値の累積度数分布

評価ランク1点の保健所管内の井戸水は，重金属汚染を受けていない地域と言える．評価ランク2点は少し汚染を受け，評価ランク3，4，5点は汚染がかなり明白に認められる地区である．

結果及び考察

1)　各項目別に汚染地区を見ると，シアン汚染が明白に認められる井戸がある地区には志村，玉川，赤羽，碑文谷，城東，高井戸，足立，雪谷，板橋東，荏原保健所管内がある．また，六価クロムは玉川，中野，志村，赤羽，世田谷，板橋西，板橋東，王子保健所管内．銅は志村保健所管内．亜鉛は町田，千住，碑文谷，世田谷，蒲田，品川，武蔵調布保健所管内．ニッケルは滝野川，志村，碑文谷，品川保健所管内である．鉛，カドミウムには全地域ともに汚染が認められなかった．

2)　明白に汚染の認められる井戸のある保健所管内は，評価ランクの点数も一般に高い．評価ランク5点の中でも，志村，赤羽，玉川，碑文谷保健所は特に顕著な汚染を示している．三多摩地区では武蔵調布，町田保健所の評価ランクが高い傾向を示している．また，明白に

表 3　保健所別工場周辺井戸水の総合評価数値（及び評価ランク）一覧表

保健所	区（市）	各種汚染因子の評価数値							総合評価数値	評価ランク
		シアン	六価クロム	銅	亜鉛	ニッケル	鉛	カドミウム		
城東	江東	54	0	0	0	0	0	0	54	4
小岩	江戸川	0	0	0	0	0	0	0	0	1
足立	足立	25	0	0	18	2	2	0	47	4
千住	〃	0	0	0	21	9	0	4	34	3
滝野川	北	0	0	0	0	27	0	0	27	3
王子	〃	0	12	3	3	0	0	0	18	2
赤羽	〃	70	36	0	30	0	0	0	136	5
板橋東	板橋	18	11	4	2	5	0	0	40	4
志村	〃	84	47	2	0	8	0	0	141	5
板橋西	〃	4	29	1	24	9	0	0	67	4
練馬	練馬	6	0	0	0	0	0	0	6	1
石神井	〃	4	4	0	0	0	0	0	8	1
中野北	中野	9	0	13	17	13	0	0	52	4
中野	〃	20	50	0	0	0	0	0	70	5
杉並東	杉並	0	4	4	8	12	0	0	28	3
杉並西	〃	0	0	0	0	0	0	0	0	1
高井戸	〃	44	0	0	15	0	0	0	59	4
梅ケ丘	世田谷	14	0	0	0	3	0	0	17	2
世田谷	〃	0	27	3	13	10	0	0	53	4
玉川	〃	84	56	0	0	2	0	0	142	5
目黒	目黒	20	0	20	25	25	0	0	90	5
碑文谷	〃	65	2	0	20	10	0	0	97	5
雪谷	大田	22	0	3	7	7	0	0	39	4
蒲田	〃	16	0	0	16	18	0	0	50	4
糀谷	〃	0	0	0	0	10	0	0	10	2
荏原	品川	12	1	0	7	10	0	0	30	3
品川	〃	1	9	0	12	17	0	0	39	4
立川	立川	5	2	0	2	9	0	0	18	2
武蔵調布	武蔵調布	22	4	0	18	9	0	1	54	4
小平	小平	0	0	0	2	2	0	0	4	1
田無	田無	0	0	6	24	3	0	0	33	3
町田	町田	0	12	0	24	6	0	0	42	4
府中	府中	0	5	0	0	0	0	0	5	1
八王子	八王子	2	8	0	16	0	0	0	26	3
日野	日野	6	11	0	0	0	0	0	17	2
東村山	東村山	0	0	0	0	0	0	0	0	1
青梅	青梅	0	0	0	0	0	0	0	0	1

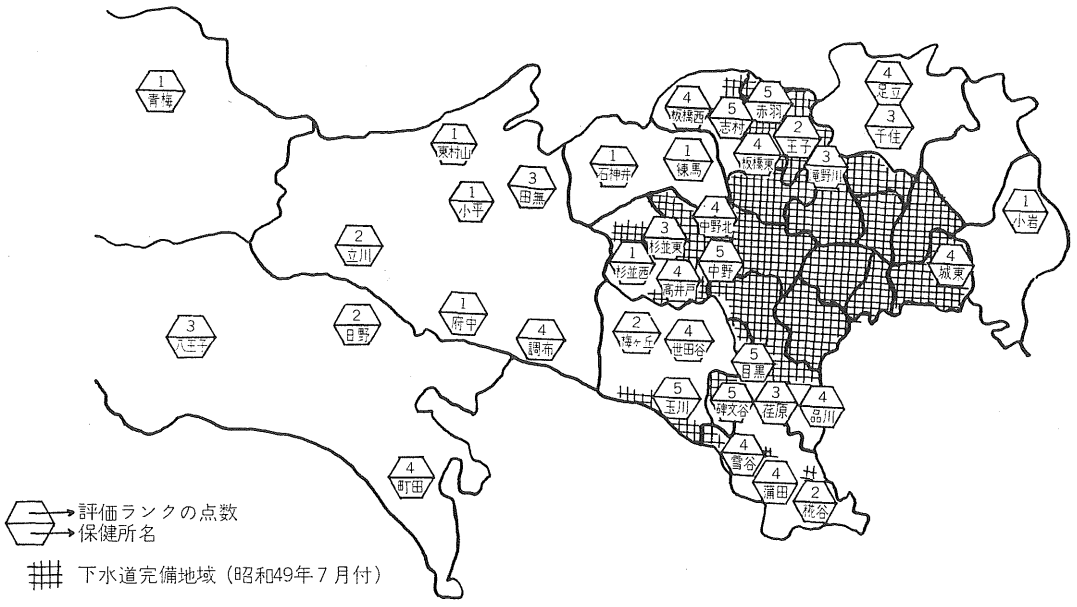


図 2 保健所別工場周辺井戸水の評価ランク

汚染の認められる井戸が少ないが，広範囲に分布しているので評価ランクの点数が高くなった中野北，目黒保健所がある．これらの汚染源の大部分がメッキ工場と推定される．しかし，碑文谷保健所管内の汚染源は写真現像所であった．

3) 中野，中野北保健所管内の下水道は昭和44年以前に完備されているのに，評価ランクの点数は非常に高い．この事実は，下水道が完備される以前の汚染に起因するものか，または，排水によって下水道，あるいは貯留槽が腐蝕し，漏洩したものと考えられる．このことから，46年度以後下水道が完備された高井戸，板橋東，赤羽保健所管内の汚染は，ただちに減少すると考えられない．

4) 東京都内の検査した井戸水の各重金属の検出率を見ると，表4より Pb=Cd<Ni<Cu<Zn の順であることがわかる．この重金属の検出率の順位は，文献に記載されている土壌のイオン交換の分配係数[2]の順位と逆の関係で一致している．ただし，実際の汚染源の排水は色々な金属が種々の割合で含有されているので，単純に断定することは危険であるが，検出率の低い金属ほど，土壌に吸着される余裕があるか，又は，吸着されていると考えられる．以上のことから，地下水の金属による汚染を考える場合，土壌のイオン交換性を考慮する必要がある．

表 4 重金属の検出率

	銅	亜鉛	ニッケル	鉛	カドミウム
検査した件数	826	700	672	142	155
0.1ppm以上の件数	21	111	6	0	0
検出率（%）	2.5	15.9	0.9	0.0	0.0

おわりに

今回の調査で，一度汚染された地区は毎年同一成分が検出されていることが判明した．このことから，浅層地下水の重金属汚染は極めてスポット的で，かつ，長期間継続している特徴が見られるので，今後とも調査を続行する必要がある．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「地下水の重金属汚染に関する調査」として実施したものである．）

文 献

1) Hemeon W. C. L.: *J. Air Poll. Cont. Assoc.*, 18(3), 166, 1968
2) 井上頼輝：公害と対策，19(9)，919，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26-1, 329—332, 1975

パラジクロルベンゼンによる環境汚染

森田昌敏* 西沢恒幸** 三村秀一*
大石真之* 中尾順子* 平賀興吾*

Environmental Pollution by Paradichlorobenzene

MASATOSHI MORITA*, TSUNEYUKI NISHIZAWA**, SHUICHI MIMURA*,
SHINSHI OISHI*, TOSHIKO NAKAO* and KOGO HIRAGA*

Ⅰ 緒　論

パラジクロルベンゼン（以下 PDCB と略す）は家庭内で広範囲に用いられる防虫剤，消臭剤である．生産高は年産約2万t程度であり，その殆んどは気化し，大気中にばらまかれる．生産高の大きさ，用途の開放性にも拘らず，PDCB による環境汚染は研究者の注意をひいてこなかった．PDCB 自身は，生分解が早く，また蓄積性も低いと考えられてきたからである．しかし，1975年に，PDCB の人体組織における残留が最初に報告され，[1] また都市大気[1]あるいは都市水道水中[2]からの検出も行なわれるようになった．このことは PDCB が環境中で予想以上に分解されにくいのではないかということを暗示しており，種々の媒体中に出現する PDCB を調査することにより，汚染像の輪郭を画くことは重要なことのように考えられる．本研究は，このような目的のために，水系，大気系そして生物系における PDCB の残留値を測定したものである．また同時に，人体脂肪組織中での蓄積機構を調べるために，Rat, Carp を用いた蓄積性を検討する実験も行った．

Ⅱ 実験の部

Ⅱ－1 分析法

Ⅱ－1－1 水試料の分析

試水 500m*l* に n-ヘキサン 50m*l* を加えシアン蒸留装置を用いて蒸留．水が 250m*l* 蒸留された段階で火を止め，留液を分液し，n-ヘキサン相を集め，KD 濃縮器を用いて1～10m*l* に濃縮する．濃硫酸 2m*l* と振った後，ヘキサン相をGCに注入する．GC条件はⅡ－1－5に示す．

Ⅱ－1－2 泥試料の分析

泥試料は遠心分離器にかけて脱水し，沈んだ部分を湿重量で3g秤取する．この試料に n-ヘキサン5m*l* を加え水蒸気蒸留にかける．留出液のうち n-ヘキサン相を集め，濃硫酸 2m*l* と激しく振って処理した後，GCに注入する．水蒸気蒸留残の汚泥をガラスフィルターでロ過し，乾燥器で乾燥した後重量を測定し泥試料の乾燥重量を決定した．

Ⅱ－1－3 大気試料の分析

既報の報告[1]に準じて行った．

Ⅱ－1－4 生物試料の分析

既報の報告[1]に準じて行った．

Ⅱ－1－5 ガスクロマトグラフィー（GC）

GC条件は以下の通り．

カラム①：Bentone 34（5％）+DC 200（5％）on Gas chrom Q（100／120），カラム温度：140°C

カラム②：Tenax^{R} GC(60／80)，カラム温度：220°C

キャリヤーガス：N_2 60m*l*／min

検出器：ECD（Ni^{63} 10m Ci），検出器温度：250°C

Ⅱ－2 蓄積性試験

Ⅱ－2－1 Carp による蓄積

プラスチック製風呂桶（80cm×80cm）に深さ 20cm に水を張り，これに PDCB 飽和水（約40ppm at 20°C）を適当量加えて濃度が1ppm になるようにした．PDCB は揮発性が高く，24時間後に，この濃度は 0.5ppm に低下したので1日1回 PDCB 水溶液を加え，その時点で1ppm になるように調節した．この水槽で体長 8～10cm の Carp と水草（オオカナダモ）を3週間飼った．エアレーションは行っていない．

Ⅱ－2－2 Rat による蓄積

Fig. 1 に示すような chamber（100×100×100cm）中で Wistar 系 Rat（雄）を2週間飼育した．1日1

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科・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
**千葉工業大学

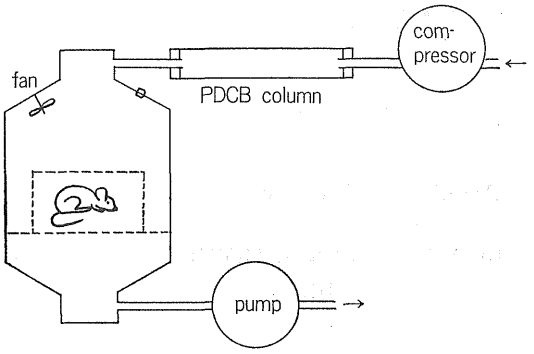


Fig. 1 Exposure system of PDCB gas

回，水と飼料の補給および排出物のそうじのために戸を開けた．PDCBの濃度は適時測定した．一定濃度に保つことは困難であったが，概ね 30～50mg/m³ の範囲にあった．

Ⅱ－2－3 **Rat における PDCB の Clearance**

体重 100g 前後の Wistar 系雄ラットを用い，飼育はゲージ内で水および市販固型飼料を自由に摂取させた．これに PDCB を溶かした（2mg/ml, 20mg/ml）オリーブ油を腹腔内に 0.5ml 注射し，それぞれ4匹づつ分析し，代謝速度を観測した．また 100ppm 注射した．2時間目のラットを臓器別に分析し，臓器への移行を観察した．

Ⅱ－2－4 **分析**

分析は体重測定後，ハサミで適当な大きさに切断し，n-ヘキサン 250ml とともに，10分間ホモジナイズした．この n-ヘキサン脂肪抽出液 50ml を遠沈管にとり，遠沈分離した後上澄液を 25ml，水 500ml とともに蒸留し，300ml の分液ロートに 250ml 留出させた．n-ヘキサン層を濃硫酸 25ml とともに2回激しく振り，GC試料とした．臓器別分析はⅡ－1－4生物試料の分析法に従って行った．

Ⅲ 結 果

Ⅲ－1 環境試料の分析結果

Ⅲ－1－1 水試料の分析結果

Table 1 に下水中の PDCB の分析結果を示す．PDCB は便所で使用されており，従って下水中に検出されるのは当然とも言えるが，そのレベルは決して高くはない．活性汚泥中には比較的高く観察され，汚泥中に濃縮されている．水道水中や河川水中での PDCB レベルは下水中よりも更に低く，検出限界（0.2ppb）以下か，あるいはそれをわずかに上まわる程度であった．

Ⅲ－1－2 大気試料の分析結果

Table 1 PDCB in Sewage, Treated water and Activated sludge

		Sewage	Treated water	Activated sludge
1	Ukima	1.5ppb	0.4ppb	3.3μg/g*
2	Odai	nd.	0.5	1.2
3	Mikawashima	0.9	0.5	0.8
4	Sunamachi	2.7	nd.	0.3
5	Shibaura	0.5	3.6	0.7
6	Morigasaki	0.6	1.8	0.9

* dry wt. basis

Table 2 PDCB in Atmosphere

Location		PDCB
Out door		
A	Lake Sagami	1.5μg/m³
B	Ome	2.1
C	Hachioji	2.4
D	Takaido	2.9
E	Okubo	4.2
F	Shinjuku	2.7
In door		
G	Inside wardrobe	1700
H	Inside closet	315
I	Bedroom	105

Table 3 PDCB in Biological Samples

Sample	PDCB(ppm)*
Human fat	2.3
Human blood	0.01
Salmon	0.05
Carp	0.10
Horse Mackerel	0.03
Beef	0.11
Pork	0.11
Chicken	0.42
Egg	0.06

* Values are represented on fat basis.

Table 2 に大気中の PDCB レベルを示す．用途からも予想されるように，PDCB は屋内では高く，屋外では低い．屋外でのレベルは東京近辺では余り差はなかった．

Ⅲ－1－3 生物試料の分析結果

生物試料中の PDCB のレベルを Table 3 に示す．ヒト脂肪中のレベルは最も高く，次いでニワトリに高い．魚の中でのレベルは一般的に低いが，魚の中では鯉が比較的高かった．

Ⅲ－2 蓄積性の実験結果

Ⅲ－2－1 Carp による蓄積

Fig. 2 に Carp による蓄積経過を示す．水中の PDCB 濃度は 0.5ppm⇄1ppm の間に保たれ，平均レベルを 0.75ppm と推定すると，3週間で約 60 倍濃縮したことになる，これは PCB の数10分の1程度の濃縮率といえる．なお水草（オオカナダモ）は生物濃縮を示さなかった．

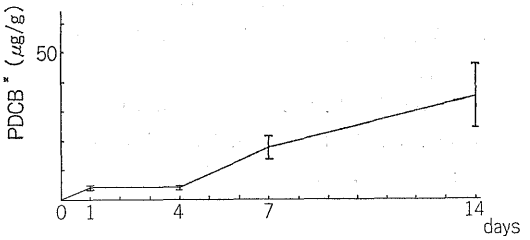


Fig. 2　Accumulation of PDCB in Carp and Water plant　　* whole basis

Ⅲ－2－2　Rat による蓄積

Fig. 3 に Rat による蓄積経過を示す．2週間後に約 35ppm（全体重あたり）に到達した．興味深いことは，鯉と Rat の蓄積曲線の Pattern が類似していることである．

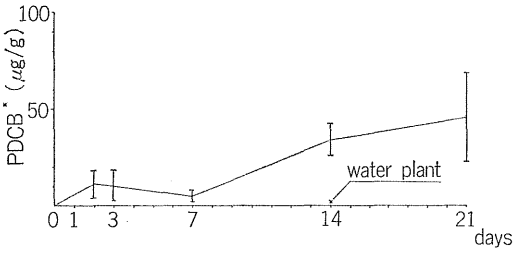


Fig. 3　Accumulation of PDCB by rats　　* on whole basis

Ⅲ－2－3　Clearance

PDCB は24時間以内に殆んど消失した．

Ⅳ　考　　察

PDCB は生分解の早い，蓄積性の低い物質と考えられてきた．例えば，PDCB は下水処理場の活性汚泥で生分解されることは知られている．またマウス，ラット，モルモットウサギに PDCB を1回投与したが，体内蓄積はなかったとの報告[3]もある．しかしながら同時にこれとは一見矛盾するような報告もある．例えば PDCB 混入の雑穀を投与された豚肉は悪臭がつき食うに耐えられなかったとの事件[4]や，ウシに PDCB 蒸気を吸入させて肉にその臭気が移ったとの報告[5]がある．また人体脂肪組織中には PCB と同程度の PDCB の残留が観察されている。[1]

このような一見相反する観察も，分解性と蓄積性を定量的に取り扱うことにより，ある程度説明可能となる．ヒトの体内での PDCB の残留というような場合，PDCB の分解速度が結構早いので，その残留は定常状態になっていると考えられる．

PDCB の吸収量を　　Qmg/day

PDCB のヒト体内半減期を　$T_{1/2}$ (day)

とすると，ヒト体内での残留値　R (mg) は

$R=Q\cdot T_{1/2}$ となる．

R を 10mg（体重 50kg，うち脂肪分10%，PDCB レベルを脂肪あたり 2 ppm と仮定），Q=1mg（100μg/m³ の PDCB を含有する空気を 10m³/day 吸入すると仮定）と仮定すると $T_{1/2}=10$ days となる．この推定には，大ざっぱな仮定がはいりすぎているので正確なものではないが，ヒトにおいて PDCB は PCB やメチル水銀の1/10程度の蓄積性をもつものと考えられる．

Carp の PDCB 蓄積実験から得られた実験結果から，PDCB の蓄積性は PCB の 1/10 程度と考えられ，これはヒトの場合と一致する．

下水処理場での活性汚泥による濃縮率も，PDCB は 1000 倍程度であり，PCB は 10000 倍程度である．従って PDCB の微生物による濃縮率も PCB の1/10程度ということになる．

結局 PDCB は PCB の1/10程度の蓄積性を持っており，このことは PDCB が PCB の10倍程度早い速度で分解されることを暗示している．

PDCBのヒト体内における残留値の高さは結局において，1日摂取量が大きいために起っている．PCB と比較した場合，PCB は総量で約2万 t が環境中に放出され，魚やヒトに蓄積しているのであるが，PDCBは同じ量が毎年消費され，しかも人間に最も近接した空間で用いられている．PDCB は PCB に較べ代謝をうけやすいのであるが，取り込み量が多いためヒト体内に高く残留しているように観察されるのである．

生体内半減期は以上の推定，また Azouz 等の観察[6]即ち「PDCBをウサギに経口投与した場合，6日目迄に40%が代謝物として尿中に排出されるが，それ以降にも徐々に排出される」からも，結構長く，ヒトにおいて10日位あるかも知れない．このことは PDCB を Rat に1回腹腔内投与した場合 PDCB が急速に体内から消失するという観察とは矛盾しているように思われる．後者の現象に対する可能な説明としては「体内にとりこまれた PDCB は徐々に脂肪組織に移行，蓄積されるが，1回投与をうけた場合は，脂肪組織に浸透する以前に大部分が代謝される．即ち蓄積として観察されるためには，

連続的な長期の吸収が必要である」ということになろう．しかしながら，種差等の問題もあり，現段階では推定の域を出ない．

腹腔内に注入された PDCB は血流を通じて急速に各臓器に分配されていく．臓器間では肝，腎，肺に高く，また脳にも割合高い．PDCBは従って，有機塩素系農薬や PCB と類似の生体内分布を示し，主として脂肪中に含有されて存在していると思われる．

謝辞 Chamber の使用にあたり溝口博士の厚意と助言に感謝いたします．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「環境汚染物質の総点検」として実施し，研究の一部は公衆衛生学会第33回1974年10月で発表した．）

1) Morita, M. and Ohi, G. : *Environ. Pollut.*, 8, 269, 1975
2) Grob, K. and Grob, G. : *J. Chromatogr.*, 62, 1, 1971
3) Bapmabckax, C. T. : *Hayka Tp. Acr. up. 01-i Moc Meg Uncm.* 175, 1967 Abstracted from. *Chemical Abstract* 70, 90586 t , 1969
4) Loeffei, W. J. : *Proc. Am. Soc. Animal Prod.*, 33, 277, 1940
5) Petersen, W. E. : *J. Dairy Sci.*, 25, 381, 1942
6) Azouz, W. E., Parke, D. V. and Williams, R. T. : *Biochem. J.*, 59, 410, 1955

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26 - 1, 333—335, 1975

ヘキサクロルベンゼンによる環境汚染

森田昌敏* 西沢恒幸** 三村秀一*

Environmental Pollution by Hexachlorobenzene

MASATOSHI MORITA*, TSUNEYUKI NISHIZAWA** and SHUICHI MIMURA*

Ⅰ 緒　論

ヘキサクロルベンゼン（以下ＨＣＢと略す）は除草剤ペンタクロルフェノール（ＰＣＰ）の中間原料として生産されてきた．昭和47年以後は生産は中止されている．外国の一部の国では，農薬として，種子消毒剤として使用されているが，我国においては使用されてはいない．外国においてＨＣＢは既に重要な環境汚染物質として認識されつつあるが，[1-7] 我国においては，農薬としての使用がなかったため，研究者の注意を引かず，森田ら[1,2]の報告が最初であった．日本におけるＨＣＢの検出が，昭和47年以前に生産されたＨＣＢの名残を観測しているのか，或は今なお一部で生産と流出が続いていることの結果であるかは明らかではない．ＨＣＢはトルコにおいて多量の中毒者をだした慢性毒を有する物質であり，[8,9] 且つ化学的にも，生物的にも極めて難分解性である．従ってＨＣＢの汚染の現状を早期に把握しておくことが，ＨＣＢの予想される将来の拡大を予防する上でも重要なことのように思われた．本研究は，そのような視点にたって，各種環境メディア中のＨＣＢの分析法を確立し，いくつかの分析例を通じてＨＣＢの汚染像を描写しようと試みたものである．

Ⅱ 実　験

Ⅱ－1 水中ＨＣＢの分析法

前報でパラジクロルベンゼンの分析法を記述したが，全く同様にして Clean-up を行った．ＧＣ条件はⅡ－4に示す．

Ⅱ－2 活性汚泥中のＨＣＢの分析法

汚泥を遠心分離器にかけ，水をデカンテーションにより除く．沈んだ汚泥を湿重量で３ｇ秤り取り，アセトン（50%）＋n-ヘキサン（50%）の混液 50m*l* を加え，ブレンダーでかきまぜ抽出する．遠心分離で泥質を沈め，溶媒層をデカンテーションより集める．沈降した泥質に再度アセトン—n-ヘキサン混液 50m*l* を加えて抽出し，１回目の抽出液と合わせてＫＤ濃縮器を用いて１～10 m*l* に濃縮する．濃縮液に濃硫酸 2 m*l* を加えて激しく振り，上澄液の n-ヘキサン層をＧＣに注入する．必要があれば硫酸層を一旦捨て，新しい濃硫酸 2 m*l* を加えて処理する．

Ⅱ－3 生物試料中のＨＣＢの分析

ＰＣＢ分析法と同様にして，試料よりアセトン含有 n-ヘキサンを用いて脂肪分を抽出する．抽出液を濃縮し，硫酸処理後ＧＣに注入する．

Ⅱ－4 ガスクロマトグラフィー

カラム　Bentone 34（５%）＋ DC 200（５%） on Gas chrom Q (100/120)

カラム温度　200°C

検出器　ECD (Ni^{63} 10mCi)

検出器温度　250°C

キャリヤーガス　N_2　60m*l*/min

Ⅲ 結　果

Ⅲ－1 下水および活性汚泥中のＨＣＢ

都内各下水処理場の下水および活性汚泥中のＨＣＢ含有量を Table 1 に示す．ＨＣＢの汚泥による蓄積が見られ，この物質が難分解性であることを示している．また工場排水を処理している下水処理場でのＨＣＢ含有量は高く，このことはＰＣＢと類似している．

Ⅲ－2 人体脂肪組織中のＨＣＢ

人体脂肪組織中のＨＣＢ含有量は Table 2 に示す通りで，平均 0.2 ppm であった．これはＨＣＢによる汚染は現在の段階では，ＢＨＣやＤＤＥ，ＰＣＢ等の1/10程度にとどまっていることを示す．

Ⅲ－3 食品中のＨＣＢ

* 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
**千葉工業大学

Table 1 Hexachlorobenzene in Sewage and Sludge

Plant	Water	HCB(μg/l)	HCB in Sludge (μg/g)
MI	I*	0.7	34
	E*	0.4	
U	I	3.5	95
	E	3.2	
O	I	1.2	55
	E	0.7	
MO	I	1.6	21
	E	0.4	
SU	I	0.5	15
	E	1.2	
SH	I	0.5	10
	E	0.4	

* I and E mean influent and effluent respectively.

Table 2 Hexachlorobenzene in Human fat

Sample	HCB(ppm)	Sample	HCB(ppm)
1	0.42	11	0.13
2	0.10	12	0.16
3	0.29	13	0.10
4	0.14	14	0.19
5	0.22	15	0.29
6	0.37	16	0.21
7	0.14	17	0.19
8	0.26	Mean	0.22
9	0.38		
10	0.17		

Table 3 HCB in food

Sample	Number	Mean level* (ppb)
Beef	2	12
Pork	2	7
Chicken	1	4
Egg	5	0.1
Horse Mackerel	3	1
Sawy-pike	5	11
Salmon	5	9
Carp	5	8
Milk	5	0.1
Butter	2	4
Soy bean	2	nd.
Wheat	1	0.6
Rice	1	nd.

* Values are represented on fat basis

食品中のＨＣＢ含有量はTable 3に示す通りである．ほとんどすべての動物性食品には検出されたが，そのレベルはＢＨＣなどの塩素農薬に較べて低い．

Ⅳ 考　　察

ＨＣＢの生物半減期はRatで約60日と長く，極めて残留性の高い物質[10]である．このことは汚泥における濃縮率からもうかがわれ，約１万倍の濃縮が観察され，ＰＣＢと同程度である．前報で述べたＰＤＣＢが比較的分解されやすかったのとは好対照をなしている．芳香環に結合した塩素数が増加すると難分解性となりやすいことはＰＣＢにおいてよく知られているが同様なことが塩素化ベンゼン類についても当てはまっている．

ＨＣＢは色々な点でＰＣＢと極めて類似している．長い生物半減期，難分解性，化学構造の類似性の他に，共に多数の中毒患者を発生させている．即ちＰＣＢがカネミ油症をひきおこしたようにＨＣＢはトルコで数千名の中毒患者―ポリフィリン尿症と光過敏症を主徴とする―をだしている．従ってＨＣＢの環境中の挙動をＰＣＢと比較しながら考察することは意味がある．

ＨＣＢはもともとは除草剤ＰＣＰの中間原料として生産され使用されてきた．昭和47年にその生産は中止され，その中止時期はＰＣＢとほぼ一致する．ＨＣＢの用途は，この他に約５％がゴムの添加剤として用いられたというが，ほとんどは中間原料としてであり，従って環境への流出量は極めて少なく，ＰＣＰの生産高から推定して1000ｔ程度と思われる．ＰＣＢの環境への総放出量は約２万ｔ弱であり，従ってＨＣＢのそれはＰＣＢの1/20程度と考えられる．

下水処理場における流入下水中のＰＣＢレベルは昭和47年の生産中止以来急速に減少している．ＨＣＢについては過去のデータがないため比較することは出来ない．昭和49年のＰＣＢレベルとＨＣＢレベルを流入下水で比較するとほぼ同程度である．ＨＣＢはＰＣＢの1/20程度が環境中に放出され，生産中止時期はほぼ同じである．このＨＣＢがＰＣＢと現在の流入下水で同じレベルであることは興味深い．この原因として，難分解性の程度の違い，用途あるいは汚染パターンの違い，あるいはＨＣＢが，ＰＣＢとは異なり，今なお環境流出している可能性等が考えられる．

ＨＣＢは農薬ＰＣＮＢの不純物として通常含有されている．またドライクリーニング用洗浄剤テトラクロルエチレンの製造過程で副生することも知られている．このような意図せぬ副生によりＨＣＢが生産され，環境へ放出されている可能性は高く，このことは今後の研究課題といえる．

本報告では未だＨＣＢの汚染像を明らかにしたとは言

えない．現在の実験データから言えることは，ＨＣＢによる環境汚染の規模はＰＣＢの1/10程度であり，その質はＰＣＢと類似したものと言える．

ＨＣＢがいくつかの生物（魚，獣，鶏など）の中で，最も人間においてそのレベルが高いことは興味深い．このことが食物連鎖の結果として起っているのか，或は人間の近くでＨＣＢが使用された為であったかは現在の段階でははっきりしない．しかしＨＣＢの難分解性，蓄積性を考慮するとき，この物質のモニターを今後も続ける必要があると思われる．

謝辞 本研究所野牛環境保健部長，大井副参事，春田生活科学部長に，適切な御助言をいただいたことを感謝いたします．

（本研究は昭和49年度研究課題「井戸水および河川水中の有機物に関する研究」の一環として実施したものである．研究成果の一部は日本化学会第30会春季大会1975年４月に発表した．）

文　献

1) Morita, M., Mimura, S., Ohi, G. and Yagyu, H. : *Environ. Pollut.*, (in press)
2) 森田昌敏，牛尾房雄，西沢恒幸，深野駿一，道口正雄，三村秀一：食衛誌，16，53，1974
3) Johnson, J. L., Stalling, D. L. and Hogan, J. W. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 11, 393, 1974
4) Acker, L. and Schulte E.: *Naturwissenschaften*, 57, 497, 1970
5) Holden, A. V. : *Pesticides Monit. J.* 4, 117, 1970
6) Tuinstra, L, G. M. Th. Jr. and Roos, J. B. : *Ned. Melk-Zuiveltijdschr.*, 24, 65, 1970
7) Zitko, V. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 6, 464, 1971
8) Cam, C. : *Dirim (Istanbul)*, 34, 11, 1959
9) Cam, C. and Nigogosyan, G. : *JAMA.*, 183, 88, 1963
10) Morita, M. and Oishi, S. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, (in press)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26 - 1, 336—342, 1975

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第1報）
皇居外苑濠群の富栄養化の現状

山崎洋子* 松本浩一*

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (I)
Eutrophication of a Group of Moats Around the Imperial Palace

YOKO YAMAZAKI* and KOICHI MATSUMOTO*

1. A group of moats around the Imperial Palace is situated in the representative center of the City of Tokyo and comprises twelve moats linked by shallow and narrow drains. The waters occupy about four hundred thousand square meters in total area, store twelve thousand tons of water in total volume, and are 0.5 to 2.5 meters deep. The water is being supplied by spring water of about one thousand ton per day in addition to precipitation and flows down from the head in the Chidorigafuchi moat to both sides of ring and overflows from the Hibiya moat.

2. The present water bodies are free from the pollution of human origins and have been kept natural for a long period. However, the progress of eutrophication of the waters in these thirty years is marked. The waters are not only one of the most valuable elements of the representative scenery of Tokyo City but also serve as a recreation area for walking and partly for boating (Chidorigafuchi). Further, the waters are expected as a source of drinking water in the case of emergency. Therefore, the conservation of the water in these moats has been taken up as an essential problem from the point of urban environment. The authors have been surveying the waters limnologically since 1969. The present paper deals a part of their works done during the seasons from 1974 and 1975.

3. The dominant phytoplankton in these moats are *Synedra* sp. and *Melosira italica* in February, *Scenedesmus* in May, *Microcystis* in August, and in November *Golenkinia radiata*, *Micractinium pusillum*, *Scenedesmus* sp., *Synedra* sp. and *Melosira italica* dominate others. The phytoplanktonic population in summer counts about 10,000 per m*l* and considerably exceeds that given by Kurashige in 1930 (about 2,000 per m*l*). This increase in the phytoplanktonic population results the increase of chlorophyll and seston and markedly decreases the transparency of the waters.

4. Amounts of seston during the seasons of autumn and winter ranged from 8.75 to 23.83 mg/*l*. Considering the figures reported from Lake Suwa in that the seston was 7-8 mg/*l* when the transparency was 1 meter, it seems necessary to decrease the seston to a half or two-thirds of the present level to keep the transparency of the moats at the level of 1 meter.

5. In summer when the "water bloom" occurs chlorophyll markedly increase up to the maximum of 163.8 mg/m^3 and the gross production showed the maximum of 13.9g O_2/m^3/day. These figures in productivity shows, together with those given by the chemical analyses such as BOD, COD, PO_4-P and Nitrogen etc., that the waters are ranked in the level of highly eutrophicated lakes.

6. As the results of the bacteriological examination, Coli-aerogenes group of bacteria was comparatively few (mostly less than 10/m*l*) and showed that the waters are free from the sewage pollution. However, the number of heterotrophic bacteria ranged among the level of 10^3 to 10^4/m*l* and the number of the sulphate reducting bacteria in mud ranged among the orders of 10^2 to 10^5/g. w. w. mud.

7. The dominant benthic animals of the waters were *Chironomus plumosus* and *Branchiura sowerbyi*. Both are the typical index animals of the eutrophicated waters.

8. As a conclusion obtained from the results of the present survey, the moats around the Imperial Palace are ranked among considerably eutrophicated lakes and ponds and need some urgent measures, otherwise the progress of the eutrophication will be accelerated and results many kinds of discomfort phenomena such as the outbreak of bad smell or swarming of midge mosquitoes, besides the degradation of value among scenery.Some measures such as circulating filter system, transplantation and conservation of aquatic weeds, removal of bottom mud and removal of plant eaters etc., are being taken into consideration.

* 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

Ⅰ 緒　言

皇居外苑の濠群は，千鳥ケ淵水上公園のボート遊びや散策等都民のリクリェーションの場所として，都内で残された数少ない風致地区の１つである．本濠群は首都の中心地域に位置し，景観上重要のみならず，緊急時の飲料水資源としての役割も担っている．本水域は1940年代には水草が繁茂し，清澄な水をたたえていたが，上水道からの補給水の涸渇，地下湧水の減少，草魚の放養などの要因が関係して水草のほとんどは消滅した．これにともない，1955年頃からは *Microcystis* を優占とする“水の華”(water bloom)の発生が年ごとに著しくなってきている．“水の華”の発生は，水域の透明度を著しく低下させ，そのまま放置すれば富栄養化が加速度的に進行するだけではなく，景観的価値をも低下させ，さらに悪臭，ユスリカの多発生等の問題がおこってくることが知られている．そこで，これら濠群の富栄養化の機構を解明し，水質保全対策の基礎とするために，当所は国立衛生試験所とともに，1969年から皇居外苑濠群の陸水学的調査を行っている．本報告は，1974年５月24日，８月29日，11月21日，1975年２月12日の四季４回にわたり行った調査のうちの細菌学的試験・基礎生産などに関する一部の結果である．

Ⅱ 調査濠群の概要および調査の方法

本濠群は総面積40万m²，貯水量12万ｔ，水深約0.4～2.5mで，流入水としては降水のほかに1,000t/day の地下湧水がある．水は桜田濠から日比谷濠 (St. 7→St. 2)，千鳥ケ淵から牛ケ淵，清水濠等を経て日比谷濠 (St. 6→St. 1）の方向に流れ，日比谷濠の雨水排水溝を通じて排水されている（Fig. 1）．

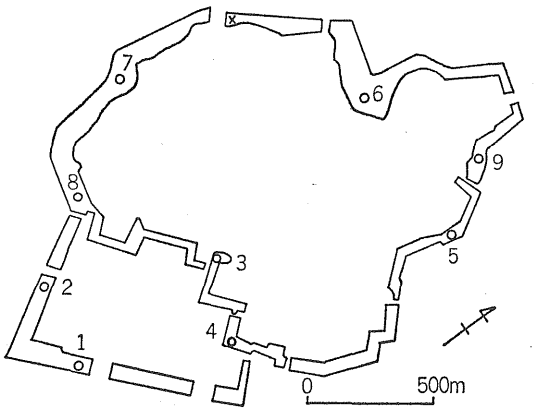


Fig. 1 Sampling stations on the moats around the Imperial Palace 1,2 : Hibiyabori, 3 : Hamaguribori, 4 : Kikyobori, 5 : Shimizubori, 6 : Chidorigafuchi, 7,8 : Sakuradabori, 9 : Ushigafuchi, × : Springhead of underground water

調査各地点で，気温，水温，pH，溶存酸素，透視度，透明度を測定し，また，表層水を採水し，細菌学的試験，クロロフィル量，基礎生産，懸濁物を測定した．化学分析用の試料は，浅い所は表層水を，水深１m以上の所は北原式採水器を用い，中層水を採水した．化学分析は国立衛生試験所が担当した．底泥の細菌学的試料と底生生物採取のための採泥は，エクマン・バージ採泥器を用いた．ほかにプランクトンの直接採取およびプランクトンネット採取を行ったがここでは省略する．

1. 細菌学的試験 Bacteriological Examination

細菌学的試験に関しては，次の４項目を行った．

一般細菌：普通寒天培地を用い，平板法で37°，24hr 後カウントした.[1)]

大腸菌群：デソキシコーレート培地を用い，平板法で37°，24hr後にカウントした.[1)]

従属栄養細菌：桜井培地を用い，平板法で30°，３日後にカウントした.[1,2)]

硫酸塩還元菌（底泥のみ）：ISA 培地を用い最確数法で30°，２週間後にカウントした.[3,4)]

2. クロロフィルの定量 Chlorophyll Determination

試水をグラスファイバーフィルター（ミリポア社製，孔径 1.1～1.5μm）でろ過し，90% アセトンで抽出しクロロフィルａとフェオ色素とを吸光法で定量した.[5)]

3. 基礎生産量 Primary Production

試水を実験室に持ち帰り，100 ml 酸素瓶につめ，13,000lux の螢光灯照射下，そのサンプリング時の水温で測定した．植物プランクトンの活性は，ウインクラー法による酸素量の変化をもって表わした．

4. 懸濁物 Seston

試水を灼熱秤量（500°，１hr）したグラスファイバーフィルター（ミリポア社製，孔径 1.1～1.5μm）でろ過し，デシケーターで乾燥後秤量し，懸濁物量を求めた．

5. 底生生物 Benthos

底泥を48メッシュのふるいでふるった残渣について，実体双眼顕微鏡を用い，底生生物を選別し，同定分類を行った．

Ⅲ 調査結果

1. 濠水の理化学的性状 Chemical and Physical Conditions

夏期は“水の華”が形成されるため，ほとんどの濠でpH ９以上を示す．透視度はこの時期に最も低い（８～19cm)．溶存酸素は年間を通して過飽和である．BOD は冬期においていくぶん減少が認められるが，濠群の大

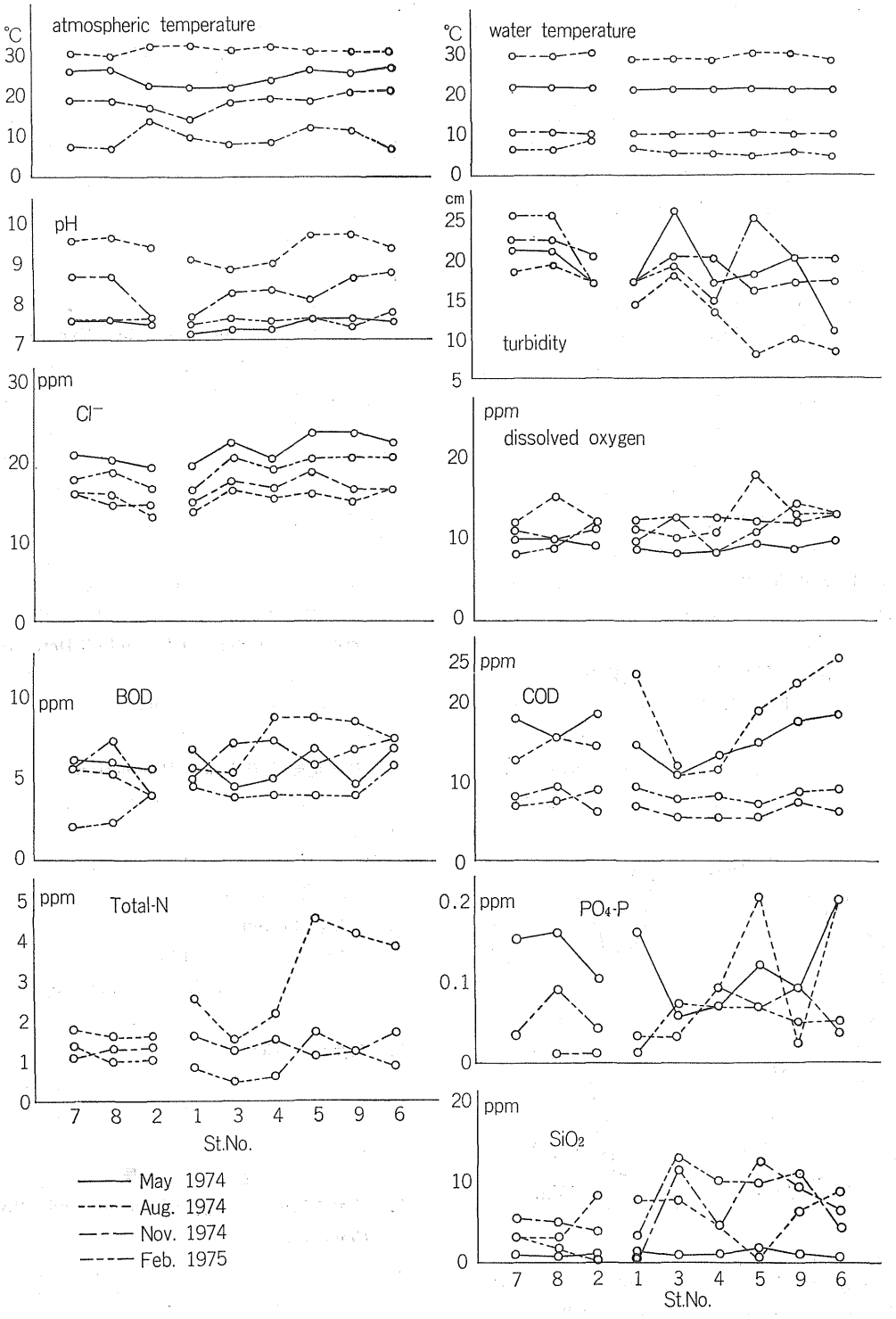


Fig. 2 Seasonal variations of chemical and physical factors
(The order of station number follows the water movement)

部分は四季を通して4～8 ppm である．CODは秋から冬にかけては7～8 ppm 程度であるが，春から夏にはその2～3倍の値を示す．本水域はBOD，CODの値からみると富栄養状態と思われ，これは井之頭池，石神井池の値とほぼ等しい.[6,7] リン酸態リンは秋期には全ての濠で減少しているが（0～0.09ppm），本水域の大部分は常に富栄養湖のリン濃度に相当する値を示す．総窒素は夏に高く，ケイ酸は春に低い値を示す．塩素イオンの値は13～24ppmの間にあり，この値は井之頭池，三宝寺池，石神井池，諏訪湖などと同じ程度である.[8] これらのことからも，本濠群は富栄養から過栄養状態であると考えられる．

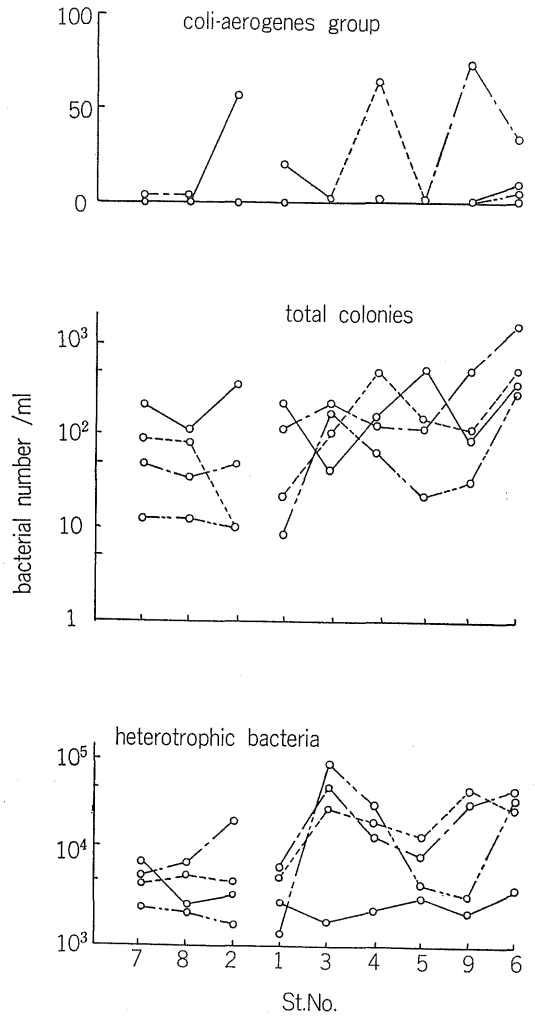


Fig. 3 Seasonal variations in bacterial population (water)
——— May 1974 - - - - - Aug. 1974
— - — Nov. 1974 — - - — Feb. 1975

2. 細菌学的試験 Bacteriological Examination

濠水の細菌学的試験結果を Fig. 3 に示す．大腸菌群数は 0～76/m*l* で，ほとんどが 10/m*l* 以下の値を示した．このことから，下水の流入はほとんど考えられない．一般細菌数は 8～1,400/m*l* で，大部分は 500/m*l* 以下である．倉沢によると松本城の濠では，一般細菌数は 10^4/m*l*，大腸菌群数は 10^2/m*l* である.[9] 従属栄養細菌数は 10^3～10^4/m*l* で，これは中～富栄養湖の細菌数に匹敵する.[10,11] これらの細菌数は井之頭池，石神井池，三宝寺池の数値に相当する．

底泥は茶カッ色から黒カッ色をしており，微かに硫化水素臭がする．硫酸塩還元菌数は 10^2～10^5/g で，佐谷戸らの報告（1973：10～10^3/g）より増加している.[12] これは培地を佐藤培地から ISA 培地に変更したためと考えられる.[13] 底泥の大腸菌群数は St. 6 に比較的多い（最高値180/g）．濠水・底泥の細菌学的試験結果からみると，St. 6（千鳥ヶ淵）にいくぶん細菌数の多い傾向が認められる．

3. クロロフィル量・基礎生産および懸濁物 Chlorophyll, Primary Production and Seston

本濠群のクロロフィルaの値は 15.1～163.8mg/m³ で，これは富栄養湖で得られるクロロフィルaの値にあたる（Fig. 5）．St. 4，5，6，9のクロロフィル量は“水の華”の発生する夏に著しく高い値を示す．St. 1，2，7，8では，春に最高値をとり，夏はむしろ減少している．

生産量は，実測値および1日の日照を8月は12時間，11月，2月は8時間として計算した場合の1日量を Table 1 に示してある．総生産量（gross production）は，植物プランクトンが一定時間内に放出した酸素量（または固定した二酸化炭素量）を示し，純生産量(net production）は，総生産量から植物プランクトンや細菌の呼吸による消費量を差し引いた値を示す．

総生産量は夏に高く，冬に低い値を示す．11月の純生産量は最も低く（1.2 g O_2/m³/day），総生産量（5.3 g O_2/m³/day）の78%は呼吸量である．従って，11月は外観上“水の華”が形成されているが，クロロフィルaも比較的少なく，活性の低下した植物プランクトンが多いと考えられる．典型的な富栄養湖である諏訪湖の総生産量は，*Microcystis* の優占する夏期において 10～30 g O_2/m³/day，珪藻の優占する春期では 2～3g O_2/m³/day と報告されているが，本濠群の値はこれに近いといえる.[14]

懸濁物と透明度の関係をみると，秋から冬の懸濁物は

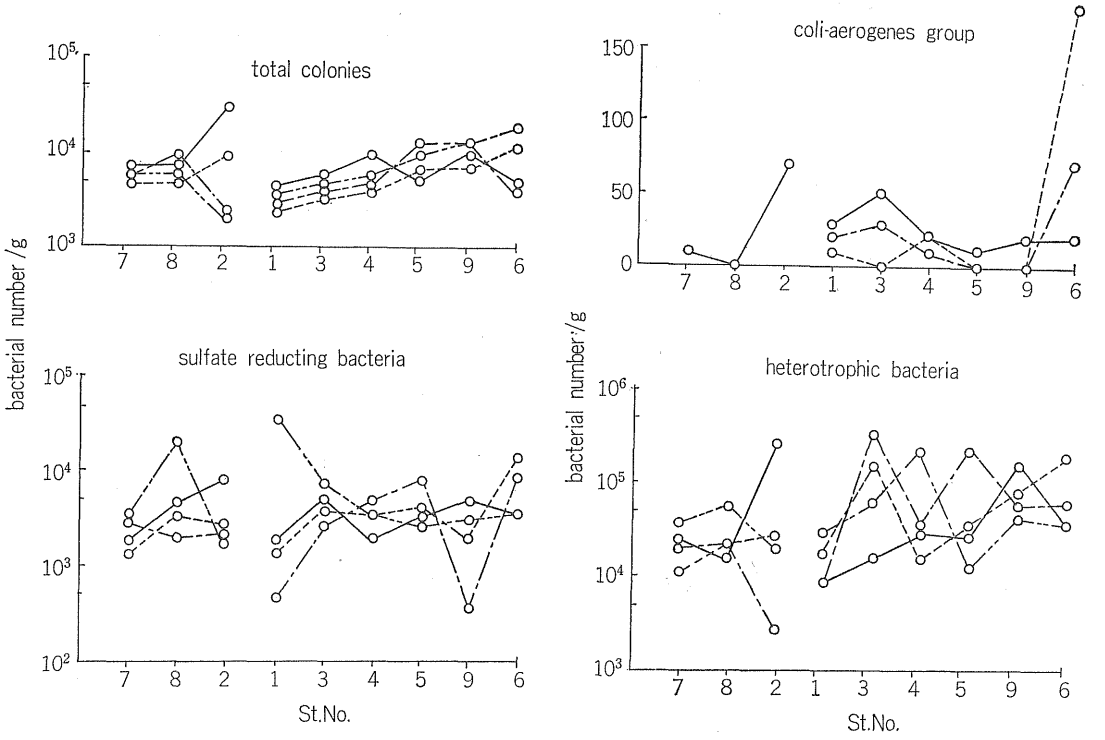


Fig. 4 Seasonal variations in bacterial population (bottom mud)
——— May 1974 - - - - - Aug. 1974 — — — Nov. 1974 — — — — Feb. 1975

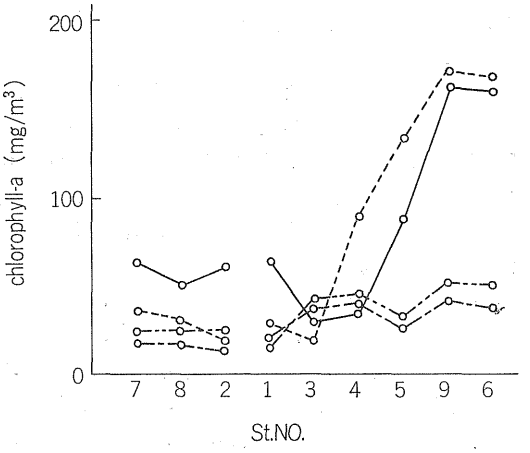


Fig. 5 Seasonal variations of chlorophyll-a
——— May 1974 - - - - - Aug. 1974
— — — Nov. 1974 — — — — Feb. 1975

8.75～23.83 mg/*l* であり，概して懸濁物が多いと透明度は低下している．

4. 底生生物 Benthos

底生生物としては，α—中腐水性およびβ—強腐水性水域の指標生物であるユスリカ類と貧毛類のみであった (Table 2)．富栄養湖の標徴種の *Chironomus plumosus* および *Branchiura sowerbyi* が出現生物の大部分を占めることと，硫酸塩還元菌数からみると，濠群の底質は富栄養的であり，底泥中は低酸素状態あるいは無酸素状態であることを示している．

Ⅳ 考察とまとめ

1. 皇居外苑の濠群は，1930年代に倉茂,[15] 洞沢,[16] 酒井[17]らによって調査されているが，その後はほとんど調査されていない．倉茂は大手濠において，3月中旬には *Synedra pulchella* が優占し，それより半月遅れて *Melosila italica* が増加し，5月には *Scenedesmus quadricada*，6月には *Microcystis aeruginosa* が優占すると報告している (1930).[15] 現在も表層水では，2月には *Synedra* sp. *Melosira italica*，5月には *Scenedesmus* 属，8月には *Microcystis* 属，11月には藍藻に変って緑藻 (*Golenkinia radiata, Micractinium pusillum, Scenedesmus* sp.)，珪藻 (*Synedra* sp. *Melosira italica*) の割合が増大する傾向が認められるが，個体数（約 10,000/ml）は当時よりかなり増加した

Table 1 The result of primary production

Date	St. No.	mgO_2/l/hr			gO_2/m^3/day		
		Pg*	Pn**	R***	Pg	Pn	R
Aug. 29, 1974	1	0.94	0.72	0.22	13.9	8.6	5.3
	3	0.71	0.49	0.22	11.2	5.9	5.3
	7	0.57	0.42	0.15	8.6	5.0	3.6
Nov. 21, 1974	7	0.32	0.15	0.17	5.3	1.2	4.2
Feb. 12, 1975	7	0.37	0.26	0.12	4.8	2.1	2.8

* gross production ** net production *** respiration

Table 2 Benthic animals in the moats around the Imperial Palace (no/m^2)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
May 24, 1974	*Chironomus plumosus*			45	45					276
	Branchiura sowerbyi	134	178	1112	445	623	45	45	45	578
Aug. 29, 1974	*C. plumosus*					134		45		
	Einfeldia insolita gr.			489	45			45		
	B. sowerbyi	45	276	1334	2223	1200	223	134		45
Nov. 21, 1974	*C. plumosus*				45					
	E. insolita gr.		45	312						
	B. sowerbyi	45	400	578	1200	534	89	623	312	45
Feb. 12, 1975	*C. plumosus*	45	45	400						
	E. insolita			89						
	Spaniotoma A gr.			45						
	B. sowerbyi	712	400	178	400	800	45	223		400

ようにみえる（倉茂；約2,000/m*l*）．このようなプランクトンの増加は，クロロフィル量（15.1～163.8 mg／m^3），懸濁物（最大値 23.83mg/*l*）の増加となり，透明度を著しく低下させ（0.4～1.0m），本濠群の景観的価値を大きく左右している．かつて繁茂していた水草（*Hydrilla verticilla* Caspi, *Potamogeton cripus* L., *Myriophyllum verticillatum*）が，上水道からの清澄な補給水の涸渇，地下湧水の減少，草魚の放養，水質の変化などによってほとんど消滅したことも，植物プランクトンの増加の一因となっていよう．

2. 秋から冬の懸濁物量は 8.75～23.83mg/*l* であった．諏訪湖では透明度が 1 m のときの懸濁物は 7～8 mg/*l* である．鉱物質が多い懸濁物の場合の値はもう少し高くなるが，この諏訪湖の値を適用すると，本濠群の透明度を 1 mにするためには，懸濁物を現在の1/2～2/3におさえることが望まれる．

3. "水の華" の発生する夏期は，クロロフィル量の著しい増加が認められ（最高値 163.8mg/m^3），高い総生産量（13.9g O_2/m^3/day）が得られた．この時期は，植物プランクトンの光合成によって，水域は pH 9 以上となる．また，クロロフィル量の多い水域では概して BOD, COD の値は高い．この傾向は総窒素についても認められる．

4. 濠水の細菌学的試験結果から，本濠群に下水が流入していることは認められないが（大腸菌群数 0～76 m*l*），水域は富栄養状態（従属栄養細菌数 10^3～10^4/m*l*）である．一方底泥も *Chironomus plumosus*, *Branchiura sowerbyi* が多数得られたこと，および硫酸塩還元菌数（10^2～10^5/g）からみると，富栄養的であり，ほとんど無酸素状態であるといえる．

以上の結果から，皇居外苑濠群は，富栄養から過栄養状態にあることは明らかである．この水域の水質および景観的価値の保全には，"水の華" の発生を抑制するこ

とが必要であろう．

植物プランクトンと水草の拮抗的関係は，いくつかの物理化学的または生物学的要因が複雑に関係しながら働いていると考えられる．懸濁物を減少させ，透明度を回復するための一策として水草を移植し管理することも考慮する必要があろう．また，循環ろ過によるプランクトンの除去や富栄養状態にある底泥を浚渫することも対策の1つとして考えられる．いずれにしても，何らかの対策を早急に行う必要がある．

謝辞 本研究にあたり，理化学分析を担当された国立衛生試験所の皆様と現地採水に御協力いただいた環境庁自然保護局皇居外苑管理事務所々員に謝意を表します．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「都内陸水の生活環境に関する調査研究」として実施したものである）

文　献

1) 日本水道協会：上水試験法，360．1971，東京
2) 陸水生物生産測定方法論研究会：陸水生物生産研究法，1969，講談社
3) Mara, D. D. and Williams, D. J. A.: *J. Appl. Bact.*, 33, 3, 543, 1970
4) 松本淳彦：東京衛研年報，23，319，1971
5) Lorenzen, C. J.: *Limnol. Oceanogr.*, 12, 343, 1967
6) 産業公害科学研究所：都立公園池水水質保全総合調査（中間報告），1974
7) 東京都建設局公園緑地部：都立公園池水水質保全総合調査（総合報告），1974
8) 桜井善雄，渡辺義人：信州の陸水，3．1974，上田
9) 倉沢秀夫：講演
10) 桜井善雄：バイオテク，2，389，1971
11) 日本生態学会環境問題専門委員会編：環境と生物指標2，40，1975，共立出版
12) 佐谷戸安好 et al.：衛生化学，19，94，1973
13) 松本淳彦：東京衛研年報，24，389，1972
14) JIBP-PF分科委員会：日本陸水群集の生産力に関する研究，197，1973
15) 倉茂英次郎：気象集誌，475，1930
16) 洞沢勇：陸水学会誌，2，29，1932
17) 酒井徹：東京市立衛生試験所報告，8，47，1932

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 26・1, 343—346, 1975

Plesiomonas shigelloides の生態学的研究
1 河川水と淡水魚における本菌の分布状況

池島伸至* 新井輝義* 楠 淳* 榊田真知子*
伊藤元彦* 伊藤 武** 坂井千三**

Ecological Surveys of *Plesiomonas shigelloides*
(1) Isolation from River Water and Fresh Water Fish

NOBUYUKI IKESHIMA*, TERUYOSHI ARAI*, JUN KUSUNOKI*, MACHIKO SAKAKITA*, MOTOHIKO ITOH*, TAKESHI ITO** and SENZO SAKAI**

During the period of 1974-1975, a survey was conducted for the distribution of *Plesiomonas shigelloides* in river water and intestinal contents of fresh water fish from the Tama River and the Naka River, in Tokyo. The isolation of the organisms was by the use of SS agar (Salmonella Shigella agar) and DHL agar (Desoxycolate Hydrogen sulfide Lactose agar) plates.

Consequently, *P. shigelloides* was isolated from 4 (2.8%) out of 142 water specimens of the Tama River. Their serotypes were consisted of 08 : H3, 022 : H3, and rest of two were untypable. It was also found that the organism was present in 6 (3.3%) of 178 fish intestinal contents. Their serotypes were two strains of 06 : H3, two of 08 : H3, one of 08 : H2, and rest of the one untypable.

緒 言

Plesiomonas shigelloides は，最初 Fergusonら[1] が下痢症患者のふん便から *Shigella sonnei* と共通抗原を有する腸内細菌類似菌を分離し，Paracolon C27と命名した．

その後，本菌の分類学的研究が Bader,[2] Sakazakiら,[3] Ewingら[4]によって進められ，近年まで *Aeromonas shigelloides* と呼ばれていた．

一方，Habsら[5]は，前述の *Aeromonas shigelloides* の生化学的性状を詳細に検討し，本菌は *Aeromonas* と異なる点を明らかにし，新しい属として *Plesiomonas* を提案した．そして種を *Plesiomonas shigelloides* と命名した．同じ頃，本菌について Eddy ら[6] は数値分類を行ない，また Sebald ら[7] はGC含有量を検討し，その成績は，Habs らの分類を支持するものであり，Ferguson が最初命名した Paracolon C27 は，現在 *Plesiomonas shigelloides* と分類学上位置付けられている．

P. shigelloides の下痢症との関連については，Ferguson ら,[1] Schmidら,[8] Sanyal ら,[9] Sakazaki ら[3]をはじめ多くの研究者によって報告されており，最近我が国においてもしばしば本菌による集団下痢症がみられ注目されている．[10,11]

しかし，現在までの発生例は感染源が全く明らかでなく，また本来の生態学的研究も殆んど進められていない．

そこで著者らは，*P. shigelloides* の生態学的研究を意図し，今回はその一環として行なった河川における本菌の分布についての調査成績を報告する．

調査対象および方法

1 被検材料

1) 河川水：表1に示すごとく，1974年6～8月およ

* 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
**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 Rasearch Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

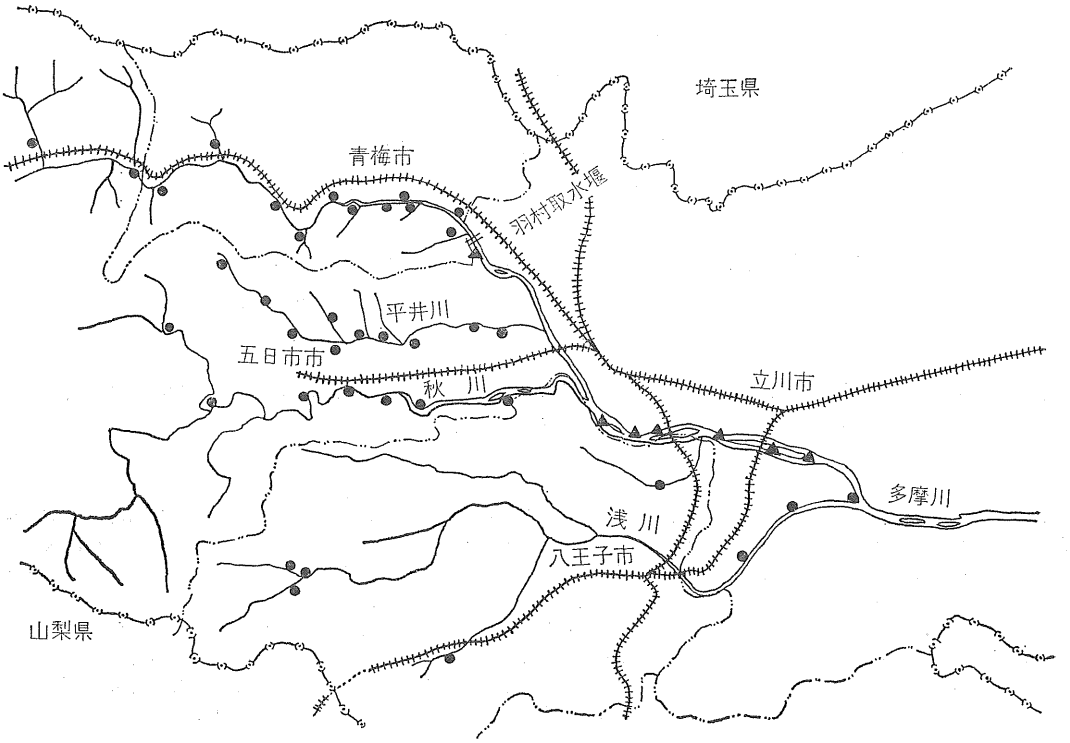


図1 多摩川水系における採水地点
注) ●：上流，▲：下流

び1975年2～7月に，東京都内の多摩川の44地点より採取した河川水142件を検査対象とした．河川水は滅菌コルベンに約500m*l*採水し，直ちに当研究所へ送付した．なお，多摩川の場合の上流とは図1に示すごとく，ヒトや家畜の屎尿汚染などが比較的少ないと考えられる羽村取水堰より上流の多摩川本流および，秋川，平井川，浅川の各支流を，また，多摩川下流とは羽村取水堰から浅川との合流点までの多摩川本流を仮称した．

2) サカナ：1974年8月，東京都内の中川で捕獲したフナ，コイおよびナマズの計77件，1975年2～6月に河川水を採取した多摩川で捕獲したヤマベ，ハヤ，フナおよびドジョウ計101件である．捕獲したサカナは氷冷輸送して実験に供した．

2 *Plesiomonas* の検査方法

各被検材料からの本菌検出方法の概略を図2に示した．河川水からの *P. shigelloides* 分離培養は，善養寺らのメンブランフィルター集菌法[12]を応用した．すなわち，Millipore Filter Corporation 製の装置とフィルター（HA型，0.45μm）を用い，被検水約500m*l* を吸引沪過し，そのフィルターの沪過面をSS寒天5枚および

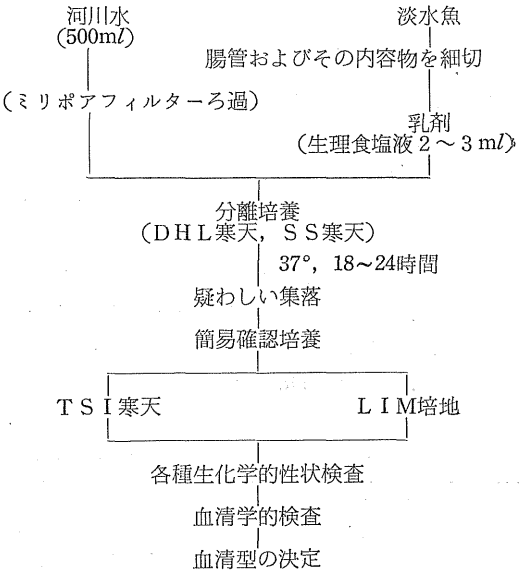


図2 河川水およびサカナからの *P. shigelloides* の検出方法

DHL寒天5枚にそれぞれ塗沫培養した．

サカナの場合は腸管を無菌的に取り出し，ハサミで細切してから，滅菌生理食塩水または，ペプトン水を2～3 ml 加えて乳剤とし，その乳剤をSS寒天およびDHL寒天に塗沫培養した．

3　*P. shigelloides* の同定および血清型別

被検材料を直接塗沫した各平板培地は37°，18～24時間培養し，出現した乳糖非分解性の集落をTSI寒天およびLIM培地に接種してまず簡易試験を行なった．両確認培地で，乳糖・白糖非分解，ブドウ糖分解，ガス非産生，硫化水素非産生，インドールならびにリジン脱炭酸陽性および運動性菌について，TSI斜面菌をガラス棒でかき取り，デイスク法によるチトクロム・オキシダーゼ試験（市販品：栄研化学）を行なった．本試験陽性菌についてさらに Ewing ら[4] の方法に従って詳細な各種生化学的性状検査を行ない，その成績によって*P. shigelloides* と同定した．

P. shigelloides と同定された菌株については，血清型別を国立予防衛生研究所　坂崎利一博士および島田俊雄技官に依頼した．

成　績

1　河川水からの *P. shigelloides* の検出状況

多摩川の河川水142件からの *P. shigelloides* の検出状況は表1に示すとおりである．河川水142件中4件（2.8%）から本菌が検出され，その陽性例の内訳は，1例は1974年6月多摩川支流平井川の平井橋下，1例は1974年6月多摩川本流の拝島橋下，残りの2例は，1975年7月多摩川と浅川の合流点である．

河川水中の本菌の汚染菌数は，陽性例はいずれも検出集落数が1ないし4個であったことから，河川水1 l 中10個以下と推定される．

2　サカナからの *P. shigelloides* の検出状況

中川で捕獲したサカナ77件および多摩川で捕獲したサカナ101件の腸管内容物からの *P. shigelloides* の検出成績は表2に示すとおりである．中川で捕獲したフナ72件中5件（6.6%），およびナマズ1件中1件から本菌が検出された．多摩川で捕獲したヤマベ，ハヤ，フナおよびドジョウの場合はすべて陰性であった．

表1　多摩川の河川水からの *P. shigelloides* 検出状況

採水年月	採水場所		検査件数	陽性件数	(%)
1974.6～8	多摩川	上流	47	1	(2.1)
	〃	下流	19	1	(5.2)
1975.2～7	多摩川	上流	70	0	
	〃	下流	6	2	(33)
計			142	4	(2.8)

表2　サカナからの *P. shigelloides* 検出状況

採取年月	採取場所	サカナの種類	検査件数	陽性件数	(%)
1974.8	中川	フナ	72	5	
		コイ	4	0	
		ナマズ	1	1	
1975.2～6	多摩川	ヤマベ	53	0	
		ハヤ	45	0	
		フナ	2	0	
		ドジョウ	1	0	
計			178	6	(3.3)

3　分離株の生化学的性状および血清型

河川水およびサカナから検出された10株の *P. shigelloides* の主要な生化学的性状を表3に示した．分離株はいずれもブドウ糖を発酵的に分解するが，ガスは非産生，硫化水素非産生，チトクロム・オキシダーゼ陽性，リジン脱炭酸試験陽性，インドール反応陽性，イノシットを分解するがマンニットは非分解性の運動性菌であった．これらの性状は，Ewing ら[4]の報告した *P. shigelloides* の諸性状と全く一致していた．なお，河川水から検出された菌株P3とP8は，オルニチン脱炭酸試験とアルギニンジヒドロラーゼが陰性であって，他の8株の性状と異なっていた．また，本菌の乳糖分解性は，バルジコーの培地を用いて検討した結果，検出株10株のうち1株は1日で陽性，5株は2～4日で陽性，他の4株は15日間の観察で陰性であった．

分離株の血清型は表3に示すごとく，O8：H3が3株，O6：H3が2株，O8：H2およびO22：H3が各々1株であった．2株はO群型別不能，H抗原が2，1株はO群型別不能，H抗原が3であった．

考　察

P. shigelloides のヒトに対する腸炎起病性については，現在明確にされているわけではないが，散発例や集団発生例の過去における多くの症例から疑うべくもないであろう．[13-15]

しかし，本菌感染症の感染源については全く明らかでなく，また本菌の自然界における分布は Sakazaki らの犬の調査，[3] Schmid ら[8] のチンパンジーや家畜に関する報告例があるに過ぎない．

著者らは，*P. shigelloides* の生態学的研究を意図し，その手がかりとして今回は，本菌と類似し魚病起因菌として知られている *Aeromonas hydrophila*,[4] *Aeromonas*

表3 分離株の生化学的性状および血清型

性状	河川水由来株				サカナ由来株					
	P3	P8	P401	P402	P10	P11	P12	P13	P14	P15
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
硫化水素（TSI）	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
クエン酸塩（シモンズ）	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
尿素	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ゼラチン	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
チトクロム・オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
リジン・デカルボキシラーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
オルニチン・デカルボキシラーゼ	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
アルギニン・ジヒドロラーゼ	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
ブドウ糖 酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ブドウ糖 ガス	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ラクトース*	+	+[2]	+[4]	+[2]	−	−	−	−	+[2]	+[2]
マンニット	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
イノシット	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ノボビオシン感受性（10μg）	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+
運動性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
血清型（O：H）	UT:2	22:3	UT:3	8:3	6:3	6:3	8:2	8:3	8:3	UT:2

注） +：1日で陽性，−：陰性，*：肩につけた数字は反応が陽性になる培養日数を示す，UT：O群1～23に該当しない

almonicida[4,16] が河川水やサカナから検出されることに着目し，東京都内の多摩川，中川を対象に *P. shigelloides* の分布調査を行なった．

今回の調査は，多摩川の場合は河川水とサカナについて行なった結果，サカナはすべて陰性であったが，河川水から本菌が検出され，その生菌数は1*l* 当り10個以下と推定された．

中川の場合は，そこで捕獲されたサカナについて調査したところ，フナおよびナマズの腸管内容物から本菌が証明された．ただ，この場合，調査対象がフナが多く，そのほかのコイ，ナマズは極めて少数例であったため，サカナの種類によって本菌の保菌が異なるのか否かは明らかではない．

いずれにしても前述のごとく河川水やサカナから *P. shigelloides* が証明されたことは，本菌の分布は極めて広範囲であることが推察されよう．

P. shigelloides の血清型別に関する研究は，Baderら，[2] Schmidら，[8] Sakazakiら[3] および Quincke[17] の報告があり，また，最近島田および坂崎[18]は23のO群と7のH抗原を明らかにし，その組合わせで26の血清型を報告している．今回の著者らの検出株は，島田および坂崎の方法で血清型別が実施され，供試菌株10株のうち8株が型別された。そのなかには，坂崎らがヒトの下痢症患者から検出しているのと同じ血清型であるO6：H3（2株），O8：H3（3株），O22：H3（1株）が認められた．このことは，ヒトの本菌感染症の感染源との関連において注目される点であろう．

今回は，河川を中心にした *P. shigelloides* の分布について述べたが，さらにヒト，犬，猫およびカメなどについても現在検討中であるので次の機会に報告する．

結論

P. shigelloides の自然界における分布調査の一環として，1974～1975年に，東京都内の多摩川の河川水および多摩川と中川のサカナの腸管内容物について，*P. shigelloides* の検索を行なった結果，以下の成績を得た．

1 多摩川で採取した河川水142件中4件（2.8%）から *P. shigelloides* が検出された．

2 多摩川および中川で捕獲したサカナの腸管内容物178件中6件（3.3%）から *P. shigelloides* が検出された．本菌が検出されたサカナの種類は，フナとナマズであった．

3 河川水およびサカナの腸管内容物から検出された *P. shigelloides* 10株の血清型は，O8：H3が3株，O6：H3が2株，O8：H2およびO22：H3が各々1株であった．残りの3株はO群型別が不能であった．

謝辞 本研究において，分離菌株の血清型別に御協力

くださった国立予防衛生研究所　坂崎利一博士および島田俊雄技官に心からの謝意を表します.

文　献

1) Ferguson, W. W. and Henderson, N. D. : *J. Bact.*, 54, 179, 1947
2) Bader, R. E. : *Zsch. Hyg.*, 140, 450, 1954
3) Sakazaki, R., Funaoka, S., Nakaya, R. and Fukumi, H. : *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 12, 355, 1959
4) Ewing, W. H., Hugh, R. and Johnson, J. G. : *Studies on the Aeromonas Group*, Communicable Disease Center Atlanta, Georgia, United States, Public Health Service, 1961, 1972
5) Habs, H. and Schubert, H. W. : *Zbl. Bakt. Abt.* 1 *Orig.*, 186, 316, 1962
6) Eddy, B. P. and Carpenter, K.P. : *J. appl. Bact.*, 27, 96, 1964
7) Sebald, M. and Veron, M. : *Ann. Inst. Pasteur*, 105, 897, 1963
8) Schmid, E. E., Velaudapillai, T. and Niles, G. R. : *J. Bact.*, 68, 50, 1953
9) Sanyal, S. C., Singh, S. J. and Sen, P. C. : *J. Med. Microbiol.*, 8, 195, 1975
10) 堀　道紀，林　克己，前島健治，木川守平，宮里嵩，米田幸雄，萩原義種：日伝染会誌，39, 433, 1966
11) 高橋暉良，藤島　周，岡田正次郎，芦田博之，奥山雄介，宮崎瑤子，加藤徳成，岡野米雄，堀光　宏：埼玉県衛生研究所報，5, 35, 1970
12) 善養寺浩，坂井千三，工藤泰雄，伊藤　武，斉藤クラ，丸山　務：日伝染会誌，43, 175, 1969
13) Sakazaki, R., Tamura, K., Prescott, L. M., Bencic, Z., Sanyal, S. C. and Sinha, R. : *Indian J. Med. Res.*, 59, 1025, 1971
14) Graevenitz, A. and Mensch, A. H. : *New England J. Med.*, 278, 245, 1968
15) Pauckova, V. and Fukalova, A. : *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Abt.* I. *Orig.*, 206, 212, 1968
16) Mc Carthy, D.H. and Rawle, C. T. : *J. gene. Microbiol.*, 86, 185, 1975
17) Quincke, G. : *Arch. Hyg. Berl.*, 151, 525, 1967
18) 島田俊雄，坂崎利一：日細菌誌，29, 95, 1974

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

食中毒の原因追求—最近の事例とその問題点—

辺野喜正夫，丸山務：公衆衛生，39 (6)，374—381，1975

わが国で過去10年間に発生した細菌性食中毒は，事件数，患者数ともに数の上ではあまり変化がみられない．しかし，その内容は生活様式の変化によって年々異にしている．そこで細菌性食中毒の原因追求の立場から，最近の話題，特に 1.細菌性食中毒と統計数値の評価，2.食中毒事件の調査，3.サルモネラ食中毒と卵，4.病原大腸菌の問題およびそれと飲料水との関連，5. *Yersinia enterocolitica*，6.滋賀県で発生したE型ボツリヌス中毒，7.食品添加物の使用禁止と嫌気性菌の項目をとりあげ論説した．

***Yersinia enterocolitica* および偽結核菌の菌学，生態と感染症**

善養寺浩：日本細菌学雑誌，30 (4)，571—581，1975

わが国における *Yersinia* 感染症は，1972年善養寺らの *Yersinia enterocolitica* 感染症例報告以来，急速に注目されてきている．特に外国では例をみない数百名の患者を数えた集団発生が小中学校を舞台に4例も発生して，公衆衛生領域で深い関心を集めてきた．*Yersinia pestis* は別として属 *Yersinia* のなかで重要なもう一つの菌に *Yersinia pseudotuberculosis*（偽結核菌）がある．偽結核菌は *Y. enterocolitica* よりも研究の歴史は古いが，現在世界的に後者の感染が前者のそれをりょうがしており，医学細菌の分野では近年 *Yersinia* 症のなかでは *Y. enterocolitica* 感染の研究が主流をなしている．そこで本報では *Y. enterocolitica* に力点をおいて，首題の問題を詳細に解説した．

エルシニア感染症

善養寺浩：*Medicina*, 12(8)，1166-1167，1975

最近の感染症の変貌は著しく，その原因の1つに原因菌の変遷が考えられる．エルシニア属もわが国では最近ようやく注目されはじめた菌であり，本菌感染症が臨床各科にわたる多彩さを示すことが特徴である．本報では *Yersinia enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* について菌学，感染病像，治療，検査，疫学と菌の生態などについて概説した．

Edwardsiella tarda

善養寺浩：*Medical Technology*, 3 (3)，306—308，1975

Edwardsiella tarda は最近，腸内細菌科にあらたに位置づけられた．本菌は腸炎病原菌としてのみでなく，敗血症や髄膜炎をも起しうるのであるから，正しく分離，同定する知識を身につけておくことが必要である．本報では主として検査技術者のために，本菌の生化学性状，生態と病原性などの問題について概説した．

エルシニア菌

善養寺浩：臨床医，1(5)，619，1975

細菌感染症をめぐる最近の話題の中で，新らしい病原菌として注目されている *Yersinia enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の菌学とそれらの病原性について概説した．

腸管系病原菌検査「生態系におけるサルモネラ」

善養寺浩：東京都予防医学協会事業年報，4，75，1974

ここで，都市環境の中でのサルモネラの生態をとらえようとした．しかし，この菌の生態でさえ限定された環境の中で理解することは困難である．サルモネラ自体はその固有な生態をもち，元来，ヒトの社会とは無縁であって差し支えないものであろう．ただ，ヒトに起病性を有するがために，人類の敵とされ，人口が密集すれば，知ろうと知るまいとかなり広範囲な病害をヒトに及ぼしている．

生態ということばが流行し，ヒトのあり方をこのことばの背景からとらえようとするとき，病原微生物，ここはサルモネラをどう扱かったらよいのか途方にくれる．こそくながら，著者らの立場から，サルモネラ症予防の提言はある．しかし，現在のように，ことに大都市ではその汚染は広く，われわれのことばは大衆には浸透しきらないであろう．

最後に，サルモネラの感染は肉が主体であり，保菌者，患者の増加は乳児の死亡につながる危険性が大きいことを強く警告しておきたい．

Isolation of *Yersinia enterocolitca* and *Yersinia pseudotuberculosis* from Swine, Cattle and Rats at an Abattoir

H. Zen-Yoji, S. Sakai, T. Maruyama and Y. Yanagawa : *Japan J. Microbiol.*, 18 (1)，103—105，1974

ヒト *Yersinia* 症の汚染源を追求する目的で，動物保菌，特に今回はブタ，ウシおよびネズミについて検討した．*Y. enterocolitica* はブタ回盲部内容物1796件中220件（11.6%），同腸間膜リンパ節917件中5件（0.5%），ネズミ回盲部内容物165件中58件（35.2%）から検出さ

れたが，ウシ回盲部内容物200件，同腸間膜リンパ節197件からは1件も検出されなかった．ネズミからの分離株のO抗原型は多岐にわたり，3，5Bは1株もなかった．一方，ブタ由来株の高頻度検出菌型は，ヒト患者由来株と同じ3，5Bであったことから，本菌感染症の感染源としてブタが重要な役割を果しているものと推定された．

Purification and Characterization of Enteropathogenic Toxins "A" and "A'" Produced by *Vibrio parahaemolyticus* and Their Biological and Pathological Activities

H. Zen-Yoji, Y. Kudoh, H. Igarashi, K. Ohta and K. Fukai : *Proceedings of the 9th Joint Conference, U. S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel*, 249—260, 1974

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 on Sephadex gel filtration. The 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. Toxin "a" (HPT-a) which was further purified highly on a chromatography and Sephadex gel filtration, was a simple protein and had the following properties : isoelectric point of pH 5.02 ; S_{20w} of 5.3 ; not containing lipids and carbohydrates. HPT-a was inactivated by heating at 60 C for 5 min, but the toxin heated at 100 C for 30 min exhibited the activities. Its LD_{50} was ca. 1.5 μg for mice. Toxins "a", "a'" and HPT-a showed the same hemolytic activities, lethality to mice, actions in tests in the guinea pig skin and rabbit intestinal loops. In tests with two toxins, including HPT-a, pathological findings on both skin responses and loops were characterized in common by edema and conspicuous neutrophiles infiltration. The toxins were presumed to be important enteropathogenic factors, based on the similarity of these findings to those observed in the autopsy cases.

An Enteropathogenic Toxin of *Vibrio parahaemolyt cus*

H. Zen-Yoji, Y. Kudoh, H.Igarashi, K. Ohta, K. Fukai and T. Hoshino : *Proceedings of the 1st Intersectional Congress of IAMS*, 4, 263—272, 1975, Science Council of Japan

Enteropathogenic toxin produced by *Vibrio parahaemolyticus* was purified from cell-free culture filtrates. The purified toxin was characterized by ; (i) a single precipitin line against polyvalent antisera ; (ii) homogeneity on polyacrylamide gels ; (iii) UV spectrum characteristic of pure protein ; (iv) sedimentation coefficient of 5.3 S ; (v) isoelectric point of pH 5.02 ; (vi) unaffected by the action of trypsin, but digested by pepsin. The molecular weight was estimated as approximately 45,000 by Sephadex gel filtration method. The toxin had only one N-terminal phenylalanine, and the sequence of the first 38 amino acid residues from the N-terminus was determined. As for the biological activities, minimal hemolytic dose was estimated to be 0.1 mcg when tested on a blood agar plate ; LD_{50} in mice was approximately 1.5 mcg ; minimal cutaneous response dose in guinea pig skin test was about 2.5 mcg. Skin response was characterized by marked edema, erythema and induration, and showed no diffuse dye permeation. More than 200 mcg of the toxin gave positive response in the intestinal loop test ; major pathological findings consisted of severely destructive changes with neutrophil infiltration and accumulation of bloody exudate in the loops. Monkeys injected 5 and 10 mg of toxin exhibited catarrhal lesion accompanied by a mucoid exudate accumulation in the jejunum ; with 25 mg, monkeys died between 5 and 10 hr after injection, and the major pathological findings were conspicuous thinning and markedly diminished tonus of the small intestinal wall, and a great abundance of bloody, mucoid exudate in the lumen. This purified toxin also showed a peculiar heat-stability : The toxin was inactivated by heating at 60 C for 5 min, but not significantly inactivated by heating at 100 C for 30 min.

マウスの実験的サルモネラ症に対する Nitrofuran 剤および常用抗生剤の治療効果の比較検討

善養寺浩，寺山　武，池島伸至，小野川尊：*Chemotherapy*, 22(7), 1180, 1974

S. enteritidis の弱毒変異株をマウスに感染させた実験的サルモネラ症に対して FT, KM, CER, ABPC, CP の治療効果を比較検討した．FT はサルモネラ感染直後および24時間後に投与しても著明な治療効果を示した．

KM は菌接種直後に投与した場合には治療効果を示したが，24時間後に治療を開始した場合には効果を示さなかった．CER, ABPC, CP はいずれの場合にも治療効果を示さなかった．FT の治療効果は 0.5mg／マウス／日以上投与した時にだけ認められ，また 2 mg を投与した場合には 1 回の投与で著明な効果が認められた．

腸炎ビブリオ食中毒の予防に関する研究

バカ貝の流通過程における腸炎ビブリオ汚染の消長について

坂井千三，寺山武，伊藤武，善養寺浩，他：食品衛生研究，25，537—540，1975

都内発生食中毒の約半数は腸炎ビブリオによるものであり，その原因食品は主として海産性の魚介類およびその加工品によるものである．そこで，本食中毒予防の基礎資料を得る目的で，都内発生の本食中毒の原因食として発生頻度の高い“バカ”貝を対象に流通段階における腸炎ビブリオ汚染の消長について検討した．

夏季におけるバカ貝の腸炎ビブリオ汚染は，生産地から消費地元の入荷時にすでに汚染されており，その生菌数は産地によって大きな差異が認められた．入荷時からむきみ処理，市場，市販店舗の各流通段階での腸炎ビブリオ汚染の消長は，入荷時の生菌数がそのまま持続するか，あるいはやや減少傾向がみられた．

本調査で，バカ貝の場合，その流通過程において腸炎ビブリオの急速の増加を予測したが，産地から入荷後の流通過程における菌数の増加よりも最初の汚染菌数が最終商品まで持続することが明らかとなった．

東京都内の中川流域で発生したカモのボツリヌス中毒について

坂井千三，伊藤武：メディヤ・サークル，19(8)，209—215，1974

1973年9月ごろより東京都の中川流域に生息しているカモなどの野鳥が多数斃死した事件について，その原因物質の究明を行ったところ，食中毒のなかで最も恐ろしいボツリヌス中毒であることが判明した．本事例は本邦で最初に確認された野鳥のボツリヌス中毒であるので，その発生の概要と細菌学的検査成績を中心に紹介した．

ボツリヌス菌の螢光抗体法による検出に関する研究

岡沢久美子，伊藤武，坂井千三，善養寺浩：東京都衛生局学会誌，55，144—145，1975

ボツリヌス中毒は，死亡率が極めて高く，その診断は患者の治療および続発防止の点から特に迅速性が要求される．現在の本中毒の診断法としては，原因食品や患者からの菌検出と毒素の証明が行われているが，いずれの場合も最終判定までに長時間を必要とする．そこで著者らは，ボツリヌス中毒の早期診断法の開発を目的として，螢光抗体法の応用を試み，その基礎的研究を進めた結果，本法はボツリヌス菌の迅速判定法として極めて秀れていることが確認された．

保存・輸送培地

坂井千三，伊藤　武：臨床検査，18(6)，669—676，1974

各種の臨床材料からの病原菌の検査に際して，材料を採取してから検査を実施するまでに長い時間の経過を避けられないことも少なくない．こうした場合，臨床材料中の病原菌の死滅を防止するために，保存輸送培地が用いられている．本報では，一般検査室で取り扱う頻度の比較的高い臨床材料の保存・輸送培地について紹介した．

日常臨床検査法　スクリーニング検査と精密検査

坂井千三，伊藤武：臨床検査，18(13)，1974

臨床材料中の病原菌は，材料を採取してから時間が経過するに従って，乾燥，温度などの物理的な影響や共存細菌の増殖に伴う代謝産物の影響によって急速に死滅，減少していく．したがって，検査材料中の病原菌をより正確に検出するためには，臨床材料を保存・輸送培地に採取することが望まれる．本報では一般検査室で取り扱う頻度の高い病原菌を対象にした糞便保存液について概説した．

ブドウ球菌エンテロトキシンの精製について

寺山武：日本細菌学雑誌，29(2)，329，1974

Bergdoll 一門の研究者によって各型のエンテロトキシンの精製がなされてきたが，彼らの報告では，その精製過程における α-溶血素の分画について特に記載されていない．私どもが彼らの方法によって精製を試みたかぎりでは，どうしても精製標品を得ることができなかった．Ent B についてはほぼ彼らの方法で純化できるが，Ent A, C, D, E および F 株はそれぞれ Ent の外に多量の α-溶血素を産生し，しかもこれが Ent 精製の障害となっていた．本報では，Ent 精製法のうちでもっ

とも容易な Ent B と，上述の理由で特に精製の困難なものを代表して Ent D の精製法について述べた．その他の Ent においても，ほとんど Ent Dの精製法をそのまま適用すればほぼ精製が可能であった．

食品および調理環境検査

ブドウ球菌食中毒発生の現況と原因黄色ブドウ球菌に関する基礎的検討

寺山武：東京都予防医学協会事業年報，4，86，1974

黄色ブドウ球菌が食品中で増殖して 10^8/g の菌数に達しても，官能検査においてまったく異常を認められない．だからこそ本菌食中毒が実際に発生するわけであるが，本食中毒は一過性の嘔吐と軽い下痢を生じただけで経過するものがほとんどであって，一般に軽視されがちである．しかし，本稿で述べたごとく，本菌食中毒の発生には腸炎ビブリオ食中毒についで常に2番目に多い集団発生をみている．さらに本症が軽症であるがゆえに統計上に現われない事例はかなりの数に達すると想定されるので，社会的損失は思ったより大であろうと推察される．こうした食中毒の発生状況と，本食中毒予防につながる基礎的調査成績をここで述べた。

Yersinia enterocolitica

丸山務：臨床検査，18（2），130—131，1974

Yersinia enterocolitica の感染病像は多彩であるが，発生頻度としては，幼児の下痢症，および虫垂炎を疑わせる胃腸炎症状が最も多い．しかしながら，わが国における本菌の研究の歴史が浅く，認識も低いことから本菌の菌学，病原性についてカラー写真を中心に概説した．

***Yersinia enterocolitica* の検査法**

丸山務：臨床検査，18（2），143—148，1974

Y. enterocolitica の検査は腸内細菌に準ずればよい．ただ注意しなければならないことは，本菌は他の腸管系病原菌に比較して，至適発育温度が低いこと，また，世代時間が長いために，分離培養および確認培養の一部は25°C，48時間の培養条件で行うことである．このため，同定までに要する日数が，他の腸内細菌よりも2～3日多くかかることも念頭におく必要がある．わが国では，本菌の検査法について書かれた物はこれまでになかったので，写真，図表を用いて詳細に解説した．

豚腸炎からの *Yersinia enterocolitica* の分離について

正谷千恵，木下正彦，永野清一郎，松本栄一，加藤孝雄，渡辺賢也，丸山務，柳川義勢：東京都衛生局学会誌，54，48—49，1974

先に著者らは，ヒト *Yersinia* 症の感染源としてブタが重要な役割をもつことを指摘したが，今回は本菌がブタにも病原性を発揮するか否かを知るためブタ腸炎からの *Y. enterocolitica* の分離を試みた．その結果，219例中3例（1.4%）から本菌が分離され，この数値は健康ブタよりも低いものであった．

糞便検査法—特に材料の採取，保存，輸送について

丸山務：*Medical Technology*，2（12），1974

細菌検査室で扱う糞便は，主として下痢・腸炎患者の糞便であり，これを検査材料として原因追求を行う場合，対象はおもに赤痢菌，サルモネラ，腸炎ビブリオなど腸管系の病原菌である．しかし，最近は，これら既知の病原菌以外にも腸炎起因菌としてこれまでの病原腸菌以外の大腸菌や *Yersinia enterocolitica* の登場があり，また，グラム陰性杆菌症や oppotunistic infection が重要視されてきている現在，糞便検査はこれらのことも考慮に入れなければ，正確な成績をひき出すことはできない．本報では，糞便からの腸管系病原菌検査法を中心として，特に糞便の採取，保存，輸送および検査の進め方についてその概要を述べた．

と畜場構内で捕えたネズミから分離した *Yersinia enterocolitica* について

渡辺賢也，木下正彦，永野清一郎，加藤孝雄，松本栄一，丸山務，柳川義勢：東京都衛生局学会誌，53，38—39，1974

多摩食肉衛生検査所でと殺されたブタからは *Y. enterocolitica* が高率に分離されることをすでに報告した．今回は上記と畜場構内で捕獲されたネズミについて本菌の分離を試みた．その結果，200例のネズミ回盲部内容物中61例（30.5%）から *Y. enterocolitica* が分離された．しかし分離株の主要検出菌型は 0：6，0：7 であり，ヒトおよびブタのそれとは異なっていたことからネズミはヒト *Yersinia* 症の感染源としては関係がないものと思われる．

と畜場内で捕えたドブネズミから分離したサルモネラについて

永野清一郎，正谷千恵，木下正彦，松本栄一，加藤孝雄，渡辺賢哉，伊藤武，津野正朗：東京都衛生局学会誌，54，80—81，1974

サルモネラによる食中毒発生の増加の要因として，と

畜場内での枝肉などへのサルモネラ汚染が重要視されている．著者らは，と場内のサルモネラによる環境汚染状況をは握する目的で，と畜場内に生息するドブネズミについてサルモネラの検索を行った結果，ドブネズミのサルモネラ保菌率は極めて高率である成績が得られた．

食中毒患者，散発下痢患者および健康人由来サルモネラ菌型の年次別推移について

津野正朗，伊藤武，柳川義勢，丸山務，坂井千三，善養寺浩：東京都衛生局学会誌，55，142—143，1975

サルモネラ食中毒の予防の基礎資料を得る目的で，本菌の健康人における保菌状況，食品汚染，環境汚染について調査を進めてきた．本報では，1964年から1973年の10年間に，都内に発生した食中毒患者，散発下痢患者ならびに都内在住の健康人から検出されたサルモネラを対象に，主として菌型の推移について述べた．

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：東京都衛生局学会誌，53，60，1974

WHO は多くの研究報告に基づいて梅毒血球凝集反応法（TPHA）の Micro 法を検討し，その有用性から従来の Macro-TPHA に替わって Micro-TPHA の採用を推奨している．我々は，この WHO 推奨の Micro-TPHA と従来法との比較試験を実施しその検討結果から更に改良 Micro-TPHA 法を考案した．改良 Micro-TPHA は，WHO の Micro-TPHA に比較して鋭敏性において優れ（WHO 法，94.1%，改良法，98.1%）特に従来法との抗体価一致率では，19.4%から45.2%へと向上し良好な改良効果を示した．

東京都における1973年９月以降のインフルエンザの検査成績

伊藤忠彦，坂井富士子，藪内清，岩崎謙二，根津尚光：東京都衛生局学会誌，53，114，1974

1973年９月～74年１月に都内で発生したかぜ患者32集団についてウイルス分離試験ならびに血清試験を行い病因を究明した．

アデノウイルス感染を確認できたのは４集団で，その発生は９～12月にかけて都の周辺地区に多くみられた．インフルエンザA型ウイルス感染が確認できたのは３集団で，10～11月に同一区内に限定して発生した．検出ウイルスはいずれもA香港型であったが，抗原的に春以前の流行株と差があった．本期の主因ウイルスであったインフルエンザB型ウイルスの感染は19集団で確認され，10～１月に都内広汎に発生した．残り６集団の病因は明らかにすることができなかった．

BK（人由来パポーバ）ウイルスの赤血球凝集素について

田口文章，長木大三，岩崎謙二，矢野一好：ウイルス，24，3，41，1974

BKウイルスのHA素について検討を行った結果，一部既知ウイルスのHA素と似た性状をもつ反面，未知の性状を有することが判った．

HA素の産生は人由来の各細胞よりサル腎由来の Vero 細胞で良く，HA素は熱，酸，エーテル，凍結融解，超音波の処理に対し比較的安定である．人O型赤血球では希釈液の pH が8.0以下で，モルモット赤血球は pH 6.5以下で，ニワトリ赤血球は pH 6.0 以下で HA 陽性となる．pH 7.1 で人血球を用い HA 反応を行うと 37° では HA 陰性，25°，4° では陽性となるが HA 価は 4° のほうが高い．pH 7.2 でサル，ヒツジ，ハムスター，ラット，マウス，ガチョウの赤血球は凝集しなかった．pH 7.2 で人赤血球の HA に個人差がみられたが，pH 6.4 ではその差が小さくなる．トリプシン処理人血球の HA の個人差は無処理群に比べて小さい．BK ウイルスの HA は BK ウイルス抗血清により抑制されるが，ポリオーマおよび SV 40 両ウイルスの抗血清では抑制されない．

BK（人由来パポーバ）ウイルスの血清疫学的研究

田口文章，長木大三，斎藤充司，春山長治，岩崎謙二，矢野一好：ウイルス，24，3，41，1974

BKウイルスの本邦における浸淫状況を把握する目的で，血清疫学的調査を行った．

人血清中の normal inhibitor の力価は大部分32以下で，$K10_4$，アセトン処理により除去できるが，RDE，カオリン処理ではほとんど影響がなかった．1972～73年に採取した健康者血清510例の検索で，HI 価40以上の保有率をみると全年齢階層ともほぼ100％であったが，平均 HI 価は年齢上昇にともなって低下した．1958年に採取した成人血清の保有率は63.5％で1972～73年に比べ低率であった．兎，馬，豚の血清中にも HI 抗体はみとめられたが，山羊，マウス，ラット血清にはみとめられなかった．流産後および妊婦血清に 2ME 処理で HI 価の低下するものがあった．

東京都における1973年９月以降のインフルエンザの検索成績

坂井富士子，藪内清，伊藤忠彦，岩崎謙二，根津尚光：感染症雑誌，49，11，475，1974

1973年9月から74年3月にかけて都内で発生したインフルエンザ様集団かぜの中，38集団について病因を検索した．その結果，インフルエンザB型ウイルスによるもの20集団，A型ウイルスによるもの8集団，アデノウイルスによるもの5集団であった．

本期の流行はインフルエンザB型ウイルス（B73型）が主因であったが，その流行の中でA型ウイルス（香港型）の流行が局地的にみとめられたのは興味深い．アデノウイルス感染はインフルエンザB型ウイルスの流行と平行して長期間にわたってみられた．本期分離したA香港型インフルエンザウイルスは抗原的に従来の流行株と差があった．

1974年5月以降東京都に発生した集団かぜの検索成績特にその病因の多様性について

矢野一好，伊藤忠彦，柳澤靖子，藪内清，岩崎謙二：東京都衛生局学会誌，55，154，1975

1974年4月～75年2月に都内で発生した集団かぜ流行例中58集団について多面的な病因検索を行った．特にライノウイルスの病因的意義を検討した．

検索の結果，インフルエンザA型ウイルス感染を確認したのは30集団，同B型ウイルス感染は1集団，アデノウイルス感染は6集団，エコー5型ウイルス感染は2集団，病因を解明できなかったのは19集団であった．ライノウイルス感染を証明できたのは僅かに2名（1.0%）であった．インフルエンザA型ウイルス感染流行は2～4月と12～2月，同B型ウイルスは2月，アデノウイルスは5～12月，エコー5型ウイルスは7月と10月，病因不明は3～1月に発生した．

都民のライノウイルス（1A，2，13，14，30各型）中和抗体保有逐時変動調査結果から，1974年春に30型ウイルスの流行のあったことが推定された．ライノウイルスは軽症例で病因的意義をもつものではないだろうか．

化粧品中の特殊成分分析法に関する研究（第9報）ヘキサクロロフェンの薄層ならびにガスクロマトグラフィーによる定性および定量法

風間成孔，水石和子，中村義昭，原田裕文，戸谷哲也：衛生化学，20，248—255，1974

本報は化粧品，医薬部外品などに含有される殺菌剤ヘキサクロロフェン（以下G—11と略す）の定性ならびに定量法を目的とし，日本薬学会，衛生試験法香粧品試験法に上提，採用されたもので，その試験法について述べてある．

化粧品中の特殊成分としての殺菌剤の試験法はすでに衛生試験法にG—11およびビオチノールの硝酸銀による定性定量法が収載されており，またこのほかUV法，比色法があるが，これら従来法はいずれも単品ないしは単純な製剤についての定量に用いられるが，やや雑複な処方からなる製剤では試験溶液中にわずかに共存する脂肪酸や界面活性剤などによっても影響を受けやすく，あるいは感度，特異性などの点から実施困難な場合が多い．そこで著者らはベビーパウダー，クリーム，石けんなどの化粧品あるいは医薬部外品中のG—11の分離確認と定量法を確立するため，イオン交換体を用いる前処理の至適条件と薄層クロマトグラフィー，ガスクロマトグラフィーへの適用性について検討した．

1. DEAE—セルローズカラムにエタノール・ヘキサン（1：9）混液の液相中で交換吸着させたのち，アセトン，1N塩酸・アセトン混液，アセトンを順次流して溶出させる操作によってG—11を定量的に捕捉し，妨害物質を除くことができた．

2. DEAE—セルローズカラムを用いることによりG—11と同様に分離捕捉される殺菌剤，吸着あるいは溶離の不完全な殺菌剤を明らかにし，TLCを行ない，さらにFID，ECDガスクロマトグラフィーにより定性定量可能な条件を見出した．なお本法によるG—11の定量限界はFID，ECDでそれぞれ250 μg，1 μg/mlである．

微量ヒ素の原子吸光分析法

江波戸挙秀，天川映子，山野辺秀夫，鈴木助治，戸谷哲也：食衛誌，15（6），469—474，1974

原子吸光を用いたヒ素の定量法における試薬添加量，酸濃度，反応ビン容積，発生ガス圧力等の至適条件および障害物質について検討した．すなわち，20%ヨウ化カリウム1ml，20%塩化第一スズ0.5ml，亜鉛末1g，3.5N塩酸酸性，測定液量20ml，反応ビン容積100ml，発生ガス圧力0.5kg/cm^{2}である．障害物質としてSe^{4+}があり，Se^{4+}はヒ素の5倍量で障害した．亜鉛末添加方法は一般に亜鉛錠剤が用いられるが，錠剤製型に熟練を要し，また，錠剤添加直後からヒ化水素が発生し，ヒ素の損失も考慮されることから，オブラートに包んだ亜鉛末を用いることにより，操作の簡易化，さらに精度の向上も得られた．

低温細菌の検査法

春田三佐夫：モダンメディア，20，273，1974

近時，コールドチェーンシステムの普及は食品を長期にわたって低温に保持する技術を可能にし，食品の品質低下，衛生上の危害の発生を阻止するうえで多くの利益をもたらしつつある．ところが，冷凍食品は別として，冷蔵の場合は，10°以下はもちろん，0°でも発育可能とされている低温細菌（psychrotrophic bacteria）の存在が注目され，それらの細菌の発育増殖にともなう低温保存食品の品質劣化が重要視されるにいたった．そこで，生鮮食品，主として乳肉食品を対象に低温細菌の概念に触れ，さらにその検査法について解説を試みた．

Agar stamp 法による黄色ブドウ球菌ならびに腸炎ビブリオの検出試験

松本昌雄，神保勝彦，梅木富士郎，小久保弥太郎，春田三佐夫：昭和48年度食品衛生調査研究報告書（1974）

Baird—Parker 培地ならびに TCBS 培地を使用するアガースタンプ法の性能ならびに応用性について，従来の拭き取り法との比較検討を試み，その結果としてこの種の方法そのものは多少グローブなものではあるが，衛生管理上の尺度として実用面で十分利用しうるものと認められた．本研究は原生科学研究費の一部補助を得て実施したものである．

生乳の細菌数の簡易測定法に関する研究

春田三佐夫，松本昌雄，神保勝彦（都衛研），武原文三郎，金子精一（神奈川衛研），渡辺昭宜，徳丸雅一，池内倶子（埼玉衛研）：昭和49年度厚生科学研究報告書（1975）

本研究は厚生科学研究補助費のもとに，都衛研，神奈川衛研，埼玉衛研3者協同で実施したものである．春田は主任研究者として全般を総括し，かつ松本らと協力，硝酸塩還元法の追試検討ならびに補酵素（ＡＴＰ，ニコチン酸アミド）の使用によるレサズリン還元法の迅速化の検討を，武原は金子の協力のもとにブリード直接鏡検計数法につき統計学的手法による精度の検討とその迅速化について，渡辺は徳丸らの協力を得てレサズリン還元法の迅速化，実施温度の改良などにつき，それぞれ生乳を試料として基礎的検討を試みた．

凍結豚肉より分離した低温発育細菌の発育温度特性

小久保弥太郎：食衛誌，15（3），188—194，1974

食肉を汚染する低温発育細菌の発育温度特性を知る目的で，振とう温度勾配培養法により，数種の凍結豚肉分離菌株といわゆる中温細菌を含む既知の菌株について，0°から5°間隔で50°までの各温度における発育状態を比較検討した．

その結果，分離菌株はいずれも0～30°で発育し，25～30°で発育が最も良かった．また，既知菌株は，分離菌株より低温での発育が劣り，中温細菌ではこの傾向が顕著であった．なお，概して *Pseudomonas* は，他の菌属より低温での発育が優れ，発育温度幅も広かった．

1971～1974年における牛乳，母乳中の残留有機塩素系農薬レベルの推移について

山岸達典，堀井昭三，境野米子，竹葉和江，森本キミ：東京都衛生局学会誌，54，58—59，1974

試料の市販牛乳は1970年10月から'74年6月までの期間に都内およびその近県の原乳処理工場，販売店から毎月検体を採取し，計230例を対象にした．母乳は都内のＢ，Ｋ，ＮおよびＴ産院の産婦から出産後一週間以内の泌乳，計111名を対象にして，1971年1月から'74年8月までの期間に一定間隔で調査を実施した．なお，試料中の有機塩素剤の分析はＡ．Ｏ．Ａ．Ｃ．法に準じて行った．

その結果，牛乳中の残留農薬濃度の年次的な変化は，経過年数にともない BHC，DDT などの濃度が減少し，これらの濃度と経過年数との間に負の相関を示した．すなわち，総 BHC で例示すると，1971年の平均値は1.06 ppm（脂肪あたり）であったが，'72年では低く 0.31 ppm，'73年では 0.22ppm とさらに低下し，各年次の減少率は約72％であった．

一方，母乳中の残留農薬濃度は，総 BHC，総 DDT の年次的な変化が認められない．すなわち，総 BHC 濃度は1971年2.56ppm，'72年1.92ppm，'73年2.85ppm および'74年2.16ppm に推移し，この場合の濃度と経過年数との相関関係が極めて低く，母乳中の総 BHC 量が減少する傾向にあるとは認め難い．また，総 DDT の場合も上述の BHC と同様な傾向にあるといえる．

原子吸光法による食品中のジメチルポリシロキサンの定量法について

西島基弘，冠政光，高橋尚子，上村尚，中里光男，木村康夫：食衛誌，16（2），110—115，1975

原子吸光法による食品中のジメチルポリシロキサン（DMPS）の定量法を検討した．食用油中の DMPS はあらかじめ −70°に保持したセルロースカラムを用いて n-ヘキサンで分離し，さらに活性炭カラムでクリーンアップを行い試料とした．その他の食品の場合はエチルエーテルで抽出した後，活性炭カラムのみでクリーンアップを行い試料とし，定量を行った．食品からの添加回収率は95.0～100.4％であった．なお，市販食品9種類に

ついて本誌を応用したところ，5種類の食品からジメチルポリシロキサンが検出された．

かん詰開かん時に生ずる金属屑について

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：東京都衛生局学会誌，54，54—55，1974

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. かんの上部の巻〆部の外側を切るかん切以外はすべて切り屑が食品中に落下し，その量は 0.1～12mg であり，長さは痕跡～1 cm であった．
2. 切り屑を人工胃液，人工腸液に投入して 37° で3時間攪拌したものの金属の溶出率は人工胃液ではスズ0.35%，鉄5.10%であり，他の金属は検出されなかった．人工腸液ではスズ0.06%，鉄0.47%であり，他の金属は検出されなかった．
3. 消化器系の障害を見るためラットを用いて急性毒性試験をおこなった結果，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，ほとんど差は見られなかった．

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，又，切り屑の量から考えて特に問題となると思われない．しかし，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．又，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避けなければならない．そこで日本缶詰協会，その他関連協会等に本研究をもとに勧告，指導をおこなった結果，通産省は消費生活用製品安全に基くSGマーク（かん切の認定基準及び基準確認方法）を設定した．

食器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：東京都衛生局学会誌，54，60—61，1974

飲食器の洗浄に使用された洗剤の残留について，食器の材質別（メラミン樹脂，ポリプロピレン，陶磁器），洗剤液の濃度，浸漬時間及びすすぎ条件を変えて残留量を実験調査した結果，残留量に影響をもつ要因としては，すすぎ方が最も重要であることが判明した．

また，学校，病院，給食センター，飲食店等で使用されている食器133検体について洗剤の残留を実態調査した結果を報告した．

市販食品用洗浄剤の成分分析に関する研究

遠藤英美，半田八十三，広門雅子，宇佐美博幸，藤居瑛：東京都衛生局学会誌，55，48—49，1975

昭和48年6月から10月の間に都内で購入した台所用洗剤7社の製品11種について成分分析を行い，界面活性剤相当分，エタノール可溶分，アニオン界面活性剤，せっけん相当分，非イオン界面活性剤，尿素について測定した結果を発表した．

食品添加物 d-ソルビットおよび d-ソルビット液の液性について

遠藤英美，宇佐美博幸，半田八十三，広門雅子，藤居瑛：東京都衛生局学会誌，55，54—55，1975

食品添加物 d-ソルビットの粉末10種，ソルビット液20種について pH を測定したところ，ほとんどが酸性を呈しており，その酸性度は液よりも末の方が高い傾向にあり，粉末の方が空気接触面積が広いために空気酸化を受け易く有機酸を生成していることが推定される．

ポルフィリン代謝系尿中成分の統計的観察

武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公：東京都衛生局学会誌，53，66，1974

ポルフィリン代謝系成分であるδ-アミノレブリン酸，コプロポルフィリンおよびこの代謝系の終産物であるウロビリノーゲンの尿中排泄水準と異常値出現状況を，東京都住民男711名，女950名についてしらべた．性別，年齢層別にF分布の公式に従い危険率1%水準における異常値棄却を行い，平均値と標準偏差を求めた．

東京都住民の尿中 δ-アミノレブリン酸量は男 2.15±0.91 mg/l，女 1.88±0.80 mg/l で男が高値を示し，高齢に従って低値になる．尿中コプロポルフィリン量は男 69.5±35.7μg/l で男が高値であり，高齢に従って減少する傾向であった．

異常値の出現状況については尿中δ-アミノレブリン酸が約3%の出現であり，女が高率であった．尿中コプロポルフィリンおよびウロビリノーゲンは尿中δ-アミノレブリン酸の2～3倍の異常値の出現であった．

食品中のヘキサクロルベンゼンについて

森田昌敏，牛尾房雄，西沢恒幸，深野駿一，道口正雄，三村秀一：食衛誌，16 (1)，53，1975

食品中のヘキサクロルベンゼン（HCB）の分析を行った結果，HCB はほとんど総ての食品から検出され，広範囲に存在する汚染物質であることが判明した．HCB の残留レベルは比較的低く，1日摂取量は 0.7 μg 程度であった．この値は WHO の勧告値 36μg（60kg の体

重として）よりも十分低いが，将来にわたり調査を継続する必要があると考えられる．

Residue Levels of Polychlorinated Terphenyls, Polychlorinated Biphenyls and DDT in Human Blood

M. Doguchi and S. Fukano : *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 13(1), 57-63, 1975

Subjected to the analysis were 27 samples of human blood offered by the volunteers, 19 males and 8 females from 21 to 57 years old, in Tokyo metropolitan Research Laboratory of Public Health in November 1973. The average concentrations of PCTs, PCBs and DDT were 5.0ppb (0.7-19.6ppb), 3.2 ppb (1.9-5.8 ppb) and 11.2 ppb (3.2-19.6 ppb), respectively. PCTs were confirmed by mass spectroscopy coupled with gas chromatgraphy. It is of interest that the level of PCT residues is higher than that of PCBs, while industrial out put of PCBs far surpasses that of PCTs.

Phthalic Acid Esters in Water

M. Morita, H. Nakamura and S. Mimura : *Water Res.* 8, 781, 1974

Two phthalic acid esters, di (n-ethylhexyl) phthalate and di (n-butyl) phthalate, were surveyed in the river water, well water and city water of Tokyo metropolitan area. In the river water these esters were found in the range of 0.4-6.8 $\mu g/l$. The concentration was low in the upper reaches of the stream but increased downstream, giving no seasonal variation. The esters were not found in the well water examined. In the household tap water they were contained in the range of 1.2-3.3 $\mu g/l$ while in the raw water of water supply they were contained in the range of 1.9-8.2$\mu g/l$. Results of jar test revealed that these esters were efficiently removed from water by using activated carbon of alminium sulphate.

Paradichlorobenzene in Human Adipose Tissue and Blood

M. Morita and G. Ohi : *Environ. Pollut.* 8, 269, 1975

Paradichlorobenzene, a chemical agent extensively used as a moth repelant and as a deodourant, was found to be present in all thirty four adipose tissues and six blood samples taken from the residents in Tokyo Metropolitan area. This substance was also recovered from the ambient air samples in the center part as well as in the surburb of Tokyo. The level of p-dichlorobenzene in the fat was approximately equal to that of polychlorinated biphenyls (PCBs) which were determined with some of the same samples, and the concentration in the blood was three times higher than PCBs. Our report calls for further investigation on the scope of the environmental pollution by p-dichlorobenzene and on the combined biological effects with other pollutants.

室内環境における空気性状について：昭和48年度に実施した調査を中心として

佐藤泰仁，青木実，溝口勲：東京衛生局学会誌，55，60—61，1975

昭和45年に，いわゆる「ビル管理法」が施行され，人間の居住空間の衛生状態について関心がもたれている．今回，昭和48年度の調査結果を中心に解析を行なうとともに，法律施行以前の結果との関係についても検討を行なった．現状におけるビル環境の実態は，機械換気空調を行なっていれば，問題となる項目はない．そしてビル環境の温熱条件は夏，冬とも同じような性状になりつつあり，これには冬の換気量の不足による室内温度の上昇も考えられる．更に快適度の点から，室内気流の増加に留意すべきである．今後，事務機器の普及による新たな室内汚染が問題となろう．

光化学スモッグによる自覚症調査について

牧野国義，溝口勲：日本公衆衛生雑誌，22 (8)，440，1975

17種に分類した自覚症について行なった1年間（昭和47年7月～48年6月）のアンケート調査に基づいて，各自覚症と汚染質との関係を検討した．そして各症状の訴症が光化学スモッグを関係するか否かを統計的手法を用いて検討した．さらに光化学スモッグの指標をスモッグ生成の機序からでなくスモッグによる被害症状の面から設定すべく検討した．

母親と新生児における水銀の蓄積と相互関係

二島太一郎，池田真悟，多田宇広，野牛弘，溝口勲，長崎護，上条宏，中島達也：東京都衛生局学会誌，55，62—63，1975

一連の水銀による人体影響の疫学的研究を進めるなかで，表記の課題についてその実態把握と，現行の環境施策の評価のための基礎資料を提供することを意図した．

被検者は昭和49年7月～8月にかけて都立築地産院で正常分娩した母親50名と，その新生児50名（男子24名，女子26名）で，母親からは頭髪及び静脈血液（母体血液と略記），新生児からは頭髪及び臍帯静脈血液（新生児血液と略記）を採取し，それぞれについて総水銀量及びメチル水銀量を測定した．新生児血液の総水銀量（2.5 μg/100g）とメチル水銀量（1.3μg/100g）の平均値は，母体血液の総水銀量（1.4μg/100g）とメチル水銀量(0.6 μg/100g）に比較して約2倍高値を示した．このことは経口的に母親から摂取された水銀が，胎盤を通過して胎児に移行濃縮することを明らかにしている．また両者には，母体血液中水銀量が高くなれば，それにともなって新生児血液中の水銀量は母親のそれを上まわって高くなる相互関係にあることを明らかにした．頭髪は，新生児の総水銀量3.8ppm，メチル水銀量2.4ppmに対して，母親の総水銀量4.7ppm，メチル水銀量2.6ppmと血液とは逆に新生児が低い傾向にあった．このことは，血液に取込まれた水銀は，排泄経路としての頭髪へ胎児期移行しにくいことを示している．したがって胎児へ取込まれた水銀は，排泄とのバランスがくずれ高濃度に血液中に存在するものと考える．新生児のメチル水銀に対する感受性が成人より極めて高いことを考えるとき，最も影響の大きい妊産婦，乳幼児に対する詳細な食生活指導基準の作成こそ，現状を直視する時必要不可欠の対策であろう．

オゾンによる液性免疫機構への影響

瀬戸博：医学のあゆみ，94，250，1975

マウスを用いて，オゾン暴露による液性免液機構への影響を調べた．その結果，抗原（ヒツジ赤血球）接種24時間前のオゾン暴露では影響を受けないが，抗原接種後一定時間内に暴露すると，0.5ppm程度の濃度でも脾中抗体産生細胞の産生は有意に抑制された．この理由について考察を加えた．

Recent Progress in the Studies of Lead Poisoning (Review)

O. Wada, and G. Ohi : *Reviews on Environ. Health.*, 1, 77-110, 1972

Review of recent progress in the studies of lead poisoning with special references on subtle toxicic manifestations and long term sequale of subclinical poisoning caused by this substance.

The Pigeon, a Sensor of Lead Pollution

G. Ohi, H. Seki, K. Akiyama and H. Yagyu : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 92-98, 1974

Determination of lead levels of the blood, femur and kidney and aminolevulinic acid dehydratase 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.

Polychlorinated Biphenyl Residues in Maternal and Cord Blood in Tokyo Metropolitan Area

K. Akiyama, G. Ohi, K. Fujitani, H. Yagyu, M. Ogino and S. Kawana : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14 (5), in press, 1975

PCB levels were determined with maternal and cord blood sampled at the time of delivery. All of the twentyfour mothers selected for this experiment are residents of Tokyo Metropolitan area. Gas chromatographic patterns of PCBs in cord blood closely resembled those of mothers. The cord blood in general showed lower PCB levels on both whole and fat basis than those in the maternal blood. No correlation was noticeable on statistical basis as regards the concentration of PCBs between the cord and maternal blood. Our data suggests that the placenta permits rather indiscriminate transmission of the organochlorine compounds of closely related chemical structure.

Protective Effect of Selenite Against Methylmercury Toxicity : Observations Concerning Time, Dose and Route Factors in the Development of Selenium Attenuation

G. Ohi, H. Seki and H. Yagyu : *Indust. Health*, 13 (3), 1975

Protective effect of selenite against methylmercury toxicity was observed in experimentally in-

duced acute and subacute methylmercury poisoning of rats. The protection becomes more evident as the acuteness of methylmercury poisoning decreases in terms of the total methylmercury dosage administered and the number of survival days after the last dosing, and there appears to be present an optimal dose relationship between the two substances. Protective effect of selenium is likewise clear in subacute methylmercury poisoning in regard to growth rate, incidence of neurological signs and mortality. We did not observe any differences in the protection when administration route was changed.

Interaction of Dietary Methylmercury and Selenium on Accumulation and Retention of These Substances in Rat Organs

G. Ohi, S. Nishigaki, H. Seki, Y. Tamura, T.Maki, H. Maeda, S. Ochiai, H. Yamada, Y. Shimamura, and H. Yagyu : *Toxicol. Appl. Pharmaco.* 32, 527—533, 1975

Four groups of male Wister rats were fed the following regimen for 40 days : 1) 20ppm methylmercury chloride (MMC), 2) 20ppm MMC+3 ppm sodium selenite, 3) 3ppm sodium selenite, 4) basal diet. The basal diet which contained 0.4ppm "organic selenium" originating mainly from fish meal and wheat was resumed on day 41. Protective effect of selenite over toxicity of methylmercury was observed in terms of both growth rate and morbidity.

Levels of total mercury, methylmercury and selenium were determined on days 0, 20, 41, 47, 54 and 61 as to the brain, liver, kidney and blood. It was noted that methylmercury increased accumulation of selenium in all the organs analyzed while selenium retention varied according to the type of selenium and the organs. Modification by selenite, despite its protective effect, remained equivocal in regard to the organ accumulation of mercury and retention therein.

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

春　田　三佐夫　（委員長）
飯　田　　基
坂　井　千　三
西　川　洋　一
野　牛　　弘
平　賀　興　吾

昭和51年1月10日　発行

規格表　第2類
印刷番号(50)1472
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第26-1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）