東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT

OF

TOKYO METROPOLITAN RESEARCH

LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

27-1

1976

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

序

編集委員諸氏および関係者の格段の努力と奉仕によって，ここに研究年報第27号をまとめることができました．

本年報は主に昨年度中に終了した研究成果および第26号発刊後最近までの間に他の専門雑誌に掲載した論文等を収めたものであります．今回も第26号の場合と同様，毒性部で実施した研究論文は第27-2号にまとめてのせることにしました．

当所の研究年報をその創刊号から通覧してみますと，感慨無量なものを感じます．終戦後の挫折，混乱，貧困の時代から今日の繁栄時代までの社会現象の変化，特に経済の高度成長に伴って発生した環境汚染問題や研究者，研究施設および研究費の充足状態の移り変り等を反映して，研究課題名およびその量と質の変遷を見逃すことはできません．正に隔世の感があります．

研究の課題，その質と量の変化とともに，それに対する評価もいろいろであろうと思いますが，どの時代にも，所員は則応して，一生懸命業務を遂行してきたことは変らない事実であります．

最近基礎医学の研究のあり方に関して，疾病の予防と治療という医学の指向する目的を忘れた研究に対する反省の声がきかれるようになりましたが，公衆衛生行政の科学的バックボーンとして責任の一端を担うわれわれは，住民の生命と健康を守るという基本的姿勢と目標を忘れてはならないと思います．

この研究年報には毒性部門を合せ113題の研究が報告されていますが，これらの研究報告に対する学術的および社会的批判を，われわれは謙虚に受け，それを更に将来発展への糧といたしたいと願っております．忌憚のない御意見，御叱正をいただければ誠に幸であります．

1976年（昭和51年）7月15日

東京都立衛生研究所長　辺野喜　正　夫

目　　次

報　　文

黄色ブドウ球菌の新抗原型コアグラーゼⅧ型の同定
……潮田　弘，寺山　武，新垣正夫，坂井千三，善養寺　浩…… 1
アフィニティークロマトグラフィーによる抗ブドウ球菌エンテロトキシン血清の精製
……寺山　武，山田澄夫，稲葉美佐子，五十嵐英夫，潮田　弘，坂井千三，善養寺　浩…… 5
Escherichia coli O 159：H20 によると推定された6事例の集団下痢症について
……坂井千三，丸山　務，伊藤　武，甲斐明美，柳川義勢，善養寺　浩……10
最近10年間に東京都内に発生したサルモネラ食中毒の疫学および細菌学的検討
……坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斎藤香彦，善養寺　浩，辺野喜正夫……16
培養 Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞コロニー法による大腸菌易熱性エンテロトキシンの検出
……工藤泰雄，松下　秀，善養寺　浩，坂井千三……24
最近10年間（1966年～1975年）の東京都内における赤痢集団発生および健康保菌者の細菌学的，疫学的検討……善養寺　浩，太田建爾，田島光三，津野正朗，工藤泰雄，坂井千三……29
本邦食品の糸状菌汚染に関する研究　市販煮干しの糸状菌汚染
……一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺　浩，辺野喜正夫……36
都民成人の Antistreptolysin O について……加納堯子，村田以和夫，大久保暢夫……41
Antistreptolysin O の簡易検査法の検討 ……加納堯子，村田以和夫，大久保暢夫……45
1975年に猩紅熱患者から検出された A 群溶血レンサ球菌の薬剤感受性
……柏木義勝，柴田　実，徳江シゲ子，浅野洋子，大久保暢夫……49
腸内ウイルス感染の実態は握（第8報）　1975年の東京都内3下水処理場下水からのウイルス分離試験成績……藪内　清，矢野一好，柴田タツ美，岩崎謙二，辺野喜正夫……54
1975年秋以降の東京都内におけるインフルエンザ流行のウイルス学的，疫学的調査
……岩崎謙二，伊藤忠彦，山崎　清，吉田靖子，横山庸子……58
1975年における都民の風疹ＨＩ抗体保有調査……吉田靖子，横山庸子，岩崎謙二……63
1975年度東京都の日本脳炎疫学的調査
……吉田靖子，藪内　清，横山庸子，岩崎謙二，木下正彦，永野清一郎，加藤孝雄……66
東京都民におけるパポーバ（ＢＫ）ウイルスＨＩ抗体保有状況の年次推移（1965～1974年）
……矢野一好，藪内　清，岩崎謙二，田口文章……71
A 香港型インフルエンザウイルスのＨＡ抗原分析とＨＡ抗原変異機作に関する試論
……岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子，山崎　清，横山庸子……74
紫外線照射によるポリオウイルスの不活化……矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二，辺野喜正夫……77
窒素通気法による亜硫酸の定量について……松本　茂，中山京子，奥沢昌子，遠藤美佐子……80
市販医療用医薬品の品質について（Ⅳ）　塩酸メクロフェノキセート錠
……重岡捨身，宮武ノリエ，上原真一，田窪栄一……85
市販医療用医薬品の品質について（Ⅴ）　システイン注射薬
……重岡捨身，田窪栄一，上原真一，宮武ノリエ……88
メッキ排水中の有害性重金属の定量
……吉原武俊，奥本千代美，寺島　潔，長嶋真知子，遠山逸雄，西川洋一，松本　茂……91
有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究（Ⅲ）　繊維製品中の有機塩素系防虫剤（ディルドリン）の定量法……吉原武俊，遠山逸雄，寺島　潔，奥本千代美，長嶋真知子，西川洋一……96
魚介類中のフタル酸エステルのガスクロマトグラフィーによる微量定量法
……植田忠彦，山添律子，森　謙一郎，鈴木助治，西田茂一，戸谷哲也…… 100
香料成分の分析に関する研究（第1報）　食品中のバニリン，クマリンのガスクロマトグラフィーによる定量法……観　照雄，鎌田国広，森　謙一郎，中村義昭，植田忠彦，戸谷哲也…… 106
香料成分の分析に関する研究（第2報）　食品中のバニリン，クマリンの高速液体クロマトグラフィーによる定量法……鎌田国広，観　照雄，山野辺秀夫，水石和子，山添律子，戸谷哲也…… 112
市販口紅およびネイルエナメル中の色素の調査について
……水石和子，風間成孔，中村義昭，山崎清子，西田茂一，戸谷哲也…… 118
東京都における水銀汚染の実態について（第3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，江波戸擧秀，原田裕文，戸谷哲也，松本　茂…… 122
微量アンチモンの原子吸光分析法……伊藤弘一，江波戸擧秀，竹内正博，雨宮　敬，原田裕文，戸谷哲也…… 126

東京都におけるＰＣＢ汚染の実態について（第４報）　食品中のＰＣＢ含有量について
……鈴木助治，山崎清子，山野辺秀夫，小泉清太郎，戸谷哲也，松本　茂…… 132
動物性食品中のウェルシュ菌分布……神崎政子，小久保彌太郎，神保勝彦，村上　一，春田三佐夫…… 136
貝類の損傷腸炎ビブリオの検出法……松本昌雄，神保勝彦，村上文子，神崎政子，村上　一，春田三佐夫…… 141
乳酸菌飲料におけるソルビン酸の再検討
……松本昌雄，神保勝彦，竹葉和江，村上文子，村上　一，春田三佐夫…… 146
東京都の野犬およびヒトの抗-*Brucella canis* 抗体保有状況
……梅木富士郎，田中豊隆，早野　剛，木村久一郎，金子誠二，
西尾秀規，村田光明，高島利幸，奥沢康司，三木　博…… 149
食品中のマイコトキシンに関する研究（第７報）　ベビー用ドライミルク中のアフラトキシン M_1 の試
験法……斎藤和夫，小川仁志，風間栄治，観　公子，井部明広，直井家寿太，木村康夫…… 153
食品中の石油系炭化水素に関する研究（第１報）　市販魚類中から n-Paraffin の検出
……小川仁志，井部明広，風間栄治，斎藤和夫，観　公子，直井家寿太，木村康夫…… 158
食用油脂の変質に関する研究（第１報）　変質に及ぼす要因
……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…… 164
食用油脂の変質に関する研究（第２報）　市販油脂食品の変質度の実態調査
……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…… 171
フッ素の衛生学的研究（第３報）　各種食品中のフッ素含有量の分析および食餌からのフッ素摂取量の
評価……友松俊夫，鈴木二郎，中沢久美子，木村康夫…… 174
メチル水銀の胎盤透過に及ぼすセレナイトの影響（ラットの臓器蓄積パターンにみられる変化）
……田村行弘，大井　玄，真木俊夫，関　比呂伸，嶋村保洋，
今野ヒロ子，落合節子，湯目邦雄，西垣　進，木村康夫…… 179
調味料製剤に関する分析法……広門雅子，宇佐美博幸，中嶋　巌，遠藤英美…… 185
カルシウム製剤の成分規格　カルシウムの定量に対する共存物質の影響
……荻野周三，安野哲子，小野綾子，大畠敏子，遠藤英美…… 190
塩化ビニル樹脂製品の残留塩化ビニルモノマーとその食品への移行（第Ⅰ報）　昭和50年度都内におけ
る市販品の実態調査……渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，藤居　瑛，遠藤英美…… 194
塩化ビニル樹脂製品の残留塩化ビニルモノマーとその食品への移行（第Ⅱ報）　材質より各種液状食品
への移行……佐藤憲一，渡辺悠二，吉田令子，藤居　瑛，遠藤英美…… 199
市販醸造酢の“真がん性”について……深野駿一，牛尾房雄，西田甲子，道口正雄，可児利朗…… 203
日本食品標準成分値の検討（Ⅱ）　みそ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…… 207
重金属類にかわって H_2O_2 を使用するケルダール法
……友成正臣，塚越ヤス，古内正孝，武士俣邦雄，可児利朗…… 210
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Ⅱ報）　コプロポルフィリンの尿中
排泄の実態……小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子…… 213
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Ⅲ報）　尿中異常陽性成分の出現と
尿中排泄 δ-アミノレブリン酸の関係 ……小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子…… 219
中学生を対象とした尿中ポルフィリン代謝系成分の地域的比較検討
……武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公…… 223
大気中浮遊粉塵のＥＤＸによる組成分析（第２報）……佐藤泰仁，溝口　勲…… 229
病院調剤室における薬塵調査について……佐藤泰仁，青木　実，溝口　勲…… 235
大気中における塩素系炭化水素の挙動……多田宇宏，太田与洋，溝口　勲…… 242
大気中ハロゲン化炭化水素測定への Gas Phase Coulometry の応用……瀬戸　博，秋山和幸，溝口　勲…… 247
東京都における大気中有機フッ素化合物の測定　(1)トリクロロフルオロメタン
……瀬戸　博，秋山和幸，溝口　勲…… 251
生体試料における水銀濃度の年代的推移
……二島太一郎，池田真悟，野牛　弘，溝口　勲，寺井　稔，戸村健児…… 254
人における血液と毛髪中の総水銀およびメチル水銀濃度とその相互関係
……二島太一郎，池田真悟，多田宇宏，野牛　弘，溝口　勲…… 258
都内興行場で集められたゴミの中のダニ，昆虫相　第２報……中田英吉，吉川　翠…… 264
光化学スモッグの涙液リゾチーム，および pH への影響……福田雅夫，大沢誠喜，岡和田紀昭，溝口　勲…… 270
大気汚染物質と急性自覚症状との関連性（第一報）　各々の特質と基礎的統計的解析
……牧野国義，溝口　勲，沖野哲郎，山本幹夫…… 274

大気汚染物質と急性自覚症状との関連性（第二報）　多変量解析による検討
……牧野国義，溝口　勲，沖野哲郎，山本幹夫…… 280
東京都区内の大気汚染物質分布のコンピュータ解析……牧野国義…… 287
サーモフォーム加温時に発生する気体の分析……太田与洋，溝口　勲…… 293
尾の旋回と軀幹のスリヨセ現象　ラットのメチル水銀中毒における早期神経症状
……関　比呂伸，湯目邦雄，大沢誠喜，今野ヒロ子，蓑輪佳子，野牛　弘，大井　玄…… 295
ラットのメチル水銀中毒における亜セレン酸ナトリウムとチオラ（2-mercaptopropionyl glycine）の
臨床的効果の比較……今野ヒロ子，関　比呂伸，蓑輪佳子，湯目邦雄，野牛　弘，大井　玄…… 297
都市環境中における突然変異誘起物質の検出
……蓑輪佳子，松下　秀，工藤泰雄，善養寺　浩，大沢誠喜，野牛　弘，大井　玄…… 300
メチル水銀のラット臓器別半減期の試算（その２）
……野牛　弘，大井　玄，関　比呂伸，西垣　進，田村行弘，久保田憲太郎…… 303
飲料水の安全性に関する研究　第１報　水中の蛍光物質について……森田昌敏，三村秀一…… 308
水道水の塩素処理により生じる悪臭物質……大橋則雄，森田昌敏，三村秀一…… 312
ＰＣＢおよびカネミライスオイル中のポリ塩素化ジベンゾフラン
……中川順一，森田昌敏，秋山和幸，樋口育子，三村秀一…… 316
水中のフタル酸エステルの塩素化……高橋保雄，森田昌敏，山崎堅吉，三村秀一…… 321
水中微量アクリルアミドの定量法……中村　弘，三村秀一…… 326
陸水中の微量オルトリン酸の分析法……岡本　寛，土屋悦輝，山崎堅吉，三村秀一…… 332
イソシアヌール酸添加による残留塩素の持続効果と殺菌力について
……笹野英雄，池島伸至，押田裕子，栃本　博，菊地洋子，神　真知子，原田裕文，黒田静夫…… 335
下水道未整備地域の水質汚染について（第Ⅰ報）
……栃本　博，笹野英雄，池島伸至，押田裕子，菊地洋子，黒田静夫，原田裕文…… 342
Plesiomonas shigelloides の生態学的研究　2　健康人および各種動物における本菌保菌状況
……池島伸至，新井輝義，楠　　淳，神　真知子，伊藤　武，坂井千三…… 350

他誌発表…… 355

学会発表…… 367

CONTENTS

REPORTS

Identification of a New Antigenic Type of Staphylococcal Coagulase, Coagulase Type VIII
..... H. Ushioda, T. Terayama, M. Shingaki, S. Sakai and H. Zen-Yoji..... 1
Purification of Anti-Staphylococcal Enterotoxin Antiserum by Affinity Chromatography
.....T. Terayama, S. Yamada, M. Inaba, H. Igarashi, H. Ushioda, S. Sakai and H. Zen-Yoji..... 5
Six Outbreaks of Acute Enteritis Due to the Infection of *Escherichia coli* O159: H 20
..... S. Sakai, T. Maruyama, T. Itoh, A. Kai, Y. Yanagawa and H. Zen-Yoji.....10
Epidemiological and Bacteriological Surveys on the Salmonella Food Poisoning in Tokyo during the Last Decade
..... S. Sakai, T. Itoh, T. Maruyama, K. Saito, H. Zen-Yoji and M. Benoki.....16
Detection of Heat-labile *Escherichia coli* Enterotoxin by a Method of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cell Colony..... Y. Kudoh, S. Matsushita, H. Zen-Yoji and S. Sakai.....24
Bacteriological and Epidemiological Surveys on the Healthy Carriers of *Shigella* and Outbreaks of Shigellosis in Tokyo, 1966–1975
..... H. Zen-Yoji, K. Ohta, M. Tajima, M. Tsuno, Y. Kudoh and S. Sakai.....29
Studies on Fungal Contamination of Foodstuffs in Japan: Fungal Flora on Dried Small Sardines marketing in Tokyo
..... H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai, H. Zen-Yoji and M. Benoki.....36
Incidence of Antistreptolysin O Antibody on Healthy Adult Tokyoites
.....T. Kanoh, I. Murata and N. Ohkubo.....41
Evaluation of New Reagents for Qualitative ASO Slide Agglutination Test
.....T. Kanoh, I. Murata and N. Ohkubo.....45
Antibiotic Sensitivities of *Streptococcus pyogenes* Derived from Scarlet Fever Patients in 1975
..... Y. Kashiwagi, M. Shibata, S. Tokue, Y. Asano and N. Ohkubo.....49
Epidemiological Survey on Enterovirus Infection (VIII) Virus Isolation made at Three Sewage Treatment Plants in Tokyo in 1975
..... K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, K. Iwasaki and M. Benoki.....54
Virological and Epidemiological Observations on the Prevalence of Influenza in Tokyo in the Period from November 1975 to March 1976
..... K. Iwasaki, T. Ito, K. Yamazaki, Y. Yoshida and Y. Yokoyama.....58
Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants in Tokyo in 1975
..... Y. Yoshida, Y. Yokoyama and K. Iwasaki.....63
Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis Virus in Tokyo in 1975
..... Y. Yoshida, K. Yabuuchi, Y. Yokoyama, K. Iwasaki, M. Kinoshita, S. Nagano and T. Kato.....66
Seroepidemiological Survey on a New Papova (BK) Virus Infections in Tokyo, 1965–1974
.....K. Yano, K. Yabuuchi, K. Iwasaki and F. Taguchi.....71
Antigenic Analysis of Influenza A Hong Kong Type Viruses and a Proposal on Possible Mechanisms of their Antigenic Variations
..... K. Iwasaki, T. Ito, Y. Yoshida, K. Yamazaki and Y. Yokoyama.....74
Inactivation of Type 1 Poliomyelitis Virus by UV Irradiation
..... K. Yano, K. Yabuuchi, T. Shibata, K. Iwasaki and M. Benoki.....77
The Determination of Sulfurous Acid by Means of Nitrogen Through-flow Method
..... S. Matsumoto, K. Nakayama, A. Okusawa and M. Endo.....80
Quality Check of Drugs (IV) Meclofenoxate Hydrochloride Tablets
.....S. Shigeoka, N. Miyatake, S. Uehara and E. Takubo.....85
Quality Check of Drugs (V) Cystein Injections
.....S. Shigeoka, E. Takubo, S. Uehara and N. Miyatake.....88
Determination of Harmful Heavy Metals in Plating Waste Waters
..... T. Yoshihara, C. Okumoto, K. Terashima, M. Nagashima, I. Toyama, Y. Nishikawa and S. Matsumoto 91

Studies on Examination Method of Household-necessities Containing Poisonous Chemical Substances (III) Determination of Organochlorine Insecticide (Dieldrin) in Textile Products ..... T. Yoshihara, I. Toyama, K. Terashima, C. Okumoto, M. Nagashima and Y. Nishikawa 96

Gas Chromatographic Determination of Low Levels of Phthalic Acid Esters in Fish ..... T. Ueta, R. Yamazoe, K. Mori, S. Suzuki, S. Nishida and T. Totani 100

Studies on the Analysis of Perfume Constituent (I) Gas-Liquid Chromatographic Quantitative Determination of Vanillin and Coumarin in Foods ..... T. Kan, K. Kamata, K. Mori, Y. Nakamura, T. Ueta and T. Totani 106

Studies on the Analysis of Perfume Constituent (II) High Speed Liquid Chromatographic Quantitative Determination of Vanillin and Coumarin in Foods ..... K. Kamata, T. Kan, H. Yamanobe, K. Mizuishi, R. Yamazoe and T. Totani 112

Coal-tar Dyes in Lipsticks and Nail Enamels ..... K. Mizuishi, M. Kazama, Y. Nakamura, K. Yamazaki, S. Nishida and T. Totani 118

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (III) Mercury Content of Fish and Shellfish ..... T. Amemiya, M. Takeuchi, K. Ito, K. Ebato, H. Harada, T. Totani and S. Matsumoto 122

The Atomic Absorption Determination of Antimony ..... K. Ito, K. Ebato, M. Takeuchi, T. Amemiya, H. Harada and T. Totani 126

Servey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (IV) Polychlorinated Biphenyl Content of Foods ..... S. Suzuki, K. Yamazaki, H. Yamanobe, S. Koizumi, T. Totani and S. Matsumoto 132

Incidence of *Clostridium perfringens* in Food of Animal Origin ..... M. Kanzaki, Y. Kokubo, K. Jinbo, H. Murakami and M. Haruta 136

Pre-enrichment Media for the Resuscitation of Osmotically Injured *Vibrio parahaemolyticus* in Seafoods ..... M. Matsumoto, K. Jinbo, F. Murakami, M. Kanzaki, H. Murakami and M. Haruta 141

Effect of Sorbic Acid for Preservation of Lactic Beverage ..... M. Matsumoto, K. Jinbo, K. Takeba, F. Murakami, H. Murakami and M. Haruta 146

Incidence of Anti-*Brucella canis* Antibody in the Sera of Stray Dogs and of Dog Pounds' Workers in Tokyo ..... F. Umeki, T. Tanaka, T. Hayano, K. Kimura, S. Kaneko, H. Nishio, M. Murata, T. Takashima, K. Okusawa and H. Miki 149

Studies on Mycotoxins in Foods (VII) Detection of Aflatoxin M_1 in Dry Milk ..... K. Saito, H. Ogawa, E. Kazama, K. Kan, A. Ibe, Y. Naoi and Y. Kimura 153

Studies on Hydrocarbons from Petroleum in Foods (I) Detection of *n*-paraffin in Commercial Fishes ..... H. Ogawa, A. Ibe, E. Kazama, K. Saito, K. Kan, Y. Naoi and Y. Kimura 158

Studies on Deterioration of Oils and Fats 1. A Primary Factor of Deterioration ..... M. Nishijima, M. Kanmuri, S. Takahashi, H. Kamimura, M. Nakazato, Y. Watari and Y. Kimura 164

Studies on Deterioration of Oils and Fats 2. Survey of Rancidity of Commercial Fried Foods ..... M. Nishijima, M. Kanmuri, S. Takahashi, H. Kamimura, M. Nakazato, Y. Watari and Y. Kimura 171

Hygienic Study on Fluorine (III) Analysis of Fluorine in Foods and Estimation of Dietary Fluorine Intake ..... T. Tomomatsu, J. Suzuki, K. Nakazawa and Y. Kimura 174

Influence of Selenite on the Transplacental Transition of Methyl Mercury (Changes Noted in the Distributional Patterns in the Rat Organs) ..... Y. Tamura, G. Ohi, T. Maki, H. Seki, Y. Shimamura, H. Konno, S. Ochiai, K. Yunome, S. Nishigaki and Y. Kimura 179

Analysis of Product for Seasoning ..... M. Hirokado, H. Usami, I. Nakajima and F. Endo 185

Studies on the Standardizing of Calcium Preparation Influence of Coexistent Substances on Determination of Calcium ..... S. Ogino, T. Yasuno, A. Ono, T. Ohata and F. Endo 190

Investigations on Residual Vinyl Chloride Monomer in Polyvinyl Chloride Food Containers and its Possible Migration into the Contents (I) Survey of the Products on the Market in Tokyo in 1975 ..... Y. Watanabe, K. Sato, R. Yoshida, T. Fujii and F. Endo 194

Investigations on Residual Vinyl Chloride Monomer in Polyvinyl Chloride Food Containers and its Possible Migration into the Contents (II) Possible Migration of Vinyl Chloride Monomer into Liquid Foods……K. Sato, Y. Watanabe, R. Yoshida, T. Fujii and F. Endo…… 199
The Survey on the Adultrants in Marketing Vinegar
…… S. Fukano, F. Ushio, K. Nishida, M. Doguchi and T. Kani…… 203
Investigation on the Standard Tables of Food Composition in Japan (II) The Nutritive Composition of Miso
……M. Tomonari, Y. Tsukagoshi, M. Furuuchi, K. Bushimata and T. Kani…… 207
An Improved Kjeldahl Method Substituted Hydrogen peroxide for Heavy Metals
…… M. Tomonari, Y. Tsukagoshi, M. Furuuchi, K. Bushimata and T. Kani…… 210
Investigations and Biochemical Studies on the Porphyrin Metabolites (II) Urinary Coproporphyrin Excretion of Tokyoites…… K. Ogasawara, K. Bushimata and S. Shimoda…… 213
Investigations and Biochemical Studies on the Porphyrin Metabolites (III) Relationship between Appearance of Abnormal Urinary Components and Urinary δ-Aminolevulinic Acid…… K. Ogasawara, K. Bushimata and S. Shimoda…… 219
Examination of Regional Difference in the Levels of Urinary Porphyrin Metabolites between Two Groups of Junior High School Pupils……K. Bushimata, S. Shimoda and K. Ogasawara…… 223
Component Analysis of Suspended Particulate Matters in Atmosphere by EDX (II)
……Y. Sato and I. Mizoguchi…… 229
Hygienic Study of Medicinal Dusts in Hospital Dispensaries
……Y. Sato, M. Aoki and I. Mizoguchi…… 235
Behavior of Chlorinated Hydrocarbons in the Urban Air
……T. Tada, T. Ohta and I. Mizoguchi…… 242
An Application of Gas Phase Coulometry for Determination of Atmospheric Halocarbons
……H. Seto, K. Akiyama and I. Mizoguchi…… 247
Measurement of Atmospheric Fluorocarbons in Tokyo Area (1) Trichlorofluoromethane
…… H. Sato, K. Akiyama and I. Mizoguchi…… 251
Chronological Shift in Mercury Concentration of Human Tissues
……T. Nishima, S. Ikeda, H. Yagyu, I. Mizoguchi, M. Terai and K. Tomura…… 254
Total Mercury and Methylmercury Concentrations in Blood and Hair and Their Interrelationship……T. Nishima, S. Ikeda, T. Tada, H. Yagyu and I. Mizoguchi…… 258
Mite and Insect Fauna in Dusts Collected from Seats and Floors of Theaters in Tokyo II
…… E. Nakada and M. Yoshikawa…… 264
Effects of Photochemical Smog on Tear Lysozyme and pH
……M. Fukuda, M. Ohsawa, N. Okawada and I. Mizoguchi…… 270
Relation between Air Pollutants and Acute Subjective Symptoms (1) Each Feature and Fundamental Statistical Analysis……K. Makino, I. Mizoguchi, T. Okino and M. Yamamoto…… 274
Relation between Air Pollutants and Acute Subjective Symptoms (2) Multivariate Analysis
……K. Makino, I. Mizoguchi, T. Okino and M. Yamamoto…… 280
Computer Analysis of Air Pollutants Distribution in Tokyo Metropolis
…… K. Makino…… 287
Analysis of Gases Emanated from Warmed Thermoform
…… T. Ohta and I. Mizoguchi…… 293
Tail Rotation and Leaning against Contact Object Early Neurological Signs in Rats with Methylmercury Poisoning
……H. Seki, K. Yunome, M. Ohsawa, H. Konno, K. Minowa, H. Yagyu and G. Ohi…… 295
Evaluation of Selenite as a Therapeutic Agent for Methylmercury Poisoning in Rats
……H. Konno, H. Seki, K. Minowa, K. Yunome, H. Yagyu and G. Ohi…… 297
Mutagenic Activities Detected in the Environment of Tokyo Metropolitan Area
……K. Minowa, S. Matsushita, Y. Kudoh, H. Zen-Yoji, M. Ohsawa, H. Yagyu and G. Ohi…… 300
Biological Half Lives of Methylmercury in the Organ Compartments of a Rat Part II
……H. Yagyu, G. Ohi, H. Seki, S. Nishigaki, Y. Tamura and K. Kubota…… 303
Studies on the Safety of Drinking Water Part 1 Fluorescent Substances in Water
…… M. Morita and S. Mimura…… 308
Malodorous Substances induced by Chlorination in Supplied Water
…… N. Ohashi, M. Morita and S. Mimura…… 312

Polychlorinated Dibenzofurans in PCBs and Kanemi Rice Oil
.....J. Nakagawa, M. Morita, K. Akiyama, Y. Higuchi and S. Mimura..... 316
Chlorination of Two Phthalic Acid Esters (DBP and DEHP) in Water
..... Y. Takahashi, M. Morita, K. Yamazaki and S. Mimura..... 321
A Method for the Determination of Trace Acrylamide in Water
.....H. Nakamura and S. Mimura..... 326
Micro-determination of Orthophosphate in Inland Water
..... Y. Okamoto, Y. Tsuchiya, K. Yamazaki and S. Mimura..... 332
On the Stabilization and Sterilization Effect of Residual Chlorine by the Addition of Isocyanuric Acid to Pool Water..... H. Sasano, N. Ikejima, H. Oshida, H. Tochimoto, Y. Kikuchi, M. Jin, H. Harada and S. Kuroda..... 335
Water Pollution in the Area without Sewage Works (I)
.....H. Tochimoto, H. Sasano, N. Ikejima, H. Oshida, Y. Kikuchi, S. Kuroda and H. Harada..... 342
Ecological Surveys of *Plesiomonas shigelloides* 2. The Isolation from Intestinal Contents and Mesentric Lymph Nodes of Domestic Animals, Dogs and Cats and Faeces of Human being.....N. Ikejima, T. Arai, J. Kusunoki, M. Jin, T. Itoh and S. Sakai..... 350

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 355

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 367

報　　文

REPORTS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 1—4, 1976

黄色ブドウ球菌の新抗原型コアグラーゼ VIII 型の同定

潮田 弘*, 寺山 武*, 新垣正夫*
坂井千三*, 善養寺 浩*

Identification of a New Antigenic Type of Staphylococcal Coagulase, Coagulase Type VIII

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

A strain (KU) of *Staphylococcus aureus* which could not be typed by the coagulase typing, type I—VII, was isolated from a case of impetigo contagiosa. Thus an attempt was carried out to investigate the antigenic specificity of coagulase of KU strain by means of cross-neutralization test, and consequently it was found to be a new antigenic coagulase. The coagulase was designated as coagulase type VIII and *S. aureus* strain KU producing it was selected as prototype strain of the typing.

To clarify the incidence of coagulase type VIII of *S. aureus*, about 8,500 strains of *S. aureus* were examined during 1972—1975. Three strains, typed to this type VIII, were isolated from each one case of impetigo contagiosa, tympanitis and staphylococcal toxic epidermal necrolysis. The result indicated that *S. aureus* of coagulase type VIII is not common in Japan. Since KU and other strains of coagulase type VIII were not typable by ordinary phage typing method, prophage typing of KU strain was carried out using 22 phage propagating strains as an indicator.

From the result, it was suggested that KU strain should be belonged to phage group III.

緒　言

黄色ブドウ球菌の分類，型別法として，私どもは本菌の産生するコアグラーゼ（以下コと略す）の抗原特異性により，コⅠ～Ⅶ型の７つの型に分類する方法を報告してきた[1-5]．

この型別法をブドウ球菌食中毒事例の疫学的調査に応用するとともに，各種の材料由来黄色ブドウ球菌の型別に用い，極めて良好な成績をおさめてきた．

これまですでに約20,000株の型別を行なってきたが，型別に必要なコ力価の得られる菌株はすべてⅠ～Ⅶ型に型別された．

近年，ブドウ球菌性の各種疾患とその原因菌株のコ型との関係を調査している際に，膿痂疹患者120名から分離された黄色ブドウ球菌360株の中に，Ⅰ～Ⅶ型の抗コ血清に中和されないコを産生する黄色ブドウ球菌が認められた．そこでこの株の生化学的性状，ファージ型などを調べるとともに，産生コの免疫学的検討を行なった結果，既知のコ型と明らかに抗原的に異なる新しい型のコであることが確認されたので，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**：膿痂疹患者由来黄色ブドウ球菌ＫＵ株である．

2. **コ型別法**：善養寺ら[1-5]の方法によった．

3. **ファージ型別**：Blair & Williams[6]の方法に準じて行なった．ファージは1RTDおよび100RTD力価のものを用いた．

4. **生化学的性状**：

i）コ産生：5％にウサギ血漿を加えたBrain Heart Infusion broth (BHI broth)[5]を小試験管（1.2cm×10.5cm）に1m*l*分注し，これに被検菌を接種後，37Cで培養し，3時間，5時間および1夜培養後血漿凝固の有無により判定した．

ii）マンニットの分解能：マンニット食塩カンテン培地へ卵黄を3％に加えたMSEY平板[7]を用い，37C 48時間培養後集落の周辺のpHの変動により判定した．こ

* 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

の方法で反応の不明瞭なものは，バルジコー培地を用いて37C 48～72時間培養後判定した．

iii) 卵黄反応：前記 MSEY 平板上の集落の周囲にみられる白濁帯の有無によって判定した．

iv) リパーゼ活性：普通カンテン培地に Tween 80 を1%，塩化カルシウムを0.1%に加えたカンテン平板を作製し，被検菌を37C 20時間培養後，集落周囲の白濁帯の有無により判定した．

v) プロテアーゼ活性：基質としてスキンミルクを用い，5%スキンミルク加普通カンテン平板を作製し，被検菌を37C 48時間画線培養後，菌苔の周囲の培地の透明帯の有無により判定した．

vi) ゲラチナーゼ活性：スタヒロコッカス110カンテン平板に被検菌を37C 48時間培養後，飽和硫安液を平板に流し，約5～10分間室温放置後，集落周囲の透明帯の有無により判定した．

vii) DNase 活性：DNase 試験用カンテン平板に被検菌を37C 20時間画線培養後，1.5N 塩酸溶液を平板に流し，約10～15分間室温放置後，菌苔周囲の培地の透明帯の有無により判定した．

5. 抗コ血清の作製：KU株を BHI broth で18時間振とう培養を行ない，その遠沈上清の Trichloroacetic acid (TCA) 沈殿を集めて，pH 8.5 のトリス緩衝液に溶解，透析後，凍結乾燥した粗コを抗原とし，Zen-Yoji ら[1] の方法によりウサギを免疫して作製した．

6. プロファージの誘発：Otsuji ら[8] の方法により，マイトマイシンCを用いて行なった．

7. プロファージ型別：橋本ら[9] の方法に準じ，型別用ファージの増殖株（以下PSと略す）を指示菌として，被検菌の誘発ファージをスポットし，溶菌パターンを判定した．

成　績

1. 生化学的性状：膿痂疹患者由来KU株の生化学的性状ならびにファージ型，コ型を Table 1 に示した．

Table 1. Biochemical characteristics of *Staphylococcus aureus* KU strain

Coagulase	+
Mannitol	+
Egg yolk reaction	+
Lipase	+
Protease	−
Gelatinase	+
DNase	+
Coagulase type	Not typable
Phage type	Not typable

本菌株はコを産生し，マンニットを分解する典型的な黄色ブドウ球菌である．卵黄反応，リパーゼ陽性，DNase の産生も陽性であった．しかしながら，スキンミルクカンテン半板を用いてのプロテアーゼ活性の測定では，分離培養した独立集落も，画線培養したものもすべて陰性という特徴を有した．

ファージ型別は 1RTD, 100RTD 力価のファージを用いて行なったが，型別不能であった．

コ型別では，既知のⅠ～Ⅷ型の抗コ血清のいずれにも中和されず，中和反応時間を延長したり，抗血清とコ抗原量を種々変えて検討したが，型別不能であった．

2. コ抗原特異性：コ型別不能であったKU株のコ濃縮液でウサギを免疫して得た抗血清の中和抗体価は32～64単位であった．そこでこの抗血清とコ抗原を用い，既知のⅠ～Ⅷ型のコ抗原と抗血清とによる交差反応を行なった．その結果，Table 2 に示すごとくKU株のコは対応する抗血清にのみ中和され，Ⅰ～Ⅷ型までの抗血清にはまったく中和されなかった．反対にKU株の抗コ血清は，Ⅰ～Ⅷ型までのコ抗原を中和せず，KU株のコ抗原のみを特異的に中和した．種々の抗原量および抗体量の組合せにより精細に検討した結果，KU株の産生するコは既知のⅠ～Ⅷ型のコとは抗原的に明らかに異なることが確認された．そこでこのコをⅧ型と決定した．

Table 2. Specificity of coagulase types

Coagulase		Anticoagulase type serum							
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ
Ⅰ	No. 104	−	+	+	+	+	+	+	+
Ⅱ	St. 213	+	−	+	+	+	+	+	+
Ⅲ	Newman	+	+	−	+	+	+	+	+
Ⅳ	Stp. 28	+	+	+	−	+	+	+	+
Ⅴ	No. 55	+	+	+	+	−	+	+	+
Ⅵ	Stp. 12	+	+	+	+	+	−	+	+
Ⅶ	St. 1125	+	+	+	+	+	+	−	+
Ⅷ	KU	+	+	+	+	+	+	+	−

3. プロファージ型別：コ型とファージ群との間には高い相関性のあることを私どもは報告してきたが[10]，コⅧ型の標準株としたKU株はファージ型別不能であったので，いかなるファージ群に属するものかを推定するために，型別用ファージのPSを指示菌として，プロファージ型を検討した．

KU株をマイトマイシンCで処理してファージ誘発を行なったろ液を，型別用ファージのPS1～22に滴下し，溶菌を観察した結果，マイトマイシンC 1.0 μg/ml 処理によるろ液がPS47, 77および83Aの3株を溶菌した．

特にPS83Aに著明な溶菌を示したので，この株で一度増強を行ない，再度溶菌パターンを検討した．その成績は Table 3 に示すごとく，ファージⅢ群の PS 6, 47, 83A, 84 および 85 の5株のみを溶菌した．この結果からKU株はファージⅢ群に属するものと推察した．

4. Ⅷ型菌の検出状況：1972年以降，約8,500株のコ型別を実施した中に，Table 4 に示した膿痂疹患者の1例から，急性中耳炎およびブドウ球菌性 T.E.N. (Toxic Epidermal Necrolysis) の各1例からコⅧ型菌が検出された．このようにコⅧ型菌のわが国における分布は，現状ではきわめて低いことが明らかにされた．

Table 3. Lytic activity of a lysogenic phage (KU phage) induced from *Staphylococcus aureus* KU strain on the phage propagating strains

Indicator strain		Lytic spectra by KU phage
Phage group	Strain	
I	29	−
	52	−
	52A	−
	79	−
	80	−
II	3A	−
	3C	−
	55	−
	71	−
III	6	+
	42E	−
	47	+
	53	−
	54	−
	75	−
	77	−
	83A	+
	84	+
	85	+
IV	42D	−
Not allotted	81	−
	187	−

考　察

十数年来，各種由来の黄色ブドウ球菌約20,000株のコ型別をⅠ～Ⅷ型の抗血清を用いて行なってきたが，型別に必要なコ力価を有するものはすべて型別された．しかしながら，本報で述べた膿痂疹由来KU株の発見以来，Table 4 に示したごとく，毎年約2,000～2,500株の型別を行なう中に1～2株のⅠ～Ⅷ型の抗血清では型別されず，Ⅷ型血清によって型別される株が出現してきた．コⅧ型と決定したものはすべて臨床由来株であり，中でも膿痂疹患者材料から続いて検出された．

コⅧ型の標準株としたKU株をはじめとして，Ⅷ型と確定した株はすべてファージ型別不能であった．私どもはこれまでに多数の菌株について，コ型とファージ群との関係を検討してきた結果，この両者間には高い相関性が存在することを報告してきた[10]．そこで，このKU株がいかなるファージ群に属するものか，プロファージ型別を行なったところ，型別用ファージのPSのⅢ群菌のみを溶菌した．橋本ら[9]，藤井ら[11]および私どもの検討では，ファージⅡ群菌からの誘発ファージはⅡ群菌を溶菌し，ファージⅢ群菌の誘発ファージはⅢ群菌のみを溶菌するという成績から，KU株はファージⅢ群に属するものと推察された．

現在，臨床由来株の中にⅠ～Ⅷ型の抗血清を用いて

Table 4. Number of isolates of *Staphylococcus aureus* of coagulase type Ⅷ from clinical specimens during 1972 through 1975

Source		No. of colonies tested	No. of typed to type Ⅷ	Phage type
Impetigo	pus	3	3	N.T.[1]
Tympanitis	pus	3	3	〃
S.T.E.N.[2]	throat	3	3	〃
	nose	2	2	〃

1) Not typable
2) Staphylococcal Toxic Epidermal Necrolysis

も，完全に中和されないコ産生株が認められているので，将来，さらに新コ型の追加がなされるであろう．

結　論

各種材料由来の多数の黄色ブドウ球菌についてコ型別を実施したが，膿痂疹患者1例の由来株（KU株）がコ型別不能であった．このKU株のコ抗原は，既知のⅠ～Ⅶ型のコ抗原およびその抗血清と免疫学的に検討した結果，Ⅰ～Ⅶ型とは抗原的に明らかに異なることが確認され，コⅧ型と決定した．

1972年以後，約8,500株のコ型別を実施した結果，コⅧ型菌は膿痂疹患者2例，中耳炎患者およびブドウ球菌性T.E.N.患者各1例から検出されたにすぎず，この型菌の分布は極めてまれなものであること　明らかにされた．

標準株としたKU株のマイトマイシン誘発ファージは型別用ファージⅢ群のPSのみを溶菌したので，KU株はファージⅢ群に属するものと推察した．

文　献

1) Zen-Yoji, H., T. Terayama, M. Benoki, and S. Kuwahara: *Jap. J. Microbiol.*, **5**, 237, 1961
2) Zen-Yoji, H., T. Terayama, M. Benoki, and S. Kuwahara: *Jap. J. Microbiol.*, **5**, 367, 1961
3) Zen-Yoji, H., T. Terayama, M. Benoki, and S. Kuwahara: *Jap. J. Microbiol.*, **6**, 59, 1962
4) 善養寺　浩，寺山　武：モダンメディア，**12**, 20, 1966
5) 潮田　弘，寺山　武，坂井千三，善養寺　浩：東京衛研年報，**26-1**, 1, 1975
6) Blair, J.E. and R.E. Williams: *Bull. W.H.O.*, **24**, 771, 1961
7) 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
8) Otsuji, N., M. Sekiguchi, T. Iijima, and Y. Takagi: *Nature*, **184**, 1079, 1959
9) 橋本　一，大島　洋，三橋　進：日細菌誌，**20**, 113, 1965
10) 善養寺　浩，寺山　武，潮田　弘，工藤泰雄，坂井千三：東京衛研年報，**19**, 49, 1967
11) 藤井良知，市橋治雄，紺野昌俊，竹下尚徳，宇野　進：小児科臨床，**19**, 1049, 1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 5—9, 1976

アフィニティークロマトグラフィーによる抗ブドウ球菌エンテロトキシン血清の精製

寺山 武*, 山田 澄夫*, 稲葉 美佐子*, 五十嵐 英夫*
潮田 弘*, 坂井 千三*, 善養寺 浩*

Purification of Anti-Staphylococcal Enterotoxin Antiserum by Affinity Chromatography

TAKESHI TERAYAMA*, SUMIO YAMADA*, MISAKO INABA*,
HIDEO IGARASHI*, HIROSHI USHIODA*, SENZO SAKAI*
and HIROSHI ZEN-YOJI*

A simple purification of the type specific staphylococcal enterotoxin antibody was attemped by means of affinity chromatography.

The type specific enterotoxin D antibody was fractionated from antiserum against partially purified enterotoxin D by chromatography using CNBr-activated Sepharose 4B adsorbed regand. In the procedure, as a regand for excluding the non-specific antibody, a non-toxic fraction obtained on the purification step of the toxin was used. A volume of 1 m*l* of the anti-partially purified toxin serum was applied on the column packed with 1.5 g gel, the gel was washed with coupling buffer (0.5 M NaCl in 0.1 M $NaHCO_3$, pH 8.3), and then elution was performed with 0.2 M glycine-HCl buffer, pH 2.3. The type specific enterotoxin antibody was found in void volume, but not antibody against regand.

In another procedure, immunoglobulin in the antiserum against a highly purified enterotoxin A was fractionated by means of affinitiy chromatography using purified toxin A as regand. The type specific immunoglobulin was present in the fraction eluted with 0.2 M glycine-HCl buffer, pH 2.3.

In both experiments, activities of regands adsorbed on Sepharose were not diminished dispite that the chromatography were perfomed 20 times repeatedly. From these results, it was evidenced that affinity chromatography was a practical and satisfactory method for further enhancement of specificity of antiserum.

わが国におけるブドウ球菌食中毒は，腸炎ビブリオ食中毒についで2番目に多い発生を示しており，近年やや増加の傾向すらうかがわれる．したがって，本食中毒の確実な診断，すなわち推定原因食品からヒトに悪心，呕吐，下痢をおこす原因毒素であるエンテロトキシン（以下 Ent と略）を証明することは公衆衛生上重要な課題となっている．

本毒素の証明法には生物学的方法[12]と特異抗 Ent 血清を用いた抗原-抗体反応[9]による方法とがあるが，前者は実用的でなく，ほとんどの場合，抗原-抗体反応が用いられている．

抗原-抗体反応による Ent の検出には，免疫学的・物理化学的に純化された Ent と，それを免疫原として作成された型特異抗血清が必要であり，そのために Ent の精製が多くの研究者によって行われている[1,2]．しかし，Ent の精製は非常に操作が繁雑であり，純粋な毒素を得ることは極めて困難である．

われわれはすでに，A～Eの精製と型特異抗血清の作成に成功し[5,13-16,18]，ゲル内沈降反応により食中毒の診断および疫学調査を行ってきた[17]．しかし，この方法は，食品中に存在する微量の Ent を検出する方法としては必ずしも完全なものといえない．そこで，感度のよい方法とされている逆受身赤血球凝集反応[10]による Ent の検出を試みたが，抗 Ent A 感作血球は Ent A のみな

* 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

らず他の型の毒素とも反応することを観察した．したがって，この方法を適用するためには，非特異的反応性を有しない，より特異性の高い抗血清，さらには Ent 抗体グロブリンの分画が必要である．

近年，酵素と酵素阻害剤などのような相補的な関係にある物質の精製にアフィニティークロマトグラフィーが開発され，そのすぐれた効果が注目されている．

本報では，アフィニティークロマトグラフィーを応用して，部分精製 Ent D を免疫して得た抗血清からの特異抗血清の精製および特異抗 Ent A 血清からの Ent A 抗体グロブリンの分画を試みた成績を報告する．

材料および方法

使用毒素；免疫原として用いた精製 Ent A は，われわれが *Staphylococcus aureus* 13N-2909 から精製して，免疫学的および物理化学的に単一であることが確認されたものである[18]．

部分精製 Ent D は，1969年東京都内で発生した本菌食中毒の原因食品から分離した *S. aureus* 1151 の 4% NZ-amine 培養上清を Amberlite CG-50, Carboxymethyl (CM) および Diethylaminoethyl (DEAE) セルロースクロマトグラフィーにより分画したものを用いた．

免疫方法；上記免疫原(50μg protein/ml)とFreund's complete adjuvant (Difco) を等量混合したものを，1 ml ずつ1週間間隔で 4回ウサギ筋肉内に 接種した．さらに追加免疫として adjuvant をふくまない毒素を，1週間後に 1 ml ウサギ皮下に接種し，最終接種後10日目に全採血した．精製 Ent A で免疫して得たものを特異抗 Ent A 血清，部分精製 Ent D で免疫して得たものを抗粗 Ent D 血清とした．

タンパクの測定と定量；タンパクの測定は分光光度計（島津，UV-210）による 280nm の吸収により，その定量は Lowry 法[7] に準じた．

ゲル内沈降反応；アフィニティークロマトグラフィーによる血清分画における Ent 抗体の検出と力価の測定は，われわれが改良したスライドゲル内沈降反応により[14]，免疫学的特異性は Ouchterlony 法[8] により検討した．

Sepharoseへのタンパクのカップリング；アフィニティークロマトグラフィーにはブロムシアンで活性化した Sepharose 4B (Pharmacia) を用いた．Ent A 抗体グロブリン分画のためには，リガンドとして上記精製 Ent A を用い，Ent D 特異抗体の精製のためには，Ent D 精製過程の DEAE セルロースクロマトグラフィーの素通り画分をリガンドとして用いた．ゲルへのリガンドのカップリングは Cuatrecasas と Anfinsen の方法[3]に準じて以下のごとく行った．

1.5 g のゲルをグラスフィルター上で 10^{-3}M HCl, 500 mlで洗浄・膨潤後，カップリング緩衝液（0.5M NaCl 加 0.1M $NaHCO_3$, pH 8.3, 以下 CB と略）に浮遊した．次いで，CB に24時間透析して平衡化したリガンド（凍結乾燥 5 mg）を加え，4C で一夜温和に攪拌しながら反応させた．反応に関与しなかった余分のリガンドを除去するため，グラスフィルター上でゲルを CB で十分（約 1l）洗浄した．リガンドと反応しなかった Sepharoseの 残存活性基を 1M エタノールアミンで 2時間，室温で処理して不活化した．さらに，CB と 0.5M NaCl 加酢酸緩衝液，pH 4 で交互に洗浄後，CB に浮遊させ使用時まで 4C に保存した．

成績および考察

1) 抗粗 Ent D 血清の精製

DEAE セルロースクロマトグラフィーで分画された Ent D 画分（0.3M NaCl 溶出画分）で免疫して得た抗血清は Ouchterlony のゲル内沈降反応において，Fig. 1に示すごとく，粗毒素との反応で2本の沈降線を形成

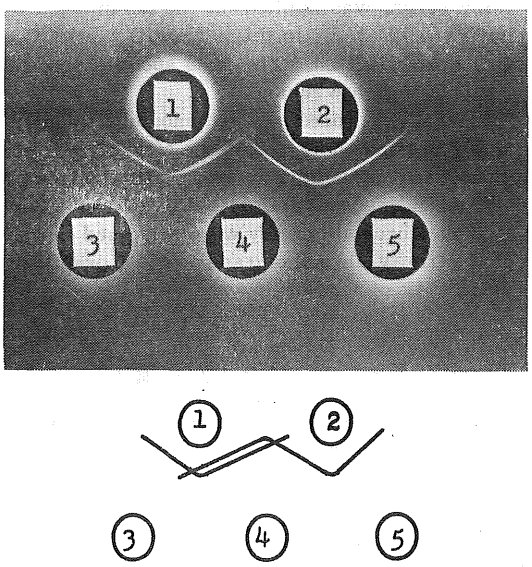


Fig. 1. Double gel diffusion test with anti-partially purified enterotoxin D serum and the reference toxin or non-toxic fraction.
1. anti-partially purified D toxin serum; 2. reference anti-D toxin serum from Dr. Bergdoll; 3. non-toxic fraction obtained on the purification step of the toxin; 4. crude D toxin; 5. reference toxin D from Dr. Bergdoll.

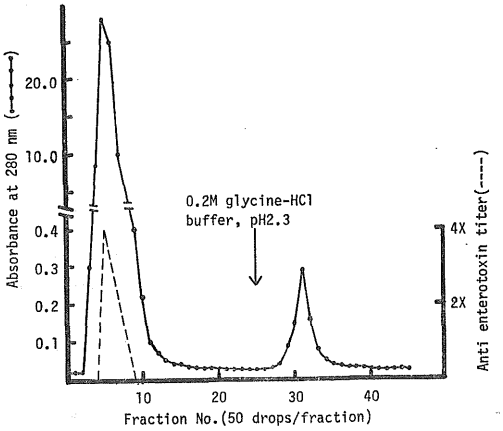


Fig. 2. Affinity chromatography of anti-partially purified enterotoxin D serum.
A volume of 1m*l* of anti-partially purified toxin D serum applied on the column (1.6×1.8cm) of CNBr-activated Sepharose 4B coupled with non-toxic fraction; the flow rate was 35.2m*l* per hour.

した．その1本は米国ウィスコンシン大学 Food Research Institute の Bergdoll 博士より分与された reference Ent D とその抗血清が形成する沈降線と融合し，他の1本は精製過程において分画された非 Ent 画分との沈降線であった．そこで，この非 Ent 画分をリガンドとしてカップリングさせた CNBr-activated Sepharose 4B を用いて，抗粗 Ent D 血清のアフィニティークロマトグラフィーを行った．溶出には 0.2M グリシン-塩酸緩衝液（pH 2.3）を用いた．溶出される血清画分がこの強酸性溶液で不活化されるのを防ぐため，あらかじめ分画試験管内に溶出量を加えた時，pH 7.0 になるように10% NaOH を添加した．その結果は，Fig. 2に示したごとく，抗血清（1m*l*）は大きな素通り画分と溶出液で溶出する小さな画分の2つに分画された．

これらのタンパク画分は Ouchterlony のゲル内沈降反応において，素通り画分は粗毒素と1本の沈降線を形成し，それは reference Ent D とその抗血清が形成する沈降線と完全に融合した．一方，小さな溶出画分はリガンドである非 Ent 画分とは沈降線を形成したが，reference Ent D とは反応しなかった（Fig. 3）．

抗 Ent D 画分を集め，限外ろ過膜 XM 50 (Amicon) を用いて約 1m*l* に濃縮した．このものの力価は精製前の抗血清と同一力価を示した．さらに，同一ゲルを用いて，1m*l* ずつ20回，抗血清の精製を試みた結果，常に同一の分画パターンを示し，リガンドの機能の低下は認められなかった．

以上の結果は，粗 Ent を免疫して得た抗血清から，ブドウ球菌が産生する他の菌体外物質をリガンドとしてカップリングさせたゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーの組み合わせにより，特異性の高い抗 Ent

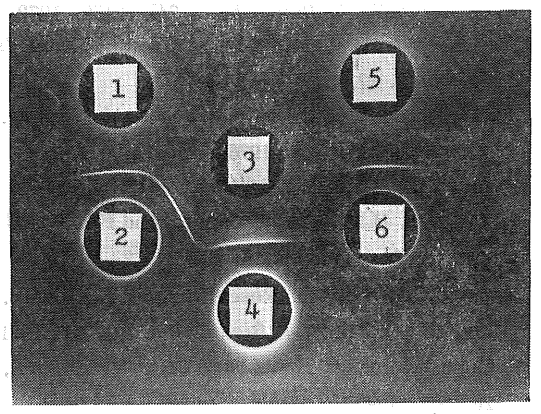


Fig. 3. Double gel diffusion test with two fraction obtained by affinity chromatography of anti-partially purified enterotoxin D.
1. crude D toxin; 2. fraction eluted in void volume; 3. reference D toxin; 4. reference anti-D toxin serum; 5. non-toxic fraction; 6. fraction eluted with 0.2M glycine-HCl buffer (pH 2.3).

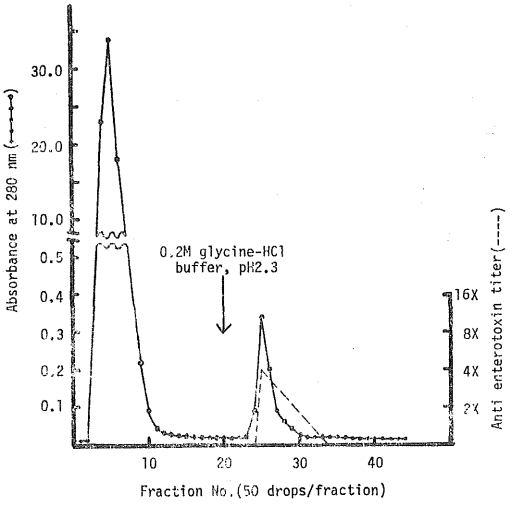


Fig. 4. Affinity chromatography of anti-enterotoxin A serum.
A volume of 1m*l* of anti-toxin A serum applied on the column(1.6×1.8cm) of CNBr-activated Sepharose 4B coupled with a pure toxin A; flow rate was 35.2m*l* per hour.

血清を得ることができる可能性を示すものである．

2) Ent A 抗体グロブリンの分画

次に，精製 Ent A をリガンドとしてカップリングさせた CNBr-activated Sepharose 4B を用いて特異抗 Ent A 血清のアフィニティークロマトグラフィーを行った結果を Fig. 4 に示した．溶出法および処理方法は上述の抗 Ent D の精製に準じた．

特異抗 Ent A 血清 (1 m*l*) は大きな素通り画分と 0.2 Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.3) で溶出する小さな画分の2つに分画された．Ent A とのスライドゲル内沈降反応において，溶出画分は沈降線を形成したが，大きな素通り画分は沈降線を形成しなかった．このことから，溶出画分は Ent 抗体グロブリン，素通り画分は他の血清タンパクを含む画分であることが確認された．

Ent A 抗体グロブリン画分を集め，精製水に透析後，限外ろ過膜 XM 50 で約 1 m*l* に濃縮した．このものの力価は精製前の 1/2 であった．さらに，同一ゲルを用いて，1 m*l* ずつ20回，抗体グロブリンの分画を試みたが，同一の分画パターンを示し，このクロマトグラフィーの高い再現性が確認された．

この結果は，逆受身赤血球凝集反応[10]や radioimmunoassay[6] などの高感度の Ent 検出法に不可欠な Ent 抗体グロブリンが，このクロマトグラフィーによって簡易に分画されることを示すものである．また，この方法は硫安沈澱と DEAE セルロースクロマトグラフィーの組み合わせ，あるいは Sephadex G-200 ゲルろ過法により抗体グロブリンを得ている方法に比して，操作は簡易で，再現性が高く，しかも特異性の高い抗体グロブリンを得ることができる．最近，Genigeorgisら[4]は Sephadex ゲルろ過，50%硫安沈澱および Sephadex ゲルろ過で得た Ent B 抗体グロブリンは，Ent B 以外の抗体グロブリンを含んでいると報告している．この点を考慮に入れるならば，われわれが得た Ent A 抗体グロブリンは極めて特異性が高いといえよう．

一方，ここに示したアフィニティークロマトグラフィーによる2種類の抗血清の精製結果は，細菌毒素の分野におけるこのクロマトグラフィーの有用性を示すものである．例えば，コレラエンテロトキシンと大腸菌易熱性エンテロトキシンの交差反応[11]の解析，および，それら毒素の単離，精製に応用しうるであろう．また，CMおよび DEAE セルロースクロマトグラフィーと Sephadex のゲルろ過の数段階の組み合わせ操作によって精製されている Ent も，Ent 抗体グロブリンをリガンドとすることにより，容易に精製が可能となろう．ことに，精製が極めて困難であるため，これまで毒素性状の知られていない Ent D の精製には，アフィニティークロマトグラフィーの有効性が期待される．

結　論

特異性の高いブドウ球菌 Ent 抗血清を得るために，アフィニティークロマトグラフィーを行い以下の成績を得た．

1) 部分精製 Ent D 抗血清から，DEAE セルロースクロマトグラフィーで得られた非 Ent 画分をリガンドとして吸着させた CNBr-activated Sepharose 4B によるアフィニティークロマトグラフィーにより，特異性の高い抗 Ent D 血清が精製された．リガンドを吸着した Sepharose は同一操作によるクロマトグラフィーを20回繰り返し使用してもその機能を失わなかった．

2) 型特異抗 Ent A 血清から，精製 Ent A をリガンドとした CNBr-activated Sepharose 4B によるアフィニティークロマトグラフィーを行い，Ent 抗体グロブリンが容易に分離精製された．この場合も，Ent A をリガンドとした Sepharose は20回同一操作を行ってもその機能を失わなかった．

謝辞 稿を終るに臨み，貴重なる reference Ent D とその抗血清を分与下さった米国ウィスコンシン大学 Bergdoll 博士に深甚なる謝意を表します．

文　献

1) Bergdoll, M.S., 坂口玄二：タンパク毒素(上), 370, 1972, 講談社サイエンティフィク, 東京
2) Borja, C.R., E. Fanning, I-Y. Huang, and M. S. Bergdoll: *J. Biol. Chem.*, 247, 2456, 1972
3) Cuatrecasas, P. and F.B. Anfinsen: *Methods Enzymol.*, 22, 345, 1970
4) Genigeorgis, C. and J.K. Kuo: *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 274, 1976
5) Igarashi, H: *Jap. J. Microbiol.*, 16, 483, 1972
6) Johnson, H.M., J.A. Bukovic, and P.E. Kauffman: *Infect. Immun.*, 5, 645, 1972
7) Lowry, O.H., W.J. Rosenbrought, A.L. Farr, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
8) Ouchterlony, Ö: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 26, 507, 1949
9) Robbins, R., S. Gould, and M. Bergdoll: *Appl. Microbiol.*, 28, 946, 1974
10) Silverman, S.J., A.R. Knoff, and M. Howard: *Appl. Microbiol.*, 16, 1019, 1968
11) Smith, N.W. and R.B. Sack: *J. Infect. Dis.*, 127, 164, 1973
12) Surgalla, M.J., M.S. Bergdoll, and G.M. Dack:

J. Lab. Clin. Med., 41, 782, 1953
13) 寺山 武, 五十嵐英夫, 潮田 弘, 坂井真紀, 善養寺 浩：日細誌, 25, 200, 1970
14) 寺山 武：日細誌, 26, 611, 1971
15) 寺山 武, 五十嵐英夫, 潮田 弘, 善養寺 浩：日細誌, 28, 276, 1973
16) 寺山 武, 山田澄夫, 五十嵐英夫, 潮田 弘, 善養寺 浩, 東京衛研年報, 25, 9, 1974
17) 寺山 武：モダンメディア, 21, 436, 1975
18) 山田澄夫, 五十嵐英夫, 寺山 武：日細誌, 31, 409, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 10—15, 1976

Escherichia coli O 159 : H 20 によると推定された6事例の集団下痢症について

坂井千三*, 丸山務*, 伊藤武*
甲斐明美*, 柳川義勢*, 善養寺浩*

Six Outbreaks of Acute Enteritis Due to the Infection of *Escherichia coli* O 159 : H 20

SENZO SAKAI*, TSUTOMU MARUYAMA*, TAKESHI ITOH*, AKEMI KAI*, YOSHITOKI YANAGAWA* and HIROSHI ZEN-YOJI*

During the period from January 1974 to December 1975, six outbreaks of acute enteritis had occurred in Tokyo. A total of 204 patients were involved in these 6 outbreaks. The major clinical symptoms observed in the patients were diarrhea (97.2%), abdominal pain (48.6%) weariness (20.8%), nausea (15.3%) and fever (10.4%). None of the patients required hospitalization or antibiotic therapy, and most were asymptomatic within 1 week. *Escherichia coli* O 159 : H 20 organisms were isolated from 103 (67.8%) out of 153 patients from 6 outbreaks approximately in pure state, and this clearly indicating the importance of the organism as a cause of diarrhea in these outbreaks. These are believed to be the first documented outbreaks of *E. coli* O 159 : H 20 enteritis in Japan.

緒　言

東京都に発生する食中毒のうち，病因物質が不明の割合は毎年およそ 30～35% である．これら不明食中毒の多くはその疫学的検討から細菌性のものと考えられている．

私共はここ数年来こうした既知病原菌が検出されない集団食中毒事例を対象にその原因究明を行なってきたが，そのうちあるものは病原大腸菌に含まれない大腸菌である O6[1]，O27[2]，O11[3]，O118[4]によるものであることを明らかにしてきた．

今回はさらに大腸菌 O159 によるものと推定された6事例の集団下痢症を経験したので，それら事例の疫学的ならびに細菌学的検査成績について報告する．

疫学的調査

1. 6事例の発生概要　1974年1月から1975年12月までの2年間に東京都に発生した集団下痢症のうち，疫学的調査，細菌学的検討成績から *Escherichia coli* O 159 によるものと推定されたものは計6例であった．各事例の発生月日，患者数などの発生概要を一括して Table 1 に示した．

6事例中4例は1974年の春から夏にかけて集中して発生したが，他の2例も含めてこれらの間には疫学的に何らの相互関係は認められなかった．

発生場所は家庭，学生寮，会社食堂など多様であった．

各事例における原因食品は事例5および6はそれぞれ会社食堂の昼食と会食料理と推定され，その潜伏時間も前者が40～48時間，後者が30～36時間と算定された．他の4例はいずれも共通原因食を明らかにすることができなかったが，事例2および3の2例では患者が共通に使用した自家井戸水が汚染源と推定された．また，事例1および4の両事例は地方に旅行した集団のみからの旅行直後の発生であり，旅行期間中の食事が原因と考えられたが明らかにすることはできなかった．

患者数は少ないもので8名，最も大規模なものは事例5の80名であり，6事例の平均患者数34名，その発症率は58.1%であった．

2. 患者の臨床症状　6事例の患者総数 204 名中調査が可能であった 144 名の各事例における主要臨床症状を Table 2 に示した．

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

各事例毎の差異はなく，全体として144名の主要症状は下痢（97.2%），腹痛（48.6%）であり，次いで脱力感（20.8%），呕気（15.3%），発熱（10.4%）があげられ，呕吐はほとんどみられなかった．

下痢は1日2～3回の水様便が最も多く，発熱も38℃以下であり，全般的には症状は軽く予後は良好であった．

細菌学的検査成績

患者総数204名のうち5病日以内の採便が可能であった152名および同時喫食の非発症者20名，計172名のふん便を主な検査対象とした．また，感染源の追求を目的として患者が共通に飲食使用した食品，井戸水，器具拭取り58件についても同様に検査を実施した．

上記検査材料からの病原菌の検索方法および大腸菌の分離同定法は前報[3]に従った．大腸菌の抗原分析に用いた抗血清は著者らが標準株を用いて自家作成したO1～O163の抗O因子血清，H1～H56の抗H血清および患者由来の代表株（E1923）で家兎に免疫して作成した抗O，抗H血清である．

1. 病原菌の検索 事例1において患者23名，同時喫食の非発症者3名，計26名のふん便を対象に病原菌の検索を行なったところ赤痢菌をはじめサルモネラ，腸炎ビブリオ，既知病原大腸菌，黄色ブドウ球菌，耐熱性ウェルシュ菌および *Yersinia enterocolitica* など本食中毒事例と関連づけられるような既知腸管系病原菌は検出されなかった．しかしながら，患者材料の約半数は直接分離培養のDHL寒天上で均一な性状を示す大腸菌様集落が純培養状に出現しているのを認めた．この集落についてTSI寒天およびLIM培地を用いて予備同定試験を行ない，さらに詳細な生化学的性状を試験した結果その大部分はインドール反応，37℃での運動性がともに陰性の大腸菌と同定された．

同様に事例2から6までの患者ふん便からも事例1と同一性状を示す大腸菌が高頻度に検出された．

2. 分離菌の血清学的性状 患者から高頻度に分離された大腸菌は先に私共が報告したO6，O27，O11，O118を含めた既知病原大腸菌血清型に該当しなかった．そこで，本菌の血清型を明らかにするため，患者由来株のうち任意に選んだ1株（E1923）を用いて抗OおよびH血清を作成し，抗原分析を行なった．

O抗原：E1923株の121℃ 2時間半加熱菌は大腸菌O1からO163までの抗O血清とのスライド凝集反応で，O159のみに著明な凝集が認められた．このため，あらかじめ作成したE1923株の抗O血清および大腸菌O159標準株 E2476-72の因子血清を用いて交差凝集反応および交差吸収試験を行なった．交差凝集反応で患者分離株はO159標準株と全く同一の態度を示し，また，交差吸収試験によって両者は相互に吸収が成立した（Table 3）．

以上の成績から患者分離株 E1923のO抗原はO159と決定された．

K抗原：O抗原の検討のところでみられたように，E

Table 1. Review of Six Outbreaks of Acute Enteritis Due to *E. coli* O 159

Outbreak No.	Date	Place	No. of at risk	No. of patients (%)	Vehicle	Incubation period
1	4, Mar., 1974	dormitory	26	23 (88.5)	unknown	
2	20, Apr., 1974	apartment	14	10 (71.4)	well water	
3	26, May, 1974	company	159	63 (39.6)	well water	
4	16, June, 1974	hotel	23	20 (87.0)	unknown	
5	5, Sept., 1974	company	114	80 (70.2)	lunch	40-48
6	16, Jan., 1975	restaurant	15	8 (53.3)	lunch	36-40

Table 2. Main Symptoms of Patients

Outbreak No.	1	2	3	4	5	6	Total (%)
No. of subjects	23	10	7	16	80	8	144
Diarrhea	21	8	7	16	80	8	140 (97.2)
Abdominal pain	20	2	1	6	36	5	70 (48.6)
Weariness				6	24		30 (20.8)
Nausea	13			1	6	2	22 (15.3)
Fever				1	11	3	15 (10.4)
Headache				5	7		12 (8.3)

Table 3. Analysis of O Antigen of an Isolate by Agglutination and Absorption Test

Antigen		O antiserum			
		O 159 (E 2476-72)		E 1923	
		Unabsorbed	Absorbed by E 1923	Unabsorbed	Absorbed by O 159
O 159 (E 2476-72)	Unheated	<40	<40	<40	<40
	121 C, 2.5 hr	2560	40	2560	<40
E 1923	Unheated	160	<40	160	<40
	121 C, 2.5 hr	1280	40	1280	<40

Table 4. Isolation of *E. coli* O 159 from Fecal Specimens and Vehicles

Outbreak No.	No. of positives/No. of subjects				
	Feces		Well water	Foods	Swab of dishes
	Patients	Symptomless persons			
1	10/23 (43.5%)	0/3			
2	7/9 (77.8%)	0/3	5/5 (100%)		
3	33/36 (91.7%)	7/8 (87.5%)	9/9 (100%)		
4	13/19 (68.4%)				
5	35/59 (59.3%)	1/5 (20.0%)	0/2	0/7	0/23
6	5/6 (83.3%)	0/1		0/2	0/10
Total	103/152(67.8%)	8/20(40.0%)	14/16(87.5%)	0/9	0/33

1923株は生菌では難凝集性を示し，121℃ 2時間半加熱菌ではじめて明瞭な凝集性を示すこと（Table 3）から，本菌がK抗原を有することは明らかである．その抗原型については目下検討中である．

H抗原：患者分離株 O159 は 37 ℃での運動性が無く，25℃で弱い陽性反応のみられたことから，25℃でクレーギー管を用いて3代継代培養し，フォルマリン死菌としたものを抗原として その分析を行なった．E1923 株は H1～H56 の抗 H血清と凝集反応を行なったところ，H 20のみに強い反応が認められ，標準株との交差吸収試験によって H20 であることが確認された．

上記の成績から，患者由来の大腸菌 E1923 株の抗原構造は O159:K？:H20 であることが明らかにされた．

3. 患者ふん便および関連材料からの *E. coli* O 159:H 20 の検出状況 事例1から6までの各事例における患者およびその関連材料からの *E. coli* O 159:H 20 の検出状況は Table 4 の通りである．すなわち，ふん便材料は患者総数 204 名中 5 病日以内のふん便152件中103件から，非発症者群20件中 8 件（40%）から本菌が分離され，患者群ではその検出率は43.5～91.7%で平均67.8%であった．感染源追求の目的で行なった食品，井戸水など58件からは事例2および3の井戸水14件以外はすべて陰性であった．

4. 井戸水からの *E. coli* O 159:H 20 の検出状況 前述のごとく，事例2および3はその疫学的調査から汚染源として井戸水が疑われたので患者が共通に使用していた井戸水についてメンブランフィルター集菌法によって検出を試みた結果，事例2では原水と末端蛇口を含めた5件，事例3では9件のそれぞれから患者より高率に分離された同一血清型菌を分離した．その時の被検井戸水14件の一般生菌数，大腸菌群数および *E. coli* O 159:H 20 の菌数を Table 5 に示した．大腸菌群測定平板から換算した 100 m*l* 中の *E. coli* O 159:H 20 の菌数

Table 5. Viable Cell Counts of *E. coli* O 159 in Incriminate Well Water

Outbreak No.	Sample No.	SPC*/ 1 m*l*	*E. coli* group/ 100 m*l*	O 159/ 100 m*l*
2	1	96	3300	3000
	2	100	3300	1700
	3	110	2400	1200
	4	92	7000	5600
	5	87	5400	3800
3	1	190	540	41
	2	210	540	140
	3	130	540	95
	4	170	1400	140
	5	10	79	10
	6	9	33	3
	7	22	79	10
	8	20	79	6
	9	18	33	3

*SPC: standard plate count

Table 6. Biochemical Characteristics of Isolates and *E. coli* O 159 Pilot Strain

Characteristics	Source		*E. coli* O159 pilot strain (E2476-72)
	Feces 30*	Well water 10*	
Indole	− (0/30)	− (0/10)	−
Methyl red	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Voges-Proskauer	− (0/30)	− (0/10)	−
Hydrogen sulfide (T S I)	− (0/30)	− (0/10)	−
Nitrate reduction	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Urease	− (0/30)	− (0/10)	−
Phenylalanin deaminase	− (0/30)	− (0/10)	−
Utilization of :			
Simmons' citrate	− (0/30)	− (0/10)	−
Christensen's citrate	d (15/30)	− (0/10)	−
Jordan' tartrate	− (0/30)	− (0/10)	−
KP-mucate	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Acetate	+ (29/30)	+ (10/10)	+
Malonate	− (0/30)	− (0/10)	−
Decarboxylation of :			
Lysin	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Ornithin	− (0/30)	− (0/10)	−
Arginine dihydrolase	− (0/30)	− (0/10)	−
Fermentation of :			
Glucose/gas	+/+ (30/30)	+/+ (10/10)	+/+
Lactose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Sucrose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Mannitol	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Dulcitol	+ (29/30)	+ (10/10)	+
Xylose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Adonitol	− (0/30)	− (0/10)	−
Rhamnose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Inositol	− (0/30)	− (0/10)	−
Raffinose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Salicin	− (0/30)	− (0/10)	−
Maltose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Trehalose	+ (28/30)	+ (10/10)	+
Arabinose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Dextrin	d (25/30)	+ (9/10)	+
Sorbitol	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Cellobiose	− (0/30)	− (0/10)	−
Sorbose	− (0/30)	− (0/10)	−
Fructose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Galactose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Mannose	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Inulin	− (0/30)	− (0/10)	−
KCN	− (0/30)	− (0/10)	−
β-galactosidase	+ (30/30)	+ (10/10)	+
Cytochrome oxidase	− (0/30)	− (0/10)	−
Motility 37 C	− (1/30)	− (0/10)	−
25 C	+ (29/30)	+ (10/10)	+
Haeolysis	− (0/10)	− (0/10)	−

Note. *=No. of tested strains.
d=different according to the strains.

は事例2では1,700～5,600，事例3では3～140であった．

5. 分離株の生化学的性状 上記大腸菌の患者ふん便由来株と井戸水由来株の詳細な生化学的性状を *E. coli* O159 標準株（E2476-72）と比較して Table 6 に示した．供試菌株のうち患者由来株は各事例ごとに無作為に選んだ5株の計30株，井戸水由来株は各事例から5株の計10株である．

Table 6 からも明らかなように，分離株は予備同定試験でみられたごとく，インドール反応陰性，運動性が37℃では陰性であるが25℃では陽性を示す特徴をもつ外は典型的な大腸菌であり，事例による差異はみられなかった．また2例の井戸水由来株も患者由来株と一致し，これら分離株は *E. coli* O159 の標準株と全く同一性状を示すことが確認された．

6. 分離株の薬剤感受性試験 生化学的性状試験に用いた患者由来の30株および井戸水由来株の薬剤感受性試験成績は Table 7 の通りである．

供試薬剤は streptomycin, chloramphenicol, tetracyclin, kanamycin, aminobenzylpenicillin および nalidixic acid の6剤を用い，MIC 値として示した．生化学的性状同様に，事例による差異はなく，水由来株もふん便由来株と同じ感受性パターンを示し，これら6剤に対して供試40株は全て感受性株であった．

考　察

E. coli O159 による下痢症例はわが国では私共のこの報告が最初である．

もともと *E. coli* O159 の標準株 E2476-72 は1972年に英国での集団下痢症から分離されたもの[5] であるが，今回著者らが明らかにした *E. coli* O159 は6事例とも標準株と生物学的，血清学的に全く同一性状を示す血清型菌であった．

発生状況で興味あることは，東京という限られた地域内で，短期間に集中して同様の集団例が発生したことであるが，疫学的調査からはこれら6事例の間で相互の関連性はみられなかった．ただ，6事例のうち，事例1および4はそれぞれが関西地方と伊豆地方への旅行者に限って発生していることから，それらの地域での感染とも推察され，*E. coli* O159 による下痢症が東京以外の地域でも発生している可能性も十分にあり得るであろう．

大腸菌食中毒に限らずいわゆる感染型食中毒の場合，原因食品を証明することはきわめて困難である．事例5では患者の共通食が会社食堂の昼食であり，同様に事例6では会食料理以外には無いことからそれぞれを原因食と推定したが，それらの食品から起因菌を検出することはできなかった．一方，事例2および3では患者が共通に使用していた自家井戸水から起因菌の検出に成功した．この2事例ではおそらく汚染水からの食品への再汚染，その食品中での菌の増殖という経路が考えられるが，事例2のような濃厚汚染水では食品中での菌の増幅なしにも感染が成立し得る可能性が考えられよう．

感染源追求の中で，6例中2例の井戸水から起因菌が検出されたことは，すでに著者らが水系感染の病原大腸菌下痢症例[6] を明らかにしてきたように，大腸菌下痢症の場合，その感染源として水がきわめて重要な役割を担うものと思われる．

Table 7. Sensitivities of *E. coli* O 159 Isolates from Fecal Specimens of Patients and Well Waters to Antibiotics

Source	No. of strains	Antibiotics*	MIC (mcg/ml)				
			6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
Feces	30	SM	12	17	1		
		CP	10	16	4		
		TC			30		
		KM		15	14	1	
		AB-PC		30			
		NA		29	1		
Water	10	SM	8	1		1	
		CP	4	6			
		TC			10		
		KM		9			1
		AB-PC		9	1		
		NA		10			

* Note. SM=Streptomycin, CP=Chloramphenicol, TC=Tetracycline
KM=Kanamycin, AB-PC=Aminobenzylpenicillin, NA=Nalidixic acid.

病原大腸菌という呼称はヒトの下痢腸炎の原因となる大腸菌であり，わが国では特定の抗原構造をもった約20種類のものに限って用いられている．この病原大腸菌による幼小児の下痢症あるいは食中毒を含めた成人の下痢症が毎年発生していることは事実である．しかしながら集団下痢症の起因菌に限定してみると著者ら[1-4]がすでに報告してきたように，これら病原大腸菌でない大腸菌による下痢症が数多く発生し，病原大腸菌のそれをむしろ凌駕しているのが実状である．したがって，特定の血清型に限定した病原大腸菌という呼称は今や多くの矛盾が生じ，病原大腸菌の定義そのものを再検討する必要があろう．

一方，Sack ら[7]，Gorbach ら[8]などの報告に端を発したヒト下痢症における大腸菌エンテロトキシンの研究は，大腸菌下痢症の本態が該菌の産生する外毒素によることを次第に明らかにしつつあり，毒素産生能の検討なくして下痢症との関連を論ずることができない趨勢にさえある．

今回著者らが分離した *E. coli* O 159 は工藤ら[9]によれば耐熱性トキシン（ＳＴ）単独産生型であることが確認され，その病原学的意義について目下検討中である．今後は腸炎起病性大腸菌の研究には血清学的検討と同時に毒素学的究明を並行して実施する必要があろう．

結　　論

1974年１月から1975年12月の２年間に東京都内で発生した６事例の集団下痢症は，いずれも赤痢菌，サルモネラ，腸炎ビブリオ，病原大腸菌，耐熱性ウェルシュ菌，黄色ブドウ球菌および *Yersinia enterocolitica* など既知腸管系病原菌の因果性が否定された事例であった．これら６事例は，疫学的調査および細菌学的検討の結果，その起因菌は *E. coli* O 159 : H 20 であることが明らかにされた．

６事例の患者数は合計204名であり，平均発症率は58.1％であった．

患者144名の主要症状は，下痢（97.2％），腹痛（48.6％），倦怠感（20.8％），呕気（15.3％），発熱（10.4％）であった．

これら各事例の患者および井戸水から分離された菌株は，いずれも生物学的および血清学的性状が同一の大腸菌であり，*E. coli* O 159 標準株に一致するものであった．

起因菌と推定された *E. coli* O 159 : H 20 の患者からの分離率は43.5～91.7％であり，６事例中２例は，いずれも患者が共通に使用した井戸水から患者分離株と同一血清型菌が検出された．

文　　献

1) 坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斎藤クラ，善養寺浩：東京衛研年報，22，1，1970
2) 坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斎藤クラ，善養寺浩：東京衛研年報，22，7，1970
3) 坂井千三，丸山　務，伊藤　武，斎藤クラ，善養寺浩：東京衛研年報，23，13，1971
4) 坂井千三，丸山　務，伊藤　武，善養寺　浩：日感染学誌，45(7)，314，1971
5) Ørskov, I., F. Ørskov, and B. Rowe: *Acta path. microbiol. scand.* Sect. B, 83, 116, 1975
6) 善養寺　浩，坂井千三，丸山　務，工藤泰雄，伊藤武，斎藤クラ：日本公衛誌，16(11)，64，1969
7) Sack, R.B., S.L. Gorbach, J.G. Banwell, B. Jacobs, B.D. Chatterjee, and R.C. Mitra : *J. Infect. Dis.*, 123 (4), 378, 1971
8) Gorbach, S.L., J.G. Banwell, B.D. Chatterjee, B. Jacobs, and R.B. Sach: *J. Clin. Invest.*, 50, 881, 1971
9) 工藤泰雄，善養寺　浩，松下　秀，丸山　務，坂井千三：第35回日本細菌学会関東支部総会講演抄録，24，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 16—23, 1976

最近10年間に東京都内に発生したサルモネラ食中毒の疫学および細菌学的検討

坂井千三*, 伊藤武*, 丸山務*
斎藤香彦*, 善養寺浩*, 辺野喜正夫*

Epidemiological and Bacteriological Surveys on the Salmonella Food Poisoning in Tokyo during the Last Decade

SENZO SAKAI*, TAKESHI ITOH*, TSUTOMU MARUYAMA*,
KAHIKO SAITO*, HIROSHI ZEN-YOJI* and MASAO BENOKI*

Outbreaks of food poisoning caused by Salmonella in Tokyo during 1966—1975 were studied epidemiologically and bacteriologically.

A total of 119 outbreaks of salmonella food poisoning had occurred in Tokyo during the last decade, involving 4,565 cases. Outbreaks occurred throughout the year, with high frequencies during the months of May to September. The vehicles of infections were confirmed on 52 out of 119 incidents. Among the confirmed vehicles of infection, the highest number of incidents were found in meat and its products, Chinese dishes, egg and its products and salads.

The strains isolated from salmonella food poisoning were typed to 30 serotypes, *S. typhimurium* incidents (30.3%) was most frequent, and followed by *S. enteritidis*, *S. thompson* and *S. infantis*.

7,327 *Salmonella* isolates from sporadic cases and healthy carriers during the period from 1966 to 1975 were typed to 96 serotypes, and most common serotypes were *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. thompson*, *S. senftenberg* and *S. schwarzengrund*.

緒　言

私達はサルモネラ食中毒の予防を目的に，健康人のサルモネラ保菌状況，市販食肉および加工品における本菌の汚染，と場排水や河川水および下水について分布調査を行い，これらの食品や環境がサルモネラで極度に汚染されていることを明らかにした[1-4]．

一方，東京都内におけるサルモネラ食中毒事件は近年著しく増加し，1963年以前では年間1～3事例であったが現在では年間15事例にもおよんでいる．これらの食中毒の原因食品や原因菌型には特徴が認められ，それらの実態を把握することは本菌食中毒予防に必要な基礎資料を提供するものと考えられる．

そこで，著者らは1966年から1975年の10年間に東京都内で発生したサルモネラ食中毒の疫学と細菌学的検討の結果から得られた成績にもとづいて，本菌食中毒の特徴とその問題点について報告する．

疫学調査成績

1. 年次別月別発生状況

東京都において1966～1975年の10年間に届出された食中毒事例は1,604件，患者数34,217名であった．このうち原因が判明した細菌性食中毒の事件数は1,022件，患者数25,045名であった．これらの食中毒の原因菌は腸炎ビブリオ，黄色ブドウ球菌，サルモネラ，病原大腸菌，耐熱性ウェルシュ菌およびエルシニヤ・エンテロコリティカであった．

サルモネラ食中毒は10年間で119事例（11.6%）患者数4,565名（18.2%）であった．Table 1に年次別，月別サルモネラ食中毒発生状況を示した．年間の発生件数は年次別に多少の変動はみられるが，年間10件前後であった．119事例のうち26事例（患者数103名）は家族内発生であった．

月別発生状況には特徴がみられ，6月，7月，8月，9月に多発し，この4カ月間に発生した事件数は全体の

* 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

Table 1. Incidence of salmonella food poisoning in Tokyo, by year and month

Year	Month												Total
	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	
1966				2(18)					3(65)	1(9)			6(92)
1967				1(19)	4(85)	2(8)	4(63)	2(69)				1(12)	14(256)
1968				1(2)	2(51)		2(15)	2(60)	1(3)	2(57)		1(3)	11(191)
1969						2(116)		3(12)	3(32)	2(24)			10(184)
1970					7(124)	3(107)	4(41)	1(39)		1(327)		1(12)	17(650)
1971	1(6)			1(5)		5(127)	3(100)	5(42)	1(22)	1(35)		1(5)	18(342)
1972			1(5)	1(2)	1(6)	2(1,119)	2(5)	4(389)	1(14)				12(1,540)
1973					2(68)	2(81)	2(401)	2(187)	2(61)	1(38)		1(4)	12(840)
1974			1(4)		2(18)	3(15)	1(3)	2(39)	2(15)				11(94)
1975			1(3)		1(17)	1(292)	1(17)		4(47)				8(376)
Total	1(6)		3(12)	6(46)	19(369)	20(1,865)	19(645)	21(841)	17(259)	8(490)		5(36)	119(4,565)

( ) : Number of cases

81%を占めている．一方，冬季から早春にかけての発生は概して少ない傾向を示した．

2. 原因施設別発生状況

原因食品の調製施設別食中毒発生件数は，和・洋食堂や中華飯店などの飲食店が27事例で最も多く，ついで旅館17事例，総菜店，パン屋あるいは肉店舗などの小売店14例，会社や事業所の給食施設13例，仕出し屋11例，学校5例，結婚式場3例および病院3例であった．家族内発生は26事例みとめられたがそのサルモネラ汚染源に関しては明らかにし得なかった．

3. 推定原因食品

各事例についての原因食品の決定は，患者の喫食調査および残存していた食品からの病原菌検索成績によった．

Table 2. Vehicles of infection in salmonella food poisoning

Vehicles	No. of outbreaks	No. of cases
Meat and its products	19	537
Egg and its products	5	1,130
Vegetable and its products	4	384
Japanese style confection	2	18
Raw seafoods (“Sashimi”)	1	17
Compound dish		
Salad	5	129
Sandwich	3	36
Omelet	2	26
“Sushi”	1	7
Noodle	3	407
Milk shake	1	31
Chinese dishes	6	130
Subtotal	52	2,852
Unknown	67	1,713
Total	119	4,565

原因食品が判明した事例は Table 2 に示すごとく，119事例中52事例（43.7%）であった．このうち最も多い食品は食肉およびその加工品で19事例，その内訳はローストチキンなどの鶏肉料理が6事例，焼とり6事例，ニワトリやブタの肝臓の生食6事例，ハンバーグ1事例であった．卵および卵加工品では生卵が3事例，たまご焼によるものが2事例であった．食肉店などで調製されたサラダ5事例，その他漬物，野菜のごまあえ，納豆および豆腐によるものも少数例認められた．

なお，中華料理による6事例の原因食品の細目は不明である．

4. 潜伏時間および臨床症状

潜伏時間と臨床症状は上記の119事例のうち，原因食品の喫食時間が明らかで，しかも患者の大半について菌検索が実施できた44事例の患者1,442名を対象に調査を行った．

潜伏時間は，原因食品喫食時を基礎とし，2時間間隔で集計した．潜伏時間の最短は2時間，最長74時間であった．患者1,442名の平均潜伏時間は26.1時間であったが各事例ごとの平均潜伏時間には著しい差異が認められ，最も短い事例では9時間，最長は39時間であった．

つぎに患者の臨床症状は Table 3 に示すごとくである．主症状は下痢，発熱，腹痛および頭痛であった．便性状は大部分の患者が水様便であったが，173名（12.0%）に粘液あるいは粘血便がみられ，少数例の患者は裏急後重を訴えた．

発熱は，37°～38°のものが191名（19.2%），38°～39°が490名（49.1%），39°～40°が257名（25.8%），40°以上の高熱のものが59名（5.6%）であった．

Table 3. Symptoms of food poisoning due to *Salmonella*

Symptoms	Number of cases(%)
Diarrhea	1,426 (98.9)
Fever	1,171 (81.2)
Abdominal pain	1,139 (79.0)
Headache	956 (66.3)
General lassitude	836 (58.0)
Chill	694 (48.1)
Nausea	514 (35.6)
Vomiting	232 (16.1)
Tenesmus	221 (15.3)

細菌学的検査成績

1. 材料および方法

1) 被検材料 サルモネラの検査は採便が可能であった発病者および同時に喫食したが症状のみられなかった非発病者のふん便を対象に行った．推定原因食品の残品が存在した場合にはそれについても菌検索を行った．

2) サルモネラの分離および同定 ふん便および食品からのサルモネラの検索は善養寺・坂井[5]の記載に準じて行った．すなわち，直接分離培養と増菌培養を併用した．直接分離培養にはＳＳ寒天と DHL 寒天を用い，増菌培養には，1966～1970年まではセレナイト培地，1971～1974年まではラパポートの培地[6]，1975年は Ivesonらの塩化ストロンチュウム培地[7]を用いた．

サルモネラの同定は Kauffmann の方法[8]に従った．

原因食品中のサルモネラ菌数は被検材料を生理食塩液で10段階希釈し，その 0.1 m*l* を DHL 寒天にコンラージ棒で全面塗布し，37°，18～24 時間培養後，発育したサルモネラ集落数を確認して算定した．

3) 菌型の決定 分離菌株のＯ群別は，Ａ—Ｅ群までのＯ群は市販診断用抗Ｏ血清（市販品：東芝化学工業），それ以外の Ｏ 群は自家調製の Ｏ 抗因子血清を用い，スライド凝集反応により行った．Ｈ 抗原の決定は Kauffmann[8] に従って自家調製した抗Ｈ因子血清を用い常法により行った．Ｈ抗原の相誘導は Jameson[9] の方法によった．

2. 成　績

1) 原因食品からのサルモネラ検出状況 原因食品が明らかにされた52事例のうち，原因食品の残品から患者ふん便由来菌株と同一菌型のサルモネラが検出された事例は Table 4 に示すごとく 6 事例であった．

残存食品中のサルモネラ菌数は，事例によって著しく異なっており，最も多いものはオムレツを原因食とした事例 2 (Table 4) の場合で，当該食品 1g 当り 1.5×10^8 個のサルモネラが認められた．なお No. 6 の事例の場合は，豆腐の原料である「こし豆」からも患者由来と同一の *S. typhimurium* が検出された．

2) 食中毒事例のサルモネラ菌型 過去10年間に東京都内で発生したサルモネラ食中毒事件 119 事例の原因菌型はＢ群 7 菌型，C_1 群 8 菌型，C_2 群 7 菌型，Ｄ群 2 菌型，E_1 群 2 菌型，E_2 群 1 菌型，E_4 群 2 菌型およびＩ群 1 菌型，計30菌型であった．

食中毒事例を菌型別にみた発生頻度は Table 5 に示すごとく，*S. typhimurium* によるものが最も多く36例，ついで *S. enteritidis* 15例，*S. thompson* 14例，*S. infantis* 10例などであった．

本菌食中毒 119 事例のうち 5 事例においては同一集団発生例の患者ふん便より 2 菌型のサルモネラが検出された．その血清型は *S. typhimurium* と *S. infantis*, *S. heidelberg* と *S. senftenberg*, *S. isangi* と *S. agona*, *S. bareilly* と *S. infantis* および *S. newport* と *S. infantis* である．なお，2 菌型が検出された事例の場合は原因の主体と考えられた菌型を当該事例の原因菌としてTable 5 には掲載した．

3) 食中毒事例サルモネラ菌型の年次別推移 サルモネラ食中毒事例の 原因菌型の 年次別出現頻度を Table 5 に示した．*S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. thompson*, *S. infantis* の 4 菌型による事例はほとんど毎年継続して流行がみられているが，その他の菌型の場合は，年ごとに大きく変動している．1966年の *S.*

Table 4. Isolation of *Salmonella* from incriminated foods

Outbreaks No.	Date	No. of cases	Vehicles	*Salmonella* viable counts/g	Serotypes
1.	Aug., 1967	47	Salad	1.5×10^2	*S. oranienburg*
2.	Aug., 1968	19	Omelet	1.5×10^8	*S. blockley*
3.	May, 1970	57	Salad	3.7×10^3	*S. typhimurium*
4.	June, 1970	57	Bean curd	2.0×10^3	*S. typhimurium*
5.	Apr., 1971	5	Vegetable salad with pounded sesame dressing	1.6×10^2	*S. enteritidis*
6.	Aug., 1972	263	Pickles	1.8×10	*S. thompson*

livingston による事例をはじめとし，*S. dublin*, *S. bovismorbificans*, *S. kottbus* および *S. hvittingfoss* による集団食中毒事例はわが国ではこれまでに認められていない最初の事例である．

4) 散発下痢症および健康者由来サルモネラ菌型の年次別推移 前述の東京都内に発生した集団食中毒事例とは別に，散発下痢症患者あるいは健康者から検出されるサルモネラの菌型の検討は都内におけるサルモネラ症の流行菌型の実態を把握するうえで極めて重要であろう．そこで，本研究では都内の散発下痢症，ならびに健康人から検出されるサルモネラ菌型についても併せて検討した．

供試した散発下痢症由来株は1967～1975年の9年間に東京都内の都立病院（荏原，墨東，豊島，駒込），済生会中央病院で赤痢と診断された患者あるいは外来下痢患者から検出され，当研究所に同定依頼を受けた1,655菌株と，同9年間における東京都立監察医務院での剖検例で，著者らによって死亡者の腸管内容物あるいは血液から検出されたサルモネラ10菌株，合計1,665菌株である．

最近9年間に散発下痢患者ふん便から検出された1,665菌株のO群は大部分A群からE群に属し，これ以外のO群は極めて少なく，わずかに6株（0.4%）であった．これらの菌株の菌型は55菌型で，年次別出現菌型は1967年では32型，1968年22型，1969年29型，1970年25型，1971年25型，1972年25型，1973年17型，1974年28型，1975年31型である．検出頻度の高い菌型は Table 6 に示すごとく，集団食中毒の場合と同様に *S. typhimurium* が最も多く，ついで *S. thompson*, *S. infantis*, *S. enteritidis* の順であった．これらの菌型のうち *S. typhimurium* は年々増加し，1967年には分離株の32%であったが，1970年以降では分離菌株の半数以上を占めている．これ以外では *S. panama* も増加が注目され，

Table 5. Serotypes of *Salmonella* from food poisoning by year

Serotypes	Year										Total
	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	
S. typhimurium	2*(18)**	6(131)	3(56)	2(6)	4(120)	2(24)	5(18)	3(446)	5(53)	4(68)	36(940)
S. enteritidis	1 (50)		2(4)	2(119)	3(65)	3(72)	1(121)	3(167)			15(598)
S. thompson			1(41)	4(36)	4(356)		1(263)	1(4)	2(11)	1(292)	14(1,003)
S. infantis				1(17)	1(14)	3(78)	1(2)	1(23)	2(19)	1(3)	10(156)
S. heidelberg		3(23)						1(53)			4(76)
S. isangi					1(6)	1(6)		1(101)			3(113)
S. san-diego			2(19)			1(20)					3(39)
S. bareilly						3(20)					3(20)
S. bovis-morbificans						2(75)					2(75)
S. derby		1(19)	1(49)								2(68)
S. give					1(35)		1(14)				2(49)
S. senftenberg						1(7)		1(38)			2(45)
S. schwarzengrund				1(6)		1(35)					2(41)
S. blockley			1(19)		1(9)						2(28)
S. potsdam									1(8)	1(10)	2(18)
S. livingstone	2 (15)										2(15)
S. montevideo	1 (9)						1(3)				2(12)
S. kottbus							1(1,112)				1(1,112)
S. oranienburg		1(47)									1(47)
S. newport					1(39)						1(39)
S. saint-paul		1(28)									1(28)
S. krefeld								1(8)			1(8)
S. muenchen							1(7)				1(7)
S. nagoya					1(6)						1(6)
S. newington		1(5)									1(5)
S. hvittingfoss						1(5)					1(5)
S. java									1(3)		1(3)
S. dublin			1(3)								1(3)
S. anatum		1(3)									1(3)
S. litchfield										1(3)	1(3)

*: Number of outbreaks, **: Number of cases

Table 6. Yearly shift of most common serotypes of *Salmonella* from sporadic cases

Serotypes	Year									Total
	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	
S. typhimurium	85(32.7)*	27(24.3)	81(38.0)	107(53.8)	96(54.2)	114(59.7)	63(67.0)	91(54.2)	138(54.8)	802(48.2)
S. thompson	23(8.8)	8(7.2)	22(10.3)	15(7.5)	6(3.4)	3	0	3	5	85(5.1)
S. infantis	9	4	15(7.0)	12(5.0)	15(8.5)	9(4.7)	1	9(5.4)	10(4.0)	84(5.0)
S. enteritidis	14(5.4)	12(10.8)	14(6.6)	9(4.5)	10(5.6)	12(6.3)	2	0	3	76(4.6)
S. heidelberg	26(10.0)	8(7.2)	4	2	2	7(3.6)	2	2	5(2.0)	58(3.5)
S. derby	7	9(8.1)	7	4	6(3.4)	2	0	1	2	38(2.3)
S. schwarzengrund	2	4	10(4.7)	6	6(3.4)	4	2	1	3	38(2.3)
S. blockley	6	11(9.9)	6	5	2	2	1	0	0	33(2.0)
S. typhi	0	3	3	7(3.5)	0	6(3.1)	4(4.3)	7(4.2)	3	33(2.0)
S. anatum	7	3	5	2	7(4.0)	1	2	1	4	32(1.9)
S. senftenberg	6	1	6	4	3	2	0	1	2	25(1.5)
S. give	4	4	0	4	0	2	0	4	7(2.8)	25(1.5)
S. tennessee	4	1	1	0	1	1	0	10(6.0)	2	20(1.2)
S. montevideo	10(3.8)	3	0	2	1	1	1	1	2	21(1.3)
S. panama	3	1	0	0	2	0	3	11(6.5)	19(7.5)	39(2.3)
Subtotal	206(79.2)	99(89.2)	174(81.7)	179(89.9)	157(88.7)	166(86.9)	81(86.2)	142(84.5)	205(81.3)	1,409(84.6)
Other serotypes	54(20.8)	12(11.8)	39(18.3)	20(10.1)	20(13.1)	25(13.1)	13(13.8)	26(15.5)	47(18.7)	256(15.4)
Total	260	111	213	199	177	191	94	168	252	1,665(100.0)

* ( ) : %

Table 7. Yearly shift of most common serotypes of *Salmonella* from healthy carriers

Serotypes	Year										Total
	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	
S. typhimurium	16(7.9)*	23(5.8)	33(10.6)	66(10.6)	122(14.5)	94(13.8)	136(18.9)	200(24.4)	85(19.0)	61(11.8)	836(15.0)
S. infantis	3	9	16	34	40(4.8)	84(12.3)	73(10.2)	57(6.9)	34(7.6)	46(8.9)	396(7.1)
S. thompson	6	19	24(7.7)	54(8.7)	92(10.9)	24	9	29	22(4.9)	19(3.7)	298(5.4)
S. senftenberg	2	23(5.8)	26(8.4)	49(7.9)	29	20	64(8.9)	36(4.4)	18(4.0)	15	282(5.1)
S. schwarzengrund	11(5.4)	9	16	48(7.7)	63(7.5)	45(6.6)	26(3.6)	17	6	16	257(4.6)
S. anatum	18(8.9)	33(8.3)	14	47(7.6)	40(4.8)	26	21	28	11	8	246(4.4)
S. heidelberg	22(10.9)	46(11.5)	25(8.0)	33	28	16	10	16	3	6	205(3.7)
S. derby	10(5.0)	21	30(9.6)	19	0	28(4.1)	18	28	12	2	168(3.0)
S. give	1	3	4	2	27	37(5.4)	38(5.3)	43(5.2)	14	35(6.7)	204(3.7)
S. montevideo	3	17	13	30	21	8	15	28	8	5	148(2.7)
S. tennessee	4	51(12.8)	8	22	16	5	10	1	18(4.0)	16	151(2.7)
S. blockley	2	6	14	26	52(6.2)	14	7	10	0	0	131(2.4)
S. enteritidis	2	11	10	19	28	20	14	18	4	8	134(2.4)
S. bredeney	7	32(8.0)	2	20	30	3	7	9	3	1	114(2.0)
S. panama	0	2	2	4	5	13	4	40(4.9)	42(9.4)	62(11.9)	174(3.1)
Subtotal	107(53.0)	305(67.3)	237(76.2)	473(76.2)	593(70.5)	437(64.0)	452(63.0)	560(68.2)	280(62.6)	300(57.8)	3,744(67.3)
Other serotypes	95(47.0)	95(23.7)	74(23.8)	148(23.8)	248(29.5)	245(36.0)	266(37.0)	261(31.8)	167(37.4)	219(42.2)	1,818(32.7)
Total	202	400	311	621	841	682	718	821	447	519	5,562(100.0)

* ( ) : %

1964年にはまったく認められなかったものが1974年は分離株の6.5%，1975年には7.5%を占めるようになった．これに反して，*S. thompson* や *S. enteritidis* はやや減少している．

死亡例から検出されたサルモネラの血清型は *S. typhimurium* が4例，*S. infantis* が2例および *S. kiambu*, *S. enteritidis*, *S. agona*, *S. derby* が各1例であった．

つぎに，健康人由来のサルモネラの場合は1966～1975年の10年間に東京都内在住の健康人から当研究所で分離した菌株，および東京都予防医学協会で分離し，当研究所に同定依頼された菌株計5,562菌株についてO群および菌型を検討した．O群別では，散発下痢症由来株に比較してA—E群以外のものが多く141菌株（2.5%）であった．5,562菌株の菌型は96菌型に達した．そのうち高頻度に検出された上位15菌型を年次別にみると，Table 7 に示すごとく散発下痢患者由来株の菌型の場合と同様な傾向がみられた．すなわち増加してきた菌型は *S. typhimurium*, *S. infantis* および *S. panama* であり，逆に減少しているのは *S. heidelberg*, *S. blockley* などであった．

考　察

東京都内におけるサルモネラによる集団食中毒例は最近急激に増加し，また本菌による散発下痢患者も著しく増加している[10-12]．こうした集団例や散発例によるサルモネラ症の増加の原因として，食肉，鶏卵およびそれらの加工品，家畜，家禽，愛がん動物およびそ族昆虫などのサルモネラ汚染が指摘されている．最近10年間に東京都内で発生した本菌食中毒の原因食品を検討した結果，食肉や鶏卵およびそれらの調理食品によるものが最も多くそれらの食品が本食中毒の感染源として極めて重要であることが確認された．しかも，食肉や鶏卵の生食による発生例および患者数は少なく，大規模な集団発生例の多くは食肉や鶏卵を原料にした加熱調理食品によるものであった．従ってこれらの食品は，食肉や鶏卵の調理過程と喫食までの間にサルモネラの二次汚染を受けたものと推察されよう．この場合の二次汚染源としては寺山ら[13]がすでに指摘しているように，サルモネラ汚染率が高い食肉を取扱った後の調理台，まな板，ふきんなどの調理器具が主要な媒体となっているのではなかろうか．

また感染源として従来からネズミが重要視されているが，著者らの今回の報告例では，林ら[14]が報告した"けずりぶし"による大規模な発生例のようにネズミが直接関与したと推察される事例は全く認められなかった．

一方，米国では，愛がん用カメから感染したサルモネラ症が多数報告されている[15]．本邦においても中森ら[16]の報告があり，また著者ら[17]の成績では輸入カメから高頻度にサルモネラが検出されている事実から本菌感染症の感染源として愛がん用カメも極めて重要であろう．

つぎに，サルモネラ食中毒，散発下痢症および健康人由来のサルモネラ菌型は極めて多彩であることが認められた．1949～1963年にヒトから検出されたサルモネラのSakazakiら[18]の報告では，*S. enteritidis* が主体で，ついで *S. typhimurium*, *S. thompson* など40菌型であった．今回の成績では，*S. typhimurium* が最も多く，ついで *S. infantis*, *S. thompson*, *S. senftenberg* など98菌型にもおよんでいる．これらのヒト由来のサルモネラ菌型は最近欧米諸国[19-21]で報告されている菌型と極めて類似していることは興味深い点と云えよう．こうした主菌型の入れ代りの原因は，近年，食肉，乾燥卵，飼料などが多量に輸入され，しかもそれらの食品の高度なサルモネラ汚染が一因をなしているものと考えられる．

結　論

1966～1975年の10年間に東京都内に発生したサルモネラ食中毒の疫学および細菌学的検査成績はつぎのとおりである．

1. 10年間に東京都内に発生したサルモネラ食中毒事件は119事例，患者数4,565名であった．月別発生では5～9月に多発する傾向が認められた．

2. 本菌食中毒の原因食品は食肉およびその調理食品が最も多く19件，ついでサラダ，サンドウィッチであった．

3. 平均潜伏時間は26.1時間で，主症状は下痢（98.9%），発熱（81.2%），腹痛（79.0%）であった．

4. 食中毒の流行菌型は年々多彩化が認められ，全体で30菌型であった．主菌型は *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. thompson*, *S. infantis* であった．

5. 散発下痢患者由来株は55菌型で，主菌型は *S. typhimurium*（48.2%），*S. thompson*（5.1%），*S. infantis*（5.0%），*S. enteritidis*（4.6%）であった．

6. 健康成人および学童から検出されたサルモネラは96菌型で，主菌型は散発下痢患者由来株の菌型と類似していた．

文　献

1) 善養寺　浩：日本公衛誌，16，680，1969
2) 善養寺　浩：日本公衛誌，16，729，1969
3) 善養寺　浩：バイオテク，3，117，1972
4) 坂井千三：メディアサークル，14，27，1969
5) 善養寺　浩，坂井千三：腸管系病原菌の検査法，153，1967，医学書院

6) Rappaport, F., N. Konforti, and B. Navon: *J. clin. Path.*, **9**, 261, 1956
7) Iveson, J. B. and E.M. Mackay-Scollay : *J. Hyg.*, **67**, 457, 1969
8) Kauffmann, F.: *The Bacteriology of Enterobacteriaceae*, **55**, 1966, Muksgaard, Copenhagen
9) Jameson, J.E.: *Mon. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.*, **20**, 14, 1961
10) 斎藤 誠，山口 剛，佐藤 肇：日伝染誌，**39**，102，1965
11) 丹治 汪，平山 顕，高山康雄，今川八束，大木 久，板倉志津子，林 勝利：日伝染誌，**42**，161，1968
12) 松原義雄：綜合臨牀，**23**，2009，1974
13) 寺山 武，五十嵐英夫，潮田 弘，池島伸至，斎藤香彦，善養寺 浩：東京衛研年報，**23**，7，1971
14) 林 徹雄，猶明義雄，吉本善次郎，坂井敏郎ら：食品衛生研究，**21**，53，1971
15) Lamm, S.H., A. Taylor, E.J. Gangarosa, H.W. Anderson, W. Young, M.H. Clark, and A.R. Bruce: *Am. J. Epidemiol.*, **95**, 511, 1972
16) 中森純三，宮崎佳都夫，西尾隆昌，土井秀之，辻徹太郎ら：臨床と細菌，**3**，88，1976
17) 伊藤 武，坂井千三，加藤俊子，上村知雄，中村 義：麻布獣医科大学研究報告，**1**，45，1976
18) Sakazaki, R. and R. Nakaya: 長崎大学風土病紀要，**6**，167，1964
19) Vernon, E. and H. Tillet: *Publ. Hlth.*, **88**, 225, 1974
20) McCoy, J.H.: *J. Hyg.*, **74**, 271, 1975
21) Aserkoff, B., S. A. Schroeder, and P. S. Branchman: *Amer. J. Epid.*, **92**, 13, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 24—28, 1976

培養 Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞コロニー法による大腸菌易熱性エンテロトキシンの検出

工藤泰雄*, 松下 秀*, 善養寺 浩*, 坂井千三*

Detection of Heat-labile *Escherichia coli* Enterotoxin by a Method of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cell Colony

YASUO KUDOH*, SHIGERU MATSUSHITA*, HIROSHI ZEN-YOJI* and SENZO SAKAI

Although the conventional Chinese hamster ovary cell assay for heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* is superior on its specificity and sensitivity to animal assays used so far, it had some difficulties in reading the results, and sometimes gave false positive reactions. To improve this, we did make an attempt to utilize the colonial CHO-K_1 cell cultures for the toxin assay, as an alternative of the use of the individual cell cultures.

When cultured CHO colonies were incubated with a dilution more than one hundredth of original culture filtrate of heat-labile enterotoxin producing *E. coli*, smooth round colonies gave the flowery shape of chrysanthemum in appearance due to the elongation of individual cell forming the colonies 18 to 24 hours after incubation with the toxin. This colonial changes were found to be more clear and easier to observe than those of individual cellular changes, and therefore false positive reactions were decreased remarkably in this method. Besides, the results obtained by this method were reliable and accurate in comparison with ordinary methods, thus suggesting that this system will be satisfactory and useful for detecting *E. coli* capable of producing heat-labile enterotoxin.

近年，コレラの発症機転の解析は目ざましい進展をみせ，コレラ特有の下痢がコレラ菌の産生するエンテロトキシンによることが明確にされるに伴い[1]，大腸菌[2]をはじめ腸炎ビブリオ[3]，ウェルシュ菌[4]，セレウス菌[5]などによる腸炎の発症にも菌の産生するある種のエンテロトキシン様物質が密接に関連していることが明らかにされてきた．

大腸菌では，現在少くともたん白性の易熱性毒素（以下ＬＴと略す）[2]と低分子の耐熱性毒素（以下ＳＴと略す）[2]の２種のエンテロトキシンが知られているが，両毒素ともこれまでのところ未精製のためその下痢発現における役割が完全に解明されるまでには至っていない．しかし，両者のうちＬＴは，コレラエンテロトキシンと同様腸管粘膜上皮細胞内のアデニルサイクラーゼ活性化作用を有することが確認されていることから[2]，コレラ毒素とほぼ同じ機序で下痢発現に関与しているとみて差しつかえなかろう．

さて，大腸菌両毒素の検出法としては，これまでウサギ結紮腸管試験[6]，ウサギ皮内試験[7]，マウス胃内投与試験[8]などが主として用いられてきたが，それらはいずれも実験動物による方法のため手技の煩雑さ，経済性，特異性や感度など多くの点で難点があった．しかし，最近マウス副腎細胞[9]や Chinese hamster の卵巣由来腫瘍型細胞（以下 CHO-K_1 細胞と略す）[10]を用いた組織培養法がコレラ毒素だけでなく大腸菌ＬＴの検出法にも応用可能であり，その感度や特異性も従来の方法に比してきわめて秀れていることが報告された．

著者らも毒素産生性大腸菌と下痢症との関連を明確にする目的で，まず CHO-K_1 細胞による大腸菌ＬＴの検出法について検討を加えた結果，従来の単個細胞法[10]では成績の判定面などに難点があったため，新たに単個細胞から形成させたコロニーを用いる改良法を考案した．

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

本報ではその成績の概要について述べる．

材料と方法

1. 供試菌株

コレラ様下痢患者あるいは集団下痢症患者由来のＬＴおよびＳＴ産生大腸菌 B_2C 株（O 6：H 16)[11]，339 t 5 株（O15：H11)[12]および M9626—M1 株（O6：H16)[13]の3株を用いた．これらの菌株はそれぞれ Dr. Formal (Walter Reed Army Medical Center, U.S.A.), Dr. Gorbach (Veterans Administration Hospital, U.S.A.) および Dr. Wells (Center for Disease Control, U.S.A.) より分与を受けた．また，参考として当所で分離した細胞侵入型大腸菌 74—15株（O143), Dr. Moon (National Animal Disease Center, U.S.A.) より分与されたブタ下痢症由来ＳＴ単独産生大腸菌 431 株（O 101：NM)[14], Dr. Gorbach より分与された非病原性大腸菌 1111 a 株（O115)[15]および国立予防衛生研究所大橋博士分与のコレラ菌 569Ｂ株（イナバ型）を用いた．

2. エンテロトキシンの調製

毒素産生には Evans ら[7]のカザミノ酸を主体とした合成培地を用いた．この培地を 500 m*l* の3角フラスコにそれぞれ 100 m*l* 宛分注，121℃，15分間滅菌後使用した．本培地に，あらかじめ同培地で37℃，18時間前培養した被検菌液を 0.1 m*l* 宛接種，37℃で18時間振とう培養後 5℃で 15,000 r.p.m., 20分間遠心沈殿し，培養上清画分を得た．この上清画分をさらにメンブランフィルター（ポアサイズ 450 nm, Millipore Co.）でろ過除菌した無菌培養ろ液を毒素材料とした．

3. CHO-K_1 細胞によるエンテロトキシンの検出

用いた CHO-K_1 細胞は順天堂大学横田博士より分与を受けた．細胞の培養は，5％透析牛胎児血清（Gibco）加 F 12 培地（日水製薬）を用い，5％炭酸ガス存在下 37°Cで行なった[10]．

1) コロニー法：0.05％トリプシン溶液で処理した培養 CHO-K_1 細胞を上記 F 12培地で約20コ 1 m*l* に希釈し，その 5 m*l* をプラスチックシャーレ（直径 6 cm)にとり，7日間培養しコロニーを形成させた．コロニー形成を確認したら培地液をすて，ついで同培地で適宜希釈した毒素溶液を 5 m*l* 添加，一定時間培養後固定・染色し，個個の細胞の elongation 化にともなうコロニー全体の形態学的変化を観察した．本法では一試料当り約 100 個のコロニーについて検査し，総コロニー数に対する形態変化を起したコロニー数の比を求めた．

2) チェンバースライド法：Guerrant ら[10]の方法に準拠し，上記 F 12 培地で約 1×10^4/m*l* に希釈した培養 CHO-K_1 細胞液 0.5 m*l* を各チェンバー(8チェンバースライド，Lab-Tek）にとり培養した．3時間前培養した後培地液をすて，ついでＦ12培地で適宜希釈した毒素溶液を 0.5 m*l* 添加，24時間培養後固定・染色し，各細胞の elongation 化を観察した．1試料当り約 400個の細胞について検査し，総検査数に対する形態変化を起した細胞数の比を求めた．

4. 粗エンテロトキシン抗血清の調製

B_2C および 339 t 5 株の培養ろ液から90％硫酸アンモニウム塩析により得た沈殿画分を透析後凍結乾燥し抗原とした．本標品 10 mg を生理食塩液 1 m*l* に溶解，等量の Freund の complete adjuvant と混合後，体重約 2.5 kg のウサギ筋肉内に 4 日間隔で 3 回接種した（2，3回目の抗原量は 20 mg および 30 mg)．1カ月後に抗原 40 mg を上記同様に追加免疫し，最終接種10日後に全採血，抗血清を得た．

5. 毒素の中和試験

前記Ｆ12培地で5倍に希釈した毒素溶液（培養ろ液）と同培地で10倍に希釈した抗粗毒素血清を等量混合し，37℃で1時間反応させた後その残存活性を前記3で述べたコロニー法により検討した．また，対照には正常ウサギ血清を用いた．

結　果

1. 大腸菌 LT の CHO-K_1 細胞コロニーにおよぼす効果

著者らが今回考案した CHO-K_1 細胞コロニー法の毒素検出法としての有用性を明らかにするため，毒素の細胞コロニーの形態学的変化におよぼす諸種の因子についてまず基礎的検討を加えた．

供試大腸菌各菌株から調製した培養ろ液を用いて CHO-K_1 細胞の毒素と反応後の形態学的変化を経時的に観察した結果を図1に示した．図から明らかなごとく，ＬＴおよびＳＴ産生株である B_2C，339 t 5 および M9626—M1 の3株ではいずれも反応後約12時間前後からコロニーの明らかな形態変化が観察され，形態変化を起したコロニーの比率は24時間で最高に達し，ほぼ48時間まで同じ値を示した．これに対し，対照として用いたＳＴ単独産生株（431)，細胞侵入型株（74-15）および毒素非産生株（1111ａ）では観察48時間までコロニーの形態変化を示したものはなく，この細胞変化が大腸菌ＬＴによる特有な反応にもとづくことが示された．大腸菌ＬＴによる24時間後の典型的なコロニーの形態変化は図 2ａに示すごとく，コロニー全体が個々の細胞の elongation 化により菊花状を呈するのが特徴であり，反応陰性の場合（図 2ｂ）と容易に鑑別できる．以上のごとく大腸菌ＬＴによるコロニーの形態変化は反応24時間で確実に観察

できることから，以後の実験ではすべてこの条件にしたがった．

つぎに，コロニーの形態変化におよぼす毒素濃度の影響について毒素活性の確認された3株の培養ろ液を用いて検討した．その結果は図3に示すとおりで大腸菌LTによるコロニーの変化にはいずれの株の場合も対照として用いたコレラ毒素（培養ろ液）と同様高い濃度依存性が認められた．ただ，各菌株培養ろ液の毒素活性を示しうる最大希釈は 100～1,000 倍と差があり，産生毒素量は菌株によりかなり異なることが示唆された．またさらに，これらの培養ろ液が示す活性に対する加熱の影響について検討した結果，コレラ毒素の場合と同様いずれも100℃，30分の加熱で完全に失活した（表1）．

大腸菌LTが示すCHO-K_1細胞の形態学的変化の特異性を確かめるため，つぎに B_2C および 339 t 5 株粗毒素で作製した抗血清による毒素中和試験を行なった．その成績は表2に示すごとく，対照として用いた正常ウサギ血清ではほとんど毒素活性の低下が認められなかったのに対し，抗毒素血清では毒素活性はほぼ完全に中和された．また，両抗毒素血清ともそれぞれの対応毒素だけでなく菌株を異にする毒素の活性も中和したことは，大腸菌の産生するLTがいずれも免疫学的に同一であることを示すものであろう．

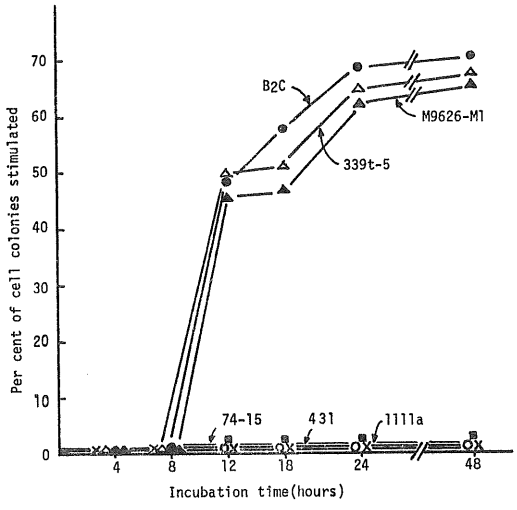
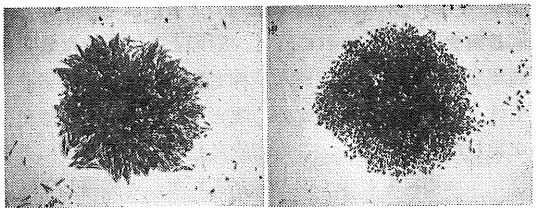


Fig. 1. Time course of morphological responses in CHO-K_1 cell colonies with *E. coli* culture filtrates. One tenth of original culture filtrates was used.



a b

Fig. 2. Cultures of CHO-K_1 cell colonies incubated for 24 hr in 0.1 dilution of culture filtrates of toxigenic *E. coli* B_2C (a) and nontoxigenic *E. coli* 1111 a (b)

2. CHO-K_1 細胞による大腸菌 LT 検出法の比較

上述の成績から，今回考案したコロニー法も大腸菌LTの検出法として十分特異性のあることが確かめられたので，さらに本法と従来の単個細胞の形態変化をみるチェンバースライド法[10]との検出法の差異について比較検討した．実験には最も強い毒素活性の認められた B_2C 株の培養ろ液を用い，その 10～5,000 倍希釈各毒素による

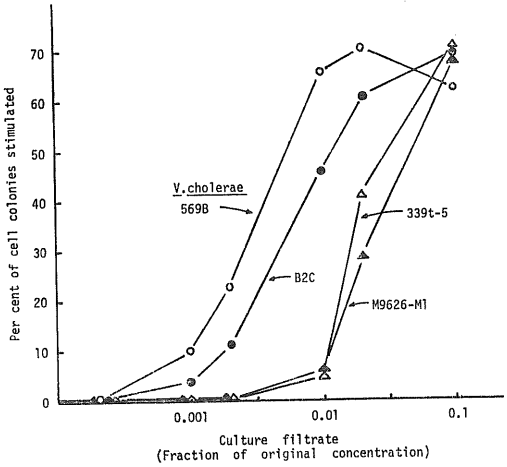


Fig. 3. Morphological responses in CHO-K_1 cell colonies incubated for 24 hours with *E. coli* enterotoxin

Table 1. Effect of heat on *E. coli* heat-labile enterotoxin stability

Strain	Enterotoxin* (Culture filtrate)	Heat treatment	
		Untreated	100C, 30min
E. coli			
B_2C	0.1	70.2	2.0
	0.02	63.6	3.0
339 t 5	0.1	70.2	1.8
	0.02	42.0	2.0
M 9626-M1	0.1	60.8	0.0
	0.02	36.9	0.0
V. cholerae			
569B	0.02	79.0	2.3

* Fraction of original concentration.
Figure indicates per cent of cell colonies stimulated.

Table 2. Cross neutralization of *E. coli* heat-labile enterotoxin with anti crude *E. coli* toxin sera

Enterotoxin* (Culture filtrate)	Neutralization with		Control (Normal serum)
	Anti B_2C toxin	Anti 339 t 5 toxin	
B_2C	3.6	0.0	46.3
339 t 5	0.0	0.0	40.7
M 9626—M 1	7.0	1.3	33.8

* One fifth of original culture filtrate was used.
Figure indicates per cent of cell colonies stimulated.

Teble 3. Comparison of two methods for *E. coli* heat-labile enterotoxin assay by CHO-K_1 cells

Enterotoxin* (Culture filtrate)	Method	
	Single cell	Colony
0.1**	68.4±2.7	69.7±2.8
0.02	43.6±3.7	60.9±3.4
0.01	26.7±3.6	45.1±3.6
0.002	13.2±1.9	10.8±0.8
0.001	10.6±2.0	3.3±0.7
0.002	8.6±1.5	0.6±0.4
Control(medium)	8.3±1.0	0.4±0.3

* Culture filtrate obtained from B_2C strain was used.
** Fraction of original concentration.
Figure indicates mean of five values±SE.

細胞の形態変化率を両法でそれぞれ検討した．5回の実験による細胞あるいはコロニーの平均形態変化率は表3に示したごとく，コロニー法では培養ろ液の1,000倍希釈前後まで毒素検出が可能であり，その毒素検出感度は従来のチェンバースライド法となんらそん色ない結果であった．さらに，チェンバースライド法では対照においても毎常約8％前後の形態変化が認められたのに対し，コロニー法ではこうした偽陽性反応はほとんどみられず，また各毒素濃度での反応性もチェンバースライド法に比して強く明瞭であることが示された．

考　察

Sack ら[12]によりエンテロトキシン産生大腸菌によるヒトのコレラ様下痢症が報告されて以来，こうした毒素産生性大腸菌による下痢症は成人だけでなく乳幼児の下痢症としてもきわめて重要なことが明らかにされつつある[16-18]．しかも，下痢症の原因として報告された毒素産生性大腸菌の多くはこれまで起病性があるとされてきた病原大腸菌と血清型を異にしており，またその毒素産生性がプラスミッド支配を受け *in vitro* で他の菌に伝達しうることから[19]，特定の血清型菌に限らずすべての大腸菌が腸炎起病性を発揮しうる可能性のあることが示唆されてきている．これらの事実は，大腸菌下痢症の解析が従来の病原大腸菌だけを対象とした血清型別だけでは不十分であり，さらに菌の毒素産生性も併せて検討する必要のあることを示しているといっても過言ではない．

著者らはこうした解析には，まず確実な毒素の検出法の確立が不可欠なことから，今回 Guerrant ら[10]により報告された CHO-K_1 細胞を用いた大腸菌 LT の検出法について検討を加えた．この方法は，CHO 細胞が LT による細胞内アデニールサイクラーゼ活性化とそれに続く細胞内サイクリック AMP の上昇と平行して形態変化（elongation）を起すことにもとづいたものであり，従来の実験動物を用いた方法に比し 5～100 倍感度がよいとされている．著者らの予備的検討の成績でもほぼ同様の結果が得られたが，Guerrant らの方法では400個以上の細胞の形態変化をみる必要があると同時にその判定に難かしさがあり，また対照においてもかなりの偽陽性反応がみられるなどいくつかの問題点が指摘された．

そこで著者らはさらにこうした点を改善する目的で，従来のチェンバースライドなどを用いた単個細胞法に代るコロニー法を考案した．既述のごとく，本法はコロニーを構成する個々の細胞の elongation による細胞全体の形態変化を観察するため，反応がみやすく判定も容易であり，またその反応が LT による特異的な反応であることも確認された．さらに，本法は従来の単個細胞に比して偽陽性反応は少なく，特異性や感度の点でも十分満足できることが示された．ただ，本法では細胞のコロニーを形成させるのに約1週間を要するため迅速性に欠ける欠点はあるが，上述の点を考慮すれば本法は従来法以上に有用であり，ルチンの毒素検出に十分応用する価値のある方法といえよう．

以上のごとく，今回大腸菌 LT の検出法として従来の方法を改良した CHO-K_1 細胞コロニー法は，十分実用性のある方法であることが確認された．

一方，大腸菌の産生する ST は，少なくとも本法では何らの反応も示さず LT とはその作用機序を異にすることが示唆された．これまで，ヒトの大腸菌下痢症では，

ＬＴがその作用が明確にされていること，また下痢症由来の毒素原性大腸菌がいずれもＬＴを産生することから重要視され，ＳＴについてはあまりかえりみられなかったといってもよかろう．しかし，ごく最近ＳＴ単独産生株によるヒトの下痢症がSackら[20]により報告され，また我々もＳＴ単独産生株による７事例の集団下痢症（O159：H20，６事件およびO11：H27，１事件）を明らかにした[21]．こうした事実はこれまで動物の下痢症で重要視されていたＳＴがヒトの場合にもＬＴと同様重要な役割を演じていることを強く示唆するものであり，今後ＳＴの作用機序もＬＴとの対比のうえで早急に解明される必要があろう．その解明は，また一方では特異性，感度の高いＳＴの検出法の開発にもつながるといえる．

結　論

培養 CHO-K_1 細胞を用いた大腸菌易熱性エンテロトキシン検出法は，従来の実験動物を用いた方法に比し感度，特異性などの点できわめて秀れた方法であるが，偽陽性反応の出現や成績の判定などに難点があったため，これらの点を改良したコロニー法を考案した．

本法はコロニーを構成する個々の細胞の elongation による細胞全体の形態変化を観察する方法であり，そのため従来の単個細胞に比して反応がみやすく，成績の判定も容易であった．このコロニーの形態変化は，易熱性毒素による特異的反応であり，その変化は毒素との反応24時間後が最も顕著であった．また，本法の特異性および感度は単個細胞法と比較して何らそん色なく，さらに偽陽性反応の出現も従来法に比してきわめて少ないことが示された．

以上の成績から，本法は大腸菌易熱性毒素の検出に有用であり，ルチンの検査にも十分応用可能な方法であると結論された．

文　献

1) Finkelstein, R.A.: *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 2, 553, 1973
2) Sack, R.B.: *Annual Review of Microbiology*, 29, 333, 1975
3) Zen-Yoji, H., Y. Kudoh, H. Igarashi, K. Ohta, K. Fukai, and T. Hoshino: *Proceedings of the 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins*, 479, 1976
4) Stark, R.L. and C.R. Duncan: *Infect. Immunity*, 6, 662, 1972
5) Glatz, B.A., W.M. Spira, and J.M. Goepfert: *Infect. Immunity*, 10, 299, 1974
6) Evans, D.G., D.J. Evans, and N.F. Pierce: *Infect. Immunity*, 7, 873, 1973
7) Evans, D.J., D.G., Evans, and S.L. Gorbach: *Infect. Immunity*, 8, 725, 1973
8) Dean, A.G., Y.C. Ching, and R.G. Williams: *J. Infect. Dis.*, 125, 407, 1972
9) Donta, S.T., H.W. Moon, and S.C. Whipp: *Science*, 183, 1974
10) Guerrant, R.L., L.L. Brunton, T.C. Schnaitman, L.I. Rebhun, and A.G. Gilman: *Infect. Immunity*, 10, 320, 1974
11) DuPont, H.L., S.B., Formal, R.B. Hornick, M. J. Snyder, J.P. Libonati, D.G. Sheahan, E.H. LaBrec, and J.P. Kalas: *N. Engl. J. Med.*, 285, 1, 1971
12) Sack, R.B., S.L. Gorbach, J.G. Banwell, B. Jacobs, B.D. Chatterjee, and R.C. Mitra: *J. Infect. Dis.*, 123, 378, 1971
13) Googins, J.A. et al: *M.M.W.R.*, 24, 261, 1975
14) Whipp, S.C., H.W. Moon, and N.C. Lyon: *Infect. Immunity*, 12, 240, 1975
15) Etkin, S. and S.L. Gorbach: *J. Lab. Clin. Med.*, 78, 81, 1971
16) Gorbach, S.L. and C.M. Khurana: *N. Engl. J. Med.*, 287, 791, 1972
17) Guerrant, R.L., R.A. Moore, P.M. Kirshenfeld, and M.A. Sande: *N. Engl. J. Med.*, 293, 567, 1975
18) Gorbach, S.L., B.H. Kean, D.G. Evans, D.J. Evans, and D. Ressudo: *N. Engl. J. Med.*, 292, 933, 1975
19) Gyles, C.L., M. So, and S. Falkow: *J. Infect. Dis.*, 130, 40, 1974
20) Sack, D.A., M.H. Merson, J.G. Wells, R.B. Sack, and G.K. Morris: *Lancet.* ii, 239, 1975
21) 工藤泰雄，善養寺　浩，松下　秀，丸山　務，坂井千三：第35回日本細菌学会関東支部総会（1976.6，横浜）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 29—35, 1976

最近10年間（1966年～1975年）の東京都内における赤痢集団発生および健康保菌者の細菌学的，疫学的検討

善養寺　浩*，太田建爾*，田島光三*
津野正朗*，工藤泰雄*，坂井千三*

Bacteriological and Epidemiological Surveys on the Healthy Carriers of *Shigella* and Outbreaks of Shigellosis in Tokyo, 1966-1975

HIROSHI ZEN-YOJI*, KENJI OHTA*, MITSUZO TAJIMA*,
MASAAKI TSUNO*, YASUO KUDOH* and SENZO SAKAI*

The incidence of healthy carriers of *Shigella* was surveyed on a total of 1,475,664 food handlers in Tokyo during the period from 1966 through 1975. Epidemiological and bacteriological investigation was also made on outbreaks of shigellosis which had occurred in Tokyo in the same periods.

The results obtained are summarized as follows:

1) Incidence of the organism in food handlers was 108 (0.06%) of 172,519 in 1966, and thereafter it was declined sharply and recorded 0.03% in 1967 and 0.008% in 1968. In the 1970's, only 0-4 persons (0-0.002%) were found to be the healthy carriers of the organism.

2) In 1966-67, *S. sonnei* and *S. flexneri* 2a were most common serotypes among the isolates, and the occurrence of *S. flexneri* was decreased by the end of 1960's. None of *S. dysenteriae* and *S. boydii* was isolated throughout the last decade. Increasing antibiotic resistance of the isolates was also observed in the last 7 years.

3) In the last decade, a total of 180 outbreaks of shigellosis had occurred in Tokyo. Among them, *S. sonnei* was the most common as a causal agent, 150/180 (83.3%), followed by *S. flexneri* 2a, 8.9% and *S. flexneri* 3a, 3.3%.

4) It was noted that 91.5% of outbreaks were due to antibiotic resistant strains. Most of isolates from outbreak cases were found to be multiple drug resistant against SM, CP and TC or SM, CP and AB-PC.

緒　言

赤痢菌が志賀により発見されて以来，既に70年以上を経過した現在，わが国の赤痢は10年前に比較して著しく減少している．東京都内においても例外ではなく，健康保菌者数ならびに集団発生例数共に年々減少の一途をたどり，最近では，健康保菌者は10万人当り１人以下という極めて低い割合となるに至った．

しかしながら一方では，次々に開発される新しい抗生物質に対する菌の耐性化の問題があり，現在では全分離株の約80%は耐性菌で占められ，治療面での大きな問題をなげかけている．

著者らは，これまでに過去20年以上にわたり，赤痢予防対策事業の一環として，都内における飲食物取扱業者を対象に夏季腸管系病原菌の保菌者検索を行ない，そこから得られた分離菌ならびにその薬剤耐性試験の成績の一部についてはすでに報告してきた[1-4]．

これらの成績は，当時の腸管系病原菌保菌者の実態が把握され，保菌者の早期発見による感染源の撲滅，生活環境の整備改善による感染経路の遮断など伝染病予防対策上の重要な基礎資料を提供した．

今回は1966年～1975年までの10年間における健康者および集団発生例の患者およびその関係者からの赤痢菌の検出成績，菌型の推移，*Shigella sonnei* のコリシン型別および分離菌の薬剤耐性について報告する．

実験材料と方法

赤痢菌の検索および薬剤耐性試験は善養寺ら[3,5]の方

* 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

法に従った．

薬剤耐性試験に用いた薬剤は，ストレプトマイシン（SM），クロラムフェニコール（CP），テトラサイクリン（TC），カナマイシン（KM），ナリジキシン酸（NA）およびアミノベンジルペニシリン（AB-PC）の6薬剤である．耐性菌の判定は各薬剤を 50 mcg/ml 以上含有した培地に発育が認められた株を耐性菌とした．

コリシン型別は Gillies[6] および岡田ら[7] の方法に従った．

実験成績

1) 健康保菌者からの検出率と菌型

1966年～1975年の10年間における赤痢菌の検査対象は表1に示すごとく，各年度により若干の差はあるが，約10～17万件の都内の飲食物取扱者のふん便である．赤痢菌の陽性数は，1966年の108件（0.06%）を最高に，1967年の50件（0.03%），1968年13件（0.008%）と以後年毎に減少している．1970年においては約17万件の検査を実施したがすべて陰性であった．しかしながら1971年以降は4～1名の健康保菌者が認められたものの，10年間の平均では，わずかに 0.013% の検出率であった．

検出された赤痢菌の菌型の年次別推移をみると，1966年は *S. sonnei* が52株（48.7%）と全体の約半数を占め，つづいて *S. flexneri* 2aが22株（17.9%），残りは2a を除く *S. flexneri* 群で，全体では10菌型であった．しかし，その後の検出菌型数は年々減少し，1969年では *S. flexneri* 2a，*S. flexneri* V-X，V-Y および *S. sonnei* の4菌型，1971年～1975年では1～3菌型となっている．また，10年間の合計では *S. sonnei* が約55%（108株），B群が残りの45%を占め，*S. dysenteriae* および *S. boydii* は全く検出されなかった．

2) 集団発生例

1966年～1975年の10年間に都内での発生あるいは他府県とも関連した集団発生例は表2に示すごとく合計 180件，患者総数は 8,920 名であった．各年度における発生件数は1966年の81事例をピークに年々減少し，1975年では僅かに2例をみたに過ぎない．

全事例を菌型別にみると *S. sonnei* による事例が 150件（83.3%）と最も多く，つづいて *S. flexneri* 2a（9.4%），*S. flexneri* 3a（3.3%）の順であり，この3菌型で全体の約96%を占めている．また，1966年より1968年の菌型は極めて多彩であるが，その後は年々減少し，最近5年間では *S. sonnei* と *S. flexneri* 2a あるいは *S. flexneri* 3a といった，ごく限られた菌型となっている．

つぎに，これらの集団発生例の月別発生状況を表3に示した．従来赤痢は夏季型の伝染病とされていたにもかかわらず，特に夏季に多発している傾向は認められず，年間を通して発生していることは注目される点といえよう．

3) 分離菌株の薬剤耐性

1969年～1975年の7年間に健康者および赤痢患者の関

Table 1. Recovery of *Shigella* from healthy subjects during the last decade in Tokyo

Year	No. of specimens examined	No. of *Shigella* detected (%)	*S. flexneri* 1a	1b	2a	2b	3a	3b	3c	4a	V-X	V-Y	*S. sonnei*
1966	172,519	108(0.06)	6 (5.6)	11 (10.2)	16 (15.1)	1 (0.9)	5 (4.6)		1 (0.9)	3 (2.8)	7 (6.5)	6 (5.6)	52 (48.1)
1967	170,534	50(0.03)		2 (4.0)	4 (8.0)		3 (6.0)	2 (4.0)			1 (2.0)	2 (4.0)	36 (72.0)
1968	162,350	13(0.008)		1 (7.7)	3 (23.1)	2 (15.4)				1 (7.7)			6 (46.2)
1969	155,372	14(0.009)			3 (21.4)						1 (7.2)	3 (21.4)	7 (50.0)
1970	166,628	0											
1971	141,391	3(0.002)			1 (33.3)	1 (33.3)							1 (33.3)
1972	132,574	2(0.002)											2 (100.0)
1973	131,200	1(0.001)										1 (100.0)	
1974	143,687	4(0.002)											4 (100.0)
1975	99,409	1(0.001)										1 (100.0)	
Total	1,475,664	195(0.013)	6 (3.1)	14 (7.3)	27 (13.8)	4 (2.1)	8 (4.1)	2 (1.0)	1 (0.5)	4 (2.1)	9 (4.6)	12 (6.2)	108 (55.4)

係者から分離された菌株を，SM，CP，TC，KM，NA および AB-PC の6薬剤について耐性試験を行なった．

a） 健康者由来株

各年度毎に健康者から分離された菌株について薬剤耐性試験を行なった成績を表4に示した．供試菌株24株のうち19株（79.1%）は耐性菌で，そのうち1株はSM，CP，TC，AB-PC の4剤耐性，8株はSM，CP，TCの3剤耐性，5株はSM，TC耐性，SM，CP耐性菌が4株，SM単独耐性が1株であった．

b） 集団発生患者由来株

1969年～1975年の7年間の集団発生例は59例である．その原因菌が耐性菌か否かを菌型別に検討した成績を表5に示した．59例中54例（91.5%）は耐性菌によるものである．それを菌型別にみると *S. flexneri* 2a および *S. flexneri* 3a による事例は，いずれも耐性菌による発生であった．*S. sonnei* による53事例の場合は5事例が感受性菌によるものであった．

Table 2. Outbreaks of shigellosis during the last decade in Tokyo

Year	No. of incidents	No. of patients	No. of incidents, by serotype						
			S. sonnei	*S. flexneri*					
				1b	2a	2b	3a	3b	4a
1966	81	4,289	70	2	5		2	1	1
1967	23	1,113	17		3	1	1		1
1968	17	454	10		4		2		1
1969	19	1,003	17		2				
1970	14	954	13		1				
1971	5	195	5						
1972	7	287	7						
1973	3	126	2		1				
1974	9	471	8		1				
1975	2	28	1				1		
Total	180	8,920	150	2	17	1	6	1	3

Table 3. Monthly incidence of outbreaks of shigellosis during the last decade in Tokyo

Year	Month												Total
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	June	July	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec	
1966	5*	5	10	13	3	12	5	2	8	8	5	5	81
	152**	168	717	471	77	1,623	128	51	340	174	199	189	4,289
1967	4	2	3	4	3	2	2			1	1	1	23
	265	46	153	67	102	42	152			29	195	62	1,113
1968	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1		17
	55	43	69	19	15	17	49	38	78	47	24		454
1969	3	1	1	2	2	2		1	3	1	1	2	19
	430	27	63	29	126	52		16	77	78	13	92	1,003
1970		1		1		2	1			2	6	1	14
		133		99		410	38			69	166	39	954
1971		1						1	1	1	1		5
		41						29	9	85	31		195
1972			1	1			1	1		1	2		7
			72	9			22	28		9	147		287
1973	1		1					1					3
	14		57					55					126
1974							1		1	4	2	1	9
							136		39	135	41	120	471
1975									1	1			2
									14	14			28
Total	15	12	18	22	9	19	11	8	16	21	19	10	180
	916	458	1,131	694	320	2,144	525	217	557	640	816	502	8,920

* Number of incidences

** Number of patients

各年度の集団発生例の患者から検出された菌株について菌型別に耐性パターンをみた成績を表6に示した．この場合も健康者由来株と同様に多剤耐性菌が圧倒的に多く，1973年の *S. sonnei* による2事例中の1事例はSM，CP，TC，KM，NAの5剤耐性菌によるものであった．

4) ***S. sonnei*** のコリシン型

1966年～1975年の10年間の健康者および集団発生例の患者から検出された *S. sonnei* のコリシン型別を行なった成績を表 7，8に示した．

健康者由来株の場合は1B，6，12，14型およびコリシンを産生しない0型の5型に分類された．そのうちわけは，供試菌株51株中14型が21株（41.2%），6型15株（29.2%），0型12株（23.5%）でこの3型によって全体の約95%を占めている．年次別にみると14型は1966年～1968年までは全体の約50%を占めていたが，1969年では急激に減少し，1970年以降は全く認められない．また，これに対して6型は各年度にみられ，むしろ増加の

Table 4. Antibiotic resistance patterns of *Shigella* isolates from healthy carriers

Year	Serotype	No. of strains tested	No. of drug resistants (%)	Antibiotic resistance pattern				
				SM	SM CP	SM TC	SM CP TC	SM CP TC ABPC
1969	*S. flexneri* 2a	3	3 (100.0)			1	2	
	S. flexneri V-X	1	1 (100.0)				1	
	S. flexneri V-Y	3	3 (100.0)			3		
	S. sonnei	7	7 (100.0)	1		1	5	
1971	*S. flexneri* 2a	1	0					
	S. flexneri 2b	1	0					
	S. sonnei	1	0					
1972	*S. sonnei*	2	1 (50.0)					1
1973	*S. flexneri* V-Y	1	0					
1974	*S. sonnei*	4	4 (100.0)		4			

Table 5. Outbreaks of shigellosis due to antibiotic resistant strains

Year	Serotype	No. of incidents	No. of incidents by drug resistance strain (%)
1969	*S. flexneri* 2a	2	2 (100.0)
	S. sonnei	17	15 (88.2)
	Subtotal	19	17 (89.5)
1970	*S. flexneri* 2a	1	1 (100.0)
	S. sonnei	13	13 (100.0)
	Subtotal	14	14 (100.0)
1971	*S. sonnei*	5	4 (80.0)
1972	*S. sonnei*	7	6 (85.7)
1973	*S. flexneri* 2a	1	1 (100.0)
	S. sonnei	2	2 (100.0)
	Subtotal	3	3 (100.0)
1974	*S. flexneri* 2a	1	1 (100.0)
	S. sonnei	8	8 (100.0)
	Subtotal	9	9 (100.0)
1975	*S. flexneri* 3a	1	1 (100.0)
	S. sonnei	1	
	Subtotal	2	1 (50.0)
Total		59	54 (91.5)

Table 6. Antibiotics resistance patterns of *Shigella* isolates from cases of outbreaks

Year	Serotype	No. of incidents	No. of Strains tested	No. of drug resistants (%)	Antibiotic resistante pattern											
					SM	CP	TC	SM CP	SM TC	CP TC	SM CP TC	SM CP ABPC	SM CP TC KM	SM CP TC ABPC	SM CP ABPC NA	SM CP TC NA	SM CP TC KM NA
1969	*S. flexneri* 2a	2	6	5(83.3)		2		1			2						
	S. sonnei	17	81	74(91.4)				1			68	5					
1970	*S. flexneri* 2a	1	92	92(100.0)		3		88			1						
	S. sonnei	13	52	51(98.1)				6		1	44						
1971	*S. sonnei*	5	141	106(75.2)				20			60	26					
1972	*S. sonnei*	7	37	32(86.5)	2					15	15						
1973	*S. flexneri* 2a	1	14	14(100.0)									14				
	S. sonnei	2	108	107(99.1)	1						48		1				57
1974	*S. flexneri* 2a	1	8	7(87.5)							7						
	S. sonnei	8	328	327(97.3)			1				1	310		10	4	1	
1975	*S. flexneri* 3a	1	14	14(100.0)							14						
	S. sonnei	1	14	2(14.3)					2								

Table 7. Colicine types of *S. sonnei* isolates from healthy carriers

Year	No. of strains tested	Colicine type				
		1B	6	12	14	0
1966	7	1 (14.3)	2 (28.6)		4 (57.1)	
1967	25		2 (8.0)		12 (48.0)	11 (44.0)
1968	6		2 (33.3)		3 (50.0)	1 (16.7)
1969	7		4 (57.1)	1 (14.3)	2 (28.6)	
1970						
1971	1		1 (100.0)			
1972	2		2 (100.0)			
1973						
1974	3		2 (66.7)	1 (33.3)		
1975						
Total	51	1 (1.8)	15 (29.2)	2 (3.9)	21 (41.2)	12 (23.5)

傾向を示している．

つぎに集団発生例由来株についてみると表8に示すごとく6，8，12，13，13A，14および0型の7型が認められた．事例別にみると健康者由来株と同様に14，6および0型の3型で全事例の約92%を占めている．また，年次別にみると，6型は各年度に認められたが，14型は1972年を最後に消失している．また，1974年には健康者由来株では全くみられなかった13A型が4事例認められた．なお，この4事例中3事例からは，6型あるいは0型菌が1～2株検出されている．

考　察

東京都の健康人における赤痢菌の検出率は，1959年～1965年までの善養寺ら[3]の報告では0.32～0.08%で年毎に減少している．今回の最近10年間における著者らの成績では，1966年の検出率は0.06%で1965年の0.08%と大差はないが，1970年以降は0.001～0.002%であって，ここ数年間に急激な減少が認められる．

健康人からの検出赤痢菌の菌型の推移をみると1964年まで *S. flexneri* 2a が主体であったが[1]，1965年には *S. sonnei* が優位を占め[4]，その後は継続して *S. sonnei* が全分離株の約半数を占めている．また，残りの菌型はすべてB群菌であった．なお，最近斎藤ら[8]は海外で感染したと考えられる *S. dysenteriae* を原因とする赤痢を報告しているが，今回の調査では *S. dysenteriae* および *S. boydii* は全く検出されていない．

健康人保菌者の減少に比例して，都内における集団事例も少なく年間2～10例の発生となっている．しかし最近，岡田らの報告[9]では埼玉県下において患者数600名にもおよぶ大規模な集団発生があり，この事件の感染源は某レストランの従業員が保菌者で，さらに何らかの経路で使用井戸水が汚染されていたことが明らかにされている．この事実は保菌者は確かに急激に減少しているとはいえ，今後も感染源としての危険性はもちろん，それ

Table 8. Outbreaks due to *S. sonnei*, by colicine type

Year	No. of incidents	Colicine type						
		6	8	12	13	13A	14	0
1966	39	5 (11.6)	1 (0.03)		1 (0.03)		27 (62.8)	5 (11.6)
1967	17						16 (94.1)	1 (5.9)
1968	9	4 (44.4)	1 (11.1)				4 (44.4)	
1969	21	7 (33.3)					11 (52.4)	3 (14.3)
1970	10	8 (80.0)				1 (10.0)		1 (10.0)
1971	5	3 (60.0)		1 (20.0)			1 (20.0)	
1972	6	4 (66.7)					2 (33.3)	
1973	2	1 (50.0)						1 (50.0)
1974	7	3 (42.9)				4 (57.1)		
1975	1	1 (100.0)						
Total	117	36 (30.8)	2 (1.7)	1 (0.8)	1 (0.8)	5 (4.3)	61 (52.1)	11 (9.4)

らの早期発見が本症の予防対策として極めて重要であることを指摘しているといえよう．

また近年，ペットとして輸入されているサルの赤痢菌保菌が感染源となった事例も報告されており[10]，このような動物からの感染といった危険性も今後注目する必要があろう．

つぎに，健康人から検出された菌株の薬剤耐性は，1968年以前に比して，ますます多剤耐性化の傾向が認められた．このことは抗生物質の開発にともない，さらに新しい耐性パターンが生じてくるであろう．しかし，KM，NAおよび AB-PC に対する単独耐性菌は今回の調査では全く検出されていない．

S. sonnei のコリシン型別は Abbott ら[11]によって開発されて以来，感染源追求に広く応用されている．

都内における健康人および集団発生例の患者由来株のコリシン型は極めてよく一致していた．また，1969年までの主コリシン型であった14型が1970年頃から急激に減少し，最近では殆んど検出されないことは興味ある点といえよう．

結　論

最近10年間における東京都内の飲食物取扱者と赤痢集団発生事例の患者関係者を対象に赤痢菌の検索を行ない，本菌の検出状況ならびに分離株の抗生物質に対する感受性を検討した結果，以下の成績をえた．

1) 飲食物取扱者からの赤痢菌検出率は1966年の0.06%(172,519名中108名)を最高に，1967年の0.03%，1968年の 0.008% と年々減少し，1971年～1975年では 0.001～0.002% であった．

2) 飲食物取扱者由来株の菌型は1966年および1967年では *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, 1b, V-X 等と多彩であったが，その後年々減少し1972年以降は，わずかに *S. sonnei* あるいは *S. flexneri* V-Y の1菌型であった．なお，10年間を通して *S. dysenteriae* および *S. boydii* は全く認められなかった．

3) 1966年～1975年の10年間における赤痢集団発生は合計180事例であった．その原因菌型のうちわけは，*S. sonnei* が150例 (83.3%)，2a が17例 (9.4%)，3a が6例 (3.3%) で，これらの3菌型で全体の 96% を占めた．

4) 健康者および集団事例より分離された菌株の薬剤耐性は1968年以前の分離株に比較して，年々増加の傾向を示した．特に集団発生由来株の耐性率は91.5%と高率であった．

5) *S. sonnei* のコリシン型は14型が主流行型であったが，1972年を最後に消失し，これに代って6型が増加した．なお，集団発生例の原因菌では，健康人由来株にみられない13A型が認められた．

文　献

1) 善養寺　浩，一言　広，太田建爾，林田敏夫：東京衛研年報，14，1，1964

2) 善養寺 浩，林田敏夫，一言 広，太田建爾：東京衛研年報，16，35，1964
3) 善養寺 浩，一言 広，大久保暢夫，太田建爾，五十嵐英夫，林田敏夫：日伝染会誌，38，175，1964
4) 善養寺 浩，大久保暢夫，一言 広，太田建爾，堀幹郎，五十嵐英夫：東京衛研年報，17，42，1965
5) 善養寺 浩，坂井千三：腸管系病原菌の検査法，第2版，111，1974，医学書院，東京
6) R.R. Gillies: *J. Hyg., Camb.*, 62, 1, 1964
7) 岡田正次郎，宮崎瑤子，芦田博之：メデアサークル，10，365，1965
8) 斎藤 誠ほか：日感染学誌，50（臨時増刊号），12，1976
9) 岡田正次郎，芦田博之，大関瑤子，奥山雄介，星野才蔵，田中厚子，日比野真理，松島冷子，早野正己：日感染学誌，50（臨時増刊号），11，1976
10) 白石圭四郎，前田博之，秋葉 亨：日感染学誌，49，226，1975
11) J.D. Abbott & Shannon, R.: *J. Clin. Path.*, 11, 7, 1958

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 36—40, 1976

本邦食品の糸状菌汚染に関する研究　市販煮干しの糸状菌汚染

一言　広*, 諸角　聖*, 和宇慶朝昭*
坂井千三*, 善養寺浩*, 辺野喜正夫*

Studies on Fungal Contamination of Foodstuffs in Japan: Fungal Flora on Dried Small Sardines marketing in Tokyo

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

Incidence of mycoflora was examined on a total of 33 batches of dried small sardines on the market in Tokyo, and also lethal toxicity of moldy sardines to mice was checked.

Filamentous fungi were isolated from 32 samples with range of 5—122/gram (average 33.5/g). Among these isolates, *Aspergillus* (25.4%), *Penicillium* (20.6%), *Arthrinium* (7.7%), *Wallemia* (7.2%), *Alternaria* (6.0%) and *Cladosporium* (5.3%) were found to be common contaminants. In mycotoxin productivity test on representative isolates from each of 33 batches, sterigmatocystin and citrinin were found to be produced by 6 strains of *A. versicolor* from 5 samples and 2 strains of *P. citrinum* from 2 samples respectively.

For observing of natural growth of fungi on the sardine samples stored, the following experiments were performed. Samples were bisected respectively, and the one was added with distilled water in 10% and the other without water. The both were allowed to stand in room temperature for 30 days. From the results, it was found that fungi could grow on 8 out of non-treated samples and 27 out of samples with water. Chroloform extracts from these moldy samples, one gram of original moldy specimens/animal, injected intraperitoneally into mice. Of the 27 samples, 18 indicated the lethal toxicity to mice. However, a further investigation about the lethal toxic substance was not attempted.

緒　言

食品のカビによる汚染は，一方では人および家畜の肝癌，肝硬変症あるいは急性中毒症等の原因となるmycotoxin産生の危険性，他方では食品の変質・変敗による品質低下といった二つの面から食品衛生上注目されている．著者らはこれまでに主として都内の市販食品を対象にカビ汚染の実態を明らかにし，その汚染防除方法についても若干の検討を加えてきた[1-7]．

今回は海産物加工品の中で比較的喫食頻度が高いと思われる食品の一つでありながら，そのカビ汚染の実態がこれまでに全く検討されていない煮干しを対象に，カビ（糸状菌）汚染の調査を行なった．さらに，カビ汚染煮干し中の産生毒素についてマウスを用いて検討した．

実験方法

1) 試　料

供試した煮干し33検体は昭和49年4月より7月の間に都内の店舗で市販の品を購入して使用した．また，捕獲場所，捕獲時期，加工法および加工の時期等の詳細については明らかにできなかった．

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種の平板培地を使用した．煮干しの培養は，試料5gを秤量し，45 mlの滅菌精製水とともにブレンダー（日本精機 K.K.）により高速で約5分間粉砕・混和したのち，その1 mlを上記平板上に均一に塗抹した．

これらの平板は25°，7ないし10日間培養した．その間連日観察し，発育した集落をPDA斜面培地に移植し，以後の同定操作に供した．

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

菌属ならびに菌種の同定は前報の記載[1]に従った.

3) 検出菌の mycotoxin 産生試験

検出菌の mycotoxin 産生の有無は供試菌を液体培地で静置培養した試料を用いて検討した. すなわち aflatoxin 産生用としてSL培地[8], ochratoxin および sterigmatocystin 産生用には YES 培地[9]を用い前報の記載[1]に従って毒素産生の有無を検討した.

また, mycotoxin 産生用参考株, 対照用標準 mycotoxin の調整, clean up 法および TLC 等はいずれも前報の記載に従った.

4) 各試料の保存試験

菌の培養検査に供した試料以外の残りの全試料を二分して購入時の包装と同様の状態で, 一方はそのまま, 他方には滅菌精製水を加え水分を30%とし室温に一カ月間放置したのち糸状菌の増殖の有無を観察した. 肉眼的に菌の増殖が認められた試料についてはその主要な汚染菌の菌種を常法に従い決定した.

5) 真菌増殖試料のマウスに対する毒性

上記保存実験の結果, 菌の増殖が認められた煮干しについては, その 30g をクロロホルムにより毒素の抽出操作を行なった. 抽出物は濃縮乾固後, 6ml のプロピレングリコールに再溶解し, 110° 10分間高圧滅菌を行なったのち1群3匹の ICR マウス(♂: 体重 25~30g)の腹腔内に各々 0.2ml 接種し, 1週間以内のマウスの生死を観察して毒性の有無を判定した.

実験成績

1) 煮干しにおける汚染糸状菌の生菌数

市販の煮干し 33 検体における検出糸状菌の生菌数を Table 1 に示した. すなわち, 糸状菌の全く検出されなかった試料は1例にすぎず, その他の試料からはいずれも糸状菌が検出された. しかし, その検出菌数は各試料 1g 当り 5—122/g, 平均 33/g で平均水分含量17.27%(14—21.2%)という糸状菌の増殖が可能な水分含量の食品としては低い値であった.

2) 検出糸状菌の分布

検出した糸状菌の菌属ごとの分布を Table 2 に示した. すなわち, 33例の試料から25菌属以上にわたって合計 1,140 株の糸状菌が検出された. 検出菌のうち最も多数認められた菌属は *Aspergillus* で全検出菌の 24.6% を占め, ついで *Penicillium* (20.6%), *Arthrinium* (7.72%), *Wallemia* (7.1%), *Alternaria* (5.9%)

Table 1. Fungal Counts made on Dried Small Sardines

Number of samples tested	Number of fungi estimated		Moisture (average)
	Range	Average	
33	5—122/gram	33.50/gram	17.27

Table 2. Incidence of Fungi in Dried Small Sardines

Fungus		Fungal count	%
Aspergillus	*terreus*	117	10.27
	glaucus	87	7.64
	versicolor	33	2.89
	fumigatus	20	1.75
	ochraceus	12	1.05
	candidus	8	0.70
	spp.	3	0.26
Total		280	24.56
Penicillium	*viridicatum*	47	4.12
	funiculosum	45	3.95
	cyclopium	30	2.63
	brevi-compactam	25	2.19
	frequentans	8	0.70
	citrinum	5	0.44
	expansum	5	0.44
	notatum	3	0.26
	Ramigena	2	0.18
	spp.	65	5.70
Total		235	20.62
Arthrinium	*spp.*	88	7.72
Wallemia	〃	82	7.19
Alternaria	〃	68	5.96
Cladosporium	〃	60	5.26
Trichoderma	〃	50	4.39
Fusarium	〃	35	3.07
Gilmaniella	〃	27	2.37
Phoma	〃	23	2.02
Torula	〃	15	1.32
Pestalotia	〃	13	1.14
Curbraria	〃	13	1.14
Aureobasidium	〃	10	0.88
Monocillium	〃	7	0.61
Nigrospora	〃	7	0.61
Scopulariopsis	〃	5	0.44
Ulocladium	〃	5	0.44
Botrytis	〃	3	0.26
Epicoccum	〃	3	0.26
Cephalosporium	〃	2	0.18
Helminthosporium	〃	2	0.18
Other imperfecti		68	5.96
Total		618	54.21
Chaetomium	*spp.*	25	2.19
Mucor	*spp.*	7	0.61
Syncepharasterum	〃	7	0.61
Total		14	1.22
Sum total		1,140	100.00

および *Cladosporium* (5.2%) などが認められ，これらの6菌属で全検出菌の70%以上を占めていた．そのほか比較的検出頻度の高い菌属は *Trichoderma* (4.3%), *Fusarium* (3%), *Glaminiella* (2.3%), *Chaetomium* (2.1%), *Phoma* (2.0%), *Torula* (1.3%), *Pestalotia* (1.1%) および *Curburaria* (1.1%) であった．

Aspergillus 属中最も多く検出されたものは *A. terreus* group で全検出菌の約11%で，ついで *A. glaucus* group (7.6%), *A. versicolor* group (2.8%), *A. fumigatus* group (1.7%), *A. ochraceus* group(1.0%) および *A. candidus* group (0.26%) の順であった．

Penicillium 属では *P. viridicatum*, *P. funiculosum*, *P. cyclopium* および *P. vrevi-compactum* の各seriesの菌がそれぞれ4.1%，4.0%，2.6% および2.2% の検出率であり，その他の series の菌はいずれも全検出菌の1%未満にすぎなかった．

3) 検出菌の mycotoxin 産生能

上記検出菌のうち，これまでに mycotoxin 産生性の報告されている菌種の検体毎の検出菌数を Table 3 に示した．すなわち全33検体のうち12検体から毒素産生の疑がわれる菌のいずれかが検出された．その内訳は *A. versicolor* (Vuill) Tiraboschi が7検体から33株，*A. ochraceus* Wilhelm が2検体より12株，*P. citrinum* Thom が2検体より5株および *F. spp.* が6検体より35株検出された．また，それらのうちの4検体は2種以上の mycotoxin 産生の疑がわれる菌の汚染が認められた．

つぎに，前記のこれら菌種の代表株を検体毎に選出して，それぞれの mycotoxin 産生性を検討した．この場合，*A. versicolor* については sterigmatocystin の，*A. ochraceus* は ochratoxin A の，*P. citrinum* は citrinin の産生の有無を検討した．その成績は Table 4 に示すごとく5試料から分離した *A. versicolor* 6株に sterigmatocystin の産生を認めた．また，*P. citrinum* はその全検出株が citrinin 産生性を示した．しかし，他の菌株はすべて毒素非産生であった．

4) 各試料の保存試験ならびに糸状菌汚染試料の毒性

各試料を2分して購入時の包装と同様の状態で，一方には水分を添加し，他方は無添加のまま室温に放置して糸状菌の増殖の有無を検討した．その成績は Table 5 に示すとおりである．水分無添加の場合は33試料中の8例に，また水分を添加した群では，水分無添加の状態で菌の増殖が認められた試料以外の19例にも菌の旺盛な増殖が認められた．これらの増殖菌の優先菌種は検体番号3, 18 および20を除きいずれも *A. glaucus* であった．

そこで，これら糸状菌が増殖した試料からクロロホルムにより抽出した分画をプロピレングリコールに再溶解したのち高圧滅菌を行ない，原試料の 1g 相当分の抽出物をマウス腹腔内に接種し1週間以内の生死を観察した．その成績は Table 5 に示したごとく，3匹中3匹が斃死した試料は3例（試料番号：4, 20, 34）で，2匹斃死した試料は5例（1, 19, 24, 25, 27），さらに1匹のみ斃死したものは10例（15, 23, 26, 3, 5, 8, 9,

Table 3. Occurrence of Fungi Belonging to Toxin Producing Species

Species of fungi	Sample number												Total
	2	4	5	8	9	11	12	17	19	20	28	29	
A. versicolor	5	7	3		5		3		2	8			33
A. ochraceus					10						2		12
P. citrinum				2						3			5
Fusarium spp.		3			5	7	8	2				10	35
Total	5	10	3	2	20	7	11	2	2	11	2	10	85

Table 4. Mycotoxin producing ability of Isolates

Strain number	Species of fungi	Number of isolates per gram	Toxin producing ability (sterigmatocystin)	
I-2-a	*A. versicolor*	3	+	
I-4-a		5	+++	300μg/l
I-4-e		2	+	
I-5-f		3	++	23μg/l
I-9-b		3	+	
I-20-b		3	+++	520μg/l

Table 5. Toxicity of Moldy Dried Small Sardines to Mice

Sample number	Treatment	Dominated fungi	Mortality
1	Not treated	*A. repens*	2/3
11		*A. ruber*	0/3
15		*A. chevalieri*	1/3
19		*A. repens*	2/3
22		*A. ruber*	0/3
23		*A. repens*	1/3
26		*A. ruber*	1/3
32		*A. ruber*	0/3
2	Added water	*A. repens*	0/3
3		*A. candidus*	1/3
4		*A. ruber*	3/3
5		*A. ruber*	1/3
7		*A. repens*	0/3
8		*A. repens*	1/3
9		*A. chevalieri* *A. repens*	1/3
10		*A. repens*	1/3
14		*A. repens*	0/3
17		*A. ruber*	0/3
18		*Rhizoctonia spp.*	0/3
20		*Mucor spp.*	3/3
21		*A. chevalieri*	1/3
24		*A. ruber*	2/3
25		*A. chevalieri*	2/3
27		*A. repens*	2/3
29		*A. ruber*	1/3
30		*A. chevalieri*	0/3
34		*A. repens*	3/3
Control		(−)	0/3

10, 21, 29) であった．なお全くマウスに対する致死作用を示さなかったものは9例であった．また，致死作用を示した18例の試料抽出物については aflatoxin, ochratoxin, sterigmatocystin, citrinin および kojic acid の存在の有無を検討したが，いずれもこれらの既知毒素は陰性であった．

考　察

これまで保存食品における糸状菌分布の報告は枚挙にいとまがない．

今回は我が国の海産の保存食品のなかで比較的利用頻度の高いと思われる煮干しの糸状菌汚染の実態を把握するために本実験を行なった．今回の調査結果からみて，海産物であっても加工品の場合は，成分の相違や水分含量等の化学的ならびに物理的性格が多少異るにせよ，その汚染カビの菌属分布は農産物加工品と一致するという興味ある成績であった．その理由は，煮干しの加工々程中の加熱，乾燥等の操作による菌の減少を考慮しても海洋中に由来する一次汚染カビがそのまま加工品の汚染へとつながる事は希で，加工々程もしくは流通過程における環境汚染によるものであるといえよう．事実，汚染カビの種類も空中浮遊カビの それとよく一致している[6]．また各煮干し間における糸状菌汚染の量的差異もむしろ加工処理後の品質管理に起因するものと思われる．

一方，煮干しを購入時のままの状態で一カ月間放置した結果，その約1/4に当る8例に糸状菌の増殖が認められたこと，また煮干しの購入時の水分含量は平均17%といういわゆる storage fungi の発育可能な水分含量[10-12]であった事実からして，糸状菌汚染の面からみた場合には必ずしも保存性に優れた食品とはいえない．さらに，今回の調査で糸状菌の増殖が認められた8試料はいずれもポリエチレンで包装されほぼ密閉した状態のものであった．これに対して紙包装の場合は，いずれも肉眼的には糸状菌の増殖が認められなかった．このことは糸状菌の発育が包装材料の種類によっても大きく影響されることを示唆しており，これらの点は食品の糸状菌汚染の防止の面から今後検討されなければならない重要な課題であると考えられる．

つぎに，加工から消費までの流通過程における煮干しの水分含量が上昇した場合を想定して，全試料にそれぞれ10%の水分添加を行なったところ，その約80%に当る27検体に糸状菌の旺盛な増殖が認められた．その発育菌の大部分は各種貯蔵カビの中で最も一般的な菌として知られている *A. glaucus* group の菌であった．この *A. glaucus* group についてはすでに echinuline[16,22], flavoglaucin[13,14,17,19,21,22], auroglaucin[1,3,14,17,19,21,22], erythroglaucin[14,17,18], physcion[13-16] および kojic acid[20] 等の物質を産生することが知られている．また，これらの菌の毒性に関しては Archer[23] が *A. repens* の産生物質の鶏胚に対する催奇形性ならびに致死性を，Semenic ら[24] がこの group の菌の増殖した飼料の鶏ヒナおよびマウスに対する致死毒性を，さらに Shank ら[25] が同様にラッテに対する致死毒性をそれぞれ報告している．著者らもこれらの菌が増殖した煮干しのクロロホルム抽出物をマウス腹腔内に接種したところ，18/27例に致死毒性が認められ，Archer[23], Semenic ら[24] および Shank ら[25] の報告とほぼ同様な成績を得た．しかも，これらのいずれの試料からも既知 mycotoxin は検出されなかった．したがって，今後この未知の毒性因子を明らかにすると同時に，これら物質による食品汚染についてもさらに検討していきたい．

一方，sterigmatocystin 産生菌による汚染が4検体

に認められたことは，煮干しがその産生用基質となり得る[7]ということ，Shankら[26]のタイの市場調査における干し魚の aflatoxin 汚染例，煮干しにおける高い水分含量等を考慮すると，煮干しの発癌性 mycotoxin による汚染の危険性があるといえよう．

以上の点から，煮干しは我が国で市販されている保存食品の中で糸状菌汚染を受ける危険性の極めて高いものの一つであり，その汚染防止対策として含水量および包装材料等の改善を早急に行なう必要があると考える．

結　論

都内市販の煮干しを対象に糸状菌汚染を検討した結果，以下の結論を得た．

1) 市販の煮干し33検体中32検体（99%）から糸状菌を検出し，その 1g 当りの検出菌数は5—122，平均33.5個であった．

2) 検出糸状菌 1,140 株のうちで比較的高率に認められた菌属は *Aspergillus* (24.5%), *Penicillium* (20.6%), *Arthrinium* (7.7%), *Wallemia* (7.2%), *Alternaria* (6.0%) および *Cladosporium* (5.3%) などであった．また，*Aspergillus* 属の中で最も多く検出された菌種は *A. terreus* Thom (10.3%) で，*Penicillium* 属では *P. viridicatum* Westling (7.7%) が最も多く認められた．

3) 汚染菌のうち，5検体より検出した *A. versicolor* に sterigmatocystin 産生性を，また2検体より検出した *P. citrinum* に citrinin 産生性をそれぞれ認めた．

4) 全試料について室温，30日間の保存試験を行なった結果，水分添加を行なわなかった群の8例および10%の水分添加を行なった群の27例に糸状菌の増殖が認められた．

5) これら糸状菌の増殖した試料からのクロロホルム抽出物をマウス腹腔内に接種した結果，27試料中の18例にマウスに対する致死作用が認められた．

（本研究は昭和49年度当研究所調査研究課題「本邦食品の糸状菌汚染に関する研究」として実施し，その概要は日本食品衛生学会第28回大会1974年10月で発表した）

文　献

1) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺浩，倉田浩，一戸正勝：食衛誌，**14**，364，1973
2) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺浩：東京衛研年報，**24**，41，1973
3) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺浩：同上，**25**，17，1974
4) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺浩：同上，**26**-1，30，1975
5) 倉田　浩，田辺弘也，粟飯原景昭，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，倉田　浩：第29回食品衛生学会学術講演会口演，1975
7) 諸角　聖，一言　広，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺浩，倉田　浩：同上
8) Reddy, T.V., L. Viswanathan, and T.A. Venkitasuburamanian: *Appl. Microbiol.*, **22**, 393, 1971
9) Davis, N.D., U.L. Diener, and D.W. Eldridge: *ibid.*, **14**, 378, 1966
10) Christensen, C.M.: *Bot. Rev.*, **23**, 108, 1957
11) Christensen, C.M.: *Mycotoxin in Foodstuffs*, 1966, M.I.T. Press, Massachusets
12) Christensen, C.M. and H.H. Kaufman: *Grain Storage*, 1969, University of Minesota Press, Minneapolis
13) Raistric, H., R. Robinson, and A.R. Todd: *J. Chem. Soc.*, **1937**, 80, 1937
14) Ashley, J.N., H. Raistric, and T. Richards: *Biochem. J.*, **33**, 1291, 1939
15) Shibata, S. and S. Natori: *Pham. Bull.*, **1**, 160, 1953
16) Kitamura, Z., U. Kurimoto, and M. Yokoyama: *Yakugaku Zasshi*, **76**, 972, 1956
17) Gould, B.S. and H. Raistric: *Biochem. J.*, **28**, 1640, 1934
18) Chandrasen, K., S. Neelakantan, and T.R. Seshadri: *Proc. Indian Acad. Sci.*, 51A, 296, 1960
19) Wolf, F.T.: *Phisiol. Plantorum*, **10**, 825, 1957
20) Yubuta, T.: *J. Chem. Soc.*, **125**, 575, 1924
21) Cruicshank, J.T., H. Raistric, and R. Robinson: *J. Chem. Soc.*, **1978**, 2056, 1938
22) Quilico, A. and L. Panizzi: *Ber.*, **76**, 348, 1948
23) Archer, M.: *Mycopathol. Micol. Applicata*, **54**, 453, 1974
24) Semenic, G., G.S. Harshfield, C.M. Carlton, C.W. Hesseltine, and W.F. Kwolek: *ibid.*, **43**, 137, 1971
25) Shank, R.C. and G.N. Wogan: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **10**, 51, 1972
26) Shank, R.C. and G.N. Wogan: *ibid.*, **10**, 61, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 41—44, 1976

都民成人の Antistreptolysin O について

加納堯子*, 村田以和夫*, 大久保暢夫*

Incidence of Antistreptolysin O Antibody on Healthy Adult Tokyoites

TAKAKO KANOH*, IWAO MURATA* and NOBUO OHKUBO*

溶血連鎖球菌（溶れん菌）感染の有無を明らかにし，その疾病の経過を観察する目的で用いられてきた Antistreptolysin O (ASO) 抗体価測定も，年令，生活環境等によって異なった抗体価分布を示すことが知られるようになってから，現在では環境汚染の影響を考慮した ASO 抗体価の調査が実施されている[1]．しかし周知のように溶れん菌による自然感染ないしは不顕性感染が多くある事から ASO 抗体価の地域差を検討する前段階として ASO 抗体価の正常値を調査する必要がある．我々は報告例の少ない成人の ASO 抗体価の正常値を求めて健康都民成人を対象に ASO 抗体価の測定を行なった．次にこれらの測定結果から ASO 抗体価の性差，年令差，更に生活環境因子との相関関係を検討して現時点での ASO 抗体価の地域差を求めた．以下その成績である．

材料および方法

1) 健康者都民の血清は，昭和50年度収集血清を当所血清保存室より供与を受けた．主として健康者と思われる学生，主婦，老人を対象とした18～70歳にわたる年令層の血清である．2) ASO 抗体価測定には，従来法の Rantz-Randall（以下 R-R）法[2] の半量法を実施した．使用試薬は栄研化学 SLO（2号，Lot No. 305 C），血球は抗凝固剤入りのヒト O 型血球を用いた．3) 生活環境因子と居住地域に関する ASO 抗体価の変動調査には，当所環境保健部測定値のいおう酸化物，降下ばいじん，および第26回東京都統計年鑑記載数値から，人口密度，工員率，道路率，自動車保有率の六項目の生活環境因子を使用した．居住地域分類も上記統計年鑑記載規準に従って商工住の地域に分類した．ASO 抗体価の地域代表値は，ASO 抗体価におよぼす年令の検討結果から ASO 抗体価の年令補正に必要な定数を算出し各地域の40～60代の ASO 抗体価に乗じて10～30代の ASO 抗体価に換算して各地域平均値を算定した．

成　績

ASO 抗体価の性，年令別の全般的な分布は表1に示す通りである．すなわち ASO 抗体価は12単位以下から625単位まで分布したが，低抗体価といわれる50単位以下は158例（44.8%）で被検血清の約半数である．一般成人の正常値の上限といわれる166単位は検体の289/353例（84.4%）を示し250単位以上は55/353例（15.6%）であった．500単位で表わした17例はそのほとんどが333単位以上または500単位でその中1例のみが625単位を示した．全分布のピークは50単位の104例で未感染群といわれる12単位以下は当然の事ながら少なく3例にすぎなかった．

年令と ASO 抗体価の関係は，男女ともに10代に最高の ASO 抗体価を示し加令と共に減少傾向が認められた．各年代間の ASO 抗体価，差の検定結果は表2に示した．危険率5%以下で10～30代の ASO 抗体価間には有意差はなく40代以上と各代の ASO 抗体価間には有意差が認められた．この結果から10～30代（$n=289$）と40～60代（$n=63$）の2グループに分類して二者間の ASO 抗体価を比較検討すると危険率1%以下で両者間の ASO 抗体価の差が明らかにされた．$t=3.30>t_{120}^{0.01}2.62$

ASO 抗体価に示す性差の影響は表3に示した．男女間には差異が認められず各年代別の性差においても同様の結果が得られた．生活環境因子と ASO 抗体価の関係は表4に示し，表5には居住地域別平均 ASO 抗体価と地域別 ASO 抗体価の差の検定，表6は生活環境因子と都民成人 ASO 抗体価の相関関係の検討結果を示した．今回の成績からは表5，6に見られる様にいずれの因子間にも有意差，相関関係は認められずその影響を明らかにする事は出来なかった．

* 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. Titration of ASO titer of sera from adult Tokyoites

Age	No. of tested	ASO titer (Todd Unit)									Geometric mean titer
		<12	12	50	100	125	166	250	333	500	
10—19	76	0	10	24	1	16	6	8	5	6	152.4
20—29	161	1	24	39	6	33	30	19	1	8	130.6
30—39	52	0	3	18	3	14	10	2	0	2	118.2
40—49	28	0	7	9	2	8	1	0	1	0	79.2
50—59	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	—
60—69	35	1	7	14	1	6	3	2	0	1	89.6
Male	106	0	13	34	4	21	19	11	2	2	117.5
Female	247	2	39	70	9	56	31	20	5	15	126.3
Total	353	2	52	104	13	77	50	31	7	17	123.6
Cumulative (%)		0.6	15.3	44.8	48.4	70.3	84.4	93.2	95.2	100.0	

Table 2. Occurrence of ASO titer by age (log)

Age	10	20	30	40	60
10		0.39	0.00	2.35	2.26
20	—		−0.42	2.25	2.20
30	—	—		2.39	2.35
40	*	*	*		−0.08
60	*	*	*	—	

$P < 0.05$

Table 3. Occurrence of ASO titer by sex (log)

	n	$\bar{x}$ log ASO$\pm\sigma$
Female	247	0.189±0.468
Male	106	0.191±0.419

$F = -0.040 < F(351, 0.05) = 1.96$

Table 4. Original data on ASO titer and environmental indexes in Tokyo districts

District	I	II	III	IV	V	VI	VII
Chiyoda-ku	1.877	0.34	12.11	57	367	21	49
Chuo-ku	1.956	0.41	13.20	93	220	25	60
Minato-ku	1.799	0.29	9.00	112	232	17	49
Shinjuku-ku	2.025	0.33	9.00	206	233	15	32
Bunkyo-ku	2.309	0.41	12.40	196	300	15	31
Taito-ku	1.826	0.56	9.10	223	400	26	53
Sumida-ku	1.974	0.39	12.90	189	507	18	39
Koto-ku	1.949	0.49	14.40	124	230	12	24
Shinagawa-ku	2.001	0.35	8.90	235	475	16	38
Meguro-ku	2.159	0.34	9.70	202	193	15	31
Ota-ku	1.975	0.51	11.30	158	291	11	28
Setagaya-ku	1.340	0.29	7.50	137	31	12	20
Shibuya-ku	1.731	0.34	10.10	179	87	15	33
Nakano-ku	1.896	0.33	10.30	241	56	12	26
Suginami-ku	1.796	0.24	7.50	168	44	12	19
Toshima-ku	2.179	0.27	13.20	261	162	14	38
Kita-ku	1.986	0.27	9.50	208	181	12	24
Arakawa-ku	2.097	0.49	6.90	222	450	13	35
Itabashi-ku	1.964	0.51	12.60	154	231	14	25
Adachi-ku	2.248	0.32	9.60	113	109	9	19
Edogawa-ku	1.815	0.36	11.10	103	107	10	20

Note: I; ASO titer (log), II; sulphur dioxide mg/day/100 m^2, III; fall dust ton/km^2. month, IV; density, V; 10 employees/area, VI; roads/area (%), VII; 100 motor vehicles/area.

Table 5. Regional difference of occurrence of ASO titer (log)

District	$\bar{x} \pm \sigma$	n
Commercial	1.977±0.418	132
Industrial	1.952±0.419	149
Residential	1.355±0.465	102
$\phi_1=2$	$\phi=200$	n=383

$F=2.475<F^2_{200}(0.05)$

$F^2_{200}(0.05)=3.04$

Table 6. Correlation of coefficient between ASO titer obtained from sera of adult Tokyoites and environmental indexes

	II	III	IV	V	VI	VII
I	0.056	0.199	0.301	0.207	−0.202	−0.118
II		0.295	−0.006	0.528**	0.283	0.220
III			−0.242	0.131	0.186	0.198
IV				0.172	−0.080	−0.078
V					0.498*	0.540**
VI						0.917**

$r=0.369$ (19, 0.05)

Note: I, II, III, IV, V, VI, VII=the same marks as in table 4.

考　察

Streptolysin O は溶れん菌の代表的な菌体外産物でこれに対応する抗体の ASO はヒトによく産生される事から血清学的診断の1指標に広く利用されている．しかし ASO 抗体は溶れん菌の自然感染によって健康人においてもこの抗体を保有しており，更に生活環境によって異なった抗体価分布を示す事が知られてから健康者の ASO 抗体価に及ぼす因子が検討されている．しかし多くの報告は，溶れん菌感染症が小児に多発することからその調査対象は幼児および学童であり，成人の ASO 抗体価分布に関しての報告はあまりみられない．我々は健康都民の ASO 抗体価を測定して成人の正常値を推定し現時点での都民生活環境が ASO 抗体価におよぼす影響を ASO 抗体価の地域差から検討した．

都民成人の ASO 抗体価は表1に示すように50単位以下は約半数の 104/353 例（44.8%）を占め 166 単位以下は 298/353 例（84.4%）であり 250 単位以上は55/353例（15.6%）にすぎなかった．この ASO 抗体価分布は大国ら[3]（n=97）および鳥巣ら[4]（n=291）の調査報告と全く一致し両者が推定した成人 ASO 抗体価の正常値と同様に都民成人 ASO 抗体価正常値の上限は 166 単位であると考察した．

500 単位で表わした17名の年令構成は，1名を除いて10～20代であった．この様に高い ASO 単位を示した原因については今回の調査では他の情報を入手出来なかったので全く不明である．しかし健康者中の高抗体価保有者について追跡調査を実施した鳥巣ら[4]はその報告の中で10～20代の高抗体価保有者の ASO 単位は変動し易く3カ月後の再検査の結果では正常単位に含まれる例が多かったと報告している．しかし中には全く元気で無症状で病歴とのつながりも不明な高 ASO 抗体価を保有する者もありこの者達は一度上昇した ASO 抗体を持続して保有する因子を内包しているのではないかと考察している．今回の我々の調査では一回だけの測定なのでこの成績を検討する事は出来ないがその年令構成から考えると変動し易いグループに包含されるのかもしれないと思われた．

ASO 抗体価と性差間には関係が認められず年令との間には有意差が示された．すなわち加令と共に ASO 抗体価は低下し40代以降は全般的に低い ASO 抗体価分布を示した．高令者の ASO 抗体価についての調査報告は少ないが Rantzら[5]が40歳以上の年令層においてその抗体価が低いことを指摘し，本邦では富岡ら[6]の高令者（60歳以上）の成績がその傾向を示している．今回の成績はこれらの成績を裏づけたものであろう．

ASO 抗体価の地域差については，古くは Cuburn and Pauli[7]の緯度差による居住地域 ASO 抗体価の変動，新しくは，J. Rotta の熱帯，亜熱帯地域間の ASO抗体価分布[8]，および山田[1]，奥山ら[9]の学童の ASO 抗体価，ASK（Antistreptokinase）抗体価に見た農村，都市型分布があり，それぞれ変動傾向を明示している．今回の成績からは何んらの関係もみい出せなかったが，幾何平均値に見る都民平均値 124 単位は，他の報告43～80[10,11]単位に比較するとやや高く，今後の検討が残された．溶れん菌罹患率，生体の免疫応答等，宿主側の要因を考慮して学童の ASO 抗体価を対象に検討を行なうならば，地域変動および変動要因を見出す可能性があると思われた．

ま と め

都民成人の ASO 抗体価の分布を調査して成人 ASO 抗体価の正常値を求めた．更に ASO 抗体価におよぼすであろう生活環境因子との相関関係を求め ASO 抗体価の地域差を検討した．

都民成人の ASO 抗体価分布は，その84.4%が 166 単位以下で占められたので全般的には正常価範囲の上限は 166 単位であると推定した．

生活環境因子との間には何れの因子ともその影響が認

められず都内地域差においても明らかにされなかった.

ASO 抗体価の性別による差異はみられなかったが年令差との間には有意差が示された. 成人間における ASO 抗体価は, 加令と共に減少傾向を示し特に40歳以上では低い ASO 抗体価分布が観察された. 感染症の疫学調査の1指標として ASO 抗体価測定を実施する場合には高令者の ASO 抗体価に対して十分な理解と検討が必要であると示唆された.

謝辞 本調査にあたり, 資料提供および御指導をいただいた環境保健部長 野牛 弘氏に深謝いたします.

文 献

1) 山田俊彦：臨床病理, **23**, 190, 1975
2) Rantz, L.A. and Randall, E.: *Proc. Exp. Med.*, **59**, 22, 1945
3) 大国寿士ら：日本臨牀, **28**, 1673, 1970
4) 鳥巣要道ら：リウマチ, **9**, 284, 1969
5) Rantz, L.A.: *Am. J. Med. Sc.*, **224**, 194, 1952
6) 富岡 一ら：日本伝染病学会雑誌, **35**, 591, 1961
7) Coburn, A.F. and R.H. Pauli: *J. Exper. Med.*, **62**, 129, 1035
8) Rotta, J.: *Streptococcal Disease and the Community*, Excepta Medica, 1974, American Elservier Publishing Co., Inc. New York
9) 奥山雄介ら：埼玉県衛生研究所年報, **4**, 107, 1964
10) Kusama, H. *et al.*: *Jap. J.M. Sc. & Biol.*, **15**, 175, 1962
11) 福岡良男：日本臨牀, **26**, 2, 111, 1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 45—48, 1976

Antistreptolysin O の簡易検査法の検討

加納堯子*, 村田以和夫*, 大久保暢夫*

Evaluation of New Reagents for Qualitative ASO Slide Agglutination Test

TAKAKO KANOH*, IWAO MURATA* and NOBUO OHKUBO*

溶血連鎖球菌（溶れん菌）感染に関連した各種疾患の補助診断として，また溶れん菌の疫学調査における感染判定の1指標として Antistreptolysin O (ASO) の測定は現在広く利用されている．ASO 抗体価測定には，溶血阻止を指標とする Rantz-Randall (R-R)[1] 法が現在最も普遍的に実施されてはいるが，この R-R 法には複雑な血清希釈や血球の入手等，本法を実施する上でいくつもの難点がある．

一般臨床医家にとっては ASO 抗体価の測定値はともあれ先ず正常範囲の ASO 抗体価血清と ASO 抗体価の高い血清を精度よくふり分ける簡易な方法が望まれる．又検査室においても，R-R 法実施前に簡便なふるい分け検査が可能であるならば労力の軽減の点から ASO 検査の一改良法の手段として非常に有効である．

このような目的をもって Behringwerk 株式会社（H社）および富士臓器製薬株式会社（F社）は最近，スライド板上の直接凝集を指標とした ASO 簡易検査法を開発した．ASO 簡易検査法試薬 Latex-ASL-Reagent（H社），Strepto-Slide（F社）を入手する機会を得たのでその有用性を従来法の R-R 法 ASO 抗体価と比較しながら検討を行った．

材料および方法

1) 被検血清は，1974年，都立豊島病院に入院した猩紅熱患者85名（2～14歳）の血清で病週を追って採血した233検体である．被検血清は，当所の血清収集保存室に −70℃ で凍結保存されていた血清で，使用直前に融解し56℃，30分間非働化して用いた．

2) 使用試薬は栄研化学 SLO（2号，Lot No. 305C），Latex-ASL-Reagent（以下H試薬）Lot No. 64E001，Strepto-Slide（以下F試薬）Lot No. AZ10202，である．血球は抗凝固剤入りのヒトO型血球を用いた．

3) ASO 抗体価の測定は，従来の溶血阻止を指標とする R-R 法[1]の半量法を実施し，ASO 抗体価は，溶血阻止抗体希釈倍数をもって表わす Todd 単位によった．

H試薬による測定方法（以下H試薬法）は，市販セットに添付されている吸収用抗原 Streptolysin O の1ビンを 2 m*l* の生理食塩水で溶解し，この 0.3 m*l* と被検血清 0.1 m*l* を小試験管中で混合して室温で15分間放置した．ついで混合液の 0.05 m*l* と残渣抗体チェック用抗原液 0.05 m*l* をスライドガラス上で混合し，4～6分後における凝集の有無によって被検血清の ASO 抗体陽性を判定した．

F試薬による測定方法は，（以下F試薬法）市販セットに添付されている希釈用液を用いて被検血清を 1：40 に希釈し，この 0.05 m*l* と感作抗原液 0.05 m*l* を添付の判定板上でよく混合して2分間室温に放置した．ついで判定板を静かに傾けて凝集を一次判定した後，更に2分間室温に静置して崩れた凝集が復元して明確な凝集塊を形成するか否かを観察した．すなわち，2分放置後の凝集も更に2分後の凝集塊も認められず均一な乳白色の微粒子懸濁液を陰性血清と判定し，2分後の一次判定で明らかな，または弱い凝集が見られ，かつ4分後の第二次判定で凝集塊が明確に認められたものを陽性血清とした．両試薬とも陰性，陽性血清を必ず対照におき，F試薬法は全反応時間を5分以内で実施した．

成　績

1) F試薬法の血清希釈と判定時間の検討

H，F 試薬の測定方法についてその操作，判定方法の検討を行ったところ，H試薬法には問題点が認められなかったが，F試薬については操作は非常に簡単であるが判定に難しさがあった．そこで被検血清の希釈倍数，判定時間，および判定方法について検討を行った成績が

* 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. Effect of time

Todd Unit.	<12				100				166			
Serum No.	A		B		C		D		E		F	
Serum dilution	×20	×40	×20	×40	×20	×40	×20	×40	×20	×40	×20	×40
*												
1 min.	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−
2 min.	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+	+	±
4 min.	±	−	−	−	+	−	−	−	+	+	+	±
10 min.	±	−	−	−	+	±	±	−	+	+	+	+

*; Time when titer is used

表1である．使用した血清は，溶れん菌未感染と考えられる<12単位血清，ほぼ同一数の陰性陽性例が認められた100単位血清，陽性血清数の増加傾向がみられた166単位血清，大部分の血清を陽性と判定した250単位血清，および>2500単位の高ASO抗体価血清の計13例である．これらの血清を各々20倍，40倍に希釈して同一操作で同一の感作抗原を加えて反応させ，1分後，2分後に凝集を観察し更に2分静置した4分後に第二次判定の凝集塊の形成を確認し，ついでその状態のままで室温に6分間放置して10分後の凝集を判定した．その結果<12単位の血清では，20倍希釈，40倍希釈の成績に大差はないが，100単位の血清では20倍希釈で一例が陽性と判定され，166単位血清は20倍希釈でほとんどの血清が陽性を示しその凝集塊は大きく明確であった．250単位血清では更にその傾向を強め>2500単位の血清では，両希釈液とも30秒以内に凝集が観察された．判定時間は，>2500単位血清を除いて，いずれのグループも1分後の判定よりも2分後の一次判定，および4分後の第二次判定の凝集塊の形成を観察する方法が良好であった．しかし二次判定以後の室温放置は判定を惑わすので賢明ではなかった．

以上，これらの成績を総合的に考察すると，F試薬法の鋭敏性をTodd 200単位の血清をふるい分ける精度に基準をおくと，先ず200単位以上の血清には著明な凝集を示し，逆に200単位より低い抗体価血清に凝集を示さない反応条件は，被検血清希釈は40倍が良好であった．判定は第一次判定を含む第二次判定の凝集塊の形成を観察する方法が容易でまた効果的であることが判明した．

2) R-R法ASO抗体価とH，F試薬法の対比成績

R-R法ASO抗体価とH，F試薬法の対比成績を表2に示した．供試血清のASO抗体価は，<12～>2500単位までの広い分布を示し，一般に小児における溶れん菌感染を判定するASO抗体価の陽性限界はR-R法ASO抗体価333単位以上（Jonesの基準）[2]とされているが，今回の調査では233例中49例（21.0%）が陽性ということになった．これら供試血清ではH試薬法に対する陽性例はTodd 250単位以上，F試薬法ではTodd 166単位以上の例で陽性例が急増したが，これら陽性例中には弱陽性例が含まれており明確な陽性は両試薬法ともTodd 333単位以上の血清に出現した．

ASO価Todd 333単位以上の49例は，H試薬法では全例49（100.0%），F試薬法では46例（93.9%）が陽性であり，Todd 250単位以上の67例は，H試薬法では65例（97.0%），F試薬法では62例（92.5%）が，同じくTodd 166単位以上の85例では，それぞれ69例(81.2%)，73例（85.9%）が陽性であった．上記各々Todd単位に区分して陰性出現率を見ると，Todd 250単位以下の血清184例中，H試薬法では161例（87.9%），F試薬法では144例（78.3%），Todd 166単位以下になるとそれは

Table 2. Distribution of positive and negative samples obtained by using agglutination reagents

Todd Unit	H. reagent		F. reagent	
	(−)	(+)	(−)	(+)
>2500	0	2	0	2
2500	0	0	0	0
1250	0	3	0	3
833	0	9	0	9
625	0	5	0	5
500	0	15	0	15
333	0	15	3	12
250	2	16	2	16
166	14	4	7	11
125	12	0	7	5
100	11	1	7	5
50	11	0	9	2
12	42	1	43	0
<12	69	1	69	1

Note : (−); negative
(+); positive

on agglutination test

				250								>2500	
G		H		I		J		K		L		M	
×20	×40	×20	×40	×20	×40	×20	×40	×20	×40	×20	×40	×20	×40
												+ (30sec)	+
−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+
+	+	+	±	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+
+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

各々159例（95.8%），142例（85.5%）であった．

以上，上記の成績から明らかなようにR-R法ASO価とH, F試薬法はかなり良く対応した．また，H, F試薬法の陽性出現率，陰性出現率から勘案すると，H, F試薬法の陽性凝集は，おおむねTodd 250単位以上に見られ，又陰性例はTodd 166単位以下に多く認められると考察した．

3) H試薬法とF試薬法の陽性数対比

R-R法によって測定されたASO抗体価別にH試薬法とF試薬法の陽性数を対比させて相関係数を算出すると $r=0.9001$ となり，更に相関係数をF検定すると1%の水準で有意であった．

考　察

ASO抗体価測定法として現在広く実施されているのはR-R法[1]およびその変法であるが，これはR-R法によって測定される患者血清抗体価のTodd単位が疾患の経過とよく対応して変動する理由からである．また，臨床分野での理解も深いことから日常検査に好んで用いられて来ている．しかしこのR-R法も手技操作が複雑であることからその改良が望まれている．ASO抗体価測定法もタンニン酸処理の赤血球を担体とする方法[3]，*Serratia* を担体とする方法等[4]が考案され報告されているが，しかしいまだ検討の域を出ていない．最近，開発された二社の凝集反応による簡易検査法は，高ASO抗体価血清をチェックして正常血清とふるい分ける目的で考案されたものである．H, F試薬法により患者血清を精度よくしかも簡単に分類する事が可能ならば，それはそれなりに有用性があると考えられる．

H試薬法は予め一定力価のStreptolysin O (SLO)と被検血清を反応させた後，未反応のASOを検出する方法である．SLOはLatexを担体としてcoatingされている．

F試薬法は溶れん菌菌体外生産物を精製し，担体の *Serratia marcescens* にcoatingして被検血清と直接反応させる方法で，ASO抗体価の他にAntistreptokinase (ASK)抗体価の測定が可能である．

1) F試薬法の血清希釈と判定時間の検討成績は表1に示される様に，F試薬法の陽性判定基準をTodd 200単位以上とするならば，被検血清希釈は40倍希釈がその目的に適応し，判定には第一次判定と第二次判定の凝集塊の形成を観察する方法が容易であった．

しかし，成績にも見られる様に判定時間は5～6分で判定を終了すべきであると考察した．なお，F試薬キットに添付されている判定板は鏡加工がほどこされていて，担体が微細で判定に困難な場合には，鏡の立体的映像効果が発揮されて，F試薬法の難点をよく補い判定に大いに役立つものと思われた．

2) R-R法ASO抗体価とH, F試薬法の対比成績は表2に示された様にかなりの対応結果が認められた．得られた結果を X^2 法検定すると以下の様な成績が得られた．

R-R法ASO抗体価≧333単位を陽性限界とした場合の陽性対比の X^2 値は，H試薬法：$5.90<X^2(1,0.05)=3.84$，F試薬法：$14.27>X^2(1,0.01)=6.63$，≧250単位を陽性限界とした場合，H試薬法：$0.26<X^2(1,0.05)=3.84$，F試薬法：$3.51<X^2(1,0.05)=3.84$，≧166単位の陽性限界ではH試薬法：$1.62<X^2(1,0.05)=3.84$，F試薬：$0.009<X^2(1,0.05)=3.84$ であった．すなわちR-R法で測定されたASO抗体価の≧333単位を陽性限界と定めるとH, F試薬の全被検血清に示す陽性数は各々，5%，1%の危険率でR-R法の陽性数との間に有意の差が認められ，≧250単位，≧166単位に陽性限界をおくとH, F試薬法とも5%の危険率でR-R法との間に有意差が認められなかった．

両試薬法の特異性から成績を考察すると，R-R法333単位以上を陽性限界とするならば，H試薬法は陽性の全血清（100.0%）を陽性と判定し，F試薬法も3例を除いた93.9%の血清を陽性と判定する可能性を示す．陰性側

における特異性を考えると，Todd 250 単位以下では陰性例はH試薬法87.9%，F試薬法78.3%，166 単位以下に限界をおくと陰性例は各々，95.8%，85.5%検出されたので，この結果から正常範囲の ASO 抗体価血清の約10%前後の血清をH試薬法は陽性とチェックし，F試薬法は約20%の血清を陽性と判定する可能性をもつと考えられる．換言すれば，H, F 試薬法は，成人の正常 ASO 抗体価の上限 Todd 166 単位以下の血清についてわずかに陽性と判断する可能性を保有しても，Todd 333 単位以上の血清については，そのほとんどの血清を陽性と判定して高い抗体価血清を見逃す危険性が非常に少ないと判断された．

受身凝集反応に基づく方法に使用される担体は一般に赤血球，Latex，カオリン等であるが，F 試薬法では *Serratia marcescene* をその担体として用いている．F 試薬を実施する場合，*Serratia* に対する抗体の影響について考慮されるが，同様に *Serratia* を担体とする ASO 抗体価測定用の検査試薬（Blue—ASO）の使用経験[5]から約 300 例中に殆んどその抗体が確認されなかったので今回も *Serratia* に対する自然抗体は関与しないものと考察した．

R-R 法の低 ASO 抗体価に出現する少数例の H, F 試薬の陽性数は，R-R 法，H, F 試薬の関与する抗体の違いが考えられる．すなわち R-R 法による測定で検出される抗体は主として 7S であり，凝集法による場合では 19S と 7S であるといわれる[6]．更にF試薬法は，ASK 抗体も測定可能であるので ASO 抗体より持続期間が長いといわれる ASK 抗体[7]を検出した可能性も否定出来ない．今後，検討の必要があると思われた．

以上，H, F 試薬法の成績と R-R 法 ASO 抗体価を比較検討した結果，従来の ASO 測定法による成績とかなりよく相関し，簡便さ，迅速性から考慮して R-R 法の定量前段階のスクリーニング・テストには非常に有効な方法と考えた．

ま と め

最近，開発された ASO 検出簡便法試薬 2 種のスライド凝集，H, F 試薬の有用性を従来の R-R 法測定値と比較検討を行った．

被検血清には猩紅熱患者血清 233 例を使用して比較検討した結果，H, F 試薬とも従来の R-R 法測定値とかなりの相関性を示した．従って両試薬の検査目的である ASO 抗体価の高い血清と正常血清をスクリーニングによって分類するには，操作の簡便性，迅速性から考察して非常に有効な試薬と判定した．

F試薬の判定には，反応 2 分後の凝集像と更に 2 分後の凝集塊を観察する第一次判定，第二次判定が判定を容易にした．

なお，両試薬の陽性凝集反応条件の調整は，R-R 法 333 単位以上の SLO 量と判定された．

謝辞 本調査にあたり試料提供をいただいた都立豊島病院伝染科 飯村 達氏に深謝いたします．

文 献

1) Rantz, L.A. and Randall, E: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **59**, 22, 1945
2) *Committee Report*: *Circulation*, **32**, 664, 1965
3) 大国寿士ら：医学のあゆみ，**59**, 13, 798, 1966
4) ASL-O 価測定用凝集反応試薬 Microtiter Technique 文献集 I，富士臓器製薬
5) 村田以和夫，加納堯子：第23回日本臨床病理学会雑誌，**23**, Supp, 193, 1975
6) 大国寿士ら：日本臨牀，**28**, 1673, 1970
7) 奥山雄介ら：感染症学会雑誌，**47**(12), 524, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 49—53, 1976

1975年に猩紅熱患者から検出されたA群溶血レンサ球菌の薬剤感受性

柏木義勝*, 柴田実*, 徳江シゲ子*
浅野洋子*, 大久保暢夫*

Antibiotic Sensitivities of *Streptococcus pyogenes* Derived from Scarlet Fever Patients in 1975

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

During the year of 1975, a total of 842 strains of group A hemolytic *Streptococci*, consisting of 311 strains sent from Hokkaido, 499 from Kanto, and 32 from Kansai districts, was subjected to their sensitivities against 16 antimicrobial agents. All the strains studied here were from the patients with scarlet fever. After the isolation they were brought to the laboratory in the lyophilized state for tests.

Minimum inhibition concentrations (MICs) of penicillin G (PC G), aminobenzyl-penicillin (ABPC), cephalexin (CEX), cefazolin (CEZ), and cephaloridine (CER) to the strains have been exist between 0.006—0.05μg/ml, 0.0125—0.1μg/ml, 0.2—1.56μg/ml, 0.1—0.39μg/ml and 0.0063—0.05μg/ml respectively. It is indicating that all the strains tested have been sensitive to the above mentioned drugs. On the other hand, MICs of the rest of drugs, such as chloramphenicol (CP), tetracyclin (TC), erythromycin (EM), oleandomycin (OL), josamycin (JM), leucomycin (LM), propionylmaridomycin (PMDM), acetylspiramycin (ACSPM), mydecamycin (MDM), lincomycin (LCM) and clindamycin (CLDM) to the strains showed more complicated spectra, and MICs of each drug showed two peaks to the strains.

Among the isolates in 1975, the most prevalent serotype of the organisms was found to be type 12 (69.8%). Of them, 212 strains (86.9%) showed multipledrug resistance against CP, TC, Macrolides and LCM. As for the type 4 strains, 54 (61.4%) of 88 in the last 4 years showed resistance to TC.

緒　言

ペニシリンを初めとし，抗生物質が開発されて以来，多くの細菌性感染症は急激に減少し，その感染病像も異なってきたことは事実である．しかし溶血レンサ球菌感染症およびその続発症と考えられているリウマチ熱や急性腎炎は，なお依然として減少傾向は認められない．我々はこのような事実から1965年以来A群溶血レンサ球菌（以下A群菌と略す）の各種抗生物質に対する感受性を測定し，その年次的動向に検討を加えてきた[1-4]．

今回は1975年に分離された猩紅熱由来A群菌の薬剤感受性を測定し，さらに耐性パターンと菌型との関係についても，過去4カ年間の成績と比較検討したので報告する．

材料ならびに方法

1) 供試菌株およびその収集施設

供試菌株は1975年に下記の施設から当研究所に送付された猩紅熱患者由来のA群菌842株である．その内訳は札幌市立札幌病院311株，都立豊島病院281株，都立荏原病院163株，都立駒込病院55株，大阪市立桃山病院32株である．

なお，供試菌株842株のうち696株は，国立予防衛生研究所あるいは神奈川県衛生研究所において菌型々別が実施された．

2) 薬剤感受性試験

* 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 *Streptococcus*

MIC (μg/ml)	Antibiotics						
	PC G	ABPC	CEX	CEZ	CER	CP	TC
>200							1 (0.1)
200							290 (34.4)
100						3 (0.4)	429 (51.0)
50						231 (27.4)	11 (1.3)
25						279 (45.0)	3 (0.4)
12.5						11 (1.3)	11 (1.3)
6.25						10 (1.2)	1 (0.1)
3.125						185 (22.0)	12 (1.4)
1.56			1 (0.1)			23 (2.7)	72 (8.6)
0.78			216 (25.7)				12 (1.4)
0.39			615 (73.0)	1 (0.3)			
0.2			10 (1.2)	359 (95.2)			
0.1		1 (0.1)		17 (4.5)			
0.05	1 (0.1)	49 (5.8)			1 (0.3)		
0.025	38 (4.5)	748 (88.8)			43 (11.4)		
0.013	792 (94.1)	44 (5.2)			328 (87.0)		
0.006	11 (1.3)				5 (1.3)		
0.003							
Total	842(100%)	842(100%)	842(100%)	377(100%)	377(100%)	842(100%)	842(100%)

供試薬剤は penicillin G (PC G), aminobenzylpenicillin (ABPC), cephalexin (CEX), chloramphenicol (CP), tetracyclin (TC), erythromycin (EM), oleandomycin (OL), josamycin (JM) の8剤である．なお一部の菌株については，下記の薬剤も追加検討した．

cefazolin (CEZ), cephaloridine (CER), leucomycin (LM), propionylmaridomycin (PMDM), acetylspiramycin(ACSPM), mydecamycin (MDM), lincomycin (LCM), clindamycin (CLDM)

感受性測定法は前報[4]と同様である．

成　績

1) 薬剤感受性

Table 1 に示すようにペニシリン系（以下ＰＣ系と略す）および cephalosporin 系薬剤に対しては，供試したすべての菌株が感受性を示し，本年も昨年までと同様に耐性株は認められなかった．

ＣＰは1969年より耐性化の徴候が現われ，1970年には完全に MIC 25μg/ml 以上および 1.56～3.13μg/ml の2峰性の分布であった．以後1972年までは耐性分離率に大きな変動はみられなかったが，1973年に至って MIC 25μg/ml 以上の耐性株が約70%を占めるようになった．その後，今回の1975年まで大きな変動はなく，むしろ1974年を頂点として，1975年には耐性菌の占める割合はやや減少している．

次にＴＣに対しては，供試菌株の約85%が MIC 100～200μg/ml の高度耐性を示し，この成績は昨年とほぼ同程度であった．

macrolide（以下 Mac と略す）系薬剤に対しては，ＣＰの耐性傾向と同様に1970年頃より耐性化が始まり，1973年には MIC 200μg/ml 以上の高度耐性株が約70%，翌1974年では約75%と増加の一途をたどっていたが，1975年に至って，薬剤別では65～70%とばらつきはあるにしても初めて感受性化の徴候がみられた．

リンコマイシン系（以下 LCM 系と略す）の場合は，化学構造の類似している Mac 系とほぼ同様の MIC の分布を示したが，Mac 系では比較的中等度耐性株が存在するのに対し，LCM 系2剤は共に高度耐性株あるいは感受性株のいずれかに2分された．

2) 血清型

供試菌株のうち，血清型別が実施された696株の型別状況は Table 2 に示すとおりである．12型が最も多く486/696株（69.8%）その他 18型24/696株（3.4%），1型23/696株（3.3%），6型14/696株（2.0%），4型4/696株（0.6%），22型3/696株（0.4%），B3264型1/696株（0.1%）の順で，型別不能株は141/696株（20.3%）であった．なお地域別による菌型の差異は認められなかった．

3) 菌型別による耐性パターン

ＰＣ系と cephalosporin 系薬剤に対しては，供試したすべての菌株が感受性を示したので，それ以外の CP・

pyogenes Isolates from The Patients of Scarlet Fever in 1975

EM	OL	JM	LM	PMDM	ACSPM	MDM	LCM	CLDM
558 (66.3)	582 (69.1)	570 (67.7)	266 (70.6)	265 (70.3)	266 (70.6)	265 (70.3)	270 (71.6)	270 (71.6)
1 (0.1)	1 (0.1)							
					1 (0.3)	3 (0.8)		
		1 (0.1)	1 (0.3)			1 (0.3)		
	1 (0.1)	2 (0.2)		3 (0.8)	3 (0.8)			
6 (0.7)		8 (1.0)	3 (0.8)					
7 (0.8)	3 (0.4)	3 (0.4)			1 (0.3)			
1 (0.1)	1 (0.1)			1 (0.3)	34 (9.0)			
1 (0.1)	75 (8.9)	1 (0.1)		5 (1.3)	72 (19.1)	1 (0.3)		
	147 (17.5)	15 (1.8)	2 (0.5)	84 (22.3)		20 (5.3)		
1 (0.1)	32 (3.8)	206 (24.5)	43 (11.4)	17 (4.5)		79 (21.0)	12 (3.2)	
5 (0.6)		35 (4.2)	62 (16.4)	2 (0.5)		8 (2.1)	89 (23.6)	5 (1.3)
226 (26.8)		1 (0.1)					6 (1.6)	61 (16.2)
36 (4.3)								41 (10.9)
842(100%)	842(100%)	842(100%)	377(100%)	377(100%)	377(100%)	377(100%)	377(100%)	377(100%)

TC・Mac 系および LCM 系の 4系薬剤の組み合わせで，1972～1975年の菌株について，その耐性（あるいは感受性）パターンを総合的に検討した．この場合の耐性値は4系薬剤共に MIC 25μg/ml 以上とした．なお1973年以前は LCM 系薬剤の感受性値の測定は行なっていないので，他の3系薬剤について検討した．その結果は Table 3 に示すとおり，初めに 1972～1975 年の 4 カ年を通しての主要菌型である 12 型についてみると，CP・TC・Mac 系・LCM 系（1972 年および 1973年は除く）のすべての薬剤に対して耐性株が多く認められた．すなわち1972年 7/32 株（21.9%），1973年 228/367 株（62.1%），1974年 87/95 株（91.6%），1975 年 212/244（86.9%）であり，1972年を除いて各年度とも CP・TC・Mac 系・LCM 系の 4剤耐性型が他の耐性型に比べ，出現頻度が高かった．

4型は，ＴＣ単独耐性のものが他の耐性型よりも多くみられ，4カ年全体では 54/88 株（61.4%）であった．

6型の場合は，4カ年全体では 36/55 株（65.5%）が感受性菌であり，次いで多くみられる CP・TC 2剤耐性型は全体では 10/55 株（18.2%）に過ぎないが，感受性株を除いてのいわゆる各種耐性型との比較では 10/19 株（52.6%）とかなりの高率を示した．

1型は，6型と同じく感受性株が多くみられ，4カ年では58/87株（66.7%）を占めている．耐性型としては，ＴＣ単独耐性もしくは，CP・TC 2剤耐性のものが比較的多く，Mac 系単独耐性は1株も認められなかった．

18型は，17株中1株のみがＴＣ単独耐性で，その他はすべて感受性株であった．

型別不能株は，感受性株が比較的多く，4カ年全体で 30/85 株（35.3%），次いでＴＣ単独耐性もほぼ同率の 29/85 株（34.1%）が認められた．

Table 2. Distribution of Serotypes of Strains of *Streptococcus pyogenes* Isolated in Three Districts of Japan in 1975

Districts	Serotypes								Total
	1	4	6	12	18	22	B 3264	U T	
Hokkaido	1(0.4)	1(0.4)	5(2.2)	153(67.6)	13(5.8)	0	0	53(23.5)	226 (100%)
Kanto	21(4.8)	3(0.7)	9(2.1)	308(70.2)	11(2.5)	3(0.7)	1(0.2)	83(18.9)	439 (100%)
Kansai	1(3.2)	0	0	25(80.6)	0	0	0	5(16.1)	31 (100%)
Total	23(3.3)	4(0.6)	14(2.0)	486(69.8)	24(3.4)	3(0.4)	1(0.1)	141(20.3)	696 (100%)

Table 3. Comparisons of The Incidence of Drug Resistance and Serotypes of The Organisms Isolated in The Last 4 Years (1972—1975)

Years	Drugs				Serotypes									Total
	CP	TC	Mac	LCM	1	3	4	6	12	18	22	B3264	UT	
1972	R	R	R		6 (10.7)	1 (50.0)	0	0	7 (21.9)	0			0	14 (10.4)
	R	S	S		0	0	0	0	1 (3.1)	0			0	1 (0.7)
	R	R	S		6 (10.7)	0	1 (4.3)	2 (12.5)	6 (18.8)	0			1 (20.0)	16 (11.9)
	S	R	R		0	0	0	0	1 (3.1)	0			0	1 (0.7)
	S	S	R		0	0	0	0	0	0			1 (20.0)	1 (0.7)
	S	R	S		9 (16.1)	1 (50.0)	18 (78.3)	1 (6.3)	4 (12.5)	0			0	33 (24.4)
	S	S	S		35 (62.5)	0	4 (17.4)	13 (81.3)	13 (40.6)	1(100)			3 (60.0)	69 (51.1)
	Total				56(100%)	2(100%)	23(100%)	16(100%)	32(100%)	1(100%)			5(100%)	135(100%)
1973	R	R	R		0	1 (12.5)	6 (11.8)	0	228 (62.1)	0	0		1 (6.3)	236 (46.2)
	R	S	S		0	0	0	1 (3.2)	4 (1.1)	0	0		0	5 (1.0)
	R	R	S		3 (12.0)	2 (25.0)	2 (3.9)	4 (12.9)	48 (13.1)	0	1 (20.0)		3 (18.8)	63 (12.3)
	R	S	R		0	0	1 (2.0)	0	21 (5.7)	0	0		0	22 (4.3)
	S	R	R		0	0	2 (3.9)	0	6 (1.6)	0	0		0	8 (1.6)
	S	S	R		0	0	0	3 (9.7)	16 (4.4)	0	0		1 (6.3)	20 (3.9)
	S	R	S		3 (12.0)	2 (25.0)	28 (54.9)	4 (12.9)	24 (6.5)	1 (12.5)	0		5 (31.3)	67 (13.1)
	S	S	S		19 (76.0)	3 (37.5)	12 (23.5)	19 (61.3)	20 (5.4)	7 (87.5)	4 (80.0)		6 (37.5)	90 (17.6)
	Total				25(100%)	8(100%)	51(100%)	31(100%)	367(100%)	8(100%)	5(100%)		16(100%)	511(100%)
1974	R	R	R	R	0	0	1 (8.3)	0	87 (91.6)		0		1 (7.1)	89 (65.0)
	R	S	S	S	1 (100)	0	1 (8.3)	0	0		0		0	2 (1.5)
	R	R	S	S	0	7 (77.8)	1 (8.3)	2 (40.0)	3 (3.2)		0		1 (7.1)	14 (10.2)
	S	R	S	R	0	0	0	0	1 (1.1)		0		0	1 (0.7)
	S	R	S	S	0	2 (22.2)	6 (50.0)	0	3 (3.2)		0		6 (42.9)	17 (12.4)
	S	S	S	S	0	0	3 (25.0)	3 (60.0)	1 (1.1)		1 (100)		6 (42.9)	14 (10.2)
	Total				1(100%)	9(100%)	12(100%)	5(100%)	95(100%)		1(100%)		14(100%)	137(100%)
1975	R	R	R	R	0		0	0	212 (86.9)	0	0	0	7 (14.0)	219 (69.3)
	R	R	S	S	0		0	2 (66.7)	4 (1.6)	0	0	0	8 (16.0)	14 (4.4)
	R	R	S	R	1 (20.0)		0	0	0	0	0	0	1 (2.0)	2 (0.6)
	R	S	R	R	0		0	0	2 (0.8)	0	0	0	0	2 (0.6)
	S	R	R	R	0		0	0	8 (3.3)	0	0	0	1 (2.0)	9 (2.8)
	S	R	S	S	0		2 (100)	0	16 (6.6)	0	1 (33.3)	0	18 (36.0)	37 (11.7)
	S	S	S	S	4 (80.0)		0	1 (33.3)	2 (0.8)	8 (100)	2 (66.7)	1 (100)	15 (30.0)	33 (10.4)
	Total				5(100%)		2(100%)	3(100%)	244(100%)	8(100%)	3(100%)	1(100%)	50(100%)	316(100%)

Note: R indicate MIC of greater than 25μg/m*l*, and S indicate MIC of less than 25μg/m*l*

考　　察

今回検討したA群菌の薬剤感受性試験で特に注目されたことは，1970年より Mac 系薬剤に対し耐性化の歩みを続けてきたA群菌が，1975年に至って初めて減少傾向を示したことと，菌型においても12型が，足並みをそろえるかのように分離率の減少をみせたことである．この Mac 系耐性化の下降の兆しは，同系薬剤の使用頻度の減少に起因するものと推察されるが，ほとんど同時にみられた12型の減少の原因については，現段階では明らかでない．この点については，今後詳細な検討が必要であろう．

次にＣＰに対する年次的動向をみると，Mac 系と並行した耐性傾向を示している．すでに生方ら[5]は，ファージによる耐性伝達を証明し，それによるとＴＣ耐性のみを運ぶものと，ＣＰあるいは CP と Mac 系耐性を同時に運ぶものと少なくとも２種のファージが存在することを推測しており，このことからも CP と Mac 系の強い関連性を推察することができる．なお，1975年後半以降，臨床面でのＣＰ使用の適応症に大幅な制限が加えられたことも，今後ＣＰ耐性減少傾向を考察する際，留意すべきことと思われる．

菌型と耐性パターンの関係については，先に宮本ら[6]が，４型とＴＣ耐性，12型と Mac 系耐性の関連性を示唆する報告を行なっているが，今回我々が他の菌型も含めて検討した結果からも少なからず関係があるように見受けられた．すなわち12型については，CP・TC・Mac 系・LCM 系の多剤耐性株が圧倒的に多く，４カ年全体で 534/738 株（72.4%）の高率を示していることと，生方ら[7]，高橋ら[8]が，Mac 系および LCM 系耐性菌はすべて CP，TC に対しても同時に耐性を示し，それらの菌はすべて12型であったと報告していることも併せて考慮すると，菌型と耐性の関連性が推察される．

また，宮本ら[6]の示唆している12型と Mac 系耐性との関係は，今回の我々の成績によると，単に12型と Mac 系のみの関係ではなく，12型は，CP・TC・Mac 系・LCM 系の多剤耐性と，より深い関係があることが考えられる．

４型は，ＴＣ単独耐性のものが多く，４カ年全体で 54/88 株（61.4％）も認められ，強い関連性があると考えられる．これは宮本ら[6]の示唆していることと一致している．

18型の場合は，17株中16株が感受性株であり，他の菌型に比べ，耐性を獲得しにくい菌型であるのか否かは，現時点では不明であり，今後の検討が必要なものと考えられた．

その他の菌型については，上記の12型，４型，18型のような際立った特徴は示さず，将来にその検討がゆだねられた．

結　　論

1975年に猩紅熱患者から検出されたA群菌 842 株について薬剤感受性を測定し，更に耐性パターンと菌型との関連性を1972～1975年について検討し，次の結論を得た．

1) ＰＣ系および cephalosporin 系薬剤に対しては，すべての供試菌が感受性を示し，耐性に移行する傾向は全く認められなかった．

2) CP と Mac 系（LCM 系）の感受性の推移は，よく並行しており，1970～1974年は耐性化の上昇を示していたが，1975年に至って両薬剤共約５％の耐性率の減少を示した．

3) 1975年の主要流行菌型は12型であり，その分離率は約 70% を占めたが，1971～1974 年は増加傾向にあったものが，本年度になって初めて減少傾向の兆しをみせた．

4) 12型は，CP・TC・Mac 系・LCM 系の多剤耐性傾向があり，４カ年全体では72.4%の出現率を示した．

5) ４型は，ＴＣ単独耐性のものが多く，４カ年全体で61.4%の出現率を示し，本菌型とＴＣ耐性の間に強い関連性が認められた．

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「溶血レンサ球菌感染症に関する研究」として実施したものである）

文　　献

1) 大久保暢夫，柏木義勝，柴田　実，秋葉　享，富沢　功，谷垣利幸：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) 浅野洋子，柏木義勝，柴田　実，徳江シゲ子，大久保暢夫：東京衛研年報，26-1，47，1975
5) 生方公子，紺野昌俊，藤井良知：医学と生物学，90(6)，363，1975
6) 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
7) 生方公子，紺野昌俊，藤井良知：小児科臨床，26(11)，1451，1973
8) 高橋洋子，生方公子，紺野昌俊，藤井良知：第24回日本化学療法学会総会抄録集，136，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 54—57, 1976

腸内ウイルス感染の実態は握（第8報）
1975年の東京都内3下水処理場下水からのウイルス分離試験成績

藪内　清*, 矢野一好*, 柴田タツ美*
岩崎謙二*, 辺野喜正夫*

Epidemiological Survey on Enterovirus Infection (VIII)
Virus Isolation made at Three Sewage Treatment Plants in Tokyo in 1975

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

緒　言

われわれは，下水から検出されるウイルスの種類，型別，出現消長を経時的に追うことにより，その地区に居住する住民間の腸内ウイルス感染症の実態をは握することができるのではないかとの考えのもとに，1967年6月以来都内3下水処理場より検体を採取してウイルス分離をおこなうと同時に，その地区のウイルス感染症との関連を検討してきた．

その結果，1967年のエコー7型ウイルス，68年のコクサッキーB群5型ウイルス，69年の同1型ウイルス，70年の同3・4型ウイルス，71年～72年のエコー11型ウイルス，73年のコクサッキーB群5型ウイルス，74年のアデノウイルスの流行推移を明らかにすることができ[1-7]，この方法が，われわれの意図をある程度満してくれるものであることが分かった．

従って，今後もこの種の調査を続けることにより，都内における腸内ウイルス感染症の実態をより正確に推測することが期待できるものと考える．本報は1975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[1,3,7]．

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にしめすとおりである．落合処理場では下水検体60件中42件（70%）から計67株のウイルスを，砂町処理場では118件中22件（19%）計28株のウイルスを，また三河島処理場では12件中5件（42%）計8株のウイルスをそれぞれ分離した．総計では190件中69件（36%）から計103株のウイルスを分離したことになる．

これらの検出ウイルスを種類別，処理場別にみると表2のとおりである．3処理場共，レオ1型ウイルス，アデノウイルス，コクサッキーB群3型ウイルスが高率に分離された．

この高率に検出された3種のウイルスについて，月別検出状況と，われわれが取扱った患者発生状況とを対比した成績を表3にしめした．まず，アデノウイルスについてみると，3処理場とも冬期と初夏にかけて（1月～6月，11月～12月）多く検出され，盛夏から秋にかけて（7月～10月）は検出されていない．都内においては，1974年12月から75年3月および75年11月から76年2月の時期にインフルエンザAホンコン型ウイルスによる集団かぜが多発したが，この集団に混在してアデノウイルスが病因と診断できたものが5集団あり，5，6月および11月には，しばしば学童におけるかぜ疾患の病因となるアデノ3型ウイルスが下水検体から検出された．この分離状況からみて，昨74年度にひきつづき都内におけるアデノウイルスの浸いんは，相当濃厚なものであったことがうかがわれる．これに対して，コクサッキーB群3型ウイルスは夏期に比較的多く分離され，またレオ1型ウイルスは，2月から10月までほとんど年間を通して分離されているが，この2種類のウイルスの下水からの出現状況から，都内において相当広範囲にわたって感染流行があったことが推測はされたが，われわれが検索し得た範囲ではこれらを裏付けるような流行をとらえることができず，その他の疫学的所見も得られなかった．これ

* 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　1975年東京都内で採取した下水検体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	導水渠	AD5	AD6 AD2	AD5・AD Reo1	P1 Reo1	AD (+)	CB3 Reo1	Reo1			P1 Reo1	AD3	AD1
	生下水 高段	CB3	AD5	AD2・AD Reo2	P1 P2	AD3		Reo1		Reo1	CB3 Reo1	CB3	AD2
	低段	CB3	AD6 Reo1	AD5 Reo1	AD5 Reo1	P1 Reo1	Reo1	Reo1		Reo1 (+)	CB3 Reo1	P2	P1
	第2沈澱汚泥	(+)	AD6	AD Reo1	Reo1	P1・AD P3・Reo1	P1 Reo1	CB4 Reo1		Reo1	P2	P3・AD2 CB3	
	第2沈澱池									Reo1			
砂町処理場	マンホール		AD	AD Reo1			AD3	(+)	Reo1				
	生下水 ろ過機									Reo1			
	汚泥 砂町系												
	砂町(1)		AD5 (+)				AD CB3	CB3				AD5 (+)	
	砂町(2)		AD Reo1			Reo1					P2		(+)
	木場(1)			Reo2						Reo1		P3	
	木場(2)				P1								
	砂町(1)						Reo1						
	第2沈澱池 砂町(2)					Reo1							
	木場		AD2	Reo2									
三河島処理場	沈澱汚泥		AD CB3			P2 Reo1	AD5	CB2 Reo1		Reo1			

注：P1(2, 3)＝ポリオ1型(2, 3型)ウイルス．CB2(3, 4)＝コクサッキーB群2型(3, 4型)ウイルス．E7(11)＝エコー7型(11型)ウイルス．AD1(2, 3, 5, 6)＝アデノ1型(2, 3, 5, 6型)ウイルス．AD＝アデノウイルス(型未同定)．Reo1(2)＝レオ1型(2型)ウイルス．(+)＝未同定ウイルス

表2 都内3下水処理場の下水検体から検出したウイルスの種類と株数

ウイルス	下水処理場 落合	砂町	三河島	計
P 1	7	1		8
〃 2	3	1	1	5
〃 3	2	1		3
CB 2			1	1
〃 3	7	3	1	11
〃 4	1			1
AD 1	1			1
〃 2	4	1		5
〃 3	2	1		3
〃 5	5	2	1	8
〃 6	3			3
A D	5	4	1	10
Reo 1	23	8	3	34
〃 2	1	2		3
未同定	3	4		7
計	67	28	8	103

表3 1975年度下水検体からの高ひん度検出ウイルスの月別消長

ウイルス	処理場	(月) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CB 3	落合	○					○				○	○	
	砂町						○	○	○				
	三河島		○										
A D	落合	○	○	○	○	○						○	○
	砂町		○	○			○					○	
	三河島		○				○						
Reo 1	落合		○	○	○	○	○	○		○	○		
	砂町		○	○		○	○		○	○			
	三河島					○		○		○			
アデノウイルスによる集団かぜ					○	○				○	○		

注：○＝ウイルスが分離されたことをしめす

は，例年のとおりわれわれが対象とする集団かぜおよびその他の感染を疑う患者は，いずれも小中学校生で，年齢的なかたよりがあるのも一因と考える．

下水検体からのウイルス分離試験に使用した6継代細胞別のウイルス検出成績を表4にしめした．コクサッキーB群およびアデノウイルスは FL, HeLa S3, Hep 2 細胞での検出率が高く，レオウイルスは Vero #462 と CMK 細胞で高率に分離された．ウイルス分離には当然のことながら，できるだけ多くの種類の細胞を使用するのが望ましい．

次に，下水検体から高ひん度に分離されたウイルス種の年次別推移を表5にしめした．コクサッキーB群ウイルスについてみると，1型と2型ウイルスはそれぞれ1962年と72年に1回ずつ検出されたのみであるが，3型ウイルスは70年以降ほぼ一年おきに検出され，4型ウイ

表4 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	HeLa S3	Hep 2	Vero 518	Vero #462	CMK
P 1	3	3	1	1		
〃 2	4			1		
〃 3	1		2			1
CB 2						1
〃 3	7	3	1			
〃 4						1
AD 1	1					
〃 2	3	1	4			
〃 3		1	3			
〃 5	6	1	2			
〃 6	3					
A D	7	3	3			
Reo 1					31	10
〃 2					3	
未同定	2	1	3	1		2
計	37	13	19	3	34	15

表5 下水検体から高ひん度に分離されたウイルスの年次別消長

年度	腸内ウイルス						アデノウイルス	レオウイルス
1967					E 7			
1968				CB 5				
1969	CB 1							
1970		CB 3	CB 4					
1971						E11		
1972	CB 2	CB 3						Reo 1
1973		CB 3	CB 4	CB 5			AD	Reo 1
1974				CB 5			AD	
1975		CB 3					AD	Reo 1

ルスは70年と73年に，5型ウイルスは68年に検出されたのちしばらく消滅し，5年後の73年になって再び2年連続して出現している．また，エコーウイルスは7型ウイルスが67年に，11型ウイルスが71年に分離されている．一方アデノウイルスとレオ1型ウイルスは73年以降ほとんど連続して高ひん度に検出されている．このように，各年度における下水からの検出ウイルスの主流が交代変化することは，その排水地区の住民間における当該ウイルスの感染流行実態を反映していると推定されるので，その年に下水中に高ひん度に現われるウイルス種と型をいちはやく察知することは，疫学上および患者診断上有意義な情報となる．また，別に報告している下水処理水の再利用[8]の基礎データーとしても重要な役割りを果すものと考える．

結　論

1. 190件の下水検体から103株のウイルスを検出した．その内訳は，ポリオウイルス16株（17%），コクサッキーウイルス13株（12%），アデノウイルス30株（29%），レオウイルス37株（35%），未同定ウイルス7株（7%）であった．中でもアデノウイルス，コクサッキーB群3型ウイルス，レオ1型ウイルスが最も高率に検出された．

2. われわれが検索した集団かぜの中，アデノウイルスによるものと診断できたものが5集団あったが，これらはいずれも下水検体からの検出時期とほぼ一致していた．アデノウイルスは最近3カ年連続してほとんど常に高率に分離されているので，都内において相当濃厚に汚染しているものと推定され，集団かぜ発生時には特に留意する必要があろう．

3. コクサッキーB群3型ウイルスについては，検出状況からみて6月～8月に流行があったとみられる．

4. レオ1型ウイルスは，1972年以来検出され，特に本75年はほとんど年間を通じて高率に検出されているので，今後の流行に注目すべきウイルスであると考える．

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，坂井冨士子ら：東京衛研年報 **20**, 35, 1968
2) 岩崎謙二，柏木義勝，山田澄夫ら：東京衛研年報，**21**, 9, 1969
3) 岩崎謙二，山田澄夫，柳沢靖子，佐々木憲子：東京衛研年報，**22**, 35, 1970
4) 岩崎謙二，山田澄夫，柳沢靖子，矢野一好，坂井冨士子，藪内　清，根津尚光：東京衛研年報，**23**, 49, 1971
5) 岩崎謙二，柳沢靖子，矢野一好，山崎　清，坂井冨士子，藪内　清，根津尚光：東京衛研年報，**24**, 53, 1972
6) 岩崎謙二，柳沢靖子，矢野一好，山崎　清，坂井冨士子，藪内　清，根津尚光：東京衛研年報，**25**, 41, 1974
7) 矢野一好，藪内　清，岩崎謙二，辺野喜正夫：東京衛研年報，**26-1**, 77, 1975
8) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二，辺野喜正夫：東京衛研年報，**27-1**, 77, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 58—62, 1976

1975年秋以降の東京都内におけるインフルエンザ流行のウイルス学的，疫学的調査

岩崎謙二*，伊藤忠彦*，山崎清*
吉田靖子*，横山庸子*

Virological and Epidemiological Observations on the Prevalence of Influenza in Tokyo in the Period from November 1975 to March 1976

KENJI IWASAKI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YAMAZAKI*,
YASUKO YOSHIDA* and YOKO YOKOYAMA*

緒　言

東京都では1968年インフルエンザ（以下「イ」と略す）A香港型ウイルスの侵入以来，同型ウイルスによる感染流行が毎年大なり小なりの規模で繰り返してきた．1975年秋東京都内発生にはじまった「イ」流行は76年初頭にかけ日本全土に蔓延し，数年ぶりの大流行に発展した．著者らはこの流行に際し，学級または学校閉鎖を行った都内小中学校の患者の一部についてウイルス学的，血清学的病因検索を行った．また患者検索とは別に一般都民における「イ」流行実態を血清疫学的に調査した．

検査材料および方法

1. 被検血清：患者血清は1975年9月以降都内の集団かぜ発生による学級または学校閉鎖を行った都内小中学校抽出患者39集団178名を急性期および回復期に採血し，実験に供した．なお3集団24名については急性期，回復期血清をペアとして採取できなかった．一般都民血清は患者とは別に梅毒血清反応検査のため当研究所に送付された血清について地域的偏りのないようにサンプリングを行い，1975年9月より76年4月まで月124～144件逐月的に採取した．

2. 血清検査：補体結合反応（CF）および赤血球凝集抑制試験（HI）により行った．CFはKolmerの小量法に準拠して行った[1]．HI試験は常法[2]に準拠し，マイクロトレイ（Cook社製）を用いて行った．

3. ウイルス分離試験：急性期に採取した患者38集団175名のうがい水について「イ」，パラ「イ」，アデノウイルスを主な検索対象として病因ウイルス分離試験を行った．ウイルス分離試験は孵化鶏卵培養法およびHeLa, FL, Hep 2, Vero, CMK細胞系を用いた細胞培養法により行った．分離ウイルスの同定はCF, HI試験，中和試験により行った．術式は前報のとおりである[3-7]．

成績および考察

患者の病因検索成績：1975年9月より76年4月までに39集団178名についてウイルス学的，血清学的検索を行い病因を究明した．検索結果の総括を表1に示した．39集団中8集団については病因を解明することはできなかったが，残り31集団はすべて明らかにすることができた．9月から10月に発生した3集団はいずれもアデノウイルス感染によるもので，3集団15名中10名からアデノ3型ウイルスを検出し，ウイルス検出ができた10名は全例，有意なCF抗体上昇を示した．ウイルス検出はできなかった他の1例は血清学的にアデノ感染が証明された．その後11月12日に採取した患者うがい水12件中7件から今期流行はじめての「イ」A型ウイルスを分離し，以後76年3月上旬にかけ27集団の患者材料から計64株の「イ」A型ウイルスを分離した．この患者検索結果から都内の「イ」ウイルス感染症の流行は11月からはじまったことが明らかとなった．なお11月以降の「イ」流行期間中アデノウイルス感染は証明できなかった．その後4月中旬になって「イ」B型感染を，ウイルス分離はできなかったが，血清学的に1集団5名中3名に証明した．

今次流行中に検出した「イ」ウイルスはニワトリ免疫血清を用いた同定試験でいずれもA香港型と確認できたが，1975年春以前の流行ウイルスとは抗原的に明らかに差が見られたばかりでなく，株間にも差があり，いわゆる東京75型とビクトリア75型とに分類された[9,10]．

* 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2には流行経過に応じたこれら両型ウイルスの検出状況を示した．都内の流行では11月から12月初旬にかけて東京75型ウイルスが，12月中旬以降にはビクトリア75型ウイルスがより多く検出されるようになった．東京75型の代表株としてA/東京 462F/75株，A/東京 470F/75株，ビクトリア75型の代表株としてA/ビクトリア 3/75株，従来の流行A型ウイルス株およびB型ウイルス株を抗原として患者ペア血清についてHI抗体価を測定した．表3に1例を示したが，患者血中抗体は今次流行株A/東京 462F/75株，A/東京 470F/75株，A/ビクトリア 3/75株の抗原に対し顕著な上昇を示した．免疫血清での交叉試験では明らかに抗原的な差異がみられた東京75型およびビクトリア75型に対し，患者血清での抗体価および上昇はほとんど差が認められなかった．これは患者血清中に従来の香港型ウイルスの感染による抗体の集積があり，両者の差がカバーされるためと考える．また患者の大部分は従来のA香港型に対し急性期にあってもかなり高い抗体価があった．B型に対してはHI抗体の4倍上昇を示した1例はCF抗体の上昇もなく，回復期血清採取5日前に「イ」ワクチンの接種を行っているので，その影響と考えられる．

表1．都内において発生した集団かぜ患者の病因分析

調査年	月	旬	検索集団数	確認結果（集団数） A型インフルエンザ	B型インフルエンザ	アデノ	不明
1975	9	中	2			2	
	10	下	2			1	1
	11	中	7	5			2
		下	6	5			1
	12	上	7	6			1
		中	4	4			
		下	2	2			
1976	1	下	4	4			
	2	中	1				1
	3	上	2	1			1
	4	中	2		1		1

表2．流行経過と分離ウイルスHA抗原構造の変遷

	ウイルス抗原構造（単位別） α	β	γ	1975年 11月 上旬	11月 中旬	11月 下旬	12月 上旬	12月 中旬	12月 下旬	1976年 1月 上旬	1月 中旬	1月 下旬
東京75型	+	+	ⅢⅠ		9	9	6	6				1
	+	+	Ⅲ				1	1				
ビクトリア75型	+	++	Ⅲ		1		3					3
	+	++	++		1		2	3	6			6
	+	Ⅲ	++		1			1	1			1

α, β, γ はHA単位種別
単位の量的表現：＋＝25%以下，＋＋＝25～50%，Ⅲ＝50～75%，ⅢⅠ＝75%以上

表3．A小学校における集団かぜの検索成績

患者	受付No.(1975)	採血年月日	CF A(S)	CF B(S)	HI A/東京 494/72	HI A/東京 364F/73	HI A/東京 462F/75	HI A/東京 470F/75	HI A/ビクトリア 3/75	HI B/群馬 1/73	HI B/岐阜 2/73	ウイルス分離
A	953	1975.11.12	<8	<8	128	128	16	16	16	64	16	+
	1009	11.25	≧128	<8	512	1024	512	512	1024	64	64	
B	954	11.12	<8	<8	256	512	16	16	16	128	64	+
	1010	11.25	32	8	2048	2048	1024	1024	1024	64	128	
C	955	11.12	<8	<8	64	128	<16	<16	<16	16	16	−
	1011	11.25	32	<8	128	256	64	32	32	16	16	
D	956	11.12	<8	<8	1024	256	64	64	16	64	32	+
	1012	11.25	32	<8	512	512	256	128	128	32	32	
E	957	11.12	<8	<8	16	16	<16	<16	<16	128	256	−
	1013	11.25	≧128	<8	512	2048	512	512	1024	256	256	

一般都民におけるA香港型「イ」の血清疫学：以上は著者らの行った患者検索成績であるが，これらはいずれも抽出集団例による検索であり，都内全体での「イ」流行による学級および学校閉鎖を行った集団数から比較すれば非常に微々たるものである．そこで1968年以降の集団かぜ発生に対して行った都内小中学校の学級および学校閉鎖の年度別合計数をもって都内における「イ」流行規模を類推比較した(表4)．これらの数値が都内の「イ」ウイルス感染の流行実態を質的にまた量的にどれだけ正確に反映しているかは問題があるにしても流行全体のすう勢を理解するには役立つと思われる．この数値の比較で見るかぎり今次の都内「イ」流行規模はA型「イ」流行として1968年以来の大流行であったと推察される．

都内におけるA型「イ」ウイルスの感染流行実態を血清疫学的に推測する目的で今次の「イ」流行前から流行期にかけ逐月的に採取した成人都民血清につき A/東京364F/73株，およびA/東京 462F/75株に対するHI抗体保有状況の逐月変遷を調査した(表5)．流行前であった1975年9月の抗体保有状況（≧16）は従来の流行株であるA/東京 364F/73株に対して70.0%とかなりの高水準であったが，今次流行のA/東京 462F/75株に対しては19.1%と極めて低率であった．両ウイルス株に対する

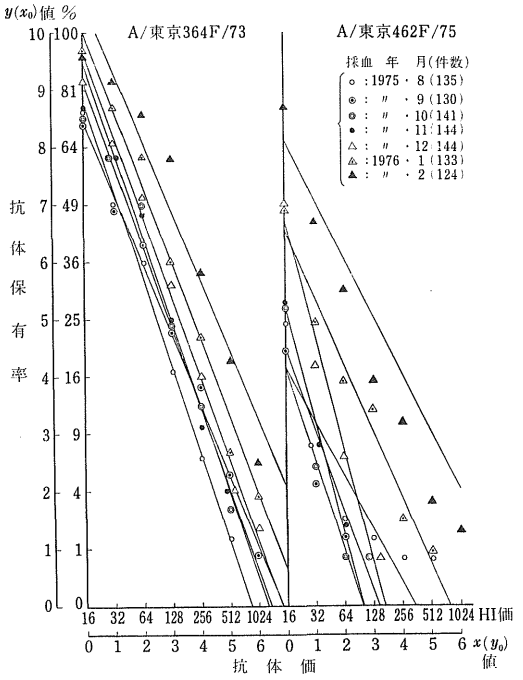


図1．成人都民のインフルエンザA型ウイルスに対するHI抗体保有状況

表4．インフルエンザ様疾患による都内の小中学校学級閉鎖状況

年度別	初発月日	最終年月日	インフルエンザウイルス分離		閉鎖状況	
			初発分離月日	ウイルス型別	学校数	学級数
1968	9. 7	69. 3. 17	68. 3. 11	A香港型	1,075	6,808
1969	11. 6	70. 3. 4	69. 11. 18	〃	374	1,272
1970	10. 6	71. 3. 22	70. 11. 26	〃	640	3,228
1971	10. 20	72. 3. 22	72. 1. 2	〃	579	1,988
1972	10. 19	73. 3. 19	73. 1. 17	〃	533	1,760
1973	4. 16	73. 7. 17	73. 5. 22	B/73 型	1,195	7,461
1973	9. 13	74. 3. 20	73. 10. 31	〃	960	5,282
1974	10. 4	75. 3. 20	74. 12. 21	A香港型	701	2,580
1975	9. 16	76. 3. 27	75. 11. 20	〃	1,021	4,751

表5．成人都民におけるA香港型インフルエンザウイルスHI抗体保有調査成績

調査年月		A/東京 364F/73抗原								A/東京 462F/75抗原							
		検査件数	HI価 16	32	64	128	256	512	1024	検査件数	HI価 16	32	64	128	256	512	1024
1975	9	130	29	11	21	11	12	6	1	131	19	4	2				
	10	141	18	15	36	17	13	4		143	30	7		1			
	11	144	31	21	30	22	8	6		144	29	8	3				
	12	144	29	20	28	23	17	3	3	144	45	15	9	1			
1976	1	133	24	20	32	19	19	5	5	133	31	12	5	12	2	1	
	2	124	10	12	16	34	19	15	8	124	38	17	19	6	9	2	2
	3	130	13	11	27	23	25	14	6	130	25	29	19	10	8	4	
	4	125	11	14	21	31	25	7	1	125	26	18	14	15	6	2	

表6．成人都民のA香港型インフルエンザHI抗体保有の解析

調査年月	A/東京 364F/73抗原				A/東京 462F/75抗原			
	$y(x_0)$	比率	$x(y_0)$	比率	$y(x_0)$	比率	$x(y_0)$	比率
1975 9	8.4	1.000	6.9	1.000	4.1	1.000	2.6	1.000
10	9.1	1.083	6.5	0.942	4.5	1.098	3.1	1.192
11	9.3	1.107	6.4	0.928	5.1	1.244	2.7	1.038
12	9.5	1.131	6.9	1.000	6.6	1.610	3.3	1.269
1976 1	10.0	1.190	7.4	1.072	6.5	1.585	5.6	2.154
2	10.4	1.238	8.7	1.261	8.1	1.976	6.6	2.538
3	10.4	1.238	8.3	1.200	8.5	2.073	6.2	2.385
4	10.5	1.250	7.1	1.030	8.1	1.976	6.0	2.308

住民の抗体保有水準，および消長経過に大きな差があることからも今次ウイルスが従来の流行株と免疫学的に異なっていることが明らかとなった．

図1は上記両ウイルス株の累積抗体保有率を各月別に対応点上にプロットし，対応点の至近距離を通る回帰直線をえがいたものである．それら回帰直線は実測値をもとにして最小二乗法により算出した．なお算出にあたって抗体保有率はその平方根値をもって，抗体値は2の対数値をもってパラメーターとした[8]．A/東京 462F/75株に対する抗体保有状況を表わした線分は11月から12月にかけ x 軸を支点とした立ち上り（低抗体価の比率の増大）を，12月から76年1月にかけて y 軸を支点とした尻上り（高抗体価の比率の増大）を示した．回帰直線と y 軸との交点 $y(x_0)$，x 軸との交点 $x(y_0)$ とすれば $y(x_0)$ 値は抗体保有値を，$x(y_0)$ 値は保有抗体値を表わすことになり，各月別の値を比率で表わせば定量的表現となる．表6には9月の値を1とした各月の比率が示してある．A/東京 364F/73株に対する抗体保有値 $y(x_0)$，保有抗体値 $x(y_0)$ ともに対9月値はそれぞれ1.25倍，1.26倍以下であったが，A/東京 462F/75株での対9月値はそれぞれ2.07倍，2.54倍と変動が大きかった．後者の月別推移を見ると抗体保有値 $y(x_0)$ は11月から12月にかけ，保有抗体値 $x(y_0)$ は12月から76年1月にかけ比率の増大が顕著であった．

次に「イ」B型ウイルスに対する抗体保有状況は B/群馬 1/73株を抗原として測定した（表7，および表8）．1975年9月から76年4月にかけて抗体保有値，保有抗体値とも大きな変動はなく，この間散発的発生は別として「イ」B型ウイルスによる感染流行はなかったものと思われる．

結　論

1975年9月より76年4月までに発生したかぜ患者39集団178名の病因検索成績ならびに一般都民における「イ」HI 抗体保有状況の逐月的調査成績から次の結論を得た．

表7　成人都民におけるB型インフルエンザウイルス HI抗体保有調査成績

調査年月	B/群馬 1/73抗原							
	検査件数	HI価 16	32	64	128	256	512	1024
1957 9	131	25	27	15	13	3		
10	141	34	32	19	12	3	3	1
11	144	42	19	11	9	2	2	1
12	144	34	19	23	12	2		
1976 1	133	32	24	21	13	12	4	
2	124	32	13	20	15	5	4	1
3	130	20	19	20	3	1		2
4	125	20	14	11	6	1	1	

表8　成人都民のB型インフルエンザ抗体保有の解析

調査年月	B/群馬 1/73抗原			
	$y(x_0)$	比率	$x(y_0)$	比率
1975 9	8.1	1.000	5.1	1.000
10	6.9	0.852	6.6	1.294
11	6.9	0.852	6.2	1.216
12	8.0	0.988	4.8	0.941
1976 1	8.9	1.099	6.3	1.235
2	8.3	1.025	6.5	1.275
3	6.6	0.815	6.2	1.216
4	6.3	0.778	5.4	1.059

1. 患者の病因検索結果から1975年9月～10月に発生した3集団の患者15名中11名はアデノウイルス感染によるもので，A型「イ」ウイルスの感染流行は11月中旬以降76年3月にかけて認められた．また76年4月に発生した1集団ではB型「イ」ウイルス感染が血清学的に認められた．

2. 今次流行での分離ウイルス64株はHI試験によってA香港型と同定できたが，免疫学的に1975年春以前の流行ウイルス株と差異が見られたばかりでなく，東京75型およびビクトリア75型に細分された．

3. 患者の病因検索結果および一般都民における流行ウイルスに対するＨＩ抗体逐月消長結果から今次のＡ型「イ」流行は1975年11月にはじまって流行のピークは12月から76年１月にあったことが推察された．なおこの期間にＢ型「イ」の流行はなかったと思われる．流行前における一般住民の流行ウイルスに対するＨＩ抗体保有は（≧16）19.1%と極めて低率であった．

文　献

1) 国立予防衛生研究所学友会：ウイルス実験学総論，201，1964，丸善
2) 福見秀雄，武内安恵：微生物検査必携，491，1966，日本公衆衛生協会
3) 坂井冨士子，岩崎謙二，山田澄夫：東京衛研年報，22，51，1970
4) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清：東京衛研年報，23，41，1971
5) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清：東京衛研年報，24，81，1972
6) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清：東京衛研年報，25，65，1974
7) 岩崎謙二，藪内　清，伊藤忠彦：東京衛研年報，26-1，69，1975
8) 岩崎謙二：東京衛研年報，26-1，81，1975
9) 岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子：日本医事新報，2709，43，1976
10) 岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子；臨床とウイルス，4，189，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 63—65, 1976

1975年における都民の風疹 HI 抗体保有調査

吉田靖子*, 横山庸子*, 岩崎謙二*

Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants in Tokyo in 1975

YASUKO YOSHIDA*, YOKO YOKOYAMA* and KENJI IWASAKI*

緒　言

従来，風疹は小児期にり患する軽症の感染症とされていたが，最近では急性感染症のうちで胎児に及ぼす影響のもっとも強いものの1つとされている[1]．1964～1965年にかけて沖縄県下で風疹の大流行があり，先天性風疹症候群児が約400名にも及んでいる[2,3]．

1975年はじめ東京・神奈川を中心に風疹の流行がはじまり，東日本から西日本へと，強く流行が拡大した．

今回の流行に際して，患者の血清学的検査をするとともに，都内および都下離島住民血清について風疹ＨＩ抗体保有状況を調査したので，その概要を報告する．

実験材料および方法

患者血清　1975年12月から1976年２月にかけて臨床的に風疹ないしは同症の疑いで送付された７集団144名の患者血清でペアで採血できたのは114件であった．

健康人血清　都内における健康人の風疹Ｈ１抗体保有状況は握のため，医療に従事している看護婦312名・看護学生478名から採取した血清について検査した．なお1976年３月に採取した離島住民477名の血清も検査した．

供試血清は，−20°のフリーザー内に凍結保存した．

HI 試験　既報に準じた[4]．

検査成績および考察

風疹患者の血清学的検査成績　1975年12月から1976年２月まで風疹疾病の疑いで検査した７集団の患者の検査概要を表１に示した．

急性期血清に対する回復期血清のＨＩ抗体価上昇比８倍以上を有意上昇とすると，ペア血清114例中75例に風疹ウイルス感染の確認ができた．

1976年１月28日，都内の某高等看護学院において風疹患者が発生した．病院実習を控えていたため今後の患者発生を予測する目的で，学生358名（ペア血清で採取できたのは336名）から１月31日に採血してＨＩ抗体価を測定した．

各クラス別の抗体陰性者数および抗体陰性者(<1：8)に対する患者発生状況をみると表２のようになる．

１月28日以降３月末までに発生した患者数49名のうち42名はすべて急性期血清における風疹ＨＩ抗体価が８倍以下のものであった．他の７名は１月31日時点で８～32倍のＨＩ抗体価をもっておりすでに発病後であったが，回復期には 1024～≧4096 と有意な抗体価上昇を示し，血清学的に風疹ウイルス感染が確認できた．

１月31日と２月27～28日にペアとして採血できた 336名中３名は，ＨＩ抗体価32から256，64から1024，16から256と血清学的に有意上昇がみられたが，発病しなかったので不顕性感染と考えることができる．初感染か再感染かは確認できなかった．子供の不顕性感染は10～50％と報告されているが[5]，成人における不顕性感染はかなり低率であると考えられる．

同学院内の風疹流行は，初発患者を１月28日にみてから，流行が終結したのは３月末以降であり，大半が寮生活を行なっているような環境下にありながらも２カ月以上の期間を要している．特に１年生における患者発生率が高く，抗体陰性者のみを対象としたり患率も２・３年生にくらべてきわめて高率であった．

健康都民の風疹 HI 抗体保有状況　1976年１～３月，某都立病院看護婦312名と風疹流行が起こる以前に採取した某都立高等看護学院生徒358名と新入学生120名，離島住民23～41歳の女性50名計840名の血清について，ＨＩ抗体価を測定し，その結果を表３に示した．

看護婦312名については，前回の調査[6]のときとほぼ変らない87.5％の抗体（≧1：8）保有率を示したが，離島婦人については74％といくぶん都心の場合よりも低か

* 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

った.

1976年1月における某高等看護学院生徒のHI抗体保有率をみると，学年およびクラスによって差がみられ，その値は52.6～82.4%の範囲にあった．これら生徒の多くは日本各地から上京しているので出身地の影響を反映し，変動が大きくなっている．

離島住民の小学生292名・高校生135名計427名の血清について検査し，結果を表4に示した．

表1 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
75. 12. 11	墨東HP	都立葛西工業高校	7	7	
75. 12. 11	立川HC	立川第3小	12	12	2
	〃	立川第6小	19	19	8
	〃	保育園	1	1	
76. 1. 31		看護学校	49	49	49
76. 2. 4		某高等学校	51	21	11
76. 2. 17	日本橋HC	東華小	5	5	5
			144	114	75

表2 某看護学院における風疹HI抗体検査成績と患者発生状況

クラス	76.1.31 採取血清における風疹HI抗体陰性者数 陰性者／在籍者数		76.2.27 採取血清における風疹HI抗体陰性者数 陰性者／採血者数		患者発生状況 患者数／在籍者数		患者数／抗体陰性者		不顕性感染
1A	11/41	26.8%	2/41	4.9%	10/41	24.4%	9/11	81.8%	
B	8/41	19.5	0/40	0.0	11/41	26.8	8/ 8	100.0	
C	8/43	18.6	1/43	2.3	8/43	18.6	6/ 8	75.0	1
2A	12/37	32.4	8/37	21.6	4/37	10.8	4/12	33.3	1
B	15/44	34.1	12/44	27.3	4/44	9.1	3/15	20.0	
C	9/40	22.5	4/37	10.8	5/40	12.5	5/ 9	55.6	
3A	11/36	30.6	5/27	18.5	4/36	11.1	4/ 8	50.0	
B	6/34	17.6	4/30	13.3	2/36	5.6	2/ 6	33.3	1
C	9/43	20.9	8/39	20.5	1/43	2.3	1/ 9	11.1	

表3 健康都民女性の風疹HI抗体保有状況

採血月日	被検査機関		検査数	風疹HI抗体価 <8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	≧4096	抗体保有率(≧1：8)
76. 1.31	高等看護学院*	1A	41	11	1	2	4	10	6	3	2	1	1		73.2%
		1B	41	8		2	2	7	8	6	3	4		1	80.5
		1C	42	8	1	1	3	8	6	6	8		1		81.4
		2A	37	12			4	6	8	3	4				67.6
		2B	44	15	1	2	3	10	5	6	2				65.9
		2C	40	9		2	4	6	13	3	3				77.5
		3A	36	11		3	1	7	4	10					69.4
		3B	34	6		2	4	13	6	3					82.4
		3C	43	9		1	5	5	3	11	4	4	1		79.1
76. 2.28～3. 4	都立病院看護婦		312	39	11	21	55	95	51	24	8	8			87.5
76. 3.28～3.30	離島々民 23～41歳		50	13	4	10	8	9	5		1				74.0
76. 4.14	高等看護学院**	1A	38	18	3	2	3	3	3	5	1				52.6
		1B	41	16	2		4	7	5	7					61.0
		1C	41	11	2	2	5	8	11	1	1				73.1

* 風疹流行前の抗体保有状況

** 1976年4月に入学した学生

表4．離島々民の年齢別風疹HI抗体保有状況

年齢(歳)	検査数	風疹HI抗体価 <8	8	16	32	64	128	256	512	抗体保有率(≧1：8)
7	8	8								0.0%
8	6	6								0.0
9	113	102				1	5	4	1	9.7
10	99	94				1	2	1	1	5.1
11	62	61							1	1.6
12	4	4								0.0
15	76	70			1	1	1	2	1	7.9
16	17	13		1		1	1		1	23.6
17	34	24		2	2	3		2	1	29.4
18	8	6		1					1	25.0

(76.5 現在)

1975年4～6月における都内6～14歳の児童・学童の抗体(≧1：8)保有率においては17.9%で，今回調査した離島小学生は平均5.8%と保有率が低かった．高校生でも15歳の年齢においては7.9%と低く，16～18歳は23.6～29.4%の保有率を示した．

表5に示したように，離島における地区別HI抗体保有状況をみると，A～E 5地区のうちD地区においては18%と高く，他の地区はほとんど抗体保有をしていないという，同一年齢層であっても，地域によって抗体保有率に差があることがわかった．

結　論

1975年から引き続いている風疹流行に際して，患者の血清学的病因検査および健康都民の風疹HI抗体保有状況を調査した．

1) ペア血清が得られた患者114名において，風疹ウイルスに対するHI抗体が有意上昇を示したものは75例であった．残りの大半は急性期に採取した血清の抗体価が高く，有意上昇がみられなかった．

2) 某高等看護学院内で1976年1～3月にかけて風疹流行が発生したが，り患した者はり患前抗体価が8倍以下のものであった．

3) 寮生活まで共にする同一学院生徒であっても学年およびクラス別によって，り患率には大きな差がみられた．

4) 上京してからの在都年数の少ない看護学院生徒間の風疹HI抗体(≧1：8)保有率は52.6～73%，上級クラスでは65～82%と学年およびクラスによって保有率に差がみられた．

表5．離島地区別小学生の抗体保有状況

地区	学年	検査数	風疹HI抗体価 <8	64	128	256	512	抗体保有率(≧1：8)
A	3	41	39		2			4.9%
	4	47	46	1				2.1
	5	61	60				1	1.6
	6	4	4					0.0
B	1	8	8					0.0
	2	6	6					0.0
	3	10	10					0.0
	4	15	15					0.0
C	3	4	4					0.0
	4	4	4					0.0
	5	1	1					0.0
D	3	50	41	1	5	2	1	18.0
	4	28	24		2	1	1	14.3
E	3	8	8					0.0
	4	5	5					0.0
(計)		292	275	2	7	5	3	5.8

(76.3.8 現在)

5) 都内の健康成人(看護婦312名)は，87.5%のHI抗体(≧1：8)保有率があったが，離島成人女性は，74%と都区内の値にくらべると低率であった．

6) 離島住民の抗体保有率は，とくに小・高学生では0～29.4%と都内に比べて低率であった．

文　献

1) 風疹の胎児に及ぼす影響に関する研究班：臨床とウイルス，4，58，1976
2) 植田浩司ら：小児科，8，834，1967
3) 平山宗宏ら：医学のあゆみ，69，331，1969
4) 柳沢靖子，藪内　清，坂井冨士子，伊藤忠彦，岩崎謙二：東京衛研年報，25，47，1974
5) 植田浩司ら：小児科，11，928，1970
6) 柳沢靖子，岩崎謙二，柳下徳雄：東京衛研年報，26-1，64，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 66—70, 1976

1975年度東京都の日本脳炎疫学的調査

吉田靖子*, 藪内　清*, 横山庸子*, 岩崎謙二*
木下正彦**, 永野清一郎**, 加藤孝雄**

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis Virus in Tokyo in 1975

YASUKO YOSHIDA*, KIYOSHI YABUUCHI*, YOKO YOKOYAMA*,
KENJI IWASAKI*, MASAHIKO KINOSHITA**,
SEIICHIRO NAGANO** and TAKAO KATO**

緒　言

1963年以来，と場ブタを対象に日脳ウイルス抗体獲得調査を行なって，都内における日脳汚染度を推定してきた．都内における日脳患者発生は1968年以来全くなく，前述の調査でも抗体獲得率は年々低下の一途をたどってきたが，1975年度の成績では抗体獲得率のわずかな上昇がみられた．また1968～1975年にブタ血清から分離した日脳ウイルスのHA抗原比較を行なったので，それらの概要を報告する．

実験材料および方法

患者血清　1975年7～12月にかけて都内伝染病院に疑似日脳として収容された4名から採取した6件の血清である．

と場ブタ血清　1975年1～12月に採取した血清 1,248件である．

供試血清は −20° に凍結保存した．

使用ウイルス抗原，血清試験法，コガタアカイエカの採集方法および分離同定試験法　すべて既報に準じた[1,2]．

検査成績および考察

疑似日脳患者の血清学的検査成績　1975年7～12月に発生した疑似日脳患者4名は，日脳ウイルスに対する血清試験の結果，すべて日脳ウイルスの感染が否定された．さら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で，アデノ・ヘルペス・ムンプス・コクサッキーB群1～5型・ポリオ1～3型・エコー6型の抗原について検査した．その結果，有意の抗体上昇を示したものが認められず，病因を明らかにすることはできなかった．

と場ブタの日脳HI抗体保有状況　1975年に採血した都内飼育ブタの経時的HI抗体保有状況の調査結果を表1に示した．

8月25日採取血清50件中4件に，本年はじめての2メルカプトエタノール感受性抗体陽性血清がみいだされ，8月末頃から都内において新鮮感染が発生しはじまったことがうかがえる．1968年以降年々都内におけるブタ社会での日脳ウイルス散布は希薄になってゆく傾向を示していたが，1975年は1974年にくらべて1カ月早い時期にウイルス感染の初発がみいだされ，抗体獲得率もわずかながら上昇して，次年後の動向に関心がもたれる[3]．

採血ブタの飼育地である多摩地区10市において，特に4市における飼育ブタのHI抗体価の上昇が高率であり，明らかに地域差がみられた．

1963年以降のと場ブタにおけるHI抗体保有率（HI抗体価；≧1：10）の年次推移を図示すると図1のようになる．

4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汚染は年を追うごとに希薄になっている中で，1975年は1974年にくらべて陽性率が上昇している[3]．

日本全域におけるブタの抗体獲得状況から日脳ウイルス汚染が推定された地区をみると表2のようになった．

愛知県以北の1都1道22県を東日本として，2府21県（1973年以降は沖縄県を含む2府22県）を西日本とわけて，HI陽性率50%以上になった県数をみると，はるかに西日本が多く，1975年には全域にわたってブタ社会に

* 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1．1975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	JaGAr 01 HI Titer								Total	陽性率 (≧1：10) %	2ME. S 抗体保有率(%)		ウイルス分離
	<10	10	20	40	80	160	320	≧640			直接法	透析法	
75. 1. 20	50								50	0			0/50
2. 24	48	2							50	4	0		0/48
3. 19	46	2	2						50	8	0		0/46
4. 21	49								49	0			0/49
5. 19	47	2	1						50	6	0		0/47
6. 23	50								50	0			0/50
7. 7	49							1	50	2	0		0/49
7. 14	50								50	0			0/50
7. 21	50								50	0			0/50
7. 28	49		1						50	2	0		0/49
8. 4	50								50	0			0/50
8. 11	50								50	0			0/50
8. 18	50								50	0			0/50
8. 25	46	1		1	1			1	50	8	50		*2/46
9. 1	50								50	0			0/50
9. 8	43		1	1	2			3	50	14	86		0/43
9. 16	39							11	50	22	67		**1/39
9. 22	46	2	2						50	8	0		0/46
9. 29	32		1					17	50	36	50		***1/32
10. 6	42	1		1	1			4	49	14	43	14	0/42
10. 13	27	2	2	2				17	50	46	43	30	0/27
10. 20	37						1	12	50	26	31	31	0/37
10. 29	38						3	9	50	24	50	17	0/38
11. 19	37							13	50	26	38	0	0/37
12. 17	37						2	11	50	26	62	0	0/37

* JaTan 175 (SW 19273)　JaTan 275 (SW 19275)　** Untyped virus (SW 19445)
*** JaTan 375 (SW 19520)
ウイルス分離はHI抗体価＜1：10のものについて，乳のみマウスを用いておこなった．（陽性数/検査数）

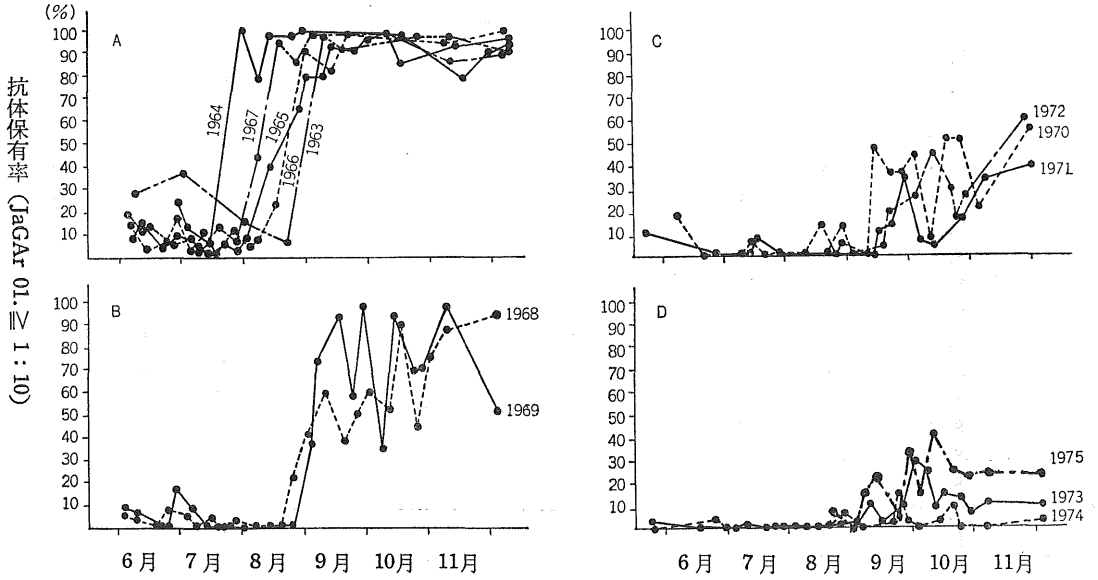


図1．東京都におけるとブタの日本脳炎HI抗体保有状況の年次別比較

ウイルス汚染が証明されている．また東日本においても，1974年の汚染県数の5倍にものぼる11県が陽性率の上昇をみている．このような日脳ウイルス汚染度は，ただちに日脳流行の前兆とするには問題はあるが，今後は一層監視態勢を強化して，動向の推移に注意する必要があるだろう．

コガタアカイエカの消長とウイルス分離試験　当研究所および都心の某地区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ともにウイルス分離試験を行ない，その成績を表3に示した．

1974年度にくらべるとはるかに少ない数しか採集できなかったが，10月3日に採集した5匹の蚊プール材料から，日脳ウイルスを分離同定した．

さらに1975年1～12月に採取した都内飼育ブタ 1,248件のうち抗体価が10倍以下1,112件について，血清を乳のみマウスの脳内に接種しウイルス分離試験を行なった．

8月25日に採取したHI抗体価10倍以下のブタ血清46件中2株（JaTan 175；SW 19273，JaTan 275；SW 19275），9月29日採取したHI抗体価10倍以下のブタ血清32件中1株（JaTan 375；SW 19520）の日脳ウイルスを分離同定し，都内における日脳ウイルスの存在を直接的に証明した．また9月16日採取したHI抗体価10倍以下のブタ血清39件中1株（SW 19445），乳のみマウスに発症させ，CMK・Vero 細胞に CPE をおこす Agent を確認したが未だ同定ができていない．

分離日脳ウイルスの抗原構造比較　最近流行している日脳ウイルス株間のHA抗原構造を比較検討する目的で，1968年以降ブタ血清から分離した5株（JaTan 168・870・772・275・375），75年蚊から分離した JaTAr 175 株および標準株 JaGAr 01 を HA 抗原として，8

表2．日本脳炎汚染地区数（都道府県別）の年次推移
（ブタの抗体保有率より日本脳炎ウイルス汚染が推定された地区）

年度＼地区	東日本*	西日本
1966	20	22
1967	22	22
1968	20	23
1969	20	23
1970	9	21
1971	5	22
1972	13	16
1973	4	21**
1974	2	12
1975	11	24

* 愛知県以北1都1道22県
** 1973年以降　沖縄県を含む

表3．1975年度東京都のコガタアカイエカの消長

採集月日	A		B		C		D		E	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
75. 6. 24	0	1	0	0	0	0	0	17	0	0
7. 1	1	8	0	4	2	0	3	27	0	0
7. 8	0	1	0	2	0	0	0	19	0	0
7. 11	0	2	0	2	0	0	0	3	0	0
7. 15	0	5	0	0			0	1	0	0
7. 22	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7. 25	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
7. 29	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8. 1	0	0	0	1	0	0			0	0
8. 5	0	2	0	4	0	0	0	0	0	0
8. 8	0	0	0	0			0	1	0	0
8. 12	0	1	1	1	0	0			0	0
8. 15	0	3	1	1	0	0	0	2	0	2
8. 19	1	5	0	1	0	0	0	0	0	1
8. 22	1	4	0	7					0	0
8. 26	1	13	0	6	1	4	0	26	0	0
8. 29	0	9	0	2			0	31	0	0
9. 2	1	5	0	4	1	5	0	4	0	0
9. 16					0	0	0	2	0	0
10. 3	0	0	0	0	0	1	0	*5	0	0

* ウイルスを分離（JaTAr 175）

年間に採取したブタ血清の中から287件を選びＨＩ試験を行なった．

表4に示したように，ブタ個体間では各抗原に対する抗体価の変動が多少みられたが，各年度別に各抗原に対する平均ＨＩ抗体価をもとめ比較したところ，1970年以降の分離株間には明らかな差はなかった．

1968年の分離株である JaTan 168 の抗原に対する平均ＨＩ抗体価は若干低い値を示しているので，流行ウイルスＨＡ抗原分析の結論は今後の検討をまちたい．

結　論

1975年度，東京都の日脳の疫学的調査を行ない次の結論を得た．

1) 1975年7～12月に発生した疑似日脳患者4名は，血清試験の結果からいずれも日脳感染は否定されたが，病因を明らかにすることはできなかった．

2) と場において採取した都内飼育ブタの日脳ＨＩ抗体保有調査結果から，75年度の日脳ウイルス汚染開始は8月末にみられ，74年より約1カ月早いこと，抗体獲得

表4．日脳分離株別における血清のＨＩ抗体価

採血月日	ブタ番号	日脳ＨＩ抗体価 (10×2ⁿ)						
		JaTan 168	JaTan 870	JaTan 772	JaTan 275	JaTan 375	JaTAr 175	JaGAr 01
68. 9. 17	SW 12403	4	5	5	6	6	5	5
	12404	4	6	6	6	6	6	6
	12406	6	8	7	8	8	8	8
	12411	6	9	9	10	9	9	9
	12412	5	6	6	7	6	6	6
69. 9. 29	13102	6	7	6	8	7	6	7
	13105	4	6	5	6	5	5	6
	13110	5	6	6	7	6	5	6
	13111	3	4	4	5	4	4	4
	13115	4	5	4	5	4	4	4
70. 10. 5	13740	6	6	7	7	6	6	6
	13745	3	5	6	6	6	6	4
	13746	5	6	6	6	6	6	6
	13748	5	6	6	7	6	6	6
	13755	6	7	7	8	7	7	7
71. 9. 27	14358	3	4	4	4	4	3	4
	14365	4	5	4	5	4	4	5
	14369	5	5	5	5	5	5	5
	14370	5	7	7	7	5	5	7
	14374	3	4	3	4	4	3	5
72. 10. 2	15662	3	5	4	5	4	5	5
	15665	5	7	7	7	7	7	7
	15681	4	7	7	8	7	7	7
	15684	6	6	6	6	6	6	6
	15689	6	7	6	7	6	6	6
73. 10. 1	16982	3	5	4	5	4	4	5
	16992	7	8	8	8	6	8	7
	16997	6	8	7	7	7	7	7
	16999	4	7	7	7	6	6	6
	17001	6	7	6	7	6	6	7
75. 9. 29	19529	5	6	7	7	6	6	6
	19530	5	6	6	7	5	5	6
	19531	4	6	5	6	5	4	5
	19532	4	5	5	5	5	5	5
	19535	4	5	5	6	4	5	5
	平均値	4.8	6.2	5.9	6.5	5.9	5.8	6.2

率も74年度の16%に対して46%と上昇したことが明らかとなった.

3) と場ブタ血清からは3株の日脳ウイルスと，乳のみマウスを発症させ CMK・Vero 細胞に CPE をおこす Agent 1株を分離した.

4) 都内において10月3日に採集したコガタアカイエカから日脳ウイルスを分離した.

文　献

1) 藪内　清，坂井冨士子，伊藤忠彦，岩崎謙二ら：東京衛研年報，24，75，1972
2) 藪内　清，坂井冨士子，伊藤忠彦，岩崎謙二ら：東京衛研年報，25，53，1974
3) 柳沢靖子，藪内　清，伊藤忠彦，岩崎謙二ら：東京衛研年報，26-1，73，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 71—73, 1976

東京都民におけるパポーバ（BK）ウイルス HI 抗体保有状況の年次推移（1965～1974年）

矢野一好*, 藪内 清*, 岩崎謙二*, 田口文章**

Seroepidemiological Survey on a New Papova (BK) Virus Infections in Tokyo, 1965-1974

KAZUYOSHI YANO*, KIYOSHI YABUUCHI*,
KENJI IWASAKI* and FUMIAKI TAGUCHI**

緒　言

1971年，英国の Gardner[1] らによって腎移植患者の尿から分離された新しいパポーバウイルス（BKウイルス）は，英国[2]，米国[3,4]，イタリア[5]，日本[6-8] においても非常に広汎に浸淫しており，幼児期に感染がおこることが，血清疫学的調査結果から示唆されている．前報[6] につづいて今回は，1965年以降における東京地区住民のBKウイルスHI抗体保有の年次推移を調査し，その結果解析により，BKウイルスの浸淫経過を究明した．

実験材料と方法

被検血清：BKウイルスHI抗体価測定に供したヒト血清は，東京都内居住健康者で1965年61名，67年71名，68年64名，69年56名，70年92名，71年114名，72年136名，73年76名，74年170名，合計840例で供血者の年齢は，6～40歳に限定した．採取した血清は，すべて −20° のフリーザー内に凍結保存しておいた．

HI試験：既報に準じて56°30分加熱処理した血清を，1/50M の PBS (pH 6.4) で希釈し，4凝集単位/0.025 m*l* のBKウイルスHA抗原を加え，室温30分間反応後，1％ヒトO型血球 0.05 m*l* 滴下し，4°1時間静置し判定した[6]．特に記載のない場合は，HI抗体価 1：40以上をHI抗体保有陽性として扱った．

抗体保有状況の分析：集団における抗体保有状況は，抗体保有率および抗体価との関連で表現されるのが通常であり，抗体価なり抗体保有率の値をいかに解釈するか，ということが分析結果に大きく影響を与えることになる．抗体価は，一定量の血清中に含まれる抗体容量であり，数学的には3次元の数値である．また，血清倍々希釈法により測定した2の倍数である．この2つの規制を満足させるパラメーターとしての対数値を採用した．一方，自然界での感染の拡がりを反映した抗体は2次元の数値である．抗体保有率のパラメーターとして，累積保有率の平方根値を採用した．実測値をそれぞれのパラメーター値に換算し，最小二乗法により抗体保有状況を現わす回帰方程式を算出し，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，$Y(x_0)$ 値は抗体保有値，$X(y_0)$ 値は保有抗体値となり，おのおのの比を取ることにより抗体保有値，保有抗体値の変動が定量的に表現される[9]．

実験結果と考察

都内におけるBKウイルスHI抗体保有状況の年次推移を知るために，1965～1974年に採取した健康都民血清840件について，BKウイルスHI試験を行い，その年次別HI抗体保有状況を表1にしめした．これら資料から直観的な分析考察を行ってみると，HI価 5×2^3 以上の抗体保有率は，1965年62.3％，67年59.2％，68年92.2％，となり1968年から大きく上昇した．高いHI価（5×2^8 以上）を持つものも1971年から出現し，1972年がピーク（5×2^{10}）となった．

BKウイルスHI抗体保有状況の年次変動を定量的に分析する目的で，前述の方法により，HI抗体累積陽性率の値をその平方根値に取り，HI抗体価を2の対数値に換算し，最小二乗法により回帰方程式を算出した（表2）．$Y(x_0)$ 値（抗体保有値）はHI抗体保有率のパラメーターであり，1965年の値を1.0とし，それに対する各年次別値の比率をみると，1967年が 0.96，1968年が

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

表1．都民におけるBKウイルスHI抗体保有状況の年次推移

採血年次	試験例数	HI価（20×2^n）分布									抗体保有率
		<1	1	2	3	4	5	6	7	8	
1965	61	23	11	14	10	2	1				62.3%
1967	71	29	18	17	6	1					59.2
1968	64	5	9	12	16	19	2	1			92.2
1969	56	12	18	11	10	5					78.6
1970	92	12	19	29	23	8	1				87.0
1971	114	8	24	29	31	18	3	1			93.0
1972	136	3	6	31	25	33	20	11	4	3	93.4
1973	76	6	20	13	21	12	3	1			92.1
1974	170	12	38	44	60	13	3				92.9

表2．都民におけるBKウイルスHI抗体保有状況の回帰方程式

年次	回帰方程式	$Y(x_0)$	（対1965年比）	$X(y_0)$	（対1965年比）
1965	$y=8.0682-1.7698x$	8.1	(1.00)	4.6	(1.00)
1967	$y=7.7892-2.2200x$	7.8	(0.96)	3.5	(0.76)
1968	$y=10.4457-1.8153x$	10.4	(1.28)	5.8	(1.26)
1969	$y=8.8517-1.9282x$	8.9	(1.10)	4.6	(1.00)
1970	$y=9.8235-2.1569x$	9.8	(1.21)	4.6	(1.00)
1971	$y=10.0539-1.8779x$	10.1	(1.25)	5.4	(1.17)
1972	$y=11.1960-1.4437x$	11.2	(1.38)	7.8	(1.85)
1973	$y=9.8893-1.7742x$	9.9	(1.22)	5.6	(1.22)
1974	$y=10.2126-2.1902x$	10.2	(1.26)	4.7	(1.02)

1.28，1969年が1.10と1968年以降10～38%の上昇がみられた．上昇のピークは，1972年1.38にあった．$X(y_0)$値（保有抗体値）は，HI抗体価のパラメーターであり，1965年を1.0としてその比率をみると，1967年に0.76に下降し，1968年1.26，1972年1.85となる二峰性のピークがあった．これらのことからBKウイルスHI抗体保有の年次推移は，1968年以降高い抗体保有率が持続しているが，その保有抗体価の推移からほぼ3年周期でウイルスの浸淫があると推測した．

今回のヒト血清における年次推移を前報[6]に報告したウサギ血清における年次推移（表3）と対比してみると，消長傾向が非常によく似ている．ウサギでは高いHI価（5×2^6以上）を示す血清が，1968年以降出現した．1973年には，5×2^7の抗体価を持つものもあり，ヒト血清の年次推移と1年のずれがみられた．しかし，供試したヒト血清は，各年次とも秋採取のものであり，ウサギ血清は，各年とも春に採取したものであるので，ウサギ血清における年次推移は，都内におけるヒト血清の年次推移との間に1年のずれはないことになる．

結　論

東京都内におけるBKウイルスHI抗体保有状況の年次推移を知る目的で，1965年から1974年に採取した都内居住健康者血清840例についてBKウイルスHI試験を行い，以下の結論を得た．

1) HI抗体保有累積値をその平方根値に，抗体価を2の対数値に換算して，最小二乗法により回帰直線を算出し，回帰直線とY軸との交点$Y(x_0)$値（抗体保有値），X軸との交点$X(y_0)$値（保有抗体値）を計算し，それらの値を比較する方法で，年次推移を定量的に分析

表3．ウサギにおけるBKウイルスHI抗体保有状況の年次推移

採血年次	試験例数	HI価（5×2^n）分布							
		<1	1	2	3	4	5	6	7
1963	20	2		8	9	1			
1964	5	1			3	1			
1965	5	1	1	1	2				
1966	17	9		4	4				
1967	5				5				
1968	7			3	3	1			
1969	11				1	5	1	4	
1970	21			1	10	8	2		
1971	15			1		5	6	3	
1972	20			2	4	8	3	3	
1973	12			2	4	3	2		1
1974	10	1	3	2	1	2	1		

した．1965年の $Y(x_0)$, $X(y_0)$ 両値を1.0とし，それに対する各年の値の比率を算出すると，$Y(x_0)$ 値抗体保有値は，1968年以降に1.1～1.4倍の上昇があり，ピークは，1972年の1.38倍であった．$X(y_0)$ 値保有抗体値は，1968年1.26倍，1972年1.85倍とピークが，二峰性になった．

2) 1963～1974年に採取したウサギにおけるBKウイルス抗体保有状況の年次推移は，1969年と1973年に高いHI価（5×2^5 以上）を持つ血清が出現しており，ヒト血清における年次推移とよく一致した．

文　献

1) Gardner, S.D. *et al.*: *Lancet.*, **1**, 1253, 1971
2) Gardner, S.D.: *Brit. med. J.*, **1**, 77, 1973
3) Dougherty, R.M. and H.S. Distefeno: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**, 481, 1974
4) Shah, K.V. *et al.*: *J. Inf. Dis.*, **128**, 784, 1973
5) Partolani, M. *et al.*: *J. Med. Microbiol.*, **7**, 543, 1974
6) 岩崎謙二，矢野一好，柳沢靖子，山崎　清，田口文章：東京衛研年報，**25**, 60, 1974
7) 田口文章，長木大三，岩崎謙二，矢野一好：BKウイルスの赤血球凝集素について，第22回日本ウイルス学会総会，仙台，1974
8) 田口文章，長木大三，斎藤充司，春山長治，岩崎謙二，矢野一好：BKウイルスの血清疫学的研究，第22回日本ウイルス学会総会，仙台，1974
9) 岩崎謙二：東京衛研年報，**26-1**, 81, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 74—76, 1976

A香港型インフルエンザウイルスのHA抗原分析とHA抗原変異機作に関する試論

岩崎謙二*, 伊藤忠彦*, 吉田靖子*
山崎清*, 横山庸子*

Antigenic Analysis of Influenza A Hong Kong Type Viruses and a Proposal on Possible Mechanisms of their Antigenic Variations

KENJI IWASAKI*, TADAHIKO ITO*, YASUKO YOSHIDA*,
KIYOSHI YAMAZAKI* and YOKO YOKOYAMA*

緒　言

インフルエンザウイルスは変異しやすく，HA抗原の変異も不連続および連続の2種が知られている．これら変異の実態はよくわかっていない．

著者らは，A香港型インフルエンザウイルスが α, β, γ（仮称）3種の免疫学的に独立したHA単位群から構成される複合体であり，ウイルス株HA抗原の免疫学的特異性は3種のHA単位の含有比率の変化に応じて変るという仮定のもとに，A香港型ウイルスのHA抗原分析を行った[1,2]．

今回は1968～76年の流行時に分離したA香港型ウイルス株のHA抗原分析成績にもとづいて，HA抗原変異について若干の考察を行った．

実験材料と方法

ウイルス：1968～76年の流行時に患者うがい液から検出したA香港型インフルエンザウイルス株を実験に用いた．ウイルス接種培養したふ化鶏卵から採取したウイルス感染漿尿液を，4° 氷室内に約1カ月放置した後3,000 rpm, 30分間の遠心沈澱を行い，遠心上清をHA抗原原液として使用した．

ニワトリ免疫血清：ウイルス感染漿尿液を週1回計4回，成鶏の翼下静脈内に接種し，最終免疫1週後に全採血して血清を分離した．血清は −20° に凍結保存した．

患者血清：1968～75年のA香港型ウイルス感染流行時に採取した患者血清で，急性期，回復期ペアで採取できたものを用いた．

HI試験：被検血清をRDE（市販品）で処理し，inhibitorを除去した後常法[3]に準拠しマイクロタイター法で行った．

実験成績と考察

1968～76年の流行時に分離したA香港型ウイルス株のHA抗原分析：前報[1,2]にのべた理論により，交叉反応の少ない愛知2/68（α型），東京452/73（β型），東京462F/75（γ型）株，3種免疫血清を用いたHI試験を行い，測定された3抗血清での抗体価の比率から被検ウイルス株のHA抗原構成を分析した．分析結果は表1，2にしめした．

また，個々の患者の急性期回復期ペア血清について α, β, γ 型ウイルス抗原に対するHI抗体価を測定し，3抗体の上昇倍数の比率から，感染ウイルスのHA抗原構成を算出すると表3のようになる．α型ウイルス抗原として愛知2/68株，β型ウイルス抗原として東京452/73株，γ型ウイルス抗原として東京462F/75株を使用した．

これら3表の成績から，1968年以降の流行ウイルスHA抗原構成の主成分が α→β→γ と変遷してきたこと，同一流行時の流行ウイルス株のHA抗原構成が必ずしも均一ではないこと，さらに同一集団内の患者から検出されるウイルス株にもHA抗原構成の上で差のあるもののあることが明らかとなった．

A香港型ウイルスHA抗原連続変異に関する試論：A香港型ウイルスのHA抗原は，免疫学的に独立した構成HA単位 α, β, γ 3者からなる複合抗原であり，それらの含有比率の変化に応じてHA抗原特性が変るのであれば，α, β, γ 各単位をそれぞれ主成分としたウイルス株から3者の含有比率が等しいウイルス株に至るまで，種種様々な変種の存在が理解できる．このような量的変化

* 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

を連続変異とすれば定義は明確となる．

インフルエンザウイルスHA抗原変異の方向性は図1にしめしたように本来は不定と考えらるべきであるが，1968年以降の実際のA香港型ウイルスHA抗原変異は，大局的には α→β→γ 型と定った方向で変化してきている．

表1．A香港型インフルエンザウイルスのHA抗原構成

ウイルス株	HI試験成績* 愛知2/68 (α′)	東京452/72 (β′)	東京462F/75 (γ′)	HA抗原の構成比率(%) α	β	γ
A/愛知 2/68	0	−3	−6	1 (88)	1/8 (11)	1/64 (1)
A/東京 494/72	0	−3	−6	1 (88)	1/8 (11)	1/64 (1)
A/熊本 1/72	−4	−3	−6	1/16 (31)	1/8 (61)	1/64 (8)
A/東京 452/73	−3	0	−5	1/8 (11)	1 (87)	1/32 (3)
A/東京 364F/73	−5	−1	−5	1/32 (6)	1/2 (89)	1/32 (6)
A/東京 825/75	−4	−2	−5	1/16 (18)	1/4 (73)	1/32 (9)
A/東京 462F/75	−5	−4	0	1/32 (3)	1/16 (6)	1 (91)
A/東京 470F/75	−5	−3	0	1/32 (3)	1/8 (11)	1 (87)
A/東京 593F/75	−7	−4	−4	1/128 (6)	1/16 (47)	1/16 (47)
A/東京 680F/75	−7	−4	−3	1/128 (4)	1/16 (32)	1/8 (64)
A/山梨 20/75	−7	−5	−5	1/128 (7)	1/32 (44)	1/32 (44)
A/ビクトリア 3/75	−7	−5	−5	1/128 (7)	1/32 (44)	1/32 (44)

注：*；対応株に対するHI価に比べた試験株HI価のずれを Log 2^n 値で示した．

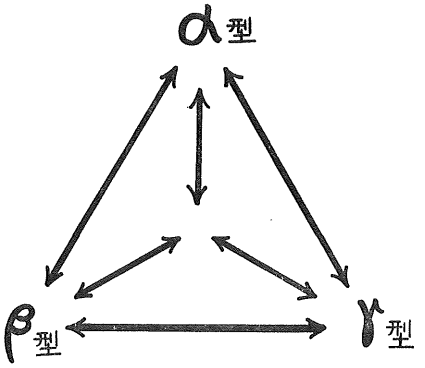


図1．A香港型インフルエンザウイルスHA抗原変異の方向性（不定方向）

表2．A香港型インフルエンザウイルスのHA抗原構成

集団No.	発生年月日	試験ウイルス株数	ウイルス株の群別 α	β	γ			
			+	+	|||	|||	|||
1	'75. 11. 11	1	1	•	•	•	•	
2	12	3	2	•	•	1	•	
3	12	3	3	•	•	•	•	
4	18	2	•	•	1	•	1	
5	19	3	3	•	•	•	•	
6	21	3	3	•	•	•	•	
7	22	3	3	•	•	•	•	
8	27	1	1	•	•	•	•	
9	27	2	2	•	•	•	•	
10	12. 1	3	•	•	1	2	•	
11	2	3	3	•	•	•	•	
12	8	3	3	•	•	•	•	
13	9	3	•	•	2	1	•	
14	10	1	•	1	•	•	•	
15	11	3	•	•	•	2	1	
16	12	1	1	•	•	•	•	
17	15	3	3	•	•	•	•	
18	19	3	2	1	•	•	•	
19	22	3	•	•	•	3	•	
20	23	4	•	•	•	3	1	
21	'76. 1. 22	4	1	1	•	1	1	
22	27	2	•	•	2	•	•	
23	30	5	•	•	•	5	•	
計		62	31	3	6	18	4	

HA単位（α, β, γ）含有率：＋＝25%以下，
＃＝25～50%，＃＃＝50～75%，＃＃＃＝75%以上

表3．患者血清の抗体上昇分析から推定した感染流行ウイルスHA抗原構造

ウイルス型	抗原構造(HA単位種別) α	β	γ	調査年度別 1968	1970	1971	1972	1975(春)	1975(秋)
α型	＃＃＃	+	+	12					
	＃＃	+	+	4	1				
	＃＃	＃	+	1	5	6		2	
	＃	＃	+	1	6	5	2	5	
β型	＃	＃＃	+		5	5	3	3	
	+	＃＃	+			3	4		
	+	＃＃	＃					1	2
	＃	＃	＃		1		3	17	4
	+	＃	＃					3	3
γ型	+	＃	＃＃				1		2
	+	+	＃＃					2	21
	+	+	＃＃＃					2	9
検査件数				18	18	19	13	35	41

HA単位含有率：＋＝25%以下，＃＝25～50%
＃＃＝50～75%，＃＃＃＝75%以上

表4．A香港型インフルエンザウイルスHA抗原変異の方向性（定方向）

	α型 ⟶			β型 ⟶			γ型		
流行ウイルス	α	β	γ	α	β	γ	α	β	γ
HA抗原構成	88	11	1	11	86	3	3	6	91
流行ウイルス	α′	β′	γ′	α′	β′	γ′	α′	β′	γ′
対応抗体	88	11	1	11	86	3	3	6	91
抗体集積	88	11	1	88	11	1	88	11	1
				11	86	3	11	86	3
							3	6	91
流行後の抗体保有	88/1	11/1	1/1	99/2	97/2	4/2	102/3	103/3	95/3
Log 2^n	6.5	3.5	0	5.6	5.6	1	5.1	5.1	5.0

免疫血清の存在下でインフルエンザウイルスを培養すると親ウイルスと抗原的特性の異った変種ウイルスが容易に得られることから，ウイルスの感染流行後には当該地区の住民の多くは抗体を産生することになるので，次期流行ウイルスの抗原構造にその影響がおよぶことは容易に考えられる．

流行ウイルス抗原構造に変化がでて再感染をくりかえすことになれば，住民の体内にはそれら感染ウイルスに対する抗体の集積が生じ，流行ウイルスの抗原変異方向はますます制約を受けることになる．

A香港型ウイルスの流行株における変異過程を数量的にとらえてみると表4のようになる．対応抗体の部分的不足または抗原抗体反応時における物理的立体干渉などによって，中和されずに残ったウイルス粒子上のHA単位の種類や比率によって抗原変異方向が支配されると考えれば，ウイルス抗原変異方向が本来不定であること，同一流行時に種々な抗原的変種が出現すること，最近インフルエンザウイルス・ワクチンの効力検定時に問題となっている，いわゆる島現象すなわち十分な抗体量の存在下でおこるウイルス非中和現象およびその際の変種出現は，比較的容易に説明することができる．

HA単位の免疫学的多元性を遺伝学的にいかに説明するかは今後の大きな課題である．

結　論

A香港型インフルエンザウイルスのHA抗原は，α，β，γ（仮称）3種からなるHA単位複合抗原であるとの観点で，1968～76年の流行時に検出した流行ウイルス株のHA抗原分析を行い，それら成績にもとづいてHA抗原変異について試論をのべた．

1) 1968年以降のA香港型流行ウイルス株のHA抗原は，α→β→γ と変遷しており，同一流行また同一集団から検出された流行ウイルス株の抗原構造は必ずしも均一でないことを明らかにした．

2) インフルエンザウイルスHA抗原連続変異方向は本来不定であるが，流行ウイルス株におけるHA抗原変異方向は大勢的に定っている．この事実を流行ウイルス株HA抗原を構成するα，β，γ単位の含有比率の変化（連続変異）と，ウイルス感染によって獲得した流行ウイルスに対する住民の抗体保有および集積との関連の数量化において試論を行った．

文　献

1) 岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子：日本医事新報，2709，43，1976
2) 岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子：臨床とウイルス，4，191，1976
3) 国立予防衛生研究所学友会：ウイルス実験学各論，33，1969，丸善，東京

東京衛研年報　*Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 77—79, 1976

紫外線照射によるポリオウイルスの不活化

矢野一好*, 藪内　清*, 柴田タツ美*
岩崎謙二*, 辺野喜正夫*

Inactivation of Type 1 Poliomyelitis Virus by UV Irradiation

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

緒　言

一般にウイルスは，紫外線の照射により容易に感染性を失うといわれているが，紫外線の効果は波長によって著しく異る[1]．ウイルスの不活化には通常波長 254 nm 前後の紫外線が用いられている．この波長は，核酸の最大吸収波長であり，ウイルス固有の抗原性をもつタンパクへの影響が少いからである[2]．

われわれは，水資源確保のための再生水利用を意図した実験の一環として，紫外線照射によるポリオウイルスの不活化実験を行った．

実験材料

供試ウイルス：CMK 細胞にポリオウイルスⅠ型弱毒株 (LSc, 2ab 株) を接種し，CPE (細胞変性効果) 出現後，培養容器のまま凍結融解し 3,000 rpm 15分間遠心沈殿した上清をウイルス原液として試験に用いた．

紫外線照射装置：紫外線殺菌灯は，ナショナル製 15W つり下げ型を用いた．紫外線強度は，International light 社製 IL-254 を用いて測定し，$\mu W/cm^2$ で表示した．紫外線強度の調節は，殺菌灯と照射材料との距離を変えることにより行った．

方　法

紫外線強度と不活化時間：上記ポリオウイルスを 1/100M の PBS で希釈し，プラスティクシャーレ (日水製 8.5φcm) に 16 m*l* 分注し液層をほぼ 2mm とした．サンプリングは，あらかじめ定めた時間にピペットを用いて 0.3 m*l* ずつ吸い取って行った．各サンプルは，紫外線照射しないウイルス対照と同時に CMK 細胞を増殖させたマイクロプレート (Cook 社製) で，CPE を指標に感染価 ($TCID_{50}/0.05$ m*l*) を測定した．

紫外線照射試料液の厚さと不活化時間：直径 13 cm, 2 *l* 容量のガラス製ビーカーを3個用意し，その中に PBS で 1,000倍希釈したウイルス液を入れ，それぞれの液層を，0.2 cm, 10 cm, 15 cm とした．紫外線照射を行い，所定時間にサンプリングして，残存ウイルスの感染価を測定した．紫外線強度は，$0.425\times10^4\mu W/cm^2$ と一定にした．紫外線透過率の測定は，直径 8 cm の石英シャーレを用いて測定した．

試料液の水質判定：ウイルス浮遊液の紫外線吸収を，Spectrophotometer (日立101型) を使用し，PBS を対照に OD_{250} を Absorbance (ABS) 値で測定した．

実験結果と考察

紫外線強度と不活化時間：ポリオウイルスⅠ型原液を PBS で 1,000 倍希釈し，紫外線照射試料の液層を 2 mm と一定にして，紫外線強度を，0.425×10^4, 0.75×10^4, 1.5×10^4, 3.0×10^4, 6.0×10^4, $10\times10^4\mu W/cm^2$ と変化させる条件下で，ウイルス不活化実験を行った．表1に各時間照射後の $TCID_{50}/0.05$ m*l* 値をしめした．上記紫外線強度の照射で，感染価が 10^0 以下になったのは，それぞれ16分，9分，7分，3分，2分，1分であった．

残存ウイルス量と紫外線照射時間の関連性をみるため，グラフ上に両者の対応値をプロットする時，照射時間値の対数値をとると，残存ウイルス量値と照射時間値との間に直線関係が成立した．紫外線強度ごとに最小二乗法によって，実測値から算出した回帰方程式は，表2にしめした．回帰係数は，3.01～3.25の範囲にあった．回帰直線は，図1にしめしたとおりで，紫外線強度が増大するに従って不活化時間は短縮し，直線は平行移動した．

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

ウイルス濃度と不活化時間：ウイルス濃度を変えた条件下で紫外線強度を一定にし，各照射時間後の残存ウイルス量を測定した．ウイルス原液を PBS で希釈し $10^{6.5}$, $10^{5.5}$, $10^{4.5}$, $10^{3.5}$, $10^{2.5}$ $TCID_{50}/0.05\,ml$ の5種類に調製した．各液層は 2 mm とし，紫外線強度は，$0.425\times10^4\mu W/cm^2$ に統一した．実験結果は，表3にしめした．照射時間値の対数値をとり最小二乗法で回帰方程式を算出し（表4），ウイルス濃度別に回帰直線を描いた（図2）．ウイルス濃度によって回帰係数は変化した．すなわち，ウイルス量が $10^{5.5}TCID_{50}/0.05\,ml$ 以上の場合，ウイルス濃度の増加にともなって回帰係数値は増大した（3.38, 4.06）が，$10^{4.5}TCID_{50}/0.05\,ml$ 以下の場合には，ウイルス濃度と関係なく，回帰係数値は，ほぼ一定となった（1.42～1.50）．

使用したウイルス原液の中には，紫外線を吸収する培地成分が含まれており，ウイルス希釈に対応してその培

表1．紫外線強度別不活化時間

照射時間	紫外線強度 ($\times10^4\mu W/cm^2$)						
	0	0.425	0.75	1.5	3.0	6.0	10
0	5.5*	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
5(秒)						3.5	3.5
10					5.5	3.5	3.0
20					4.5	3.5	2.5
30				4.0	4.0	3.0	2.0
1(分)		5.0	4.5	3.5	3.0	1.0	0
2		4.5	4.0	3.0	2.0	0	
3		4.0	3.5	2.5	0		
4		4.5	2.5	2.0			
5		3.5	2.5	1.5			
6		3.0	2.5	1.0			
7		3.5	2.0	0.5			
8		3.5	1.5	0			
9		2.5	0				
10		2.0					
11		1.5					
12		1.5					
16		0					

* $TCID_{50}/0.05\,ml$ (log 10)

表2．紫外線強度別不活化時間の回帰方程式

紫外線強度 ($\times10^4\mu W/cm^2$)	回帰方程式
0.425	$y=11.21-3.18x$
0.75	$y=10.53-3.25x$
1.5	$y=9.19-3.19x$
3.0	$y=8.73-3.23x$
6.0	$y=7.18-3.19x$
10	$y=5.97-3.01x$

ウイルス濃度 $10^{5.5}TCID_{50}/0.05\,ml$

表3．ウイルス濃度別不活化時間

照射時間	ウイルス濃度				
	6.5*	5.5	4.5	3.5	2.5
5(秒)			2.75	2.5	2.0
10			2.75	2.0	1.75
20			2.5	1.75	0.75
30			2.25	1.25	0.5
1(分)		4.0	2.0	1.0	0.25
2	4.0	3.0	1.25	0.75	0
3	3.75	2.75	1.0	0.25	
4	3.0	2.5	1.0	0	
5	2.75	2.25	0		
6	3.0	2.0			
7	2.5	1.5			
8	2.0	1.25			
9	2.0	1.0			
10	2.0	0.75			
11	2.0	0.5			
12	1.0	0.5			
13	1.0	0.25			
14	0.75	0			
15	1.0				
16	1.0				
17	0.5				
18	0.25				
19	0				

* $TCID_{50}/0.05\,ml$ (log 10)
紫外線強度 $0.425\times10^4\mu W/cm^2$

表4．ウイルス濃度別不活化時間の回帰方程式

ウイルス濃度 (log 10)	回帰方程式
6.5	$y=12.87-4.06x$
5.5	$y=10.28-3.38x$
4.5	$y=4.33-1.50x$
3.5	$y=3.49-1.42x$
2.5	$y=2.77-1.45x$

紫外線強度 $0.425\times10^4\mu W/cm^2$

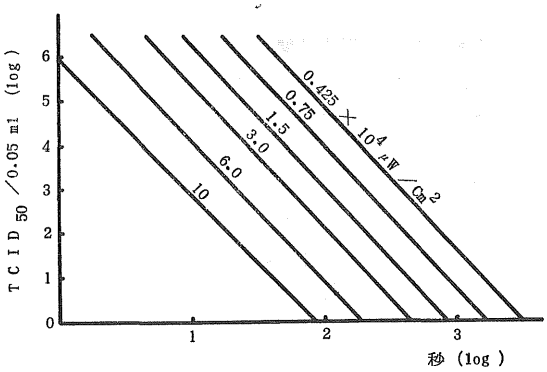


図1．紫外線強度別不活化時間の回帰直線

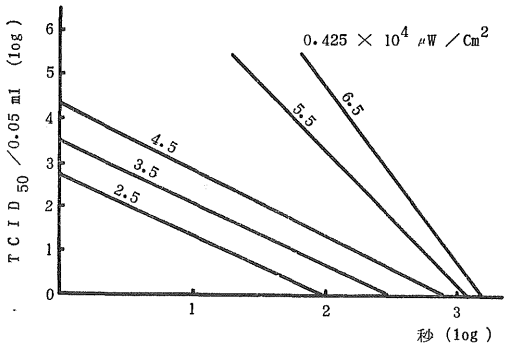


図2．ウイルス濃度別不活化時間の回帰直線

地成分は減少する．実験に用いた MEM 培地の 100倍希釈液の OD_{250} は，0.26 (ABS) であり，$10^{6.5}$, $10^{5.5}$, $10^{4.5}$, $10^{3.5}$, $10^{2.5}TCID_{50}/0.05\,ml$ ウイルス液の OD_{250} は，それぞれ 0.26, 0.026, 0.0026, 0.00026, 0.000026 となる．つまり，この回帰係数値の変化に影響を与えるのは培地成分であるとすれば，影響を与えない量の OD_{250} 値は，0.026以下であると考えられる．

ウイルス濃度 $10^{4.5}TCID_{50}/0.05\,ml$ 以下の回帰係数（平均 1.5）は，培地成分の影響がないウイルス液と紫外線照射時間の2つの因子からなる基本的な，ポリオウイルス不活化回帰係数と考えられる．この不活化回帰係数を高濃度ウイルス不活化時の回帰式に代入して，$y=5.5-1.5x$ なる回帰直線を引くと，X 軸との交点が 3.6 となる．図1の紫外線強度 $0.425\times10^4\mu W/cm^2$ の回帰直線と X 軸の交点は 3.53 となり両者の値は，ほぼ一致した．培地中の紫外線吸収成分の量が一定の時，ウイルス不活化におよぼす影響は，照射時間が短いほど大きいことをしめしている．その傾向は，培地成分の量が多くなるほど顕著となる．

試料液の厚さと不活化時間：紫外線は，水中にはいると液層の厚みにより透過率が変化しその効果が左右される．そこで，PBS を用いてウイルス液層 ($10^{5.5}TCID_{50}/0.05\,ml$) を 0.2 cm, 10 cm, 15 cm の3段階にし，不活化実験を行った．各層における紫外線透過率は，それぞれ 100%，92%，89% であった．実験結果は，表5にしめした．PBS で希釈したウイルス液を紫外線強度 $0.425\times10^4\mu W/cm^2$ 照射時，液層の厚みと不活化効果に有意な差はみられなかった．今回の実験は，無色透明なウイルス液での実験であったため，実験範囲の液層では有意な差がみられなかったが，色調や濁度のある水質の場合には，液層の厚さがウイルス不活化に大きく影響を与えることは考えられる．

表5．ウイルス液層の厚さと不活化時間

液層	照射時間 1(分)	2	4	8	16
2 mm	3.0	3.0	2.5	2.0	<1.0
10 cm	4.0	4.0	3.0	2.5	<1.0
15 cm	4.0	3.5	3.0	1.5	<1.0

紫外線強度 $0.425\times10^4\mu W/cm^2$

結論

紫外線によるポリオウイルスの不活化実験を行い，以下の結論を得た．

1) ポリオウイルスI型弱毒株 (LSc, 2ab 株) 培養液を PBS で1,000倍希釈 ($TCID_{50}/0.05\,ml: 10^{5.5}$) し液層 2 mm，紫外線強度 0.425×10^4, 0.75×10^4, 1.5×10^4, 3.0×10^4, 6.0×10^4, $10\times10^4\mu W/cm^2$ とし各時間における $TCID_{50}/0.05\,ml$ を求めた．残存ウイルス量値と紫外線照射時間の対数値の間に直接関係が成立した．ウイルス不活化量は，照射時間の対数値に正比例した．

2) 紫外線強度を 0.425×10^4 とし，ウイルス濃度を $10^{6.5}$, $10^{5.5}$, $10^{4.5}$, $10^{3.5}$, $10^{2.5}TCID_{50}/0.05\,ml$ として，各照射時間における残存ウイルス濃度を測定した．回帰直線は，ウイルス濃度 $10^{5.5}$, $10^{6.5}TCID_{50}/0.05\,ml$ で X 軸を支点とする 立ち上がりがみられ，回帰係数 3.38, 4.06 となった．ウイルス量 $10^{2.5}$, $10^{3.5}$, $10^{4.5}TCID_{50}/0.05\,ml$ では，$Y(x_0)$ 値が照射前のウイルス力価とほぼ一致し，回帰係数値は 1.5 となった．この回帰係数値は，ウイルス液と照射時間の2つの因子からなる基本的なポリオウイルス不活化回帰係数である．

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「再生水（下水処理水）のウイルス学的研究」として実施したものである）

文献

1) Henle, W. and G. Henle: *J. Exp. Med.*, **85**, 347, 1947
2) Benzeri, S.: *J. Bact.*, **63**, 59, 1952

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 80—84, 1976

窒素通気法による亜硫酸の定量について

松本 茂*, 中山京子*, 奥沢昌子*, 遠藤美佐子*

The Determination of Sulfurous Acid by Means of Nitrogen Through-flow Method

SHIGERU MATSUMOTO*, KYOKO NAKAYAMA*,
AKIKO OKUSAWA* and MISAKO ENDO*

Monier-Williams method (MW method), one of the determination methods of sulfurous acid in foods and medicines, affords comparatively good recovery on general samples, but the existence of aldehydes or essential oils leads to large errors at the estimation. We modified apparatus and test conditions: heating temperature, PH or titration methods taking MW method as a basis, and the determination methods were established for various samples.

They are composed of two steps: (A) separation of SO_2 ((1) under boiling, acidified with HPO_3, (2) bath warming, (3) distillation with water), (B) titration of absorbed solution ((1) titration of SO_4 with chelate indicator, (2) iodometry). Good results were obtained on not only with wine and general processed foods, but also with onion, garlic and radish which contain remarkable essential oils.

I はじめに

食品，薬品などに添加された亜硫酸およびその塩類の定量法として，古くから Monier-Williams法(以下 MW 法と略す) が行われている．この方法は通常の試料については，比較的良好な回収率を与えるので，現在もその変法が，AOAC 法[1]，日本薬学会協定法[2]などにそれぞれ採用されている．MW法の骨子は試料を鉱酸酸性として，煮沸下，遊離した二酸化イオウ (SO_2) を二酸化炭素または窒素を通じて吸収液（過酸化水素溶液）中に導き，生成した硫酸をアルカリ定規液で滴定するものであるが，この際共存する物質，例えばアルデヒド，精油等により大きな誤差を生ずる[3,4]．われわれは MW 法を基本として，その装置，試験条件などを改変し，上記成分による影響を減少し，SO_2 に対して，より特異的な定量方法の設定を試みた．MW法そのほか，食品などに含まれる亜硫酸を定量するとき，通例 (A) SO_2 の分離，吸収，(B)吸収液の滴定または比色による定量 の2つの段階に分けて行われる．そこで (A) SO_2 の分離では試料をメタリン酸 (HPO_3) 酸性としたのち，(1) 煮沸通気による分離法．(2) 加温通気による法．(3) 水と共に蒸留する法の3法とし，(B)ではMW法に比し特異性のある (1) キレート指示薬による硫酸の滴定法と，特異性には乏しいが終点の明瞭な (2) ヨウ素滴定法の2法を採用することとし，各試料別に(A)(B)各段階で最も適した組合せによる定量法を設定することとした．以下これらの方法の説明と，試料への適用結果について報告する．

II 実験方法

II—1 **試薬** ①硫酸イオン標準液：K_2SO_4（特級）を 110° で3時間乾燥し，その 0.363 g をはかり，水に溶かして正確に 1,000 m*l* とする．本液 1 m*l*=0.2 mg SO_4^{2-}(JIS KO 103) ②0.02N 酢酸バリウム溶液：$(CH_3COO)_2Ba \cdot H_2O$ 1.10 g および $(CH_3COO)_2Pb \cdot 3H_2O$ 0.40 g をはかり，水100 m*l* および酢酸 2 m*l* を加えて溶かし，イソプロパノールを加えて 500 m*l* とし，つぎのようにして力価Fの標定を行う．標定：硫酸イオン標準液 10 m*l* を正確にとり，これにイソプロパノール 50 m*l*，酢酸 1 m*l* およびトリン指示液2滴を加えたのち，本液を徐々に滴加して滴定する．終点は1分間以上持続するだいだい赤色とする（JIS KO 103 に準ずる）．$F = 200/96 \times x$，x：本液の滴定 m*l* 数．③トリン指示液：トリン 0.2 g をとり，水 100 m*l* に溶かす．④アルセナゾIII指示液：0.2% アルセナゾIII溶液を，必要ならばろ過

* 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

し，しゃ光して保存する（保存期間1か月以内）⑥SO_2 標準液：Na_2SO_3（特級）0.5 g を酸素を除いた水 500 m*l* に溶かして，1時間以上放置して用いる．本液は急速に力価を減ずるから，使用のつどヨウ素滴定法（(B)—(2)）により SO_2 濃度を測定する．

II—2 試験方法 (A) SO_2 の分離法 (A)—(1)煮沸通気法（標準法）．この方法は試料を HPO_3 酸性とし，煮沸下，遊離した SO_2 を N_2 気流により，吸収液 (1) H_2O_2，または (2) Na_2CO_3 溶液中に導き，(1)の場合は(B)—(1)硫酸の滴定，(2)の場合は(B)—(2)ヨウ素滴定を行うものである．〔装置および試験操作〕 Fig. 1 に示すような装置を用い，吸収管 E_1 および E_2 中には，(1)キレート滴定により定量する場合は 3% H_2O_2 溶液（吸収液(1)）計 15 m*l* を入れ，また(2)ヨウ素滴定により定量する場合は 2% Na_2CO_3 溶液（吸収液(2)）計 25 m*l* を入れる．三頸フラスコA中には液体試料 10～20 g（SO_2 として 1～5 mg を含む）をはかりとり，酸素を除去した水120m*l*，消泡用シリコーン樹脂溶液1滴を加え，F より N_2 ガスを7～8分間通じたのち，分液漏斗 B から HPO_3 溶液（1→5）35 m*l* を，ピンチコックIを開いて注加する．試料が固形のときは，細かく砕いたのち，その 10～15 g をはかり，酸素を除去した水 120～140 m*l* を加えて分散させ以下液体試料と同様に操作する．つぎにフラスコヒーターの温度をあげて，沸とうさせ，約1時間静かに還流させる．この間 N_2 の流量は毎分 110～130 m*l* とする．つぎに冷却管Cの冷却水を除き，なおしばらく煮沸を続け，導管の D_1 の部分が温かく感じられるようになってから，Dをはずし，D中の水滴を吸収液中に洗いこむ．吸収液および E_1，E_2 の洗液を合わせ（洗液は計 10 m*l* とする），キレート滴定用試験溶液(1)またはヨウ素滴定用試験溶液(2)とする．(A)—(2)加温通気法（別法i）．この方法は SO_2 の分離を水浴中で加温下に行うものである．〔装置および試験操作〕 Fig. 2 に示すような装置を用いる．すなわちフラスコ全体が水中に没するような水浴Hを用い，Fの先端には半融ガラスI（グラスフィルターG1 程度の目のもの）をつけて通気によるかき混ぜがじゅう分に行われるようにする．導管Dは直接フラスコにつけ，また附着した水滴を吸収管中に洗いこめるように，D_1 の部分に接合か所を設ける．また彎曲部は適当な方法で保温し，水滴が滞留して，これに溶けた SO_2 の回収が遅延しないようにする．試験操作は(A)—(1)に準ずるが，試料は液体またはこれに準ずるものとし，固型のものを含むのを避ける．また酸素を除いた水のかわりに NaCl 溶液（1→5）を用い，フラスコ中の液の総量は 150 m*l* をこえないようにする．HPO_3 溶液を加えたのち，浴温を上げ，55±1°として90分間保持する．N_2 の流量は 150～180 m*l*/min として，かき混ぜがじゅう分行われるようにする．捕集液については通例(1)

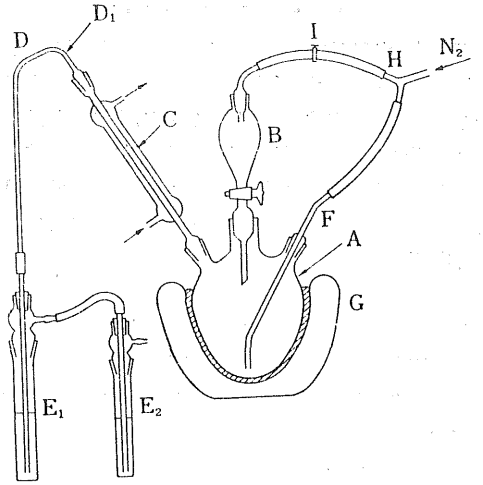


Fig. 1. Apparatus for Boiling Method (A)—(1)
A : 300～500 m*l* three necks flask
B : 50 m*l* separating funnel
C : Liebig condenser
D, F : glass pipe
E_1: impinjer style absorption tube (inner diameter 20mm for 10～15m*l* solution)
E_2: absorption tube(inner diameter 15mm for 5～10m*l* solution)
(diameter of each mouth of E_1 and E_2 is 1 mm)
G : flaskheater (covered with glasswool and asbestos)

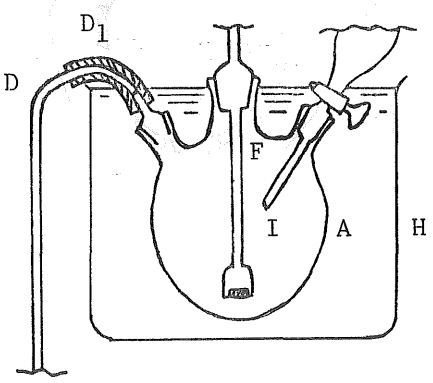


Fig. 2. Apparatus for Bath warming Method (A)—(2)
H : water bath(sink to the necks of flask)
I : tube equipped with sintered glass(G1)
D_1: covered with heat insulating material

キレート指示薬による硫酸の滴定を行う．(A)—(3)蒸留法（別法 ii)．この方法は SO_2 の分離を，水と共に，吸収液(2)中へ蒸留して行うものである．滴定は(B)—(2)ヨウ素滴定による．〔装置および試験操作〕 Fig. 3 に示すような装置を用いる．導管Dは直接フラスコに接続し，他端を冷却管につなぎ，吸収液 2 % Na_2CO_3 溶液 20 m*l* を入れた 100 m*l* の三角フラスコを受器として，冷却管の先は吸収液中に導く．試験操作は(A)—(1)に準ずるが，試料は精油分，アルデヒド体などを含まないものとし，また HPO_3 溶液 (1→5) の量は 25 m*l* とする．酸素を除いた水でフラスコ内の液量を 160～170 m*l* としてから，N_2 を徐々に通じ，フラスコヒーターの温度を上げてゆるやかに蒸留を行う．留液約 50 m*l* を取り，捕集液について(2)ヨウ素滴定法を行う（糖分の多い試料では内容物が焦げないように注意する)．(B)滴定法（定量）(B)—(1) キレート指示薬による硫酸の滴定．試験溶液(1)をとり，これにイソプロパノール 125 m*l*，酢酸 2 m*l*，トリン指示液 3 滴を加えたのち，0.02 N 酢酸バリウム溶液を徐々に滴加して滴定する．終点は 1 分間以上持続するだい

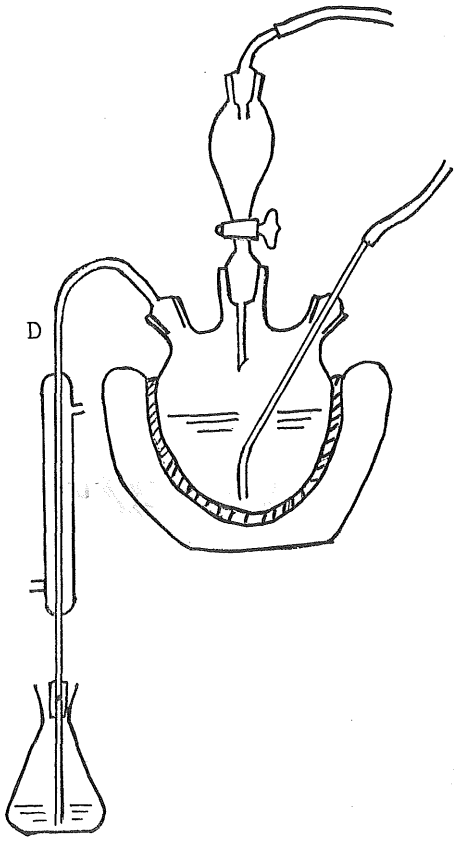


Fig. 3. Apparatus for Distillation with Water (A)—(3)

だい赤色とし，終点前後の標準色と比較し判定する．空試験溶液により補正する．（④アルセナゾIII指示液を用いてもよい)．

0.02 N $(CH_3COO)_2$ Ba 溶液 1 m*l*=0.6407 mg SO_2 (B)—(2)ヨウ素滴定．0.02 N I_2 溶液を正確に 5 m*l*（または 10 m*l*）とり，これに試験溶液(2)の全量を加えたのち，HCl (1→2) 4 m*l* を加えて 5 分間放置し，過剰の I_2 を 0.02 N $Na_2S_2O_3$ 溶液で滴定する（指示薬デンプン溶液)．

0.02N I_2 溶液 1 m*l*=0.6407 mg SO_2

II—3 SO_2 の回収試験 II—2にあげた各法の回収率を検するため，つぎのような試験を行った．〔試験操作〕水または試料の所定量をフラスコA中に入れ，水（または NaCl 溶液）およびシリコーン樹脂溶液を加えたのち，N_2 ガスを通じ，つぎに⑤ SO_2 標準溶液一定量 (SO_2 として 1～5 mg) をピペットで分液漏斗Bに入れ，以下II—2にあげた操作に従って試験を行い，(B)—(1)または(B)—(2)の法で滴定する．同時に標準溶液を，同一のピペットで量り，ヨウ素滴定法によって SO_2 含量を測定し，回収率を計算する．

III 実験結果とその検討

III—1 各試験方法の SO_2 回収率 各試料からの回収実験に先立って，水＋SO_2 標準液からの回収率をII—3の方法に従って測定した．(ア) (A)—(1) 煮沸通気法の装置および操作によって試験を行い，(B)—(2)による滴定を行ったときの回収率はつぎのようであった． SO_2=1.0～2.5mg のとき 97.8—100.5%(5回)平均値 98.6%, SO_2=4.5～5.5 mg のとき97.2—99.7%（4回）平均値98.2% 以上のとおり回収はほぼ完全に行われ，ばらつきは滴定誤差の範囲内と見られた．なお(B)—(1)の法により硫酸根の滴定を行うときも，標準溶液の絶対力価を正確にとり，終点の判定を慎重に行えば，結果はほとんどヨウ素滴定の場合と同様で，97—99%の回収率がえられた．(イ)(A)—(2)（別法 i）加温通気法の場合も，上記と同様にして回収実験を行ったところ，(A)—(1)とほぼ同様平均98%の回収率がえられた，(ウ)(A)—(3)（別法 ii) 蒸留法でも，上記の回収結果は滴定誤差の範囲内であった．

III—2 各種試料の空試験値および SO_2 の添加回収実験ならびに市販品の実測値 砂糖，あめ，日局ぶどう酒その他の食品についての空試験値，SO_2 実測値およびIII—1に準じて行った，SO_2 標準液添加による回収率の測定結果を Table 1 に示す．すなわち砂糖，あめ，ぶどう酒，ほし果物，甘なっとう，煮豆など精油分を含まない試料については，SO_2 の分離法として(A)—(1)，(A)—(2)，(A)—(3)のいずれを用いても良好な回収がえられた

Table 1. Recovery of SO_2 from Samples

sample	separation of SO_2	titration	value of blind test	SO_2 added	recovery	note
sugar, candy	(A)—(1)	(B)—(1), (B)—(2)				
	(A)—(2)	(B)—(1), (B)—(2)	0	1—5 mg/20 g	97—98.5%	
	(A)—(3)	(B)—(2)				
wine (J.P.)	(A)—(1)	(B)—(1), (B)—(2)				
	(A)—(3)	(B)—(2)	1.9 mg/20 g*	2—2.5 mg/10 g	98—99%	not to be over heated
pineapple (dried)	(A)—(1)	(B)—(1), (B)—(2)				
	(A)—(3)	(B)—(2)	2.1—2.5 mg/10 g*	2—2.5 mg/10 g	96—98%	
radish	(A)—(1)	(B)—(1)	0.1—0.15 mg/10 g			
	(A)—(2)	(B)—(1)	<0.1 mg/10 g		92—94%	(A)—(3) and (B)—(2)
onion	(A)—(1)	(B)—(1)	0.1—0.18 mg/10 g	2—2.5 mg/10 g		
	(A)—(2)	(B)—(1)	<0.1 mg/10 g		90—95%	cannot be applied
garlic	(A)—(1)	(B)—(1)	0.3—0.4 mg/10 g			
	(A)—(2)	(B)—(1)	0.15—0.25 mg/10 g			
sugared bean	(A)—(1)	(B)—(1), (B)—(2)			97—98.5%	not to be over heated
	(A)—(2)	(B)—(1), (B)—(2)	0	2—2.5 mg/10 g	92—96%	
	(A)—(3)	(B)—(2)			97.5—101%	not to be over heated

note:
(A)—(1) boiling method
(A)—(2) bath warming m.
(A)—(3) distillation with water m. (HPO_3 add.)
(B)—(1) SO_4 titration (Thorin or Arsenazo III)
(B)—(2) iodometry
*SO_2 cont.

が，だいこん，玉ねぎ，にんにくなど精油分の多い試料では(A)—(3)蒸留法は適用できず，(B)—(2)ヨウ素滴定法もまた大きな空試験値を与えるので用いることができない．これらの試料については Table 1 に示すような各法を適用することにより比較的低い空試験値がえられた．特ににんにくについては大きな障害が見られたが，(A)—(2)法，(B)—(1)法の組合せによって同値を 25 mg/kg 以下に押えることができた．なおこれらの試料に(A)—(1)煮沸法を適用するとき，冷却管Cの水を除いてから，管内の水滴に溶けている SO_2 を駆出するため加熱をつづけるが，この際注意して過熱を避け，留液中に精油分が入らないように留意する必要がある．また糖分の多い試料では強熱を避け，アスベストでフラスコを保護して，焦げを防ぐようにしなければならない．以上のほか，かんぴょう，ほしあんず，果実酒などについても前記の各法による実測を行ったが，特にばらつきが多く，実施上支障があるものは見られなかった．ただ(A)—(2)加温法では，フラスコ内に固型分が見られるような試料では，回収率の低下がみとめられた．したがって(A)—(1)法がもっとも適用範囲が広く，これを標準的方法とし，(A)—(2)法は特に精油分などを含むか，加熱により分解が著しく，空試験値の多い試料に適用することとした．(A)—(3)法は既述のように，精油分を含まない試料についてのみ適用される．

III—3 試験条件の検討 (ア) SO_2の分離法について (a)本法の装置についてはなるべく特殊の器具を用いないようにしたが，吸収管 E_1, E_2 内にスパイラルガラス板を入れて，気泡が回転するようにすれば吸収の能率が良好になる．また煮沸法の場合，冷却管Cの下端が細い場合は還流が順調に行われないことがあった．(A)—(2)加温法では，フラスコ全体を浴中に没しないと，附着した水滴に SO_2 が溶けて，回収に時間を要する．D_1 部についての注意はII—2 (A)—(2)に記載した通りである．導管 F の先端には Fig. 2 の I のような装置（または球状のもの）をつけて通気による攪拌をじゅう分行うようにする．しかしこのようにしても固型分を含む場合には前述のように回収の低下がみられた．(A)—(3)蒸留法では，記載のように試料の焦げによる(+)の誤差を防ぐため，フラスコの保護に特に注意しなければならない．(b)フラスコ内の液性については試料中の不安定成分の分解を防ぐため，なるべく弱い酸の使用が望ましく，又金属イオンの隠蔽も期待できるので，HPO_3 を使用したが，SO_2 の回収は満足に行われた．通気時間については，とくに(A)—(2)の場合，温度を低下させれば，回収のばらつきを防ぐためには時間延長が必要となるので，実用上，記載のような時間と温度条件を採用した．(A)—(3)法における留液の量は 40～50 ml でじゅう分であった．

(イ)滴定条件について (a)キレート指示薬を用いる硫酸の滴定については，トリン法，アルセナゾIII法，テトラヒドロキシキノン2ナトリウム KCl 試薬（食添）による法の3法について比較検討したが，結果はほぼ同一であった．ただ終点の判別しやすさで，トリン指示薬がわずかにすぐれていると思われたので，トリン法を主とすることとした．吸光度滴定を行うときは 500～530 nm において吸光度の変化は最大であった[5]．またトリン法，アルセナゾIII法ではいずれもイソプロパノールの添加量は4～5倍量のとき，終点の変色が最も明瞭になった．また注目されたのは，これらのキレート試薬は KCl, NaCl, CH_3COONa, CH_3COOK などの塩類の添加により滴定が不可能になることであった．テトラヒドロキシキノン2ナトリウムの場合は pH を 6.5—7.5 としたのち，食添公定書に準じ，エタノール等量を加えて滴定するのがよく，とくにエタノール濃度は滴定結果に大きな影響を与えた．(b)ヨウ素滴定法(B)—(2)では，過剰のヨウ素を加える逆測法によるのが最も誤差が少なく，酢酸鉛捕集—ヨウ素液滴加による法に比し，滴定結果は良好であった．

IV おわりに

以上本試験法の実施法と各試料への適用結果ならびに各試験条件についての検討を行ったが，本法は実施に当って，各項記載の諸点に留意すれば，精油分などを含むものにも適用され，各種試料について比較的良好な回収が期待できる．本試験法のうち(A)—(1)煮沸法と(B)—(1), (B)—(2)の滴定法については昭和51年度薬学会協定衛生試験法[6]に，また(A)—(2), (A)—(3)法は別法として同注解に収載されることとなった．

謝辞 本法に関する追試と助言をいただいた横浜市衛生研究所河村太郎所長，中村正明氏，神奈川県公害センター和田裕所長に深謝いたします．

文 献

1) *Methods of Analysis of the A.O.A.C.* 12th, EC. 366—368, 1975
Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington DC.
2) 日本薬学会編衛生試験法注解，186, 1973, 金原出版株式会社
3) 二島太一郎，松本 茂：東京衛研年報，21, 59, 1970
4) 松本 茂，二島太一郎，永瀬 誠，蔵内正行：東京衛研年報，21, 63, 1971
5) 橋爪六郎：医薬品研究，1, 192, 1970
6) 衛生化学（衛生試験法特集号）22, 105, 1976

東京衛研年報　*Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 85—87, 1976

市販医療用医薬品の品質について (IV)　塩酸メクロフェノキセート錠

重岡捨身*, 宮武ノリエ*, 上原真一*, 田窪栄一*

Quality Check of Drugs (IV)
Meclofenoxate Hydrochloride Tablets

SUTEMI SHIGEOKA*, NORIE MIYATAKE*, SHIN-ICHI UEHARA*
and EIICHI TAKUBO*

はじめに

市販医療用医薬品のうち，今回は意識障害治療剤，脳代謝改善剤として用いられている塩酸メクロフェノキセート錠に遊離酸として含まれる p-クロルフェノキシ酢酸（以下 p-CPA と略す）をトリメチルシリル化（以下 TMS 化と略す）し，ガスクロマトグラフィー（以下GCと略す）によって定量する方法について検討したので，市場品の定量結果と共に報告する．

Fig. 1 に塩酸メクロフェノキセートおよび TMS 化体を示す．

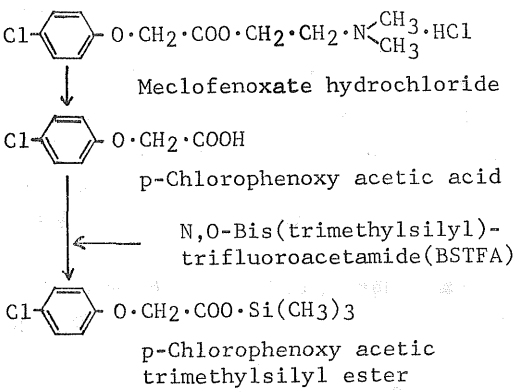


Fig. 1.

塩酸メクロフェノキセートはフランスの Amphar 社が開発したもので，単なる中枢興奮剤ではなく，脳細胞によく移行し，脳神経細胞の酸化還元機構ならびにグルコース代謝に促進的に働き，脳循環の改善をはかる特有な神経作用調節効果を発揮するとされており，交通事故等による頭部外傷後遺症におけるめまいの治療に多用されている．このメクロフェノキセートに遊離酸として含まれる p-CPA はその品質をチェックするために，原体の規格にはアルカリ滴定により定量し，その限度値を 1.0% 以下と定めたものが多いが，その製剤については限度値を規定しているものはわずかで，その規定もアルカリ滴定による方法で，配合成分に酸性物質を含む場合などは不十分である．メクロフェノキセートを製剤化する際にエステルが分解し，遊離酸が増加することが考えられるので，原体のみでなく製剤中の p-CPA もチェックし，その品質を確保することが必要と思われる．

実験の部

1. 試料　塩酸メクロフェノキセート錠は 5社 6種で，いずれも白色のフィルムコーティング錠を PTP 包装またはメタルシールされたものである．

2. 試薬・試液　N, O—Bis(trimethylsilyl) acetamide (BSA), N, O—Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), *n*-ヘプタデカン，安息香酸フェニル（以上東京化成），内部標準液 ①*n*-ヘプタデカンの 0.015%アセトン溶液，②安息香酸フェニルの0.015%アセトン溶液，p-CPA 標準品：東京化成特級の p-CPA をシリカゲルデシケーターで 24 時間以上乾燥し，その約 100 mg を精密に量り，中和エタノール 50 m*l* を加えて溶かし 0.1N 水酸化ナトリウム液で滴定し，純度98%以上のものを用いた．塩酸メクロフェノキセート：製剤用原体．

3. 定量法　**標準液**　p-CPA 約 10 mg を精密に量り，アセトンを加えて溶かし正確に 50 m*l* とする．この液 1, 2, 3, 4 m*l* をそれぞれ別々のナス型フラスコにとり，それぞれに内部標準液 2 m*l* を正確に加え，注意して減圧でアセトンを留去し，残留物にアセトン 0.5 m*l* を加えて溶かし標準液とする．

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

試料液 試料の5錠をとり，アセトンに1～2分間浸し，生乾きの状態でピンセットを用いてフィルムコーティング部を注意して除き，室温でアセトン臭がなくなるまで風乾したのち，重量を精密に量り1錠の平均重量を求める．この錠剤を乳ばちで均一な粉末とし，1錠相当の試料を量りエーテル 30 m*l* を加え10分間振とうし，傾斜してエーテル抽出液を取り，試料はさらにエーテル 10 m*l* ずつで2回同様の操作を行い，エーテル抽出液を合わせ注意して溶媒を減圧留去する．残留物はシリカゲルデシケーターで一夜乾燥し，アセトン 10 m*l* を正確に加えおだやかに振り混ぜて溶かしたのち，2.5 m*l* ずつを正確に別々のナス型フラスコA，Bにとる．Aには内部標準液 2 m*l* を正確に加え，A，Bから注意して溶媒を減圧留去し，残留物にアセトン 0.5 m*l* を加えて溶かし試料液A，Bとする．

定量 試料液Bの 2 μl をGCに注入し p-CPA-TMS 化体および内部標準物質と同じ位置にピークのないことを確かめたのち，標準液，試料液Aにそれぞれ BSTFA 50 μl を加え室温で5分間放置したのち，交互にGCに注入し内部標準物質と p-CPA-TMS 化体とのピーク高比を求め定量する．適当なピーク高比が得られないときは濃度をかえて再度試料をとりなおして操作する．

GCの条件：島津ガスクロマトグラフ 5AP$_3$TF，カラム：①10% Apiezone L Chromosorb W (AW-DMCS) 60～80 mesh，3 mm×2 m，② 5 % Polyphenylether 6 ring Chromosorb W (AW-DMCS) 80～100 mesh，3 mm×1.5 m（以上日本クロマトエ業製），カラム温度：①240°，②210°，注入口温度：カラム温度より約30°高い一定温度，キャリヤーガス：N_2 40 m*l*/min，H_2 40 m*l*/min，空気 0.9 *l*/min.

定量法の検討

TMS 化については除草剤として使用される 2,4ジクロルフェノキシ酢酸ナトリウムを TMS 化し定量する方法[1]があり，p-CPA も同様の方法で定量することが考えられ，その条件等について検討した．

TMS 化剤の選択 TMS 化剤として BSA，BSTFA，ヘキサメチルシラザン(HMDS)，トリメチルクロルシラン (TMCS) の4種について検討した．通常 TMS 化には HMDS と TMCS を一定比率で加える方法がとられるが，p-CPA 300μg に TMCS 100μl と HMDS 100μl を加え室温で反応させたところ，TMS 化が試薬添加直後最高に達し，その後急速に減少し安定性に欠けた．また BSA 100μl と TMCS 100μl を加えたときも同様であった．Fig. 2 に示すように p-CPA 300μg に BSA，BSTFA を加え直ちにその 2μl をGCに注入し内部標準物質とのピーク高比を求めるとき BSA，BSTFA のいずれを用いても TMS化はすみやかに進み，210分後もそのピーク高比は変らず安定であった．BSAは添加後TMS化率が最高になるまで15～20分を要するが，BSTFA は直ちに最高に達するのでBSTFAを用いることとした．またメクロフェノキセートに BSA，BSTFA を加えGCに注入したところ，p-CPA の TMS 化体は生成せず混在するメクロフェノキセートは影響しないことが判明した．

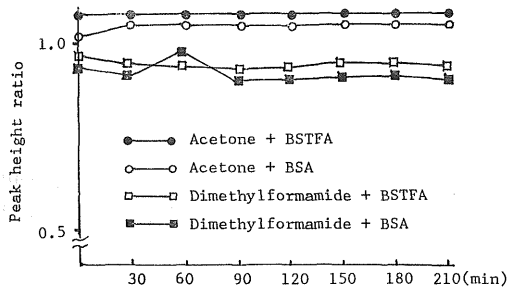


Fig. 2. Effect of Standing time of the Mixture and Solvent to the Silylation

TMS化剤の添加量について p-CPA 600μg に対して BSTFA 20μl，50μl，100μl を加え，それぞれ内部標準物質に対するピーク高比を求めたが，いずれも同じ値を示したので 50μl とした．

溶媒の選択 p-CPA を TMS 化する際の溶媒としてアセトンおよび N，N′-ジメチルホルムアミドについて検討したが Fig. 2 に示すとおりアセトンは N，N′-ジメチルホルムアミドに比較してピーク高比が安定で TMS 化率も高く，さらに p-CPA，内部標準物質の溶解も良いのでアセトンを用いることにした．

検量線・再現性 p-CPA の 150～600μg について定量法により操作したところ，直線性のある検量線が得られ，再現性も良好であった．

カラムの選択 Fig. 3 に示すとおり2種のカラムについて検討したが Apiezone L ではメクロフェノキセートのピークは p-CPA-TMS 化体の前に現われ，両者のピークは接近しているが保持時間が短く，また Polyphenylether 6 ring ではメクロフェノキセートが内部標準物質の後に出て分離も良いが保持時間が長いなど，両者のカラムに一長一短があるが，いずれを用いても定量は可能であった．

結果および考察

p-CPA の定量法としては (イ)硫酸・メタノール混液を加え加熱還流しメチルエステルとする方法[2]，(ロ)ジメトキシプロパン・メタノール・塩酸混液を加えて放置しメ

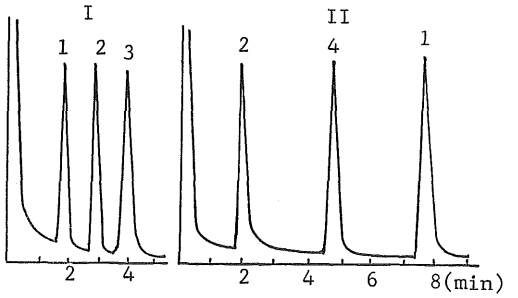


Fig. 3. Gas chromatogram of p-Chloro-phenoxy acetic trimethylsilyl-ester
1: Meclofenoxate　3: n-Heptadecan(I.S)
2: p-CPA-TMS ester　4: Phenyl benzoate(I.S)
I: Apiezon L, column temp. 240°
II: Polyphenylether 6 ring, column temp. 210°

チルエステルとする方法[3]，(ハ)ブトキシエタノール・塩酸混液を加えて加熱しブトキシエタノールエステルとする方法[4]などが報告されているが，著者らの実験によればいずれもメクロフェノキセートから p-CPA を抽出する際に混在するメクロフェノキセートが酸で分解し p-CPA を生成し，これがそれぞれに対応する新たなエステルを生成するので，これらの方法を定量法に応用することは不適当であった．そこで TMS 化体としGCによる方法を検討した．

試料の5社6種について試験した結果，4種は原体の限度値（p-CPA として 1.0%以下）に近いものであったが，2種は越えるものであった．このように原体をいくらチェックしても製剤化する過程で遊離酸が増加することが考えられるので最終製品の p-CPA を定量し塩酸メクロフェノキセート錠の品質を確保する必要がある．またメクロフェノキセートは一般に紫外部吸収法で定量されているが，その吸収は p-CPA の吸収によるものであり，メクロフェノキセートと p-CPA の分離が溶媒抽出では完全に行なうことができないので，真のメクロフェノキセート含量を求めるには，まず総メクロフェノキセートとして紫外部吸収法で定量したのち，p-CPA を GC で定量してその差をメクロフェノキセート含量とする必要があると考えられる．

謝辞　本研究に際して有益なご助言を頂いた(株)環境技術研究所の中尾正三，茂呂光男両氏，ならびに検体の収集にあたられた薬事監視員の方々に深謝します．

（本研究は昭和50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) 中尾正三，茂呂光男，富沢絹子：農薬生産技術，20(補)，2，1969
2) Gardner, K. and K.C. Overton: *Anal. Chim. Acta.*, 23, 337, 1960
3) 農薬生産技術，21，37，1970
4) Meagher, W.R.: *J. Agr. Food. Chem.*, 14, 374, 1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 88—90, 1976

市販医療用医薬品の品質について（V） システイン注射薬

重岡捨身*, 田窪栄一*, 上原真一*, 宮武ノリエ*

Quality Check of Drugs (V) Cystein Injections

SUTEMI SHIGEOKA*, EIICHI TAKUBO*, SHIN-ICHI UEHARA*
and NORIE MIYATAKE*

はじめに

薬務行政上の必要から，著者らは解毒剤，抗アレルギー剤などの名で薬物中毒やジンマシンの治療に用いられている市販の *l*-システインを含む注射剤について，システインの定量をするように国ならびに都の薬務当局から要請をうけ，一応の成果を得たので報告する．

市販品の実態を調査した結果，システインを含むこの種の注射剤は，①システイン 1 mg/m*l*，グリチルリチン 2 mg/m*l*，グリシン 8～20 mg/m*l*，②システイン 4 mg/m*l*，ブドウ糖 6 mg/m*l*，アスコルビン酸 50～100 mg/m*l*，の2通りの内容に大別され，製品は 2～20 m*l* のものであった．いずれの場合でも化学的に極めて不安定なシステインを混合製剤の中から選択的に定量することは容易ではない．まず対象となるほとんどの製品が予試験の結果，安定剤として酸性亜硫酸塩を配合し，なおかつアンプルを開いたのちは酸化をうけやすく，放置，振とうまたは希釈などがいちじるしく定量値を低下させる要因になることを確認した．

すでに報告されている定量法のうちから安定剤をも含めて配合される共存成分の影響をうけにくい方法を検討し，前記①についてはリンタングステン酸法[1]を，また②については酸性ニンヒドリン法[2,3]を採用することとした．なお試料溶液のシステイン濃度についてはそれぞれの原報によらず，システインとして 1 mg/m*l* の試料をとってすみやかに反応させるように考慮したが，②の場合はシステイン濃度が高いため止むなく最少限度の希釈をして 1 mg/m*l* とした．

実験の部

試薬・試液 クエン酸緩衝液：クエン酸 105 g に水酸化ナトリウム 52.5 g を加え水約 450 m*l* に溶かしたのち，酢酸ナトリウム 110 g，尿素 250 g，塩化アンモニウム 26.8 g および塩化亜鉛 13.6 g を加えて溶かし，水を加えて 1 *l* とする（混濁する場合はガラスフィルター（G4）でろ過する）．発色試液：リン酸 33 m*l* に水 150 m*l* を加えて振り混ぜたのち，タングステン酸ナトリウム 100 g を加えて溶かし，約1時間おだやかに還流沸とうさせる．冷後臭素2滴を加え再び弱く沸とうさせて過量の臭素を除き，冷後水を加えて 500 m*l* とする．酸性ニンヒドリン試液：ニンヒドリン 375 mg に酢酸・塩酸混液（6：4）10 m*l* を加え加温して溶かす．0.2% グリチルリチン水溶液：グリチルリチンモノアンモニウム 50 mg をとり水 10 m*l* を加え水酸化ナトリウム試液を滴加して溶かし，希酢酸を加えて中和したのち，水を加えて 25 m*l* とする．塩酸システイン標準品：JIS 特級 L-システイン塩酸塩を食品添加物公定書定量法[4]により定量し純度99%以上のものを用いる．塩酸システイン標準溶液：塩酸システイン標準品約 50mg を精密に量り，0.05%亜硫酸水素ナトリウム溶液を加えて溶かし正確に 50 m*l* とする．本溶液は調製後直ちに使用する．

定量法 塩酸システイン標準溶液，1% グリシン溶液，1% アスコルビン酸溶液，0.2% グリチルリチン溶液，試料溶液のそれぞれ 10 μl ずつを薄層クロマトグラフ用シリカゲル（メルク社，シリカゲル $HF_{254+366}$）を用いて調製した薄層板（厚さ 0.25 mm，110° 60分間活性化したもの）にスポットする．つぎに *n*-ブタノール・酢酸・水混液（3：1：1）を展開溶媒として約 10 cm 展開したのち，薄層板を風乾する．これを紫外線ライトによりアスコルビン酸を確認したのちヨウ素蒸気中に20分間放置し，かっ色スポットとして成分の確認をする（Rf 値はシステイン0.48，グリシン0.30，アスコルビン酸0.68，グリチルリチン 0.60）．アスコルビン酸を含まないものについてはリンタングステン酸法で，含むものについて

* 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

は酸性ニンヒドリン法で定量する.

(1) **リンタングステン酸法** あらかじめクエン酸緩衝液 50 m*l*, 発色試液 2 m*l* を入れた 100 m*l* のメスフラスコ3個 (T, S, B) に試料 (T), 標準溶液 (S), 0.05%亜硫酸水素ナトリウム溶液 (B) をそれぞれ 2 m*l* ずつ正確に加えて混和し, 水を加えて 100 m*l* とする. 室温で25分間放置したのち (B) を対照に 720 nm の吸光度 A_T, A_S を測定し定量する.

(2) **酸性ニンヒドリン法** あらかじめ0.05%亜硫酸水素ナトリウム溶液 3.0 m*l* を入れた小試験管に試料 1.0 m*l* をピペットの先たんを液につけながら加え, ピペットで注意してかき混ぜ試料溶液とする.

酢酸 10 m*l*, 酸性ニンヒドリン試液 (以下NH試液と略す) 1 m*l* を入れた 25 m*l* のメスフラスコ3個 (T, S, B) に試料溶液 (T), 標準溶液 (S), 0.05%亜硫酸水素ナトリウム溶液 (B) をそれぞれ 1 m*l* ずつ正確に量って加え, 軽く栓をして沸とう水浴中で正確に5分間加熱し, ただちに流水で室温まで冷却したのち酢酸を加えて 25 m*l* とする.

a) この液を 1 m*l* 正確に量って 20 m*l* のメスフラスコにとり, エタノールを加えて 20 m*l* とする. 加熱をはじめたときから60分以内に (B) を対照として 557 nm 付近における極大吸収波長で吸光度 A_T, A_S を測定し定量する.

b) この液 1 m*l* を正確に量って共栓遠心沈でん管 (T′, S′, B′) にとり, ベンゼン 20 m*l* を正確に量って加え, 0.1N 塩酸 5 m*l* を加え3分間はげしく振り混ぜ遠心し, ベンゼン層をとり B′ を対照として加熱をはじめたときから60分以内に 565 nm 付近の極大吸収波長で吸光度 A_T', A_S' を測定し定量する.

定量法の検討

システインの安定性 塩酸システイン標準品を水に溶かしその安定性をリンタングステン酸法により測定したところ, 溶解後10分で96～98%, 20分後で94～96%と低下し, 溶解する水を煮沸し窒素を通して冷却したものを用いた場合も同様であった. 溶解する水を0.05%亜硫酸水素ナトリウム溶液にすることにより数時間安定であった.

吸収曲線, 検量線および再現性 それぞれの定量法にしたがって操作し, 吸収曲線をえがくときは Fig. 1 のとおりであり, 0.25mg～1.75 mg/m*l* の範囲で検量線は直線性があり, 再現性も良好であった.

(1) **リンタングステン酸法** 本法について定量法に対する還元物質および共存物質の影響を検討した結果, システインと同量の亜硫酸水素ナトリウムまたはピロ亜硫酸ナトリウムは影響しないが, アスコルビン酸は同量で2～3倍の感度を示し妨害する. しかし倍量のグリチルリチンまたは20倍量のグリシンの共存は影響を認めない.

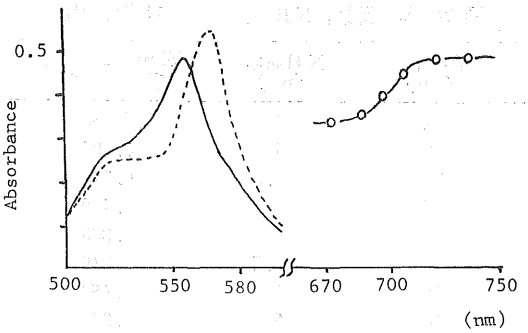


Fig. 1. リンタングステン酸法と酸性ニンヒドリン法の吸収スペクトル
————酸性ニンヒドリン法(a)
……酸性ニンヒドリン法(b)
○-○-○リンタングステン酸法

(2) **酸性ニンヒドリン法**

(イ) **還元物質, 共存物質の測定値におよぼす影響** システインと同量の亜硫酸水素ナトリウム, ピロ亜硫酸ナトリウム, シスチン, 倍量のグリチルリチンまたはブドウ糖は影響せず, また12.5倍量, 25倍量のアスコルビン酸も影響しないが, 20倍量のグリシンは約2%の低下を示す. しかしシステイン, ブドウ糖およびアスコルビン酸の組合せの注射剤にはグリシンは含まれていないので影響はないものと考える.

(ロ) **加熱時間と吸光度** 塩酸システイン 1 mg/m*l* 溶液 1 m*l* をとり, 加熱時間を変化させるほかは定量法 a)により操作し吸光度を測定するとき, 3分: 0.373, 5分: 0.445, 10分: 0.414, 20分: 0.342を示したので, 加熱時間は5分とした.

(ハ) **NH 試液, 酢酸の量と吸光度の関係** 反応時のNH試液と酢酸の量を変化させるほかは定量法 a) により操作し吸光度を測定するとき, Table 1 のとおりで, NH試液 1 m*l*, 酢酸 10 m*l* とした.

(ニ) **NH 試液の濃度と吸光度の関係** 塩酸システイン 0.25 mg～1.75 mg/m*l* の溶液についてニンヒドリン濃度を 2.5, 3, 3.75% とし定量法 a) にしたがって操作した結果は Table 2 のとおりで, ニンヒドリン濃度は3.75%とした.

(ホ) **転溶溶媒の選択** 反応液の呈色物質はベンゼンのほかには酢酸, エタノール, イソブタノール, *n*-アミルアルコール, 酢酸エチル, キシレン, クロロホルムまたは四塩化炭素に転溶するが, 呈色の安定時間が比較的長

Table 1. 酢酸，NH試液の量と吸光度の関係

酢　酸 (ml)	NH試液 (ml)	557nmにおける 吸　光　度
1	1	混　濁
2.5	1	0.307
5	0.5	0.318
5	1	0.410
5	2	0.380
10	0.5	0.316
10	1	0.450
10	2	0.376
20	1	0.406

Table 2. NH試液の濃度と吸光度

システイン (mg/ml)	ニンヒドリン（%）			
	2.5	3	3.75	5
1.74	0.683	0.726	0.772	0.731
1.50	0.612	0.632	0.660	
1.25	0.495	0.510	0.552	
1.00	0.422	0.422	0.440	
0.76	0.326	0.320	0.338	
0.50	0.222	0.217	0.226	
0.25	0.115	0.112	0.112	

いベンゼンを用いることとした．

（ヘ） **呈色の安定性**　a）エタノール溶液および b）ベンゼン溶液はいずれも比較的安定であるが，時間の経過とともにわずかに吸光度が低下するので，両液とも加熱開始より60分以内で測定することにした．

（ト） **NH 試液の安定性とエタノール濃度と吸光度の関係**　NH試液を調製した直後，3日後，7日後．エタノール濃度を 95v/v%，99.5v/v% の2種について吸光度との関係を検討した結果，NH試液は調製後3日以内ならば安定であり，エタノール濃度はいずれも吸光度に差が認められないので 95v/v% とした．

考　察

システインの安定剤として注射剤にしばしば添加される亜硫酸塩は N-エチルマレイミド法[5,6]，DCBQ 法[7]，2,2′または 4,4′ジチオピリジン法[8] ではあきらかに妨害が認められたので，これらの方法は応用することができなかった．この妨害を受けない方法としてリンタングステン酸法，酸性ニンヒドリン法について検討し，一応の成果が得られた．しかしこの両法においてもシステインそのものを選択的に定量する方法ではないが，前述のような成分，配合比のもののように比較的単純な注射剤では内容成分を確認したのち応用できるものと考える．なお安定剤として亜硫酸塩が添加されたものでもアンプルを開封し，放置または振とう等をすることによりシステインの含量が低下するので，開封後は直ちに使用することが望ましい．この方法により市販のシステインを含む注射剤の品質を評価することができるものと考える．

謝辞　本研究に際して有益なご助言を頂いた国立衛生試験所生物化学部中路幸男技官に深謝します．

（本研究は昭和50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) Kassell, B. and E. Brand : *J. Biol. Chem.*, **125**, 115, 1938
2) Work, E. : *Biochem. J.*, **67**, 416, 1957
3) Gaitonde, M.K. : *Biochem. J.*, **104**, 627, 1967
4) 第三版食品添加物公定書解説書，B-393，1973，広川書店
5) Roberts, E. and G. Rouser : *Anal. Chem.*, **30**, 1291, 1958
6) Alexander, N.M. : *Anal. Chem.*, **30**, 1292, 1958
7) 井上　修，中村　弘ら：昭和45年度厚生科学研究報告，114，1971
8) Grassetti, D.R. and J.F. Murray, Jr. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 41, 1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 91—95. 1976

メッキ排水中の有害性重金属の定量

吉原武俊*, 奥本千代美*, 寺島潔*, 長嶋真知子*
遠山逸雄*, 西川洋一*, 松本茂*

Determination of Harmful Heavy Metals in Plating Waste Waters

TAKETOSHI YOSHIHARA*, CHIYOMI OKUMOTO*, KIYOSHI TERASHIMA*,
MACHIKO NAGASHIMA*, ITSUO TOYAMA*, YOICHI NISHIKAWA*
and SHIGERU MATSUMOTO*

A simple method is discribed for the determination of chromium (VI), copper, zinc, cadmium and nickel in plating waste water. A micro amount of chromium (VI) was extracted with methylisobutylketone as diethyldithiocarbamate complex at pH5 and determined with atomic absorption spectrophotography. Repeated test for chromium (VI) added to samples showed a good recovery of 93.5% and a coefficient of variation of 3.8%. Other metals were simultaneously determined by square-wave polarography in 1M-ammoniumchloride-ammonia aqueous solution. The analysis of spiked samples revealed that the recoveries and coefficient of variations (in the parenthesis) were 94.6% (1.0%), 94.6% (1.6%), 95.2% (2.6%) and 94.1%(2.1%) respectively for copper, zinc, nickel and cadmium.

緒　言

メッキ工場排水中の無機シアン化合物は毒物および劇物取締法により，その限度が1 ppmと規定されているが，そのほかの有害性金属は対象外である．これらの金属は総理府令によって金属ごとに排水基準が定められ，またクロム，銅，亜鉛，ニッケルおよびカドミウムの定量については同令によって JIS・K・0102 を適用するように規定されている．しかし，メッキ工場排水中には作業内容によって種々の物質が含まれ，JIS 法を適用する場合に共存物質が測定値に影響することがあるので，前記の金属について各種定量法の簡便性または精度について検討し，次いで都内メッキ工場の排水についてこれら金属の含量を測定したので併せて報告する．

実　験　の　部

試薬および標準原液　特に記載のないかぎり試薬特級を用いた．1)クロム(VI)標準原液：重クロム酸カリウム 0.248gを水に溶かし正確に100mlとする，2)クロム(III)標準原液：重クロム酸カリウム 0.142 gを少量の水に溶かし塩酸 20 mlを加え，溶液の黄赤色が緑色に変化するまで還流する．この液1滴をとり，ジフェニルカルバジド試液1滴を加え，赤紫色を呈しないことを確認したのち，冷後反応液に水を加えて正確に 100 ml とする，3)銅標準原液：硫酸銅（5水塩）0.393 g を30%硫酸2滴を加えた少量の水で溶かしたのち，水を加えて正確に100ml とする，4)ニッケル標準原液：硫酸ニッケルアンモニウム（6水塩）0.673 g を硫酸数滴を加えた少量の水で溶かしたのち，水を加えて正確に 100 ml とする，5)亜鉛標準原液：硫酸亜鉛（7水塩）0.440 g を水に溶かし正確に100 ml とする，6)カドミウム標準原液：金属カドミウム 0.100 g を希硝酸 5 ml に溶かし，煮沸して酸化窒素ガスを除去し，冷後水を加えて正確に 100 ml とする，7)鉄標準原液：和光純薬製原子吸光用試薬，1)～7)の各標準原液はそれぞれ1 mg/ml の金属を含み，試験に用いる標準液はこの原液を水で適宜希釈して用時調製する，8)2%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（以下 DDTC と略す）溶液：DDTC 2 g を水に溶かし 100 ml とする，9)酢酸緩衝液：0.5M酢酸ナトリウム液に氷酢酸を加え pH 5.0 に調節する，10)1%ジフェニルカルバジド溶液，11)10%亜硝酸ナトリウム溶液，12)20%尿素溶液，13)過マンガン酸カリウム溶液，14)5 M塩化アンモ

* 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

ニウム・アンモニア溶液：塩化アンモニウム81gを少量の水に溶かしたのち，アンモニア水 340 m*l* および水を加え1 *l* とする．10)～13)は JIS・K・0102・51・クロムの項に準じて調製する．

装置 原子吸光分析装置：パーキンエルマー 403型，分光光度計：日立自記分光光度計 EPS-3 T 型，く形波ポーラログラフ分析装置：柳本ポーラログラフ P-8 型

試料 昭和50年11～12月にシアン定量用検体として都内のメッキ工場から採水された排水を用いた．各検体はシアン固定のため水酸化ナトリウムで pH 11以上に調節されたもので，外観上均一な排水と沈殿物または浮遊物を含む不均一な排水の2群に大別される．各群から任意に同数ずつ合計60種選び，15%酒石酸で中和したのち，試料とした．

定量操作

1. クロム(VI) 溶媒抽出原子吸光光度法 試料の適量を正確にとり，酢酸緩衝液5 m*l*および水を加え100m*l*とし，DDTC 溶液 2.5 m*l* および水を飽和させた MIBK 10 m*l* を加え，5分間振り混ぜたのち，MIBK 層を分離し，原子吸光光度法（測定条件，波長：3579Å，ランプ電流：25mA，スリット：3，空気流量：23.2 *l*/min，アセチレン流量：3.8 *l*/min，バーナー位置：10mm）により吸光度を測定し，クロム(VI)標準液（2～80μg/m*l*）各1 m*l* を同様に操作して得られた検量線から試料中のクロム（VI）を求める．

吸光光度法 試料の適量を正確にとり，JIS・K・0102・51に準じて定量する．

ポーラログラフ法 試料の適量を正確にとり，注意して蒸発乾固し，残留物を 1 N 水酸化ナトリウム液20m*l* に溶かし，−0.7 V付近のく形波ポーラログラムを測定する．クロム（VI）標準液（50～1,000 μg/m*l*）各2 m*l* を同様に操作して得られた検量線から試料中のクロム(VI)を求める．

2. 全クロム 試料をJIS・K・0102・51の1項に準じて過マンガン酸カリウムで酸化し，前記1の方法に準じて，原子吸光光度法，吸光光度法およびポーラログラフ法により全クロムを測定する．

3. 銅，亜鉛，ニッケルおよびカドミウム 試料の適量を正確にとり蒸発乾固し，残留物を 0.1N 塩酸2 m*l* に溶かし5 M 塩化アンモニウム・アンモニア溶液4 m*l*および水を加えて正確に 20 m*l* とする．

0～−1.5 Vの間のく形波ポーラログラムを記録し，各金属の半波電位の位置に生じた波高を測定し，あらかじめ標準液を用いて作成した各金属の検量線よりその量を求める．

結果および考察

都内のメッキ工場で最も多く行なわれているのは，ニッケル，クロム，銅および亜鉛メッキであり，メッキ排水中にはこれらの金属，シアン化合物，濃厚な酸，アルカリおよびシアンなどの処理に使用された次亜塩素酸塩，硫酸第一鉄など種々の化学物質が含まれており，排水中の重金属を分析する場合，測定値に影響が生じる．メッキ排水中のクロム（VI）は JIS・K・0102・51・2により測定する場合，鉄あるいはクロム（III）などの影響を受け，溶媒抽出原子吸光光度法[1-14]およびけい光X線法[15-18]などはクロム（VI），（III）の分離，定量精度，分析操作の簡便さなどの面で問題があるので，JIS 法，溶媒抽出原子吸光光度法，ポーラログラフ法の3法について種々検討した．ニッケル，銅，亜鉛およびカドミウムについてはポーラログラフ法による同時定量法を検討した．

1. クロム（VI） 吸光光度法（JIS 法） JIS に準じて操作した場合，クロム（VI）0.2～2 μg/m*l* の間で直線回帰が得られ，クロム（VI）標準液(40 μg / m*l*) 1 m*l* をとり同様に操作し変動係数を求めたところ 0.4 %であった．また発色時の pH を 0.8～2.0 に変化させて吸光度を測定したところ，ほとんど差が認められなかった．10種のメッキ排水にクロム（VI）標準液（40 μg/m*l*）1 m*l* を添加し，回収率および繰り返し実験による再現性を検討したところ，回収率はTable 1に示されるように試料によって異なり 67.3～104.7 %であったが，回収率の低下する割合は試料によりほぼ一定であった．試料を過マンガン酸カリウムで酸化したのち，クロム（VI）標準液（40μg/m*l*）1 m*l* を添加しその回収率を求め，酸化前の回収率と比較したところ，Table 1に示すように回収

Table 1. Recovery of Chromium(VI) by the Diphenylcarbazide Method(JIS)

Sample No.	Recovery(%) A	Recovery(%) B
1	88.9	93.5
2	67.3	100.3
3	74.7	96.9
4	104.7	106.7
5	87.7	93.6
6	68.0	92.5
7	68.2	100.7
8	103.9	99.6
9	96.0	95.7
10	72.2	92.2

A : before oxidation
B : after oxidation

率が上昇した．この際，排水中の鉄が妨害物質となるので，クロム（VI）の吸光度に与える鉄の影響および試料中の鉄の含量を測定した．鉄1，5および10 mg 共存時の吸光度は鉄が存在しない場合に比して，それぞれ13，28および50%低下し，100 μg 以下ではほとんど吸光度に影響がなかった．前述の試料中の鉄量を JIS・K・0102・47・2 に準じて原子吸光光度法により定量した結果 Table 1 の試料中 No. 1 および 3 から 0.69 および 0.83 μg/ml，その他から 0.50 μg/ml 以下の鉄が検出された．この結果からクロム（VI）の回収率を低下させる他の妨害物質の存在が考えられるが，前述のようにメッキ排水中には種々の化学物質が存在し，さらにこれら化学物質の種類，濃度などは，各工場の作業内容により，あるいは採水時期により変動するため，これら妨害物質の確認は困難である．前述のように回収率は試料によって異なるが，再現性が認められることから，JIS により作成した検量線によらずに，各試料別に一定量のクロム（VI）を添加して得られた検量線によってメッキ排水中のクロム（VI）を測定することとした．

溶媒抽出原子吸光光度法　DDTC-MIBK 抽出原子吸光光度法は深町ら[5] により報告されているが共存するクロム（III）の分離方法および抽出条件などは各報文により異なっている．そこでクロム(VI) とクロム(III) の分離，クロム（VI）と DDTCの錯体生成時間，錯体のMIBK層への移行および安定性などについて検討した．クロム（VI）標準液（40 μg/ml）1 ml をとり，0.5M 酢酸ナトリウム液 5 ml を加え，酢酸とアンモニア水により pH を種々に調節したのち，定量操作に準じて吸光度を測定し，吸光度と pH の関係を検討したところ Fig. 1 のように pH 5 で最大の吸光度を示した．また1回の抽出操作により，錯体のほとんどが MIBK 層に移行した．これに比しクロム（III）標準液（40μg/ml）1 および 5 ml をとり同様に操作したところ，pH 8 で最大の吸光度を示したが，1回の抽出操作により MIBK 層に移行する錯体は20% 以下であり，大部分が水層に残った．以上の結果から以下の抽出操作は pH 5 で行なうこととした．クロム（VI）標準液（40μg/ml）1 ml およびクロム（III）標準液（40 μg/ml)50ml をとり，振とう時間を5，10，15および30分の4段階とし，吸光度と抽出時間の関係を検討したところ，吸光度はほとんど変化せず，クロム（VI）と DDTC の錯体生成反応および生じた錯体の MIBK 層への移行はすみやかに進行し，振とう時間は5分で十分であった．深町ら[5] は15分以内に抽出操作することによりクロム(III)を分離しているが，今回の実験では振とう時間30分の場合もクロム（III）の影響はなかった．次に生じた錯体の安定性を検討するため，5分間振り混ぜたのち分離した MIBK 層を冷暗所保存(1)，室温放置(2)および2層を分離せず室温放置(3)に区分して一定時間毎に吸光度を測定したところ，いずれの場合も2時間以内では一定の吸光度を示し，4時間以降では (2) および (3) の吸光度が低下した．以上の実験結果より pH 5 で5分間振り混ぜ，MIBK 層を分離することによりクロム（VI）を定量することとした．この条件で操作した場合0.2～8.0 μg/ml の間で直線回帰が得られ，吸光光度法の検討に使用した10種のメッキ排水にクロム（VI）標準液（40 μg/ml）1ml を添加し，回収率および変動係数を測定したところ，いずれの試料からも93.5% 以上の回収率が得られ，JIS 法にみられた回収率の低下は生じなかった．また変動係数は 3.8 %であった．

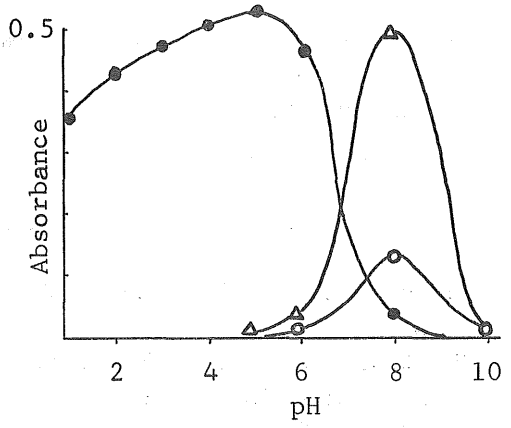


Fig. 1.　Effect of pH on Extraction
——●——: Chromium(VI)　40μg
——○——: Chromium(III)　40μg
——△——: Chromium(III)　2000μg
2%DDTC: 2.5ml, MIBK: 10.0ml

ポーラログラフ法　クロム（VI）は 1 N 水酸化ナトリウム溶液中で−0.7 V 付近に還元波を生じ 5～100μg/ml の間で直線回帰が得られた．10種の試料 20 ml にクロム（VI）標準液（1 mg/ml）1 ml を添加し，10N 水酸化ナトリウム液 2.5 ml および水を加えて 25 ml としたのち測定し，クロム（VI）の回収率を求めたところ試料によっては満足する値が得られなかった．そこで同じ試料を蒸発乾固し，残留物を 1 N 水酸化ナトリウム液に溶かしたのち，回収率を求めたところ，いずれの試料も 93.8%以上の値を示した．

以上の3法により10種のメッキ排水中のクロム（VI）を測定したところ，分析法による測定値の差はほとんど認められなかったが，吸光光度法は各試料別に標準液を

添加する必要があり，ポーラログラフ法は他の2法に比して感度が低いことなどから，メッキ排水中のクロム（VI）の定量には DDTC-MIBK 抽出原子吸光光度法が適当と認める．

2. 全クロム 試料にクロム（VI）および（III）各20 μg/m*l* を 1 m*l* ずつ添加し全クロムの回収率を求めたところ，吸光光度法，溶媒抽出原子吸光光度法およびポーラログラフ法とも95%以上の値を示し，10種の排水中の全クロムの測定値は分析法による差がほとんど認められなかった．

3. 銅，亜鉛，カドミウムおよびニッケル 1M塩化アンモニウム・アンモニア溶液中のく形波ポーラログラムを測定したところ，銅，カドミウム，ニッケルおよび亜鉛の順に−0.5，−0.8，−1.1および−1.3V付近に還元波が生じ，ポーラロ感度50において各々5～100，5～80，5～100および10～100 μg/m*l* の間で直線回帰が得られた．50 μg/m*l* 以上のクロム（VI）が共存する場合，−1.4V付近にクロム（VI）の還元波が生じ亜鉛との分離定量は不可能であり，この場合は1Mリン酸中で−1.2 V 付近の亜鉛波を測定する．しかし亜鉛に比しクロム（VI）は感度が低く，実際にメッキ排水を分析する場合にほとんど問題はなかった．10種のメッキ排水に銅，亜鉛，ニッケルおよびカドミウムの標準液をそれぞれ 40 μg/m*l* の濃度となるように添加して回収率および変動係数を求めたところ，回収率はそれぞれ 94.6，94.6，95.2，および94.1%で変動係数は 1.0，1.6，2.6 および 2.1%であった．

Table 2. Metals in Plating waste water

Sample No.	Cr(VI) 0.5*	Total-Cr 2*	Cu 3*	Zn 5*	Cd 0.1*	Ni -
1		4.6	3.1	1.0		
2			35.3			73.3
3		2.2	2.4	t		
4		0.2	11.3	1.8		6.9
5		t	198.5	28.2		21.6
6		11.3	58.4			
7	3.2	3.4	98.4			7.4
8			79.0	25.6		116.4
9		0.3	1.2			
10		t	12.8			
11		0.4	12.5			55.6
12		16.4	4.9			
13	8.1	11.4	8.1			7.4
14	0.1	0.1	47.1			5.6
15	2.2	4.1	30.5		3.0	
16		1.8	16.2			3.5
17		t	t	t		t
18		10.4	32.8			
20	0.8	19.8				
26	0.1	1.8				
28		1.7	8.7			

* Limit μg stipulated by Effluent Standards
t: trace, The samples of 1 to 25 contain precipitates or floats

4. メッキ排水中の重金属 1，2および3の実験により設定された測定条件に従いメッキ排水中の金属を測定したところ Table 2 に示すように不均一な試料（No. 1～25）のほとんどから金属を検出し，中には総理府令に定められた基準値以上の排水があった．本実験では無機シアン定量用検体として採水された試料を用いたが，排水中の各物質の種類，濃度は採水時期などにより大きく変動するため，試料の採水方法の検討が今後必要であろう．

結　論

メッキ排水中の重金属を JIS 法により測定した場合試料により回収率の低下を生じたが，クロム（VI）は DDTC-MIBK 抽出原子吸光光度法により，銅，ニッケル，亜鉛およびカドミウムは1M塩化アンモニウム・アンモニア溶液中のく形波ポーラログラフ法により定量が可能であった．本法により50種の排水中の金属含有量を測定したところ，クロム（VI），全クロム，銅，ニッケル，亜鉛およびカドミウムがそれぞれ6，20，19，10，6および1種の試料から検出された．

謝辞 本研究にあたり試料の収集にあたられた衛生局薬務部薬事監視員の皆様に深謝いたします．

文　献

1) Delaughter, B.: *At. Abs. Newslett.*, 4, 273, 1965
2) Mansell, R.E.: *ibid.*, 4, 365, 1965
3) Midgett, M.R: *ibid.*, 6, 128, 1967
4) 下村滋，福本佳子，棚瀬弥一郎：衛生化学，16, 144 1970
5) 深町和美，森本昌宏，柳川正男：分析化学，21, 26, 1972
6) 島田武憲，田中克彦，福井昭二，管野三郎：衛生化学，19, 35, 1973
7) 安田誠二，垣山仁夫：九州工技試報，553, 1973
8) 河野隆年：分析化学，22, 55, 1973
9) 久冨啓次，久下芳生：水処理技術，15, 667, 1974
10) 深町和美，古田直子，柳川正男，森本昌宏：分析化学，23, 187, 1974
11) 後藤　尚，神馬　諭：*ibid.*, 23, 517, 1974
12) 相原将人，木卜光夫：*ibid.*, 24, 718, 1975

13) 松尾　力，志田惇一，安彦政信，今野和久：*ibid.*, **24**, 723, 1975
14) 日色和夫，応和　尚，Mercedes Takaoka，田中孝，川原昭宣：*ibid.*, **25** 122, 1976
15) Luke, C.L.: *Anal. Chim. Acta*, **41**, 237, 1968
16) Watanabe, H.: *Talanta*, **19**, 1363, 1972
17) Blount, C. W., D. E. Leyden, T. L. Thomas, and S. M. Guill: *Anal. Chem.*, **45**, 1045, 1973
18) 竹本修明，北村秀樹，久下芳生，中川　茂，村田勝夫，池田重良：分析化学，**25**, 40, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 96—99, 1976

有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究（III）
繊維製品中の有機塩素系防虫剤（ディルドリン）の定量法

吉原武俊*, 遠山逸雄*, 寺島潔*, 奥本千代美*
長嶋真知子*, 西川洋一*

Studies on Examination Method of Household-necessities Containing Poisonous Chemical Substances (III) Determination of Organochlorine Insecticide (Dieldrin) in Textile Products

TAKETOSHI YOSHIHARA*, ITSUO TOYAMA*, KIYOSHI TERASHIMA*, CHIYOMI OKUMOTO*, MACHIKO NAGASHIMA* and YOICHI NISHIKAWA*

An analytical method of dieldrin in textile products was evaluated in terms of its sensitivity and recovery. The method employed here involves extraction from textile products, a clean-up with florisil column chromatography for elimination of the interference and gas chromatography with electron capture detector. Soxhlet extraction with methanol gave higher recovery than reflux extraction with acetone・methanol mixture(1:1). The detectable minimum amount of dieldrin by gas chromatography with electron capture detector was 5.45×10^{-4}ng. According to the method for dieldrin modified in the present study, the recovery was 96.5% and the coefficient of variation was 2.29%. Dieldrin was detected in all samples examined ranging in the levels of 0.01—0.46ppm and 0.07—43.8ppm, respectively for raw wool and treated wool.

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」の施行に伴い，著者らは，これらの行政検査を行なうとともに，家庭用品に含有される有害物質の定量法について検討してきた[1,2]．かつて繊維製品に防虫の目的で使用されていた有機塩素系化合物のうち，ディルドリンの定量法に関する厚生省試案を追試し，定量精度を高めるために，抽出，精製およびガスクロマトグラフィーなどの操作条件について検討したので報告する．

ディルドリン定量法（厚生省試案）

1. **装置** 電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー（以下ECD-GCと略す）

2. **試験液の調整** (1)**抽出** 繊維を細切し，その約1gを精密に量り 500 m*l* ナス型フラスコ（I）に入れ，アセトン・メタノール混液（1：1）250 m*l* を加え，還流冷却器をつけ70°の水浴中で30分間抽出し，温時抽出液を 500 m*l* ナス型フラスコ（II）にとる．還流冷却器およびナス型フラスコ（I）をアセトン・メタノール混液（1：1）100 m*l* で洗い，洗液は抽出液に合せ，溶媒を減圧留去(ロータリーエバポレーター)する．

(2)**精製** 内径 1.5 cm，長さ 30cm のカラム管にカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム10g，ついでその上に無水硫酸ナトリウム約5gをn-ヘキサンを用いて入れ，カラム上端に少量のn-ヘキサンが残る程度までn-ヘキサンを流出させる．溶媒を留去したナス型フラスコ（II）に6%エーテル・n-ヘキサン溶液 10 m*l* を加え，よく振り混ぜたのち，このカラムに通導し，さらに6%エーテル・n-ヘキサン溶液20 m*l* ずつで2回ナス型フラスコ（II）を洗い，洗液をそれぞれカラムに通導したのち，6%エーテル・n-ヘキサン溶液100 m*l* で溶出する．最初の溶出液 150m*l* をとり，n-ヘキサンで全量を正確に 200 m*l* とし，これを試験液とする．

3. **試験** 操作条件 1. column: glass column 3mm ×1.5～2.0m, 5% Silicone SE-30 on Chromosorb W (AW-HMDS) 60～80 mesh, column temp.: 200°, detector temp.: 250°（線源がトリチウムの場合は最高使用温度), carrier gas: N_2 ディルドリンが約12分

* 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

で流出する流速に調整.

操作条件2. つぎに示す以外は操作条件1に示すところによる. Column: 2%DEGS-0.5%H_3PO_4, ディルドリンが約5分で流出する流速に調整.

操作条件1, 2のうちいずれかでピーク高比法またはピーク面積法により定量を行なう.

実験の部

試薬・試液 特に記載するものの他は試薬特級を, 有機溶媒は残留農薬試験用を用いた. カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム: フロリジン社製フロリジル (60～80メッシュ) 130° 活性化, ディルドリン標準品シェル化学製土壌残留農薬試験用ディルドリン標準品 (98.1%) を ECD-GC で単一ピークを示すまで再結晶, ディルドリン以外の標準有機塩素農薬: 和光純薬製残留農薬標準品, ディルドリン原液: n-ヘキサン 1 m*l* 中に 1 mg を含有する, その他の有機塩素農薬原液: それぞれn-ヘキサン 1 m*l* 中に 0.1 mgを含有する, 試験に用いた精製水は 2 *l* を n-ヘキサン 200 m*l* で3回洗浄し, 洗液の 5 m*l* 濃縮液に農薬分析を妨害するものが存在しないことを確認した.

1. 繊維製品中のディルドリンの定量

抽出 細切した試料約 1g を精密に量り, ソックスレー抽出器に入れて, メタノール 100 m*l* を用いて3時間抽出したのち, 抽出器および試料は 20 m*l* のメタノールで洗い, 洗液はフラスコ中の抽出液に合せ, 約 1 m*l* となるまで溶媒を減圧留去し, 水 5 m*l* を加え分液ロートに移す. n-ヘキサン 20 m*l* でフラスコを洗い, さきの分液ロートに入れ, よく振り混ぜたのち, n-ヘキサン層を分離する. さらに n-ヘキサン 20 m*l* ずつで3回同様の操作を繰返し, n-ヘキサン層は合せ, 無水硫酸ナトリウム 5 g で脱水し, 約 1 m*l* になるまで溶媒を減圧留去する.

精製 活性化フロリジル 10g を内径 1.5 cm, 長さ30 cm のカラム管に n-ヘキサンを用いて充てんし, さらにその上に無水硫酸ナトリウム 5 g を積層し, 前述の濃縮液を通導し, フラスコは 15% エーテル・n-ヘキサン溶液 10 m*l* ずつで3回洗い, それぞれカラムに通導し, 15% エーテル・n-ヘキサン溶液を溶出溶媒とし, 約 5 m*l*/min で溶出し, 最初の溶出液 180 m*l* をとり, n-ヘキサンで正確に 200 m*l* とする.

定量 つぎに示す操作条件で, ECD-GC によりピーク高比法で定量する. GC: 島津 GC-4CM 型 (ECD-^{63}Ni), column: glass column 3 mm × 2.0m, sensitivity: 10^2 MΩ, range: 4×10^{-2}V.

① 2%DEGS-0.5%H_3PO_4 on Chromosorb W (AW-DMCS) 60～80 mesh, column temp.: 175°, carrier gas: N_2 120 m*l*/min, injection temp.: 250°.

② 5% Silicone QF-1 on Chromosorb W (AW-DMCS) 60～80 mesh, column temp.: 195°, carrier gas: N_2 70 m*l*/min.

2. 原毛中のディルドリンの定量

原毛約 2 g を精密に量り, 100 m*l* 三角フラスコに入れ, これに 0.5 N -水酸化カリウム・エタノール溶液 20 m*l* を加え, 還流冷却器をつけ1時間水浴中で加熱し, 冷後フラスコ内の溶液を 200 m*l* の分液ロートに移し, フラスコは石油エーテル 30 m*l* で3回洗い, 液をさきの分液ロートに入れる. これに水 20 m*l*を加え, 振り混ぜたのち, 石油エーテル層を分離し, 水層は別の分液ロートに移し, 石油エーテル 30 m*l* で2回抽出を繰返す. 抽出液はさきの石油エーテル層に合せ, 50%エタノール溶液 20 m*l* ずつで3回洗い, 石油エーテル層は無水硫酸ナトリウム 5 g で脱水し, 溶媒を減圧留去したのち, 前述のフロリジルカラムで精製し, ECD-GC にかけ, ピーク高比法により定量する.

結果と考察

羊毛を防虫加工する場合, ディルドリンはキシレンに溶解し, 適当な乳化剤を加えて乳剤として使用し, 羊毛重量の0.05～0.1%のディルドリンを染浴に加え, 40～100° で加工するのが普通で, Lipson ら[3] は, 0.005%

Table 1.

No.	sample	Dieldrin (μg/g)
1	毛糸	0.34
2	おむつカバー	0.67
3	手袋	0.07
4	子供パンツ	0.05
5	子供帽子	0.05
6	毛糸	0.44
7	毛糸	0.11
8	毛糸	0.06
9	ニット	0.03
10	ニット	0.03
11	織物	0.03
12	織物	0.09
13	毛糸	0.58
14	原毛・オーストラリア	0.06
15	原毛・オーストラリア	0.11
16	原毛・南アメリカ	0.46
17	原毛・ニュージーランド	0.01
18	原毛・南アフリカ	0.03
K-1	モスリン・防虫加工	23.0
K-2	モスリン・防虫加工	43.8
K-3	モスリン・防虫加工	8.94
K-4	英ネル・防虫加工	0.22

のディルドリンでもコイガの死亡率は100％であると報告している．防虫加工された羊毛におけるディルドリンと羊毛の結合状態について，奥[4]は分子中のエポキシ環と羊毛のケラチンタンパクの化学的結合とし，その後，山本[5]は羊毛が45°以上に加熱されると膨潤し，その際ディルドリンが物理的に吸着され，冷却とともに強固な結合をなすと説明している．

抽出 原毛中のディルドリン量は Table 1 に示すように最高 0.46 ppm で，ディルドリンの有効防虫量を考慮すれば，羊毛に対する自然汚染量は分析操作上考慮しなければならない数値ではなく，試料からの抽出は全量抽出が望ましい．Table 2 に示すように，厚生省試案では抽出が一回で完全に行なわれていない．これはディルドリンが羊毛に容易に吸着されることから，抽出操作中で抽出と吸着が平衡関係を生じ，ソックスレー抽出では吸着が減少しているものと考えられるので，厚生省試案に比し抽出効率が高まっている．Table 3 に示すように，メタノール・ソックスレー抽出法が変動係数 (C.V.) および抽出効率ともよい数値を示した．0.5N-水酸化カリウム・エタノール溶液で繊維質を分解したのち，石油エーテルでディルドリンを抽出して定量した結果は，メタノール・ソックスレー抽出法による定量値の約88％を示し，ディルドリンを同様の操作でアルカリ処理した結果，ディルドリンの回収率は91.8％であり，原毛には脂肪が多く抽出液の精製が容易でないことから，この方法は原毛からのディルドリン抽出法に応用できるものと考える．

精製 大槻ら[6]によれば，フロリジルはロットにより活性度が異なるので，吸着の割合が変化し，特に親和性の強いディルドリンは，活性度の影響を受け易いとされている．そこで3種のロットの異なるフロリジルを用い，溶出実験を行なった．130°，18時間活性化したフロリジル 10 g を用い，6％エーテル・n-ヘキサン溶液で溶出し，溶出液を 10 m*l* ずつ分画して，溶出量を検討した結果，いずれのロットでもディルドリンは 180 m*l* までに溶出され，また，溶出溶媒として15％エーテル・n-ヘキサン溶液を用いた場合には 150 m*l* までに完全に溶出された．この溶出実験では，ディルドリン溶液 1 m*l* をカラムに通導したが，定量操作ではナス型フラスコを15％エーテル・n-ヘキサン溶液 10 m*l* ずつで3回洗いその都度洗液をカラムに通導しているので，溶出溶媒の全量は 180 m*l* とした．

定量 残留農薬分析の ECD-GC については，多くの報告[7-13]があるが，ディルドリンが他の有機塩素系農薬，特に p,p′-DDE と分離可能なカラムは限られている．Thompson ら[7]は，3％DEGS, 5％QF-1 および 1.5％OV-17-1.95％ QF-1 などで，ディルドリンと他の有機塩素系農薬を分離しているので，これらのカラムについて検討した結果，2％DEGS-0.5％H_3PO_4 と 5％シリコン QF-1 でディルドリンの分離が可能であった．また，厚生省試案で用いられている 5％シリコン SE-30では，p,p′-DDE とディルドリンの分離が不可能であった．ディルドリンは 2％DEGS-0.5％H_3PO_4 では0.017～0.065 ng，5％シリコン QF-1では0.0044～0.026 ng の間で直線回帰が得られた．ディルドリンの ECD-GC による検出限界は 5.45×10^{-4}ng であった．

添加回収実験 添加回収実験の回収率が良い値を示すからといって，羊毛に加工されたディルドリンの抽出率が良いと断言できないが，ソックスレー抽出器を用いたメタノール抽出法の妥当性を検討するため，加工布K-1を用いて添加回収実験を行なった結果，96.5％の回収率を示した．

結　論

繊維製品中のディルドリンの定量法に関する厚生省試

Table 2. Effect of Extraction (Sample K-2)

solvent	extraction method	number of extraction				total
		1	2	3	4	
Acetone・MeOH(1:1)	reflux, 70°, 30min	41.2	1.88	0.32	0.11ppm	43.51ppm
MeOH	Soxhlet, 80°, 3hr	43.8	0	0	0	43.8

Table 3. Coefficient of Variation (C.V.) of Three Methods (Sample K-1)

solvent	extraction method	Dieldrin(ppm)	standard deviation	C.V.(%)
Acetone・MeOH(1:1)	reflux, 70°, 30min	15.26	0.357	2.34
MeOH	Soxhlet, 80°, 3hr	22.97	0.526	2.29
0.5N KOH・EtOH	alkali decomposition, 1hr transfer to Petroleum Ether	20.26	0.616	3.04

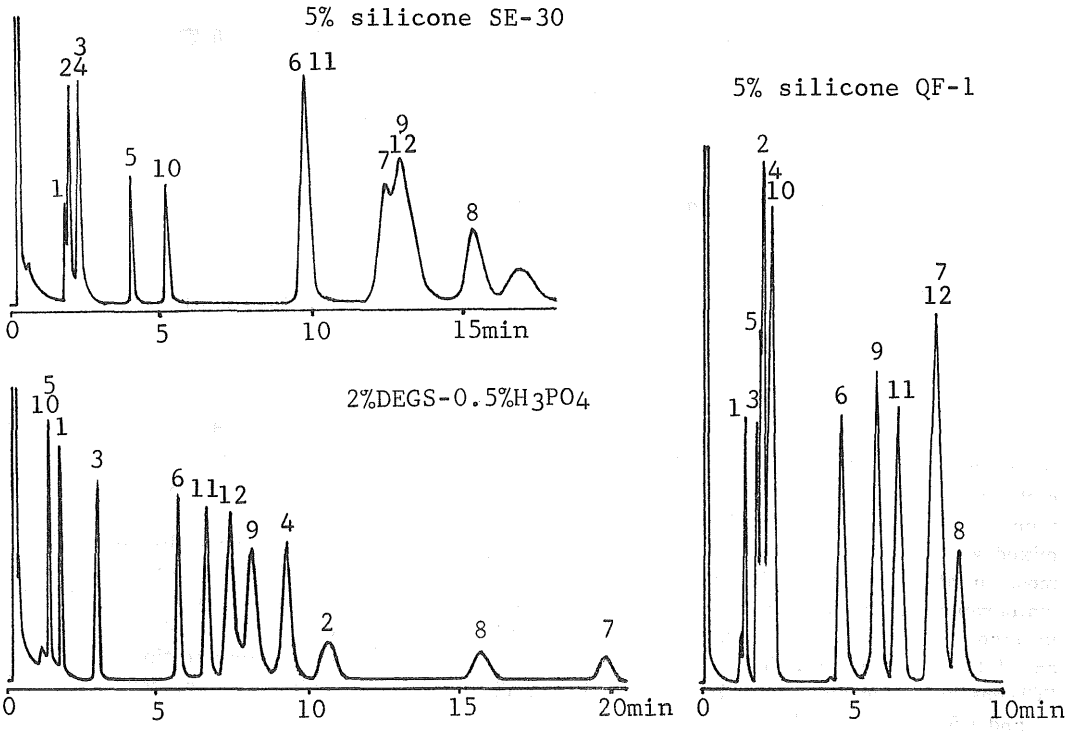


Fig. 1. Gas-Chromatograms of Dieldrin and Organochlorine Pesticides
1 : α-BHC, 2 : β-BHC, 3 : γ-BHC, 4 : δ-BHC, 5 : Heptachlor, 6 : p,p′-DDE, 7 : p,p′-DDD, 8 : p,p′-DDT, 9 : o,p′-DDT, 10 : Aldrin, 11 : Dieldrin, 12 : Endrin

案について検討した結果，より精度を高めるためには，つぎの3項目の条件が適当であると認められた．

1) 抽出　ソックスレー抽出器によるメタノール抽出．

2) 精製　フロリジルは130°，18時間活性化し，溶出溶媒として15%エーテル・n-ヘキサン溶液を用いる．

3) ガスクロマトグラフィーの条件　カラム充てん剤として，2%DEGS-0.5%H_3PO_4 または5%シリコンQF-1を用い，その他は実験の部・定量による．

謝辞　本研究にあたり，加工布および原毛等の入手に協力された衛生局薬務部薬事衛生課指導第二係の方々，実験に協力された三木一女氏に深謝いたします．

文　献

1) 吉原武俊, 奥本千代美, 福士真知子：東京衛研年報, **24**, 117, 1972
2) 吉原武俊, 奥本千代美, 寺島　潔 ら：*ibid.*, **25**, 103, 1974
3) Lipson, L. and J. R. McPhee: *Textile Research Journal*, **28**, 679, 1958
4) 奥　正己：化学, **13**, 317, 1956
5) 山本行常：*ibid.*, **22**, 31, 1967
6) 大槻久美子, 関田　寛, 武田由比子ら：衛生試報, **89**, 34, 1971
7) Thompson, J. F., A. C. Walker, and R. F. Moseman: *Journal of The AOAC*, **52**, 1263, 1969
8) Wincke, W.W. and J.A. Burke: *ibid.*, **52**, 1277, 1971
9) Gabica, J., M. Watoson, and W.W. Benson: *ibid.*, **57**, 173, 1974
10) Windham, E.S.: *ibid.*, **52**, 1237, 1971
11) Masaki U., S. Taue, and T. Nishimoto: *J. Food Hyg. Soc.*, **11**, 256, 1970
12) 伊藤誉志男, 大槻久美子, 関田　寛ら：衛生試報, **89**, 43, 1971
13) 皆川興栄, 森　量夫, 堺　敬一ら：食衛誌, **13**, 317, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 100—105, 1976

魚介類中のフタル酸エステルのガスクロマトグラフィーによる微量定量法

植田忠彦*, 山添律子*, 森謙一郎*, 鈴木助治*
西田茂一*, 戸谷哲也*

Gas Chromatographic Determination of Low Levels of Phthalic Acid Esters in Fish

TADAHIKO UETA*, RITSUKO YAMAZOE*, KENICHIRO MORI*,
SUKEJI SUZUKI*, SHIGEKAZU NISHIDA* and TETSUYA TOTANI*

Studies were made to develop an appropriate procedure for detection and determination of dibutyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in fish meat. When fresh Akōdai (Red rock cod) meat incorporated with 4μg/20g of DBP and DEHP was used for the experiments, it was found that the extraction made three times with 10m*l* of ether-hexane (1 : 4) after the sample was mixed with 10m*l* of 12N H_2SO_4 is likely to be the most effective one. It was also found that the most suitable clean-up of the extract can be made by the Florisil and Aluminium oxide column chromatography, after the concentration of the extract by the use of rotary evaporator. By this clean-up step, DBP and DEHP could be separated effectively from polychlorinated biphenyls, pesticides and fat in the extract. The recoveries of DBP and DEHP in the final preparation tested by the ECD-gaschromatography were 70.2% for DBP and 87.9% for DEHP with standard deviations of 6.63 % and 4.59% respectively.

緒　言

1970年頃よりフタル酸エステル（以下 PAE と略す）による環境汚染が問題にされ始めて以来，その毒性，代謝等 PAE の安全性に関する研究が各方面において実施され，これらは大場らの総説[1] で紹介されているところである．

一方これらの安全性に関する研究と並行して医療用器具，容器包装材料ならびに環境試料中の PAE の分析法についても研究が行なわれ，種々の特徴ある方法[2-6] が報告されている．これらの分析法の中で魚介類，肉類中の微量の PAE の分析については，試料からの抽出法ならびに同時に抽出される脂質との分離，精製法の二つの問題が十分解決されているとはいえない．

そこで今回，抽出法とクリーンアップを中心に魚介類中の微量フタル酸エステル（主にジブチルフタレート，ジエチルヘキシルフタレート）の電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー（以下 ECD—GC と略す）による分析法について検討したので報告する．

実験方法

試薬

(1)ヘキサン：特級品に水酸化カリウム粒を加え，Widmer 精留塔を用いて蒸留し，さらに1回ゆっくり蒸留したものを用いる．

(2)メタノール，エタノール，アセトン，エチルエーテル：メタノール，エタノールには酸化カルシウム，アセトンには炭酸カリウム，エチルエーテルには水酸化カリウムを加え Widmer 精留塔を用いて 1回ゆっくり蒸留したものを用いる．

(3)水：500 m*l* の蒸留水をヘキサン 100 m*l* を用いて2回洗浄したのち使用する．

(4)塩酸および12N硫酸：(3)と同様に処理する．

(5)無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用硫酸ナトリウムをアセトンおよびヘキサンで洗浄したのち140° で24時間乾燥した．この10gのヘキサン 5 m*l* 洗液は EDC-GC により妨害ピークを持たないことを確認する．

(6)フロリジル：Floridin 社製フロリジル（60—100メッシュ）を600°，20時間および140°，24時間それぞれ加熱活性化し，デシケータ中に保存して用いる．

(7)アルミナ：Merck 社製 Aluminiumoxid aktiv sauer を 140°，20 時間加熱活性化し，デシケータ中に保

* 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

存して用いる.

(8)Sephadex LH—20: Pharmacia Fine Chemicals 社製のものをそのまま用いる.

(9)Amberlite XAD—7: オルガノK.K.製のものをソックスレーを用い，アセトン，エタノールおよびヘキサンで洗浄して用いる.

(10)オリーブ油：東豊薬品 K.K. 製（日本薬局方）のものを用いる.

(11)フタル酸エステル標準液—①ヘキサン溶液：東京化成K.K.製ジブチルフタレート（以下 DBP と略す）およびジエチルヘキシルフタレート（以下 DEHP と略す）各100 mg をヘキサンに溶かして 100.0 m*l* とし標準原液とする．これをヘキサンで希釈して標準溶液を調製する．②エタノール溶液：①と同様にしてエタノール溶液を調製し，この溶液は添加回収試験に供する.

装置

(1)ガスクロマトグラフ：島津 GC—5A 型電子捕獲型検出器付，^{63}Ni, ①カラム：1.5% OV—17＋1.95% QF—1（uniport KS, 100—120メッシュ）3mm×1.0 m（ガラス製），②温度：カラム210°，注入口250°，検出器240°，③キャリヤーガス：窒素50m*l*/min，④注入量：5 μl

(2)ガスクロマトグラフ質量分析計：LKB—9000（島津）①カラム：前項①に同じ（3 mm×1.0）②温度：カラム225°，注入口250°，セパレーター 280°，イオン源 290°，③イオン化電圧：20eV ④スリット：0.1mm, 0.3 mm

(3)ロータリーエバポレーター：石井製，KM—I 型

(4)Kuderna—Danish 濃縮器（以下KD濃縮器と略す）

操作方法

(1)抽出：魚肉の可食部をホモジナイズし，その20g を 50 m*l* 遠沈管にとり，12N硫酸 10 m*l* を加えたのちガラス棒を用いて十分に試料をほぐす．これにエーテル・ヘキサン（1：4）10 m*l* を加え5分間激しく振とう抽出後，1,500～2,000 rpm で5分間遠心分離し，エーテル・ヘキサン層を 100 m*l* ビーカにとる．さらにエーテル・ヘキサン溶液 10 m*l* を用いて2回同様にして抽出を行なったのち前液と合する.

次にエーテル・ヘキサン抽出溶液は無水硫酸ナトリウム約5g を用いて脱水後，100 m*l* のナス型フラスコに移し，ロータリーエバポレーター（以下R.E.と略す）を用いて溶媒を十分に除去しこの抽出脂肪を次のクリーンアップ操作に供する.

(2)クリーンアップ—（I）：600° で20時間活性化したフロリジル3g を 1×20 cm のガラスカラムにヘキサンを用いて詰め，その上に無水硫酸ナトリウム0.5—1gを積層する.

前項のフラスコ中の抽出脂肪に約2 m*l* のヘキサンを加えて溶かし，調製したフロリジルカラムにのせ，その液を流す．さらにヘキサン2 m*l* ずつを用いて2回同様にして洗い込んだのち，ヘキサン 50 m*l*，エーテル・ヘキサン（1：19）50 m*l*，エーテル 40 m*l* を用いてカラムクロマトグラフィーを行なう．このときの流出速度は1～2滴/sec とする.

DBP および DEHP はエーテル画分に溶出するのでこの画分の溶媒をR.E.を用いて除去し，残留物について次のクリーンアップを行なう.

(3)クリーンアップ—（II）：140° で20時間活性化したアルミナ3g を 1×20 cmのガラスカラムにヘキサンを用いて詰め，(2)と同様に無水硫酸ナトリウムを積層する．前項(2)の残留物をヘキサンを用いて同様にして洗い込んだのち，ヘキサン 10 m*l*，エーテル・ヘキサン（3：7）50 m*l*，エーテル・ヘキサン（1：1）40 m*l* を用いてカラムクロマトグラフィーを行なう．この時の流出速度は（I）と同様1—2滴/sec とする.

DPB およびDEHP の溶出するエーテル・ヘキサン（3：7）および（1：1）画分を集め，R.E.を用いて溶媒を除去する.

このときクリーンアップ後の残留物は乾固した状態で放置することなく，直ちに 10.0 m*l* のヘキサンを加え，ガスクロマトグラフィー用試験溶液とする.

(4)定量法：フタル酸エステルのヘキサン標準溶液より，ヘキサンを用いて 0.05 μg/m*l*—0.5μg/m*l* の濃度の標準溶液を調製する．これを用いてガスクロマトグラフィーを行ない，保持時間とピーク高より検量線を作成する．試験溶液を同様に操作し，この検量線よりフタル酸エステル含有量を求める.

結果および考察

溶媒の濃縮法 微量の PAE の定量を行なう場合，使用する溶媒の精製および器具の浄化が必要であるが，試験室の雰囲気中から PAE の混入による妨害も当然考慮しなければならない．特に DBP および DEHP の中で蒸気圧の高い DBP の妨害が予想される．このためR.E.，KD濃縮器および窒素通気法を用いて，ヘキサン50 m*l* に DBP, DEHP 各4 μg を添加し，これの回収率試験を行なったところ DBP, DEHP 共に 100% であり，またブランク値は DBP において R.E. 0.03μg, K.D.濃縮器 0.05 μg，窒素通気法 0.02 μg であった．これらはGC—MS（フラグメントグラフィー）によっても確認

された．これらのブランク値は本試験法における定量限界濃度の1/3以下の濃度となるためいずれの方法も使用可能であるが，操作の簡便さおよびブランク値の比較的低いR.E.法を採用した．

クリーンアップ 脂肪含有量の高い食品中のPAEの定量に当っては，まず問題となるのが抽出試料中の脂肪とPAEの分離であろう．特にECD—GCを用いる場合この処理が十分行なわれていない状態では定量操作は困難である．

すでにECD—GCによるPAEの定量法が種々報告されているが，この中で食品の油脂試料中に移行したPAEのクリーンアップ法としてはアセトニトリル・ヘキサン分配によって油脂の大部分を除去したのち，フロリジルカラムクロマトグラフィーあるいは濃硫酸処理による有機塩素系化合物等の妨害物質との分離法の組合せが主である．これらの方法は回収率および操作の煩雑さ等，PAEの分析法として若干の問題が残されている．

又Stalling[7]らが農薬のクリーンアップに用いているゲルろ過クロマトグラフィーは脂肪の除去法として注目すべき方法と思われるが装置の面で問題が残る．Sephadex LH—20 (20g) を用いた自然流下による方法について検討したところ溶媒をエタノール・ヘキサン (1:1) とすることにより比較的脂肪とPAEの良い分離を示したが十分とはいえず，又長時間を要するため適当な方法とはいえない．一方合成吸着剤であるAmberlite XAD—7カラムクロマトグラフィーを用いた脂肪とPAEの分離操作では脂肪が多量に共存する場合担体がその影響を受け，再現性の良い結果は得られなかった．

そこで今回，アセトニトリル・ヘキサン分配を行なうことなくクリーンアップの目的を達成する方法として，フロリジルを用いたカラムクロマトグラフィーについて検討した．試料としては抽出魚油とオリーブ油がこの操作中良く似た挙動を示すため，オリーブ油1gを用いDBP, DEHP各4.0 μg，KC—300 0.5 μgおよびγ-BHC, Aldrine, pp′—DDT, pp′—DDE各0.2 μgをそれに添加し，ヘキサン約4 ml溶液として以下の操作を行なった．

先ず (i) 140° 24時間活性化したフロリジルを用い，2×30cmカラム（フロリジル10g）を調製し，展開溶媒としてヘキサン80 ml，エーテル・ヘキサン (1:3) 100 ml，エーテル80 mlによりクロマトグラフィーを行なった．又 (ii) 600° 20時間活性化したフロリジルを用い，1×20cmカラム（フロリジル3g）を調製し，展開溶媒としてヘキサン50 ml，エーテル・ヘキサン (1:19) 50 ml，エーテル40 mlによりクロマトグラフィーを行なったところいずれも良好な分離を示した．従って使用する吸着剤，溶媒の量の少ない (iii) を用いることとした．このときDBP, DEHPはFig. 1に示すごとくエーテル画分に溶出する．

しかしこのフロリジルによるクリーンアップ— (I) のみではECD—GCによる定量のためには不十分であるため，さらに140° 20時間活性化したアルミナを用い1×20cm（アルミナ3g），展開溶媒としてヘキサン10 ml，エーテル・ヘキサン (3:7) 50 ml，エーテル・ヘ

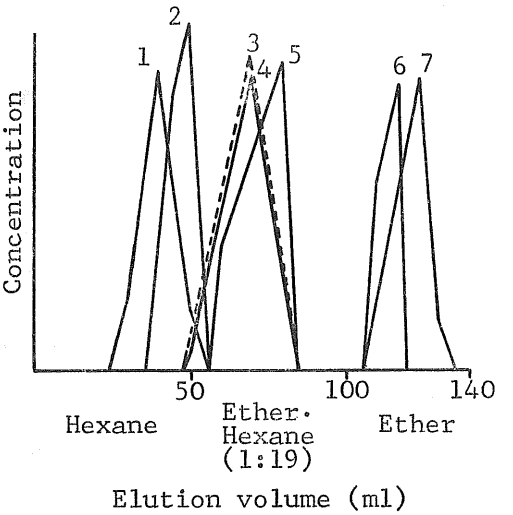


Fig. 1. Separations of DBP and DEHP from PCB and Pesticides with Florisil Column
1: Aldrine, 2: γ-BHC, 3: KC-300, 4: pp′-DDE, 5: pp′-DDT, 6: DEHP, 7: DBP

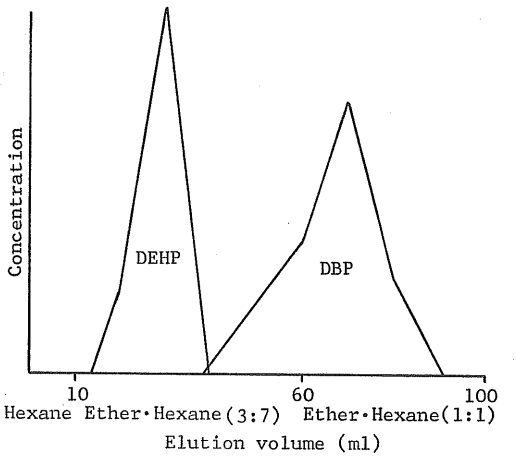


Fig. 2. Elution of DBP and DEHP with Aluminium oxide Column

Table 1. Recovery of DBP and DEHP added to Olive Oil

No.	Added DBP (μg/g)	Added DEHP (μg/g)	Found DBP (μg)	Found DEHP (μg)	Recovery DBP (%)	Recovery DEHP (%)
1	4.0	4.0	3.32	4.12	83.0	103.0
2	4.0	4.0	2.92	3.94	73.1	98.4
3	4.0	4.0	3.08	4.06	76.9	101.6
4	4.0	4.0	2.84	3.68	71.1	92.1
5	4.0	4.0	3.18	4.11	79.4	102.7

	DBP	DEHP
$\bar{x}$ [a]	76.7%	99.6%
SD[b]	4.84%	4.59%

Note: Cleanup was made by Florisil and Aluminium oxide (Sauer) column chromatography
a) Average
b) Standard deviation

Table 2. Comparisons of Extraction Methods for the Recovery of DBP and DEHP from Fresh Meat of Akōdai (Red rock cod)

Extraction method	Sample amount(g)	Fat (mg)	Added DBP(μg)	Added DEHP(μg)	Recovery DBP(%)	Recovery DEHP(%)
1)[a]	20	244	4.0	4.0	70.2	87.9
2)[b]	20	351	4.0	4.0	59.1	71.5
3)	20	903	4.0	4.0	41.1	91.7
4)	20	231	4.0	4.0	48.7	34.7
5)	20	264	4.0	4.0	48.4	48.8
6)	20	458	4.0	4.0	38.7	64.7
7)	20	289	4.0	4.0	36.8	56.0

Note: 1). Extraction with ether-hexane (1:4) from sample mixed with 10m*l* of 12N H_2SO_4 2). Ether-hexane (1:4) 10m*l* of 12N HCl 3). Methanol-chloroform (1:2) 4). Hexane, 10m*l* of 12N H_2SO_4, 2 hours of refluxing 5). Methanol-hexane (1:2), 2 hours of refluxing 6). Acetone-hexane (1:2), 2 hours of refluxing 7). Hexane, 2 hours of refluxing
a) Mean value of 5 experiments
b) Mean value of 2 experiments

キサン（1:1）40 m*l* によりクリーンアップ—(II)を行なった結果，妨害物質はほぼ完全に除去できた．このとき DBP, DEHP は Fig. 2 に示すごとくエーテル・ヘキサン（3:7）および（1:1）画分に溶出する．

そこでクリーンアップ—（I）および（II）を用いてクリーンアップの回収率試験を行なったところ Table 1 に示すとおり良好な結果が得られたので以後この方法に従って行なった．

抽出法 魚介類中の PAE の抽出は一般に脂肪の抽出法が適用されている．しかしこれらの試料は含水量が多いため，ソックスレー抽出に際して試料の乾燥または無水硫酸ナトリウム等による前処理が必要でありかつ操作中の汚染等も問題となり適当でない．そこで試料の脱水等の前処理をすることなく行なえる抽出法について検討した．

試料は比較的含有脂肪の多いアコウダイの可食部をホモジナイズしたものを用いた．試料採取量はいずれも 20g とし，添加試験については DBP, DEHP エタノール標準溶液をエタノールを用いて希釈し，2 μg/m*l* の添加用溶液を調製したのち，その 2.0 m*l* を各試料に添加し，冷凍庫に一夜保存したものを用いた．

これらの試料を用い以下 1)—7) の各抽出法について検討した．

1)操作方法の抽出の項に準じて行なった．2) 前項 1) と同様の操作を 12N 塩酸々性で行なった．3)メタノール・クロロホルム（1:2）25 m*l* を用いて抽出を行なった[8]．4) 12N 硫酸 10 m*l* を加えたのち，ヘキサン 20 m*l* を用いて 2 時間水浴上で加熱還流抽出した．5) メタノール・ヘキサン（1:2）20 m*l* を加えて水浴上で 2 時間加熱還流抽出した．6) アセトン・ヘキサン（1:2）20 m*l* を加え，水浴上で 2 時間加熱還流抽出した．7) ヘキサン 20m*l* を加え，水浴上で 2 時間加熱還流抽出した[9]．

4)—7)は還流後ガラスフィルター（G—2）によりろ過したところ，ろ過後水分が共存するためヘキサン層を分取したのち，さらに水層をエーテル・ヘキサン（1:4）10 m*l* で 2 回振とう抽出した．

これらの結果は Table 2 に示すとおりであるが脂肪抽出量と PAE の回収率に相関関係は認められなかった．

これらの抽出法の中で1)—3)は3回抽出操作を行なうのに対し，4)—7)は1回の還流抽出のみであるため低回収率となったものと思われる．いずれの場合も試料のホモジネートは十分であっても抽出条件によっては試料が塊状となり十分ほぐれない場合には良い回収率は得られない．これらのことより2)の場合低濃度の塩酸を用いること，また3)のDBPについては還流抽出法を用いることなどにより，それぞれ回収率の向上が予想される．また4)—7)はPAEを抽出する方法としては必ずしも適当ではなく，従って1)が他の方法と比較してDBPおよびDEHBの抽出率についても良好であるため今回1)の方法を用いることとした．

さらにこの時の硫酸濃度の抽出率におよぼす影響について0—9 Nの各濃度溶液を用いDBP, DEHP各4.0 μg を添加し，エーテル・ヘキサン10 m*l* で3回抽出した結果を Table 3 に示す．これにより，この硫酸濃度の範囲では DBP, DEHP の回収率に影響を与えないことが分った．

添加回収率 以上検討を行なった本定量法に基づいて，試料にアコウダイを用い，DBP, DEHP 各4.0 μg を添加した場合の添加回収率およびガスクロマトグラムを Table 4, Fig. 3 に示す．

この DBP, DEHP の回収率および標準偏差は各70.2%，6.63%および87.9%，4.59%と PAE の分析法としてはほぼ満足できる結果が得られ，本法を用いることによって魚中の微量の DBP および DEHP の同時定量が可能となった．

ブランク値 先に述べたように DBP は溶媒や濃縮操作によるブランク値が認められるため本試験法の空試験を行なったところ，DEHP は検出されないが DBP は 0.05 ppm の波高で検出された．したがって実際試料に本法を適用するに当っては特に DBP のブランク値について考慮する必要がある．

そこで本試験法の検出限界は DBP においてはその点を考慮すると 0.07 ppm, DEHP については 0.05 ppm である．なお標準溶液（DBP, DEHP 各4.0 μg）を用いた時の本試験法による添加回収率は DBP, DEHP 各

Table 3. Effect of Concentration of Sulfuric Acid on Recovery of DBP and DEHP

	Volume (m*l*)	Added DBP (μg)	Added DEHP (μg)	Recovery DBP (%)	Recovery DEHP (%)
Aqua	26	4.0	4.0	96.6	98.8
1N-H_2SO_4	26	4.0	4.0	90.9	98.8
2N-H_2SO_4	26	4.0	4.0	90.9	96.3
3N-H_2SO_4	26	4.0	4.0	88.9	91.4
5N-H_2SO_4	26	4.0	4.0	87.2	95.1
7N-H_2SO_4	26	4.0	4.0	88.7	95.3
9N-H_2SO_4	26	4.0	4.0	90.6	98.8

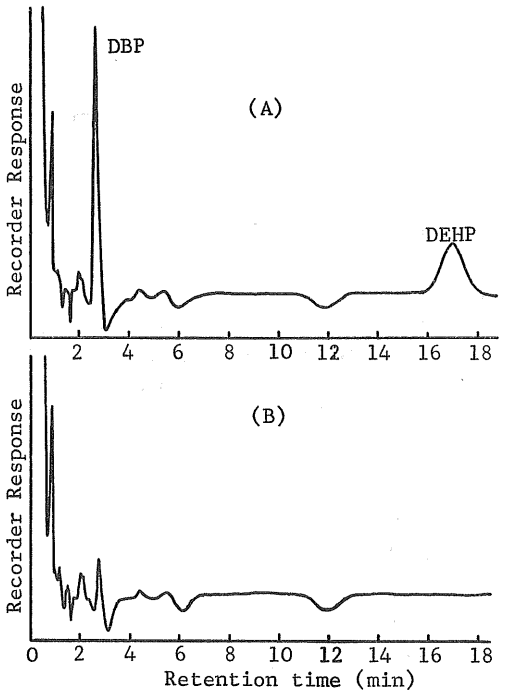


Fig. 3. Gas Chromatograms of the Akōdai (Red rock cod) Extracts : (A) with 4μg of DBP and DEHP, (B) without DBP and DEHP

Table 4. Recovery of DBP and DEHP from Fresh Meat of Akōdai (Red rock cod)

No.	Added DBP (μg)	Added DEHP (μg)	Found DBP (μg)	Found DEHP (μg)	Recovery DBP (%)	Recovery DEHP (%)
1	4.0	4.0	2.46	3.28	61.5	82.0
2	4.0	4.0	2.72	3.73	68.0	93.3
3	4.0	4.0	2.96	3.67	74.0	91.8
4	4.0	4.0	3.16	3.45	79.0	86.3
5	4.0	4.0	2.73	3.45	68.3	86.3

	DBP	DEHP
$\bar{x}$ a)	70.2%	87.9%
SD b)	6.63%	4.59%

a) Average b) Standard deviation

78.4%および100%であった.

結　論

魚介類中の DBP および DEHP の ECD—GC による同時微量定量法について検討し，つぎの結果を得た.

(1)溶媒の濃縮はロータリーエバポレーターを用いることにより，回収率良く，かつ好能率に行なうことができた.

(2)抽出法は12N硫酸 10m*l* を加え，エーテル・ヘキサン（1：4）で抽出，遠心分離する方法が良好であった.

(3)クリーンアップとしてはフロリジル（3 g, 1×20 cm）およびアルミナ（3 g, 1×20cm）カラムクロマトグラフィーを行なった．この操作によって DPB, DEHP は脂肪，PCB，農薬等の定量妨害物質と分離されECD—GC による定量が可能となった.

(4)オリーブ油 1 g に DBP および DEHP 各 4.0 μg を添加した場合のクリーンアップの回収率は76.7%および99.6%，標準偏差は各4.84%，4.59%であった.

(5)魚肉に対する DBP および DEHP の添加回収率は70.2%および87.9%，標準偏差は各6.63%，4.59%であった.

(6)本試験法の検出限界は DBP 0.07 ppm，DEHP 0.05 ppmであった.

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「フタル酸エステルの安全性の評価に関する研究」として実施されたものである.）

文　献

1) 大場琢磨，大森義仁，出羽　刀，小田嶋成和ら：衛生試験所報告，91，1，1975
2) 大場琢磨，伊東　宏，水町彰吾：*ibid.*，91，1，1973
3) 片瀬隆雄，半谷高久：工業用水，173，23，1973
4) Thomas, G.H.: *Environment Health Perspectives* 3, 23, 1973
5) Stalling, D.L., J.W. Hogan, and J.L. Johnson: *ibid.*, 3, 159, 1973
6) 斎藤行生，武田明治，内山　充：日本食品衛生学会講演要旨集　34，1975
7) Stalling D.L., R.C. Tindle, and J.L. Johnson: *J. of the AOAC*, 55, 32, 1972
8) Southgate, D.L.: *J. Sci. Food Agric.*, 22, 590, 1971
9) 児玉剛則，高井義治：公害と対策，10，850，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 106—111, 1976

香料成分の分析に関する研究（第1報）
食品中のバニリン，クマリンのガスクロマトグラフィーによる定量法

観　照雄*，鎌田国広*，森　謙一郎*，中村義昭*
植田忠彦*，戸谷哲也*

Studies on the Analysis of Perfume Constituent (I)
Gas-Liquid Chromatographic Quantitative Determination of Vanillin and Coumarin in Foods

TERUO KAN*, KUNIHIRO KAMATA*, KENICHIRO MORI*,
YOSHIAKI NAKAMURA*, TADAHIKO UETA* and TETSUYA TOTANI*

Gas chromatographic method for the determination of vanillin and coumarin in foods was investigated. The procedure established were as follows: vanillin and coumarin were extracted with dichloromethane from the sample refluxed with diluted sulfuric acid and ethanol. The extract was passed through a Florisil column and eluted with methyl formate, which was then concentrated. The vanillin and coumarin were determined by gas-liquid chromatography equipped with 2% OV-210 column and a hydrogen flame ionization detector.

This method had been used for chocolate, biscuit, ice cream, powder cocoa, caramel and Tonka beans. The average recovery of vanillin and coumarin added to the food were 94.6 and 90.2%, respectively. The detection limits of vanillin and coumarin were 0.12μg and 0.05μg.

緒　言

従来からバニリンおよびクマリンは調合香料として広く使用されていたが，クマリンおよびその誘導体の毒性実験から安全性に疑問が生じたため，昭和46年2月26日厚生省告示第39号によって食品添加物から削除された[1]．現在，バニリンまたはクマリン個々の分析法については吸光度測定法[2,3]，薄層クロマトグラフィー[4,5]，ガスクロマトグラフィー[6,7]など多数報告されているが，天然香料等を用いる着香によってクマリンの食品中への混入が考えられるため，食品中のバニリン，クマリンを同時分析するガスクロマトグラフィーを用いる分析方法について検討し，満足すべき結果が得られたので報告する．

実験方法

1. **試薬** i) バニリン標準溶液：バニリン（東京化成，mp 80°—81°）100.0 mg をはかり，エタノールに溶かし正確に 200 m*l* とする．

ii) クマリン標準溶液：クマリン（東京化成，mp 68°—70°）100.0 mg をはかり，エタノールに溶かし正確に 200 m*l* とする．

iii) 内部標準溶液：p-ターフェニル(東京化成)100.0 mg をはかり，エタノールに溶かし正確に 100 m*l* とする．

iv) フロリジル：フロリジル（合成ケイ酸マグネシウム）60—100メッシュ（和光純薬）130° で5時間乾燥し，デシケータ中に保存する．

v) シリカゲルFM薄層：ワコーゲルB—5FM(和光純薬）を常法に従い調製し，105°，30分間活性化する．

vi) 水酸化カリウム・メタノール溶液：水酸化カリウム5 g をメタノールに溶かし 100 m*l* とする．

vii) その他：試薬はすべて特級品を用いる．

2. **装置** i) ガスクロマトグラフ：島津製 GC-5A 型，水素炎イオン化型検出器付を使用する．

ii) Kuderna—Danish（以下KDと略す）濃縮器

3. **操作法**

3.1 **試験溶液の調製** ①抽出：試料の一定量（バニリ

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24--1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ン 200 μg, クマリン 100 μg 以上を含むもので通常は 1.0—20.0 g) を200 m*l* フラスコにとり, 20 %硫酸 4 m*l*, エタノール 25 m*l* を加え, 還流冷却器をつけて水浴上で1時間加熱する. 放冷後, 沈殿物がある場合はガラスろ過器 (No. 3 G) で吸引ろ過し, 沈殿物をエタノール 25 m*l* を用いて洗ったのち, 洗液とろ液を分液ロートに移す. ただし沈殿物がないときはそのまま分液ロートに移す. この液に塩化ナトリウム 50 g, 水 300m*l*, およびジクロルメタン 100 m*l* を加え, 5分間振り混ぜ, 静置してジクロルメタン層を分取する. 水層はさらにジクロルメタン 50 m*l* ずつで2回抽出する操作を繰り返す. 全ジクロルメタン層を合わせ水 100 m*l* で洗い, 無水硫酸ナトリウムで脱水したのち, KD濃縮器に移し, n-ノナン 0.8 m*l* を加えたのち, 減圧下 50° 以下で約 2 m*l* になるまで濃縮し抽出液とする.

②フロリジルカラム柱の調製：つぎに内径 1 cm, 長さ 30 cm のコック付ガラスカラムにフロリジル 7 g を n-ヘキサンに懸濁させ, カラム管に気泡が生じないように注意して流し込み, フロリジルをつめる. この上に無水硫酸ナトリウム 1 g を n-ヘキサンと共に加え層積させフロリジルカラム柱を調製する.

③クリーンアップ：フロリジルカラム柱にさきに得た抽出液を静かに加え, さらに濃縮管を少量の n-ヘキサンで洗い, この洗液をカラム柱に加えたのち, カラム柱の上層の液がほとんどなくなるまで流出させる. つぎに油分などの妨害物質を除くために n-ヘキサン 100 m*l* を用い 2 m*l*/min の流速で洗ったのち, 同じ流速でギ酸メチルを気泡が生じないように注意して流し, 100m*l* の溶出液をあつめる. この溶出液を KD 濃縮器に移し, n-ノナン 0.8 m*l* を加えたのち水流ポンプを用いて減圧とし, 50° 以下で約 3 m*l* になるまで濃縮後, エタノールを加えて正確に 5 m*l* とし, これを試験溶液とする.

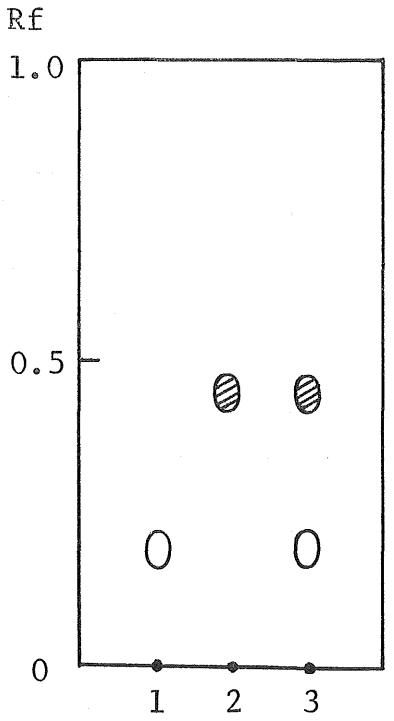


Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of Vanillin and Coumarin
1: Vanillin
2: Coumarin
3: Separation of 1+2

3.2 薄層クロマトグラフィーによる定性 シリカゲル FM薄層の下端から 2.5 cm の位置を原点とし, 試験溶液およびバニリン, クマリン標準溶液 2—10 μ*l* をそれぞれ約 1 cm の間隔をおいて塗布する. 風乾したのち石油エーテル・酢酸エチル (2：1) を展開溶媒とし上昇法で 10 cm 展開する. 展開終了後, 風乾し, 水酸化カリウム・メタノール溶液を噴霧したのち, 100°, 30分間加熱を行なう. 冷後紫外線 (365nm) 照射下でスポットを観察し, 試験溶液のスポットの色調および Rf 値をバニリン, クマリン標準溶液のそれと比較して判定する. Fig. 1 にバニリンおよびクマリンの薄層クロマトグラムを示す.

3.3 ガスクロマトグラフィーによる定性および定量

試験溶液 2 m*l* をとり, これに内部標準溶液 0.5 m*l* を加えてガスクロマトグラフィー試験溶液とする.

ガスクロマトグラフィー測定条件

カラム：2 % Silicone OV—210 Chromosorb W AW DMCS 60—80メッシュ, 3 mm×2 m ガラスカラム, 温度 170°, 検出器：水素炎イオン化型検出器, 水素 50 m*l*/min, 空気 1.2 liter/min, 温度 120°, キャリヤーガス：窒素 60 m*l*/min, 試料注入部温度：210°, 感度：8×10^2

①定性：バニリンおよびクマリン標準溶液を別々に 2 m*l* とり, それぞれに内部標準溶液 0.5 m*l* を加えた溶液 5 μ*l* を測定条件に従いガスクロマトグラフィーを行ない, 得られたガスクロマトグラムよりバニリン, クマリン, 内部標準物質のピークの保持時間を測定し, 内部標準物質との相対保持時間を求める. 試験溶液 5 μ*l* をとり, 同様にガスクロマトグラフィーを行ない, 得られたピークの相対保持時間を求め, 標準溶液のそれと比較して定性を行なう.

②定量：試験溶液 5 μ*l* をとり, 以下③検量線の作成の項に従いガスクロマトグラフィーを行なう. バニリン

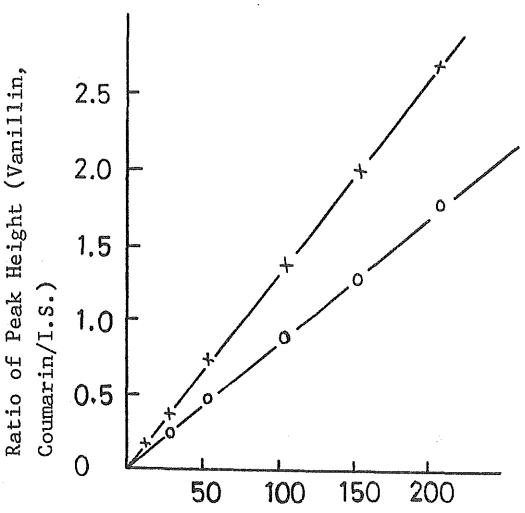


Fig. 2. Calibration Carves of Vanillin and Coumarin
○——○ : Vanillin
×——× : Coumarin

およびクマリンの各ピークの高さと内部標準物質とのピーク高比より検量線によってバニリン，クマリンの濃度を求め，試料中の含有量を算出する．

③検量線の作成：内部標準溶液 0.5 m*l* にエタノールで各濃度に希釈したバニリンおよびクマリンのそれぞれの標準溶液 2 m*l* を加える．このとき 1 m*l* あたりバニリン25，50，100，150，200 μg クマリン10，50，100，150，200 μg 含む標準系列をつくり，測定条件に従って操作しガスクロマトグラフィーを行なう．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それぞれの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成する．検量線を Fig. 2 に示す．

結果および考察

1. 抽出溶媒の選択 試料からバニリンを抽出する方法として，衛生試験法[8] ではエタノール中で加熱し溶媒抽出する方法が用いられている．A.O.A.C.[2] では室温において硫酸酸性で溶媒抽出法がとられ，Schlack[9] らも同様の方法を報告している．そこで本法では試料を希硫酸とエタノール中で加温したのち溶媒抽出する方法を用いることとした．そしてバニリン，クマリンのいずれに対しても効率よく同時に抽出できる至適溶媒について検討した．

バニリン，クマリン標準溶液の各 1 m*l* をとり，20% 硫酸 4 m*l*，エタノール 25 m*l* を加えて 1 時間還流する．冷後，塩化ナトリウム 50 g，水 300 m*l* を加え，溶媒100，50，50 m*l* で 3 回抽出し，KD 濃縮器で濃縮したのち，内部標準溶液 1 m*l* を加え，エタノールで 5 m*l* としガスクロマトグラフィーによる定量の項に従い測定し抽出率を求めた．その結果を Table 1 に示した．バニリン，クマリンを同時にほとんど完全に抽出可能な溶媒はクロロホルムとジクロルメタンであることが認められたが，沸点が低いため濃縮時間が短縮できるジクロルメタンを抽出溶媒として用いることとした．

Table 1. Effect of Various Solvents on the Extraction of Vanillin and Coumarin

Solvent	Recovery(%)	
	Vanillin	Coumarin
Benzene	32.1	68.9
Chloroform	100.8	101.5
Dichloromethane	100.0	100.0
Ether	100.0	86.3
n-Hexane	0	41.6

2. カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ 試料を分析するときのクリーンアップ条件について検討した．方法はカラムクロマトグラフィーを用いることとした．

はじめにバニリン，クマリンを同時に捕捉可能な吸着剤およびイオン交換体について実施した．吸着剤としてシリカゲル，アルミナ（酸性，中性，塩基性），フロリジル，イオン交換樹脂として Dowex 1—×4, 2—×8, Bio Rad AG 1—×8, イオン交換セルローズとして DEAE-, AE—, GC—, ECTEOLA—セルローズ（Brown社）の計12種類を使用した．それぞれをカラム管に常法に従って充塡し，バニリン，クマリン標準溶液の各 1 m*l* を注入したところ，12種すべてのカラムにおいてバニリン，クマリンが完全に捕捉されることが認められた．

つぎに油分などを除くことを目的として n-ヘキサン約 100 m*l* を 2 m*l*/min の流速で流したところ，シリカゲルカラムはバニリン，クマリン共に溶離したが，アルミナ，DEAE—など 9 種のカラムはクマリンのみを溶離し，フロリジル，Dowex 1—×4 はバニリン，クマリンのいずれも溶離しないことを見い出した．そこでこのように n-ヘキサンでクリーンアップが可能なフロリジル，Dowex 1—×4 のカラムを選びバニリン，クマリンの溶離溶媒について検討した．すなわちギ酸メチル，アセトン，酢酸エチルなど 7 種の溶媒について行ない，各溶媒 100 m*l* を流速 2 m*l*/min の割合で流してから濃縮し，ガスクロマトグラフィーによる定量の項に従い溶離量を定量した．Dowex 1—×4 のカラムではクマリン

については完全に溶離するアセトン，メタノールなどの溶媒は見い出せたが，バニリンの溶離は極めて悪く，満足すべき溶媒は見い出すことができなかった．しかしフロリジルカラムについて検討し，その結果（Table 2）ギ酸メチルによるときバニリン，クマリンの両者を定量的に溶出させることが可能になることを見い出したので以下溶離溶媒はギ酸メチルを使用することとした．

3. ガスクロマトグラフィー用カラムの選択 Furuya[6] らはクマリンのガスクロマトグラフィーに SE—30 カラム，Johansen[7] はバニリン，クマリンに対し PEG 20 M カラムを用いることを報告している．そこで分離カラムとして 5 % SE—30, 2 % OV—101, 1 % OV—17, 2 % QF—1, 2% PEG 20 M などの極性の小さいものから大きいもの 6 種について検討した．これらのカラムのうちバニリンとクマリンの分離が良く，シャープなピークを示したのは 2 % OV—210 カラムであったので以後このカラムを用いることとした．また本カラムを用いたバニリン，クマリンの検量線を作成したところ，バニリン 0.12—1.0 μg，クマリン 0.05—1.0μg に直線性を示し，再現性の良い結果が得られた．

4. バニリン，クマリンとその関連物質の分離 つぎに天然あるいは合成品として配合され，バニリン，クマリンの分析上妨害のおそれのあるこれらの関連物質につき検討した．すなわちイソバニリン，エチルバニリン，オルトエチルバニリン，6—メチルクマリン，3, 4—ジヒドロクマリン，ベラトルアルデヒド，パラヒドロキシベンズアルデヒドの 7 種について薄層クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーを実施した．

①薄層クロマトグラフィー：Copenhaver[4], Sumere[5] はバニリンまたはクマリンの同定にシリカゲル吸着剤を用いているが，すべての関連物質を同時に検出する目的から無機性混合けい光体入シリカゲル，ワコーゲル B—5 FM を用いることとした．また検出感度を増加するために発色剤として 5 % 水酸化カリウム・メタノール溶液を噴霧したのち，100°，30分間加熱し，紫外線を照射してスポットを観察する方法を用いた．

展開溶媒として 7 種類の混合溶媒について検討したが

Table 2. Effect of Various Solvents on the Elution of Vanillin and Coumarin

Solvent (100ml)	Recovery(%) Vanillin	Coumarin
Methyl formate	100	100
Ethyl acetate	0	100
Dichloromethane	4	100
Ethanol	29	100
Acetone	5	100
Ether-n-Hexane (1:1)	0	5
Tetrahydrofuran	25	80

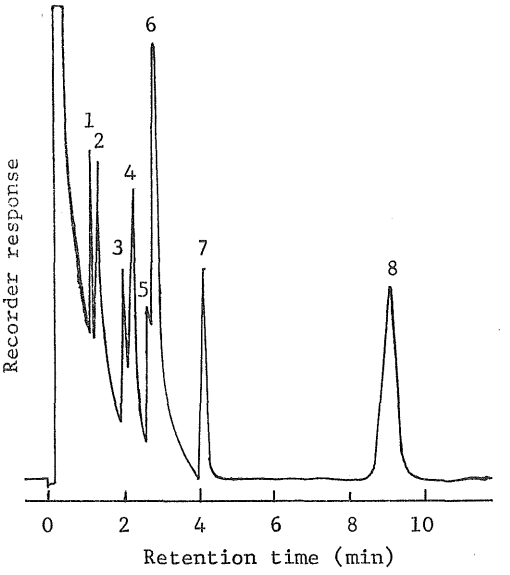


Fig. 3. Gas Chromatogram of Vanillin, Coumarin and the Related Compounds
1 : o-Ethylvanillin
2 : p-Hydroxybenzaldehyde
3 : Vanillin, 3,4-Dihydrocoumarin
4 : Veratraldehyde, Ethylvanillin
5 : Isovanillin
6 : Coumarin
7 : 6-Methylcoumarin
8 : I. S. (p-Terphenyl)

Table 3. Rf Values and Fluorescence of Vanillin, Coumarin and the Related Compounds

Compound	Rf×100	Fluor.	Compound	Rf×100	Fluor.
Vanillin	19	D. Green	Coumarin	45	D. Red
Isovanillin	19	D. Green	6-Methylcoumarin	0	D. Red
Ethylvanillin	30	D. Green	3, 4-Dihydrocoumarin	0	D. Yellow
o-Ethylvanillin	39	Brown	Veratraldehyde	24	Brown
p-Hydroxybenzaldehyde	18	Brown			

(D. = dark)

Table 4. Analytical Results of Vanillin and Coumarin in Foods

Foods		Constituent	Original (ppm)	Added (μg)	Found (ppm)	Recovery (%)
Chocolate	2g	Vanillin	161.3	500	397.9	94.6
		Coumarin	ND	500	225.5	90.2
Biscuit	10g	Vanillin	115.8	500	167.0	102.5
		Coumarin	ND	500	46.0	92.0
Ice cream	10g	Vanillin	5.4	500	55.5	100.2
		Coumarin	ND	500	45.0	90.0
Cocoa	2g	Vanillin	ND	500	250.0	100.0
		Coumarin	ND	500	225.0	90.0
Caramel	5g	Vanillin	30.0	500	130.0	100.0
		Coumarin	ND	500	97.0	97.0
Vanilla extract	1g	Vanillin	1500			
		Coumarin	ND			
Vanilla essence	1g	Vanillin	1600	Sample(Chocolate)		
		Coumarin	ND		Vanillin $\bar{x}$ =	94.6
Tonka extract	1g	Vanillin	ND		n =	6
		Coumarin	4650		CV(%) =	4.11
Vanilla beans	5g	Vanillin	36000		Coumarin $\bar{x}$ =	90.2
		Coumarin	21		n =	6
Tonka beans	5g	Vanillin	ND		CV(%) =	4.93
		Coumarin	9700			

ND=not detectable

最も分離が優れていた石油エーテル・酢酸エチル（2：1）を選んだ．本条件において行なったバニリン，クマリンおよびこれらの関連物質の Rf 値を Table 3 に示した．バニリンは暗緑色，クマリンは暗赤色のけい光を示し，おのおの 0.2 μg まで検出でき，バニリンとイソバニリン，6—メチルクマリンと 3,4—ジヒドロクマリンは分離しないが，それ以外のものについては分離した．

②ガスクロマトグラフィー：前項 3.3 の測定条件に従って行なったバニリン，クマリンおよびこれらの関連物質のガスクロマトグラムを Fig. 3 に示した．クロマトグラムは 7 ピークに分離することを認め，ピークの 3 はバニリンとジヒドロクマリン，ピークの 4 はエチルバニリンとベラトルアルデヒドが合波となった．しかし薄層クロマトグラフィーではそれぞれは分離し，個々に同定することが可能であったから薄層クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーを併用することによって，これら関連物質を完全に分離確認することができた．

5. 市販食品に対する測定結果 本法の市販食品に対する適用性を検討した．市販のチョコレート，ビスケットなどは東京都内で昭和49年 3 月に購入した．個々の添加回収試験は市販食品 1—10 g にバニリン，クマリン標準溶液各 1 ml を加えてよく混和し，上記の実験方法に従って行なった．操作を 3—6 回繰り返しその平均した定量値を Table 4 に示した．

チョコレートはバニリン 161.3 ppm 検出され，回収率は94.6%，変動係数 4.1% を示し，クマリンは検出されなかったが回収率90.2%，変動係数 4.9 % が得られた．ビスケット，アイスクリーム，ココア，キャラメルからはクマリンが検出されず，添加回収率はバニリン，クマリンともに90%以上の値を示した．バニラ豆はバニリン3.6%，クマリン 21 ppm，トンカ豆はクマリン0.97 %を検出し，これらの豆類で食品を着香した場合はクマリンの混入が懸念される．またガスクロマトグラフ—質量分析計を用いマスフラグメントグラフィーを行なって求めた定量値と本法の定量値がよく一致し，本法の測定を障害する物質の混入がないことが確認できた．

以上のことから市販食品に対しても本法が十分に適用できることを認めた．

結　論

着香された食品に含まれるバニリン，クマリンをガスクロマトグラフィーによって同時に定性ならびに定量する方法について検討し，つぎのことを明らかにした．

1) バニリン，クマリンは希硫酸，エタノールを加え 1 時間加熱還流後，塩化メチレン溶媒で完全に抽出される．2) 抽出液のクリーンアップは吸着剤をフロリジルとするカラムクロマトグラフィーを必要とする．3) 定量にはガスクロマトグラフィーを用い，OV—210 カラ

ム，水素炎イオン化型検出器とするとき，同時にバニリン，クマリンを定量することができる．4）食品にバニリン，クマリンを添加した場合の回収率は90%以上であった．5）本定量法の検出限界はバニリン0.12 μg，クマリン 0.05 μg である．

（本研究の概要は日本食品衛生学会第28回昭和49年10月で発表した．）

文　献

1) 厚生省環境衛生局食品化学課：食品衛生研究，21，379，1971
2) The Association of Official Analytical Chemists: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 11th Ed., 311, 1970, Washington, D.C
3) 高石清和：薬学雑誌，88，1467，1967
4) Copenhaver, J.H. and M.J. Carver: *J. Chromatogr.*, 16, 229, 1964
5) Van Sumere, C.F., G. Wolf, H. Teuchy, and J. Kint: *J. Chromatogr.*, 20, 48, 1965
6) Furuya, T. and H. Kojima: *J. Chromatogr.* 29, 382, 1967
7) Johansen, N.J.: *J. Gas Chromatogr.*, 3, 202, 1965
8) 日本薬学会編：衛生試験法，253，1973，金原出版
9) Schlack, J.E. and J.J. Dicecco: *J. of the AOAC*, 57, 329, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 112—117, 1976

香料成分の分析に関する研究（第2報）
食品中のバニリン，クマリンの高速液体クロマトグラフィーによる定量法

鎌田国広*，観　照雄*，山野辺秀夫*，水石和子*
山添律子*，戸谷哲也*

Studies on the Analysis of Perfume Constituent (II)
High Speed Liquid Chromatographic Quantitative Determination of Vanillin and Coumarin in Foods

KUNIHIRO KAMATA*, TERUO KAN*, HIDEO YAMANOBE*,
KAZUKO MIZUISHI*, RITSUKO YAMAZOE* and TETSUYA TOTANI*

Several experimental conditions were studied for the simultaneous determination of vanillin and coumarin in food by high speed liquid chromatography. The sample solution was prepared according to the method discribed in the previous paper. The determination of vanillin and coumarin was carried out by HSLC under following condition.

The condition was follows, column: Permaphase ETH, 1m×2.1mm, i. d., mobile phase: ethanol•n-hexane(1:49), flow rate: 0.75ml/min, temperature: 20°, detector: UV photometer(254nm)

The detection limits of vanillin and coumarin were 0.03μg and 0.005μg, respectively and the both calibration curves showed linearity to 0.05μg.

The recoveries of vanillin added to food were 92.6-100% and those of coumarin were 90.0-98.0%. This method was applied to 52 samples of commercial food and it was found that vanillin was contained in 25 samples and coumarin in 13 samples.

緒　言

前報[1]においてガスクロマトグラフィー（以下GCと略す）を用いる食品中のバニリン，クマリンの同時分析法について報告した．

今回，さらに高速液体クロマトグラフィー（以下HSLCと略す）によるバニリン，クマリンの同時分析法の確立を意図し，種々検討したところ，感度および分離能が前報より優れ，実用性の高いことが認められたので報告する．

実験方法

1. 試薬　前報に準ずる

2. 装置　i）高速液体クロマトグラフ：島津デュポン製830型　ii) Kuderna—Danish（以下KDと略す）濃縮器

3. 試料　東京都内で昭和49年3月～9月に購入した12種52検体（外国製27検体を含む）の市販食品を用いた．

4. 操作法

4.1 試験溶液の調製　前報3.1試験溶液の調製の項にしたがって得た試験溶液を用いる．

4.2 HSLCによる定性および定量　①定性：バニリンおよびクマリン標準溶液をエタノールで希釈した溶液5μlについて測定条件に従いHSLCを行ない，得られたクロマトグラムよりバニリン，クマリンのピークの保持時間を求める．試験溶液5μlをとり，同様にHSLCを行ない，得られたピークの保持時間を求め標準溶液のそれと比較して定性を行なう．

②定量：試験溶液5μlについてHSLCを行ない，あらかじめ作成した検量線によってバニリン，クマリンの濃度を求め，試料中の含有量を算出する．

③検量線の作成：バニリンおよびクマリン標準液をエタノールで希釈し，バニリン10—100ppm，クマリン5—100ppmの標準系列をつくり，各溶液5μlについて測定

* 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

条件に従い操作し HSLC を行なう．それぞれのクロマトグラムよりピーク高を測定し，横軸に濃度，縦軸にピーク高をとり検量線を作成する．Fig. 1 に検量線を示す．

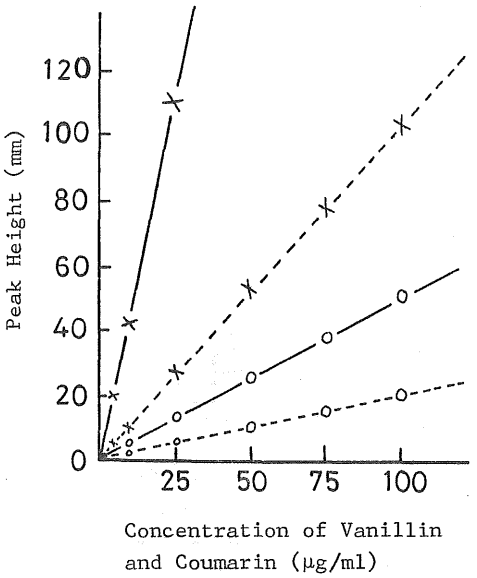


Fig. 1. Calibration Curves of Vanillin and Coumarin
○——○ : Vanillin, Range 4×10^{-2} AUFS
○……○ : Coumarin, Range 8×10^{-2} AUFS
×——× : Coumarin, Range 4×10^{-2} AUFS
×……× : Coumarin, Range 8×10^{-2} AUFS

高速液体クロマトグラフィーの測定条件

カラム充てん剤：Permaphase ETH（デュポン製），カラム：ステンレス製 2.1 mm× 1 m，カラム温度：約 20°，カラム入口圧：25kg/cm², 移種相：エタノール・n-ヘキサン（1 : 49），流速：0.75 m*l*/min，検出器：紫外線吸光光度計（波長 254 nm），感度：4×10^{-2}, 8×10^{-2} Absorbance unit full scale（以下 AUFS と略す），記録計：記録紙速度 5 mm/min

結果および考察

1. HSLC 測定条件の検討 HSLC の測定条件を設定するにあたり，バニリンおよびクマリン相互の分離ならびに前報において分析上妨害のおそれのある物質として調べたエチルバニリン，オルトエチルバニリン，イソバニリン，6—メチルクマリン，3, 4—ジヒドロクマリン，パラヒドロキシベンズアルデヒド，ベラトルアルデヒドの 7 種との分離を目的として検討した．

1.1 カラム充てん剤の選択 バニリン，クマリンおよびこれらの関連物質が最も良く分離され，安定したピークが得られるカラム充てん剤について検討した．

カラム充てん剤としてはデュポン製の吸着型 Zorbax SIL, Zipax PAM, 分配型 Permaphase ETH, 逆相分配型 Zipax HCP, Permaphase ODS および Henry が天然物クマリン類の分離に用いた Zipax ANH[2]，ま

Table 1. Retention Times of Vanillin, Coumarin and the Related Compounds on Various Columns

Compound	Columns 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vanillin	1.94	7.00	3.08	0.42	0.67	0.61	1.00	1.50	3.44	0.60
Isovanillin	1.83	3.25	3.64	0.46	0.70	0.81	0.93	0.95	2.25	0.58
Ethylvanillin	1.17	5.00	1.82	0.58	0.67	0.87	1.13	1.50	4.50	0.64
o-Ethylvanillin	0.89	2.50	0.58	1.00	1.27	1.61	1.80	1.30	9.56	0.98
Coumarin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6-Methylcoumarin	0.83	1.00	0.74	2.34	1.87	2.13	1.13	1.25	1.81	0.46
3, 4-Dihydrocoumarin	ND	1.38	ND	0.38	0.67	0.68		1.50	ND	0.44
Veratraldehyde	1.00	1.00	0.82	0.69	0.93	0.84	0.80	0.88	0.75	
p-Hydroxybenzaldehyde	1.39	11.00	4.32	0.46	0.67	0.74	1.07	1.40	3.84	

(Coumarin=1.00)

Columns and Mobile Phase
1. Zorbax SIL. 25cm., 5% Ethanol/n-Hexane
2. Zipax PAM. 50cm., 5% iso-Propanol/n-Hexane
3. Permaphase ETH. 100cm., 2% Ethanol/n-Hexane
4. Zipax ANH. 50cm., H_2O
5. Zipax HCP. 50cm., H_2O
6. Permaphase ODS. 50cm., H_2O
7. Zipax WAX. 50cm., 0.01 M NaB_4O_7 + 0.005M $NaNO_3$
8. Permaphase AAX. 100cm., 0.05M $KHPO_4$ + 0.015M NaOH
9. Zipax SAX. 100cm., 0.01M NaB_4O_7 + 0.005M $NaNO_3$
10. HITACHI GEL 3010. 50cm., Methanol

ND = not detectable

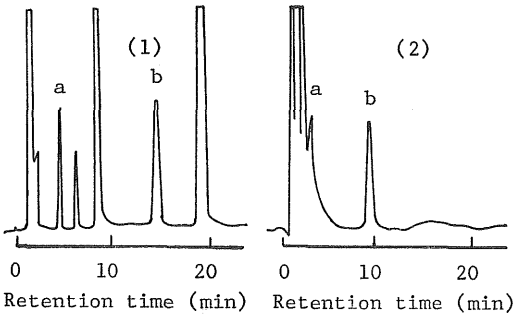


Fig. 2. High-Speed Liquid Chromatograms of Sample added Vanillin and Coumarin
(1) : column : Permaphase ETH, mobile phase : 2%ethanol/n-hexane, column pressure : 25kg/cm², flow rate: 1ml/min
(2) : column : Zipax SAX, mobile phase: 0.01M NaB_4O+0.005M $NaNO_3$, column pressure : 100kg/cm², flow rate: 1ml/min
a : Coumarin b : Vanillin

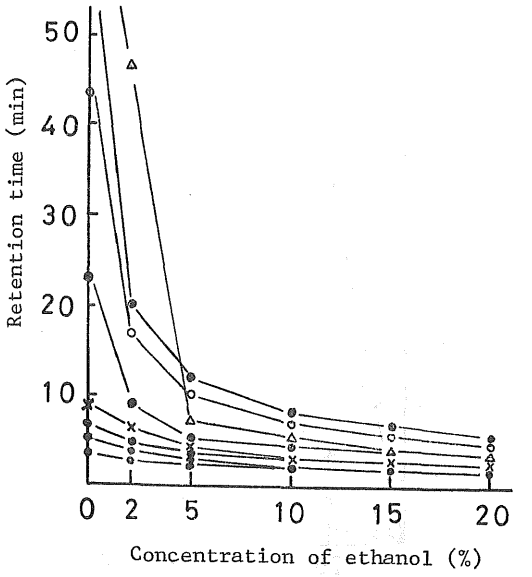


Fig. 3. Effect of Ethanol Concentration on the Retention Time of Vanillin, Coumarin and Related Compounds
○——○ : Vanillin
×——× : Coumarin
△——△ : p-Hydroxybenzaldehyde
●——● : Related Compound

たイオン交換型としては Zipax WAX, Permaphase AAX および Nelson がバニリン，エチルバニリン，クマリンの三種の分離を行なった Zipax SAX[3]，中山らがクマリン類の分類に用いた日立ゲル 3010[4]（日立製）の10種類について行なった．この結果をクマリン1.00とする相対保持時間として Table 1 に示した．なお測定はそれぞれのカラム充てん剤で最も分離のよい条件に設定した．

いずれのカラム充てん剤においてもバニリンとクマリンは分離することを認めたが，関連物質との分離は Permaphase ETH, Zipax SAX の分離能が優れていることが認められた．

そこで，この両者のカラム充てん剤を用い，試料にバニリンおよびクマリンの標準溶液を添加して得た試験溶液に適用したところ，Fig. 2 に示すように Zipax SAX はクマリンの分離が不完全となるが，Permaphase ETH は独立したピークを認め，定量するときのピーク高の測定が容易となるのでカラム充てん剤として，Permaphase ETH を用いることとした．

1.2 移動相の選択 Permaphase ETH カラムによるバニリン，クマリンおよびこれらの関連物質の最適分離条件を捜すため，移動相の溶媒の種類ならびに溶媒の混合比率を検討した．

移動相としてクロロホルム・イソオクタン，エタノール・n-ヘキサン，エタノール・シクロヘキサン，テトラヒドロフラン・n-ヘキサンなどの混合溶媒で HSLC を行なったところ，エタノール・n-ヘキサンを用いるとき分離能が優れていた．

つぎに，この移動相の最適な混合比を得る目的でエタノール濃度を 0—20%まで変化させ，この結果をバニリン，クマリンおよび関連物質の保持時間として Fig. 3 に示した．Fig. 3 から移動相はエタノール濃度が増すにつれバニリン，クマリンおよび関連物質の保持時間は短くなり，それぞれのピークが近接し，分離能が低下することを認めた．特にパラヒドロキシベンズアルデヒドはエタノールの 5 %濃度まで他の化合物より保持時間の短縮する率が大きい．そのためバニリン，クマリンおよびこれらの関連物質の分離が困難となることが認められた．そこでバニリン，クマリンおよびこれらの関連物質を完全に分離し，分析に必要とする時間も約45分ですむ 2 %エタノール濃度，すなわちエタノール・n-ヘキサン（1 : 49）を移動相に用いることとした．

なお Permaphase ETH のロットを異にするカラムを用いた場合，保持時間，溶出順位に変動が認められたので，そのつど分離を最適にするため移動相のエタノール濃度を変化させ，パラヒドロキシベンズアルデヒドよりバニリンの保持時間が短時間になるように設定する必要があった．

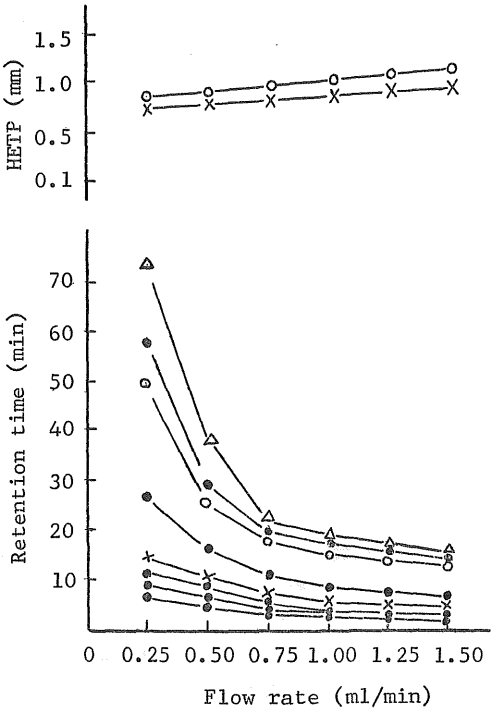


Fig. 4. Effect of Flow Rate on Retention Time and HETP
○——○ : Vanillin
×——× : Coumarin
△——△ : p-Hydroxybenzaldehyde
●——● : Related Compound

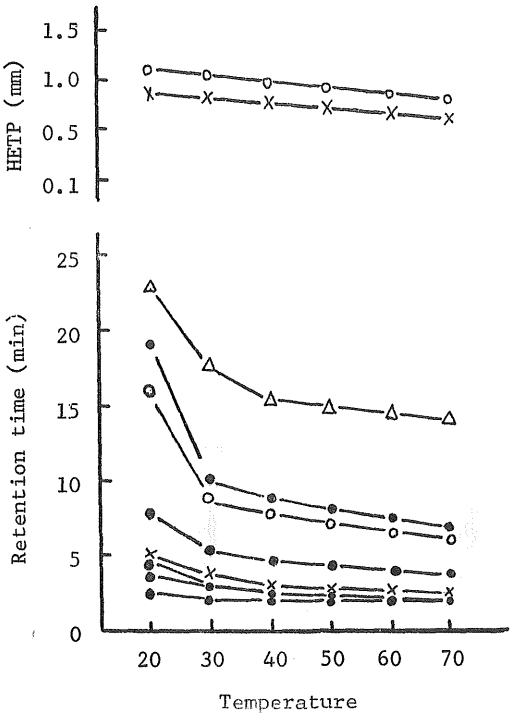


Fig. 5. Effect of Column Temperature on Retention Time and HETP
○——○ : Vanillin
×——× : Coumarin
△——△ : p-Hydroxybenzaldehyde
●——● : Related Compound

1.3 流速 移動相の流速を毎分 0.25 m*l* — 1.5 m*l*まで変化させ保持時間および分離能に与える影響を求めた．この結果を Fig. 4 に示す．流速が増大するにつれ理論段高さ(HETP)はわずかながら上昇し，理論段数は低下することを認めたが，分析時間を考慮して流速は 0.75m*l*/min を選んだ．

1.4 カラム温度 カラム温度を20°から70°まで 6 段階に分け，それぞれバニリン，クマリンおよびこれらの関連物質の HSLC を行い，保持時間と理論段高さ（HETP）を測定した結果をFig. 5 に示す．カラム温度は高温になるにつれ理論段高さの減少ならびに保持時間の短縮が起き，それぞれのピークが重なるので最も低い温度の 20° をカラム温度とした．

2. 検量線の作成 実験方法 4.2 の項に記した方法によってバニリンならびにクマリンの検量線を作成した．この結果は Fig. 1に示すごとく感度 4×10^{-2} AUFS において，バニリン 0.05—0.5 μg，クマリン 0.025—0.125 μg，感度 8×10^{-2} AUFS においてバニリン 0.05—0.5 μg，クマリン 0.025—0.5 μg の範囲で原点を通る直線性を示した．また検出限界はバニリン 0.03 μg，クマリン 0.005 μg であった．

3. 本法と GC 法の比較 本法の HSLC と前報の GC の測定条件に従いバニリン，クマリンおよびこれらの関連物質の相対保持時間と検出感度を比較した．その結果を Table 2 に示した．前報のＧＣではバニリンと3，4—ジヒドロクマリン，エチルバニリンとベラトルアルデヒドの分離は困難であったが，本法の HSLC においてはバニリン，クマリンおよびこれらの関連物質を完全に分離することができた．検出感度は HSLC が数倍優れ，特にクマリンでは 0.005 μg の感度であり，HSLC が好結果であった．

つぎに，チョコレートならびにアイスクリーム試料にバニリン，クマリンの標準溶液を添加し，4. 操作法の項によって得た試験溶液について本法の HSLC ならびに前報のＧＣを行ない，それぞれのクロマトグラムを比較した結果を Fig. 6 に示す．クマリンのピークは単一ピークを示すため HSLC が優れていることが認められた．

Table 2. Relative Retention Times and Detection Limits of Vanillin, Coumarin and the Related Compounds

Compound	Relative retention time(coumarin=1.00) GC	HSLC	Detection limit (ng) GC	HSLC
Vanillin	0.66	3.08	50	30
Isovanillin	0.90	3.64	50	50
Ethylvanillin	0.76	1.82	25	15
o-Ethylvanillin	0.41	0.58	50	5
Coumarin	1.00	1.00	25	5
6-Methylcoumarin	1.48	0.74	25	5
3, 4-Dihydrocoumarin	0.69		250	
Veratraldehyde	0.76	0.78	25	10
p-Hydroxybenzaldehyde	0.48	4.32	100	50

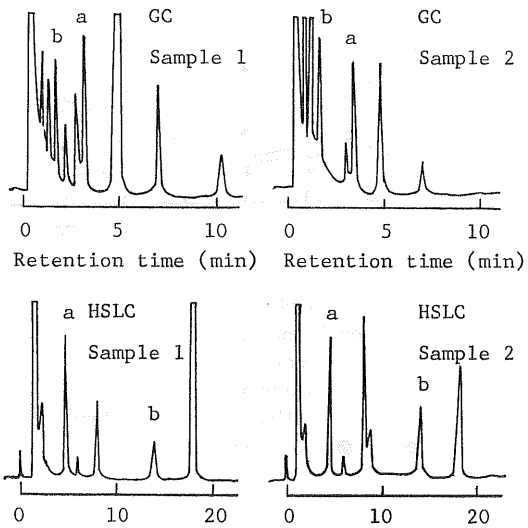


Fig. 6. Comparison between the Chromatograms of GC and HSLC
Sample 1: Chocolate Sample 2: Ice cream
a: Coumarin b: Vanillin

Table 3. Average Recovery of Vanillin and Coumarin added to Foods

Foods		Vanillin added 250μg Recovery(%)	Coumarin added 125μg Recovery(%)
Ice cream	10g	96.4	94.4
Chocolate	2g	94.0	91.0
Cocoa	5g	93.2	90.0
Chewing gum	2g	92.6	98.0
Cookie	10g	94.3	90.5
"Sakura-mochi"	10g	100.0	92.0

さらに，チョコレートについて操作を繰り返し，6回注入したときの変動係数を比較したところ，本法はバニリン3.2%，クマリン4.4%，前報はバニリン4.1%，クマリン4.9%であり，バニリン，クマリンともに本法が満足すべき結果を与えた．

4. 添加回収試験 以上のことから本法を各種市販食品に適用し，回収率を検討した．すなわちアイスクリーム，チョコレート，ココア，チューインガム，クッキーおよびサクラ餅にそれぞれバニリン250μg，クマリン125μgを添加し，前項の操作法により定量を行なった．操作を3—6回繰り返し，その平均した値を Table 3 に示した．回収率はバニリン92.6—100%，クマリン90.0—98.0%と好結果が得られ，本法は実用性が高いことを認めたので，つぎに実際市販食品に応用した．

5. 市販食品の分析結果 市販のアイスクリーム2検体，チョコレート14検体，チョコレート菓子6検体，クッキー5検体，チューインガム2検体，アルコール飲料4検体，ココア1検体，キャラメル1検体，ゼリー2検体，パン2検体，サクラ餅7検体，サクラ餅用のサクラの葉6検体の12種52検体の食品について分析を行なった．

この結果を Table 4 に示した．これらの市販食品からバニリンを検出したものはアイスクリーム，チョコレート等52検体中25検体，クマリンを検出したものはサクラ餅（平均4.7 ppm），サクラ餅用のサクラの葉（平均197ppm）の13検体であった．アルコール飲料，ココア等14検体からはバニリンならびにクマリンが検出されなかった．

結　論

食品中のバニリン，クマリンを HSLC を用いて同時定量するための条件を検討し，実用に供しうる分析法を確立した．

1) HSLC の測定条件はカラム充てん剤として Permaphase ETH，移動相としてエタノール・n-ヘキサン（1：49）を用いることによりバニリン，クマリンの定

Table 4. Analytical Results of Vanillin and Coumarin in Foods

Foods	Number of samples	Content (ppm) Vanillin Range (Ave.)	Coumarin Range (Ave.)
Ice cream	2	16–39 (28)	ND
Chocolate	11	6–316 (88)	ND
	3	ND	ND
Chocolate cookie	6	11–91 (57)	ND
Cookie and biscuit	4	9–23 (16)	ND
	1	ND	ND
Chewing gum	1	50	ND
	1	ND	ND
Alcoholic beverages	4	ND	ND
Cocoa	1	ND	ND
Caramel	1	21	ND
Jelly	2	ND	ND
Bread	2	ND	ND
"Sakura-mochi"	7	ND	1.3–7.5 (4.7)
Cherry leaves	6	ND	29–550 (197)

ND=not detectable

量分析が可能であった．2）本測定法はバニリン，0.05—0.5 μg，クマリン 0.025—0.5 μg において原点を通る直線性を認める検量線が得られ，検出限界はバニリン 0.03 μg，クマリン 0.005 μg であった．3）試験溶液の調製は前報に準じた．4）各種市販食品に添加したときのバニリン，クマリンの回収率は90%以上の好結果を示した．5）市販食品12種52検体を測定したところ，25検体からバニリンを検出し，13検体からクマリンを検出した．

（本研究の概要は日本薬学会第95年会昭和50年4月で発表した．）

文　献

1）観　照雄，鎌田国広，森謙一郎ら：東京衛研年報，27—1，106，1976
2）平田義正，鳩野重威：高速液体クロマトグラフィー 346，1974，講談社
3）Nelson, J.J., *J. Chromatog. Sci.*, 11, 28, 1973
4）中山充，平岡三津子，松尾昭彦ら：第16回液体クロマトグラフ研究会講演要旨集，No. 14，9，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 118—121, 1976

市販口紅およびネイルエナメル中の色素の調査について

水石和子*, 風間成孔*, 中村義昭*, 山崎清子*
西田茂一*, 戸谷哲也*

Coal-tar Dyes in Lipsticks and Nail Enamels

KAZUKO MIZUISHI*, MASAYOSHI KAZAMA*, YOSHIAKI NAKAMURA*,
KIYOKO YAMAZAKI*, SHIGEKAZU NISHIDA* and TETSUYA TOTANI*

Analysis of dyes in lipsticks and nail enamels was done according to the method described in Standard Method of Analysis for Hygienic Chemists, and also by means of alumina column chromatography. Better separation of dyes could be obtained by the alumina column chromatography with a small amount of sample. Pre-treatment of nail enamel with acetone•ether(1 : 1) solution was suitable for elimination of nitrocellulose and other materials.

It was found that dyes widely used for commercial lipsticks were Lithol Rubin B, Lake Red C. Dibromofluoresceine and Tetrabromofluoresceine and for nail enamels Lake Red C and Lithol Rubin B. Subsidary dyes were not significantly detected in all samples.

まえがき

化粧品に使用を許可される色素は薬事法により規制されており，催腫瘍性などの毒性で人体に有害の疑いのもたれた色素は順次削除されている．現在では，許可色素は83品目であるが[1]，これらの色素は省令で，別表第1（医薬品，医薬部外品および化粧品用タール色素11品目），別表第2（外用医薬品，医薬部外品および化粧品用タール色素47品目），別表第3（粘膜以外に使用する外用医薬品，医薬部外品および化粧品用タール色素25品目）の3グループに分けられている．ネイルエナメルには別表第1，第2，第3の全色素が使用を許可されるが，経皮，経口的に問題が多いと考えられる口紅に使用されるものは別表第1，第2に収載されている計58品目のみである．

今回は，都内で市販されている訪問販売化粧品の口紅25種およびネイルエナメル6種に使用されている色素の種類を調査し，最近問題とされているアマランス（赤色2号），エリスロシン（赤色3号），フロキシンB（赤色104号）などの使用状況を調べ，また繁用されている色素に付随する副色素について検討を加えた．

実験の部

試料　昭和50年度に東京都衛生局薬務部が収去した訪問販売化粧品の口紅25検体と，ネイルエナメル6検体である．

試薬　〔薄層クロマトグラフィー用〕薄層：シリカゲル（Wakogel B-5），ポリアミド（和光純薬）　展開溶媒：①n-ブタノール・エタノール・0.5 N アンモニア水（6 : 2 : 3），②1, 1—ジクロルエタン，③1,1,2—トリクロルエタン

〔ろ紙クロマトグラフィー用〕ろ紙：東洋ろ紙 No. 50，展開溶媒：①n-ブタノール・エタノール・0.5 N 酢酸（6 : 2 : 3）②25%エタノール・5%アンモニア水（50 : 50）

〔カラムクロマトグラフィー用〕カラム充填剤：シリカゲル（Mallinckrodt 社，100 メッシュ），アルミナ（Woelm 社，basic）

〔色素標準品〕国立衛生試験所標準品および市販色素を薄層クロマトグラフィー等で分取，精製したもの．

装置　日立自記分光光度計 323 型，紫外線照射ランプ（波長 254 nm）日立 EPI—G_3 赤外分光光度計

試験溶液の調製法　1）衛生試験法の香粧品試験，有機性着色料の項に準じ[2]，Chart 1 の方法により抽出し，試験溶液を調製した．

2）カラムクロマトグラフィーによる溶出分離：アル

* 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

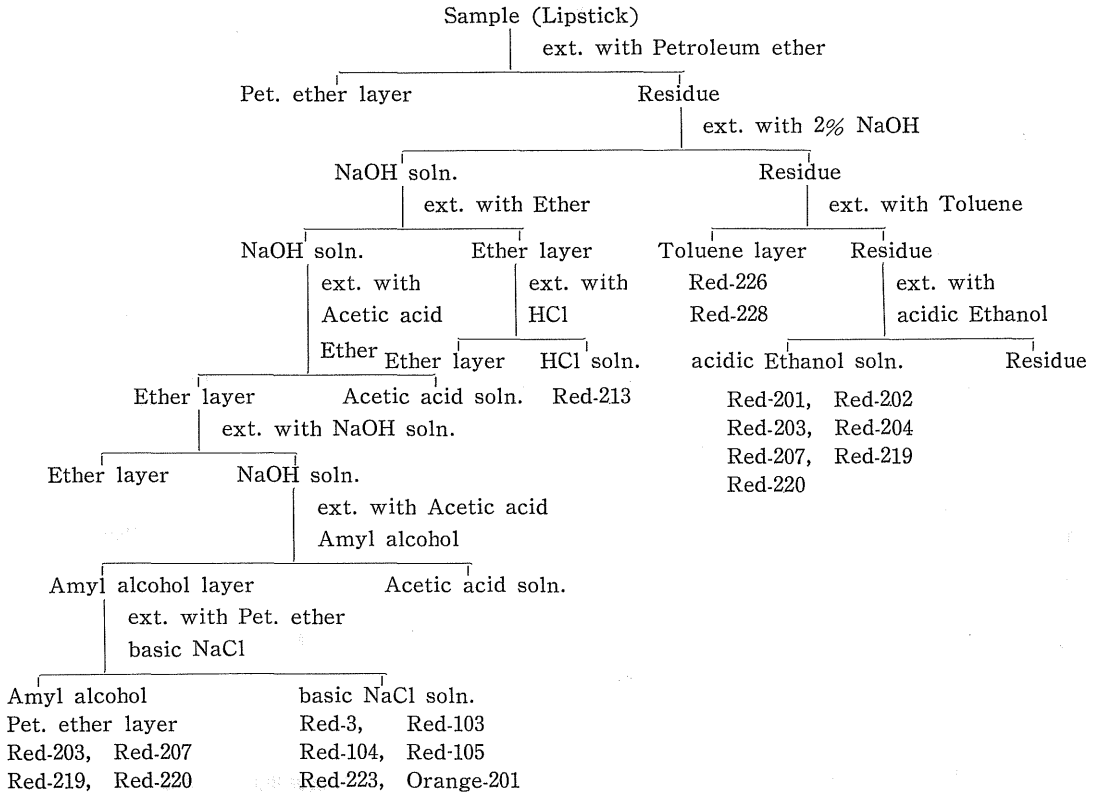


Chart 1. Analytical Scheme of Coal-tar Dyes in Lipstick

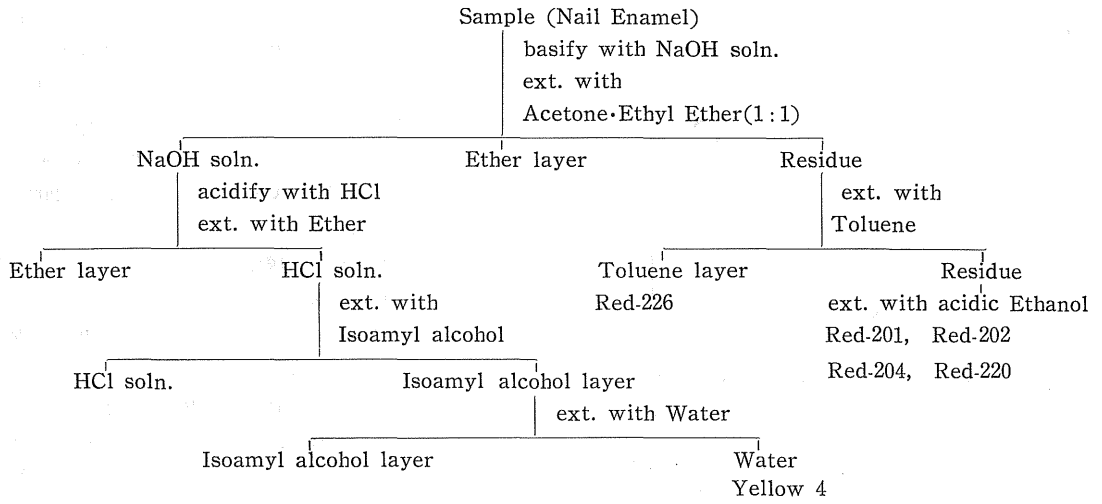


Chart 2. Analytical Scheme of Coal-tar Dyes in Nail Enamel

ミナ(Woelm 社, basic)を石油エーテル・エタノール(4：1)混液を用いて，直径 0.5 cm，長さ約 20cmのコック付カラムクロマトグラフィー用ガラス管に充塡し，常法に従ってカラムを作製する．このカラムに，先の混液に試料を溶解または懸濁させた液を静かに流し込み柱内にしみ込ませ，さらに混液を流して洗浄し，ついでトルエン，n-ブタノール・エタノール・0.5 N アンモニア水(6：2：3)混液を用いて展開し，分離した色

Table 1. Dyes Detected from Commercial Lipsticks and Nail Enamels

Dyes		Number of Sample L.S.	N.E.	Dyes		Number of Sample L.S.
Monoazo Dyes				Xanthene Dyes		
Lithol Rubin B	(Red 201)	14	4	Erythrosine	(Red 3)	2
Lithol Rubin BCA	(Red 202)			Phloxine B	(Red 104)	2
Lake Red C	(Red 203)	23	3	Rose Bengale	(Red 105)	1
Lake Red CBA	(Red 204)			Rhodamine B	(Red 213)	1
Lithol Red BA	(Red 207)	6		Tetrabromofluoresceine	(Red 223)	15
Brilliant Lake Red R	(Red 219)	4		Eosin YS	(Red 230)	1
Deep Maroon	(Red 220)	2	1	Dibromofluoresceine	(Orange 201)	7
Parmaton Red	(Red 228)	1		Triphenylmethane Dyes		
Parmanent Orange	(Orange 203)	8		Brilliant Blue FCF	(Blue 1)	1
Tartrazine	(Yellow 4)	1	3	Patent Blue CA	(Blue 203)	1
Thioindigo Dyes						
Herindone Pink CN	(Red 226)	1	1			

L.S. : Lipstick, N.E. : Nail Enamel

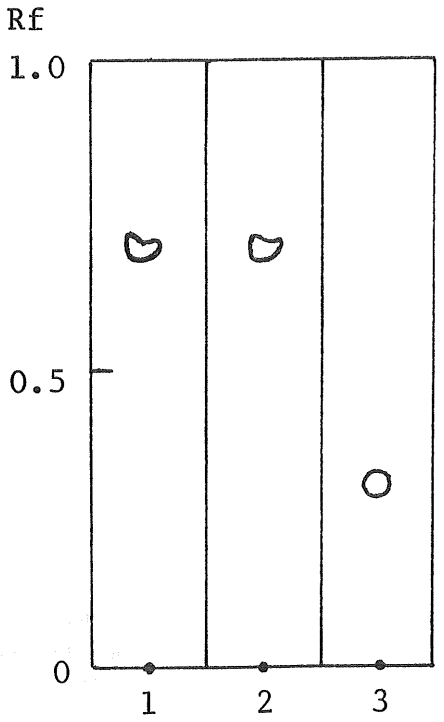


Fig. 1. Paper Chromatogram of Eosin YS, Ponceau R and Dye Detected from Lipstick
Developing solvent: n-Buthyl alcohol• Ethanol • 0.5N CH_3 COOH(6 : 2 : 3)
1 : Sample (lipstick), Yellowish fluoresceine
2 : Eosin YS, Yellowish fluoresceine
3 : Ponceau R

素の吸着帯を溶出させる．流出速度（1ml/min）．溶出液を適宜調製して確認用試験溶液とした．

3）ネイルエナメル中の色素の分離：Chart 2 の方法に準じて，ネイルエナメル中の色素の分離を行ない試験溶液を調製した．

確認方法　上記の試験法に従って得た試験溶液を用い，以下の方法で色素の確認を行なった．

薄層クロマトグラフィー，ろ紙クロマトグラフィー，可視部吸収スペクトル法，赤外吸収スペクトル法．

実験結果および考察

1. 口紅中から検出された色素　タール色素の抽出・分離 1）および2）の方法により試料口紅から Table 1 のような色素が検出された．25 検体の口紅から，赤色系15種，黄色1種，橙色2種，青色2種の計20種類の色素を検出した．アゾ色素のレーキレッド C および Ba レーキ（赤色 203，204 号）が最も頻用され（$^{23}/_{25}$），次いでテトラブロムフルオレセイン（赤色223号）（$^{15}/_{25}$），リソールルビン B および Ca レーキ（赤色201，202号）（$^{13}/_{25}$）であった．

発がん性が疑われて米国で使用禁止とされたアマランス[3]は今回の対象検体からは検出されなかったが，厚生省の委託実験で発がん性が疑われるデータが出たと報道された[4]エリスロシンは2検体から，また一部より，染色体異常が指摘されたフロキシン B[5]も2検体から検出された．フロキシン B は，目下使用が許可されているが，現在のところ食品，医薬品にほとんど使用されない傾向にある．

使用禁止の色素ポンソー R（赤色503号）が表示されている口紅について分析したところ，ポンソー R は検出されず，エオシン Y S（赤色 230 号）が検出された．他に表示には無いローズベンガル（赤色 105 号）を検出した口紅があり，その2件とも表示違反として処置された．

2. **ネイルエナメル中の色素** ネイルエナメル6検体について3)ネイルエナメル中の色素の分離および確認方法に従い分析を行なったところ Table 1 に示す色素が検出された．ネイルエナメルは爪に長時間コーティングするので，爪に染着したり，吸収されて人体に有害な影響をおよぼす色素は含まれてはならないが，今回の検体はいずれも許可色素を使用していた．

3. **副色素** 色素の種類によって必然的に副色素を含有するものがあり，エオシン YS（赤色230号），ウラニン（黄色202号），テトラブロムフルオレセイン（赤色223号）等のフルオレセイン系色素にその傾向がある．特にジブロムフルオレセインにおいては比較的多量に検出される[6,7]．ジブロムフルオレセインは 4, 5—ジブロムフルオレセインが主色素であるが（40—60%，例外として80—90%），4—ブロム化体，2, 4, 5—トリブロム化体，2, 4, 5, 7—テトラブロム化体の混入が考えられる．他にレーキレッドC，ブリリアントレーキレッドR，リソールルビンBCA，リソールレッド等にも副色素が検出されることが多い．

今回の調査では，ジブロムフルオレセインを含む口紅は $^{6}/_{25}$ 検体であったがいずれも顕著な副色素の存在は認められなかった．

他の色素も比較的濃度が薄く，副色素は検出されなかった．

米国では法定色素の規定には副色素の規定があるが，我が国の薬事法は，原末での純色素含量の規定だけで，副色素について詳しくは規定されていない．色素のうちで，副色素についての品質の規格化が要求されているものがあるが，今後，薄層クロマトグラフィー，紫外部吸収スペクトル，赤外吸収スペクトル，高速液体クロマトグラフィーを用いて分析法を検討する予定である．

まとめ

1. 口紅にはアゾ色素のレーキレッドC（Ba レーキ）リソールルビンB（Ca レーキ），キサンテン系のテトラブロムフルオレセイン等の色素が繁用され，ネイルエナメルにもレーキレッドC（Ba レーキ），リソールルビンB（Ca レーキ）が使用されている．

2. アルミナカラム法により，少量の口紅試料から色素分離が可能であった．

3. ネイルエナメルからの色素分離に，前処理としてアセトン・エーテル（1：1）の混液で抽出する操作を行ない，ニトロセルロース等の基剤を除去することができた．

4. ジブロムフルオレセイン（橙色201号）を使用している口紅が6検体あったが，顕著な副色素の存在は認められなかった．

5. 色素表示違反の口紅が2例あった．

文献

1) 昭和41年8月31日厚生省令第30号〝医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令〟改正昭和47年12月13日厚生省令第55号
2) 日本薬学会編：衛生試験法注解，567，1973，金原出版
3) Federal Register, 41, No. 28, 5823, February 10, 1976
4) 東京新聞：1976年1月25日朝刊
5) 毎日新聞：1976年3月18日朝刊
6) Graichen, C. and J. C. Molitor : *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 42, 149, 1959
7) 佃井典子，持田研秀：衛生化学，18，103，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 122—125, 1976

東京都における水銀汚染の実態について（第3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*, 江波戸舉秀*
原田裕文**, 戸谷哲也*, 松本　茂*

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (III)
Mercury Content of Fish and Shellfish

TAKASHI AMEMIYA*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KOICHI ITO*, KIYOHIDE EBATO*,
HIROFUMI HARADA**, TETSUYA TOTANI* and SHIGERU MATSUMOTO*

One hundred eighty three samples of fish and shellfish obtained at the Tokyo central market were analysed for both total and methyl mercury in order to monitor mercurial pollution the sea food protein resource. The heighest levels among all samples of this research were 1.50ppm of total mercury and 0.72ppm of methyl mercury, which were found in a blue marlin. The samples contained fairly high levels of total mercury were as follows: shark; 0.89ppm, spearfish; 1.19ppm, broadbill; 0.84ppm, yumekasago (a kind of scorpionfish); 0.95ppm, tuna; 0.59ppm, rockfish; 0.89ppm, kinmedai; 0.93ppm. Most of all the samples were leveled near 0.10ppm of total mercury. From this and the previous data, it appears likely that accumulation of mercury in fish and shellfish occurs through their preferential food chain.

緒　言

著者らは，食品汚染調査の一環として，魚介類中の総水銀（T—Hgと略す）量およびメチル水銀（Me—Hgと略す）量を調査し，すでに前報[1,2]において報告した．昭和50年度においても引き続き魚介類の水銀汚染の実態を把握する目的で本調査を実施したので報告する．

実験方法

1. 試料　昭和50年4月から51年3月までの1年間に東京中央卸売市場から搬入された魚介類で56種183検体である．

2. 操作および定量

2—1：総水銀　試料をホモジナイズし，その一定量をとり，硫硝酸湿式分解後，フレームレス原子吸光分析を行った．なお，測定機器は島津製水銀分析計UV—201型を用いた．

2—2：メチル水銀　2—1でホモジナイズした試料の一定量に塩酸を加え，振とうして均一とし，ベンゼン抽出して遠心分離を行い，システインで抽出後，酸性としてベンゼンで再抽出して，これをECD付ガスクロマトグラフで分析した．しかし，試料のなかにはベンゼンおよびシステイン抽出時に強固なエマルジョン形成をおこすものがあるため，それらのものについてはFDA法を若干改良したアルカリ分解による方法[3]を用いて分析した．なお，測定機器は島津製ガスクロマトグラフGC—5 AP_3 EF型（^3H線源使用 ECD付）を用いた．

結果および考察

実験の結果をTable 1に示す．

実験の結果は前報の総水銀およびメチル水銀の回収率実験にしたがって補正した．

1. 魚介類　厚生省通達[4]では魚の体長によって大型魚(60cm以上のもの)，中型魚(20以上60cm未満のもの)小型魚（20cm未満のものおよび貝類）に分類している．今回の調査に用いた魚種56の魚体の大きさによるうちわけは，大型魚18%，中型魚66%，小型魚16%であった．

* 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. Mercury Content of Muscle in Fish and Shellfish

	Sample Name	N	T—Hg(ppm)		Me—Hg(ppm)		Me—Hg/T—Hg(%)	
			Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
1	Aji (Horse-mackerel)	9	0.02—0.07	0.04	0.01—0.06	0.03	50.0—85.7	60.0
2	Anago (Conger eel)	1	0.11		0.08		72.7	
3	Anko (Angler)	1	0.29		0.26		89.7	
4	Isaki	4	0.05—0.13	0.08	0.03—0.12	0.07	60.0—100	83.8
5	Iwashi (Sardine)	8	0.02—0.03	0.03	0.01—0.02	0.02	33.3—100	56.3
6	Inada	3	0.07—0.21	0.12	0.05—0.16	0.09	71.4—76.2	73.0
7	Unagi (Eel)	2	0.07—0.09	0.08	0.05—0.09	0.07	71.4—100	85.7
8	Umeiro	1	0.17		0.12		70.6	
9	Oakamuro	1	0.16		0.15		93.8	
10	Karei (Flatfish)	11	0.03—0.17	0.07	0.01—0.16	0.05	33.3—100	62.4
11	Katsuo (Bonito)	6	0.20—0.45	0.31	0.16—0.40	0.27	80.0—95.5	89.8
12	Kamasu (Barracuda)	1	0.07		0.06		85.7	
13	Kisu (Sillago)	2	0.09—0.13	0.11	0.06—0.12	0.09	66.7—92.3	79.5
14	Kinmedai	2	0.90—0.95	0.93	0.80—0.85	0.83	88.9—89.5	89.2
15	Kurokawakajiki	1	1.50		0.72		48.0	
16	Konoshiro	15	0.02—0.06	0.03	0.01—0.03	0.02	33.3—100	57.5
17	Koi (Carp)	2	0.03—0.04	0.04	0.02—0.03	0.03	66.7—75.0	70.9
18	Sake (Salmon)	1	0.04		0.02		50.0	
19	Saba (Mackerel)	4	0.06—0.11	0.10	0.05—0.10	0.08	80.0—90.9	84.0
20	Same (Shark)	2	0.82—0.96	0.89	0.80—0.91	0.86	94.8—97.6	96.0
21	Sawara	6	0.03—0.07	0.05	0.02—0.06	0.04	66.7—85.7	74.0
22	Sanma (Mackerel pike)	1	0.07		0.05		71.4	
23	Shirokawakajiki	1	1.11		0.56		50.5	
24	Suzuki (Bass)	4	0.08—0.22	0.18	0.07—0.21	0.16	87.5—95.5	92.1
25	Suketodara	4	0.03—0.25	0.12	0.02—0.23	0.10	62.5—92.0	75.3
26	Tachiuo (Hair-tail)	1	0.12		0.11		91.7	
27	Takabe	3	0.04—0.09	0.06	0.04—0.09	0.05	80.0—100	93.3
28	Tai (Sea bream)	10	0.08—0.25	0.15	0.06—0.21	0.13	60.0—100	82.8
29	Tara (Cod)	1	0.10		0.08		80.0	
30	Tobiuo (Flyingfish)	2	0.08		0.07—0.08	0.08	87.5—100	63.8
31	Nishin (Herring)	2	0.04—0.05	0.05	0.03—0.04	0.04	75.0—80.0	77.5
32	Nijimasu	2	0.03		0.02		66.7	
33	Hamachi	2	0.07—0.11	0.09	0.06—0.07	0.07	63.6—85.7	74.7
34	Haze (Goby)	1	0.02		0.01		50.0	
35	Hatahata	2	0.07—0.10	0.09	0.06—0.08	0.07	80.0—85.7	82.9
36	Hirame (Flounder)	3	0.07—0.10	0.08	0.05—0.07	0.06	70.0—75.0	72.1
37	Hiramasa	1	0.22		0.18		81.8	
38	Fugu (Swellfish)	1	0.26		0.21		80.8	
39	Buri (Yellow tail)	2	0.03		0.02		66.7	
40	Bora (Gray mullet)	5	0.01		ND			
41	Mutsu	13	0.05—0.87	0.28	0.04—0.74	0.23	63.6—92.3	80.2
42	Medai	2	0.19—0.20	0.20	0.15—0.16	0.16	75.0—84.2	79.6
43	Menuke	5	0.61—1.29	0.89	0.59—1.28	0.82	84.4—99.2	91.3
44	Makajiki	1	1.19		1.09		91.6	
45	Maguro (Tuna)	3	0.48—0.73	0.59	0.42—0.72	0.55	87.5—98.6	91.9
46	Mekajiki	1	0.84		0.78		92.9	
47	Yumekasago	1	0.95		0.81		85.3	
48	Aoriika	2	0.16—0.17	0.17	0.15—0.16	0.16	88.2—100	94.1
49	Surumeika	7	0.02—0.11	0.06	0.01—0.08	0.04	50.0—80.0	67.2
50	Kani (Crab)	2	0.03		0.01		33.3	
51	Asari(Short-necked clam)	1	0.02		0.02		100	

52	Akagai (Ark shell)	2	0.01—0.02	0.02	ND			
53	Ebi (Lobster)	6	0.03—0.07	0.05	0.02—0.06	0.04	66.7—100	76.6
54	Hamaguri (Clam)	2	0.01—0.02	0.02	ND			
55	Kaki (Oyster)	2	0.02—0.06	0.03	ND			
56	Shijimi (Corbicula)	2	0.01		ND			

N : number of samples.
ND : not detectable.

また，カキ，ハマグリなどの貝類は小型魚に分類される．

1—1). 大型魚　サメ，カジキ類（マカジキ，メカジキ，シロカワカジキ，クロカワカジキ）およびマグロについて調査を行った．

総水銀においては，クロカワカジキから1.50ppm が検出されたが，前回[2]の調査でも同魚種から2.60 ppm が検出されている．この値は今回調査した全検体中で最も高かった．

このほかシロカワカジキ1.11 ppm，マカジキ1.19 ppm，サメ 0.89 ppm，メカジキ 0.84 ppm，マグロ 0.59 ppm で，いずれも高い値であった．

一方，メチル水銀はクロカワカジキ 0.72 ppm，サメ 0.86 ppm，シロカワカジキ 0.56 ppm，マカジキ 1.09ppm メカジキ0.78ppmであった．これらのメチル水銀量の総水銀量に対する割合をみると，クロカワカジキ48.0%，シロカワカジキ50.5%で，サメなどに比して低値であったが，この結果は前報[2]と同様の傾向を示した．

上記のようにサメおよびカジキ類については前回[2]と今回の2年間の資料では，多くの研究者が指摘しているとおり，いずれも高濃度の水銀含有量であった．なおこれらの検体はマグロの一部を除いてすべて切身で搬入されたもので，それが魚体のどの部分であるかは不明である．またこれらのうち，とくにメカジキは水銀含有量の多いメヌケなどをたびたび餌とすることがあり，水銀含有量の多いことは食物連鎖に関連することが考えられる．

しかし，サメ，カジキおよびマグロは遠海性であり，前回および今回の調査結果をみるかぎりにおいては公害などによる汚染ではないと思われる．

今回の調査に用いた検体はカマボコなどの食品に利用されているが，現在では暫定規制（T—Hg は 0.40ppm 以下および Me—Hg は 0.30 ppm以下）の対象からはずされている．

1—2). 中型魚　今回の調査において，中型魚のうちで，キンメダイ，メヌケ，ユメカサゴはいずれも暫定規制値を上回っており，総水銀含有量はそれぞれ平均値で 0.93 ppm，0.89 ppm，0.95 ppm であった．

キンメダイおよびメヌケの前回[1,2]の調査における平均含有量は，キンメダイ 0.62 ppm，0.42 ppm，メヌケ 0.62 ppm，0.54 ppm であり，今回の調査結果の方が高い値を示している．しかし，水銀含有量は同一魚種間では体長に左右されることが多く，この程度では有意の差とはいえないと考えられる．ユメカサゴはメヌケと同様カサゴ科の深海魚で，今回はじめて調査したが，総水銀として 0.95 ppm を検出したため自主規制の対象となった．また，ムツおよびカツオの一部に暫定規制値をこえるものがみられた．ムツについてみると，体長 50cm，3 kg のものは総水銀の平均値 0.65 ppm で規制値である 0.4 ppm をこえたが，体長25—30cm，200—250g 程度の小形のものは 0.10 ppm 付近に集中していた．一般に同種の魚でも体長の大きいものほど水銀含有量が高いことが知られており，今回の調査でも体長 30cm 以下のムツは暫定規制値をこえないことが確認された．そこで東京都は 30 cm 以下の静岡県出荷のムツについて昭和51年5月21日自主規制を解除した[5]．つぎにカツオ6検体について調査したところ，総水銀において，それぞれ0.45 ppm，0.41ppm を示した．これらの中型魚のうちでキンメダイ，メヌケおよびカツオは暫定規制の対象外となっている．その他の中型魚ではとくに高値のものはみられなかったが，やや高いものとしてアンコウ 0.29ppm，フグ 0.26 ppm，ヒラマサ 0.22 ppm，メダイ 0.20 ppm，スズキ 0.18 ppmの総水銀を検出した．

年次の推移をみると大型魚と同様に，含有量において多少の増減はあるが，顕著な変化はみられなかった．

1—3). 小型魚および貝類　今回調査した小型魚および貝類は69検体で，全体の約 1/3 を占めていた．ほとんどの検体は 0.10ppm 前後であり，前報[1,2]と同様の傾向を示していた．また，前報[2]のなかでハマグリから 0.29 ppm，0.41 ppm の総水銀を検出していたが，これは局地的な水銀汚染によるものであろうと思われる．しかし，今回の調査では前回のような高い含有量を示すものはみられなかった．

1—4). 頭足類　スルメイカ8検体，アオリイカ2検体について調査した．

スルメイカは平均 0.06 ppm の総水銀を検出し，アオ

リイカにおいては0.17ppm，メチル水銀0.16 ppm であった．このアオリイカは体長が50cm以上もあり，やはり魚類と同様に体長の大きさに関係があると思われる．

今回調査した魚を総水銀含有量で①0—0.10 ppm，②0.10—0.20ppm，③0.20—0.30 ppm，④0.30—0.40ppm，⑤0.40ppm 以上の5グループに分類した．それによると①は120検体で全体の65.6%，②は29検体で15.8%，③は12検体で6.6%，④は2検体で1.1%，⑤は20検体で10.9%であった．この割合は前報[1,2]と近似した傾向を示し，0.20 ppm 以下の魚は全体の81.4%を占めていた．

まとめ

1. 今回の調査に用いた試料は56種183検体である．

2. カジキ類，サメ，マグロ，キンメダイそしてムツおよびカツオの一部から暫定規制値をこえる水銀が検出された．

3. ユメカサゴから高濃度の水銀が検出されたため自主規制の対象となった．また，体長30cm 以下の静岡県出荷のムツは自主規制が解除になった．

4. 中型および小型魚は，ほとんど0.20 ppm以下で，全体の80%であった．

5. 前報同様，深海性のものは高含有量を示した．

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ならびに食品監視課の方々に深謝いたします．

文献

1) 伊藤弘一，竹内正博，江波戸擧秀，雨宮 敬，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，25，141，1974
2) 雨宮 敬，竹内正博，伊藤弘一，江波戸擧秀，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，26—1，129，1975
3) 竹内正博，江波戸擧秀，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) 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
5) 東京都衛生局環境衛生部長通達：51衛環乳第193号昭和51年5月18日

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 126—131, 1976

微量アンチモンの原子吸光分析法

伊藤弘一*, 江波戸攀秀*, 竹内正博*, 雨宮敬*
原田裕文**, 戸谷哲也*

The Atomic Absorption Determination of Antimony

KOICHI ITO*, KIYOHIDE EBATO*, MASAHIRO TAKEUCHI*, TAKASHI AMEMIYA*,
HIROFUMI HARADA** and TETSUYA TOTANI*

Analytical optimum condition for the determination of antimony as antimony trihydride by atomic absorption spectrometry was examined. The antimony trihydride generated by reduction of antimony with zinc powder was collected in collective appratus and introduced by argon into an atomic absorption spectrometer system equipped with argon-hydrogen flame.The optimum amounts of reagents added to the 20 m*l* of prepared solution were 9 m*l* of conc. hydrochloric acid, 0.5mg of stannous chloride, 1. 0 g of zinc powder, and the reduction time was 2 minutes. The linear relationship was obatained in the range of 0.1 to 1.0 μg as antimony and the minimum detection limit was 0. 1 μg. For the determination of antimony by this method, no interference was observed by the presence of 1,000μg of Fe, 100μg of Cu, 50μg of Se to the 20m*l* of prepared solution containing 1μg of antimony. However, the remarkable interference from nitric acid used as the reagent was observed, but the problem was solved by the disintegration of nitric acid with ammonium oxalate.

緒　言

一般に微量のアンチモンの定量法として，比色法および原子吸光法が知られている[1]．このうち比色法としてはローダミンB法が繁用されているが，操作の煩雑さおよび精度の点から必ずしも満足できる方法とはいえない．これに対して原子吸光法にはアンチモンをキレート抽出して，アセチレン—空気炎で測定する方法[2-4]とアンチモンを還元することによって発生するアンチモン化水素をアルゴン—水素炎中で測定する方法[5,6]の2つがある．このうちキレート抽出法において，一般に用いられるキレート剤にはピロリジン・ジチオカルバミン酸，あるいはジエチル・ジチオカルバミン酸があり，抽出溶媒としてはメチルイソブチルケトン，キシレン等が使用されている．またアンチモンの還元は塩酸酸性の試験溶液に亜鉛末あるいはナトリウムボロハイドライドを添加して行なう方法[7-9]が一般に知られている．これらの原子吸光法はいずれも短時間で測定ができ，かつ操作も簡便であるが，とくに水素化物として測定する方法は，キレート抽出法より感度，精度の点でも優れている．しかしその反面アンチモン化水素の発生条件あるいは試料溶液中の夾雑物などの影響を受けやすい欠点がみられる．そこで著者らはこれらの欠点を改良し，より安定性の高い定量法を設定する目的で，塩化第一スズおよび亜鉛末の添加量，発生ビンの容量，塩酸濃度あるいは反応時間等について検討し，二三の知見が得られたので報告する．

実験方法

試薬　硫酸，硝酸，塩酸およびアンモニア水は精密分析用を，その他の試薬は特級を用い，また水はイオン交換樹脂を通した脱イオン水を用いた．

1）アンチモン標準原液：金属アンチモン(99.999%) 1.000g をとり，塩酸 100m*l* に溶解したのち，水で希釈して正確に 1,000 m*l* としてアンチモン標準原液とする．

* 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
** 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

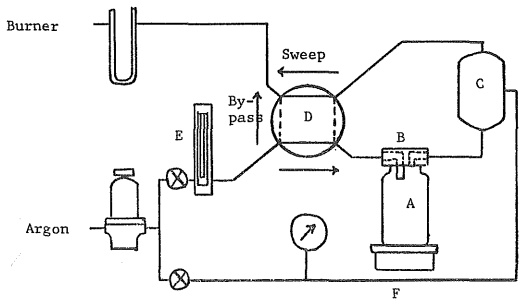


Fig. 1. Diagram of Apparatus of Antimony Hydride Generation
A, reaction bottle : B, connector of reaction bottle : C, tank : D, four-way stopcock: E, flow meter: F, magnetic stirrer.

Table 1. Analytical Conditions of Antimony

Wave length	217.6 nm
Lamp current	15 mA
Argon flow rate	7.0 L/min
Argon gas pressure	1.5 kg/cm² G
Hydrogen flow rate	2.5 L/min
Hydrogen gas pressure	0.4 kg/cm² G
Argon carrier flow rate	5.0 L/min
Generation gas pressure	0.5 kg/cm² G

Apparatus : Nippon Jarrel-Ash Model AA-780 atomic absorption spectrophotometer equipped with a generation and collection system of arsine.

2) アンチモン標準溶液：アンチモン標準原液 5 m*l* を正確にとり，最終液が 5 Nとなるように塩酸を加え，さらに水を加えて 100m*l* としアンチモン標準溶液とする．

3) アンチモン測定溶液：アンチモン標準溶液 1 m*l* を正確にとり，5 N塩酸を用いて正確に1,000m*l* とする．この溶液は 20 m*l* 中にアンチモン 1 μg (Sb として) を含有する．

4) 0.1% (w/v) 塩化第一スズ溶液：塩化第一スズ ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) 0.12 g を濃塩酸に溶かし 100 m*l* とする．

5) 亜鉛末錠剤：バインダーを含有する亜鉛末（日本ジャレル—アッシュ社製）に水を加えてペースト状とし，ステンレス製の亜鉛錠剤成型器に気泡の入らないように注意して充てんし100° で乾燥する．

6) オブラート包装亜鉛末：バインダーを含有しない亜鉛末（和光純薬製）1 g をオブラート（国光オブラート製）に包む．

装置 1) 原子吸光装置：日本ジャレル—アッシュ社製 AA—780 型

2) バーナーヘッド：水冷式 10 cm スリットバーナー

3) 光源：ウェスチングハウス社製アンチモン中空陰極ランプ．

4) アンチモン化水素発生および捕集装置：日本ジャレル—アッシュ社製 ASD—1 A 型（概略をFig. 1 に示す．）

測定操作 試験溶液 20 m*l* を内容量 130 m*l* の発生ビン（A）にとり，塩化第一スズ溶液 0.5 m*l* を加えてふりまぜ，1分30秒間放置したのち，攪拌子およびオブラート包装亜鉛末 1 g を加え，すばやくアンチモン化水素発生器の接続部(B)に連結し，スターラーで攪拌する．2分間反応させた後，アルゴンをキャリヤーガスとして発生したアンチモン化水素をアルゴン—水素炎に導入して吸光度を測定する．測定条件は Table 1 に示す．

試験溶液および空試験溶液の調製 試料10～50g を正確にはかり，ケルダールフラスコに入れ，濃硫酸 5 m*l* と濃硝酸約 5 m*l* を加え，振り混ぜた後石綿上直火で褐色の煙の発生が終わるまで加熱する．この際，フラスコの内容液が無色～淡黄色透明とならない時は冷後過塩素酸 2 m*l* と硝酸 10 m*l* を加えて再び同様に加熱し，以後適宜硝酸 10m*l* ずつを加え無色～淡黄色透明な液となるまでこの操作をくり返す．この分解液に飽和しゅう酸アンモニウム溶液 20 m*l* を加え，白煙が発生するまで直火で加熱する．冷後水を加えて正確に 100 m*l* とし試験溶液とする．別に同様に操作した空試験溶液を調製する．

実験結果および考察

下記の各実験における測定結果は，それぞれの条件において，15回のくり返し実験により得られた吸光度の平均値および相対標準偏差を示す．

発生ビンの内容量 反応により生じたアンチモン化水素には発生ビンおよび貯留ビン中に一定時間貯留されたのちフレーム中に導入されるが，この場合発生ビンの内容量の差によってガスの発生が影響を受けることも考えられるので，発生ビンの至適内容量を求めるために次の実験を行なった．すなわち 80～130 m*l* の内容量の異なる 6 種類の発生ビンを使用し，それぞれ測定操作の項に従い，アンチモン測定溶液 20 m*l* を用いてアンチモン化水素を発生させ，アルゴン—水素炎中に導入して吸光度を測定し，相対標準偏差を求め，その結果を Fig. 2 に示す．内容量 120 m*l* 以上の発生ビンを使用するとやや感度の低下がみられるものの，相対標準偏差は一定となることが認められた．そこで以後の実験においては，試験溶液の増加も考慮し，内容量 130 m*l* の発生ビンを使

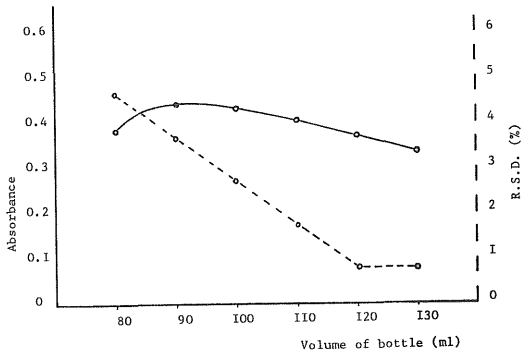


Fig. 2. Effect of Volume of Reaction Bottle
——○——: Absorbance
……○……: R. S. D. (Relative Standard Deviation)

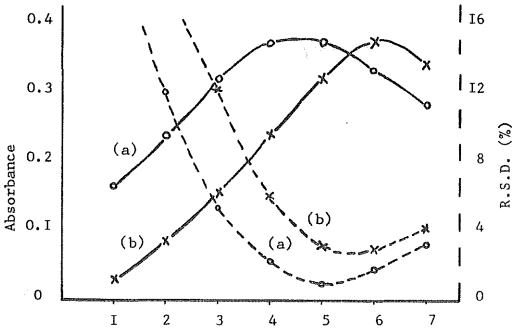


Fig. 3. Effect of concentration of Hydrochloric Acid
(a) ; $SnCl_2$ adding method
(b) ; $SnCl_2$ nonadding method
——: Absorbance
……: R. S. D. (Relative Standard Deviation)

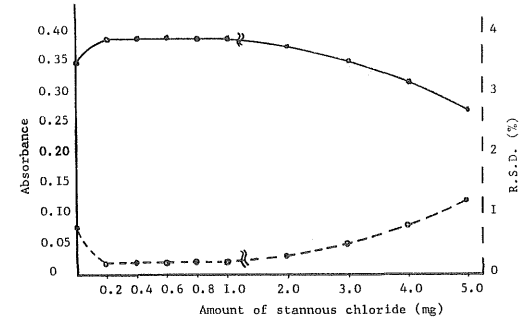


Fig. 4. Effect of Stannous Chloride Concentration on the Reaction of Antimony
——○——: Absorbance
……○……: R.S.D.(Relative Standard Deviation)

用することとした.

試験溶液中の塩酸濃度 ガス発生に最も密接な関係があると考えられる試験溶液の酸濃度について検討した. アンチモン測定溶液 20 m*l* について, 塩酸濃度を 1～7 Nの範囲で変化させ, その他は測定操作の項に従って測定した結果を Fig. 3 に示す. Fig. 3 にみられるとおり塩酸濃度が 5 Nにおいて吸光度は最大値を示し, 相対標準偏差は最小値を示した. 従来の方法[5,6]は塩化第一スズを添加しない方法であるが, 塩酸の至適濃度を 6 Nとしている. しかしながらわれわれの実験条件では 5 Nで十分であり, また精度も従来の方法と比較して, 相対標準偏差において約 1.8 %の向上がみられたことから塩酸濃度は 5 Nとすることにした.

塩化第一スズの添加について 従来のアンチモンの定量法ではヒ素の場合と異なり, 試験溶液に塩化第一スズを添加しない方法が用いられている. しかし上記のように塩化第一スズを添加することにより, 定量値の精度が向上することが認められたのでその添加量について検討した. すなわちアンチモン測定溶液 20 m*l* に塩化第一スズの含有量が 0～5 mg となるように加え, その他の条件は同一として, 吸光度を測定した結果を Fig. 4 に示す. Fig. 4 によると塩化第一スズは 0.1 mg の添加によっても無添加の場合に比較して吸光度は増加し, 0.1～1.0 mg の範囲で一定となり, 以後減少し, また相対標準偏差も同一の範囲で一定となることが認められた. そこで塩化第一スズの添加量は 0.5 mg とし, 試験溶液にはこの量に相当する 0.1% 塩化第一スズ溶液 0.5 m*l* を加えることとした. また塩化第一スズを添加してから亜鉛末を加えるまでの放置時間について検討したところ, 1 分以上の放置時間をとればアンチモンの定量値も一定となり, また相対標準偏差においても十分満足できることが認められたので放置時間は 1 分30秒とすることにした.

亜鉛末の添加方法および添加量 亜鉛末の添加方法は錠剤を用いる方法が一般に行なわれているが, 均一な錠剤を成型するのに熟練を要し, また試験溶液に投入と同時に反応が始まるため, アンチモン化水素の損失をまねきやすく, すばやい操作が必要となる. さきに江波戸[10]らは微量ヒ素の原子吸光分析法に際し, 亜鉛末錠剤のかわりに, 一定量の亜鉛末を市販のオブラートに包み試験溶液へ投入する方法（以下オブラート法と略す）を試み良好な結果を得たことを報告している. そこで本報においても, この両者の方法について検討したところ, 吸光度においては差がみられなかったが実用上での便宜性のみならず精度においても相対標準偏差が約 2 %の向上がみられた. また亜鉛末添加量の吸光度および相対標準偏差におよぼす影響について検討したところ, 0.5～2.5 g

の添加量においては吸光度，相対標準偏差は一定であることが認められたので，亜鉛末添加量は1g とし，オブラート法を用いることにした．

亜鉛末添加後の反応時間　測定操作において，亜鉛末を添加してから発生したガスをフレームに導入するまでの反応時間について検討した結果を Fig. 5 に示す．反応時間を30秒から5分まで検討したところ吸光度はほぼ同じ値を示したが，相対標準偏差は1分30秒以上で良好かつ一定な値となることが認められたため，亜鉛末添加後の反応時間は2分とすることとした．

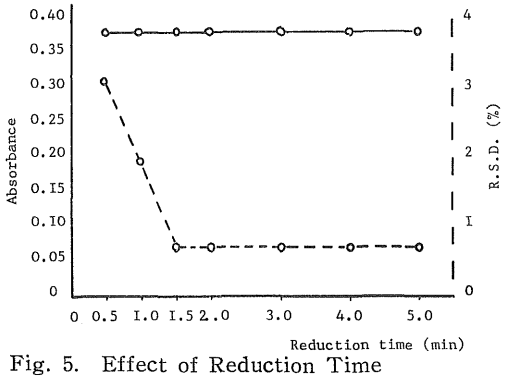


Fig. 5.　Effect of Reduction Time
——○——: Absorbance
……○……: R. S. D. (Relative Standard Deviation)

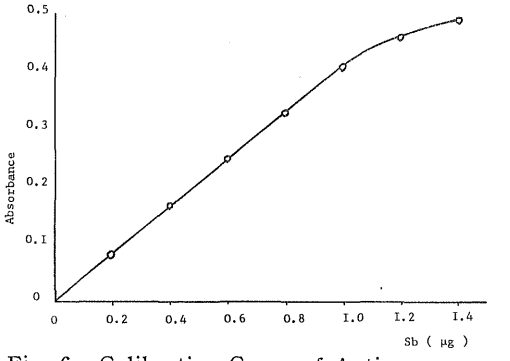


Fig. 6.　Calibration Curve of Antimony

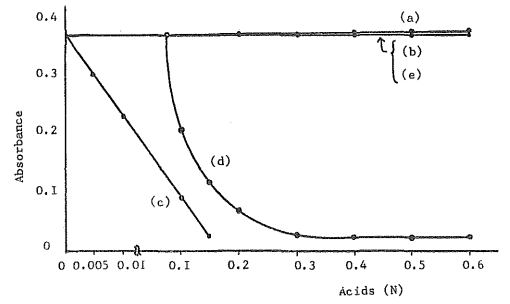


Fig. 7.　Effect of Acids on the Absorbance of Antimony
(a) H_2SO_4 ; (b) $HClO_4$; (c) HNO_3 ; (d) $HNO_3+(NH_4)_2C_2O_4$, boil ; (e) $HNO_3+(NH_4)_2C_2O_4+H_2SO_4$, heat

検量線　今回検討した方法によりアンチモン0～1.5 μg を含有する標準溶液について それぞれ測定操作を行ない検量線を作成し，Fig. 6 に示した．1.0 μg 以下において良好な直線性を得ることができ，その定量限界は 0.1 μg である．

妨害物質　試料の前処理として硫硝酸湿式分解を用いていることから試験液中に残留する過塩素酸，硫酸あるいはこの硫酸をアンモニア水で中和するときに生ずる硫酸アンモニウム等の本法への障害について，また試験溶液中に混在する各種金属イオンの妨害についても検討したので，その結果を Fig. 7, Table 2 および Table 3 に示す．

1) 無機酸：Fig. 7 に示したように 試験溶液中の硫酸の濃度が増加するに従いわずかに正の誤差を生じたが，過塩素酸の存在では誤差が認められなかった．一方硝酸は負の誤差を生じ，0.1 N でアンチモン1 μg の吸収はほとんど消失した．しかし硝酸の添加量の異なるアンチモン試験溶液 20 m*l* にシュウ酸アンモニウム1g および硫酸を1 m*l* 加え，白煙が生ずるまで加熱後，アンモニア水にて中和し，塩酸を用いて酸濃度を調整した後測定したところ，硝酸による影響は全く認められなかった．

2) 硫酸アンモニウム：1 μg のアンチモンを含有する試験溶液に硫酸アンモニウムを添加して測定したところ，6g までの添加において影響は全く認められなかった．

3) 各種金属イオンによる妨害：各種金属イオンの障害について検討した結果を Table 3 に示す．1 μg のアンチモンを含有する試験溶液に各種金属イオンをそれぞれ添加し，測定操作の項に従い，吸光度を測定して影響

Table 2.　Effect of Ammonium Sulfate

Quantity of $(NH_4)_2SO_4$	Absorbance
0	0.373
0.5	0.374
1.0	0.374
2.0	0.373
3.0	0.373
4.0	0.374
5.0	0.373
6.0	0.375

Quantity of $(NH_4)_2SO_4$: g/20m*l*
Sb : 1 μg/20m*l*

を調べたところ，Mg^{2+}, K^{+}, Na^{+} は 10,000 倍量の添加においても妨害はみられなかった．しかしながらAs^{3+}は 1,000 倍量の 添加においてわずかな正の誤差を与えた．また Fe^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Se^{4+}, Te^{6+} は負の誤差を与えたが，なかでも Te^{6+} は 10 倍量において妨害し，約20%の負の誤差を与えた．

精度および回収率　本定量法の適用性を検討するために，試料として，玄米 50 g，魚肉（サバ）50 g，畜肉（牛肉）50 g を用い，試験溶液の調製の項に従って分解し，得られた試料液についてアンチモンの定量を行ない，また上記試料に 0.5 μg および 1 μg のアンチモンをそれぞれ添加したのち分解し，定量操作の項に従い定量を行ない，本法の精度と回収率を検討し，その結果を Table 4 に示した．玄米の回収率は98%で相対標準偏差は 3.2～3.9 %であり，魚肉および畜肉の回収率は共に85%で相対標準偏差は3.5, 4.1%であった．なお鉱物への適用性を調べるために，試料として粉末イオウを用いて試験したところ，回収率は 92, 94 %で相対標準偏差は 4.2～5.3%であった．

Table 3. Effect of Diverse Ions

Diverse ions	Concentration of diverse ions(μg/20ml)	Absorbance
none	—	0.373
As^{3+}	1000	0.375
Mg^{2+}	10000	0.373
K^{+}	10000	0.373
Na^{+}	10000	0.373
Fe^{2+}	5000	0.373
Fe^{3+}	5000	0.345
Co^{2+}	500	0.332
Ni^{2+}	500	0.358
Cu^{2+}	500	0.355
Se^{4+}	100	0.345
Te^{6+}	10	0.307

Sb : 1 μg/20 ml

結　論

塩酸を用いて酸濃度を調整したアンチモンを含有する試験溶液に塩化第一スズを加え，さらに亜鉛末を添加してアンチモン化水素を発生させ，アルゴン—水素炎に導入してアンチモンを測定する原子吸光法について種々の測定条件を検討した．

1) 発生ビンの内容量は 120 ml 以上で良好な精度が得られた．しかし試験溶液の増加および装置の大きさを考慮し，内容量 130 ml の発生ビンを本法において使用することとした．

2) 試験溶液の酸濃度については，5 Nの塩酸酸性において，感度および精度は良好な結果を示した．また本法は塩化第一スズを加えない方法と比較して，相対標準偏差を約1.5%低下させることができた．

3) 塩化第一スズの添加量は，試験溶液 20 ml 中に 0.1～1.0 mg において良好な結果を得ることができたため，0.5 mg とし，0.1%塩化第一スズ溶液 0.5 ml を添加することとした．

4) 塩化第一スズを添加してから亜鉛末を添加するまでの放置時間は 1 分30秒以上あれば良好な精度で測定することができた．

5) 亜鉛末をオブラートに包んで添加する方法は錠剤として添加する方法より操作が簡便でかつ精度も良好であった．また投入量は 1 g で十分であった．

6) 亜鉛末の反応時間は 1 分 30 秒以上であれば，吸光度および精度は良好であることが認められたために反応時間は 2 分とした．

7) 硫酸，過塩素酸および硫酸アンモニウムはアンチモン化水素の発生に影響を与えなかった．硝酸は硫酸-シュウ酸アンモニウム処理においてその障害を除くことができた．金属イオンでは，特に Te^{6+} が障害を与え，10倍量の存在において約20%の負の誤差を生じた．

8) 玄米，魚肉，畜肉にアンチモン 0.5 μg および 1μg を添加して回収率および相対標準偏差を測定したとこ

Table 4. Recovery of Antimony

Sample	N	Sample size(g)	Antimony present($\bar{x}$)(μg)	added	found($\bar{x}$)(μg)	Rec. of added Sb A. V. ($\bar{x}$) (%)	R.S.D. (%)
Rice	5	10	0	0.5	0.48	98	3.2
	5	10	0	1.0	0.97	98	3.9
Fish meat (mackerel)	5	10	0.2	0.5	0.60	85	3.5
	5	10	0.2	1.0	1.02	85	4.1
Beef	5	10	0.1	0.5	0.50	84	3.8
	5	10	0.1	1.0	0.92	85	4.0

A. V. : average
R. S. D. : Relative Standard Deviation

ろ，前者は85～98%で後者は3.2～4.1%であった．

文　献

1) 浜口　博：超微量成分分析，374，1970，産業図書
2) Mostyn, R. A. and A. F. Cunningham: *Anal. Chem.*, 39, 433, 1967
3) Willis, J.B.: *Anal. Chem.*, 34, 614, 1962
4) 小林重雄，乙部貞夫：分化，21，1648，1972
5) Yamamoto, Y., T. Kumamaru, Y. Hayashi, and R. Tsujino: *Anal. Lett.*, 5, 419, 1972
6) 寺島　滋：分化，23，1332，1974
7) Fernandez, F.J.: *At. Abs. News.Lett.*, 12, 93, 1973
8) Kan, K.T.: *Anal. Lett.*, 6, 603, 1973
9) Schmidt, F.J. and J.L. Royer: *Anal. Lett.*, 6, 17, 1973
10) 江波戸擧秀，天川映子，山野辺秀夫，鈴木助治，戸谷哲也：食衛誌，15，469，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 132—135, 1976

東京都における PCB 汚染の実態について（第4報）
食品中の PCB 含有量について

鈴木助治*, 山崎清子*, 山野辺秀夫*, 小泉清太郎*
戸谷哲也*, 松本茂*

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (IV)
Polychlorinated Biphenyl Content of Foods

SUKEJI SUZUKI*, KIYOKO YAMAZAKI*, HIDEO YAMANOBE*,
SEITARO KOIZUMI*, TETSUYA TOTANI* and SHIGERU MATSUMOTO*

Determinations of polychlorinated biphenyls (PCB) in fishes, shellfishes, dairy products, meats and mother' s milk which were collected in Tokyo were made by gaschromatography. Consequently, it was found that the PCB concentrations in all samples examined did not exceed limit of PCB provisional standard settled by the Ministry of Welfare in 1972. This survey on fishes showed to become lower in mean concentration (0.06ppm) of PCB than that of the survey in 1973 and 1974. However, some of viscera of fishes were found to be containing high concentrations of PCB, e.g., Suzuki (perch)contained 12.72 ppm of PCB. It is considered that viscera and meats of these fishes need to be checked continuously on PCB pollution.

緒　言

PCB による環境汚染は，これまでに多くの研究者によってその実態の解明がなされてきた．昭和47年にPCBの製造，使用の禁止あるいは食品中の PCB の暫定規制値の設定などの行政措置がうち出され，これらの措置によって PCB の環境汚染の進行は停止されるに至った．しかし食生活上重要な魚介類からは現在なお PCB が検出されており，またその化学的安定性が高いことを考えると，食物連鎖系を通して長期間にわたり魚介類への PCB の蓄積，濃縮あるいは拡散が行なわれてゆくものと予想される．われわれは都民の食生活の安全性確保を目的として前報[1-3]にひきつづき今年度も食品，主として魚介類に重点を置いて PCB の実態調査を行なったので報告する．

調査方法

調査試料は昭和50年4月より昭和51年3月までの間に東京都内の市場および小売店から入手した．その内訳は魚31種類70検体，貝類5種類9検体，食肉5種類38検体，乳製品4種類50検体，鶏卵10検体，母乳20検体，包装紙4検体，計48種類201検体である．PCB の測定方法は前報[1,2]と同様に，アルカリ分解法による前処理ののち，ECD 付ガスクロマトグラフィーによって PCBの定量を行なった．

結果および考察

Table 1に魚の調査結果を示す．魚31種類70検体のうち38検体に PCB が検出され，検出率54%（ただしPCB含有量として trace すなわち 0.004 ppm 以下のものは不検出とした），全体の平均は 0.06 ppm であった．最高値はボラの 0.60 ppm，平均 0.44 ppm であり，そのほかかなり高い値を示したものは，コノシロ 0.54 ppm，スズキ 0.48 ppm の2魚種であった．いずれも PCB 暫定規制値[4]（遠海沖合魚介類 0.5 ppm，近海内湾魚介類 3.0 ppm）を越えるものはない．調査した検体数が比較的多い魚種について，われわれが調査してきた昭和48年度[2],49年度[3]と今回の結果を平均値で比べてみると（以下この年度順に数値をあげる），ボラ 0.40 ppm, 0.53 ppm, 0.44 ppm，コノシロ 0.44 ppm, 0.41 ppm, 0.39 ppm，サバ 0.20 ppm, 0.27 ppm, 0.05ppm，イワシ0.08 ppm, 0.08 ppm, 0.03 ppm であり，これらの魚種についてはそれぞれ調査年度で大きな変動はみられない．し

* 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

Table 1. Concentrations of PCB in Sea Fishes

Sample	PCB Concentration in fish meat (ppm wet wt)			PCB concentration in internal organ (ppm wet wt)		
	N	Range	Mean	N	Range	Mean
Aji (horse-mackerel, Trachurus trachurus)	3	0.02—0.10	0.05	3	0.02—0.23	0.11
Anago (conger, Astroconger myriaster)	1		0.07	1		trace
Anko (angler, Lophius litulon)	2		trace	2		trace
Binnaga (tuna, Germo alalunga)	1		trace	-		
Bora (gray mullet, Mugil cephalus)	2	0.29—0.60	0.44	2	0.53—1.12	0.83
Buri (yellow tail, Seriola quinqueradiata)	1		nd	1		trace
Hiramasa (Seriola aureovittata)	1		trace	1		0.01
Hirame (flounder, Paralichthys olivaceus)	3		trace	2	trace—0.03	0.02
Hokke (Pleurogrammus azonus)	2	0.01—0.02	0.02	2		trace
Isaki (Parapriatipoma trilineatum)	2	trace—0.02	0.01	2	trace—0.03	0.02
Iwashi (sardine, Sardinops melanosticta)	2	0.01—0.04	0.03	2	trace—0.03	0.02
Katsuo (bonito, Katsuwonus pelamis)	2		trace	2		trace
Kisu (sillago, Sillago sihama)	1		0.01	1		0.12
Konoshiro (Clupanodon punctatus)	3	0.20—0.54	0.39	3	0.16—0.48	0.27
Koi (carp, Cyprinus carpio)	3		trace	3	nd—0.02	0.01
Kurumaebi (prawn, Peraeus japonicus)	2	trace—0.03	0.02	-		
Masu (trout, Oncorhynchus masou)	1		trace	1		trace
Makogarei (flat fish, Limanda yokohamae)	3		trace	3	nd—0.03	0.01
Mutsu (Scombrop boops)	1		0.09	1		0.17
Nishin (herring, Clupea pallasi)	1		0.03	1		trace
Oakamuro (Decapterus russelli)	1		0.02	1		0.05
Saba(mackerel, Pneumatophorus japonicus)	13	trace—0.12	0.05	13	trace—0.10	0.05
Sanma (mackerel pike, Cololabis saira)	1		trace	1		trace
Sawara (Scomberomorus niphonius)	5	nd—0.05	0.01	3	nd—0.12	0.04
Suketoodara (Theragra chalcogramma)	2		trace	2	trace—0.10	0.05
Suzuki (perch, Lateolabrax japonicus)	2	0.32—0.48	0.40	2	4.88—12.72	8.80
Surumeika (Todarodes pacificus)	3	trace—0.01	trace	3	0.04—1.50	0.57
Shiroamadai(Branchiostegus argentatus)	3		nd	3		nd
Syako (Squilla oratoria)	1		0.06	-		
Takabe (Labracoglossa argentiventris)	1		trace	1		0.02
Tobiuo (flying fish, Prognichthys agoo)	1		trace	1		trace

nd : not detected, N : number of samples

Table 2. Concentrations of PCB in Fishes in the 1973-1975 Survey

Year	N	No. of positive samples (%)	Range (ppm)	Mean (ppm)
1973	130	75	nd—1.87	0.15
1974	83	63	nd—1.22	0.09
1975	70	54	nd—0.60	0.06

nd : not detected, N : number of samples

かし各年度全体の調査結果 (Table 2) からみると, 48, 49, 50年度の PCB の検出率はそれぞれ75%, 63%, 54% と低下し, また各年度の平均値も 0.15 ppn, 0.09ppm, 0.06 ppm と明らかに減少の傾向を示している. このことはさらに PCB の濃度範囲を魚種別にみても認められる. すなわち 0.00—0.05 ppm の値を示した 48, 49, 50 年度の魚種は, それぞれ全体の 51%, 67%, 74%. 0.05—0.5 ppm のものは38%, 31%, 26%. 0.5 ppm 以上のものは11%, 2%, 0%であり, また内臓中の PCB も各年度順に 0.00—1.0 ppm の値を示した魚種の割合を列記すると全体の85%, 95%, 97%である. したがって可食部と内臓のいずれも年度順に PCB 低濃度魚種の割合が増加している. われわれが今までに調査した魚は, その種類や検体数が限られたものであるため, このような PCB の減少傾向をもって直ちに現在の魚類全体の PCB 汚染や PCB による海洋汚染が低下していると断定することはできないが, 昭和47年度における PCB の製造ならびに使用規制の効果があらわれてきたものではないかと思われる.

内臓は28種類63検体について調査したが, その検出率

Table 3. Concentrations of PCB in Dairy Products

Sample	N	PCB concentration in wet material (ppm)		PCB concentration in extractable fat (ppm)	
		Range	Mean	Range	Mean
Milk	25		trace	nd — 0.18	0.02
Modified milk powder	5		trace		trace
Process cheese	12	nd — 0.01	0.01	nd — 0.04	0.02
Butter	8	trace — 0.04	0.01		
Hen's egg	10	trace — 0.02	trace		

nd : not detected, N : number of samples

は51%，全体の平均は 0.37 ppm であった．このうち高い値を示した魚種はスズキの 12.72 ppm, 4.88 ppm，ボラの 1.12 ppm, 0.53 ppmであった．これらの内臓と可食部の値は明確な相関性を示さなかったが，昭和48年[2]，49年[3] と今回の結果から考えると，①内臓に多く可食部に少ないもの，②両者共に比較的多いもの，③両者共に少ないもの，④内臓に少なく可食部に比較的多いものにわけられる．つぎにこれらの例について調査年度，魚種名，(可食部の PCB ppm, 内臓の PCB ppm) の順に記載する．

①に属するもの：50年　スズキ (0.48, 12.72)(0.32, 4.88)，スルメイカ (0.01, 1.50)，49年　アジ (0.12, 1.19)　サヨリ (0.19, 1.87)，48年　フッコ (0.75, 26.82) (0.78, 4.98)，ウミタナゴ (0.05, 2.37)，カレイ (0.11, 6.12)，ハマチ (0.63, 3.58)

②に属するもの：50年　ボラ (0.60, 1.12) (0.29, 0.53)，49年　ボラ (1.02, 4.23)，サバ(1.22, 3.70)，48年　サバ (1.20, 2.35) (0.59, 2.30)，コノシロ (0.42, 0.79) (0.57, 1.12)

③に属するもの：ほとんどの魚が③の場合である．

④に属するもの：50年　コノシロ (0.43, 0.16)，49年コノシロ (0.63, 0.11)，イワシ (0.20, 0.01)，サバ (0.34, 0.08)，48年　アナゴ(1.87, 0.17) (1.56, 0.45).

以上の結果から考察するとき，内臓は肉部に比較して脂肪分が多いため PCB が蓄積しやすい状態にあると云えるが，このような可食部に対する内臓中の PCB の量的変動はそれらの諸臓器の代謝機能に由来すると思われ，これらの結果が代謝過程における PCB の内臓から肉部への移行をある程度示唆しているものと考えられる．今回調査したスズキのように極めて多くの PCB が内臓に含まれている場合もあり，当然肉部への移行が予想されるので，今後も魚の可食部と内臓の PCB を調査してゆく必要がある．

貝類についてはアカガイ 2 検体，ハマグリ 3 検体，カキ 2 検体，サザエ 1 検体，ヤマトシジミ 1 検体を調査したが，PCBが検出されたものはカキ 2 検体共に，0.06 ppm，ヤマトシジミ 0.02 ppm であった．そのほかはいずれも trace 程度であり，暫定規制値[4] を越えるものはない．

Table 4. Concentrations of PCB in Meats

Sample	N	PCB concentration (ppm wet wt)	
		Range	Mean
Beef	7		trace
Pork	11	nd — 0.01	trace
Chicken	10	nd — 0.02	0.01
Cow liver	1		trace
Pig liver	9		trace

nd : not detected, N : number of samples

乳製品，鶏卵，肉類の結果は Table 3 と 4 に示す通りである．いずれも PCB 含有量は極めて少なかった．食生活上比較的摂取量の多いと思われる牛乳や育児用粉乳は過去 2 年間の調査[2,3] でも trace であり，暫定規制値[4] をはるかに下回っている．また包装紙についても 4 検体調査したが，いずれも検出しなかった．

われわれは昭和47年度以降毎年 PCB による母乳汚染の実態調査を行なってきたが，今回も都内に在住する授乳中の産婦20人より出産後 2—3 週間以内の母乳の提供を受け，それらについて PCB の調査を行なった．その結果全例より PCB が検出され，そのパターンはKC—500にほぼ一致していた．全乳あたりの値は0.011—0.084 ppm，平均 0.035 ppm，脂肪あたり，0.27—1.15 ppm，平均 0.81 ppm であった．過去 3 年間のわれわれの調査[1-3] では全乳あたり 47 年平均 0.031 ppm，48 年平均 0.030 ppm，49年平均 0.029 ppm であったが，今回の結果はこれらよりやや高い値を示した．厚生省の47—49年における全国平均値[5] が，0.035, 0.032, 0.028 ppm であり，また兵庫県[5]，長崎県[6]，宮崎県[7] などの調査で毎年漸減傾向を示しているのに比べて，われわれの結果がむしろ高くなっていることは，乳児の PCB摂取許容

量[5,8] 0.033 ppm を若干越えていることからも注目される．ただ上記の測定値は母乳の採取時期や個人差によって変わる可能性があるので，さらに母乳の継続調査が必要と思われる．

まとめ

魚，貝，食肉，乳製品，鶏卵，包装紙，母乳についてPCBの調査を行なった．いずれも暫定規制値を越えるものはなかった．過去2年間の結果と比べて魚のPCBは若干漸減傾向にあることがわかった．しかし可食部に比べて内臓に高い値を示すものがあり，それらの肉部への移行を考えると，さらに継続調査が必要であろう．また母乳は全乳あたり平均0.035 ppm であった．この値は昨年の全国平均0.028 ppm を上回り，乳児の摂取許容量0.033 ppm とほぼ同程度であった．

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，食品監視課ならびに母子衛生課の方々に深謝致します．

文献

1) 原田裕文，観 照雄，植田忠彦，竹内正博，江波戸擧秀，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) 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，26—1，134，1975
4) 昭和47年8月に厚生省が設定したPCBの暫定規制値：遠海沖合魚介類0.5 ppm，近海内湾魚介類3.0ppm，牛乳0.1 ppm，乳製品1.0 ppm，育児用粉乳0.2 ppm，肉類0.5 ppm，卵類0.2 ppm，容器包装5.0 ppm
5) 深瀬 治，寺西 清，磯村公郎：兵庫県衛生研究所研究報告，10，26，1975
6) 桑野紘一，馬場強三，吉田一美：長崎県衛生公害研究所報，14，72，1974
7) 堀内邁一，串間奉文，本田喜善：宮崎県衛生研究所報，16，18，1974
8) 林路彰：第32回日本公衆衛生学会総会，広島，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 136—140, 1976

Incidence of *Clostridium perfringens* in Food of Animal Origin

MASAKO KANZAKI*, YATARO KOKUBO*, KATSUHIKO JINBO*,
HAJIME MURAKAMI* and MISAO HARUTA*

Since *Clostridium perfringens* type A is an ubiquitous organism, it is widespread over the earth[1], and is a normal inhabitant of the intestinal tract of man and animals[1,2]. Therefore, food of animal origin often becomes contaminated with the organism in various ways, e.g., meat may be contaminated by excrement-borne organisms during slaughtering, skinning, scrapping operations and inspection. In the early report linking *C. perfringens* with food poisoning, Hobbs et al.[1] reported that the heat-resistant spore-formers were the responsible organisms of food poisoning, since in England, incriminated foods involved in outbreaks of *C. perfringens* foodborne illness were usually meat or poultry that has been boiled or lightly roasted. Later, however, Hall et al.[3] and Hauschild et al.[4] proved that when sufficient numbers of *C. perfringens* were ingested, regardless whether the organism is heat-resistant or heat-sensitive, the organisms will form spores in the intestine and cause food poisoning.

Thus, it is favorable to clarify the degree of average contamination by the organisms in various foods of animal origin, both in ingredients and finished products, to establish an appropriate standard for the finished products, for controlling outbreaks of *C. perfringens* foodborne illness.

Materials and Methods

1. *Food samples*

During the period from December 1974 to November 1975, a total of 1,034 samples consisting of 62 raw fish-pastes, 197 finished fish-paste products, 80 raw meat for processing and 695 hams and sausages, obtained from the processing plants and retail shops in Tokyo, was subjected for the presence of presumptive *C. perfringens*.

2. *Media*

a. *Semi-solid Shahidi-Ferguson Perfringens (SFP) agar*

A concentration of agar in SFP medium which originally reported by Shahidi and Ferguson[5] was reduced to 0.05%, i.e., composed of 15g of tryptose(Difco), 5g of soytone (Difco), 5g of yeast extract (Difco), 1g of sodium metabisulfite, 1g of ferric ammonium citrate, 1mg of resazurin sodium salt, 30,000u of Polymyxin B, 12mg of Kanamycin sulphate, 0.5g of agar and 1,000m*l* of distilled water. After the medium was dissolved completely, pH was adjusted to 7.6, and 10m*l* aliquot was transferred to test tubes (18×180mm) and sterilized at 121°C for 10 minutes. For the original sample suspensions, 10m*l* of double strength medium was used.

b. *Clostridium Welchii (CW) agar plate*

Commercial dehydrated medium (Nissan) of the following composition, of 5g of heart infusion (Nissan), 10g of proteose peptone W (Nissan), 10g of casein-peptone (Nissan), 5g of sodium chloride, 10g of lactose, 0.05g of phenol red, 20g of agar and 0.2g of Kanamycin sulphate, pH 7.6±0.1, was suspended in 1,000m*l* of distilled water and heated gently to dissolve the agar. After the medium was cooled to about 50°C, 30m*l* of egg yolk was added to the medium and 15m*l* of the agar was

* 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

poured into petri dishes.

c. *Modified Duncan-Strong (DS) sporulation medium*

The medium modified by Uemura[6] of the following composition was used. Ingredients of the medium are 2g of yeast extract (Difco), 18g of proteose peptone (Difco), 12g of $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.5g of Na-thioglycolate, and 4g of soluble starch in 1,000m*l* of distilled water. After pH was adjusted to 7.0±0.1, 10m*l* aliquot was transferred to test tubes (18×180mm) and sterilized at 121°C for 15 minutes.

3. *Enumeration of presumptive C. perfringens*

One milliliter aliquots (10m*l* for double strength medium) of 10^{-1}–10^{-5} dilutions of the samples were dispensed into tripricate 10m*l* of the above mentioned modified SFP. After the incubation at 46°C overnight, most probable number (MPN) of presumptive *C. perfringens* was calculated from the number of blacken tubes.

4. *Isolation and identification of the organism*

Isolation of the organism was made from one of the three highest dilutions showing positive reaction. One loopful from each blacken tube was plated onto CW agar plate. After the incubation at 35°C overnight in an anaerobic jar, typical colony was fished. For the confirmation of the isolates, they were streaked onto CW agar plate in which anti-*C. perfringens* type A toxin-filterpaper (Nissui) was laid.

Results

1. *Incidence of presumptive C. perfringens in raw fish-paste and its finished products*

As it will be seen in Table 1, only 3 (4.8%) of 62 raw fish-pastes tested showed a contamination level of greater than 10^3/100g of the presumptive organisms. It is indicating that these raw fish-pastes tested were relatively in good conditions and likely to be handled satisfactory in the plant. When same survey was conducted on finished fish-paste products, known as typical and traditional Japanese protein foods, such as "Tsumire", "Hanpen", "Chikuwa" and "Suji" etc., obtained from retail shops, only 6 (3.0%) of 197 showed a contamination level of 10^2/100g of the organisms. None of the finished products that have been contaminated with greater than 10^3/100g of the organisms was found.

Table 1. Incidence of Presumptive *C. perfringens* in Fish-Paste and Its Finished Products

	Specimens	No. of tested	Degree of contamination by *C. perfringens*/100g			
			$<10^2$	10^2	10^3	10^4
Fish-paste	Codfish	29	27	1		1
	Shark	3	2	1		
	Hair-tail	2	1	1		
	Miscellaneous	28	17	9	1	1
Finished products	"Tsumire"	65	62	3		
	"Hanpen"	56	55	1		
	"Chikuwa"	7	7			
	"Suji"	17	17			
	Miscellaneous	52	50	2		

2. *Incidence of presumptive C. perfringens in raw meat and hams and sausages*

To clarify the degree of contamination by the enumeration of presumptive *C. perfringens*, the meat samples supposed to use for the production of Vienna sausages were taken from the 8 medium size meat processing plants in Tokyo. As it will be seen in Table 2, pork and beef removed from

their head and mixed raw meat pastes were tended to be contaminated more heavily with the organisms than the other 6 sorts of meat, such as red pork, rabbit meat, mutton, horse meat, minced beef, and minced beef and pork. When meat products obtained from retail shops in Tokyo were tested, 37 (5.3%) of 695 samples were contaminated with a level of greater than 10^3/100g of the organisms, and 213 (30.6%) were 10^2/100g levels respectively. It is apparent from the results that among the meat products tested, sausages tend to have contaminated with greater numbers of the organisms than the other types of meat products.

Table 2. Incidence of Presumptive *C. perfringens* in Raw Meat and Its Finished Products

	Specimens	No. of tested	Degree of contamination by *C. perfringens*/100g				
			$<10^2$	10^2	10^3	10^4	10^5
Raw meat	Pork from head	11	1	2	5	2	1
	Red pork	21	9	9	2	1	
	Rabbit meat	13	8	5			
	Mutton	8	5	2	1		
	Horse meat	5	3	2			
	Beef from head	4		1	1	1	1
	Minced beef	3	2			1	
	Minced beef and pork	7	2	5			
	Mixed raw meat paste	8	1	3	1	3	
Processed products	Loins ham	46	45	1			
	Pressed ham	91	88	2		1	
	Other hams	65	65				
	Vienna sausage	301	111	165	22	2	1
	Frankfurter	60	25	30	5		
	Salamis	18	12	3	1	1	1
	Other sausages	71	62	6	3		
	Miscellaneous	43	37	6			

3. *Thermostability of the isolates*

Ten milliliters of the 72 hour cultures of the isolates in modified DS sporulation medium[6] were divided into 3 portions, and heated at 60, 80 and 100℃ for 10 minutes respectively. After the heating, they were cooled immediately and 0.1m*l* of each portion was transferred into modified SFP to determine the degree of heat tolerance of the spores produced. As it will be seen in Table 3, 24(21.4%) of 112 isolates obtained from hams and sausages were capable to produce heat resistant spores endurable to the heating at 100°C for 10 minutes. However, none of the isolates from fin-

Table 3. Degree of Thermotolerance of the Representative *C. perfringens* Isolates

Source of the isolates	No. of strains tested	No. of thermophilics at 60°C for 10 minutes	No. of thermotolerants at		
			60°C for 10 minutes	80°C for 10 minutes	100°C for 10 minutes
Hams and sausages	112	1 (0.9)	2 (1.8)	85 (75.9)	24 (21.4)
Raw meat	36	0	4 (11.1)	31 (86.1)	1 (2.8)
Fish-paste products	8	3 (37.5)	1 (12.5)	4 (50.0)	0
Raw fish-paste	7	0	0	7 (100.0)	0
Total	163	4	7	127	25

Note: Figures in the table indicate the numbers of strains, and parentheses indicate percent occupied.

ished fish-paste products was tolerable to the same heating condition.

4. *Hobbs' serotypes of the isolates*

The 24 hour cultures of the isolates on CW agar plate were washed and resuspended in 0.9% saline, (and heated at 100°C for 1 hour) and serotyped into the known Hobbs' serotypes 1~17 by slide-agglutination tests. As it will be seen in Table 4, only 15 (9.2%) of 163 isolates obtained through this survey could be typed into the Hobbs' serotypes, and most of them were the one obtained from hams and sausages. However, none of the isolates from finished fish-paste products could be typed into her serotypes.

Table 4. Hobbs' Serotypes of the Representative *C. perfringens* Isolates

Source of the isolates	No. of strains tested	Hobbs' serotype																	untypable
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Hams and sausages	112	3				1		1	2	1			1			1	1		101
Raw meat	36														1	1			34
Fish-paste products	8																		8
Raw fish-paste	7		1								1								5
Total	163	3	1			1		1	2	1	1		1		1	2	1		148

Discussion

Much efforts have been payed by many workers to isolate[1] or to enumerate[2] *C. perfringens* in foods, however, the interpretation of the counts of the organism in food is rather difficult. Because, degree of the contamination may vary in different parts of the samples tested, and the numbers of the organism in food may change during the interim between laboratory testing and their consumption. Of course, the mere presence of *C. perfringens* in food is not directly related to the risk of occurrence of food poisoning. The contamination of food by the organism from environment cannot account for millions of viable cells that required to develop symptoms.

Among the 3 principles of foodborne disease control, i.e., a) limitation of contamination, b) inhibition of growth and c) destruction of the organism[7,8], only inhibition of growth is likely to be a practical procedure applicable for controlling outbreaks of *C. perfringens* foodborne illness[9]. However, as it was shown in Tables 1 and 2, heat-resistant spores of the organism in ingredients of the products could not be destroyed during their heating process and will remain in the products. Therefore, it is desirable to pay every possible effort, practical in an operation, to reduce the numbers of the initial contamination of the organism in ingredients of the products.

With regard to the serotypes of the food isolates, 15 (9.2%) out of 163 strains were typed into 1~17 Hobbs' types. Of them, only 2 strains (Hobbs' types 3 and 8) exhibit heat resistance at 100℃ for 10 minutes boiling. In general, howerer, spores with different heat resistance are likely to be present in the same cultures, but it is not clear that how this is related to enterotoxigenesis. Thus, in the further studies on the enterotoxigenesis of the food isolates, enterotoxin productivity of the strains should be clarified.

Summary

During the period from December 1974 through November 1975, a total of 1,034 specimens, consisting of 62 raw fish-pastes, 197 finished fish-paste products, 80 raw meat for processing, and 695 hams and sausages, was subjected for the presence of presumptive *C. perfringens*. Of the specimens tested, 15 (24.2%) of 62 raw fish-pastes harbored greater than 10^2 per 100g of the organisms, but only 6 (3.0%) of 197 finished fish-paste products showed a same grade of the contamination. As for the meat products, 250 (36.0%) of 695 specimens showed contamination levels of greater than

10^2 per 100g, while 49 (61.3%) of 80 raw meat for processing harbored the same amount of the organisms. Among the meat products tested, sausages tended to show greater contamination than the other types of meat products.

Of the 163 isolates tested for their thermotolerance, 152 (93.3%) strains were able to survive through the heating process at 80°C for 10 minutes, and 25 (15.3%) showed a heat resistance against 10 minutes boiling. Fifteen (9.2%) of 163 isolates were typed into 11 Hobbs' serotypes, and most of them were the ones from hams and sausages.

References

1) Taylor, A. W. and W. S. Gordon: *J. Pathol. Bacteriol.*, 50, 271, 1940
2) Hobbs, B. C., M. E. Smith, C. L. Oakley, and G. H. Warrack: *J. Hyg.*, 51, 75, 1953
3) Hall, H. E., R. Angelotti, K. H. Lewis, and M. J. Foter: *J. Bacteriol.*, 85, 1094, 1963
4) Hauschild, A. H. W. and F. S. Thatcher: *J. Food Sci.*, 32, 467, 1967
5) Shahidi, S. A. and A. R. Ferguson: *Appl. Microbiol.*, 21, 500, 1971
6) Uemura, T.: *Jap. J. Bact.*, 29, 345, 1974 (in Japanese)
7) Bryan, F. L.: *J. Milk Food Technol.*, 31, 110, 1968
8) Bryan, F. L.: *ibid.*, 31, 131, 1968
9) Bryan, F. L.: *ibid.*, 32, 381, 1969

動物性食品中のウェルシュ菌分布

神崎政子*, 小久保彌太郎*, 神保勝彦*
村上一*, 春田三佐夫*

1974年12月から1975年11月の間に，都内の食肉魚介加工場ならびに小売店より採取した食肉魚介製品とその主原料計1,034例について，A型ウェルシュ菌(以下ウ菌)による汚染状況を推定ウ菌を指標としたMPN法で調査した．その結果，原料魚すり身では62例中15例(24.2%)が10^2/100gレベル以上の推定ウ菌に汚染されていたが，その製品では同レベル以上の汚染が197例中6例(3.0%)に認められたにすぎなかった．原料畜肉では80例中49例(61.3%)が10^2/100gレベル以上の汚染を示すと同時に，その製品でも695例中250例(36.0%)が同レベル以上の菌によって汚染されていることがわかった．なお，変法DS培地に接種した分離株163株中152株(93.3%)は80°，10分の加熱に耐え，そのうち25株(15.3%)は，100°，10分の加熱にも耐え生残した．また，分離株中15株(9.2%)が11のHobbs血清型に型別されたが，その大半は食肉製品由来株であった．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 141—145, 1976

Pre-enrichment Media for the Resuscitation of Osmotically Injured *Vibrio parahaemolyticus* in Seafoods

MASAO MATSUMOTO*, KATSUHIKO JINBO*, FUMIKO MURAKAMI*, MASAKO KANZAKI*, HAJIME MURAKAMI* and MISAO HARUTA*

Fishbein et al.,[1] and Nakanishi et al.,[2] reported on the most probable number (MPN) technique for the enumeration of *V. parahaemolyticus* in seafoods. The former is by using triplicate tubes of glucose salt teepol broth and latter by employing quintuplicate tubes of salt colistin broth or salt polymyxin B broth. In practice, however, these methods are rather laborious or insensitive to recover an extremely low numbers of *V. parahaemolyticus*. Particularly, the organisms suffering from cold or osmotical injuries are tend to failed to multiply in the presence of other closely related marine vibrios in the samples.

Recently, Murakami et al.[3] reported more simple, sensitive, and practicable technique, for the recovery of presumptive *V. parahaemolyticus* in seafoods. However, it was found that some of the organisms in market seafoods which being placed in immersed waters are not active enough to multiply in the pre-enrichment medium reported by Murakami et al.[3] Thus, in this study, an attempt was made to develop more suitable pre-enrichment medium will be effective for the resuscitation of the osmotically injured organisms, as well as the ones injured by being placed in the lower temperature.

Materials and methods

1) *Organisms* Following 5 laboratory stock strains were cultured in 1% peptone water with 3% NaCl, and used for the basic experiments, i. e., *V. parahaemolyticus* 3454-1, *V. alginolyticus* C-13, *V. abalonicus* ATCC 27390, and two other closely related marine vibrios V-93-1 and V-38-1.

2) *Immersed waters of market seafoods* During the period from May to October 1974, 223 samples of the immersed water of shucked shellfish, such as "Kobashira" (shell ligament of *Mactra chinensis*), "Shitakiri" (foot of *Mactra chinensis*), and "Sakiaka" (*Scapharca broughtonii*) were obtained from the Tokyo Central Wholesale Market.

3) *Basal resuscitation medium* For the pre-enrichment of the injured organisms in the samples, tryptone-soytone-yeastextract-broth (TSYB) with following composition was applied as a basal resuscitation medium, i.e., 1.7% of tryptone (Difco), 0.3% of soytone (Difco), 0.3% of yeastextract (Difco), 0.25% of dextrose, 0.25 % of dipotassium phosphate and 2.0 % of sodium chloride. After the medium was dissolved completely, pH was adjusted to 7.3 ± 0.1 and sterilized at 121°C for 15 minutes.

4) *Experimental preparation of an osmotically injured V. parahaemolyticus* One tenth milliliter of the 24 hour culture of *V. parahaemolyticus* 3454-1 strain in 1 % peptone water with 3% NaCl was suspended in 100m*l* of sterilized distilled water and kept at 0° C for 30 minutes. The preparation of the injured cells was always made immediately before the each experiment.

5) *Selective enumeration of the organism* Procedure used for the enumeration of presumptive *V. parahaemolyticus* in the specimens was the one described by Murakami et al.,[3] i.e., 1 m*l* aliquots of

* 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

10^{-1}—10^{-7} dilutions of samples were dispensed into triplicate 10m*l* of the test pre-enrichment media. After incubation at 35°C for 18 hours, one loopful from each growth positive tube was inoculated into 3 m*l* of arabinose colistin peptone water(ACPW)with 7 % NaCl, and incubated at 35°C overnight. MPN of presumptive *V. parahaemolyticus* was calculated from the number of ACPW tubes which showed their color change from red to yellow.

Results

1) *Comparison of the effect of pre-enrichment media for the resuscitation of osmotically injured V. parahaemolyticus* As it will be seen in Table 1, colistin broth with 2 % NaCl (Eiken) and 1% peptone water with 3 % NaCl or 6 % NaCl were not effective for the resuscitation of osmotically injured *V. parahaemolyticus*. Supplement of 0.1 % organic acids in TSYB yielded 50 % increase on the recovery of the organisms than TSYB alone. Furthermore, it was found that when we used ACPW subsequent to the pre-enrichment of experimentally prepared mixtures, containing relatively low numbers of osmotically injured *V. parahaemolyticus* and extremely large numbers of above mentioned 4 other strains, the results obtained by MPN always agreed well with the numbers supposed to be inoculated in the mixture. No inhibitory effect of 4 other marine vibrios was observed, although these competitors used were able to grew well in the pre-enrichment media with 0.1% of the organic acids.

2) *Salt concentration of immersed waters used for shucked shellfish* Salt concentration of immersed

Table 1. Effect of Several Pre-enrichment Media Used the Resuscitation of Osmotically Injured *V. parahaemolyticus*

Pre-enrichment media used	Organisms recovered by ACPW (MPN/100m*l*)	Relative recovery rate (%)
TSYB	1.6×10^4	100
TSYB with 0.1% sodium pyruvate	2.4×10^4	150
TSYB with 0.1% sodium fumarate	2.3×10^4	150
TSYB with 0.1% sodium succinate	2.4×10^4	150
TSYB with 0.1% sodium acetate	2.4×10^4	150
TSYB with 0.1% sodium lactate	2.4×10^4	150
TSYB with 0.1% sodium citrate	2.4×10^4	150
TSYB with 0.1% sodium dl-malate	2.4×10^4	150
TSYB with 0.1% sodium 0.1% *l*-malatic acid	2.4×10^4	150
TSYB with 0.1% oxalacetic acid	2.4×10^4	150
TSYB with 1 % arabinose	3.5×10^3	22
Colistin broth water with 2 % NaCl (Eiken)	2.4×10^3	15
1 % peptone with 3 % NaCl	1.3×10^3	8
1 % peptone water with 6 % NaCl	$<2.3 \times 10^1$	<0.1

Table 2. Concentration of Sodium Chloride in Immersed Waters Used for Shucked Shellfish

Immersed waters used for	No. of tested	Concentration of NaCl in immersed waters		
		<0.29%	0.3~0.9%	≧1 %
"Kobashira" (shell ligament of *Mactra chinensis*	83	1 (1.3%)	10 (12.0%)	72 (86.7%)
"Shitakiri" (foot of *Mactra chinensis*)	54	30 (55.6%)	22 (40.7%)	2 (3.7%)
"Sakiaka" (*Scapharca broughtonii*	86	47 (54.6%)	34 (39.5%)	5 (5.9%)
Total	223	78 (35.0%)	66 (29.6%)	79 (35.4%)

Table 3. Comparisons of the Concentration of NaCl in Immersed Waters and Amount of Presumptive *V. Parahaemolyticus* Recovered

Concentration of NaCl in immersed waters (%)	No. of tested	Contamination levels of immersed waters (MPN/100m*l*)			
		$\geqq 10^1$	10^2	10^3	$\geqq 10^4$
<0.29%	38	2 (5.2%)	4 (10.5%)	12 (31.5%)	20 (52.8%)
0.3~0.9	37	1 (2.7%)		10 (27.0%)	26 (70.3%)
≧ 1	49			3 (6.1%)	46 (93.9%)
Total	124	3 (2.4%)	4 (3.2%)	25 (20.2%)	92 (74.2%)

Table 4. Effect TSYB with 0.1% Sodium Pyruvate for the Pre-enrichment of Presumptive *V. parahaemolyticus* in Shucked Shellfish

Samples	*V. parahaemolyticus* detected (MPN/100g) by the use of		
	TSYB with 0.1% sodium pyruvate	colistin broth with 2% NaCl	1% peptone water with 6% NaCl
" Shitakiri "	4.3×10^4	3.6×10^2	3.6×10^2
" Shitakiri "	2.4×10^5	4.3×10^4	9.1×10^3
" Shitakiri "	1.2×10^7	7.5×10^6	4.6×10^6
" Shitakiri "	2.8×10^4	2.3×10^4	2.3×10^4
" Shitakiri "	5.4×10^3	2.4×10^3	2.4×10^3
" Shitakiri "	7.9×10^3	3.1×10^3	4.9×10^3
" Sakiaka "	3.6×10^3	$<3.6 \times 10^3$	$<3.6 \times 10^3$
" Kobashira "	2.4×10^7	4.3×10^5	4.3×10^5
" Kobashira "	4.6×10^7	9.3×10^6	1.6×10^6

waters of shucked shellfish in the Tokyo Central Wholesale Market was tested according to the procedure[4] recomended by the Japan Water Works Association. As it will be seen in Table 2, 72 (86.7%) of 83 immersed waters used for "Kobashira" were containing greater than 1% of sodium chloride, while only 2 (3.7%) of 54 and 5 (5.9%) of 86 used for "Shitakiri" and "Sakiaka" contained greater than 1% of NaCl respectively.

When MPN of presumptive *V. parahaemolyticus* in immersed waters of shucked shellfish was calculated by ACPW, subsequent to the pre-enrichment in 1% peptone water with 6% NaCl, 46(93.9%) of 49 immersed waters with a concentration of greater than 1% NaCl yielded greater than 10^4/100m*l* of the organisms, while 20 (52.8%) of 38 ones with a concentration of less than 0.29% of NaCl yielded same levels of the orgamisms (Table 3). In other words, very wide distribution of the contamination levels of the organisms were calculated on immersed waters with a lower concentration of NaCl.

3) *Application of TSYB for the pre-enrichment of presumptive V. parahaemolyticus in shucked shellfish*

To prove the effectiveness of TSYB with 0.1% organic acids, for the resuscitation of injured *V. parahaemolyticus* in shucked shellfish, TSYB with 0.1% sodium pyruvate was used as a pre-enrichment medium. As it will be seen in Table 4, in every sample, TSYB with 0.1% sodium pyruvate gave quite satisfactory results than the other 2 conventional pre-enrichment media. The medium, however, being non-selective, numbers of growth positive tubes in the pre-enrichment steps were increased considerably than in the other 2 media.

Discussion

In seafoods, *V. parahaemolyticus* is always expected to contain with relatively large numbers of other closely related marine vibrios. Therefore, methodologically, it has been quite difficult to enumerate very low numbers of injured *V. parahaemolyticus* in seafoods. Murakami et al.[3] already

mentioned about the occurrence of the cold injury of the organisms during the refrigerated storage of seafoods. However, as it will be seen in Table 3, the osmotic fragility of *V. parahaemolyticus* in immersed waters of shucked shellfish is also likely to occur, when their salt concentration have been less than 1 %. Namely, 30 minutes exposure of the organisms to distilled water resulted 10^1 ~10^3—folds differences in its viable cell counts, according to the pre-enrichment media applied (Table 1). On the other hand, the presence of a relatively higher concentration of salt (6 % NaCl) in the pre-enrichment medium was also inhibitory to the cells suffering from the osmotic injury. Lee[5] reported on the kinetics of *V. parahaemolyticus* inactivation in hypotonic solutions, that 90 % of the organisms were inactivated within 11 minutes in 0.2 % peptone water, 7 minutes in Butterfield's phosphate buffer, and 4 minutes in distilled water. On the other hand, Hidaka and Kakimoto[6] reported that the inactivation process could be reversed if the cells were returned to salt solution within 10 minutes.

The results indicated in Table 4 suggest us that the presence of the osmotically injured *V. parahaemolyticus* in market shucked shellfish, as well as the presence of the cells injured by keeping them in a refrigerator. Thus, the application of TSYB with 0.1% sodium pyruvate as a pre-enrichment medium for the enumeration of presumptive *V. parahaemolyticus* in shucked shellfish is likely to be very useful, if we could supplement some selectivity of the organisms on it.

Summary

Comparative studies were made on several pre-enrichment media in an attempt to obtain a more simple, sensitive, and practicable technique for the recovery of presumptive *V.parahaemolyticus* in seafoods. The media studied on their resuscitation ability to osmotically injured cells were ; tryptone-soytone-yeastextract-broth (TSYB), TSYB with 0.1% organic acids, TSYB with 1 % arabinose, colistin broth with 2 % NaCl, 1 % peptone water with 3% NaCl, and 1 % peptone water with 6 % NaCl. Among them, TSYB with 0.1 % organic acids, such as sodium pyruvate and sodium pyruvate and sodium acetate were quite effective for the resuscitation of the osmotically injured *V. parahamolyticus*. In addition to this, the salt concentrations of immersed water used for 223 shucked shellfish were also studied. Of them, 144(64.6%)were found to be containing less than 1 % of NaCl and tend to yield lower numbers of the organisms, when the results were compared with the ones obtained on the samples containing greater than 1 % NaCl.

Note: (This investigation was supported by the research grant given by the laboratory, under the theme of "Studies on simple enumeration methods for *V. parahaemolyticus* in seafoods").

References

1) Fishbein, M. and B. Wentz: *J. Milk Food Technol.*, 36, 118, 1973
2) Nakanishi, H. and M. Murase: *Proc. International Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, 117, Saikon Publishing Co., 1974
3) Murakami, H., K. Jinbo, M. Kanzaki, Y. Kokubo, M. Haruta, and M. Yamada : *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 16, 247, 1975 (in Japanese)
4) Japan Water Works Association: *Method for water analysis*, 239, 1970, Tokyo (in Japanese)
5) Lee, J. S.: *Appl. Microbiol.*, 23, 166, 1972
6) Hidaka, T. and D. Kamimoto: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 34, 706, 1968

貝類の損傷腸炎ビブリオの検出法

松本昌雄*, 神保勝彦*, 村上文子*, 神崎政子*
村上　一*, 春田三佐夫*

卸売市場における生食用むき身貝の漬水を対象にその塩分濃度と腸炎ビブリオ（腸ビ）数を調査したところ，大部分のバカガイや赤貝は淡水に浸漬されていることが判明し，更に腸ビが低浸透圧によって損傷を被っている傾向を認めた．そこで，実験的に調製した低浸透圧損傷腸ビを回復させるための予備培養液について検討した．その結果，ピルビン酸ナトリウムを加えた食塩加 TSYB が，最も効果的であった．続いて本予備培養液の実用性についてバカガイを対象に検討したところ，2％食塩コリスチンブイヨン，6％食塩加ペプトン水を用いて測定した腸ビ MPN 値にくらべて同等あるいは 10^2 倍以上高い値が得られた．

（本研究は昭和50年度当研究所研究課題「腸炎ビブリオの簡易定量法並びにその応用に関する研究」として実施したものである．）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 146—148, 1976

乳酸菌飲料におけるソルビン酸の再検討

松本昌雄*, 神保勝彦*, 竹葉和江*
村上文子*, 村上　一*, 春田三佐夫*

Effect of Sorbic Acid for Preservation of Lactic Beverage

MASAO MATSUMOTO*, KATSUHIKO JINBO*, KAZUE TAKEBA*,
FUMIKO MURAKAMI*, HAJIME MURAKAMI* and MISAO HARUTA*

従来，乳酸菌飲料には保存料としてデヒドロ酢酸の使用が認められていたが，1972年8月に行なわれた食品・添加物等の規格基準の一部改正によってデヒドロ酢酸の使用禁止と，それに代わるソルビン酸の使用許可措置[1]がとられるに至った．現在の乳酸菌飲料の製造方法や技術は20年前と比較して著しく進歩し，その上，冷蔵施設の普及および衛生管理の徹底などによって乳酸菌飲料の微生物汚染は急速に減少した．このように，製造方法や衛生管理の進歩した段階では，保存料を使用しなくとも乳酸菌飲料の微生物学的品質は十分に保持できるものと考えられる．事実，都内で市販されている乳酸菌飲料の大部分には，ソルビン酸は使用されていない状態である．

そこで，このような現状で製造，管理された乳酸菌飲料でのソルビン酸の効果と必要性について再検討を行なった．

実験材料および方法

14社19工場で製造された22種類の乳酸菌飲料（そのうちソルビン酸を使用しているもの6種類）を供試材料とした．

各試料とも，入手時に乳酸菌並びにカビ・酵母の培養を定法[2]に準拠して行なった．その後，ソルビン酸を使用している試料についてはそのまま中試験管に10 m*l*ずつ分取し，ソルビン酸を使用していない試料については，ろ過滅菌したソルビン酸ナトリウムをソルビン酸として 0.04 g/kg になるように添加したものと，無添加のものを調製して中試験管に 10 m*l* ずつ分取して10±0.5°に保存した．保存後，所定期日ごとに各試料の乳酸菌数並びにカビ・酵母数を測定した．なお，ソルビン酸の定量は蒸留法[3]に基づいて行なった．

実験成績

1972年に一部改正された食品・添加物等の規格基準が1973年1月から施行され，ソルビン酸がデヒドロ酢酸に代わって乳酸菌飲料の保存料として使用してよいことになった．

そこで，1973年から1975年の3年間に亘って都内の市販乳酸菌飲料並びにその原料についてソルビン酸（以下SoA）の使用状況について調査を実施した．それら成績のうち，最も大量に流通消費されている乳を主原料とする乳酸菌飲料の調査成績だけをとりあげて表—1に示した．

この成績から明らかなように，乳酸菌飲料におけるSoAの使用率は年々減少の傾向にある．SoA使用製品のSoAの検出量は，いずれも許容基準値以下で 0.01～0.049 g/kg であり，年々低くなっている．そこで，筆者らはあらためて，乳酸菌飲料におけるSoAの必要性と効果について検討した．対象試料は，14社19工場で製造された22検体で，うちSoAの検出されたもの6件に過ぎず，その検出量は 0.02～0.04 g/kg であった．この6件のうち4件は，製造2週間後も酵母やカビなどの発育は認められなかった．残りの2件は，いずれも0.03 g/kg のSoAを含有していたが，製造後7～10日目には 1 m*l* 当り 10^4 以上オーダーの酵母数に達した．

他方，SoAを使用していない乳酸菌飲料16件について，SoAを実験的に添加してその効果を検討したところ，7/16件はSoA添加の如何にかかわらず，製造後2～3週間経過しても酵母やカビなどの発育は全然認められなかった．残りの9/16件は酵母あるいはカビの発育が認められた．そこで，これら9件の試料についてはSoA添加と無添加における酵母・カビ数の経時的変化を 10°

* 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

表1 各年度における乳主原・乳酸菌飲料のソルビン酸の検査成績

年度	検体数	検出せず	ソルビン酸 (g/kg)					
			≦0.01	0.011～0.02	0.021～0.03	0.031～0.04	0.041～0.05	>0.05
1973	60	26 (43)	0	3	1	19	18	0
1974	42	27 (64)	0	0	5	7	2	0
1975	56	43 (77)	0	1	7	5	0	0

注：( ) 内数字は百分率

表2 乳酸菌飲料のソルビン酸使用と酵母の発生

ソルビン酸	検体数	酵母の発生検体数
添加製品	6	2
無添加製品	16	9

表3 10°—7日間保存乳酸菌飲料におけるソルビン酸の保存効果

検体数	ソルビン酸による発育抑制酵母数(log.)				
	<1	1	2	3	≧4
9	4	1	0	1	3
		5			

表4 ソルビン酸無添加乳酸菌飲料の保存と酵母数

保存日数(日) / 酵母数 1 ml 当り	<3	4～9	≧10
<1 log.	7	0	0
1 log.	0	1	0
2 log.	0	1	0
3 log.	0	4	0
≧4 log.	0	1	7

で保存しながら比較観察し，製造後約1週間目の試料の酵母（あるいはカビ）数の差，すなわち SoA によって発育が抑制された酵母数を対数で示した(表—3)．すなわち，SoA 添加によって発育が抑制された酵母数は 10^1, 10^3, 10^4 台（あるいはそれ以上）のものがそれぞれ1件，1件，3件と予期したほどの効果は得られなかった．残りの 4/9 件は，SoA の効果が全然認められなかった．

なお，SoA を使用しないで，しかも酵母汚染を受けている検体は，表—4から明らかなようにいずれも製造直後の酵母数が 1 ml 当り 10^1 以下と少ない．これが 10° で約1週間保存されると大部分のものが 1 ml 当り 10^3～10^4 台の酵母数に達してしまうことが明らかとなった．次に，乳酸菌の菌数保持におよぼす SoA の影響について検討したが，10° 保存では乳酸菌数の減少速度は著しく緩慢で製造1～2週間経過してもほとんど菌数に変化なく，しかも SoA 添加試料と無添加試料の菌数間に差は認められなかった．

考察

現在市販の乳酸菌飲料の品質並びに SoA の使用状況などの実態からみて，その製造加工の施設設備の改善や，製品の衛生並びに温度管理を徹底すれば，SoA などの保存料は不必要であると推測される．事実，今回実施した調査でも SoA 無添加製品16件中，7件は製造後2週間経過しても酵母やカビなどの発育は認められなかった．逆に SoA を 0.03 g/kg 使用している製品の中には，製造後7～10日目ですでに酵母数が 1 ml 当り 10^4 以上に達したものもあった．他方，SoA 無添加製品に 0.04 g/kg の SoA を実験的に添加して，その効果について検討した結果によると，酵母発育抑制効果の認められた製品もあったが，ほとんどの製品ではその効果が認められなかった．その理由については今後の検討にまつとしても，製造加工の工程で酵母汚染を防止できないような工場で製造されたような乳酸菌飲料では，SoA を使用しても期待するほどの効果はあがらないことを示唆している．

乳酸菌飲料は乳等省令によって乳酸菌数が規定され，消費時に至るまでその規定菌数保持が必要条件となっている．乳酸菌の生菌数は，pH，無脂乳固形分，糖濃度，人工甘味料，有機酸，保存料，保存温度，菌種およびその培養齢，発育促進物質などの諸因子，特に無脂乳固形分と保存温度に強く左右される．

この主要因子である無脂乳固形分が，3％に満たない乳主原・乳酸菌飲料では，特に保存温度が生菌数保持の重要因子であることは明白である．事実，今回行なった乳酸菌飲料の 10°－2週間の保存試験でも乳酸菌の減少はきわめて緩慢で，2週間後の菌数オーダーは当初のそれと変らなかった．メーカーの中には温度管理や衛生管理をおろそかにし，その結果として生ずる酵母やカビの二次汚染，乳酸菌数の急減，品質変化などの諸欠陥は，

保存料の使用によりすべて解決できるものと誤信している向きもかなりあるように思われる．こと食品に関する限り，環境や施設設備の衛生上の欠陥や不備を保存料の使用によってカバーするという安易な態度は極力排除されねばならないところである．まして，保健飲料をセールスポイントとしている乳酸菌飲料にあっては，食品以外の化学物質を極力排除する前向きの姿勢が要求されてしかるべきであろう．

結　論

都内の市販乳酸菌飲料を10°に保存し，その間における SoA 使用の有無による酵母やカビの発生並びに乳酸菌数などの経日変化の差異を観察した．その結果，SoA 使用の有無による差異は認められなかった．これらのことから乳酸菌飲料の細菌学的品質は，工場環境，施設，設備の改善や原材料，製造・加工工程などの衛生管理並びに流通過程での温度管理を徹底すれば，酵母・カビの汚染防止並びに乳酸菌数の保持などは十分可能であり，SoA の使用は特に必要ないものと考えられる．

文　献

1) 官報，第13688号，6，1972
2) 厚生省：食品衛生小六法，昭和49年版，121，1974，新日本法規，東京
3) 日本薬学会：衛生試験法注解，200，1973，金原，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 149—152, 1976

東京都の野犬およびヒトの抗-*Brucella canis* 抗体保有状況

梅木富士郎*, 田中豊隆**, 早野剛**, 木村久一郎**,
金子誠二**, 西尾秀規**, 村田光明**, 高島利幸**,
奥沢康司***, 三木博***

Incidence of Anti-*Brucella canis* Antibody in the Sera of Stray Dogs and of Dog Pounds' Workers in Tokyo

FUJIO UMEKI*, TOYOTAKA TANAKA**, TAKESHI HAYANO**,
KYUICHIRO KIMURA**, SEIJI KANEKO**, HIDEKI NISHIO**, MITSUAKI MURATA**,
TOSHIYUKI TAKASHIMA**, KOHJI OKUSAWA*** and HIROSHI MIKI***

はじめに

1962年に米国のビーグル犬繁殖場で死産，流産等を主徴とする疾病が多発し，その起因菌として *Brucella canis*（以下 *B. canis* と略記）が1966年に初めて Carmichael[1] らにより発見報告された．その後，相次で繁殖場のビーグル犬の間に本症の疑いのあるものが発生し，同菌の分離が報告[2-5]された．我が国においても1973年に東ら[6]が本菌に起因したビーグル犬繁殖場での流行が静岡県で発生したことを報告するにおよんで，他の地域で飼育されている犬の間にも，本菌の潜在感染が存在するのではないかとの疑いが強く持たれるに至った．

そこで我々は，今回，東京都内で飼育されている犬の間における本菌の汚染状況を把握するため，1974年5月から1976年3月までに，東京都犬管理事務所（以下犬管と略記）で，捕獲抑留された野犬698頭の血清について抗-*B. canis* 抗体の出現率調査を行った．

これと同時に，犬管職員延べ253名の血清についても，職員の健康管理の観点から1974年と1975年の2回にわたって，抗-*B. canis* 抗体の出現の有無を検査した．

一方，*B. canis* と共通抗原があるとされている *Escherichia coli*（以下 *E. coli* と略記）α ならびに *E. coli* 268 の抗原についても抗体の出現状況を併せて調査したので報告する．

材料および方法

1. 菌凝集抗原

B. canis 凝集抗原は，北里研究所の合田博士から分与された RM-666, QE-13 の両抗原を使用した．なお，対照抗原としては，*E. coli* α, *E. coli* 268, *Yersinia enterocolitica*（以下 *Y.e.* と略記）0-3 および *Y.e.* 0-9 の4抗原を用いた．対照抗原原液は，それぞれの菌の tryptose 寒天（Difco）平板37° 24時間培養菌を pH 7.2 の 0.15 M リン酸緩衝食塩液（以下 0.15 M PBS と略記）で2回洗浄後，100°で2時間加熱して調製した．

なお，*B. canis* 抗原および対照抗原は，使用にのぞみ，Colman 比色計を用いて波長 420 nm で RM-666 は O.D.＝0.22 に，QE-13 は O.D.＝0.4 になるようにそれぞれの抗原原液を 0.15 M PBS で希釈調整した．

2. 被検血清

犬血清は，犬管に4日間抑留された犬の心臓から採血し，血液凝固後すみやかに分離を行い非働化して，−20°に凍結保存した．なお，これらの犬については，歯牙による年齢推定，経産，未経産，精巣腫大萎縮の有無を同時に調査した．ヒト血清のうち，犬管職員の血清は，1974年に117名，1975年に136名の延べ253名から採取したものである．対照としたヒト血清は，東京都立衛生研究所に梅毒検査のために送付されたもののなかから404名分を無作為に抽出した．

3. 試験管内凝集反応

今回抗体調査に用いた術式は，山内ら[7]により報告された Carmichael の変法で，調査の前半は *B. canis* RM-666 抗原を，後半は QE-13 抗原を用いて行った．RM-666 抗原を用いた場合は被検血清の 1：25 倍から，

* 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
** 東京都犬管理事務所　*** 東京都衛生局環境衛生部乳肉衛生課

QE-13 抗原の場合は 1：20 倍からそれぞれ被検血清の 0.5 m*l* 2倍段階希釈を行い，等量の 抗原を 加えた後，52° で48時間反応させた．24時間目に中間判定を行った後，48時間目に50%凝集以上の菌凝集を示した最高血清希釈の逆数をその血清の抗体価とした．

検査成績

1. 抗-*B. canis* 抗体出現状況

犬血清698頭中の抗-*B. canis* 抗体検出率は，その陽性限界を RM-666 抗原の場合は 1：400 倍以上，QE-13 抗原の場合には 1：320 倍以上とすると，16頭（2.3%）が陽性であった．これらの陽性血清は，同時に用いた *E. coli* α 抗原，*E. coli* 268 抗原，*Y.e.* 0-3 抗原および *Y.e.* 0-9 抗原に対して類属反応を示さなかったので，*B. canis* 感染による特異抗体であると判定した．なお，これらの犬のうち，雑雄犬364頭には精巣の腫大，萎縮等は認められなかった．また雑雌犬334頭中妊娠したものが5頭（1.5%），経産犬と思われるものが52頭（15.6%）含まれていた．

一方，犬管職員延べ253名の血清抗体価はいずれも 1：100 倍以下を示し，同時に実施した一般都民の血清抗体価も 1：200 倍以下で，犬管職員の血清と一般都民の血清との抗体分布にほとんど差異が認められず，職員全員，*B. canis* 感染既応歴を疑わせるものはなかった．

2. 性別にみた抗-*B. canis* 抗体保有状況

抗-*B. canis* 抗体陽性犬16頭の抗体価を性別にわけてみると，1：320倍，1：400倍のもの雄4頭（1.1%），雌4頭（1.2%），1：640倍，1：800倍のもの雄5頭（1.4%），雌1頭（0.3%），1：1280倍，1：1600倍以上のものが雌2頭（0.6%）であった．

3. 年齢別による抗-*B. canis* 抗体保有状況

抗-*B. canis* 抗体陽性の犬の推定年齢は表3に示したとおり，1歳，2歳，3歳，4歳，5歳，6歳および8歳齢がそれぞれ3頭，4頭，2頭，3頭，1頭，2頭，1頭であった．表で明らかなように年齢の差による感受性の差は認められなかった．なお，このうち4歳齢の1頭は妊娠中で，8歳齢のものは経産犬であった．

4. ヒトおよび犬の血清中の抗-*B. canis* 抗体および抗-*E. coli* α ならびに *E. coli* 268 の抗体出現状況

B. canis と共通抗原があるとされている *E. coli* α ならびに *E. coli* 268 の抗原に対するヒト血清中の抗体出現状況についてみると，*E. coli* α 抗体の出現頻度が33.5%とやや高かったのに対し，*E. coli* 268 抗体のそれは5.8% に過ぎなかった．

一方，犬血清中の *E. coli* α および *E. coli* 268 抗体の出現頻度は，それぞれ55.6%，38.3%であった．

考　察

抗体調査の結果，抑留犬698頭中16頭（2.1%）が凝集反応により陽性を示したことから，都内で飼育されている犬の間にも，*B. canis* が潜在的にすでに分布しているらしいことが推測された．

表1　犬およびヒトの *B. canis* 抗体の出現状況

血清	例数	抗体価 RM-666 / QE-13					
		≦1：50 / ≦1：40	1：100 / 1：80	1：200 / 1：160	1：400 / 1：320	1：800 / 1：640	1：1600 / 1：1280
犬	698	594	67	21	8	6	2
犬管理所職員	253	246	7				
一般都民	404	390	8	6			

表2　犬の性別による *B. canis* 抗体の出現状況

性別	例数	抗体価 RM-666 / QE-13					
		≦1：50 / ≦1：40	1：100 / 1：80	1：200 / 1：160	1：400 / 1：320	1：800 / 1：640	1：1600 / 1：1280
雄	364	305 (83.8)	40 (11.0)	10 (2.7)	4 (1.1)	5 (1.4)	
雌	334	289 (86.5)	27 (8.1)	11 (3.3)	4 (1.2)	1 (0.3)	2 (0.6)
計	698	594 (85.1)	67 (9.6)	21 (3.0)	8 (1.1)	6 (0.9)	2 (0.3)

注：（ ）は%を示す

表3　犬の年齢別による *B. canis* 抗体の出現状況

年　齢	例　数	抗　体　価					
		RM-666 QE-13	≦1：50 ≦1：40	1：100 1：80	1：200 1：160	1：400 1：320	1：800 1：640	1：1600 1：1280
≦1歳	164		149	9	3	1	1	1
2	172		147	17	4	1	2	1
3	114		91	16	5	2		
4	104		88	10	3	3		
5	54		44	5	4		1	
6	29		22	4	1	1	1	
7	17		15	2				
8	18		14	2	1		1	
9	7		7					
≧10	19		17	2				
計	698		594	67	21	8	6	2

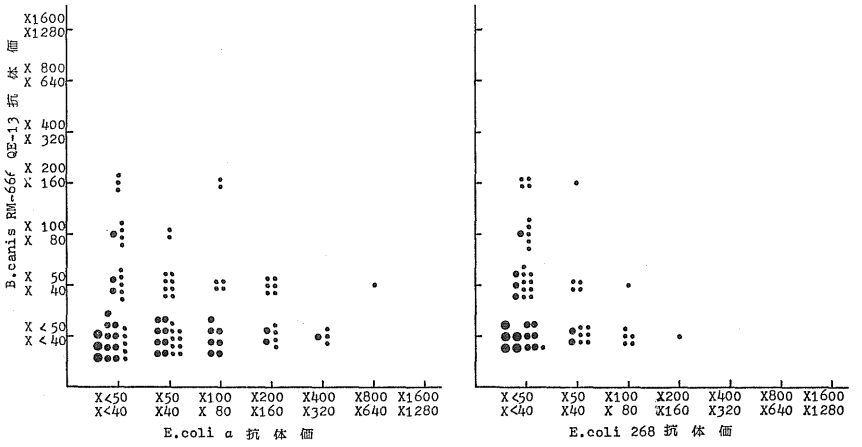


図1　ヒトの血清中の *B. canis* 抗体および*E. coli α*, *E. coli* 268 抗体の出現状況
注：● n＝100　● n＝10　・ n＝1

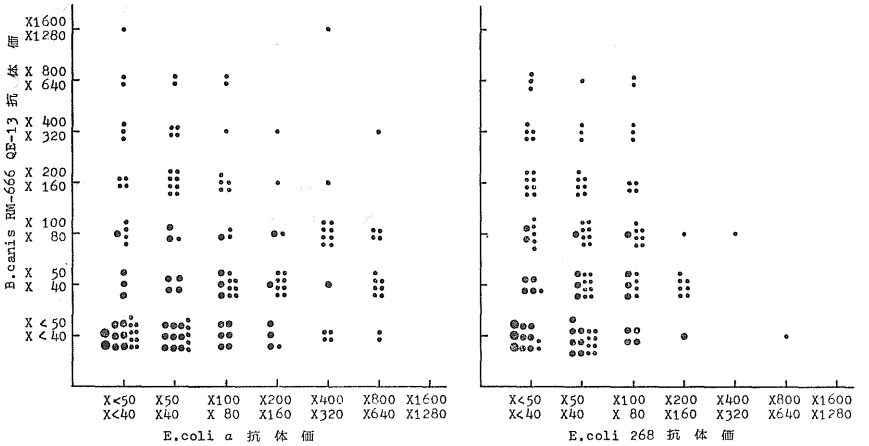


図2　犬の血清中の *B. canis* 抗体および*E. coli α*, *E. coli* 268 抗体の出現状況

従来，犬管においては抑留期間中の犬の間に犬個有の何らかの疾病が集団発生した事例はないが，今後はたとえ短期間の抑留とはいえ，犬同士の間の *B. canis* 感染の可能性を考慮して十分な防疫対策を講じる必要があると考えられる．今までに報告[1-7]された犬のブルセラ症は，主としてビーグル犬繁殖場での流産，死産等を主徴とするものであり，それらの感染経路は，経口感染によるものであるらしいとされている．しかし，その他のルートとして創傷からの接触感染も疑われていて，その疫学はまだ確立されていないのが現状である．また，犬が *B. canis* に感染した場合，一般に臨床症状を示さないので，犬管で犬を抑留した場合，4日間の抑留期間中に *B. canis* 感染犬を臨床的に発見隔離し，他の犬への感染防禦につとめることは極めて困難であると考えられる．

獣医公衆衛生にたずさわる獣医師として，今一つの関心事は，犬の間におけるブルセラ症の流行のヒトへの影響の問題である．たまたま，本症の原因菌が細菌分類学上，ブルセラ属に属するところから，人畜共通伝染病としてよく知られている他のブルセラ症の重大な被害を連想しがちであるが，米国で報告されたヒトの感染例[8] 6例中1例は，32歳の動物飼育係の感染であり，他の1例はシェパード犬を飼育していた53歳の女性でいずれも軽症であったと報告されている．我が国では，熊谷ら[9]の北海道で行った調査があるのみで，それによると 1,782名中2名（0.11%）が1:160倍の抗体価を示したが，この人達は *B. canis* の感染を受けた者かどうかは，症状もなく，菌の分離培養も行っていないので確認できなかったと報告している．また，現在まで *B. canis* によるヒトの死亡例は全く報告されていない．

今回，2回にわたって健康管理の観点から実施した犬管職員の血清検査の結果は，*B. canis* の感染を疑わせるものは1名もなかった．しかし本症が人畜共通伝染病の一つとして扱われている限り，犬と密接な関係にある犬管職員の血清検査を引き続き実施していきたいと考えている．

つぎに今一つ考えなくてはならないのが，*B. canis* 抗体を調査する際，類属反応の出現である．*B. canis* と共通抗原を有する菌の自然界における分布はよく知られているが，一般に *Y.e.* 0-9 感染の場合以外は出現する抗体価が低いと言われている．表には示さなかったが，我々の調査結果も *Y.e.* 抗原に対してはほとんどの血清が1:50倍以下の抗体価を示した．

一方，*E. coli α*, *E. coli* 268 抗原に対してはかなりの抗体を持っているものがみられた．

むすび

1974年5月から1976年3月まで，犬管で捕獲抑留された犬698頭の血清について，山内らの報告した方法で抗 *B. canis* 抗体の出現状況を調査した．

その結果，*B. canis* RM-666 抗原および QE-13 抗原に対し，1:320倍以上の抗体価を示したものが698頭中16頭（2.3%）であった．このうち雄が9頭，雌が7頭であった．

これらは，いずれも *E. coli α* および *E. coli* 268, *Y. e.* 0-3 および *Y.e.* 0-9 に対し類属反応を示さなかった．また，犬管職員延べ253名の血清および404名の一般都民の血清はすべて陰性であった．

なお，*B. canis* と共通抗原を有する *E. coli α* に対するヒトおよび犬血清中の抗体出現頻度は，それぞれ33.5%，55.6%であった．

謝辞 終わりに当たり，ご指導をいただいた北里研究所の合田朗博士に深く感謝致します．

（本研究の一部は，昭和50年度日本獣医公衆衛生学会昭和50年2月で発表した．）

文　献

1) Carmichael, L.E.: *J.A.V.M.A.*, 149, 1126, 1966
2) Hill, W.A., G.L.Jr. Van Hoosier, and N. McCormick: *Lab. Anim. Care.*, 20, 205, 1970
3) Moore, J.A., B.N. Gupta, and G.H. Conner: *J.A.V.M.A.*, 153, 523, 1968
4) Taul, L.K., H.S. Powell, and O.E. Baker: *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 73, 543, 1967
5) Carmichael, L.E. and R.M. Kenney: *J.A.V.M.A.*, 152, 605, 1968
6) 東　量三，伊佐山康郎：日獣会誌，26, 111, 1973
7) 山内忠平，鈴木達雄，野村達次，久木田禧一，岩城隆昌，数野勇造，合田　朗：日獣誌，36, 175, 1974
8) Morisset, R., W. Wesley, Spink: *The Lancet*, Nov. 8, 1000, 1969
9) 熊谷　満，中村リツ子，上田正義，伊佐山康郎：北海道立衛生研究所報，25, 58, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 153—157, 1976

食品中のマイコトキシンに関する研究（第7報）
ベビー用ドライミルク中のアフラトキシン M_1 の試験法

斎藤和夫*, 小川仁志*, 風間栄治*, 観公子*
井部明広*, 直井家寿太*, 木村康夫*

Studies on Mycotoxins in Foods (VII)
Detection of Aflatoxin M_1 in Dry Milk

KAZUO SAITO*, HITOSHI OGAWA*, EIJI KAZAMA*, KIMIKO KAN*,
AKIHIRO IBE*, YASUTA NAOI* and YASUO KIMURA*

緒　言

アフラトキシン B_1, B_2, G_1, G_2 は発癌性物質として著名であり，著者らはその試験法について開発および検討を行ない，ピーナッツ，ピーナッツ製品[1]，雑豆類および醸造食品[2]など多数の食品からの検索を実施している．また，アフラトキシンB群産生能のある *Aspergillus flavus* あるいは *Aspergillus parasiticus* により汚染された飼料を乳牛が摂取した時，乳牛にアフラトキシン B_1 および B_2 の代謝産物であるアフラトキシン M_1 および M_2 が生成してくると報告されている[3-5]．一方アフラトキシン M_1 は B_1 と同様に強い発癌性をもつことが明らかにされてきた．今回，著者らは微量のアフラトキシン M_1 によって汚染された乳あるいは乳製品を摂取することが特に乳児の健康に多大の影響を与えるものと考え，ベビー用ドライミルクについてその試験法の検討と市販ベビー用ドライミルクについてアフラトキシン M_1 の検索を実施したのであわせて報告する．

実験の部

(1)試料　市販ベビー用ドライミルク　40種

(2)試薬　特にことわりのないかぎり試薬特級を使用した．活性炭（和光純薬㈱製），20%酢酸鉛試液：200 g の酢酸鉛を水に溶かしたのち，3 m*l* の氷酢酸および水を加えて 1 *l* とする．5%食塩水，ケイ酸：マリンクロット社製カラムクロマト用 100 Mesh，シリカゲル：メルク社製カラムクロマト用キーゼルゲル60，シリカゲルプレート：メルク社製 Pre-Coated-TLC 20×20 cm

(3)標準品　アフラトキシン B_1：MAKOR BIOCHEMICALS FOR RESEARCH 製のものを使用した．アフラトキシン M_1：Stubblefield ら[6] の方法に準じて調製した．

a）培養

あらかじめ水で湿潤した米 10 kg を約 100 g ずつ三角フラスコに分け，常法どおり滅菌，これに *A. flavus* NRRL 3145 を接種し28°，6日間これを時々振とうしながら培養する．培養が終了したのち滅菌し，次の操作をおこなった．

b）分離抽出

培養米をクロロホルムと共にホモジナイズしたのちろ過，この操作を3回くり返し，ろ液を合わせて濃縮し，無水硫酸ナトリウムで脱水したのち，活性炭および炭酸銅で脱色した．次にクロロホルムを濃縮して少量としたのち，約10倍量の n-ヘキサンを加えてアフラトキシンを含む粗沈澱物を得た．

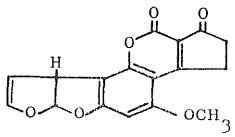
c）精製

アフラトキシン B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2 を含む沈澱物は2種類のカラムおよび TLC のバンドスポット法によって精製した．

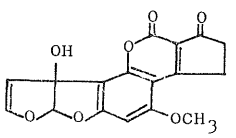
カラム1：ケイ酸 255 g を内径 4.5 cm のカラム管にエタノール・クロロホルム混液（1：99）で充塡後これを使用する．b）で得られた沈澱物はクロロホルムに溶解したのち，カラムに負荷エタノール・クロロホルム混液（1：99）により流速 30 m*l*/hr で溶出した．アフラトキシン M_1 は 1,760 m*l* から 3,260 m*l* の間に溶離した．

カラム2：シリカゲル 35 g を内径 1.8 cm のカラム管にクロロホルムで充塡したのちこれを使用する．カラ

* 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



Aflatoxin B_1



Aflatoxin M_1

Fig. 1. Structural formulas of Aflatoxin B_1 and Aflatoxin M_1

ム1で得たアフラトキシン M_1 を含む画分は濃縮したのち，シリカゲル 3 g を加えこれを乾燥し，次いで n-ヘキサンと共にシリカゲルカラムに負荷，n-ヘキサン 50 m*l*，n-ヘキサン・クロロホルム混液（1：1）100 m*l*，クロロホルム 100 m*l* で順次洗浄したのち，エタノール・クロロホルム混液（1.5：98.5）により流速 12～18 m*l*/hr で溶出する．アフラトキシン M_1 を含む部分はすべて集め約 10 m*l* まで濃縮した．これを TLC プレート上にバンド状にスポットし，2-プロパノール・アセトン・クロロホルム混液（5：10：85）で展開したのち，アフラトキシン M_1 に相当する部分をけずりとりエタノール・クロロホルム混液（1.5：98.5）で溶出した．カラム1，カラム2および TLC による精製を数回繰り返すことによって純粋なアフラトキシン M_1 10.8 mg を得た．

アフラトキシン M_1 の性質：アフラトキシン M_1 は Fig. 1 のような構造式を有する．mp は 299° で分子量 328 である．アフラトキシンの急性毒性はアヒルヒナ経口投与で LD_{50} 320μg/kg であり慢性毒性は肝癌が知られている．

d）アフラトキシン M_1 および B_1 標準溶液の調製

アフラトキシン M_1 標準溶液：c）で得られたアフラトキシン M_1 1.0 mg をクロロホルムで 50 m*l* とした．

アフラトキシン B_1 標準溶液：アフラトキシン B_1 10 mg をベンゼン・アセトニトリル混液（98：2）で 100m*l* とし，その 1 m*l* を分取しベンゼン・アセトニトリル混液（98：2）で 50 m*l* とした．

(4)試験法

a）抽出法

試料は 50 g を精秤し，これに水 90 m*l* およびアセトン 300 m*l* を加え，ホモジナイザーで5分間攪拌抽出したのち，ろ紙ろ過をおこなう．ろ液 275 m*l* を分取し，これに 200 m*l* の水を加え酸性酢酸鉛試液 20 m*l* を加えて5分間攪拌，次いでろ紙ろ過をおこない，水―アセトン層 350 m*l* を分取する．これを分液ロートに移し n-ヘキサン 100 m*l* で洗浄する．次にこの水―アセトン層をクロロホルム 50 m*l* で3回抽出し，クロロホルム層を合わせ5％食塩水 100 m*l* で洗浄したのち，無水硫酸ナトリウム 10～15 g を投じて攪拌静置し，次いでろ紙ろ過をおこないろ液を減圧濃縮する．得られた残渣をクロロホルム 500μ*l* に溶解し試験溶液とする．

b）分離検出

TLC 用プレート 20×20 cm (Merck Pre-Coating) に試験溶液 5～10μ*l* およびアフラトキシン M_1 標準溶液をスポットし，2-プロパノール・アセトン・クロロホルム混液（5：10：85）を溶媒として展開する．終了後プレートを風乾し，紫外線灯下（365 nm）でアフラトキシン M_1 の有無を検する．アフラトキシン M_1 は青色の蛍光を発して確認できる．Rf は0.54であった．

実験結果および考察

乳製品からのアフラトキシン M_1 試験法は Journal of the Association of Official Analytical Chemists[7]（以下 AOAC と略す）をもとにベビー用ドライミルク中からアフラトキシン M_1 の試験をおこなった．AOAC 法では抽出時にろ過補助剤としてセライト 545 を使用しているが，このろ過補助剤を使用しなくてもろ過操作に困難はなく，また回収率も良好であった．TLC プレートは Merck 社製の Pre-Coating を使用した．アフラトキシン M_1 用の展開溶媒は 2-プロパノール・アセトン・クロロホルム混液（5：10：85）を使用し，約1時間展開後風乾，紫外線照射（365 nm）をおこない確認した．この条件によりアフラトキシン M_1 は Rf 0.54 を示し，肉眼による確認限界は 10 ng であった．なお前述の試験法においてアフラトキシン B_1 の示す Rf は 0.93 である．

TLC 蛍光デンシトメトリー

TLC プレート上でアフラトキシン M_1 は紫外線照射した時，青色の蛍光を発することを確認した．この蛍光について蛍光分光光度計により励起波長 (Excitation) および蛍光波長 (Emission) を測定した結果，励起波長 368 nm，蛍光波長 445 nm であった．次に 20～120 ng の範囲でアフラトキシン M_1 を展開した TLC プレートを展開方向に移動させて励起波長 368 nm，蛍光波長 445 nm で蛍光デンシトメトリーをおこなった．その結果この濃度範囲ではピーク面積との間に直線関係が成立する．Fig. 2 は 20～120 ng/Spot の濃度における蛍光デンシトグラムであり，Fig. 3 はその検量線である．

試料に対する添加回収実験

アフラトキシンB群，G群，M群不検出のベビー用ドライミルクを使用して添加回収実験をおこなった．試験法は(4)に述べたような手順で進めた．アフラトキシン M_1 添加量は 200 ppb である．Fig. 4 は 2-プロパノー

ル・アセトン・クロロホルム混液 (5：10：85) で展開したのちのプレートに紫外線照射した場合のクロマトグラムである．Fig. 4 の1はアフラトキシン M_1 標準品であり，2はアフラトキシン M_1 無添加の試料について前述のとおり操作したものであり，3はアフラトキシン M_1 添加，同様に操作したものである．ベビー用ドライミルクの場合は (Fig. 4 の 2) アフラトキシン M_1 標準品と同じ位置付近に妨害蛍光を認めなかったので，今回は Clean up 操作を必要としなかったが，一応 Clean up 操作についても検討をおこなった．カラムクロマトグラフィーはピーナッツ試験法[1] にもとづいておこなった．

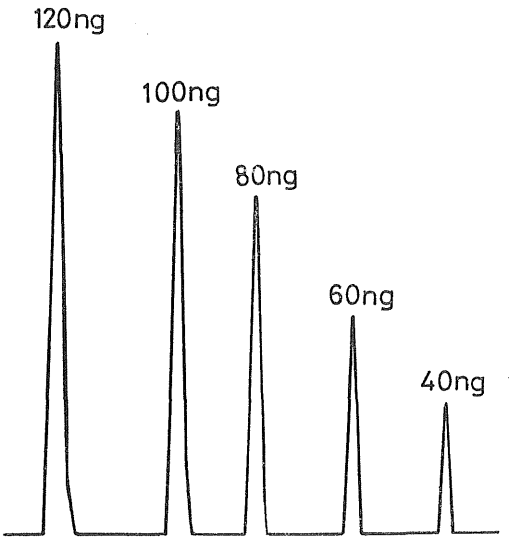


Fig. 2. Densitogram of Aflatoxin M_1 on TLC plate.

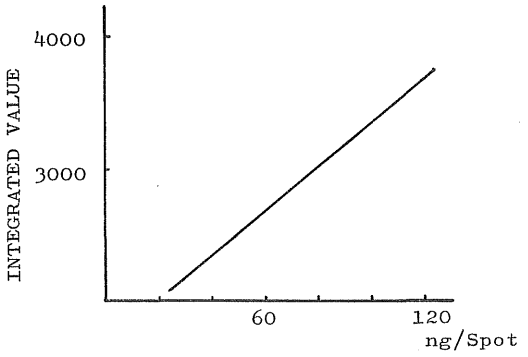


Fig. 3. Calibration curve of Aflatoxin M_1 in TLC densitometry.
Excitation : 368 nm, Emission : 445 nm, Filter : 43, Slit : (Exc) 8 (Emi) 8, Sensitivity : 3.

Fig. 5 の1はアフラトキシン M_1 標準品であり，2はアフラトキシン M_1 無添加，前述のとおり操作したのち，Scheme 1 の方法により Clean up したものであり，3はアフラトキシン M_1 添加，前述のとおり操作したのち，Clean up[1] したものである．Fig. 4 の2と3の Rf

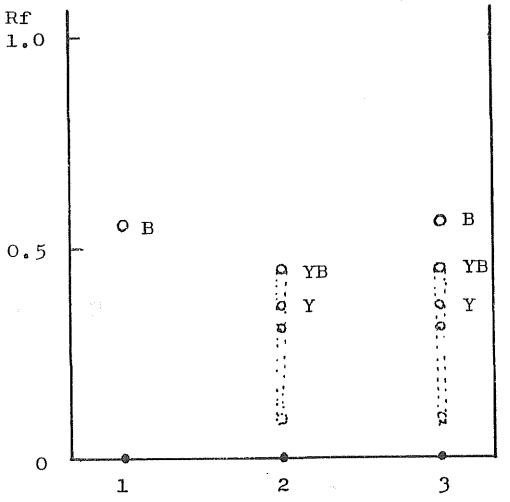


Fig. 4. Thin layer chromatogram visualized in ultraviolet light (365 nm) (Non Clean up).
Developer : 2-Propanol•Acetone•$CHCl_3$ (5 : 10 : 85), B=Blue, Y=Yellow, YB=Yellowish blue.

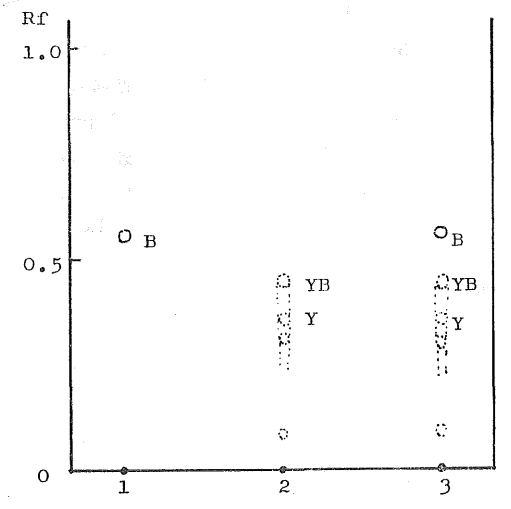


Fig. 5. Thin layer chromatogram visualized in ultraviolet light (365 nm) (Clean up).
Developer : 2-Propanol•Acetone•$CHCl_3$ (5 : 10 : 85), B=Blue, Y=Yellow, YB=Yellowish blue.

Scheme 1. Clean up method

Clean up
- Wash column with 150 m*l* n-Hexane and 150 m*l* Ethyl ether
- Elute column with 200 m*l* Methanol-Chloroform (3 : 97)

Eluate
- Concentrate to dryness
- Dissolve in 0.5 m*l* Chloroform

Sample extract

TLC

0.45 付近の黄青色の蛍光物質は Clean up することにより著しく減少した．また，アフラトキシン M_1 のカラムクロマトグラフィーをおこなった時の洗液であるn-ヘキサンとエチルエーテルを濃縮したのち同様に TLC をおこなった結果，アフラトキシン M_1 と同じ位置に蛍光をみとめなかった．よって n-ヘキサンおよびエチルエーテルにはアフラトキシン M_1 が移行してこないものとおもわれる．次に，アフラトキシン B_1 とアフラトキシン M_1 が共存する場合の検討をおこなった．アフラトキシン B_1 およびアフラトキシン M_1 を同一 TLC プレート上にスポットし，2-プロパノール・アセトン・クロロホルム混液 (5 : 10 : 85) を使用し展開をおこなうと，アフラトキシン M_1 の Rf は 0.54 であり，アフラトキシン B_1 の Rf は 0.93 であった．また，クロロホルム・アセトン混液 (9 : 1) を使用し展開をおこなうとアフラトキシン M_1 の Rf は 0.17 であり，アフラトキシン B_1 の Rf は0.58であった．よって上記2つの展開溶媒によってアフラトキシン B_1 および M_1 は分離確認することができる．次にアフラトキシン B_1 を，20 ppb，アフラトキシン M_1 を 200 ppb 添加し，前述の試験法どおり処理して得た試験溶液および標準品を同一プレート上にスポットしたのち，上記の展開溶媒で TLC に付し，次いでデンシトメトリーをおこなった．その回収率は Table 1 に示した．

Table 1. Recovery (%) of Aflatoxin B_1 and M_1 added to Dry milk.

	Non Column	With Column
Aflatoxin B_1	87.5～90.0	77.0
Aflatoxin M_1	87.5～93.0	78.0

総　括

1) *A. flavus* NRRL 3145 の培養で米 10 kg 中より 10.8 mg のアフラトキシン M_1 が得られた．この菌株はアフラトキシン B_1, B_2, G_1, G_2 を多量に産生し，一方 M_1 の収率が大変悪く，もっと M_1 収率の高い菌株を使用した方が良いとおもわれる．また多量の米から M_1 を抽出，精製することは操作にかなり困難が感じられたので液体培地を使用した方が良い．

M. Ramachandra pai ら[8]は *A. flavus* NRRL 3251 株を用い，液体培地から 1 mg/100 m*l* のアフラトキシン M_1 を得ている．従って今後はこの条件によりアフラトキシン M_1 の分離をおこなう必要がある．またアフラトキシンB_1を含んだ合成培地中に spore を suspension したのち incubate をおこなうとアフラトキシン B_1 の 5～8 %がアフラトキシン M_1 に変換する事実も報告[8]されており，これは多量に産生したアフラトキシン B_1 について有効にこれを利用する方法を示唆するものであって，この点についても今後実験を進めるつもりである．

2) 上記の試験法により1社につきロット別に10種類ずつ4社の市販ベビー用ドライミルクについて試験をおこなったが，この方法はすべてのベビー用ドライミルクに使用できた．また，この40種類のミルクの試験結果はアフラトキシン M_1 およびアフラトキシン B_1 は検出されなかった．この理由は一つにはベビー用ドライミルクの原料乳の搾乳時期がカビ汚染のない牧草飼育の時期にあたっていたこと，また供試試料が少なかったことにもよると考えられる．従って我々は季節的な要素を勘案しながらさらに多くのベビー用ドライミルクについて試験をおこなう予定であり，あわせてその他の乳製品（市乳，チーズ，バターなど）の試験も，おこなう予定である．

謝　辞

本研究を進めるにあたり菌株の御分譲を頂いた国立衛生試験所一戸正勝博士，また有益な御示唆を頂いた国立予防衛生研究所粟飯原景昭博士に感謝致します．

文　献

1) 木村康夫，直井家寿太，友松俊夫，小川仁志，風間栄治，斎藤和夫，江口良子：東京衛研年報，22，87，1970
2) 直井家寿太，風間栄治，小川仁志，斎藤和夫，江口良子，志村公子，友松俊夫，木村康夫：東京衛研年報，23，169，1971
3) de Iongh, H., R.O. Vles, and J.G. vAN Pelt: *Nature*, 202, 466, 1964
4) Allcroft, R., O.B.E., H. Rogers, G. Lewis, J. Nabney, and P.E. Best: *Nature*, 209, 154, 1966
5) Masri, M.S., R.E. Lundrin, J.R. Page, and V.

C. Garcia: *Nature*, 215, 753, 1967
6) Stubblefield, R.D., G.M. Shannon, and O.L. Shotwell: *JAOCS*, 47, 389, 1970
7) Pons, W.A., Jr., A.F. Cucullu, and L.S. Lee: *JAOAC*, 56, 1431, 1973
8) Ramachandra pai, M., N. Jayanthi Bai, and T.A. VENKITASUBRAMANIAN: *Appl. Microbio.*, 29, 6, 850, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 158—163, 1976

食品中の石油系炭化水素に関する研究（第1報） 市販魚類中から n-Paraffin の検出

小川仁志*, 井部明広*, 風間栄治*, 斎藤和夫*
観公子*, 直井家寿太*, 木村康夫*

Studies on Hydrocarbons from Petroleum in Foods (1)
Detection of n-Paraffin in Commercial Fishes

HITOSHI OGAWA*, AKIHIRO IBE*, EIJI KAZAMA*, KAZUO SAITO*,
KIMIKO KAN*, YASUTA NAOI* and YASUO KIMURA*

緒　言

海洋の石油汚染は瀬戸内海の重油流出事故などを例にするまでもなく，日本近海はもとより，全世界的に広がっている．特に本邦では洞海湾，瀬戸内海，伊勢湾，東京湾が石油汚染のワースト4として著名である．しかもこれら海域の浄化の必要性は重視されながらも遅々として進まず，瀬戸内海，東京湾などで獲れる魚介類については石油汚染のおそれが十分に考えられ，その安全性について深刻な問題を投げかけている．魚介類について，石油による汚染の実態を知ることは，異臭魚の発生や石油の中に含まれる各種炭化水素の安全性の見地から，食品衛生上極めて有意義であり，かつ緊急な問題であるといえる．

本報では石油中に含まれる normal-Paraffin を指標として，ガスクロマトグラフィーによって食用魚を分析し，A 重油，B 重油および C 重油における n-Paraffin 類のガスクロマトグラムとの比較検討を行なった．

材料と方法

1. 試料および抽出法 各地で水揚げされた魚14種を用いそれぞれ筋肉部分を試料とした．抽出およびクリーンアップ操作は内山ら[1]の方法に準じ，Scheme 1 に示した．

2. 試薬 試薬は試薬特級を使用した．

Pyrene は Eastman Kodak 社製を用いた．

3. 重油抽出物標準溶液 丸善石油㈱社製 A重油，B重油，C重油を用い，それぞれ10倍容のエチルアルコールで激しく振とう抽出後，3,000 回転5分間の遠心分離をしエチルアルコール層をろ紙ろ過する．ろ液を濃縮，エチルアルコールを除去したのち得られた油分について，Scheme 1 に示した各操作を行なった．カラムクロマトグラフィーによって得られた溶出液を濃縮して得た油分をそれぞれ 100 mg とり，内部標準溶液Bで溶解し 100 m*l* とした．（濃度 1,000 ppm）

4. 流動パラフィン標準溶液 流動パラフィンを3に述べたごとく操作し，濃度 2,000 ppm の標準溶液とした．

5. 内部標準溶液 Pyrene 100 mg を 1,000 m*l* の n-Hexane に溶解しこれを原液とする．

A液：原液 30 m*l* をとり n-Hexane で 100 m*l* とする．（Pyrene 30 ppm 溶液）

B液：原液 50 m*l* をとり n-Hexane で 100 m*l* とする．（Pyrene 50 ppm 溶液）

6. n-Paraffin 類標準溶液 n-Paraffin 類（東京化成）ドデカン ($C_{12}H_{26}$)，トリデカン ($C_{13}H_{28}$)，テトラデカン ($C_{14}H_{30}$)，ペンタデカン ($C_{15}H_{32}$)，ヘキサデカン ($C_{16}H_{34}$)，ヘプタデカン ($C_{17}H_{36}$)，オクタデカン ($C_{18}H_{38}$)，ノナデカン ($C_{19}H_{40}$)，およびエイコサン ($C_{20}H_{42}$) を正確に計り，おのおの 50 ppm となるよう5のB液で調製した．

さらに，この一部をとって2倍および5倍に希釈して 25 ppm および 10 ppm 溶液とした．（同じく5のB液で調製）

7. カラムクロマトグラフィー Carrierとして Kieselgel 60 (Merck, ASTM, 70～230 mesh) を 500°, 24時間活性化したのち (1.5%の水を含む)，5 % (w/w) の割合に蒸留水を加え 6.5% (w/w) 含水としたものを

* 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

用いた. 内径 22 mm のカラム管に無水硫酸ナトリウム, Kieselgel 60, 無水硫酸ナトリウムを順次 n-Hexane で湿式積層させた. このカラムに Scheme 1 の①を負荷したのち n-Hexane で溶出した.

8. ガスクロマトグラフィー(GLC) 装置：島津 GC-5A型, 操作条件：充てん剤3%SE-52 chromosolb WAW DMCS 80～100 mesh, ガラスカラム管 0.3 cm ×200 cm, カラム温度（昇温法）90°→260° 毎分 6° 上昇, 注入口温度 270°, キャリアガス 窒素 30 m*l*/min, 水素流速25 m*l*/min, 空気流速 0.8 *l*/min, 検出器 FID, Sens. 10^2MΩ, Range 0.04V, チャートスピード10mm /min.

Scheme 1. Analytical Procedure of Extraction and Clean up

Sample 50 g or 100 g
- extract with n-Hexane 100 m*l*,
- blend for 3 min.
- filterd

Filtrate

Evaporate

Residual oil
- Saponify with 10% KOH in 90% EtOH 50 m*l* for 1hr.

Hydrolysate
- add 100 m*l* distil water,
- extract with n-Hexane 100 m*l*, (three times)

n-Hexane layer
- wash with H_2O 20m*l* (twice)
- dehydrate over Na_2SO_4 (anh.)
- concentrate to Ca. 5 m*l*

Column chromatography
- elute by n-Hexane 100 m*l*,

Eluate……①
- concentrate to dryness

Residue
- dissolve in n-Hexane 1 m*l*

GLC

Table 1. Relative Retention Time of n-Paraffins

Carbon number	t_R*
C_{12}	0.25
C_{13}	0.36
C_{14}	0.45
C_{15}	0.54
C_{16}	0.63
C_{17}	0.70
C_{18}	0.78
C_{19}	0.85
C_{20}	0.92
Pyrene	1.00

*t_R is retention time relative to Pyrene

試料から得た n-Paraffin 含有抽出物は5のA液 1 m*l* に溶解したのち, その 5μl を注入した. 重油抽出物, 流動パラフィンおよび n-Paraffin 類標準溶液もそれぞれ 5μl を注入した.

結　果

1. n-Paraffin 類標準溶液 (25 ppm) のガスクロマトグラムは Fig. 1 に示すとおりであった. 各 n-Paraffin の retention time の相対値（内部標準 Pyrene の保持時間を1とした時の相対保持時間 t_R）は Table 1 に示した.

2. 重油抽出物標準溶液のガスクロマトグラフィー：材料と方法の部3で調製したA重油, B重油, C重油抽出物の各溶液について8の条件によりガスクロマトグラフィーに付した. 得られたガスクロマトグラムは Fig. 2, 3 および4に示した.

また, n-Paraffin 類 50 ppm 溶液と C 重油抽出物 2,000ppm 溶液を同量混和し, 5μl 注入したところ Fig. 5 に示すとおりピークの一致をみた. 同様にしてA, B 重油抽出物についてもピークの一致をみた.

Fig. 2, 3 および4にみられる各ピークは Table 1 に示した t_R との比較および, A, BおよびC重油抽出物と n-Paraffin 類標準品との混合物のガスクロマトグラムの検討から, 各重油抽出物中には, C_{12}～C_{20} の n-Paraffin の存在が確認され, 又 C_{21}～C_{28} の n-Paraffin の存在が推定された.

3. A, BおよびC重油抽出物ガスクロマトグラフィーにおける n-Paraffin 類のピーク高の比較：各重油抽出物標準溶液 5μl 注入時におけるピーク高から C_{12}～C_{28} の n-Paraffin の全量を 100 として各 n-Paraffin の割合（%）をグラフにとり Fig. 6 に示した.

4. A, BおよびC重油における n-Paraffin (C_{12}～C_{20}) の含量：n-Paraffin 類標準溶液を 10 ppm, 25 ppm および 50 ppm の濃度別にガスクロマトグラフィーを行ない内部標準法により検量線を作成し, A, BおよびC重油における n-Paraffin のそれぞれの含量を求め Table 2 に示した.

すなわち C_{12}～C_{20} の n-Paraffin の含量はA重油抽出物において19.3%, B重油抽出物において14.1%, C重油抽出物においては7.6%であった. また, これらの含

量は元の各重油に対してA重油の場合18.9%，B重油の場合 8.4%，C重油では 3.3% に相当する．

5. 魚から調製した試料溶液のガスクロマトグラフィー：供した魚種は Table 3 に示した．それぞれのガスクロマトグラムのうち8種については Fig. 7～Fig. 14 に示した．

また，相対値より各 n-Paraffin を同定した．

6. 流動パラフィンのガスクロマトグラフィー：石油系炭化水素の一つとしての流動パラフィンは離型剤として一部食品に使用を許可されており，これによる沿岸海域汚染も十分に考えられるので，重油汚染との区別が可能か否かについて検討するため，市販流動パラフィンを Scheme 1 のごとく操作したのちガスクロマトグラ

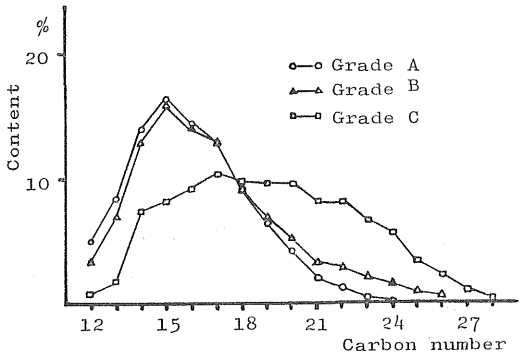


Fig. 6. Patterns of n-Paraffins in each fuel oil extract

Table 2. n-Paraffins composition (%) in each fuel oil

	grade A		grade B		grade C	
	μg/ml	%	μg/ml	%	μg/ml	%
C_{12}	18.8	1.8	12.0	1.2	8.0	0.8
C_{13}	24.4	2.4	15.0	1.5	5.4	0.5
C_{14}	28.5	2.9	19.5	2.0	6.5	0.7
C_{15}	30.8	3.1	21.8	2.2	7.3	0.7
C_{16}	26.5	2.7	19.7	2.0	8.5	0.9
C_{17}	23.3	2.3	17.7	1.8	9.8	1.0
C_{18}	17.3	1.7	12.9	1.3	9.4	1.0
C_{19}	13.5	1.4	11.3	1.1	10.0	1.0
C_{20}	9.5	1.0	9.7	1.0	10.0	1.0

Table 3. Species of tested fish

Species	Landing place	Sample weight (g)
Aji (I)		50
Aji (II)	Sasebo	50
Sawara (I)	Shimonoseki	50
Sawara (II)	Shimonoseki	50
Katsuo (I)	Choshi	50
Katsuo (II)	Choshi	50
Konoshiro	Kurashiki	50
Takabe	Shikine-jima	50
Oakamuroaji	Ito	50
Tobiuo	Miyake-jima	50
Hamadai	Kagoshima	100
Suzuki	Chiba	100
Kinmedai	Shimoda	50
Suketodara	Hokkaido	50

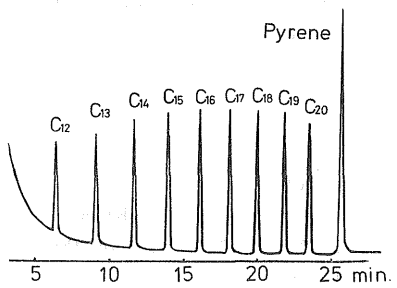


Fig. 1. Gas chromatogram of n-Paraffin standard
* The numbers showed on the peak indicate carbon number.
Conditions: See 8-Method

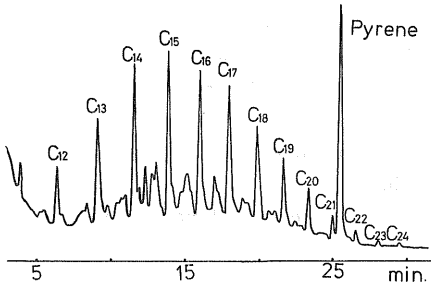


Fig. 2. Gas chromatogram of Grade A fuel oil extract

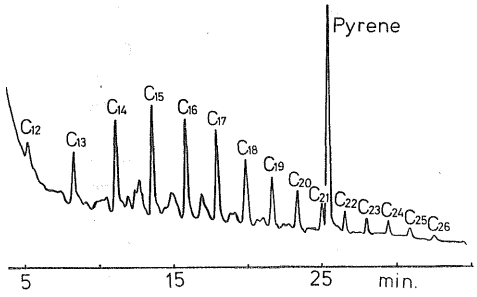


Fig. 3. Gas chromatogram of Grade B fuel oil extract

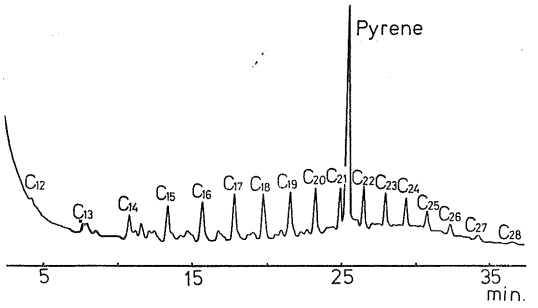


Fig. 4. Gas chromatogram of Grade C fuel oil extract

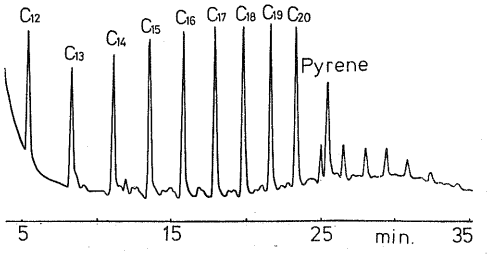


Fig. 5. Gas chromatogram of mixing n-Paraffin standard (C_{12}~C_{20}) in Grade C fuel oil extract

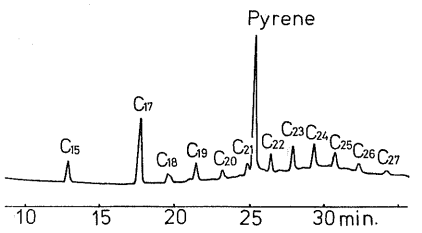


Fig. 7. Gas chromatogram of extract from "Katsuo" (II)

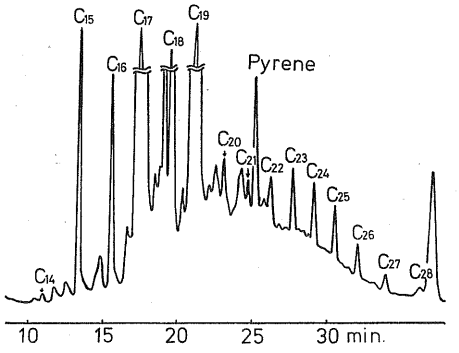


Fig. 8. Gas chromatogram of extract from "Konoshiro"

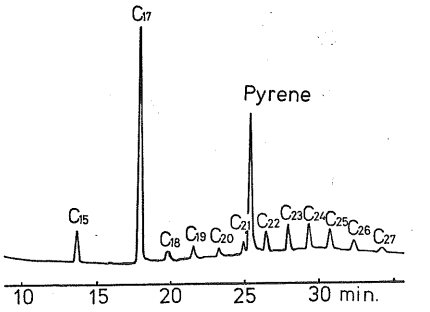


Fig. 9. Gas chromatogram of extract from "Takabe"

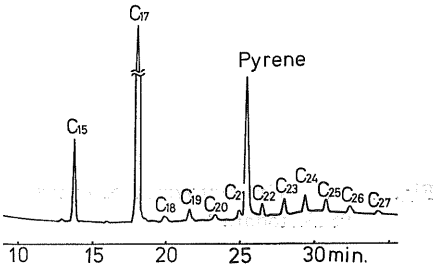


Fig. 10. Gas chromatogram of extract from "Oakamuroaji"

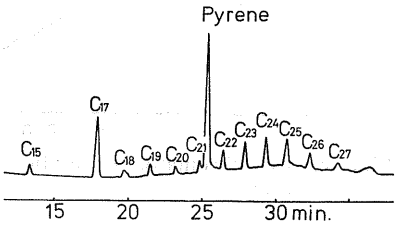


Fig. 11. Gas chromatogram of extract from "Tobiuo"

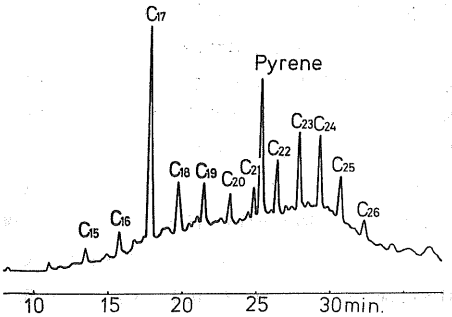


Fig. 12. Gas chromatogram of extract from "Suzuki"

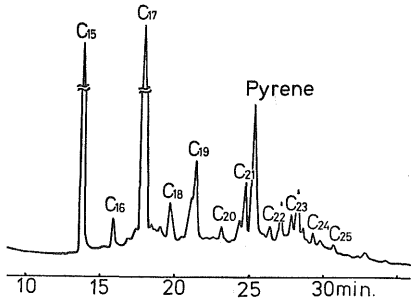


Fig. 13. Gas chromatogram of extract from "Kinmedai"

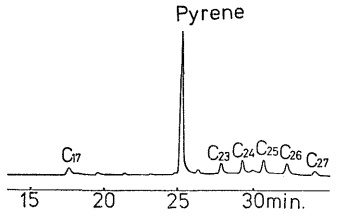


Fig. 14. Gas chromatogram of extract from "Suketodara"

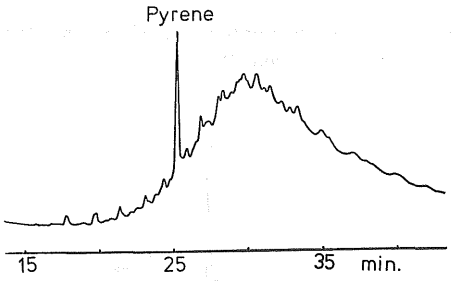


Fig. 15. Gas chromatogram of liquid Paraffin

フィーに供した．得られたガスクロマトグラムは Fig. 15 に示した．

考　　察

抽出操作において，ケン化後 n-Hexane で抽出する際，魚の種類によってはエマルジョンをおこして分離しにくいものもあるが，エチルアルコールを加えるとすみやかに分離する．また，全操作において器具類はワセリンなどを十分とり除いて使用した．

n-Paraffin のガスクロマトグラムにおいて，C_{12}～C_{15} の炭化水素では Retention time にわずかに変動がみられ，相対値において C_{12} では 0.20～0.25，C_{13} では 0.31～0.36，C_{14} では 0.42～0.45，C_{15} では 0.52～0.54 の範囲にあった．しかし C_{16} になって 0.62～0.63 とほぼ安定してくる．C_{17} 以降は安定している．これは昇温法における初期温度の不安定さによるものと思われる．したがって C_{12}～C_{15} の炭化水素を確認しがたい時は標準品を添加しピークが一致するか否かを確認する必要がある．

重油は丸善石油社製を用いたが，共同石油社製のA重油についても同様に操作してガスクロマトグラフィーに付したところ，ほぼ一致するパターンを示した．

また，C_{12}～C_{20} までの n-Paraffin 類は標準品をもって確認したが，C_{21} 以降は C_{12}～C_{20} のピークにならって推定した[2]もので，今後標準品について確認したい．C_{21} から C_{28} までの相対値は C_{21}=0.98，C_{22}=1.04，C_{23}=1.10，C_{24}=1.15，C_{25}=1.21，C_{26}=1.27，C_{27}=1.34，C_{28}=1.44 であった．

A，BおよびC重油の違いは Fig. 6 でわかる．AおよびB重油ではよく似たパターンを示している．両者とも C_{15} を頂点にし炭素数の増えるに従ってなだらかに下降しているが，A重油では C_{24} までの n-Paraffin が含有されているのに対してB重油では C_{26} まで含有されている．また，C重油ではさらに大きく違って C_{17} 付近をゆるやかな頂点にして下降し C_{28} まで含有されている．

Table 2 によれば，さらに違いは明らかになった．すなわち n-Paraffin のしめる割合は，A重油では18.9%，B重油では 8.4%，C重油では 3.3% であり，A重油よりもB重油が，B重油よりも C重油の方が n-Paraffin の総量が少なく，しかも含まれる n-Paraffin の種類は炭素数の多いものが増えていく傾向があった．

魚から得た抽出物のガスクロマトグラムでは，ほとんどの試料から n-Paraffin 類を検出した．本実験では，魚から検出された n-Paraffin 類の量的関係を示すパターンが Fig. 6 に示した各重油抽出物のいずれかのパターンに一致するかもしれないという期待があったが明りょうな一致はみられなかった．また，海苔から流動パラフィンが検出された[3]ことから，流動パラフィンのガスクロマトグラムとも比較したが流動パラフィンによる魚の汚染を示す結果はみられなかった．魚の抽出物から得られたガスクロマトグラムは，"すけとうだら" をのぞきすべての魚から類似したパターンがみられる．すなわち，C_{17} を頂点とした大きな山と C_{21} 付近を谷として C_{23}，C_{24} を頂点としたもう一つの小さな山が認められる．"すけとうだら" のガスクロマトグラム (Fig. 14) において C_{23}～C_{27} にかけて小ピークがみられるが，同様に操作した Blank のガスクロマトグラムからもほぼ同様のピークがみられることから，魚自体からくる n-Paraffin 類は検出されなかったと判断した．この理由は "すけとうだら" が北洋にのみ棲息する魚種であること，

そして北洋海域の石油汚染が非常に少なく，魚介類に石油が移行することはほとんど考えられないためであろう．

一般に，魚体中から n-Paraffin を検出する理由として，他の天然成分由来と石油成分由来が考えられるが，今までに石油以外の天然成分としての n-Paraffin 類は確認されていない．したがって石油成分由来と考えるのが妥当ではないかと思われる．魚の中には不ケン化物としてロウ[4]を持つものがあるが，これは脂肪酸と肪脂属アルコールとのエステルで，Paraffin からなる石油系のロウとはまったく異なるものである．また，特異的なガスクロマトグラムのパターンを持つ理由として，炭素数の差によって n-Paraffin 類の魚体中における蓄積および消費の状況が相違することが考えられる．

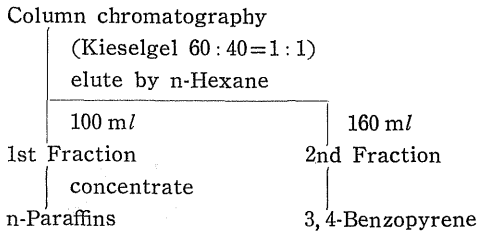
"きんめだい" 抽出物のガスクロマトグラム (Fig. 13) が他の魚と若干異なるが，これは魚の種類によって n-Paraffin の蓄積が，食性，体質の面から多様であることを示唆するものと思われる．もう一つ興味のある点は n-Paraffin 類のそれぞれの量的関係である．各魚の棲息していた海域の石油による汚染度は不明であるが，外洋性の "とびうお"，"かつお"，"たかべ" および "おあかむろあじ" と比べて，内湾性でしかも瀬戸内海産の "このしろ"，同じく内湾産の "すずき" との n-Paraffin 類の量は，あきらかに後者が多い．このことはやはり海の汚染度と n-Paraffin 類の量とに相関関係があることを示唆するものである．

本実験では，指標として n-Paraffin 類のほかに，石油中にベンゾピレンが存在することから特に 3,4-ベンゾピレンの検出も行なった．n-Paraffin と，3,4-ベンゾピレンはカラムクロマトグラフィーによって n-Paraffin と分離できるが，本法の 6.5% 含水 Kieselgel 60 では十分でなく，Kieselgel 60 と 40 を活性化し，1:1 で混和して用いる方法 (Scheme 2) を検討中である．n-Paraffin 類においては，このカラムでも6.5%含水 Kieselgel 60 のカラム同様十分回収され変らぬ回収率を得たので 3,4-ベンゾピレンと n-Paraffin の同時定量法確立が可能となった．

結　論

(1) 食品の石油汚染の実態を知るために，特に市販魚類をとりあげ石油系炭化水素の n-Paraffin 類を指標としガスクロマトグラフィーによって分析する方法を検討した結果，各 n-Paraffin をガスクロマトグラム上で完全に分離同定することができた．

Schnme 2. Separation of n-Paraffins and 3,4-Benzopyrene



(2) 外洋産の魚と石油汚染の著しい内湾産の魚との間に n-Paraffin の蓄積量に明らかに差がみられること，また，石油汚染の少ない北方海域産の魚種に蓄積がみられなかったことは，本研究を進めることが極めて意義あることの理由ともなり，n-Paraffin 類の検出が石油汚染の実態究明に有力な手掛りをあたえるものといえる．

(3) 今後の課題として，魚を用いての生体実験を行ない，n-Paraffin の魚体への取りこみについて魚種による違い，また，濃度，期間による蓄積量の差があるかなどについて実験を進める必要がある．

(4) 水島湾での重油流出事故と同じことが東京湾でおこることを想定し，その時の対策の一環として，現時点における東京湾産魚の石油汚染の実態を把握しておく必要があるものと考え，東京湾産魚について集中的に検討を行なう予定である．

(5) ガスクロマトグラフィーで得られた各ピークについて，ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いての詳細な検討を行ない，より正確に n-Paraffin を同定し，さらに魚体中の n-Paraffin 量を正確に定量する方法を確立し，魚肉と共に摂取される石油系炭化水素の量とそれが人体に与える影響について早急に何らかの手掛りを得たいと考える．

謝辞　重油を提供していただいた丸善石油株式会社に深謝します．

文　献

1) 内山　充，武田明治，斎藤行生ら：日本食品衛生学会第29回学術講演会，講演要旨集，5，1975
2) 弟子丸修：日水誌，37，297，1971
3) 榎本則行，坂本　登：食衛誌，16，406，1975
4) 土屋靖彦：水産化学，48，1971，恒星社厚生閣

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 164—170, 1976

食用油脂の変質に関する研究（第1報） 変質におよぼす要因

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 Deterioration of Oils and Fats
1. A Primary Factor of Deterioration

MOTOHIRO NISHIJIMA*, MASAMITSU KANMURI*, SHYOKO TAKAHASHI*,
HISASHI KAMIMURA*, MITSUO NAKAZATO*,
YUKO WATARI* and YASUO KIMURA*

まえがき

食用油脂は加工，調理および保存状態により種々の変質過程を経る．

油脂の変質に関する報告は数多く見られるが[1-10]，変質について総合的な検討を行なっているものは少ない．そこで著者らは直射日光，温度，金属および酸素などの各要因が油脂に与える影響について調査した．また市販の油揚げ食品についても同様の調査を行なったので併せて報告する．

実験方法

1. 試料，試薬および装置

(1) 試料

1) **大豆油**：抗酸化剤，シネルギストおよびシリコン樹脂無添加のもので過酸化物価（以下POV）1 meq/kg，酸価（以下 AV）0.1，カルボニル価（以下 CoV）3，ヨウ素価（以下 IV）135，粘度（以下 Vis）33cs のものをもちいた．

2) **モデル食品**：蒸しめん（小麦粉 2.5 kg，かん水 4 g，グアガム 1.5 g，クロシン 0.7 g および食塩 40 g を水 800 m*l* で練り合わせて厚さ 1.03 mm，切り歯18番で切り蒸したもの）を大豆油で 140°，90秒間揚げた．

3) **即席中華めんおよび揚げ菓子**：即席中華めん（ラード：BHT 180 ppm およびトコフェロール 240 ppm 添加），ピーナッツ（パーム油），スパニッシュピーナッツ（パーム油），そらまめ（米白絞油）および揚げせんべい（米白絞油）のそれぞれについてメーカーの製造直後のものを用いた．

(2) 試験油の調製

1) 油脂はそのままを試験油とした．

2) 油揚げ食品の場合は粉砕器で粉砕したのち 50 g を 300 m*l* の共栓フラスコに秤取して無水硫酸ナトリウム 5 g およびエチルエーテル約 150 m*l* を加えて窒素を3～5分導入した．暗所に一夜放置後 No. 5c のロ紙でろ過し，残渣はエチルエーテル 50 m*l* で2回洗滌した．ろ液を合わせ，減圧下 35° 以下でエチルエーテルを留去して残渣を試験油とした．

(3) **試薬および装置** 油脂抽出にもちいたエチルエーテルは過酸化物を含まないことを確認して使用した．他の試薬はすべて特級品をもちいた．粘度計：ウベローデ型動粘度計 4，6，7号（蕪木科学器機工業KK）金属容器：銅，鉄，亜鉛，アルミニウム，ニッケル，スズ，およびステンレス製（対照としてガラス製）の内径8.0cm×高さ 2.5 cm の容器をもちいた．

2. 油脂の変質度の測定

本研究においての変質度は官能試験（臭気），POV，AV，IV，CoV，および Vis をもって総合的に判定することとした．なお POV，AV，IV（ウィイス法）の測定は日本薬学会協定衛生試験法に準じ，CoV および Vis の測定は日本油化学協会制定基準油脂分析試験法に準じた．

結果および考察

1. 油脂の変質と安定性

食用油脂または油揚げ食品の変質の主要因として，製造および調理時における温度の影響，保存または店頭販売時における光線の影響，ならびに製造，調理および保存時における金属容器の影響が考えられる．そこでフラ

* 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

イ用油として最も多量に使用され，かつ比較的変質が速いため，変質度を見るには利点を有する大豆油をもちいて検討を行なった．

(1) **温度** 大豆油 30 g を内径 6.5 cm×高さ 5.0 cm のビーカーに入れ 30°，60°，90°，120°，150°，170°および200°の各温度の油浴中で連続的に加熱を行ない，6時間ごとに変質度を測定した．結果は Fig. 1 に示したとおりであり，POV については 90° までは温度の上昇に伴って急激な増加が見られた．120°では50時間までに急激な増加が認められるが，100 時間後には 85meq/

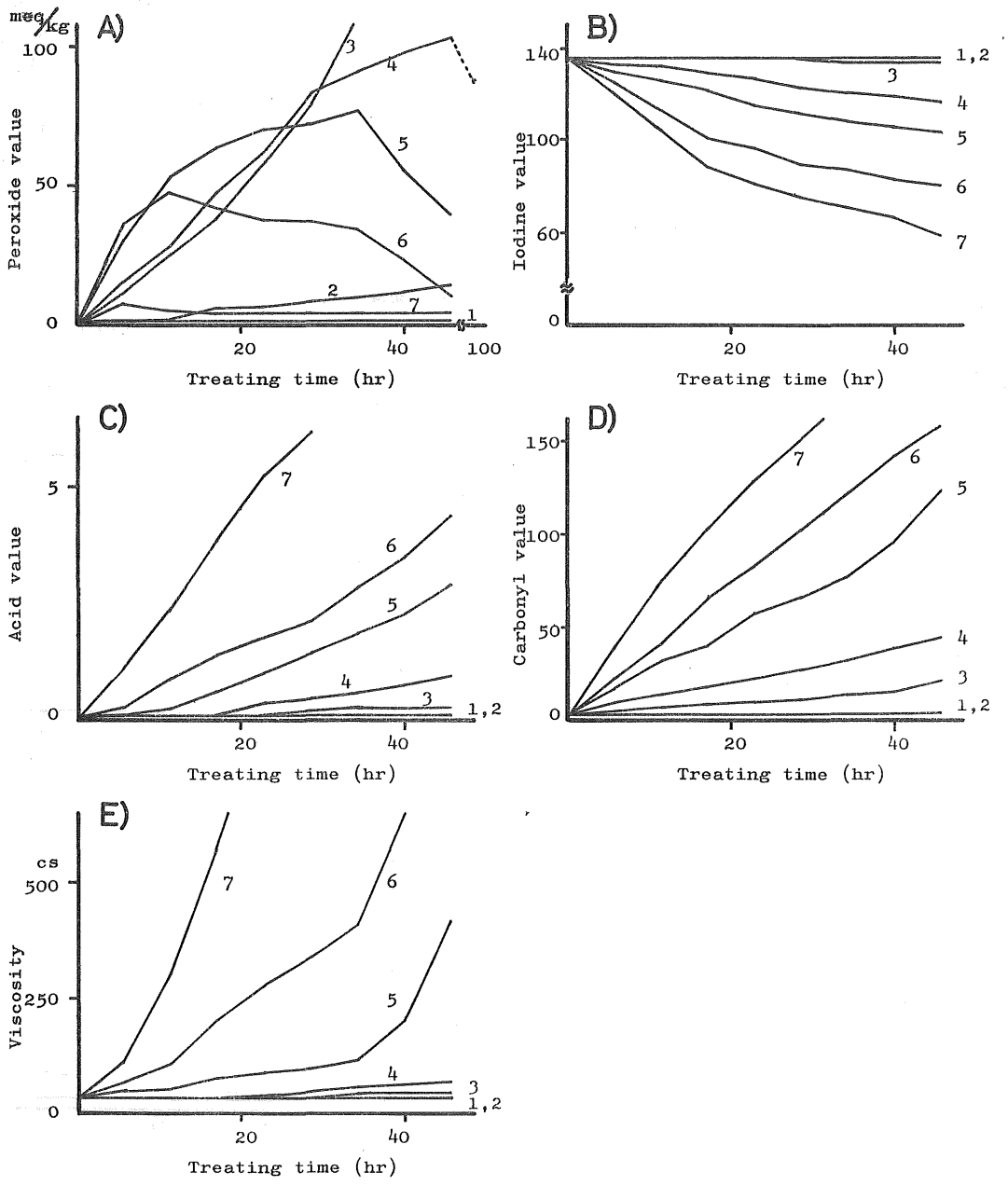


Fig. 1. Effect of temperature on deterioration of soybean oil
A : Peroxide value B : Iodine value C : Acid value
D : Carbonyl value E : Viscosity
1 : 30° 2 : 60° 3 : 90° 4 : 120° 5 : 150° 6 : 170° 7 : 200°

kg と下降の傾向が見られた．150° 以上では高温になるに伴い極大値に達する時間が短く，かつ値が小さくなる傾向を示した．これらの事実は油脂の酸化速度が温度により大きく影響されること，すなわち温度の上昇，また時間の経過に伴ない酸化は促進されるが，反面，過酸化物の分解も同時に促進するために生ずる現象であると推察される．IV については Fig. 1—B に示したとおりであり，90° 以上では加熱温度および時間の経過に伴ない減少の傾向を示した．このことは 90° 以上では温度の上昇に伴い加熱重合が促進されることを示唆しているものと思われる．AV, CoV, および Vis の結果は Fig. 1—C～E に示したとおりであり，いずれも IV と同様の傾向を示した．以上のことから油の変質はほぼ 90° を境にして，それ以下では主として自動酸化による過酸化物の蓄積が油の変質の因子となり，90° 以上では熱酸化重合にもとづく変質が主であることが判明した．

(2) **光線** 試料 100 g を内径 6.0 cm×高さ 8.5 cm のビーカーに秤取して直射日光下，室内蛍光灯下および暗所に放置して約 50 日間の経日変化を調査した結果は，Fig. 2 に示したとおりであり，直射日光下では 2 日目で異臭を発し，3 日目で POV が 100 meq/kg を上回った．蛍光灯下では10日で 10 meq/kg を上回り30日目では異臭を発した．一方暗所に放置したものは50日目でも微に POV に上昇を認めたに過ぎなかった．IV, AV および CoV については POV と同様に直射日光下では急激な変化が認められたが，蛍光灯下，暗所に放置したものは，蛍光灯下の CoV が微に上昇が認められたほかは特に変化は見られなかった．以上のことから太陽光線は油の自動酸化の速度を著しく促進することが推察された．

(3) **金属** 銅，亜鉛，ニッケル，スズ，ステンレス，アルミニウムおよびガラス製の内径 8.0 cm× 高さ 2.5

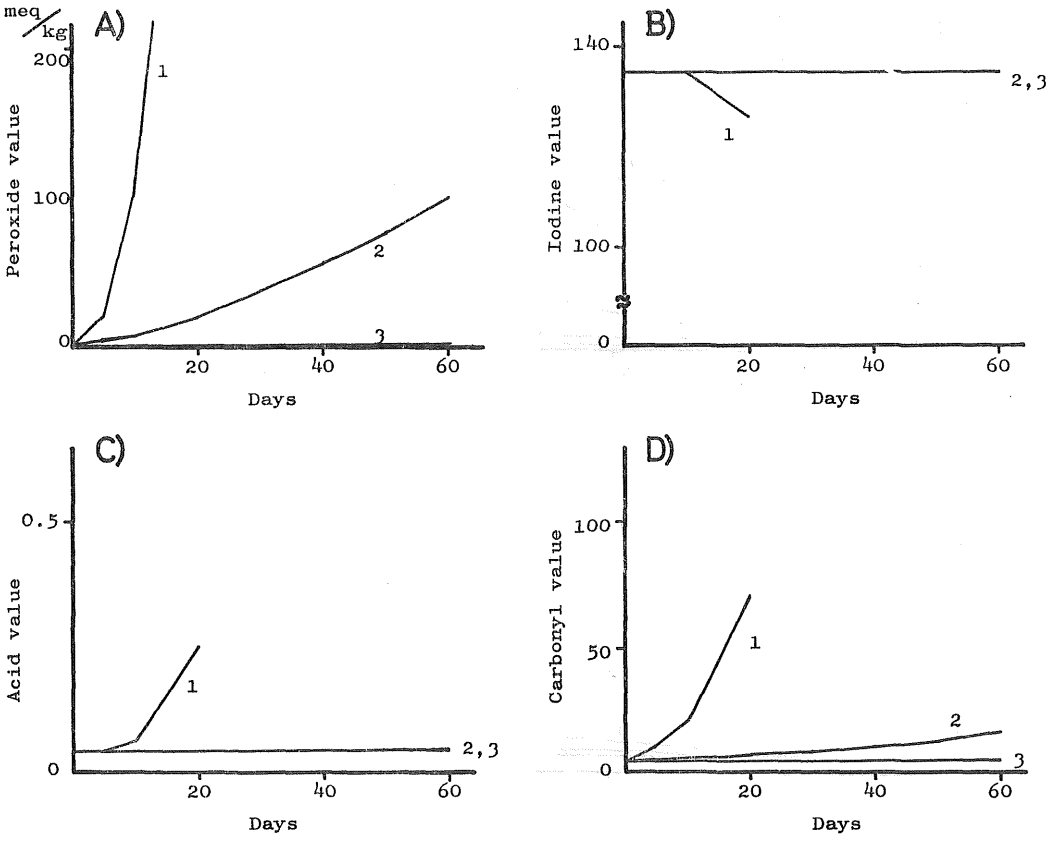


Fig. 2. Effect of rays on rancidity of soybean oil
A : Peroxide value B : Iodine value C : Acid value
D : Carbonyl value
1 : Sun light 2 : Fluorescent light 3 : Dark place

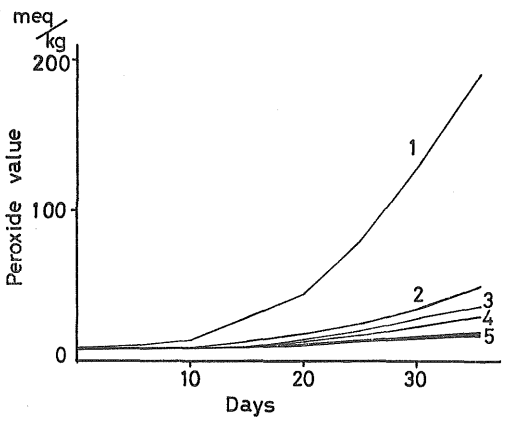


Fig. 3. Effect of metal on rancidity of soybean oil
1: Cu 2: Fe 3: Cr 4: Zn
5: Sn, Stainless, Al, Glass

cm の各容器にそれぞれ試料 50 g を分取して 200°, 30 分間加温後ビーカーに移し暗所に放置して経日変化を測定した結果は Fig. 3 に示したとおりであり，特に銅容器内で加温した油は POV の増加が著しかった．また加

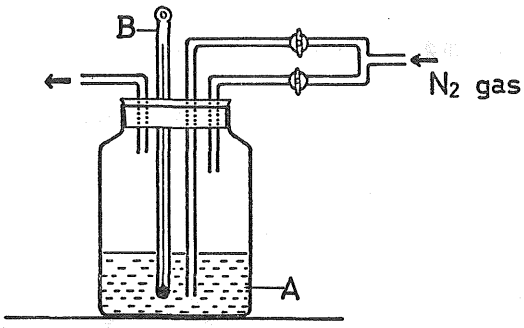


Fig. 4. Apparatus of air replace with N_2 gas
A: Soybean oil B: Thermometer

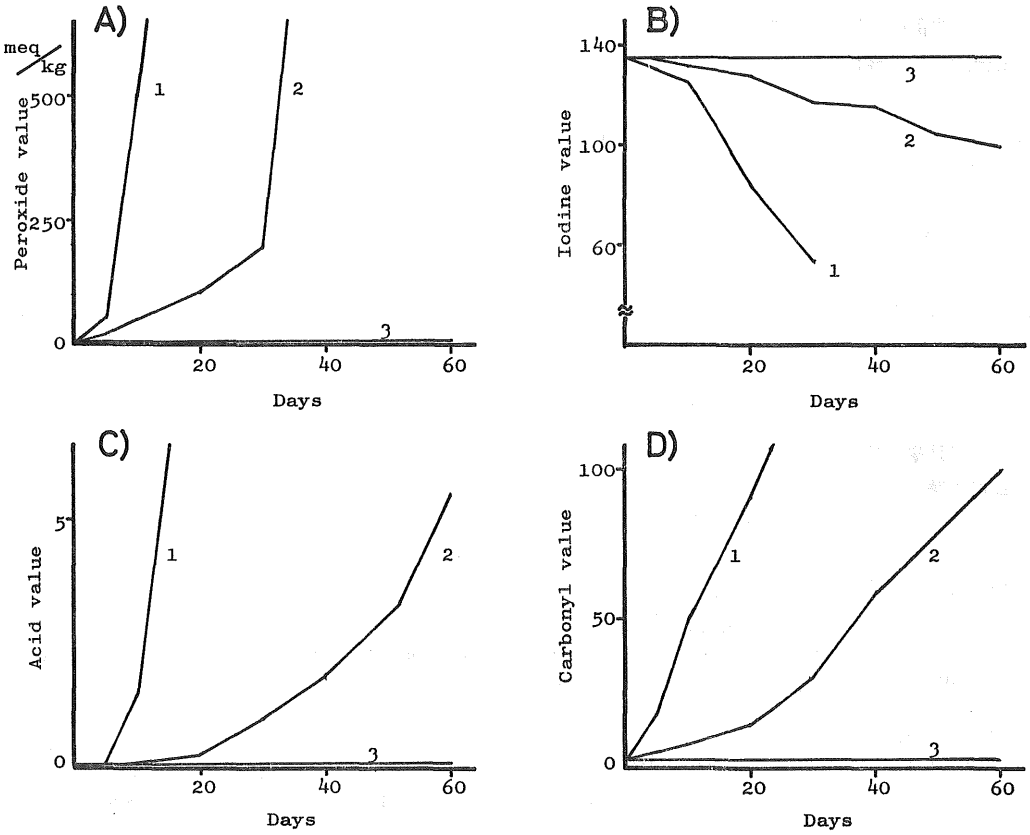


Fig. 5. Chemical changes during autoxidation of oil in fried noodle
A: Peroxide value B: Iodine value C: Acid value
D: Carbonyl value
1: Sun light 2: Fluorescent light 3: Dark place

温したのちは 4.5 ppm に増加していたことから，油に溶出した銅が油脂の変質を促進することを示唆しているものと考える．他の容器の影響の強さは銅容器に比較してわずかではあるが，鉄＞クローム＞亜鉛＞ニッケル，スズ，ステンレス，アルミニウム，ガラスの順であった．

(4) **酸素** 試料 50g を Fig. 4 に示したような容器に入れ，窒素を通じ除酸素したのちヘッドスペースに窒素ガスを通気しつづけたものと栓を取り大気中に暴露したものをそれぞれ 160，200° の条件で加温したのち15時間放冷し，変質度を測定した結果は Table 1 に示したとおりであり，窒素気流中のものは安定でほとんど変質が認められなかった．一方大気中に暴露したものに重合の促進が観察されたことは自動酸化には酸素の存在が必要なのは当然であるが，重合も 200° では酸素の存在が必要であることが推察された．このことは空気接触面積（cm^2/g）が油の変質に大きな要因になることを示唆している．

2. 油揚げ食品の変質と安定性

(1) モデル食品の経日変化

油脂の変質による中毒または異臭等の苦情は油揚げ食品中の油脂が原因となる場合が多い．そこで大豆油をもちいて 150°±3° で90秒間めんを揚げたのち，直射日光下，蛍光灯下および暗所に放置してそれぞれの変質度を調査した．POV の結果は Fig. 5 に示したとおりであり，大豆油の結果（Fig. 2）と比較して変質が急速であった．また IV，AV および CoV についてもほぼ同様の結果が得られた．これは油揚げをつくる場合の温度，さらに油揚げ食品は空気との接触面積が大きくなるためと考えられる．

(2) 市販の油揚げ食品の経日変化

1) 即席中華めん 新油をもちいて作製した即席中華めんの油脂含量は16～23%，抽出油の POV は 5.0meq/kg，AV は 0.1 であり，加熱使用油で作製した即席中華めんの油脂含量は17～23%，抽出油の POV は 9.0meq/kg，AV は 0.5 であった．それぞれの油で揚げた即席中華めんを暗所，冷暗所，蛍光灯下，直射日光下に放置したときの抽出油の POV 測定結果は Fig. 6—A に示したとおりであり，暗所および冷暗所に放置した場合 200 日目でもほとんど変化が見られなかった．蛍光灯下に放置したものは新油，加熱使用油で誘導期に大きな差が見られ，200 日目では新油で揚げたものは POV 30 meq/kg に対し，加熱使用油で揚げたものは 240 meq/kg に達した．直射日光下での変質はきわめて速く，加熱使用油で揚げた即席中華めんは10日目で POV 66 meq/kg，20日目で 200 meq/kg に達した．新油で揚げた即席中華めんはわずかに上昇の抑制が見られた．一方 AV については Fig. 6—B に示したとおりであり，直射日光下では加熱使用油で揚げた製品は新油で揚げたものに比較

Table 1. Stability of Soybean Oil at Heat

Sample preparation	Characteristic value				
	POV (meq/kg)	AV	CoV	IV	Vis(cs)
Air blown into sample at 180°	30	0.5	35	126	52
N_2 blown into sample at 180°	1	0.1	3	135	33
Air blown into sample at 200°	35	0.4	46	124	56
N_2 blown into sample at 200°	1	0.1	3	135	33
Control	1	0.1	3	135	33

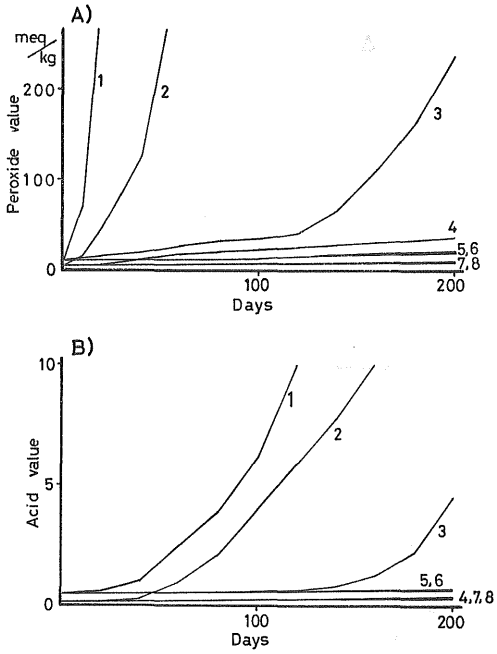


Fig. 6. Chemical changes during autoxidation of fat in instant ramen
A : peroxide value B : Acid value
1 : Sun light (used fat)
2 : Sun light (initial fat)
3 : Fluorescent light (used fat)
4 : Fluorescent light (initial fat)
5 : Dark place (used fat)
6 : Cooling place (used fat)
7 : Dark place (initial fat)
8 : Cooling place (initial fat)

して，より上昇が速く蛍光灯下では加熱使用油が120日頃から徐々に上昇する傾向を示したのに対し，新油で揚げたものは200日目でも変化が認められなかった．即席中華めんの包装は遮光等について考慮されているが，直射日光下はもちろん蛍光灯下でも変質に影響するため暗所による保存が必要と思われる．また新油と加熱使用油により保存性の異なることから加熱使用油の使用は充分な注意が必要と思われる．

2) **その他の食品**　ピーナッツ，スパニッシュピーナッツ，そらまめおよび揚げせんべいのそれぞれを製造直後より蛍光灯下に放置してPOVおよびAVの経日変化を調査した結果はFig. 7に示したとおりであり，おおむね30日でPOVは20 meq/kgを越え，かつ，いずれの食品も風味が損われ，2カ月でそらまめおよびピーナッツのPOVは50 meq/kgを越え，そらまめは異臭が認められた．各品目により変質度が異なるのは原材料の種類，使用油脂の種類，揚げ温度，揚げ物の油脂含量および調味料の抗酸化能等の差によるものと思われる．

まとめ

油の変質の主要因である直射日光，温度，金属および酸素が油脂に与える影響を検討し，また油揚げ食品の放置条件による変質度を調査した．

1. 油脂を加温した場合，90° 以下では主として自動酸化にもとづく変質が生じ，90° 以上では主として熱重合にもとづく変質が生ずる．
2. 太陽光線は自動酸化の速度を著しく促進させる．
3. 油脂を金属容器に入れ加熱した場合，微量に混入した金属が変質を促進し，影響の強さは銅が最も大きく，他は鉄＞クローム＞亜鉛＞ニッケル，スズ，ステンレス，アルミニウムの順であった．
4. 劣化は酸素の存在が大きく影響すること，また油脂の空気接触面積が変質に大きな要因となった．
5. 油脂とモデル食品を蛍光灯下に放置した場合，モデル食品の方が自動酸化が著しかった．

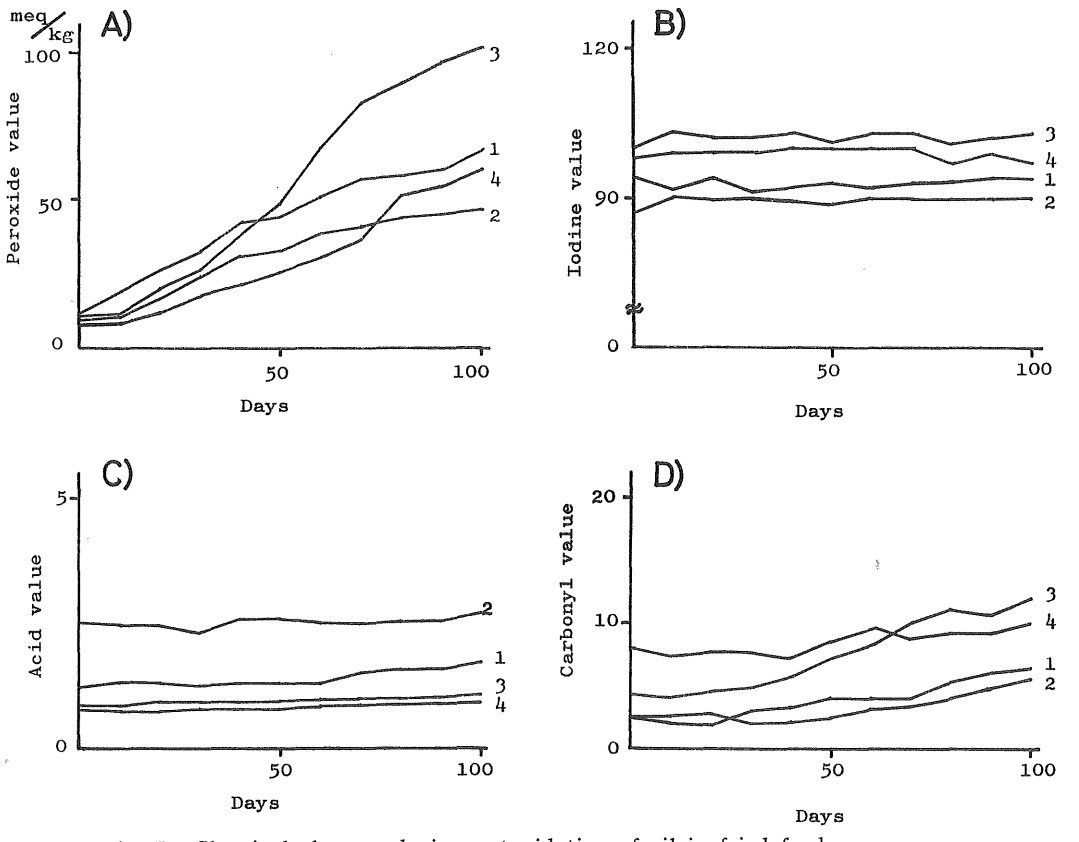


Fig. 7. Chemical changes during autoxidation of oil in fried foods
A : Peroxide value　B : Iodine value　C : Acid value　D : Carbonyl value
1 : Peanut　2 : Spanish bean　3 : Broad bean　4 : Fried rice cracker

6. 市販即席中華めんを製造直後より冷暗所，暗所に保存した場合は200日後でも特に変化は認められなかった．蛍光灯下に放置したものは徐々に POV の上昇が認められ，加熱使用油で揚げたものは新油で揚げたものに比較して誘導期が短かかった．

7. ピーナッツ，スパニッシュピーナッツ，そらまめおよび揚げせんべいのそれぞれ製造直後より蛍光灯下に放置したものはおおむね1カ月で風味が損われ，2カ月で異臭を認めるものもあった．

謝辞 本研究に当り試料を提供していただいた豊年製油株式会社，明星食品株式会社に深謝いたします．

文　献

1) Sahasrabudhe, M.R.: *J. Am. chem. soc.*, **42**, 763, 1965
2) Endres, J.G., V.R. Bhalerao, and F.A. Kummerow: *ibid.*, **39**, 188, 1962
3) 松尾　登：栄養と食糧，**25**，579，1972
4) Perkins, E.G. and L.A. Van Akkern: *J. Am. chem. soc.*, **24**, 782, 1965
5) Bottino, N.R.: *ibid.*, **39**, 25, 1962
6) Chipault, J.R. and G.R. Mizuno: *ibid.*, **41**, 468, 1964
7) Anderson, R.H. and T.E. Huntley: *ibid.*, **41**, 687, 1964
8) 梶本五郎，吉田弘美：油化学，**20**，555，1971
9) 土田雅子，三浦利之，武藤　健：油化学，**22**，259，1973
10) 伊藤誉志男，磯部公明：食衛誌，**11**，268，1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 171—173, 1976

食用油脂の変質に関する研究（第2報）市販油脂食品の変質度の実態調査

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 Deterioration of Oils and Fats
2. Survey of Rancidity of Commercial Fried Foods

MOTOHIRO NISHIJIMA*, MASAMITSU KANMURI*, SHYOKO TAKAHASHI*,
HISASHI KAMIMURA*, MITSUO NAKAZATO*,
YUKO WATARI* and YASUO KIMURA*

まえがき

食用油脂は植物性，動物性を問わず大部分がトリグリセライドであり，そのほか遊離脂肪酸，リン脂質，ステアリン，脂溶性ビタミンなどを含有している．食物としての油脂は高いエネルギー供給源であり，また必須脂肪酸の供給源としても栄養生理学的に重要な物質である．しかし必須脂肪酸はいずれも高度不飽和脂肪酸であることから，必要度の高いものほど変質し易いという欠点を有している．

食用油脂の変質は栄養価を損なうばかりでなく風味をも損ない，さらに油脂の変質が原因と思われる中毒を起こす場合もある[1]．また異臭等による苦情もあとを絶たない．

国連食糧農業機関・国連世界保健機関では食用油脂の一般規格の中で過酸化物価（以下 POV）は 10 meq/kg 以下，酸価（以下 AV）は KOH 0.6 mg/kg 以下とすることを提言している[2]．

またわが国においては即席中華めんについて，特殊栄養食品の基準として製造時の POV が 20 meq/kg 以下と定められている[3]．日本農林規格においては製造時の AV が 1.8 以下，また製造年月日を明示すること[4]，さらに日本即席食品工業協会の自主規格では保存期間を6カ月と規定している．しかし他の油揚げ食品についての規格等は見当らない．

そこで我々は市販食用油脂ならびに油揚げ食品中の油脂の変質程度を把握するために，即席中華めん，かりん糖，揚げせんべい，ポテトチップおよびピーナッツについて変質度の調査をおこなった．

実験方法

1. 試料および試薬

(1) **試料**　いずれも市販品をもちいた．

種類は袋入り即席中華めん 28 種（77検体），カップ入り即席中華めん 8 種（9検体），揚げせんべい 58 種（61検体），かりん糖16種（16検体），ポテトチップ24種（24検体），ピーナッツ 12 種（12検体）および食用油脂14種（14検体）である．なお同一銘柄の試料は販売先あるいは製造年月日等の異なるものである．

(2) **試験油の調製**　カップまたは袋の開封時に異臭の有無を確認したのち前報[5]に従って調製した．なお異臭は個人差が大きいため6人中4人以上が異常と認めたものを異臭有りと判定した．

(3) **試薬**　油脂抽出にもちいたエチルエーテルは過酸化物を含まないことを確認して使用した．他の試薬はすべて試薬特級品をもちいた．

2. 油脂の変質度の測定

本研究における変質度は官能試験（臭気），POV，AV およびカルボニル価（以下 CoV）をもって総合的に判定することにした．POV および AV の測定は日本薬学会協定衛生試験法に準じた．CoV の測定は日本油化学協会制定基準油脂分析試験法に準じた．

結果および考察

袋入りおよびカップ入り即席中華めん，揚げせんべい，かりん糖，ポテトチップおよびピーナッツ中の油脂ならびに食用油脂のそれぞれの POV，AV，CoV は Table 1～3 に示した．

1. 即席中華めん

揚げ油は一般にラードが使用さ

* 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. Peroxide Value of Oil and Fat in Fried Foods

Sample name	No. of sample	POV				
		<10	10～20	20～30	30～60	60<
Instant ramen	86	28	50	4	2	2
Fried rice cracker	61	23	24	5	7	2
Fried dough cake	16	7	3	3	3	0
Potato chip	24	11	5	2	3	3
Buttered peanut	12	3	4	1	3	1
Edible oil	14	14	0	0	0	0

Table 2. Acid Value of Oil and Fat in Fried Foods

Sample name	No. of sample	AV			
		<1.0	1.0～1.5	1.5～2.0	2.0<
Instant ramen	86	66	15	2	3
Fried rice cracker	61	16	24	14	7
Fried dough cake	16	4	7	1	4
Potato chip	24	14	6	1	3
Buttered peanut	12	6	6	0	0
Edible oil	14	14	0	0	0

Table 3. Carbonyl Value of Oil and Fat in Fried Foods

Sample name	No. of sample	CoV			
		<5	5～10	10～15	15<
Instant ramen	86	20	55	10	1
Fried rice cracker	50	6	32	11	1
Fried dough cake	10	0	4	4	2
Potato chip	13	1	3	7	2
Buttered peanut	12	10	1	1	0
Edible oil	14	14	0	0	0

れ，且つ揚げ温度が140～150°であることからブチルヒドロキシアニソールおよびジブチルヒドロキシトルエン等の抗酸化剤はかなり残存するものと思われる．また製品の油脂含量が13～22%であることから使用油の回転率は良いと思われる．以上の理由から即席中華めんは他の油揚げ食品と比較して保存性は良いものと考えられる．

86検体中 POV が 20 meq/kg 以下のものが78検体（91%）であった．残り8検体のうち2検体はそれぞれ POV 68 meq/kg（製造後約120日），70 meq/kg（製造後約220日）を示し，またこの2検体は明らかに異臭が認められた．6検体の POV は 20～60 meq/kg であったが，これらはいずれも異臭は認められなかった．最も POV の高い2検体のうち1種は自主規格の保存期間以内であるにもかかわらず明らかに異臭を認めたことは，販売店における管理に検討を要することを示唆している．なお AV 2.0 以上のもの，CoV 15 以上のものと変質度との関連性は特に認められなかった．

2. 揚げせんべい もち米およびうるち米を原料としたいわゆる米菓計61検体について調査をおこなった．油脂含量は8～32%であり，大半のものが15～25%であった．61検体中47検体（77%）のものが POV 20 meq/kg 以下で，12検体の POV は 20～60 meq/kg の範囲内にあり，2検体のものが 61 meq/kg，67 meq/kg を示した．POV が 60 meq/kg を越える2検体はいずれも異臭を認めた．AV は7検体が 2.0～2.4 を示し，残り 54 検体は 2.0 以下であった．CoV を測定した検体は計50種であるが，このうち10以下のものが38検体で，残り12検体は 10～18 であった．

揚げせんべいと即席中華めんの油脂含量を比較した場合，油脂含有率がほぼ同じことからフライヤー中の油の回転率は同程度と思われるが，揚げせんべいの揚げ温度が 250° 前後の場合が多く，また植物油を使用している場合が多いことから，一般にラードを使用している即席中華めんに比較して変質しやすいものと思われる．また AV が高いものは劣化の進んだ油で揚げた製品であることも考えられる．

3. かりん糖 16検体はいずれも小麦粉を原料としたもので，いわゆるいもかりん糖は対象としなかった．油脂含量は11～40%であり，15～20%のものが多かった．POV が 20 meq/kg 以下のものは16検体中10検体（62%）で，残り6検体は 20～36 meq/kg であった．AV は 2.0～5.8 のものが4検体であった．CoV は10検体について測定したところ5～17 であった．

かりん糖の揚げ温度は一般に 180～200° であること，また油の回転率は即席中華めんと同程度であると思われるが，AV の高いものがあることから加熱使用油にかなり劣化の進んだ油を使用している可能性もあると思われる．

4. ポテトチップ ポテトチップ（馬鈴薯の輪切り）のほかに，マッシュポテト，でん粉を原料としたポテトスナックを同一に扱った．油脂含量は 22～40% であった．24検体中 POV が 60 meq/kg 以上を示すものが3検体あった．このうち 119 meq/kg の値を示すものについてみると AV が 3.6，CoV が16であり，同様に 138 meq/kg のものは AV が 4.4，CoV が 18 といずれも高い値を示し，且つ強い異臭を認めた．残り21検体のうち

16検体の POV は 20 meq/kg 以下（67%）であり，5検体は 20～60 meq/kg の範囲内であった．これら21検体はいずれも異臭を認めず，また AV はいずれも 2.0 以下であった．

ポテトチップの揚げ温度は 160° 前後がよいとされ，また油脂含量が22～40%であることから油の回転率は早いはずであるにもかかわらず，変質の進んだものが販売されていることはポテトチップの空気接触面積が大きいことのほかに販売店での管理の粗雑さによることが原因していると思われる．

5. ピーナッツ 油脂含量は15～38%であった．12検体中 POV が 20 meq/kg 以下のものは7検体（58%），20～60 meq/kg のものが4検体，60 meq/kg を越えるものは1検体であったが，特に値の高い1検体には異臭を認めた．AV は 0.6～1.1，CoV は1～11 であった．

ピーナッツを揚げる温度は 150～180° 程度であり，揚げる場合の油脂吸量は2～3%と非常に少ないことからフライヤーへの差し油の量が少なく，したがって油の回転率が悪いことは明らかである．ピーナッツは成分として多量の油脂を含有するため，この油脂の品質が製品の安定性に影響するものと思われるが，今回の調査では因果関係が判然としなかった．しかしながら一般的に保存性のよい食品であると考えられているピーナッツは，油揚げとした場合，保存方法に特に留意する必要がある．

6. 食用油脂 家庭用に市販されている食用油脂14検体はいずれも POV 3 meq/kg 以下，AV 0.6 以下，CoV 5 以下であり良質のものであった．家庭で揚げ物用として使用したのち保存する場合には光線等に十分注意し，なるべく短時日で使用することに留意すれば特に問題ないものと思われる．

ま と め

市販の油揚げ食品および食用油脂の変質度を調査するため，即席中華めん，揚げせんべい，かりん糖，ポテトチップ，ピーナッツおよび食用油脂の計160種類，213検体について調査をおこなった．

1. 即席中華めん86検体中78検体が POV 20 meq/kg 以下であったが，2検体のものが POV 60 meq/kg を越え，これらはいずれも異臭が認められた．また製造後4カ月のものでも変質していたものがあったことは，流通面での光線等の影響を十分に留意する必要がある．

2. 揚げせんべい61検体，かりん糖16検体，ポテトチップ24検体およびピーナッツ12検体の揚げ菓子について調査をおこなった．大半のものは POV 30 meq/kg 以下，AV 2.0 以下，CoV 15 以下であったが POV 60 meq/kg を上回ったものはいずれも異臭が認められた．AV および CoV と製品の変質度との関連性は今回の調査結果からは特に認められなかった．

これらの製品は即席中華めんが主としてラードを使用するのに対して植物油が多く，また揚げ温度が高いものが多いこと，さらに一般的には包装が簡易であることなどから加工，流通段階での留意はもちろんのこと，特に販売時での光線等の影響について十分に配慮すべきである．

3. 油揚げ食品の変質に関しては，ほとんど法的な基準が見当らない．しかし現実に異臭を有し，かつ POV，AV の高い製品もいくつか市販されていたことは問題であり，魚の干物等の食品中には POV，AV の高いものがあるとしても，少なくとも油揚げ食品中の油脂に関しては何らかの法的規制または指導基準の設定が必要と思われる．

文 献

1) 山崎 恵：ニューフードインダストリー，15，12，4，1973
2) FAO/WHO 合同食品規格計画食品規格委員会，CAC/RS 19—1969
3) 厚生省公衆衛生局長通知，栄発第222号（昭和46年4月8日）
4) 農林省告示第1571号（昭和47年8月25日）
5) 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：東京衛研年報，27-1，164，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 174—178, 1976

フッ素の衛生学的研究（第3報） 各種食品中のフッ素含有量の分析および食餌からのフッ素摂取量の評価

友松俊夫*, 鈴木二郎*, 中沢久美子*, 木村康夫*

Hygienic Study on Fluorine (III) Analysis of Fluorine in Foods and Estimation of Dietary Fluorine Intake

TOSHIO TOMOMATSU*, JIRO SUZUKI*, KUMIKO NAKAZAWA*, and YASUO KIMURA*

The analysis of fluoride was made in 710 samples of 241 food items to make estimation of dietary fluoride intake.

The levels of fluoride less than 3 ppm were encountered in 199 items which corresponded to 82.6 % of total items examined. The marine products including fish and seaweed were shown to contain more than 3 ppm of fluoride.

Based on the fluoride levels in the foods found in this study, a dietary intake was calculated to be 1,747.2μg/day which was quite close to that found in the diet for 6 day period analyzed previously. However, agreement between the calculated and found value might be incidental, because some ingredients of the diet were not involved in the food items examined in this study. This result appears to warrant a farther study to make more precise evaluation on our dietary fluoride intake.

はじめに

フッ素による食品汚染を知る一つの手段として，異なった年代における分析値と比較するために，現在における食品中のフッ素含有量を知る必要がある．また，これらの含有量を用いて，現在人間が，どの程度のフッ素量を摂取しているか評価することも，我々の健康と関連して興味のあるところである．

今までに，これらの調査に関連して，分析方法の検討[1]や，market-basket study による摂取量の評価[2]を行って来た．

今回は，比較的データの少ない加工食品を含めて，個々の食品中のフッ素含有量を知ること，ここで得られた分析値および前回 market-basket study で利用された献立表[2]中の食品重量から，フッ素摂取量の評価を行うこと，などを目的として調査研究を実施したので報告する．

実験方法

試料の収集および調製 241種，710検体の試料について，主として市販品を購入し，穀物および魚介類の一部は，それぞれ倉庫および魚市場から入手した．また生の海草は，直接海岸で採取したものである．これらの試料のうち，不均一な乾燥品は，豆粉砕機を用いて，また水分の比較的多いものは，ホモジナイザーを用いて均一の試料とし，分析に供した．

装置，試薬および分析操作 前報[1]に準じた．

実験結果および考察

今回収集した食品について，フッ素含有量の分析を行ったところ，表1に示す結果を得た．

これまでにも，食品中のフッ素濃度について多くの報告があるが，そのほとんどが未加工品についての分析値であった．今度の調査で得た未加工品中の値と，これらの報告に記載されている含有量[3-5]は，後者における供試試料の状態が不明なため，かならずしも直接比較することはできないが，後者の分析値は，過大にすぎるようにおもわれる．このことは Fisher[6] らの報告によってもうらづけられる．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Fluoride Content of Foods

products	sample No.	ppm min.	ppm max.	ppm av.
Cereal Products				
Grains				
barley, dry, whole	1			0.79
barley, dry, pressed	5	1.64	1.95	1.84
buckwheat, dry, whole	1			0.89
corn, dry	2	0.79	0.94	0.87
corn, fresh, frozen	2	0.46	1.00	0.73
corn, boiled, canned	2	0.59	0.69	0.64
corn (giant-), roasted, salted	1			2.14
foxtail millet, dry, whole	1			0.64
japanese barnyard millet, dry, whole	1			0.83
proso millet, dry, whole	1			0.41
rice, dry, brown	57	0.41	2.07	1.30
rice, dry, polished	10	0.25	2.10	1.20
rye, dry, brown	1			2.27
sorghum, dry, whole	1			2.02
wheat, brown	1			0.96
wheat flour	7	1.84	2.47	2.16
Bread				
brown bread	2	1.84	1.97	1.90
french bread	2	1.82	2.15	1.99
raisin bread	1			1.85
white bread	7	1.79	2.24	1.99
other bread	4	2.02	2.42	2.21
Other Products				
bread crumb	2	2.00	2.14	2.07
buckwheat noodles, dry	5	1.64	1.99	1.75
chinese-noodles, instant	56	0.14	2.72	0.89
japanese noodles, dry	10	1.00	1.82	1.50
japanese noodles, wet	5	0.58	0.96	0.83
macaroni, dry	4	1.64	1.79	1.72
rice, bran	4	1.74	1.99	1.87
spaghetti, dry	1			1.79
Roots and Tubers				
"katakuri" starch	1			0.45
"konnyaku", white, wet	2	0.24	0.28	0.26
"konnyaku", dark, wet	2	0.25	0.42	0.34
"konnyaku", "shirataki", wet	1			0.42
potato, fresh	5	0.33	0.52	0.45
sweet potatoes, fresh	5	0.70	0.87	0.77
taros, fresh	5	0.26	0.63	0.37
yams, fresh	5	0.46	0.62	0.54
Confectioneries				
"an" bread	1			1.94
"an" doughnuts	1			2.04
biscuits	2	1.60	1.70	1.65
candy	6	0.87	1.48	1.22
chocolate bread	1			1.95
cream bread	1			1.95
cream wafer	1			0.58
"hot cake mix", powder, unbaked	1			2.12
"karintou"	4	0.73	1.25	1.01
"okonomiyakinomoto" powder, unbaked	1			5.20
pie (cheese, cream, raisin, cinnamon)	4	1.72	2.02	1.88
sweet bread	2	1.99	2.04	2.02
Seeds and Nuts				
almond, roasted, seasoned	1			1.60
brazil nuts, roasted, salted	1			1.60
cashew nuts, roasted, salted	1			2.25
gingko seeds, boiled, canned	1			0.74
hazel nuts, roasted, salted	1			2.07
japanese chestnuts, fresh	1			0.61
macadamia nuts, roasted, salted	1			2.09
peanuts, roasted, seasoned	1			1.94
peanuts, shelled, roasted	2	1.80	2.20	2.00
peanuts, in shell, roasted	2	1.78	1.94	1.86
pine nuts, dry	1			1.84
pistachio nuts, roasted	1			1.77
sesame seeds, dry	1			2.60
walnuts, dry	1			1.95
Legumes				
"abura-age" (soybean curd, fried)	3	0.73	1.80	1.17
"azuki" beans, dry	5	1.99	2.25	2.11
broad beans, boiled, frozen	1			1.09
"budo-mame", cooked	1			1.06
"ganmodoki" (soybean curd, mixed with vegetables, fried)	1			0.54
kidney beans, fresh	1			0.35
"nama-age" (soybean curd, fried)	1			0.43
"natto", fermented soybeans	5	1.41	2.15	1.82
peas, fresh	1			0.24
"sasage" beans, dry	1			2.32
soybeans, dry	6	1.77	2.50	2.13
soybean flour, roasted	1			2.30
soybean curd	5	0.14	0.51	0.35
soybean curd, congealed	1			2.79
"yuba" (soybean whey), dry	1			2.59
Seafoods				
Fish				
"amadai" (muscle), fresh	1			0.18
"amadai" (skin), fresh	1			54.26
"amadai" (bone), wet	1			124.48
anchovies, filets, canned	1			1.72
anchovies, boiled, oiled, canned	2	9.19	10.23	9.71
bonito (muscle), fresh	1			0.22
bonito (skin), fresh	1			52.80
bonito (bone), wet	1			259.01
bonito (muscle) "teriyaki", broiled, canned	1			1.65

bonito (muscle), dry	1			1.52
cod (muscle), fresh	1			1.12
cod (skin), fresh	1			6.06
cod roe, raw, salted	1			1.03
cod roe, seasoned, canned	1			0.63
conger eel (muscle) "kabayaki", broiled, seasoned	1			2.15
conger eel (skin) "kabayaki", broiled, seasoned	1			10.43
eel (muscle) "kabayaki", broiled, seasoned	1			2.93
eel (skin) "kabayaki", broiled, seasoned	1			32.55
eel head "kabutoyaki" roasted, seasoned, canned	1			28.71
eel viscera "kimo", roasted, seasoned, canned	1			2.00
goosefish, boiled, canned	1			2.15
herring, fillet, smoked, oiled, canned	1			3.15
"kinmedai" (muscle), fresh	1			0.44
"kinmedai" (skin), fresh	1			115.08
"kinmedai" (bone), wet	1			137.29
mackerel (muscle), fresh	1			0.44
mackerel (skin), fresh	1			3.00
mackerel (bone), dry	1			814.33
mackerel, seasoned, canned	3	8.96	18.48	12.77
mackerel, broiled, canned	1			14.05
mackerel, pick (muscle), fresh	1			0.68
mackerel, pick(skin), fresh	1			5.02
mackerel, pick (bone), dry	1			56.25
mackerel, pick, broiled, canned	1			4.80
mackerel pick, seasoned, canned	1			3.10
"menuke" (muscle), fresh	1			0.22
"menuke" (skin), fresh	1			96.66
"menuke" (bone), wet	1			257.60
salmon (muscle), smoked, canned	1			2.20
salmon, boiled, canned	1			17.48
sardine (muscle), fresh	1			0.71
sardine (skin), fresh	1			2.45
sardine (bone), dry	1			395.16
sardine, seasoned, canned	2	12.93	19.46	16.20
"shirasuboshi", half dried	1			6.61
"shishamo", boiled, canned	2	10.24	15.98	13.11
tuna (muscle), fresh	1			1.60
tuna (muscle), boiled, oiled, canned	2	1.70	2.00	1.85
tuna (muscle), seasoned, canned	1			2.00
Fish paste products				
"bohru", fish paste, fried	4	0.42	1.51	0.88
"hanpen", fish paste, boiled	6	0.41	2.57	0.97
"satuma-age", fish paste, fried	2	0.82	1.52	0.94
"satsuma-age", fish paste, mixed with sesame, fried	1			1.01
"satsuma-age", fish paste, mixed with vegetables, fried	1			1.52
"suji", stringy fish paste, boiled	3	0.46	1.11	0.68
"tsumire" fish paste, boiled	10	0.49	2.02	1.10
Shellfish				
abalone, fresh	1			1.12
arkshells, fresh	1			0.77
arkshells, seasoned, canned	3	2.15	3.50	2.64
clams, fresh	1			1.66
corbiculas, fresh	1			1.71
oysters, fresh	36	1.14	2.57	1.49
oysters, smoked, oiled, canned	2	1.60	3.45	2.53
scallop (muscle), fresh	1			0.84
scallop (viscera), fresh	1			2.87
scallop ligment, boiled, canned	1			1.80
short-necked clams, fresh	1			2.39
short-necked clams, seasoned, canned	1			3.50
top-shell (muscle), fresh	1			1.97
top-shell (viscera), fresh	1			144.93
trough shells, fresh	60	0.70	2.35	1.29
"tsubugai", seasoned, canned	1			2.40
Other marine animal products				
king crab, boiled, canned	5	1.23	2.80	2.02
octopus, smoked, oiled, canned	1			2.80
red crab, boiled, canned	1			10.67
"sakura ebi", dry	1			35.00
shrimp, boiled, canned	1			4.60
squid, seasoned, canned	1			2.87
squid, salted viscera, bottled	1			1.88
whale (muscle), fresh	1			1.60
whale "yamatoni", seasoned, canned	1			1.10
whale bacon, raw	5	0.99	1.48	1.22
Seaweeds				
green laver, dry	1			35.00
"hijiki", fresh	1			0.74
"isomoku", fresh	1			1.58
"matabou", fresh	1			1.83
purple laver, dry	1			3.03
sea lettuce, fresh	1			1.89
"suginori", fresh	1			1.90
tangle, fresh	1			0.93
"tororo konbu", dry	1			5.70
"tororokonbunomoto", dry	1			2.23
Meat Products				
beef, corned, canned	1			0.73
chicken, boiled, canned	1			1.27
chicken, roasted, seasoned, canned	2	0.19	0.99	0.59

pork, minced, raw	50	0.62	1.44	1.05
pork, ham	3	0.24	0.71	0.40
sausage, frankfurt	6	0.19	0.49	0.41
sausage, luncheon meat, canned	1			1.05
sausage, salami	2	0.30	0.65	0.48
sausage, wienerwurst	5	0.35	1.18	0.64
sausage, wienerwurst, canned	1			1.05
Dairy Products				
butter	3	0.06	0.26	0.18
cow's milk, raw	9	0.32	0.45	0.39
cheese, processed	4	0.12	4.60	1.40
ice cream	3	0.19	0.44	0.31
lact ice	3	0.34	0.64	0.46
skim milk	1			0.43
sour cream	1			0.40
Eggs				
hen's egg, white	1			0.44
hen's egg, yolk	1			0.77
hen's egg, shell	1			19.31
pidan, white	1			0.85
pidan, yolk	1			0.91
quail's egg, whole	1			1.54
quail's egg, white	1			1.63
quail's egg, yolk	1			0.71
quail's egg, shell	1			20.30
Fruits				
apple, fresh	1			0.22
fig, canned	3	0.89	1.01	0.94
grape fruit, canned	2	0.52	0.86	0.69
japanese persimmon, fresh	1			0.63
mandarin orange, flaked, canned	1			0.85
orange marmalade	1			0.34
peach, canned	2	0.98	0.99	0.99
pineapple, flaked, canned	2	0.93	1.23	1.08
raisin	1			0.34
strawberry, jam, bottled	1			0.26
ume apricot, salted, dried	1			0.60
Beverages				
Alcoholic beverages				
beer	4	0.21	0.30	0.23
beer, porter	1			0.15
beer, stout	1			0.11
gin	1			0.08
liqueurs	2	0.16	0.20	0.18
"sake", superior class	1			0.77
"sake", first class	2	0.25	0.26	0.26
"sake", second class	1			0.29
"shochu"	2	0.05	0.06	0.06
whisky	2	0.05	0.05	0.05
wine	5	0.23	0.36	0.32
Other beverages				
"amazake"	1			0.88
apple juice, bottled	1			0.21
carbonated beverages, bottled	4	0.15	0.19	0.17
carbonated beverages, canned	5	0.15	0.27	0.21
cocoa, instant, powder	1			3.20
coffee, instant, powder	5	3.50	4.55	3.88
grape juice, bottled	1			0.22
mandarin orange, juice, canned	2	0.13	0.24	0.19
mandarin orange, nectar, canned	1			0.24
tomato juice, canned	1			0.18
Fungi				
lentinus edodes, boiled, canned	1			0.80
mushroom, boiled, canned	1			0.55
Seasonings and Others				
lard	1			0.33
margarine	3	0.04	0.40	0.26
"miso" fermented, salted soybean	5	0.70	1.00	0.80
"shoyu", soy sauce	5	0.76	1.00	0.87
sugar, white, superior	2	0.09	0.10	0.10
"tamago furikake"	1			5.52
"tarako furikake"	1			3.34
tomatocatsup	1			0.47
"tonkatsu" sauce	1			0.15
vegetable oil	1			0.03
vinegar, bottled	1			0.34

今回は，加工品についても調査を行い，加工によるフッ素含有量の変化を検討したが，その結果は次の通りである（単位は ppm).

corn, fresh 0.73～0.87 に対してcorn, canned 0.64, wheat flour 2.16 に対して breads 1.85～2.21, soybean 2.13 に対して soybean goods 0.35～2.79, fish (muscle) fresh 0.62 に対して fish paste products 1.01, short necked clam, fresh 2.39 に対して canned 3.50, whale (muscle) fresh 1.60 に対して canned 1.10, pork minced, raw 1.05 に対して pork ham 0.40, cow's milk, fresh 0.39 に対して skim milk 0.43, egg (yolk) fresh 0.71～0.77 に対して pidan (yolk) 0.91, egg (white) fresh 0.44～1.63 に対して pidan (white) 0.85, soybean の場合，加工品の値 0.35 は，豆腐のフッ素含有量である．文献値[7]から水分含有量を85%とすれば，soybean からのフッ素量は0.32となり，豆腐の含有量とかなり近いといえる．以上のことから，加工品，未加工品間のフッ素含有量には，大差がないことを認めた.

次に表1に示した個々の食品の平均分析値と，前回[2] market-basket study で使用された献立表中の食品重量から，計算によって求めたフッ素摂取量を表2に示

Table 2. Comparison of Total Fluoride Intake from Foods

day	a	b	c	d	total (ppm)
1	594.5	287.7	1290.5	122.5	2295.1
	305.3	625.7	3584.0	340.8	4855.8
2	665.9	355.2	66.6	154.2	1241.8
	294.8	859.3	100.2	286.7	1541.0
3	634.0	480.1	601.1	126.9	1842.1
	316.0	673.7	327.0	281.0	1597.7
4	463.0	348.3	704.0	78.9	1594.2
	244.8	772.2	67.8	177.8	1262.6
5	672.9	258.2	707.5	210.9	1849.6
	335.9	627.4	176.4	360.5	1500.2
6	637.5	284.4	601.1	137.4	1660.5
	409.2	594.5	315.8	266.0	1585.5

a: cereals, b: vegetables and seasoning, c: fish and shellfish, d: meat and dairy products

Upper and lower rows are results of this study and market-basket study, respectively.

す．2段に示されている数値の上段は今回の評価値で，下段は market-basket study で得られた結果である．今回の結果では，食品からの1日当りの平均フッ素摂取量は，1,747.2μg，範囲は 1,241.8μg～2,295.1μg であり，前回の値は各々，2,057.1μg，1,262.6μg～4,855.8μg であった．今回フッ素摂取量を計算するにあたり，食品のフッ素含有量が表1にない場合は，次の方法で求めた．卵，カステラ，マヨネーズ，フレンチソース，豆乳については，文献記載[8,9]の食品部分の比率または原料の構成比から，すいか，バナナ，しそ実，枝豆については前報[1]の vegetable の平均フッ素含有量を代用した．その他，あみの佃煮は "sakura ebi" dry，レバーは pork, minced，あじは herring, fillet，はぜは前報[1]の Fish II を代用し，うなぎかば焼は eel (muscle) 75%，eel (skin) 25% として計算した．以上の結果，今回の摂取量評価で得られた値は，market-basket study の評価量の約85%であった．

結　論

今回分析された食品中のフッ素含有量は，1ppm 未満が 41.5%，1ppm 台が 26.1%，2ppm台 が 14.9%，3ppm 台が 3.3%，4ppm～9ppm 台が 3.7%，10ppm～90ppm 台が 7%，100ppm 以上が 3.3% であった．このうち 3ppm 以上の値を示すものは，ほとんどが海産食品または，それらが構成食品となっているものであった．一方 3ppm 未満の値を示す食品は，82.5% であった．以上のことから，海産食品以外の食品のフッ素含有量は，ほとんど 2ppm 台以下であることが判明した．また今回計算によるフッ素摂取量の評価を行ったところ，その値は，前回[2]の結果にきわめて近いものであった．しかし，いまだ個々の食品中のフッ素含有量に関するデータが不足しており，結果について言及することができなかった．今後，この方面の調査が進むにつれて，いかなる食餌内容でも，食品中のフッ素含有量と食品消費量から，計算による摂取量評価が可能になるものと思われる．

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「食品中のフッ素の定量について」として実施したものである．なお本研究の主題目については，第一報から「フッ素の衛生学的研究」と改める．）

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) 友松俊夫，鈴木二郎，中沢久美子，木村康夫：*ibid.*，26-1，192，1975
3) 松浦新之助，国分信英：フッ素の研究，1972，東京大学出版会
4) 岡村　保，松久次雄，半谷富士子，山田雅子：栄養と食糧，20，80，1967
5) 岡村　保，松久次雄，半谷富士子，山田雅子：*ibid.*，20，93，1967
6) Fisher, F. and M.J. Prival: *Total Fluoride intake* 1973, Center for Science in the Public Interest, Washington D.C.
7) 科学技術庁資源調査会編：日本食品成分表，1971，医歯薬出版株式会社
8) 遠藤一夫：食品製造工程図集，1970，化学工業社
9) 河野友美：食品大事典，1970，真珠書院

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 179—184, 1976

メチル水銀の胎盤透過に及ぼすセレナイトの影響
(ラットの臓器蓄積パターンにみられる変化)

田村行弘*, 大井 玄**, 真木俊夫*, 関 比呂伸**
嶋村保洋*, 今野ヒロ子**, 落合節子*, 湯目邦雄**
西垣 進*, 木村康夫*

Influence of Selenite on the Transplacental Transition of Methylmercury
(Changes Noted in the Distributional Patterns in the Rat Organs)

YUKIHIRO TAMURA*, GEN OHI**, TOSHIO MAKI*, HIROSHI SEKI**,
YASUHIRO SHIMAMURA*, HIROKO KONNO**, SETSUKO OCHIAI*,
KUNIO YUNOME**, SUSUMU NISHIGAKI* and YASUO KIMURA*

Four groups of female Wistar rats were fed the following regimen from three days after conception through the day of delivery: (a) 10 ppm methylmercury chloride (MMC): (b) 10 ppm MMC+3 ppm sodium selenite (Se): (c) 3 ppm Se: (d) basal diet.

Analyses were made with the organs of both pups and mothers for total and methyl mercury and selenium immediately after the parturition. Total and methyl mercury levels in the blood and kidneys of mothers fed MMC+Se were approximately by fifty percent lower than the values found in the mothers which were fed MMC diet alone. In contrast, no significant difference was noted as regards mercurial levels in the organs of pups between MMC and MMC+Se group. Selenium levels in the organs of MMC+Se group were overall 2 to 7 times higher than those of MMC group.

This relative abundance of selenium in both pups and mothers in the group fed MMC+Se regimen suggests that protective effect of selenium against methylmercury toxicity is operative on both sides of the placenta during pregnancy.

緒　言

セレン化合物がメチル水銀の毒性軽減因子であることは，多くの動物実験[1-5]や生化学的実験[6]で立証され，また疫学的[7-9]にも，これを裏付ける事実が得られ，確立された事として認承されている．

筆者らは，先に，メチル水銀源となるマグロ，カジキ，深海魚中に多量のセレンが存在していることを明らかにし[10,11]，更にマグロには，メチル水銀に拮抗できるセレン化合物が有効量含まれていることを確認した[12]．

これらのことから，近年，世界的に魚介類の摂取によるメチル水銀の毒性評価[13,14]や，魚介類中のメチル水銀許容量について論議がなされるに至っている．

このような動きの中で，このセレン化合物の毒性軽減機構について，広い分野で実験がなされているが，明確な解答は得られていない．また，母体から胎児へのメチル水銀の移行は，胎性水俣病の発見以来，多くの実験が行なわれているもの[15-18]の，メチル水銀中毒に対するセレン化合物の拮抗作用が，母親とその仔に対してどのような影響を及ぼすかについては調べられていない．

そこで，亜急性中毒領域のメチル水銀が食餌を通して妊娠ラットに投与された場合，亜セレン酸ナトリウムの同時投与が，その母仔に対してどのような影響を与えるかについて，臓器内の総水銀，メチル水銀および総セレンの分布パターンから検討したので報告する．

方法・材料

妊娠3日目のウィスター系雌ラット（体重　約250g）を各群2匹ずつ4群に編成し，メチル水銀単独投与群；メチル水銀セレン同時投与群；セレン単独投与群；コン

* 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
** 同環境保健部環境衛生研究科

トロール群とし，室温 25±5°，湿度 60±5% の部屋で，出産するまで下記の実験飼料および飲料水を自由に摂取させ飼育した．

実験飼料は，Table 2 に示した配合割合を基本飼料とした．メチル水銀はアセトンにとかし，次に基本飼料の粉末とよく混合したのち，ペレットし，固型飼料に調整した．またセレンは，亜セレン酸ナトリウムを飲料水に溶かし調整した．なお Table 1 に飼料及び飲料水中のメチル水銀，総水銀，セレン濃度の実測値を示した．

出産までの約18日間実験飼料を与えた雌ラットは，出産後12時間以内に体重測定した．次いで，エーテル麻酔後下行大静脈から採血し，断頭放血後，脳，肝臓，腎臓を摘出した．また仔については，断頭放血後，母親と同様に各臓器を摘出した．直ちに各々の臓器重量を測定後，凍結し，分析するまで −25° で保存した．

分析法：1）メチル水銀……FDA 法を若干変更した方法[19]で分析を行ない，その値は水銀として表示した．なお本法での平均回収率は約 80% であるので，測定値を 0.8 で除して補正した．2）総水銀……五酸化バナジウムを触媒として硫硝酸分解後，還元気化注入方式によるフレームレス原子吸光法[20]で分析した．3）セレン……過塩素酸，硝酸で分解し，2,3-ジアミノナフタレンとのキレートを蛍光光度法[21]により測定した．

なお，本報の分析値はすべて Wet Weight で示した．

Table 1. Analytical Value of Methyl and Total Mercury, and Selenium Concentrations in Experimental Diet and Water

Group	Diet			Water		
	Me-Hg	T-Hg	Se	Me-Hg	T-Hg	Se
MMC	9.5	11.1	0.12*	nd	nd	nd
MMC+Se	9.5	11.1	0.12	nd	nd	3
Se	nd	nd	0.12	nd	nd	3
Cont.	nd	nd	0.12	nd	nd	nd

Me-Hg: Methylmercury, T-Hg: Total mercury, Se: Selenium
*: Natural origin, nd: <0.05ppm, unit: ppm

Table 2. Composition of Experimental Diet

Ingredients (%)		Ingredients (%)	
Casein	20	$CaCO_3$	3.6
Corn	55	Salt	
Soybean meal (45% Protein)	2.5	Yeast	
		Vitamin complex	
Rice bran	9.0	Corn germ	2.0
Kaoliang	4.2	Soybean oil	0.6
Alfalfa	3.0		
			100%

Table 3. Averaged Body and Organ Weight of Mothers after Parturition

Group	Weight (g)	Pups $\bar{x}$	Organ Weight per B.W. (%) Brain	Kidney	Liver	Neurological signs
MMC	249	7	0.60	0.65	4.0	(−)
MMC+Se	264	9	0.60	0.75	4.2	(−)
Se	266	10	0.70	0.70	4.8	(−)
Cont.	283	9	0.60	0.70	4.3	(−)

結　果

Table 3 に，母親の出産後の体重，新生児の一腹当りの匹数，体重に対する各臓器の重量比（%）の平均値が示してある．水銀—セレン同時投与群（以下同時投与群と略す）の母親の体重，臓器重量比，仔の出産数は，いずれもコントロール群と差がなかったが，水銀単独投与群（以下水銀単独群と略す）は母親の体重，臓器重量比が他群と比べ低く，更にその仔の出産数も7匹と少なかった．一方，本実験中，母親はメチル水銀中毒の神経症状（四肢のマヒ，後肢交差）および粗毛等の発現がみられず，また，いずれの群も流産することなく無事に分娩し，その仔は外見的に異常が認められなかった．

Fig. 1 は，各臓器および血液中の総水銀，メチル水銀，総セレン濃度の分析結果であり，母親の数値は2匹の平均値，仔のそれは，各群毎にプールして，分析した測定値を示した．

1）水銀の臓器中濃度パターン

母親の腎臓および血液中の総水銀，メチル水銀濃度は，同時投与群が，水銀単独群に比べ，約 1/2 に減少していた．また肝臓および脳中では，この両群間にほとんど差は認められなかった．仔では，セレン投与の有無および母体血中の水銀濃度に関係なく（同時投与群と水銀単独群間の母体血中では，約2倍の差がある．），各臓器間の水銀濃度は，各臓器とも両群間でほとんど差が認められなかった．

また各臓器の水銀濃度順位は，同時投与群および水銀単独群のいずれも母親では，腎臓＞肝臓＞脳であり，仔では，肝臓＞腎臓＞脳となり，母仔間の肝臓と腎臓の濃度順位が逆転し，特に肝臓中水銀濃度は，仔において，その母親の約 1.5 倍を示した．

2）セレンの臓器中濃度パターン

母親の肝臓および腎臓中のセレン濃度は，同時投与群

が水銀単独群の 1.5～2倍であり，脳および血液中では3倍以上も高かった．またセレン単独群と比べ，脳では，2倍と高い傾向を示した．仔の脳中セレン濃度は，各群間に差がほとんどないが，他の臓器では，同時投与群は水銀群に比べいずれも高く，特に同時投与群の肝臓中では，4.3 ppm を示し，水銀単独群およびコントロール群の7～8倍，セレン群の3.5倍と有意に高い濃度を示した．

また各臓器別セレン濃度順位は，コントロール群を除き，母仔間では異なり，母親では腎臓＞肝臓＞脳，仔では肝臓＞腎臓＞脳の順となり，水銀濃度の順位と同じ傾向を示した．

3) 母と仔の臓器別水銀，セレン濃度との比較

Table 4 に，母親臓器中濃度を1とした時の仔の同一臓器中の水銀およびセレンの割合を示した．水銀濃度は，腎臓では同時投与群および水銀単独群ともに，仔が母親より低く，逆に肝臓では，高い傾向を示した．

一方セレン濃度は，同時投与群の仔の肝臓のみ，その母親より著しく高く約2.7倍を示したが，他の群では，いずれも仔の方が低く，また他の臓器でも仔が母親より低かった．

考　察

セレン—メチル水銀同時投与群（以下同時投与群と略す）とメチル水銀単独投与群（以下水銀単独群と略す）との胎児間の臓器水銀濃度は，ほとんど同じレベルであり，亜セレン酸同時投与は，胎児の水銀蓄積面に影響を

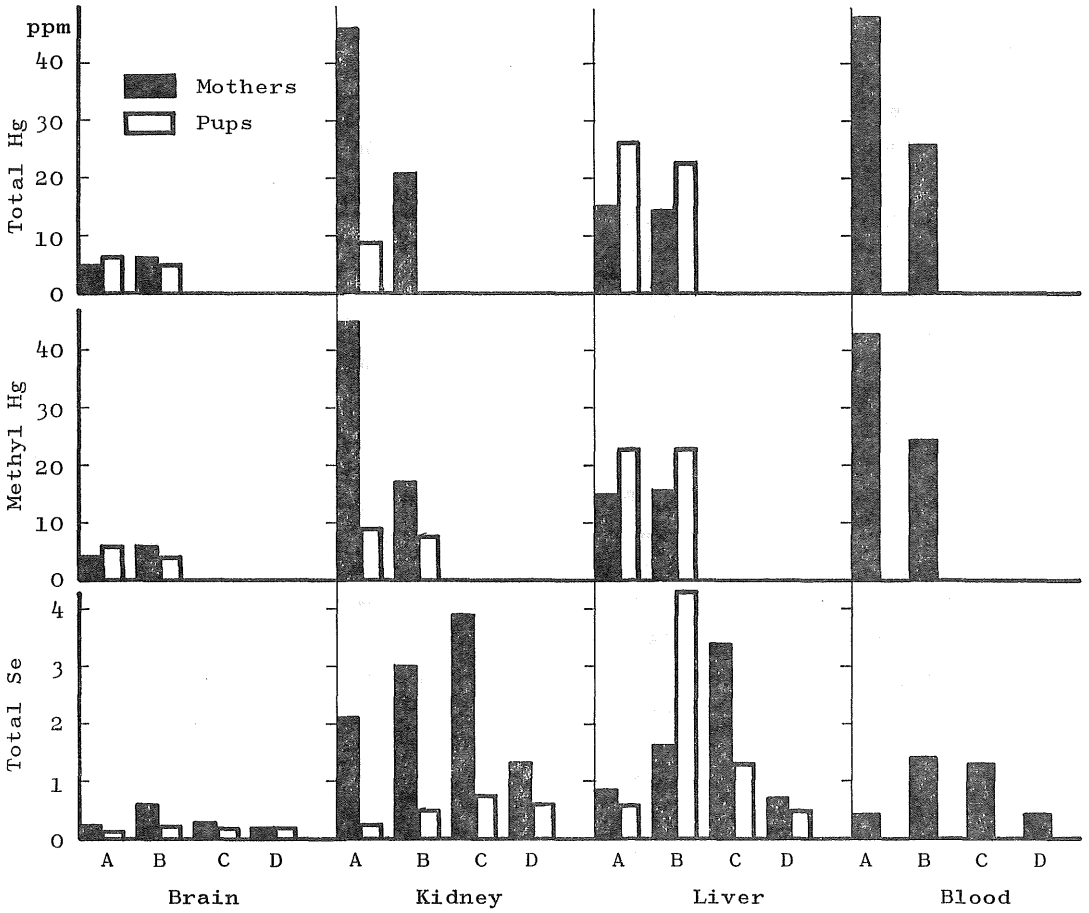


Fig. 1. Distribution of Total Mercury, Methylmercury and Selenium Levels in each Organ, Blood of Mothers and Pups after Parturition Time

A: MMC group　B: MMC+Se group　C: Se group　D: Control group
(ppm: wet weight)

Table 4. Ratio of Pups/Mothers on Total and Methylmercury, and Selenium Concentration in Organs

Group	Brain			Kidney			Liver		
	T-Hg	Me-Hg	Se	T-Hg	Me-Hg	Se	T-Hg	Me-Hg	Se
MMC	1.4	1.5	0.61	0.19	0.20	0.11	1.7	1.5	0.74
MMC+Se	0.82	0.72	0.23		0.48	0.17	1.7	1.5	2.7

T-Hg: Total mercury, Me-Hg: Methylmercury, Se: Selenium

与えなかった．また，こうした現象は，両群間の母体血濃度が著しく異なるにもかかわらず，その影響が，仔の臓器水銀蓄積に反映されていなかった．これら二つの事実より，母親から仔への水銀移行に及ぼす亜セレン酸の役割りを検討すると，次の可能性が考えられる．

(1) 水銀の絶対量が，仔および母の全体を通じて，その総量が水銀単独群と等しいとするならば，仔または母親の今回測定した以外の組織，または器管へメチル水銀を移行させる．(2) 母親から外部への排泄が促進される．(3) 母親の血液，腎臓においてみられた水銀の低下に相当する部分が，胎盤を通過するならば，メチル水銀の胎盤通過性を増加させる．

以上の内，(1)の可能性は，セレンが(メチル)水銀ときわめて親和性の高いものを形成せしめ，標的器管への移行率を低めている[2]といわれていることから考えられる．今回の結果以外の仔の体軀，胎盤の水銀濃度を追試したが[22]，同時投与群および水銀単独間には，全く差が認められていない．従って，今後胎児を取り囲んでいる羊膜，羊水，更には母体全体とその排泄を調べて明らかにして行く必要がある．

(2)では，メチル水銀により各臓器がダメージを受けない場合，メチル水銀の一部が，biotranseformation され，無機水銀として排泄される[23,26]．またメチル水銀とセレン摂取量の関連性からみると，短期間にメチル水銀の低濃度がセレンと共に摂取されたとき，腎臓や肝臓で有意に水銀単独群より水銀濃度が低くなる傾向を示す[2,24,25]．更に，メチル水銀—セレン同時投与群の方が各臓器の水銀濃度の減少が早いという報告もある[3]．これらのことからセレンは，直接または間接的にメチル水銀の脱メチルや排泄を促進する結果，母体血と腎臓水銀濃度を低めるものとも考えられる．しかしメチル水銀対総水銀の割合は，同時投与群および水銀単独群間のいずれの臓器とも差がないことから，吹野ら[26]のいう脱メチルの証拠は認められなかった．このことは血液あるいは臓器中の水銀の絶対濃度の違いが，脱メチル化に大きく関与しているかも知れない．他方，今までの急性または亜急性領域の雄ラットや他の動物での実験[1,2,4,5,27]では，同時投与群は水銀単独群より，各臓器の水銀濃度が等しいか，むしろ高いのに，今回の妊娠ラットでは血液，腎臓で著しく低かった．これは，妊娠という特殊条件下における水銀の代謝が特異的であり，セレンの効果も非常に複雑であることを暗示している．

次いで，(3)は同時投与群の母体血水銀濃度が水銀単独群より低いにもかかわらず，その仔の臓器の水銀濃度が同じレベルであることから，メチル水銀の膜通過性がセレンにより増加していると考えられる．モノメチル水銀は，無機水銀と異なり，アミノ酸の s- と結合し，アミノ基やカルボキシル基は intact な形をとるため，脳血液関門の能動輸送に乗り易いと報告[28]されているが，セレンの共存下では，この結合を弱める効果があるため，更にこの輸送機構に乗り易く，胎盤も通過し易くするのではないかと考えられる．

一方セレンの蓄積は，母仔ラット共に同時投与群が水銀単独群より高く，セレン単独群と似た蓄積傾向を示し，亜セレン酸投与の影響と同時にメチル水銀の影響も現われている．特に同時投与群の新生児の肝臓中では，その母親の肝臓や他の群の肝臓中と異なり高いレベルにある．この傾向は，第1には，セレンがメチル水銀に付随して取り込まれるためと考えられる．このことは，胎生期の肝臓が造血機関であり，またメチル水銀が血液中の蛋白，特にヘモグロビンと結合していることから[29]，血液の集まるこの臓器に，水銀が運ばれ蓄積すること，更に，メチル水銀共存下のセレンが，蓄積性を増したという事実は，いくつかの実験[4,27]や疫学的調査[7-9]から明らかである．第2には，メチル水銀とセレンが何らかの形で相互に結合し，生命保持に必要なセレンを不活性化するため[30]，これを補う意味で，より多くのセレンを蓄積したとも考えられる．いずれにしてもセレン単独では中毒を発現する蓄積量であっても，水銀が同時に存在している時は相互に低毒化される事実から，仔の肝臓に対するセレンの移行は，水銀中毒に対してかなり有利な現象であると考えられる．

Table 5. Concentration Ratio of Total Mercury vs. Selenium

	Group	Brain $\left(\frac{\text{T-Hg (ppm)}}{\text{Se (ppm)}}\right)$	Kidney $\left(\frac{\text{T-Hg (ppm)}}{\text{Se (ppm)}}\right)$	Liver $\left(\frac{\text{T-Hg (ppm)}}{\text{Se (ppm)}}\right)$
Mothers	MMC	27 $\left(\frac{4.8}{0.18}\right)$	22 $\left(\frac{46.4}{2.1}\right)$	19 $\left(\frac{15.5}{0.84}\right)$
	MMC+Se	10 $\left(\frac{6.2}{0.62}\right)$	7 $\left(\frac{21.0}{3.0}\right)$	9 $\left(\frac{15.0}{1.59}\right)$
Pups	MMC	60 $\left(\frac{6.6}{0.11}\right)$	37 $\left(\frac{9.0}{0.24}\right)$	43 $\left(\frac{26.5}{0.62}\right)$
	MMC+Se	36 $\left(\frac{5.1}{0.14}\right)$	16* $\left(\frac{8.2}{0.52}\right)$	6 $\left(\frac{25.1}{4.32}\right)$

*: Methylmercury vs. Selenium

以上のことから，妊娠ラットへの亜セレン酸の同時投与は，水銀単独投与に比べ胎児へのセレンの移行が多くなり，Table 5 で明らかなように総水銀対セレンの濃度比がいずれの臓器とも水銀単独群の 1/2 以下と低く，特に仔の肝臓では 1/7 と低い値を示していることから，また，母親の血液，腎臓の水銀濃度が 1/2 と低くなったことから，セレンがメチル水銀中毒の保護的効果を有するという見地からみて，亜急性中毒量のメチル水銀に対して母仔共に有利な影響を与えることが示唆される．

要　約

メチル水銀が，胎盤を透過し胎児に高濃度に蓄積することは衆知の事実であるが，我々はセレンの同時投与がこれに対しいかなる影響を与えるかを観察した．

ウィスター系雌ラットを 4 群に分け，妊娠 3 日目から出産するまで次の実験食を毎日与えた：(a) 10 ppm 塩化メチル水銀 (MMC)：(b) 10ppm MMC+3 ppm 亜セレン酸ナトリウム (Se)：(c) 3 ppm Se：(d) コントロール

出産直後に新生児および母親の臓器中の総水銀，メチル水銀，セレン濃度を分析した．MMC+Se 群の母親では，血液，腎臓中の総水銀，メチル水銀濃度は，MMC 群に比べ約半分に減少していた．これに対して新生児では，MMC 群であろうと，MMC+Se 群であろうと分析された臓器中水銀濃度は有意の差を示さなかった．セレン濃度については，MMC+Se 群では，母仔とも MMC 群の 2～7 倍の高値を示した．

セレンの水銀毒性に対する保護作用の面からみると，上記のごとく，母仔ともに MMC+Se 群におけるセレン濃度の顕著な上昇は，この保護作用が妊娠期を通じて，母，胎児の双方に働いていることを示唆するものである．

（本研究の概要は日本衛生学会第46回総会1976年7月で発表した．）

文　献

1) Ganther, H.E., C. Goudie, M.L. Sunde, M.J. Kopecky, P. Wagner, Sang-Hwan Oh, and W. G. Hoekstra: *Science*, 175, 1122, 1972
2) Stillings, B.R., H. Lagally, P. Bauersfeld, and J. Soares: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243, 1974
3) Iwata, H., Y. Ohsawa, and H. Okamoto: *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, 5, 673, 1973
4) Ohi, G., S. Nishigaki, H. Seki, Y. Tamura, *et al.*: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 527, 1975
5) 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
6) Kasuya, M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 35, 11, 1976
7) 氏岡威令：熊本医学会誌，34，補冊第 2，119，1960
8) Koeman, J.H., W.H.M. Peeters, C.H.M. Koudstoal-Hol, P.S. Tjioe, and J.J.M. De Goeij: *Nature*, 245, 385, 1973
9) Kosta, L., A.R. Byrne, and V. Zelenko: *ibid.*, 254, 238, 1975
10) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫，*et al.*：東京衛研年報，25, 235, 1974
11) 田村行弘，真木俊夫，山田　洋，*et al.*: *ibid.*, 26-1, 200, 1976
12) Ohi, G., S. Nishigaki, H. Seki, Y. Tamura, *et al.*: *Envir. Res.*, 12, 49, 1976
13) Ganther, H.E.: *Comment on Action level for mercury in fish and shellfish to FDA*, Feb, 1975

14) Marsh, D.O., M.D. Turner, and J.C. Smith: *Comment on Loaves and fishes, some aspects of methylmercury in foodstuffs to FDA*, Feb, 1975
15) Suzuki, T., N. Matsumoto, T. Miyama, and H. Katsunuma: *Ind. Health*, **5**, 149, 1967
16) 藤田英介：熊本医学会誌，**43**，47，1969
17) 田口良雄：日衛誌，**25**，563，1971
18) Yang, M.G., K.S. Krawford, J.D. Garcia, Wang J.H.C., and K.Y. Lei: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **141**, 1004, 1972
19) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫，*et al.*：東京衛研年報，**24**，239，1972
20) 田村行弘，真木俊夫，山田　洋，*et al.*：*ibid.*, **25**, 227, 1974
21) Watkinson, J.H.: *Anal. Chem.*, **38**, 92, 1966
22) 大井　玄，西垣　進，田村行弘，関　比呂伸：未発表
23) Norseth, T. and T.W. Clarkson: *Arch. Environ. Health*, **21**, 717, 1970
24) Chen, R.W., H.E. Ganther, and W.G. Hoekstra: *Biochem. Biophy, Res. Comm.*, **51**, 383, 1973
25) Potter, S. and G. Matrone: *J. Nutr.*, **104**, 638, 1974
26) Stoewsand, G.S., C.A. Bache, and D.J. Lisk: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 152, 1974
27) 吹野秀亀，会田幸男，山根靖弘：第96回日本薬学大会講演要旨，151，1976
28) 高橋　等：綜合臨床，**23**，37，1974
29) Suzuki, T., T. Miyama, and H. Katsunuma: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **5**, 502, 1971
30) Froseth, J.A., C.P. Richard, and J.R. Carlson: *Fed. Proc.*, **33**, 660, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 185—189, 1976

調味料製剤に関する分析法

広門雅子*, 宇佐美博幸*, 中嶋巖*, 遠藤英美*

Analysis of Product for Seasoning

MASAKO HIROKADO*, HIROYUKI USAMI*, IWAO NAKAJIMA*
and FUSAYOSHI ENDO*

Methodological study was made for the analysis of the ingredients of several flavor enhancing seasoning products. The methods adopted in this study were Karl Fisher titrimetric (KF) method for the determination of water content, Volhard method for the amount of salt, Somogyi method for the sugar, automatic amino acid analysing method for the monosodium glutamate (MSG), and dual wavelength spectrophotometry for the 5′-ribonucleotide (5′-RNA).

Consequently, it was found that the first 3 methods adopted in this investigation were found to be more advantageous than the conventional Japanese Agriculture Standard (JAS) methods, by showing the smaller coefficient of variations (C.V.). As for the detection of MSG in the products, 96.36% of 500 mg of MSG in 0.5 g of the sample was effectively recovered with the C.V. of 1.96%. Whereas the detection of 5′-RNA, 102.7% and 71.79% of both 3 mg of sodium 5′-inosinate and sodium 5′-guanylate in 0.2 g of the sample were recovered with the C.V. of 1.45% and 2.93%, respectively.

The ingredients of 11 commercial flavor enhancing seasonings produced by the 10 companies were found to be composed of 3.19—5.52% of water, 22.23—31.55% of salt, 10.13—41.84% of sugar, 9.77—39.91% of MSG, and 0.22—1.01% of 5′-RNA, respectively.

緒　言

添加物製剤の中で今日特に繁用されている調味料は，食生活の多様化簡便化により，グルタミン酸ナトリウム中心から，複雑な味を目ざした調味料製剤（だしのもとなど）に移ってきた．しかしその成分組成は明らかでなく，分析法も確立されていないので，著者らは日本農林規格[1]を参考にして，調味料製剤中の水分，塩分，糖分，アミノ酸および核酸の定量法を検討し，市販風味調味料11種について成分含量を調査した．

実験の部

試料　市販風味調味料（だしのもと），A～K，11種

試薬　1)カールフィッシャー試薬ＳＳ：三菱化成　2)標準水・メタノール液：三菱化成　3)脱水溶剤ＦＭ：ホルムアミド入メタノール(三菱化成)　4)脱炭酸水：蒸留水を加熱沸騰させ貯蔵ビンの上部に吸収管をつけて炭酸ガスの溶存を防止した．アミノ酸分析用の水および試薬の希釈水にはこれを用いた．5)アミノ酸アナライザー用発色試薬：ニンヒドリン試液（和光純薬）　6)アミノ酸アナライザー用緩衝液：Hi-Buffer IPH-1, 2, 4（三菱化成）　7)アナライザー用アミノ酸混合溶液：アミノ酸20種混合，グルタミン酸濃度 0.1μmol/m*l*（味の素）　8)pH 2.2 クエン酸緩衝液：試料希釈用（和光純薬）　9)活性炭：ダルコG-60（クロマト用，和光純薬）1gをエタノール-アンモニア水-水混液（50：5：45）でよく洗った後，十分水洗し，110°，4時間乾燥した．　10)その他の試薬：特にことわりのないかぎり，食品添加物公定書および食品衛生試験法に記載されている試薬を用いた．

装置　1)カールフィッシャー電気滴定装置：三菱化成ＭＳ型　2)アミノ酸アナライザー：日本電子 JLC-6AH型　3)二波長自記分光光度計：日立356型

定量法

1)　水分　(1)JAS法：JAS規格[1]に基づいて行った．(2)カールフィッシャー（KF）法：脱水溶剤 FM 25 m*l*を滴定フラスコにとり，カールフィッシャー試液を滴下して終点まで滴定した．次に試料約 1g を精秤して加え，30分間よくかきまぜた後，過量のＫＦ試液の一定量

* 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

を加え，10分間激しくかくはんし，水-メタノール標準溶液で終点まで滴定した．水分含量は食品添加物公定書法[2]に従って算出した．

2) **塩化ナトリウム** (1)JAS法(硝酸銀滴定法)：JAS規格[1]に基づいて行った．(2)Volhard 法（チオシアン酸塩滴定法)：試料約 0.1g を精密にはかり，水を加えて 100 m*l* とし，ろ過した．そのろ液 10 m*l* をとり，硫酸第二鉄アンモニウム溶液 5 m*l* と 0.05N 硝酸銀溶液 15 m*l* を振り混ぜながら加え，沸騰するまで加熱した．つぎに，塩化銀の沈殿が凝集するように振り混ぜながら冷水に浸して冷却した．過剰の硝酸銀を 0.05N チオシアン酸アンモニウム溶液で滴定し，塩化ナトリウム量を求めた．

3) **糖量** (1)JAS法：JAS規格[1]に基づいて行った．(2)Somogyi 法[3]：試料約 1.25g を精密にはかり，水を加えて 100 m*l* とし，ろ過した．このろ液 10 m*l* をとり水を加えて 100 m*l* とし，還元糖測定用検液とした．また，ろ液 10 m*l* を約 65° の水浴中に浸し，25% 塩酸 5 m*l* を加えて15分間保った後，冷却し，メチルレッドを指示薬として10%水酸化ナトリウム溶液で中和し，水を加えて 100 m*l* とし，全糖用検液とした．これらの検液について，Somogyi 法[3]で定量した．

4) **アミノ酸** 試料約 0.5g を精密にはかり，水 20 m*l* を加え 5 分間煮沸し，ろ過した後残留物を水で洗浄した．ろ液および洗液を合わせ，50°以下で減圧濃縮し，乾固後，0.01N 塩酸約 3 m*l* で溶かし，強酸性カチオン交換樹脂カラム（Amberlite IR-120 H^+型，内径 1 cm，高さ 20 cm）内に注入し，0.5 m*l*/min の流速で樹脂層表面まで流した．つぎに約 500 m*l* の水を 2 m*l*/min の流速で流した．（この段階でアミノ酸と陽イオンは吸着され，糖類を含む中性物質と陰イオンは流去した．）ついで約 450 m*l* の 2N アンモニア溶液を 1 m*l*/min の流速で流し，アミノ酸を溶出させ，溶出液を合せて 500 m*l* にした．その 5 m*l* を 50° 以下で減圧下に濃縮乾固し，pH 2.2 クエン酸緩衝液で 50 m*l* にした．この溶液2.5m*l* をアミノ酸アナライザーで下記の条件下で分析した．同時にアミノ酸混合溶液を分析し，その吸光度の積分比から試料中のアミノ酸の量を算出した．

分析条件：Column：LCR-2, Flow rate：buffer 1.15 m*l*/min, ninhydrine 0.2 m*l*/min, Column temp：52°, Reaction bath temp：95°, UV wavelength：570 nm.

5) **5′-リボヌクレオチド (5′-RNA)**

試料約 2g を精密にはかり，水約 20 m*l* を加えて加熱して溶かし，ろ過した後，残留物を水で洗浄した．ろ液および洗液を合わせ，80° 以下で減圧濃縮し，乾固させた後，0.01N 塩酸約 3 m*l* に溶かし，あらかじめ用意した活性炭カラム（内径 1 cm，高さ 7 cm）内に注入し，5′-RNA を吸着させた．ついで 50 m*l* の蒸留水で洗った後，1.4% アンモニア水 130 m*l* を通して 5′-RNA を溶出させた．この溶出液を減圧下に濃縮乾固した後，5′-RNA（5′-イノシン酸ナトリウムおよび 5′-グアニル酸ナトリウム）の濃度がそれぞれ 10～50 μg/m*l* になるように 0.01N 塩酸で定容にした．神蔵ら[4]の方法に従って，5′-イノシン酸ナトリウム（5′-IMP）の定量の時は 5′-グアニル酸ナトリウム（5′-GMP）の等吸収点（λ_1=272.25 nm, λ_2=243.25 nm）を求め，5′-GMP の定量の時は 5′-IMP の等吸収点（λ_1=231.75 nm, λ_2=266.0 nm）を求めて，二波長分光測光法で同時定量した．

結果および考察

定量条件の検討

1) 水分 乾燥減量法とKF法による水分測定の結果を Table 1 に示した．JAS 法（温度70°，圧力 30 mm Hg，5時間減圧乾燥）では，試料 A 中の水分測定値は 1.05% であったが，温度 90°，圧力 1 mmHg で20時間の減圧乾燥では1.95%と高かった．この結果から，JAS 法では乾燥が不十分であったと考えられる．その上，変動係数が 5.1% と大きく，測定値にバラツキがあった．それに比較し，KF法は測定値のバラツキも少なく，測定時間も約40分に短縮できた．また JAS 法と KF 法による市販風味調味料11種中の水分測定値を Table 2 に示した．JAS 規格では水分 4 %以下と規定されているが，Table 2 の結果から，JAS 法では限度をこえた検体はなかったが，KF法では64%が限度をこえた．したがって JAS 規格中の水分の項は検討しなおす必要があると考えられる．

2) 塩化ナトリウム 塩化ナトリウム標準品（含量 99.99%）および試料A について，Mohr (JAS) 法と Volhard 法の測定値を比較した結果を Table 3 に示した．Mohr 法および Volhard 法とも測定値にバラツキ

Table 1. Determination of Water by Karl Fisher Titrimetric and Drying Method

Method	Water Content	
	Mean(%)	C.V.(%)
Drying I	1.05	5.14
Drying II	1.95	10.37
Karl Fisher	3.19	1.88

I：70° 30 mmHg 5 hr (JAS Method)
II：90° 1 mmHg 20 hr
C.V.：Coefficient of Variation

がなく，それらの平均値の間には有意の差が認められなかった．しかし Mohr 法と比べて Volhard 法は操作は複雑であるが，終末点が見やすく，測定値のバラツキがやや少ないという理由で Volhard 法が適当であると結論した．

3) 糖量 試料A中の糖含量について，JAS法と Somogyi 法の測定値を比較した結果を Table 4 に示した．JAS 法は検液中の糖濃度が Somogyi 法の 5 倍量というだけで，他の操作法は全く同じであったが，還元糖および非還元糖の測定値はともに Somogyi 法より低い値を示した．また測定値のバラツキも JAS 法の方が大きかった．糖の定量は，検液中の濃度が 0.1～0.3 mg/m*l* の範囲が最も良いといわれるが，JAS 法では，その 5 倍量 (0.5～2.5 mg/m*l*) で測定しているため，反応が定量的に進行しなかったと考えられる．したがって著者らは Somogyi 法を採用した．

Table 2. Determination of Water in Commercial Flavor Enhancing Products

Sample	Method	
	Karl Fisher	JAS
A	3.19(%)	1.05(%)
B	5.42	0.55
C	3.61	0.55
D	3.39	0.45
E	5.51	1.04
F	4.90	0.94
G	5.91	1.54
H	3.52	0.82
I	4.07	2.92
J	5.28	1.45
K	5.52	1.57

Table 3. Determination of Salt by Mohr and Volhard Method

Salt content		Method	
		Mohr(JAS)	Volhard
Standard	Mean	100.31(%)	99.61(%)
(Assay : 99.99%)	C.V.	0.11	0.00
Sample A	Mean	28.56	27.92
	C.V.	0.18	0.12

Table 4. Determination of Sugar in Sample A by Somogyi and JAS Method

Sugar content		Method	
		Somogyi	JAS
Reducing	Mean	38.39(%)	33.44(%)
	C.V.	0.34	0.89
Nonreducing	Mean	3.45	1.83
	C.V.	2.88	26.84

4) アミノ酸 この試験法はカラム操作が複雑で分析に長時間を要したが，糖や塩化ナトリウムなどの妨害物質はほとんど除去されたので，アミノ酸アナライザーのカラムを汚さず，アミノ酸の移動速度に影響を及ぼさなかった．定性試験の結果，調味料中のアミノ酸の大部分はグルタミン酸ナトリウム (MSG) であったので MSG について定量測定した．調味料中からの MSG の平均回収率は 96.36% と良く，変動係数も1.96%で測定値のバラツキも少なく信頼度の高い結果が得られた．

5) 5′-RNA 呈味性を示す 5′-RNA のうち，特に 5′-IMP および 5′-GMP が MSG と相乗効果を示すといわれ，調味料中に添加されるので，今回はこの二種の同時定量について検討した．5′-GMP 中の 5′-IMP の定量測定の場合，波長を $\lambda_1=272.25$ nm, $\lambda_2=243.25$ nm にセットし，二波長分光測光法で行った時の検量線は，5′-GMP 20 μg/m*l* に対し，5′-IMP が 5～60 μg/m*l* の濃度範囲で，$y=0.01398+0.0482x$, 相関係数 0.9997～0.9999 の直線性を示した．5′-IMP 中の 5′-GMP の定量の場合は，波長を $\lambda_1=231.75$ nm, $\lambda_2=266.0$ nm にセットし測定した時，5′-IMP と同じ濃度範囲で，検量線は $y=0.01244+0.01269x$, 相関係数 0.9992 の直線性を示した．また 5′-IMP の調味料中からの回収率は 102.7%と良く，変動係数も1.45%で測定値のバラツキも少なかった．しかし 5′-GMP の回収率は 71.99% と悪い上に，変動係数も2.93%と大きく，測定値にバラツキがあったので，5′-GMP の定量法については今後検討したいと考える．なお活性炭処理後の試験溶液には 5′-RNA 以外のUV吸収は認められなかった．したがって二波長測光法の測定の際の妨害物質は活性炭処理により除去されたと考える．

市販風味調味料の分析結果

11種の市販調味料の成分分析結果を Table 5 に示した．Table 5 より，糖量10.13～41.84%，塩化ナトリウム 22.23～31.55%，MSG 9.77～39.91% で，この三成分の合計が55.18～98.79%となり，調味料製剤の主体はこれら三成分であることが判明した．MSG 以外のアミノ酸として，ヒスチジン，リジン，アスパラギン酸，スレオニン，セリン，グリシン，アラニン，メチオニン，イソロイシンおよびロイシン等が微量検出された．これらのアミノ酸は呈味のために添加された蛋白加水分解物や風味のために添加されたカツオや昆布等のエキスに由

Table 5. Determination of the Amount of Ingredients Flavor Enhancing Products

Sample	Water	Salt	Total Sugar	MSG	5′-RNA (5′-IMP, 5′-GMP)
A	3.19%	27.92%	41.84%	9.77%	0.38% (0.37%, 0.01%)
B	5.42	28.14	10.13	16.91	1.01 (0.64 , 0.37)
C	3.61	24.97	41.17	16.04	0.22 (0.21 , 0.01)
D	3.39	27.66	36.50	26.09	0.37 (0.30 , 0.07)
E	5.51	27.84	17.53	39.91	0.60 (0.16 , 0.44)
F	4.90	31.55	24.22	25.75	0.75 (0.74 , 0.01)
G	5.91	30.00	13.29	16.07	0.50 (0.31 , 0.19)
H	3.52	22.23	39.01	37.56	0.55 (0.41 , 0.14)
I	4.07	26.93	33.90	25.99	0.28 (0.27 , 0.01)
J	5.28	30.00	31.29	15.27	0.63 (0.48 , 0.15)
K	5.52	30.70	28.52	26.10	0.36 (0.18 , 0.18)
Mean	4.57	27.99	28.86	23.22	0.51 (0.37 , 0.14)

Table 6. Ratio of 5′-RNA to MSG in Each Flavor Enhancing Product

Sample	Ratio 5′-RNA/MSG
A	0.038
B	0.060
C	0.014
D	0.015
E	0.015
F	0.029
G	0.031
H	0.015
I	0.011
J	0.041
K	0.014

来するものと考えられる．また 5′-RNA が 0.22～1.01%含まれていた．通常，5′-RNA は MSG との呈味相乗効果のために 1/100～1/10 併用添加されると言われるが，Table 6 に示した各調味料中の 5′-RNA の MSG に対する割合をみると，すべて 1/100～1/10 の範囲内にあった．

まとめ

1) 調味料中の水分，塩化ナトリウムおよび糖の定量法には，KF法，Volhard 法および Somogyi 法をそれぞれ用い，それらと JAS 規格に収載されている JAS 法とを比較検討した．

KF法は，測定時間が JAS 法の 5 時間に比べ，約 40 分と短く，変動係数は 1.88% で JAS 法の 5.14% に比較し小さかった．

Volhard 法は JAS 法に比べ，操作は複雑であるが，終末点が見やすく，変動係数（塩化ナトリウム標準品）は 0.0001%以下で，JAS 法の0.11%に比べ小さかった．

Somogyi 法は，変動係数が0.34%（還元糖），2.88%（非還元糖）であり，JAS 法の変動係数 0.89%（還元糖），26.84%（非還元糖）に比べ小さかった．

以上の結果より，JAS法に比べ，KF法，Volhard法および Somogyi 法がそれぞれ適当であると結論した．

2) アミノ酸（MSG）の定量にはアミノ酸自動分析計を用いた．試料 0.5g に MSG 500μmol 添加した時の平均回収率は 96.36%，変動係数 1.96%とバラツキも少なく信頼度の高い結果が得られた．

3) 5′-RNA の定量には，二波長分光測光法を用いた．5′-IMP および 5′-GMP とも検量線は直線性を示した．5′-IMP 3 mg を試料 0.2g に添加した時の平均回収率は102.7%，変動係数 1.45% と良い結果が得られたが，5′-GMP の平均回収率は71.99%と悪く，変動係数も2.93%と大きかった．5′-GMP については目下検討中である．

4) 風味調味料11種中の水分，塩化ナトリウム，糖，MSG および 5′-RNA を分析した結果，主成分は，塩化ナトリウム（平均 27.99%），糖（平均 28.86%）および MSG（平均23.22%）であり，これら三成分の合計は平均 80.07% であった．その他，わずかのアミノ酸および 5′-RNA が検出された．

以上の結果より，カツオ風味および昆布風味と表示されているにもかかわらず，それらに由来すると考えられる成分は少量添加されているにすぎない実態が判明した．

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「食品添加物製剤に関する自主検査法および分析法」として実施したものである．）

文　献

1）日本農林規格協会：JAS，風味調味料の日本農林規格，昭和50年6月4日農林省告示第607号
2）食品添加物公定書注解編集委員会：食品添加物公定書注解，Ⅲ，1127，1974，金原出版
3）日本薬学会編：衛生試験法注解，94，1973，金原出版
4）神蔵美枝子，遠藤英美，佐々木英人：食衛誌，13，555，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 190—193, 1976

カルシウム製剤の成分規格
カルシウムの定量に対する共存物質の影響

荻野周三*, 安野哲子*, 小野綾子*
大畠敏子*, 遠藤英美*

Studies on the Standardizing of Calcium Preparation
Influences of Coexistent Substances on Determination of Calcium

SHUZO OGINO*, TETSUKO YASUNO*, AYAKO ONO*,
TOSHIKO OHATA* and FUSAYOSHI ENDO*

In an attempt to standardize calcium preparation, influence of coexistent substances on determination of calcium was investigated by means of chelatometric titration and atomic absorption spectrophotometry. Direct-chelatometric titration method gave satisfactory results which were free from the interference of coexisting sulfuric acid, potassium aluminium sulfate, tartaric acid and citric acid. In the presence of phosphoric acid and phosphates, back-chelatometric titration method was suitable. In the case of using atomic absorption spectrophotometry, addition of lanthanum to the sample and use of acetylene-nitrous oxide flame were found likewise effective in removing the influence of the afore mentioned substances. Coefficients of variation of chelatometric titration method and atomic absorption spectrophotometry were 0.13 and 1.38%, respectively.

緒　　言

食品添加物は食品衛生的な見地に基づいて規格が定められ，また対象食品の種類や使用量などを制限するための基準が設けられている[1)]．

しかし二品目以上の食品添加物から成る製剤は，使用上の便利さや使用効果をあげる意味で多用されているにもかかわらず，ほとんどの場合，これらの規定が設けられていない．多種多様な物質が共存する製剤の規格，基準化は複雑かつ困難ではあるが，その安全性は単一品と同様に確保されねばならない．したがって製剤に対する規格，基準の設定とそれに伴う試験法の確立が急務であると考える．その意図から，今回筆者らは強化剤や食品製造用添加剤として多用されているカルシウム製剤について，その規格，基準を設定するさいの基礎資料の一つとして，カルシウムを定量する場合の共存物質の影響を検討することを試みた．

カルシウムの定量法は種々あるが，筆者らは EDTA による直接滴定法（以下 DT 法と略す），EDTA—酢酸亜鉛による逆滴定法（以下 BT 法と略す），および原子吸光法（以下 AA 法と略す），を用い，カルシウム製剤中に混合される可能性のある硫酸塩，ミョウバン，リン酸とその塩類，酒石酸，クエン酸，およびデンプンの影響について比較検討したのでその結果を報告する．

実　　験

1. 装　置

原子吸光分析装置：日本ジャーレル・アッシュ製 AA-1 MARK II型，DL-1 付属

2. 試　薬

0.05M-EDTA：ドータイト EDTA 18.7 g を水に溶かして 1 l とし，0.025 M 塩化亜鉛標準溶液[1)]で標定する．0.05M 酢酸亜鉛：酢酸亜鉛 10 g を数滴の酢酸を加えた水に溶かして 1 l とし，0.05M-EDTA で標定する．NN（2-オキシ-1-(2′-オキシ-4′-スルホ-1′-ナフチルアゾ) 3-ナフトエ酸）：ドータイト NN 希釈溶液を使用．HNB（ヒドロキシナフトールブルー）：ドータイト HNB 0.1 g を用時水に溶かして 100 ml とする．EBT（エリオクロームブラック・T）・塩化ナトリウム希釈粉末：ドータイト EBT 0.1 g と塩化ナトリウム 10 g を均

* 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

一に混合する．トリエタノールアミン：トリエタノールアミン 30 m*l* に用時水を加えて 100 m*l* とする．アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液：塩化アンモニウム67.5 g をアンモニア水 570 m*l* に溶かし，水で 1 *l* とする．5N 水酸化カリウム：水酸化カリウム 350 g を水に溶かして 1 *l* とする．5％塩化ランタン溶液：酸化ランタン 58.65 g を水で湿らせたのち，塩酸 250 m*l* を徐々に加えて溶かし，水で 1 *l* とする．カルシウム標準溶液：110° で3時間乾燥した炭酸カルシウム 12.4863 g を必要最少量の10％塩酸に溶かし，水で 1 *l* とする．この溶液 1 m*l* は 5 mg のカルシウムを含む．

3. 操作

1) DT法 カルシウム標準溶液 10 m*l* をとり，カルシウムに対し1～100 倍量の硫酸，ミョウバン，オルトリン酸，リン酸一ナトリウム，リン酸二ナトリウム，メタリン酸ナトリウム，ピロリン酸カリウム，ポリリン酸，酒石酸，およびクエン酸を個々に加え，この各々に水 40 m*l* を加え，5N 水酸化カリウムで pH 13 としたのち，NN，あるいは HNB を指示薬として 0.05M-EDTA で滴定する．

デンプンの場合は，110°で3時間乾燥した炭酸カルシウム 50.0mg に1～100倍量のデンプンを加え，これを乾式灰化したのち，10％塩酸 1 m*l* を加えて水浴上で加温溶解し，水 40 m*l* と 5N 水酸化カリウム 10 m*l* を加えて滴定する．

2) BT法 カルシウム標準溶液 10 m*l* をとり，1)と同様に硫酸，etc. を加え，さらに 0.05M-EDTA 40 m*l* を加えたのち，アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液で pH 10 に調整する．これに EBT・塩化ナトリウム希釈粉末 0.025 g を指示薬として加え，過剰の EDTA を 0.05N 酢酸亜鉛で滴定する．

なお，デンプンに関しては，このBT法の場合も乾式灰化の操作を加える．これは次の3) AA法においても同様である．

Table 1. Optimum Conditions for Determination by Atomic Absorption Spectrophotometry

Burner	5-cm slit	10-cm slit
Wavelength (nm)	239.9	239.9
Lamp current (mA)	20.0	20.0
Acetylene flow-rate(*l*/min)	6.0	1.5
Oxidant flow-rate(*l*/min)	3.0 (Nitrous oxide)	1.0 (Air)
Burner height (cm)	1.7	2.8
Burner angle (°)	25	0

3) AA法 カルシウム標準溶液 10 m*l* に1), 2)と同様に硫酸，etc. を加え，さらに5％塩化ナトリウム溶液 5 m*l* と，5％ 塩化ランタン溶液 20 m*l* を加えて，水で全量を 100 m*l* とし測定する．

この時の測定条件を Table 1 に示す．

通常カルシウムの分析線としては，422.7 nm の波長が用いられ，その標準感度は 0.09 μg/m*l*/1％ であるが[2]，今回の実験で対象とするカルシウムの濃度は％単位であるために，試料の希釈による実験誤差の増加を避ける意味で，上記の波長に比べて感度の低い 239.9 nm を分析線として利用した．この波長における標準感度は 10 μg/m*l*/1％ である[2]．

干渉の抑制には一般に，塩化ランタンの大量添加と，アセチレン-亜酸化窒素による高温フレームの使用が有効とされ[3]，また，フレーム中でのカルシウムのイオン化に起因する定量値の低下は，ナトリウム，あるいはカリウムなどのイオン化電圧の小さい元素を 500 ppm 以上添加することにより防ぐことが可能であるといわれる[4]．

実験では，高温フレームの使用は，通常のアセチレン-空気のフレームに比べ，干渉を受けにくいことが確かめられたが，500～4000 ppm のナトリウムの添加の有無は定量値に差を与えなかった．

4. 結果

各定量法における定量誤差は，Table 2 に示すとおりであった．

次に各共存物質についての実験結果を述べカルシウムに対するそれらの共存比とカルシウムの定量値の関係を，Fig. 1 に示す．

1) 硫酸 100 倍量の硫酸の共存は，DT法およびBT法に影響せず，AA法では25倍量の共存は影響しなかった．

2) ミョウバン ミョウバン中のアルミニウムのDT法に対する妨害は，トリエタノールアミン 10 m*l* の添加で抑えられ，[100]倍量のミョウバンの共存も影響なかった．HNB は，NN に比べて終末点の判別をより容易

Table 2. Coefficient Variations (C.V.) of Analytical Methods

	C.V.(%)	
		(ashing)
Direct-chelatometric titration	0.13	1.48
Back-chelatometric titration	0.27	1.83
Atomic absorption spectrophotometry	1.38	2.57

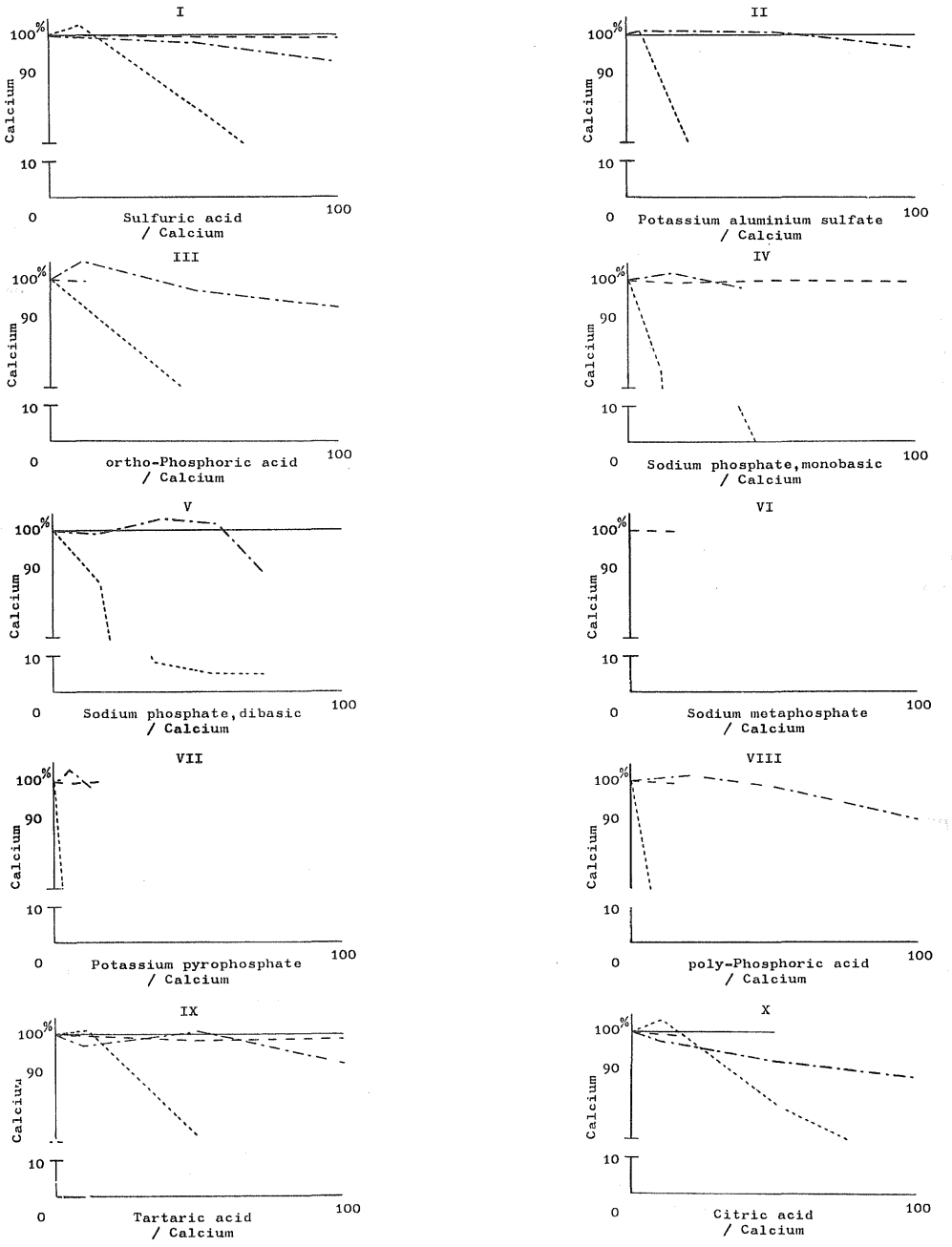


Fig. 1. Relations between Ratio (Coefficient Substance/Calcium) and Quantitative Value of Calcium

———— : Direct-chelatometric titration
— — — : Back-chelatometric titration
····· : Atomic absorption spectrophotometry (Acetylene-Air flame)
—•—•— : Atomic absorption spectrophotometry (Acetylene-Nitrous oxide flame)

にした．またアンモニアアルカリ性で滴定を行なうBT法は水酸化アルミニウムの生成により定量不可能であった．

AA法の場合，50倍量のミョウバンの共存は定量に影響がなかった．

3) **リン酸とその塩類** DT法に対するリン酸イオンの妨害は，アルカリ性溶液中での難溶性リン酸カルシウムの生成に起因し，Collier[5]によれば，定量に影響しないリン酸イオン濃度は，試料溶液中のカルシウム濃度に依存し，溶液 70 ml 中に 0.1, 1, 10 mg の各カルシウムを含む場合は，Pとして 3, 1, 0.5 mg までであるという．また，Pとして4倍程度の共存は，CYDTA（シクロヘキサンジアミン四酢酸）による置換滴定法が可能であるが[6]，さらに大量の存在においては，イオン交換法[7]，あるいは溶媒抽出法[8]などにより，あらかじめリン酸イオンを除く必要がある．

BT法はDT法に比べて妨害は少なく，公定法に採用されている[9]．

実験では，BT法を用いることで，オルトリン酸，メタリン酸ナトリウムおよびポリリン酸は10倍量，ピロリン酸カリウムでは15倍量の存在を可能にしたが，それ以上の存在では終末点の判別が困難であった．リン酸一ナトリウム，およびリン酸二ナトリウムは 100 倍量存在しても支障がなかった．

AA法におけるリン酸イオンの妨害は，アセチレン-空気フレーム中で耐火性の $Ca_2P_2O_7$ を形成し，カルシウムの原子化を妨げることによる[4]．

実験では，5倍量のピロリン酸カリウム，10倍量のオルトリン酸，15倍量のリン酸一ナトリウム，20倍量のポリリン酸，50倍量のリン酸二ナトリウムは，それぞれ定量に支障がなかった．

4) **酒石酸およびクエン酸** HNB を指示薬とするDT法はBT法に比べて良好な結果を与え，酒石酸では100倍量，クエン酸では50倍量の存在は影響がなかった．NNを使用した場合には，酒石酸，クエン酸ともに10倍量の存在は支障がなかった．これに対しBT法の場合には，酒石酸で50倍量，クエン酸では10倍量までが支障がなかった．

AA法では，50倍量の酒石酸，および10倍量のクエン酸の存在は影響がなかった．

5) **デンプン** デンプン，その他の不溶性有機物は，あらかじめ分解処理を行なう必要がある．

本実験では乾式灰化法を用いて分解し，その結果，DT法およびBT法では100倍量の存在でほぼ100%，AA法では96%の定量値を得た．

まとめ

キレート滴定法，および原子吸光法におけるカルシウムの定量のさいの，共存物質の妨害について検討した．

実験の結果，キレート直接滴定法は，硫酸，ミョウバン，酒石酸，およびクエン酸について良好な結果を与え，逆滴定法は，硫酸およびリン酸とその塩類について比較的影響が少なかった．また原子吸光法は，簡易性，迅速性において他法にまさり，多数の試料を同時に測定する日常の試験法としては有効な手段となり得るが，一面その定量誤差の大きさが問題となる．この定量誤差は，低感度波長の選択と，高温フレームの使用によるS/N 比の悪化に起因するものと考えられる[3]．

Thompson[10]は，S/N比の悪化を抑え，239.9nm の分析線と同程度に感度を低下させる方法として，ゲルマニウムのランプの利用を報告しており，今後の検討事項に加えたいと思う．

（本研究は昭和50年度当研究所研究課題「食品添加物製剤に関する自主検査法および分析法」として実施している一部である．）

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) Interscience Publishers: *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*, 8, 109, 1969, John Wiley and Sons, Inc
3) Slavin, W: 原子吸光分析 —基礎と応用—, 77, 1970, 広川書店
4) 鈴木正己，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，137，1973，南江堂
5) Collier, R.E.: *Chem. and Ind.*, 1955, 587
6) Verma, M.R., V.M. Bhuchar and K.J. Therattil: *Nature.*, 179, 1244, 1957
7) Brunisholz, G., M. Genton, and E. Plattner: *Helv. Chim. Acta.*, 36, 782, 1953
8) Collier, R.E.: *Chemist-Analyst.*, 43, 41, 1954
9) 日本公定書協会：第8改正日本薬局方解説書，C-1862，1971，広川書店
10) Thompson, K.C.: *Analyst.*, 95, 1043, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 194—198, 1976

塩化ビニル樹脂製品の残留塩化ビニルモノマーとその食品への移行（第Ⅰ報）
昭和50年度都内における市販品の実態調査

渡辺悠二*, 佐藤憲一*, 吉田令子*
藤居瑛**, 遠藤英美*

Investigations on Residual Vinyl Chloride Monomer in Polyvinyl Chloride Food Containers and its Possible Migration into the Contents (I)
Survey of the Products on the Market in Tokyo in 1975

YUJI WATANABE*, KENICHI SATO*, REIKO YOSHIDA*,
TERU FUJII** and FUSAYOSHI ENDO*

During the period from September 1975 through February 1976, a total of 381 food containers made of polyvinyl chloride (PVC) and 310 liquid foods, such as sauce, "Sake", edible oil, soy sauce, "Mirin" and others being contained in PVC containers were subjected to analysis for the presence of residual vinyl chloride monomer (VCM) in the material and migrated VCM in foods. The detection of VCM was made by the method recommended by the Japan Hygienic PVC Association, by the use of gas chromatography.

As for the residual VCM in the containers, 1.1—492.5 ppm of VCM were present in 41 (10.8%) specimens. Of them, 19 (18.3%) of 104 were the products of before December 1974, and rest of 22(7.9%) of 277 were the ones after January 1975. The PVC containers containing greater than 1 ppm of VCM were mostly the ones prepared for soy sauce, sauce and edible oil, and these were promptly retrieved from the market. On the other hand, 10 (3.2%) of 310 foods tested were found to be containing 0.03—0.22 ppm of the migrated VCM.

緒　言

昭和48年3月，アメリカにおいて塩化ビニル樹脂(以下PVCと略す）製容器入りウィスキー中より塩化ビニルモノマー（以下VCMと略す）が検出され，以後アルコール飲料容器としての適性が問題視されていた．その後Maltoni[1]により，VCMの発がん性が立証されるにおよび，PVC製品中のVCMが食品衛生上大きな問題としてクローズアップされるようになってきた．これを契機として昭和50年9月FDAは食品用PVC製品に対する規制値を検討し，これを提示した[2]．

一方，わが国でも業界の団体である塩ビ食品衛生協議会（以下塩ビ協と略す）が中心となって，食品用PVC製品の調査を実施し，昭和49年10月以降における製品中の残留VCMは1ppm以下であるという発表を行っている．

著者らは昭和49年からPVC製品の規格検査を行う際に，VCMの残留についても調査を実施し，その結果容器中にVCMの残留しているものが市販されている実態[3]をつきとめた．以上の情勢をふまえ，東京都では昭和50年9月以降の市販VCM製品について，昭和50年9月，11月，昭和51年2月の3回にわたってVCMの一斉検査を実施し，その結果東京都内におけるVCMの残留実態を知ることができたので報告する．

実験の部

1. 調査方法

第1回調査（昭和50年9月10～17日）：昭和49年以降製造された樹脂中のVCMの残存量は1ppm以下であり，従って食品の製造年が昭和50年以降の製品からはVCMは検出されないという発表が塩ビ協においてなされたので，これをもとに塩ビ協で定めた試験法[4]に従っ

* 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
** 東京都薬剤師会衛生試験所

て，当所において新宿を中心としたデパート，スーパーマーケット等の市販品164検体を購入して調査することにした．

第2回調査（昭和50年11月13～30日）：第1回の当所自主調査の結果，PVC製品中より1 ppmを超えるものが判明した．都としては，国の規制値が未だ示されていない段階ではあったが，塩ビ協において昭和50年10月15日より，材質中のVCM残存量を1 ppm以下にするという自主規制にのり出した現状を考慮し，全都的につぎの業種を対象として一斉検査を行うことにした．

1) 容器メーカー 2) 食品メーカー（主として液体食品） 3) 食品販売業

なお食品メーカーとしては，しょうゆ，ソース，食酢，マーガリンの5業種を，また販売業からはボトル容器入り食品を対象とし，105検体が衛生局から送付された．

Table 1. Items of the Products

Food or Container	I	II	III
Edible oil	39	8	19
Soy sauce	33	22	26
Sauce	46	30	21
Sake	0	2	5
Mirin	4	0	13
Others food	11	2	28
Container-package	31	4	0
Total	164	105	112

第3回調査（昭和51年2月3～19日）：昭和50年12月23日，厚生省通達[5]によりVCMの暫定規制値1 ppm（材質中）が示された．この規制後の実態調査の目的で第二次一斉取締り検査が企画され，主として市販の液体食品（しょうゆ，ソース，酒など）を中心とした115検体が同じく送付された．

2. 試料

検体の内訳は表1の通りである．

3. 装置

ガスクロマトグラフ：日立163型，FID検出器付および柳本G80型，FID検出器，バックフラッシュ装置付．

ガスクロマトグラフ-質量分析計：島津LKB-9000型，多重イオン検出器付．

4. 試験法

1) 材質（容器包装）中のVCMの定量

前報同様，日本薬学会協定衛生試験法[6]に従って定量した．

2) 内容食品中のVCMの定量

塩ビ協で定めた試験法を準用して定量した．なお内容食品中のVCMの検査は材質中のVCMが1 ppmをこえるものについてのみ行った．

VCMの検査は，通常のガスクロマトグラフによる場合，1検体の処理に約1時間要するため，第2回の調査以後はバックフラッシュ装置付のガスクロマトグラフを用いて行ったところ，1検体の処理時間は約15分に短

Table 2. Result of VCM detected in the Products on the Market

Food or Container	I (Sept. 1975)			II (Nov. 1975)			III (Feb. 1976)			Total		
	Samples	A	B	Samples	A	B	Samples	A	B	Samples	A	B
Edible oil	31	1	0	8	0		16	1	0	55	2	0
	8	2	2	0			3	0		11	2	2
Soy sauce	22	3	2	22	3	0	25	0		69	6	2
	11	3	0	0			1	0		12	3	0
Sauce	25	0		30	2	2	14	0		69	2	2
	21	6	1	0			7	1	1	28	7	2
Sake	0			2	2	0	3	0		5	2	0
	0			0			2	2	1	2	2	1
Mirin	0			0			8	0		8	0	0
	4	0		0			5	1	1	9	1	1
Others food	7	0		2	0		24	1	0	33	1	0
	4	1	0	0			4	0		8	1	0
Container-package	0			32	9	—	0			32	9	—
	31	1	—	8	2	—	0			39	3	—
Total	90	4	2	97	16	2	90	2	0	277	22	4
	74	13	3	8	2	0	22	4	3	104	19	6

Note The upper row: samples made after January 1975.
The down row: samples made before December 1974.
A: samples detected above 1.0 ppm VCM in material
B: samples detected above 0.03 ppm VCM in contents food

縮された．また日本薬学会および塩ビ協で定めた VCM の検出法は FID 検出器付ガスクロマトグラフを用いる方法であるが，更にガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) による方法を検討したところ，マスフラグメントグラフィーを行うことにより，VCM の確認定量が可能であった．この方法はガスクロマトグラフ法に比べて感度は約10倍高く，検体の処理時間も約10分間で，終了した．ガスクロマトグラフ法で検出された VCM は全てこの方法で確認定量した．GC-MS 法の操作条件は第2報[7]に記載したとおりである．

Table 3. Amount of VCM detected in the Products

Sample		VCM ppm		Date of food products	Number of research order
		Material	Contents food		
Edible oil	1	4.6	0.14	1974. 3	I
	2	3.5	0.14	1974. 8	I
	3	2.6	N. D	1975. 1	I
	4	1.1	N. D	1975. 11	III
Soy sauce	1	124.0	0.20	1975. 6	I
	2	108.0	0.05	1975. 6	I
	3	9.7	N. D	1975. 9	II
	4	3.8	N. D	1974. 6	I
	5	2.3	N. D	1975. 2	II
	6	1.7	N. D	1975. 6	I
	7	1.4	N. D	1974. 4	I
	8	1.4	N. D	1974. 4	I
	9	1.3	N. D	1975. 11	II
Sauce	1	59.2	0.13	1974. 6	I
	2	29.8	0.07	1975. 10	II
	3	10.0	N. D	1973. 11	I
	4	9.7	N. D	1974.	I
	5	9.2	0.03	1975. 6	II
	6	8.8	N. D	1973. 11	I
	7	3.8	N. D	1974. 4	I
	8	2.6	N. D	1974. 4	I
	9	2.4	0.03	1974. 6	III
Sake	1	12.6	N. D	1973. 11	III
	2	12.1	0.04	1973. 5	III
	3	8.4	N. D	1975. 4	II
	4	4.9	N. D	1974. 4	II
Mirin	1	26.5	0.22	1673. 8	III
Others food	1	15.4	N. D	1976. 1	III
	2	9.1	N. D	1975. 9	I
Container-package	1	492.5	—		II
	2	165.2	—		II
	3	19.3	—		II
	4	18.9	—		II
	5	5.3	—		II
	6	4.1	—		II
	7	2.6	—		II
	8	2.2	—		II
	9	2.1	—		II
	10	1.7	—		I
	11	1.4	—		II
	12	1.1	—		II

(N.D : <0.03 ppm)

結果と考察

PVC 製品における材質（容器包装）および内容食品中の VCM の試験結果を表2に，材質中 1ppm 以上および内容食品中 0.03 ppm 以上検出したものの材質中の残存量および食品への移行量を表3に示す．また表2に示した結果に基づき，材質および内容食品中の VCM の検出率を表4に，また調査別の VCM の検出率を表5に示す．

なお塩ビ協において，食品の製造年が昭和50年の製品からは VCM は検出されないという見解を発表しているので，市販品の食品の製造年月日または容器の購入年月日から，検体を昭和49年12月以前のものおよび昭和50年1月以降のものの2つに大別して結果をまとめると表5のごとくである．

Table 4. Detection Rate of VCM in the Products

	in Material(%)			in Contents foods (%)		
	1974	1975	Total	1974	1975	Total
Edible oil	18.2	3.6	6.1	18.2	0	3.0
Soy sauce	25.0	8.7	11.1	0	2.9	2.5
Sauce	25.0	2.9	9.3	7.1	2.9	4.1
Sake	100.0	40.0	57.1	50.0	0	14.3
Mirin	11.1	0	11.1	11.0	0	5.9
Others food	12.5	3.0	4.9	0	0	0
Container-packag	7.7	28.1	7.7	—	—	—
Total	18.3	7.9	10.8	9.2	1.6	3.2

Table 5. Detection Rate of VCM on each Survey

Date of Production	I (Sept. 1975)		II (Nov. 1975)		III (Feb. 1976)		Total	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1974	17.6	7.0	25.0	—	18.2	13.6	18.3	9.2
1975	4.4	2.2	16.5	3.1	2.2	0	7.9	1.6
Total	10.4	3.8	17.1	3.1	5.4	2.7	10.8	3.2

Note A : in Material (%)
B : in Contents foods (%)

1. 材質（容器包装）中の残存 VCM の実態

材質中の検出率は表4より全体では10.8%（41/381検体）であり，これを食品製造年別にみると，昭和49年以前のもの（18.3%）に比べて50年以降のもの（7.9%）では検出率が低くなっている．

次に調査別にみると，表5より第1回（10.4%），第2回（17.1%）に比べて第3回（5.4%）は1/2から1/3の検出率であった．これは昭和50年11月から，東京都が行政指導を行ったこと，12月に国が材質中 1 ppm を限度とする暫定基準を通知したことによると同時に，業界の対応が進み，VCM をほとんど含まない樹脂を用いて成型された容器が多く使用され始めてきたことを示している．なお第1回に比べて第2回の検出率が高いのは，第1回の検体が当所周辺で購入された製品であり，商品の回転率の高い市販品であるのに，第2回の検体は多摩地区等の都周辺部の回転率の低いものを含む全都的な製品であることによると思われる．

食品別にみると，表4より酒，しょうゆ，ソース，食用油，みりん，その他の食品順に検出率が高く，食品の製造年が昭和49年以前のものよりも50年以降のものが低かった．

容器の型別にみると，表4よりカップ，箱形（6.0%）に比べてボトル（11.1%）の検出率が高い．これは材質の厚みおよび可塑剤の混合割合と関連があると思われる．

全調査結果より容器中 1 ppm の VCM を限度として分類してみると，全体の89.2%（340/381）は 1 ppm 以下であり，残りの11.8%（41/381）が 1.1～492.5 ppm の範囲で残存していた．これらのうち残存していた検体の約90%（36/41）は 50 ppm 以下であった．またストレッチフィルムからは 1 ppm を超えるものは検出されなかった．これは成型加工の際に樹脂に多量の可塑剤等を添加し加熱混練するため，VCM が揮散してしまうことによる．

なお第1回調査で材質中高濃度の VCM を検出したしょうゆ容器は，しょうゆの製造年月日が昭和50年6月製であるのに残存量が多いのでさらに調査を行ったところ，この容器は昭和48年9月から49年2月にかけて仕入れられたもので，石油ショックの頃の粗悪製品であることが判明した．このことは食品の製造年は新しくても容器は必ずしも新しいものではなく，かなり古い容器も使用されていることが明らかになった．第2回調査においても，未使用容器で VCM が検出されたものは，大部分昭和50年4月以降購入されたものであるがその製造年は古いものと考えられる．

第3回調査で検出された容器は，同一容器メーカーのものに多かった（4/6，66.7%）．

なお第2，第3回の検査で材質中 1 ppm を越える検体については，業者に自主回収させる措置がとられた．

2. 内容食品中の移行 VCM の実態

材質から内容食品へ移行した VCM の検出率は表4より，全体では 3.2%（10/310 検体）であり，これを食品製造年別にみると，昭和 49 年以前のもの（9.2%）に比べて 50 年以降のもの（1.6%）では低くなっている．

次に調査別にみると，表5より第1回 3.8%，第2回 3.1%，第3回2.7%と順次検出率は低くなってきてはいるが，依然として検出されている．しかし第3回の昭和50年以降のものからは全く検出されなかった．

食品別にみると，表4より酒，みりん，ソース，食用油，しょうゆの順に検出率が高く，めんみやカップ，箱形容器入りの食品などからは検出されなかった．そして食品製造年が昭和49年以前のものでは，酒，食用油，みりん，ソースの4食品から，50年以降のものでは，ソース，しょうゆの2食品から検出された．

内容食品入り容器中 1 ppm を超える容器（29検体）の食品中への VCM 移行量は，表3から 0.03～0.22 ppm で，0.03 ppm 以下：19検体，0.03～0.10 ppm：6検体，0.10 ppm 以上：4検体であった．VCM の残存量の多い容器（10 ppm 以上）では，内容食品中の検出率が 66.7%（6/9）と高かったが，量的な相関は認められなかった．容器中の残存量は少なくても，接触日数が長いため，VCM が内容食品へ移行していたソースや，逆に接触日数が短くても残存量が多いため，VCM が内容食品に移行してきていたしょうゆなどの例が認められた．

第3回調査においては，食品製造年が昭和50年以降のもので，PVC 容器の需要の多い食用油，しょうゆ，ソースの製品中，容器中に VCM が残存していたものは，66検体中わずか2検体で内容食品中にも検出されなかった．このことから食品製造年月日が最近のものであれば，VCM の内容食品への移行は少ないものと思われる．

ま と め

PVC 製品における容器および内容食品中の VCM について，市販品を試料として昭和50年9月から51年2月にかけて，3回にわたり実態調査を行った．その結果，全体では材質中の VCM の検出率は 10.8%（41/381）で，第1回10.4%（17/164），第2回17.1%（18/105）に比べて規制後の第3回は5.4%(6/112)と低くなってきている．また食品製造年別では，昭和49年以前のものは 18.3%（19/104）で50年以降のものは 7.9%（22/277）

と低い．食品別ではソース，食用油，しょうゆなどの食品に多い．また材質中のVCM残存量は1.1～492.5ppmの範囲で，50 ppm 以下は 89.8% (36/41) であった．

材質から内容食品へVCMが移行していたものは3.2% (10/310) で，調査別にみると，第1回 3.8% (5/164)，第2回3.1% (2/105)，第3回2.7% (3/112) とあまり差はなかった．しかし食品製造年別にみると，昭和49年以前のもの9.2% (6/104) に比べ50年以降のものは1.6% (4/277) と明らかに低くなっている．ただし材質中検出したもののうち，内容食品に移行していたものは食品製造年をとわず高い移行率 (34.5%，10/29) であった．また内容食品中の移行量は 0.03～0.22 ppm でソース，しょうゆ，食用油，酒と食品の別なく検出されている．この問題について，業界では食品製造年が昭和50年1月以降の製品からは全く検出されないはずであるという見解を表明している．しかし樹脂中のVCMの除去など，業界の対応がされ始めたのは昭和49年10月頃からであり，従って食品製造年が新しい製品でも，容器の製造年が必ずしも新しいものではなく，一部では石油ショックの頃の古い容器が使用されていたことが今回の調査で明らかになった．しかし昭和51年2月に行なわれた第3回調査では，昭和50年以降の食品製造年のものからは，内容食品中にVCMは全く検出されなかったことから，最近の容器包装中にVCMはほとんど残存していないと推測される．従って古い容器が容器メーカー等の流通経路から排除されることにより，食品衛生上におけるVCMの問題は解消されるものと考えられる．

都としては，今後も引き続き一斉検査を行い，監視を続ける方針である．

謝辞 本調査の検体収集に御協力下さった衛生局食品監視課各位に深く感謝の意を表します．

文　献

1) Maltoni, C: *Annuals of the New York Academy of Sciences*, **246**, 195, 1974
2) Federal Register, 40(171), 40529, 1975
3) 渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，諏訪世津子，藤居瑛：東京衛研年報，**26-1**，230，1975
4) 第7回塩ビ食品衛生セミナーテキスト，41，1975，塩ビ食品衛生協議会
5) 厚生省通達，昭和50年12月23日，環食化第53号
6) 日本薬学会編：衛生化学，**21**，130，1975
7) 佐藤憲一，渡辺悠二，吉田令子，藤居　瑛，遠藤英美：東京衛研年報，**27-1**，199，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 199—202, 1976

塩化ビニル樹脂製品の残留塩化ビニルモノマーとその食品への移行（第II報）
材質より各種液状食品への移行

佐藤憲一*, 渡辺悠二*, 吉田令子*
藤居瑛**, 遠藤英美*

Investigations on Residual Vinyl Chloride Monomer in Polyvinyl Chloride Food Containers and its Possible Migration into the Contents (II)
Possible Migration of Vinyl Chloride Monomer into Liquid Foods

KENICHI SATO*, YUJI WATANABE*, REIKO YOSHIDA*,
TERU FUJII** and FUSAYOSHI ENDO*

The possible migration of vinyl chloride monomer (VCM) from polyvinyl chloride (PVC) container into liquid foods was tested by soaking of PVC pieces, which are known to have been containing various amounts of VCM, to 4% acetic acid, 20% ethanol, soy sauce, sauce and salad oil. The detection and confirmation of VCM was made by the use of the gaschromatography and the gas-massfragmentgraphy.

It was found that no migration of VCM was occurred during 5 months storage, if the concentration of VCM in PVC is less than 1 ppm. However, if the original content of VCM in PVC was exceeding greater than 1 ppm, it was tended to migrate into salad oil, followed by soy sauce and sauce. The heighest migration observed on a salad oil sample was about 40% from PVC pieces with 4.95 ppm of VCM residues.

はじめに

1975年にアメリカ[1]およびイタリア[2]で塩化ビニルモノマー（以下VCMと略す）の発ガン性が明らかにされて以来，日本でも食品用容器包装に使用されている塩化ビニル樹脂（以下PVCと略す）製品に残留するVCMについて，社会的に問題となってきている．このため東京都においても独自に調査を行ない，その結果を報告してきた[3,4]．

食品衛生の立場からVCMの問題を考えた場合，材質中のVCMの残留よりもむしろ内容食品への移行の方が重要な問題である．そこで材質中のVCMについて，4週間の溶出実験の結果「VCMが材質中1ppm以下であれば，内容食品へ移行しない」という報告[5]をもとに，昨年12月厚生省では「食品用PVC製容器包装中のVCMの残留濃度を1ppm以下とする」という通達[6]を出し，行政指導を実施している．

しかし食品が容器に入れられてから，消費者が購入するまでの期間は，新日本婦人の会の調査[7]では，PVC製容器入り食用油で平均約3ケ月であると報告されている．そこで長期間保存した場合，どの程度材質中のVCMが食品溶媒中に移行するか，追試を兼ねて調査を行ったので報告する．

実験の部

試薬 エタノール：ガスクロマトグラフィーでVCMのピークを妨害する不純物のないもの，VCM標準液：関東化学の1ppm VCM標準液，ただし本VCM標準液の取扱いは充分な注意が必要である[3,8-10]．

試料溶液の調製 東京都において実態調査を行ったとき，材質中にVCMを検出した検体から1ppm未満3種類（0.30 ppm, 0.55 ppm, 0.67 ppm），1～2ppm 3種類（1.07 ppm, 1.42 ppm, 1.91 ppm），2～10ppm 3種類（2.55 ppm, 4.95 ppm, 8.44 ppm），10ppm以上

* 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
** 東京都薬剤師会衛生試験所

3種類（27.53 ppm, 59.20 ppm, 108.00 ppm）の計12種類を選び，これを充分洗浄風乾後，表面積約 25 cm², 重量約 1 g の試料片を作成し重量を正確に測定した．この試料片を5種類の食品溶媒（4%酢酸，20%エタノール，しょうゆ，ソース，サラダ油）それぞれ 50 m*l* を入れた共栓付比色管（50 m*l*）の中に浸漬し，密栓して室温で1ケ月，3ケ月，5ケ月間保存し試料溶液を調製した．

分析法 1. 試験溶液の調製 試料溶液中の VCM の捕集は塩ビ食品衛生協議会で開発された方法[8]で，試料溶液 20 m*l* に添加溶媒としてエタノール 20 m*l* を加え，窒素ガス流量 80 m*l*/min，水浴温度60°，捕集時間30分でドライアイス-エタノール浴（約−70°）中のエタノール 10 m*l* に捕集して試験溶液とした．ここで用いた捕集装置の概要を図1に示した．なお試料の採取はサラダ油，ソースなど粘度が高くホールピペットを使用することができないので，注射器に太い針をつけて行った．

2. 測定法 1) ガスクロマトグラフィー 装置は柳本ガスクロマトグラフ G 80，FID 付バックフラッシュ装置，カラム条件はカラム充塡剤：Ucon oil LB-550 X (10%)/Anakrom SD (70～80 mesh)，カラム温度：70°，注入口温度：180°，キャリヤーガス：N_2 22 m*l*/min, H_2, Air：最高感度に調整，感度：1×1，チャートスピード：40 mm/min，注入量：8 μl で行った．

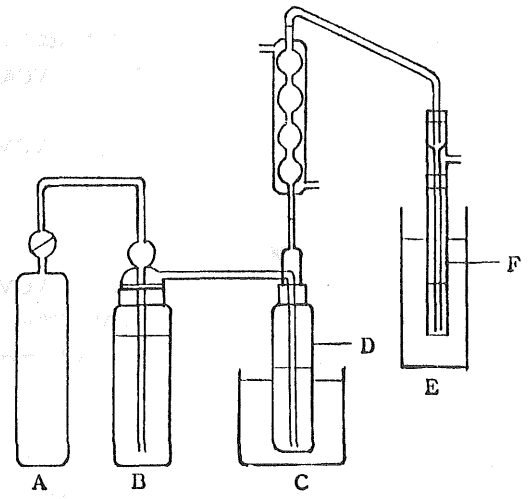


Fig. 1. Apparatus for VCM Extraction
A : Gas Cylinder
B : Washing Bottle (ethanol)
C : Water Bath
D : Sample Bottle
E : Dewar Bottle (Dryice-Ethanol)
F : Collector

VCM の分析は高感度で行なうため溶媒ピークが非常に大きくなり，通常1回の分析に45～60分かかるが，このバックフラッシュ装置は流路切り替えにより短時間で溶媒を系外に排出するという機構をもち，1回の分析時間は約10分で行える．検量線は用時 1 ppm の VCM 標準液をドライアイス-エタノール浴中に冷却しながら 2,4,6,8 μl とり絶対検量線法によって作製した．このガスクロマトグラフィーによる VCM の検出感度は約 0.08ng である．

2) ガス-マスフラグメントグラフィー[11] 装置は島津 LKB-9000 形ガスクロマトグラフ質量分析計，多重イオン検出器付，測定条件はカラム：ガラスカラム 3

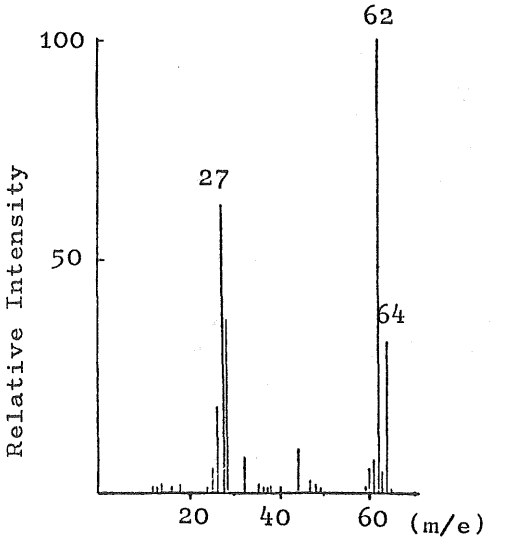


Fig. 2. Mass Spectra of VCM

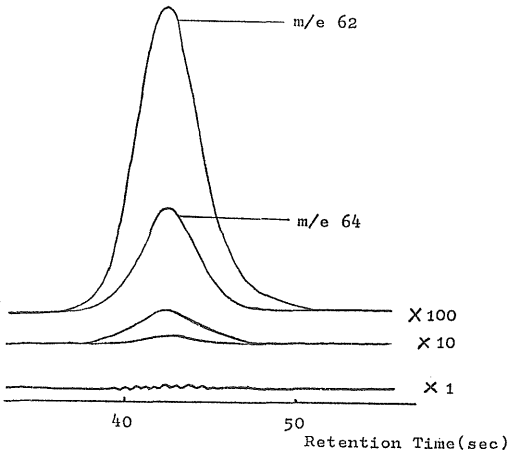


Fig. 3. Mass Fragment of VCM m/e 62, 64

mm×2 m，カラム充填剤：Ucon oil LB-550X (10%)/Anakrom SD (70～80 mesh)，カラム温度：60°，注入口温度：180°，キャリヤーガス：He 20m*l*/min，セパレータ温度：180°，イオン源温度：250°，イオン化電圧：70 eV，トラップ電流：60 μA，*m/e*：62，64 で行った．VCM（分子量：62.5）の場合，マススペクトルは図2に示すように親イオン *m/e*：62 が基準ピークとして現われるが，さらに ^{37}Cl の同位体を含むことからマスフラグメントは図3に示したように *m/e*：62 に比べ *m/e*：64 にイオン強度が約 1/3 のピークをもつ．このイオン強度比は一定であることから，この比を測定すればVCMの確認ができる．これによってガスクロマトグラフィーでVCMを検出したものを確認したところ，全てVCMであった．

結果と考察

材質中のVCMの食品溶媒への溶出状態を示したものが表1である．なおここでは試料片の表面積を正確に測定できないので，VCMの溶出は材質 1g 当りに換算した値である．

この表から材質中VCMが 1 ppm 以下であれば5種類の食品溶媒に 5ケ月ではVCMの溶出は認められない．1～2 ppm のものは5ケ月でサラダ油にわずかに溶出する．2～10 ppm のものは3ケ月位からサラダ油，しょうゆ，ソースに溶出してきており，さらにVCMを

Table 1. Result of VCM migrated into Liquid foods

VCM Concentration in material	Liquid food	1 mon.	3 mon.	5 mon.	VCM Concentration in material	Liquid food	1 mon.	3 mon.	5 mon.
	a	ppm	ppm	ppm		a	ppm	ppm	ppm
	b					b			
0.30 ppm	c				2.55 ppm	c			
	d					d			
	e					e			0.012
	a					a			
	b					b			
0.55	c				4.95	c		0.006	0.016
	d					d		0.006	
	e					e		0.018	0.040
	a					a			
	b					b			
0.67	c				8.44	c			0.006
	d					d		0.002	0.004
	e					e		0.006	0.008
	a					a			0.006
	b					b		0.004	
1.07	c				27.53	c		0.044	0.075
	d					d		0.047	0.006
	e			0.007		e	0.017	0.072	0.116
	a					a			0.008
	b					b		0.005	0.009
1.42	c				59.20	c	0.003	0.045	0.065
	d					d	0.008	0.010	0.009
	e			0.007		e	0.037	0.087	0.160
	a					a	0.016	0.008	0.013
	b					b	0.016	0.025	0.012
1.91	c				108.00	c		0.131	0.023
	d					d	0.014	0.024	0.012
	e			0.009		e	0.069	0.260	0.336

Note a：4% Acetic acid b：20% Ethanol c：Soy sauce
d：Sauce e：Salad oil

Table 2. Rate of VCM Migrated into Salad oil, Sauce and Soy sauce

VCM Concentration in material	Salad oil			Sauce			Soy souce		
	1 mon.	3 mon.	5 mon.	1 mon.	3 mon.	5 mon.	1 mon.	3 mon.	5 mon.
1.07 ppm	%	%	32.7%	%	%	%	%	%	%
1.42			24.6						
1.91			23.6						
2.55			23.5						
4.95		18.2	40.4		6.1	0.0		6.1	16.2
8.44		3.6	4.7		1.2	2.4			3.6
27.53	3.1	13.1	21.1		8.5	1.1		8.0	13.6
59.20	3.1	7.3	13.5	0.7	0.8	0.8	0.3	3.8	5.5
108.00	3.2	12.0	15.6	0.6	1.1	0.6	0.0	6.1	1.1

10 ppm 以上含有するものでは1ケ月でも容易に溶出してきている．またVCMはサラダ油に最も溶出しやすく，次いでしょうゆ，ソースの順で，20%エタノールには溶出しにくい，4%酢酸にはほとんど溶出しないということがわかる．

ソースにおいて材質中VCMが4.95ppm, 27.53ppm, 59.20 ppm, 108.00 ppm のものは3ケ月に比べ5ケ月の方がVCMの溶出量が減少している．この現象は4%酢酸，20%エタノール，しょうゆについても若干認められている．この原因については，検体のバラツキ，保存期間中の管理の不手際，VCM の分解などが考えられる．特にVCMが食品中で何らかの反応を生じ変化するというようなことがあるとすると新たな問題となろう．

表1の結果から，サラダ油，しょうゆ，ソースについて VCM の移行率を計算したものが表2である．これによると，サラダ油へのVCMの移行率は1ケ月で約3%，3ケ月で約10%，5ケ月では最高40%にもなることがわかる．またバラツキが大きいが，VCM のソースへの移行率は10%以下であるが，しょうゆでは5ケ月で10%を越えるものがある．

ここで最もVCMが移行しやすいサラダ油について移行量を計算してみると，容器重量：50 g，内容量：1 *l*，材質中のVCM濃度：1ppm，移行率：40%として1 *l* 中0.02 mg ということになる．また現実に液体食品を摂取するときは，しょうゆ，ソースをつけて食べる，また食用油，酢をドレッシングとして用いるなどのほかはほとんど加熱されるので，食品中のVCMは揮発してしまうと考えられる．

このように容器の材質中のVCMが1 ppm 以下であれば，食品からVCMが体内に多量摂取されるという心配は今のところ少ないと思われる．しかし夏期における食品の流通，貯蔵温度は40°近くになること，材質中VCMが1.07 ppm のものでもサラダ油に5ケ月でわずかではあるが溶出していること，VCM は発ガン性の証明された物質であることなどを考えると，材質中のVCMの量をより少なくしてゆくべきである．

文　献

1) Federal Register, 40(71), 40529, Sep. 3 1975, FDA
2) Maltoni, C.: *Annuals of the New York Academy of Sciences*, 246, 195, 1974
3) 渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，諏訪世津子，藤居瑛：東京衛研年報，26-1，230，1975
4) 渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，藤居　瑛，遠藤英美：東京衛研年報，27-1，194，1976
5) 辰濃　隆，佐藤美恵子，谷村顕雄：科学技術庁報告書，1975
6) 厚生省通達，昭和50年12月23日，環食化第53号
7) 甲斐良一：壮快，1，197，1976
8) 塩ビ食品衛生セミナーテキスト，41，1975，塩ビ食品衛生協議会
9) 辰濃　隆：食品衛生研究，25(11)，103，1975
10) 日本薬学会編：衛生化学，21，130，1975
11) 藤居　瑛，渡辺悠二：食品の包装，7(2)，36，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 203—206, 1976

市販醸造酢の"真がん性"について

深野駿一*, 牛尾房雄*, 西田甲子*
道口正雄*, 可児利朗*

The Survey on the Adultrants in Marketing Vinegar

SHUN-ICHI FUKANO*, FUSAO USHIO*, KOKO NISHIDA*,
MASAO DOGUCHI* and TOSHIRO KANI*

緒　言

昭45公取委告示第12号「食酢の表示に関する公正競争規約」によれば，"醸造酢とは米，麦その他の穀類，酒粕又は果実及び種酢により変性したアルコールを原料とし，酢酸発酵させたものであって，合成酢酸を使用せず又は添加しないものをいう"と規定されている．

合成酢酸は石油化学より得られるアセチレン又はエチレンを酸化し合成したもので，これを原料とした食酢は醸造酢に比べ著しく安価である．このことから食酢製造に合成酢酸が使用され，あたかも純醸造酢であるかのようにして販売され，上述の公正競争規約に反する製品があることも想像される．

醸造酢と合成酢とを鑑別する方法は，諸外国を含め多くの研究があり，たとえば醸造酢中に含まれる各種カルボニル化合物，アルコール類，エステル類，アミノ酸類，アルカロイド類などを，ガスクロマトグラフィー，アミノ酸分析計，けい光分光計により定性又は定量する方法などが考えられている．しかし，これら有機物含有量は製品により著しく差があるうえに，醸造酢の中には蒸留酢といわれるアルコールを主原料とした高酸度醸造酢があり，この製品は酢酸以外の有機成分が少ないために上記の方法では合成酢と誤認されるおそれがある．

そこで著者らは，二次的に含まれる有機物によらず，酢酸そのものの構成元素である炭素の放射性同位元素 ^{14}C を定量することにより鑑別を行った．その他この試験結果を補う意味から従来行なわれているアミノ酸含有量，過マンガン酸カリウム消費量，総酸，比重も合せて測定したので報告する．

実験方法

1. 試　料

昭和50年12月～51年1月，食品機動監視班により収去された市販醸造酢28検体について調査した．

2. ^{14}C の測定

原理　^{14}C による考古学上の年代決定法はよく知られた事実であり，これを利用したものである．合成酢の原料である石油は，中生代から第三紀のプランクトン類よりつくられたといわれている．これらプランクトンに取り込まれた ^{14}C は5000万年から1.5億年の間半減期5760年の確率で崩壊し続けている．従って現在石油中の ^{14}C 存在比は，中生代の ^{14}C 存在比の $(1/2)^{10,000}$ 以下であり，この石油より合成された酢酸中には ^{14}C は存在しないと考えて良い．

一方発酵法により生成された酢酸は，その原料が現在炭酸同化作用により固定された炭素を含むため ^{14}C が存在し，一定レベルの放射能を有している．この放射能の差を利用して合成酢酸含有比を知ることができる．

酢酸の分離　精製法は Masai らの方法[1]に準拠した．すなわち市販食酢 1.8 l をロータリーエバポレーターで蒸留し，得られた留液に炭酸カルシウムを添加した．これをろ過後，ろ液を蒸発，乾燥し，得られた酢酸カルシウムにピロリン酸を添加して真空蒸留し，精製酢酸を得た．

シンチレーター溶液の調製　シンチレーターは，2,5-diphenyloxazole 4 g と bis〔2-(5-phenyloxazolyl)〕benzene 0.1 g をトルエンに溶解し，1 l に定容して調製した．ガラスバイヤルビンにこのトルエンシンチレーター 10 ml および試料として精製酢酸 10 ml をホールピペットで等量加え測定した．

β 線の測定　液体シンチレーションカウンター (Beckman 社製 LS-230) により，^{3}H と ^{14}C チャンネルを合せたチャンネルを用いて測定した．酢酸はクエンチン

* 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. Analytical Data on

No.	Material	S.G.	T.A.	I.A.	O.N.	^{14}C Radioactivity D.P.M.	^{14}C Radioactivity B.A.A.C.	Asp	The	Ser
			%	%			%	mg/100 ml		
1	Rice	1.026	4.57	4.2	12.67	19.3	77.4	1.1	0.9	1.1
2	Rice	1.024	4.67	4.2	12.37	19.5	78.6			
3	Rice	1.030	5.07	4.5	6.96	22.1	90.7	2.4	2.3	2.7
4	Rice	1.018	4.27	4.2	5.51	22.9	94.5	2.2	6.2	7.5
5	Rice	1.051	4.56	4.5	6.32	22.6	93.1	5.8	3.3	5.3
6	Rice	1.052	4.61	4.5	7.76	23.4	96.8	4.2	2.4	3.6
7	Rice, Alcohol	1.051	4.62	4.5	4.73	21.9	89.8	12.2	4.9	6.3
8	Rice, Alcohol	1.039	4.61	4.5	1.50	23.4	96.8	0.2	1.2	1.2
9	Rice, Alcohol	1.037	4.67	4.5	6.89	23.7	98.2	0.2	0.4	0.4
10	Rice, Alcohol	1.044	4.67	4.5	10.52	22.2	91.2	4.4	3.2	4.4
11	Rice, Koji (molded)	1.020	4.45	3.34	7.21	24.6	102.4	2.9	38.0	36.9
12	Alcohol, Sake cake	1.019	4.28	4.2	7.74	22.9	94.5	2.4	2.2	2.2
13	Alcohol, Sake cake	1.016	4.29	4.2	8.01			5.1	2.5	2.3
14	Alcohol, Sake cake	1.016	4.28	4.2	7.91					
15	Alcohol, Sake cake	1.014	4.47	4.3	7.01	21.3	87.0	1.4	1.7	1.0
16	Alcohol, Sake cake	1.012	4.42	4.3	4.83					
17	Alcohol, Sake cake	1.014	4.37	4.3	1.84			1.5	2.2	1.8
18	Alcohol, Sake cake	1.012	4.40	4.3	1.64	23.0	94.9			
19	Alcohol, Sake cake	1.018	4.33	4.2	6.37	22.7	93.5	5.3	2.4	2.4
20	Alcohol, Sake cake	1.016	4.34	4.2	8.24	23.8	98.7	2.0	2.6	1.0
21	Alcohol, Sake cake	1.016	4.33	4.2	1.20	23.0	94.9	0.3	0.8	0.2
22	Alcohol, Sake cake	1.036	8.12	8.0	11.48	23.0	94.9	27.3	10.3	12.0
23	Apple juice, Alcohol	1.024	5.12	5.0	1.99	22.5	92.6	7.7	3.3	8.9
24	Apple juice, Alcohol	1.024	5.10	5.0	7.05					
25	Apple juice, Alcohol	1.018	5.18	5.0	7.66	23.1	95.4	5.6	1.0	2.2
26	Apple juice, Alcohol	1.020	5.17	5.0	5.31	24.3	101.0	0.6	0.7	0.4
27	Apple juice	1.014	5.17	5.0	8.95	22.3	91.7	0.7	0.2	0.2
28	Lemon juice, Alcohol	1.042	4.58	4.5	2.55	22.6	93.1	29.2	2.6	15.8

S.G.: Specific gravity T.A.: Total acid I.A.: Acid concentration indicated on the label

グが大きくその他各種の要因により計数効率が異なる[2]ため各試料に内部標準線源〔^{14}C-トルエン，5.73×10^5 dpm/g±3%，Packard 社製，(dpm：1分間当りの崩壊数)〕を 10 μl 添加し，個々に計数効率を求め補正した．計数測定は，試料については12,000カウント以上，内部標準を添加した場合は 160,000 カウント以上計数させた．バックグラウンドとして酢酸の代りにトルエン 10 ml をバイヤルビンに加え測定した．

精製酢酸中の水分の測定 前記の精製法では水分が0～10数%の割合で混入するため，Kaneko ら[3]は蒸留をくりかえすことにより水分を1%以下にして誤差を防いでいる．しかし吸湿性の酢酸より水分を完全に除くことは困難であり，また水分が1%以下であることをチェックする必要がある．そこで我々は水分を正確にガスクロマトグラフィーで定量し，精製酢酸の純度を測定した．

ガスクロマトグラフィー条件は以下のとおりである．

島津 GC 5AP，カラム：P.E.G. 1000, 10% on Flusin T 60/80 mesh, 1.5 m ガラスカラム ID 3ϕ，カラム温度：105°，N_2: 80 ml/min，検出器：TCD.

3. 遊離アミノ酸分析法

試料 100ml を減圧下40°で，ロータリーエバポレーターにより 10 ml 前後に濃縮後，クエン酸緩衝液 pH 2.2 により 50 ml に定容し，アミノ酸分析に供した．分析条件は以下のとおりである．

アミノ酸自動分析計：日立 KLA-3B，注入量：500μl，樹脂：日立球状樹脂 #3105，カラム：塩基性用 100 mm ×5ϕ，中酸性用 520 mm×9ϕ，溶出液：pH 5.28，pH 3.02，pH 4.25 のクエン酸緩衝液，カラム温度：55°，流速：60 ml/hr.

4. 酸化値

AOAC 法[4]に従って分析した．すなわち試料 50 ml を水蒸気蒸留し，この留液に対する 1N 過マンガン酸カリ

Commercial Vinegar

Free amino acid contents														
Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ileu	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Total
14.1	2.0	0.8	1.6	nd	1.3	0.3	0.8	1.7	1.1	1.1	1.9	0.9	2.3	33.0
3.0	6.7	2.0	3.6	0.2	1.7	1.5	1.9	4.7	4.4	2.9	5.1	3.1	8.6	56.8
7.1	17.4	10.5	8.3	0.3	10.9	2.1	7.4	11.5	7.1	3.9	14.7	3.9	0.8	121.8
172.7	18.5	9.1	10.8	nd	3.3	0.8	8.5	1.5	8.5	0.9	2.3	1.8	3.5	256.6
172.5	13.0	3.9	5.9	0.3	2.4	0.9	1.4	4.1	1.1	2.0	2.8	1.8	3.5	225.8
123.7	13.4	4.2	6.2	nd	5.9	1.0	4.0	6.7	2.7	4.0	8.4	4.2	7.8	215.6
150.0	5.4	1.0	4.8	nd	1.3	0.4	1.2	2.3	nd	0.8	0.2	tr	0.1	170.1
30.6	3.4	0.4	1.7	nd	0.8	0.2	0.5	0.8	0.2	0.3	0.9	0.2	tr	41.0
83.2	10.8	30.7	11.8	1.1	4.2	1.0	2.8	6.0	4.1	2.7	5.5	3.8	9.0	188.7
7.2	58.3	51.6	150.3	3.7	65.0	16.2	41.0	69.3	8.9	24.7	15.3	2.3	0.4	592.2
23.8	5.7	1.8	2.7	nd	2.4	0.4	1.7	2.3	1.1	1.7	4.3	1.3	3.4	59.4
25.0	5.2	1.7	2.5	nd	2.3	0.2	1.6	2.1	1.2	1.4	3.9	1.5	3.3	61.8
19.4	2.9	0.7	1.3	nd	1.6	0.4	1.2	1.9	0.5	1.1	2.3	1.0	0.9	39.3
22.2	4.0	1.6	3.2	nd	2.2	0.5	1.5	2.4	0.6	1.1	1.9	1.5	1.9	50.1
25.2	6.6	1.8	2.8	nd	2.5	0.2	1.7	2.4	1.2	1.6	3.3	1.0	3.0	63.4
20.8	4.1	23.1	6.1	nd	2.4	0.7	1.9	3.6	3.0	1.5	2.5	1.6	0.5	77.4
80.6	nd	0.5	1.4	nd	0.8	0.2	0.5	0.8	0.3	0.4	0.2	0.2	0.2	87.4
60.0	28.1	10.5	20.3	nd	8.3	0.5	5.9	9.3	3.0	7.1	14.2	7.4	11.3	235.5
5.4	3.9	2.0	6.8	nd	4.3	0.6	2.4	3.1	1.3	1.3	5.5	1.5	2.5	60.5
2.6	1.0	0.9	2.8	nd	1.4	0.3	1.1	1.8	0.4	1.0	1.9	1.7	1.9	27.6
1.4	0.5	0.7	1.5	nd	0.9	0.2	0.5	0.8	0.7	0.6	1.0	0.6	0.1	11.2
1.4	0.9	0.3	0.8	nd	0.4	0.2	0.3	0.4	0.3	0.3	0.7	0.3	0.1	7.5
127.3	26.0	1.6	17.4	nd	2.2	0.3	0.4	0.6	0.4	0.7	0.9	0.8	4.3	230.5

O.N.: Oxidation Number D.P.M.: D.P.M./g carbon B.A.A.C.: Biogenic acetic acid content

ウム消費量 (m*l*) を求め，これを酸化値とした．

5. 総 酸

日本薬学会協定，衛生試験法[5] に従い試料 5 m*l* を 1/10N水酸化ナトリウム溶液により滴定し酢酸として表示した．

6. 比 重

日本薬学会協定，衛生試験法[6] の浮きばかりによる方法により測定した．

実験結果及び考察

測定結果は Table 1 に示した．試料 No. 1～11 は米酢，No. 12～22 は粕酢，No. 23～27 はリンゴ酢と表示されていたものである．表中括弧でくくられた番号は同一製造元，同一銘柄の製品で，この種の重複検体は ^{14}C と遊離アミノ酸測定は一部を除き行わなかった．

1. ^{14}C の測定結果

試料 No. 1, 2 を除き食酢の放射能は 21.3～24.6dpm /gC（炭素 1 g 当りの 1 分間の崩壊数）に分布した．これらの値は平均値で比較すると Kanekoら[3] の報告と比べ 3 dpm ほど高くこの原因については検討中である．

試料 No. 1 のA社の製品については，19.3 dpm/gC と低く，再度同銘柄の製品について検査したところ 19.5 dpm/gC と同様の値を示した．この値は試料 1, 2 を除く値が平均 22.9 dpm/gC，標準偏差 0.78 dpm/gC に分布しているのに対し明らかに低い値であった．

^{14}C の天然放射能は非常に弱いため測定に対し以下の項目について検討した．

β 崩壊に対する統計上の誤差：カウント総数 N に対する標準偏差は $\sqrt{N}$ で表わされ，今回の測定では $N \geqq 12{,}000$ カウントであるから，相対標準偏差は0.9%〔$(\sqrt{N}/N)\times 100$〕以下である．

計数効率：すべての試料について計数効率を測定した結果 0.533～0.645 であった．これらの値から個々の試

料につき補正を行い計数もれに対する誤差を除いた．

精製酢酸の純度：酢酸以外の酸が混入したとしても食酢中の酢酸以外の有機酸量は 100 mg/100 m*l* 以下であり[7]，その影響は 0.1% 以下である．これに対し精製酢酸中の水分は多く，測定の結果0.21～12.4%含有していた．また市販の特級酢酸は 0.036～0.65%（5検体）の水分量であった．この水分量より室温における酢酸-水混合溶液の比重換算を行い精製酢酸 10 m*l* 中に含まれる炭素量を正確に求めた．

精製操作中における他の放射性物質の混入：このため試薬特級酢酸の4%水溶液をつくりブランクテストを3回行ったところ，2.2, 2.9, 3.0 dpm/gC であった．精製前の特級酢酸は 2.3 dpm/gC で，精製操作中に他の放射性物質の混入はないものと思われる．その他 ^{3}H の影響もあるが今回の条件では 0.1 cpm 以下と考えられている[3]．

また核実験等により ^{14}C の自然界における地理的分布がみだされ，また経年的にも変化をきたし[8]，このため食酢原料の産地及び収穫年代により ^{14}C 含有量が異なっていることも考えられる．

醸造酢含有率：調査対象品の中から最も高い崩壊数を示した4試料 No. 9, 11, 20, 26 の平均値を醸造酢 100%とみなし，試薬特級の4%水溶液より精製した酢酸を0%として比例配分し，醸造酢含有率（%）とした．

試料 No. 1, 2 のA社の製品は，78%含有率で他の製品が平均94.5%（標準偏差3.66%）に対し，明らかに低い値を示した．

2. 遊離アミノ酸含有量

アミノ酸含有量は 7～592 mg/100 m*l* と製品により著しい変動があった．一般的傾向として，米酢は含有量が高く，次に粕酢，リンゴ酢の順であった．この中で特にアミノ酸含有量が高い試料は，米酢，特濃酢（酸度8%），又はこうじを原料とした製品であった．

醸造酢の中には専売アルコールを主原料とする製品を含むため，アミノ酸含有量が著しく少なくても合成酢とはいえないが，試料 No. 1, 2 のA社の製品は，アルコールを主原料としない米酢としては含有量が低い値であった．

酢の原料の種類により特異的アミノ酸があれば原料表示につきある程度の判定ができるが製品間のバラツキが大きく区別することができなかった．また製品によっては，グルタミン酸，イノシン酸，アラニン，酵母エキスなどを添加しているものもあると考えられ，アミノ酸組成による鑑別を困難にしている．この他アミノ酸構成パターンを数学的に処理する方法も検討中である．

3. 酸化値

醸造酢には多種のカルボニル化合物が含まれるため過マンガン酸カリウム消費量は，合成酢と比べ高く両者の判別法となりえる．しかし蒸留酢では合成酢と変らずこれを混合した場合には適正な値を示さない．今回の結果においても 1.20～12.67 (m*l*/50 m*l*) とバラツキ，^{14}C 測定値，アミノ酸含有量とも比例関係になく，醸造酢と合成酢の判別は困難であった．

4. 総酸及び比重

すべての試料が表示酸度以上であった．

比重は 1.012～1.052 であった．この差は食酢に含まれるしょ糖，水あめ，デンプン分解物などの含有量の差によるものと思われる．

結　論

昭和50年12月～51年1月にかけ，食品機動監視班により収去された市販醸造酢28検体について，^{14}C，遊離アミノ酸，酸化値，総酸，比重を測定し醸造酢と合成酢の鑑別を行なった．

醸造酢中の ^{14}C 測定値はA社の製品を除き炭素 1g 当り平均 22.9±0.78 dpm であったが，A社の米酢は 19.4 dpm と低い値を示し，実験誤差を考慮しても 100% 醸造酢とはいえず，合成酢の混合又は原料として合成アルコールの使用等が考えられる．また今回の調査では合成酢 100% のものはなかった．

遊離アミノ酸含有量及び酸化値についてはバラツキが大きく，^{14}C との相関もみられず，これらの値から鑑別することはできなかった．

総酸はすべて表示酸度以上であった．

謝辞　試料収集に当り御協力いただいた食品監視課ならびに食品機動監視班の方々，実験方法につき御助言いただいた食品総合研究所の伊藤寛室長に深謝致します．

文　献

1) Masai, H., S. Ohmori, T. Kaneko, and H. Ebine: *Agr. Biol. Chem.*, 37(6), 1321, 1973
2) 伊藤　寛，海老根英雄，櫛引順三，菊地啓武：食総研，30, 49, 1975
3) Kaneko, T., S. Ohmori, and H. Masai: *J. Food Sci.*, 38, 350, 1973
4) Assoc. Offic. Agr. Chem.: *Official Method of Analysis of the A.O.A.C*, 12, 563, 1975
5) 日本薬学会：衛生試験法注解，524, 1969, 金原出版
6) 日本薬学会：衛生試験法注解，523, 1969, 金原出版
7) 伊藤　寛：香料，112, 103, 1975
8) Nydal, R. and K. Lovseth: *J. Geophys. Res*, 75, 2271, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 207—209, 1976

日本食品標準成分値の検討 (II) みそ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 (II) The Nutritive Composition of Miso

MASAOMI TOMONARI*, YASU TSUKAGOSHI*, MASATAKA FURUUCHI*,
KUNIO BUSHIMATA* and TOSHIRO KANI*

はじめに

三訂日本食品標準成分表を改訂するための基礎データーを得る目的で，前報に引続いて日常の食生活において使用頻度の高い「みそ類」について栄養成分値の測定を行ない，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．なお，「みそ」は49年7月8日農林省告示第607号で品質表示基準が適用になり，50年1月より品名・原材料名・添加物・製造年月日・製造者名の表示が義務づけられた．品名は使用した麹の種類によって，米みそ・麦みそ・豆みそ・調合みその4種に類別し，原材料名は使用したものの多い順に表示することになった．

実験

試料　試料は表1に示した．これらを都内の店舗より購入し，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，即席みそは具類も混合粉砕し分析試料とした．

分析法　前報[1]と同様に行なった．なお，たんぱく質換算係数は窒素×5.71，カロリー換算係数は（たんぱく質×3.47）＋（脂質×8.37）＋（炭水化物×4.07）を用いた．これらはFAO提唱による「みそ」と同様の数値を適用したものである．また，平均値・標準偏差・最大値・最小値の求め方は前報[1]と同様に行なったが，試料の個々の測定値のうち米みそ灰分10.6% ナトリウム3800 mg% および豆みそ炭水化物23.7%については危険率1%，米みそビタミン B_2 1.38 mg% 即席みそ炭水化物47.4% 灰分26.8% およびカルシウム404 mg% については危険率5%でスミルノフの棄却検定に基づいてこれらの測定値は棄却した．豆みそ6例中1例にビタミンB_2 1.5 mg%（実測値1.42 mg%）をエンリッチした特殊栄養食品がありこの測定値は除外した．

結果および考察

米みそ17例の栄養成分値を表2に示した．これらはたんぱく質10.7% 脂質5.3% 炭水化物20.5%熱量165Cal. であった．豆みそ6例の栄養成分値を表3に示した．これらはたんぱく質14.3%脂質7.3%炭水化物16.0%熱量181 Cal. であった．原材料に米を多く使う米みそはたんぱく質・脂質が少なく炭水化物が多く，対照的に大豆を多く使う豆みそはたんぱく質・脂質が多く炭水化物が少ない．PFCカロリー比（たんぱく質カロリー・脂質カロリー・炭水化物カロリー割合）によってみるといっそうその特徴が理解できる．すなわち，米みそのPFCは23：27：50，豆みそは28：35：37となり，また，豆みそのPFCは大豆のPFC 30：37：33に近似している．即席みそ6例の栄養成分値を表4に示した．これらはたんぱく質18.9% 脂質7.5% 炭水化物39.8% 熱量296 Cal. であった．このPFCは23：22：55でありどちらかというと米みそに近い値を示している．

米みそ・豆みそともCa/Pは1：2であるが，即席みそのCa/Pは1：1でカルシウム含量は前二者の約2倍量と高い．これは製造上および品質維持の上からカルシウム塩おそらく炭酸カルシウムを添加したものと推定できる．このことは灰分に対する炭酸含有試験およびpHからも確認できる．

ナトリウム値から換算した食塩の含量は，豆みそ10.5%～13.5% 平均12% 米みそ12%～14% 平均13% で豆みそのほうがやや少ない．また，豆みそは熟成期間が永いので「塩馴れ」して塩辛さはあまり感じさせないといわれているが，今回の検査では甘口と称しているもの7

* 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

米みそ	豆みそ	即席みそ
ヤマサ味噌・佐渡蔵出しマルダイみそ	ヤマイヅミ赤だし味噌	永谷園赤だし
信州田舎みそ・神州一味噌・信州大吟醸	八丁味噌	永谷園あさげ
本場仙台味噌・ハナマルキおかあさん	京出し味噌	永谷園白みそしたて
やまじるし完熟・ハナマルキあまくち	宮城名産仙台味噌	味の素わかめ汁
ハナマルキ米糀・信州優上味噌	名古屋名産赤だし味噌	味の素信州みそ
ハナマルキ味噌・信州あま塩造山吹	岡崎名産八丁味噌	味の素赤みそ
越後雪国の味・マル京ぜいたく味噌	調合みそ	
越後のこころ・信州あまくち	四季づくり田舎みそ	

表2. 米みそ (17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	49.8	10.7	5.3	20.5	13.9	82	189	5153	400	0.08	0.25	165
標準偏差	2.81	0.58	0.47	3.20	0.77	13.37	46.35	258	87	0.02	0.32	11.15
最大値	55.5	11.8	6.1	26.4	15.0	108	296	5500	540	0.12	1.00	185
最小値	45.9	10.0	4.3	14.3	11.8	51	115	4700	250	0.04	0.07	150
棄却測定値					10.6			3800			1.38	

表3. 豆みそ (6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	47.7	14.3	7.3	16.0	13.5	91	189	4792	620	0.06	0.28	181
標準偏差	2.73	2.57	1.29	0.85	0.65	27.2	70.75	369	255	0.01	0.20	16.42
最大値	51.6	17.7	9.6	17.0	14.4	129	312	5300	940	0.07	0.60	204
最小値	44.2	11.7	5.6	14.8	12.7	44	120	4200	320	0.05	0.09	156
棄却測定値				23.7								

表4. 即席みそ (6例)

	水分 %	たくぱく質 %	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	8.5	18.9	7.5	39.8	23.5	186	233	8207	827	0.16	0.64	296
標準偏差	16.9	1.69	1.58	1.14	0.61	43.42	34.82	612	218	0.05	0.49	9.64
最大値	11.7	22.1	9.2	41.0	24.5	268	245	9400	1.240	0.23	1.22	307
最小値	5.9	16.7	4.6	37.6	22.7	149	186	7600	640	0.08	0.13	280
棄却測定値				47.4	26.8	404						

表5. 調合みそ (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%	カリウム mg%	ビタミン B_1 mg%	ビタミン B_2 mg%	熱量 Cal
	48.0	11.8	5.1	20.8	14.3	76	137	5100	510	0.07	0.15	168

例中7例が米みそ，中辛と称しているもの6例中4例が豆みそであった．さらに，食塩含量も甘口は最大値13.7% 最小値 11.9% 平均12.8% 中辛は最大値 14.0% 最小値 10.7% 平均12.6% であることから甘口・中辛の区別は食塩含量という点だけではない．

ビタミン B_1 は製造過程における加熱処理で破壊されているが，ビタミン B_2 は耐熱性のために残存し，また，はっこう中での増加あるいは着色のために添加したと思われるものもあり全体的に自然含有程度（0.10 mg%～0.15 mg%）より高い値を示した．

あとがき

日本人の食生活に改変がおこったとはいえ，みそが食卓から消えることもないしその摂取が極端に多くなることも考えられず，各家庭の好みに合った各種のみそが現在の量は出廻り引続いて日常食の中に組み入れられるであろう．

たまたま前述のみそ類の分析を行なったのであるが，供試材料を東京山手で求めたために山手嗜好の工業生産みそについての分析値を示したことになる．食品標準成分表改訂のための基礎資料としては，みその嗜好の地域差による試料および自家醸造みそが試料に入っていなかったために不充分であるが，この点に関しなお多くの試料を集めなければならない．

食生活指導の上から食塩摂取を制限する人達を対象に低食塩みその出現という考えもあろうが，自家醸造の保存の問題，また，そのために今までの風味と全く違った風味のものができるという問題などがある．みその風味を生かしながら食塩摂取量を少なくする工夫を栄養指導対策として今後とらねばならない．そのために表示の中に食塩の含有量を示して栄養指導に役立たすことを望みたい．

謝辞 本調査に協力し助言をいただいた衛生局栄養課の職員各位に深謝いたします．

文　献

1) 友成正臣，塚越ヤス，古内正孝，武士俣邦雄，可児利朗：東京衛研年報，26-1，241，1975
2) 科学技術庁資源調査会編：三訂日本食品標準成分表10版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1 210-212, 1976

重金属にかわって過酸化水素を使用するケルダール法

友成正臣*, 塚越ヤス*, 古内正孝*
武士俣邦雄*, 可児利朗*

An Improved Kjeldahl Method Substituted Hydrogen Peroxid for Heavy Metals

MASAOMI TOMONARI*, YASU TSUKAGOSHI*, MASATAKA FURUUCHI*,
KUNIO BUSHIMATA* and TOSHIRO KANI*

はじめに

有機態窒素測定のさいのケルダール法には常法として分解促進剤に銅塩，水銀あるいはセレンおよびそれらの酸化物を使用しているが，これらは分析終了後に排水路を経て廃棄され公共水域の環境汚染の原因となる．筆者らは，環境汚染物質を排出しない代替試薬による食品分析法を開発し環境汚染防止に資する目的から，これら重金属類にかわって過酸化水素を使用しその成果を比較しあわせて分析上に若干の検討を行なったので報告する．

実　験

試料　高脂質あるいは高たんぱく質または高糖質の代表的な食品として粉末チーズ，きなこ，かまぼこ，小麦粉，甘納豆および精白米の6種を店頭より購入しその2～3容器および2～3包装分について分析を行ない，あわせて，特異なN型態をもつアミノ酸としてアルギニン・グルタミン酸・ヒスチジン・リジン・トリプトファンについて分析を行なった．

分析法　窒素として約 30mg を含む試料を精密にはかりとり，300m*l* ケルダールフラスコを用いて下記の条件によって分解し，窒素の全量を水蒸気蒸留したのちほう酸液吸収，0.1N 塩酸滴定法により定量した．

従来からの分析法の分解法については，硫酸銅法[1]（以下A法と記す）は硫酸銅・硫酸カリウム（1：9）2g および硫酸 20m*l* を，水銀法[2]（以下B法と記す）は酸化第二水銀 0.5g に硫酸カリウム 10g および硫酸 20m*l* を使用し，それぞれ透明に分解したのちさらに1時間加熱し試験溶液とした．また，アミノ酸の場合とくに味の素アミノ酸規格分析法[3]（以下D法と記す）として分解促進剤に硫酸銅・硫酸カリウム（1：10）5.5g（リジンおよびトリプトファンの場合はさらに酸化セレン 0.2g を用いる）および硫酸 20m*l* を使用し透明に分解したのちさらにアルギニンは6時間，グルタミン酸は3時間，ヒスチジンは5時間，リジンは7時間，トリプトファンは5時間加熱し試験溶液とした．

過酸化水素法[4,5]（以下C法と記す）　窒素として約 30mg に相当する試料を 300m*l* のケルダールフラスコ中に精密にはかりとり，これに硫酸 20m*l* を加えてあらかじめ 250～280° に設定したマントルヒーター内におき，ときどき振りまぜながら試料を炭化する．

いったんフラスコを冷却したのち 100m*l* 滴下ロートより 30% 過酸化水素水を約 10m*l* 加えて再びマントルヒーター内におき加熱する．つづいて滴下ロートから過酸化水素を 1 min 当り 1.5m*l* の割合で約 70m*l* を連続的に滴下しさらにこの溶液を1時間加熱し試験溶液とする．

たんぱく質換算係数は FAO 提唱による数値を適用し，粉末チーズ 6.38，きなこ 5.71，小麦粉 5.70，精白米 5.95，その他は 6.25 を用いた．

結果および考察

食品測定法別たんぱく質測定値ならびに各アミノ酸測定法別窒素測定値を，それぞれ表1および表2に示した．測定法の違いによる各測定値のバラツキを推測統計的に調べるためウエルヒの差の検定に基づいて有意性を判定した．

食品の場合は，5%以下（2%～5%）の危険率で差が有意であったものは，粉末チーズのA法とB法，かまぼこのA法とC法，精白米のB法とC法とである．また，10%以下（5%～10%）という低い信頼度ではあ

* 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 各食品測定法別たんぱく質測定値 (%) (n=4)

品名		測定法 A ($CuSO_4$ 法)	B (HgO 法)	C (H_2O_2 法)
粉末チーズ	M	47.90	49.08	48.87
	S.D.	0.56	0.34	0.82
	C.V.	0.0118	0.0070	0.0167
きなこ	M	36.77	37.44	36.98
	S.D.	0.59	0.10	0.47
	C.V.	0.0160	0.0026	0.0127
かまぼこ	M	11.43	11.21	10.69
	S.D.	0.33	0.32	0.16
	C.V.	0.0292	0.0289	0.0152
小麦粉	M	8.23	8.19	8.15
	S.D.	0.06	0.50	0.15
	C.V.	0.0072	0.0613	0.0181
甘納豆	M	6.62	6.74	6.71
	S.D.	0.07	0.05	0.12
	C.V.	0.0106	0.0076	0.0178
精白米	M	5.67	5.79	5.53
	S.D.	0.14	0.11	0.12
	C.V.	0.0240	0.0184	0.0215

註：M…平均値，S.D.…標準偏差，C.V.…変動係数

表 2 各アミノ酸測定法別窒素測定値 (%) (n=3)

品名		測定法 A ($CuSO_4$ 法)	B (HgO 法)	C (H_2O_2 法)	D (標準法)
アルギニン	M	30.49	30.44	30.49	30.54
	S.D.	0	0.18	0	0.07
	C.V.	0	0.0059	0	0.0024
グルタミン酸	M	9.44	9.35	9.45	9.40
	S.D.	0.03	0.08	0.01	0.03
	C.V.	0.003	0.0084	0.0015	0.0037
ヒスチジン	M	28.52	28.24	27.25	27.42
	S.D.	0.18	0.75	0.11	0.23
	C.V.	0.0063	0.0267	0.0042	0.0086
リジン	M	17.41	18.42	17.03	17.32
	S.D.	0.16	0.10	0.47	0.17
	C.V.	0.0093	0.0053	0.0275	0.0101
トリプトファン	M	12.70	14.06	11.26	13.61
	S.D.	0.07	0.32	0.38	0.16
	C.V.	0.0055	0.0227	0.0338	0.0118

註：M…平均値，S.D.…標準偏差，C.V.…変動係数

るが差が有意であったものは，甘納豆のA法とB法である．なお，粉末チーズに有意差が認められたことは牛乳の場合のB法値＞A法値と一致する[5]．

さらに，食品によってはC法が低く出ることがあるが，低く測定される方法であると断定するのはこれだけの実験例では不足である．また，A法値とC法値に有意差（5%水準）があるとされるのはかまぼこだけであって，魚肉ねり製品についてはさらに検討が必要である．

結晶アミノ酸5種類を用いた窒素含有量の分析例において4種の測定法を比較したとき，過酸化水素法値はアルギニンおよびグルタミン酸の場合は1％以下の危険率で他の3法値と有意差があるとはいえず，ヒスチジンにおいては理論的窒素含有量とほぼ一致し，D法値と差があるとはいえず，リジンにおいても同様であるが，トリプトファンにおいてはC法値はやや低い．トリプトファンの場合4測定法値間のそれぞれの差は大きい．

アルギニン（塩酸溶液）の分解のさいB法で長頸フラスコの頸部に結晶性の昇華物質が付着した．この物質を分析したところ昇汞であることが認められた．このことから，分析上の注意事項として，塩酸あるいは食塩などを多量に含む試料を酸化水銀を触媒として分解するさいに昇汞の生成があり，これは分解フラスコの頸部が低温である場合この部分に付着するが，高温となるとフラスコ外に出ることになる．したがって水銀法の場合ドラフトの換気をよくする必要がある．

C法の場合，分液ロートから過酸化水素水を滴下するのでドラフトが広くないといけない．また，1回に測定される数が制限される．

まとめ

各種の衛生試験検査を行なった場合，その廃棄物を合理的に処理しないとこれらが環境汚染の原因となる．これをさけるために重金属類にかわって過酸化水素を用いるたんぱく質測定のためのケルダール法を試みたところ，粉末チーズ，きなこ，小麦粉，甘納豆，精白米のいずれの食品でも常用されている硫酸銅法と測定値に差があるとはいえなかった．ただし，かまぼこについては低値であった．

含窒素有機化合物の窒素含有量測定のためにアミノ酸5種について検討したところ過酸化水素法値が低いものとしてトリプトファンがあり，このことから，窒素の位置によっては過酸化水素法を用いることに注意が必要である．

文献

1) 日本薬学会編：衛生試験法注解，1973，金原出版
2) IDF Standard 20：1962
3) 味の素株式会社：アミノ酸規格，1965
4) 野口・平山ら：油化学 23，156，1974
5) JIS-K 3370，1973，4.7.2 銅定量法

東京衛研年報　*Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 213—218, 1976

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II報）
コプロポルフィリンの尿中排泄の実態

小笠原　公*, 武士俣　邦　雄*, 霜　田　さと子*

Investigations and Biochemical Studies on the Porphyrin Metabolites (II)
Urinary Coproporphyrin Excretion of Tokyoites

KIMI OGASAWARA*, KUNIO BUSHIMATA* and SATOKO SHIMODA*

コプロポルフィリン（以下 Cp と略す）は鉛障害[1-5]ばかりでなく，各種貧血症[6]，肝臓疾患[7,8]でも尿中に異常に排泄される．尿中排泄 Cp 量から各種の公害による健康障害の有無の推定をするためには，住民の有病性の調査と同時に，尿中排泄 Cp 量はどのような水準にあるかの現状を把握しておくことが保健対策上重要であり，また今後大気汚染その他各種の公害等について環境改善の評価ができる資料としても価値あるものと考える．

そこでポルフィリン代謝系成分のうち，東京都の主要道路近辺に居住する住民を対象として，δ-アミノレブリン酸の尿中排泄実態について得られた成果をすでに報告[9]した．今回は尿中排泄 Cp について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尿中排泄 Cp 水準の実態，尿成分の異常出現との関連ならびに季節による尿中排泄差異について検討を行った．

Cp の尿中異常排泄は特殊な作業環境下での高濃度鉛暴露と関係[10,11]が深いが，通常の生活環境のように大気中鉛濃度が低く，低濃度の人体鉛汚染では相互関係が明確でない．早期に鉛害をスクリーニングできる Cp の尿中異常排泄水準の解明資料とするためにも，尿中排泄鉛ならびに血液中鉛との量的相互関係について検討したので報告する．

調査方法

1. 調査期間と検査対象

昭和46年9月～51年3月を調査期間とした．検査対象者は東京都の主要道路近辺に居住する35保健所管区内住民のうち，鉛害検診あるいは公害検診の受診を希望する18歳～70歳代の男691名・女913名である．このうちには小学生男女19名，中学生男女296名と18歳未満者が少数含まれる．なお尿中排泄 Cp を測定したもののうちには尿成分定性試験を行えなかった例（男女54名）も含まれる．

尿中排泄 Cp の年代別正常値，居住地域別の水準差，季節による尿中排泄差異さらには有病性との関係等の吟味を容易にするために，小中学生等の若年層および尿成分定性試験をあわせて行い得なかった例については本調査対象からあらかじめ除外した．したがって本報告の調査対象人員は年次別に46年　男136名・女226名，47年男255名・女493名，48年　男83名・女42名の31保健所管区内住民男474名・女761名計1,235名である．

2. 検査および測定方法

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．

尿ウロビリノーゲン，タンパクおよび糖定性試験：第I報と同じ方法[7,9]

尿中排泄 Cp 量測定：著者らが開発したエーテル抽出による微量けい光法[12]

検査成績および考察

1. 尿中排泄 Cp の正常値について

尿中排泄 Cp の正常値は表1に示すごとく男 64.8±35.3μg/*l*，女 58.6±33.0μg/*l* であり，男がやや高値であって性差がみられた．

尿中排泄 Cp 量測定は昭和46年9月～48年2月に男474名・女761名について行ったのであるが，この全例について尿ウロビリノーゲン，タンパクおよび糖定性試験を行い，尿中排泄 Cp 測定数から男139例（29.3%）・女175例（23.0%）の異常陽性者を除外した．さらに前報[9]に述べた推計統計手法にしたがって，男11例

* 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

(3.3%)・女17例 (2.9%) の異常値削除を行った男324例・女569例につき性別に正常値を定めたものである.

すべての調査対象者の尿中排泄 Cp 平均値は男 81.9±56.3μg/l・女 69.7±46.2μg/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, さきに述べた正常値との差の検定によって有意に差が認められる. また尿ウロビリノーゲン, タンパクおよび糖3成分すべての尿定性試験異常陽性者の尿中排泄 Cp 平均値は男 108.9±65.6μg/l・女 92.8±52.3μg/l であり, 正常値より高値であった. またさらに全例から統計処理によって異常値削除 (男36例7.6%・女36例4.7%) をして得られた尿中排泄 Cp 平均値は男 67.7±32.9μg/l・女 61.3±32.1μg/l であって, 尿定性試験異常陽性例を含むこの値でも正常値と比較すると高値である. このことは尿成分異常陽性者が関与して尿中排泄 Cp 平均値が高値を示したことになるので, 正常値を定めるにはあらかじめ尿成分異常陽性のデータは除外するのが当然である. したがってウロビリノーゲン, タンパクおよび糖の尿中異常出現によって推察する有病性との関係から Cp の尿中排泄を吟味する必要がある. これに関しては次報に述べたい.

前述した尿中排泄 Cp 正常値の決定は, 約3年間にわたる測定データを一括処理して得たものである. 調査期間を単年ごととしなかった理由としては, 年次ごとの検査数を調査全例に対する年次別検数比としてあらわすと, 46年 男28.7%・女29.4%, 47年 男53.8%・女64.8%, 48年 男17.5%・女5.8% となり, 年次別に検査数のかたよりがある. したがって単年別に尿中排泄 Cp の年齢別正常値, 居住地域別水準差および季節による変動を考察することは正確性を欠くおそれがあるためである.

東京都住民の尿中排泄 δ-アミノレブリン酸値に関しては, 大阪市民または名古屋市民について報告[13,14]されている値に比較し, やや高い水準であることをすでに報告[9]したのであるが, 尿中排泄 Cp 値は他府県住民のそれと比較してどのような水準であろうか. 1965年に報告[13]された大阪市民330名の平均値 45μg/l, 1973年に報告[14]された名古屋市民および東海市民232名の平均値 23.5～48.5μg/l に比較し, 東京都住民の尿中排泄 Cp 値はやや高水準である. このほか尿中排泄 Cp 値についての報告が散見される. すなわち松本久男[4]による 50～70μg/l, Nakao[15] による 70±40μg/l, 田口徹也ら[16]による男 73.3±35.4μg/l・女 44.1±21.3μg/l などに比較すると近似した値であった. しかしそのいずれも対象例が少ないこと, 対象者が特殊であること, 尿中排泄 Cp 測定法の差異さらにその平均値の算出方法が不明確であることのために安易な比較には問題がある.

尿中排泄 Cp 測定法は多種の方法[17-20]があるがその測定精度に疑問点が多く, すぐれた測定法がいまだ確立されていない. われわれは昭和45年5月新宿区牛込柳町における鉛害問題の提起以来, 一般住民の鉛害の有無を解明するためポルフィリン代謝系成分に関する調査研究を行ってきた. 当初は尿中排泄 Cp の定性検査を行っていたのであるが, この定量の必要性を認識し, 従来の測定法よりも精度のよい方法に改善を図り, 満足できる成績を得ている.

表1 性別および年齢別の尿中排泄コプロポルフィリン正常値

年齢	性別	測定数	尿定性検査異常陽性数	異常値棄却数	正常値 (μg/l)	全例の正常値に対する差の検定
—19	男	6	2	0	62.6±26.0	
	女	0	0	0		
20—	男	63	22	2	74.2±34.6	
	女	50	16	1	61.8±32.3	
30—	男	72	24	2	73.7±33.4	
	女	198	36	6	58.7±32.0	
40—	男	94	20	1	69.9±35.4	
	女	193	46	4	56.9±33.6	
50—	男	95	24	5	66.3±39.3	
	女	178	31	3	59.8±33.3	
60—	男	108	35	1	50.4±27.9	P<0.001
	女	113	37	2	57.5±34.5	
70—	男	36	12	0	56.1±34.3	
	女	29	9	1	59.6±29.9	
全例	男	474	139	11	64.8±35.3	
	女	761	175	17	58.6±33.0	

尿中に排泄されるCp量に年齢による差があるか否かの検討をした．10歳間隔で表現した各年代層ごとに尿定性試験異常陽性者と，性別に統計的異常値棄却を行い，表1に示すように年代層ごとの正常値を算定した．全例から得られた性別の正常値と各年代層ごとの尿中排泄Cp値について，性別に差の検定を行ったところ，男では60歳代が有意に低値であった．この値に対し20～40歳代は有意に差があり高値であった．しかし女では各年代層とも近似の値であった．すなわち男では高齢にしたがい低値となる傾向であり，性別にみて若年代では男が女より高値であり，性差ならびに年代差があった．20歳未満者は検査数が僅少のため今後の調査としたい．小中学生の低年齢層については現在調査中であるが，このうち中学生の尿中Cp値に関し本号で別に報告[21]をする．

2. 居住地域ごとの住民尿中排泄Cp量

居住地域ごとに住民の尿中排泄Cp量の差異の有無を検討することは，大気汚染または地域特有の公害の人体影響を検索するのに重要である．東京都地域区分は第Ⅰ報同様に広場と青空の東京構想による10地域区分[22]とした．調査対象全例から統計的異常値の削除を行って得られた居住地域ごとの住民尿中排泄Cp測定結果を表2に示す．なお統計棄却データのうち，鉛中毒認定基準値[23]を越す例が男に16例，女に2例あったが，いずれも尿中排泄鉛量は20μg/l以下であった。

男女別に全例から得られた尿中排泄Cp正常値と各地域住民の尿中排泄Cp平均値との差の検定を行ったところ，男についてみると多摩郊外Ⅱ・城西および山手地域に有意差が認められ，高水準であった．女についてみると城西・山手および下町地域が有意に高水準であった．これらの地域とは逆に男の場合には城東地域が有意に低水準であって，尿中排泄Cp平均値が高い城西地域の値に比較すると多摩近郊・城北・下町および都心地域は低水準であった．女の場合には都心地域が有意に低水準であり，尿中排泄Cp平均値が高い下町地域の値に比較すると多摩郊外Ⅱ・城東および城南地域はやや低い水準であった．以上述べたようにCpの尿中排泄は地域別にみて男女かならずしも一致した出現傾向を示さなかった．

居住地域によって尿中排泄Cp水準に差がみられたことは気中鉛あるいはほかの化学物質の大気汚染による人体影響があったためか，Cpの尿中排泄をもたらす地域特有の因果関係があるのか，また被調査者の年齢構成あるいは尿中排泄Cp測定実施季節の差異さらには被調査者の有病性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排泄Cpの量的相互関係の項に述べるように，東京都住民の尿中排泄鉛量ならびに血液中鉛量ともに低値であり，鉛中毒を生ぜしめるほどの危険量ではなかった．鉛量が低水準である東京都住民の尿中排泄Cp値との相互関係を吟味してみると，相関係数がきわめて小さくまた尿中排泄鉛および血液中鉛の増量区分にしたがったCpの尿中排泄増加関係が成立しない．さらに労基法施行規則に定める尿中Cp値150μg/l以上のものは少数であったことなどから考察して，Cpの尿中排泄水準に地域差が認められたことは，これが気中鉛による人体影響とは考えられない．

つぎに鉛以外の物質による大気汚染程度との関係について考察してみる．東京都大気汚染観測データ[24]，公害研究所[25]および衛生研究所環境保健部[26]の調査資料によると城北・下町・都心・城南地域は空中降下ばいじんならびに亜硫酸ガス等による大気汚染程度が強い．文京・新宿・渋谷・江東・千代田・港・品川および大田の8区は複合大気汚染物質の人体影響（気管支ゼンソク・肺気シュ・ゼンソク性気管支炎・慢性気管支炎等4疾病の慢性気管支炎様症状）として公害健康被害補償法にもとづいて，昭和49年11月補償区域に指定された．その後板橋・荒川・北・足立・目黒・豊島・葛飾・江戸川・墨田・台東・中央の11区が加えられたのであるが，これらの地域は第Ⅰ報で報告したように尿中排泄δ-アミノレブリン酸水準とは関連がみられた．しかし尿中排泄Cp水準について地域の関連をみると，その尿中排泄水準が有意に高い城西・山手地域は大気汚染度が低く，Cpの尿中排泄水準が有意に低い城東・都心地域は大気汚染度が高く，Cpの尿中排泄はδ-アミノレブリン酸の尿中排泄とはやや異なった実態であった．したがってその尿中排泄は大気汚染との関連以外に地域住民の生活環境，調査季節さらに有病性との関係があろう．

前項で尿中排泄Cp値は若年代が高値であることを述べた．尿中排泄Cp値が高水準であった地域の被調査者年齢とそれが低水準であった地域住民の平均年齢について吟味したところ，概して年齢構成のかたよりはなかった．

季節の違いによるCpの尿中排泄差異については次項に述べることとするが，Cpはδ-アミノレブリン酸とやや異なり夏季のほか冬季にも多く尿中に排泄される．そのため地域別のCp尿中排泄水準の比較検討には調査季節を考慮しなければならない．そこで尿中排泄Cp値が高水準または低水準であった地域について，調査を行った季節のかたよりの有無をしらべたところ，多摩郊外Ⅱおよび城東地域のみがともに1保健所管区住民

表 2 居住地域ごとの住民尿中排泄コプロポルフィリン平均値および尿成分異常陽性率

居住地域	性別	検査数	異常値棄却数	尿定性異常陽性率 (%)	コプロポルフィリン平均値 (μg/l)	全例の正常値に対する差の検定
多摩郊外II	男	16	0	31.3	89.1±35.4	P<0.01
	女	14	0	7.1	51.5±23.7	
多摩近郊	男	28	2	15.4	60.8±25.5	
	女	105	9	17.7	63.1±33.4	
城西	男	82	7	24.0	88.8±39.1	P<0.001
	女	105	6	18.1	64.3±37.2	P<0.05
山手	男	88	6	28.1	75.4±40.0	P<0.02
	女	90	0	11.1	70.5±36.8	P<0.001
城北	男	91	4	28.7	61.7±32.1	
	女	116	3	25.7	62.2±31.4	
城東	男	23	1	22.7	48.1±27.7	P<0.01
	女	22	2	20.0	54.6±23.6	
下町	男	48	4	31.8	58.6±37.0	
	女	73	3	31.4	75.1±42.8	P<0.001
都心	男	28	4	12.5	55.5±27.0	
	女	75	2	28.8	51.6±28.1	P<0.05
城南	男	70	8	27.4	71.5±31.9	
	女	116	11	24.8	59.8±32.3	
全例	男	474	36	26.0	64.8±35.3	
	女	761	36	21.5	58.6±33.0	

について，2月と10月にそれぞれ1回の測定であった．これらの地域以外では夏冬ほぼ同数の例数であり，季節のかたよりの問題はなかった．

つぎに Cp の尿中排泄水準に地域差があったことに対する検討として，被調査者の有病性を推察する尿成分定性試験を行い，尿ウロビリノーゲン，タンパクおよび糖を含めた異常陽性率との関連について吟味した．表2に示したように男についてみると，尿中排泄 Cp 水準が高い多摩郊外II・城西・山手地域とその値が平均的水準であった城北・城南地域では尿成分異常陽性率が高率であり，異常陽性率が高率であるのに尿中排泄 Cp 水準が低かった下町地域のみ両成分が不一致であったことから，それらは相互に関連があるようにも思われる．女についてみると尿中排泄 Cp 平均値が高い城西・山手・下町地域のうち下町地域のみが尿成分異常陽性率が高く，また尿中 Cp 値が低水準の都心では逆に異常陽性率が高率であって，男の場合とは異なった関係であった．このことについては尿ウロビリノーゲン，タンパクおよび糖それぞれの陽性率との関係を吟味したうえで考察をする必要がある．

3. 季節による Cp 尿中排泄差異

尿は抗利尿ホルモンバソプレシンの調節をうけて生理的に希釈や濃縮をおこす．尿中排泄 Cp に関する調査は年間を通して毎月行ったので，季節によるその尿中排泄量に変動があるか否かの検討をする必要がある．そこで調査月ごとにデータを集計し，統計削除を行ったのち各月の尿中排泄水準の比較検討を行った．結果を表3に示すが，性別に全例から得られた尿中排泄 Cp 正常値に対し，各月の尿中排泄 Cp 平均値との差の検定を行ったところ，男女とも7月・9月および2月が有意に高値であった．8月については測定数が少ないために有意性が得られなかったが，7月と9月が有意に高水準であることから考えると8月も高水準であると推察するのが至当であろう．5月・10月は有意に低水準であり，他の月は年間平均値に近似した水準であった．すなわち Cp の尿中排泄量には季節変動があり，7月と10月のその平均値の差は男 46.2μg/l・女 40.2μg/l であった．したがって尿中排泄 Cp 量を指標とする諸検診の実施は年間平均水準である春秋に行われるのが望ましい．

4. 尿中排泄鉛量および血液中鉛量と尿中排泄 Cp 量の関係

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（男233名・女286名）・血液中鉛量（男505名・女734名）と尿中排泄 Cp 量を測定し，それらの量的相関関係をしらべた．その結果東京都住民の尿中排泄鉛平均値は男 6.5μg/l・女 5.9μg/l，血液中鉛平均値は男 10.8μg/100g・女 7.9μg/100g であって，神奈川県警察官[27]の尿中排泄鉛量 17μg/l・血液中鉛量 17μg/100g に比較し低値であった．尿中排泄 Cp 量測定は鉛害検診指標と

表 3　季節による尿中排泄コプロポルフィリン量の変動

月	性別	検査数	異常値棄却数	平均値 (μg/l)	全例正常値に対する差の検定
5	男	61	5	55.6±29.4	P＜0.05
	女	72	5	60.5±27.9	
6	男	21	1	78.0±29.0	
	女	38	0	63.4±32.4	
7	男	19	2	96.2±48.8	P＜0.05
	女	57	3	97.9±44.7	P＜0.001
8	男	4	0	62.9±25.9	
	女	19	1	67.7±32.9	
9	男	67	4	78.9±40.8	P＜0.02
	女	172	7	65.6±37.4	P＜0.05
10	男	85	7	50.0±30.8	P＜0.001
	女	131	6	47.7±25.6	P＜0.001
11	男	43	2	66.0±33.6	
	女	100	8	57.1±30.7	
12	男	44	2	73.1±37.2	
	女	45	1	65.4±33.0	
1	男	18	3	74.6±32.7	
	女	17	1	61.5±40.1	
2	男	94	7	87.9±40.4	P＜0.001
	女	70	4	78.0±37.0	P＜0.01
3	男	18	3	67.1±30.2	
	女	40	0	58.3±32.9	

して行われるが，人体鉛量が低水準での相互関係が明らかでない．そこで鉛の尿中排泄量および血液中鉛量の増量にしたがった Cp の尿中排泄増加関係が成立するか否かをしらべるため，第Ⅰ報で報告[9]した検討方法と同様に，尿中排泄鉛量および血液中鉛量を全例鉛群，平均値以上の鉛群，統計棄却上限値以上の鉛群の3群に量的区分をして，それぞれの尿中排泄 Cp 値を対比させて相関係数を算出した．その結果それら鉛量区分の増量とは逆に男女とも小さい係数となった[28,29]．

以上述べたように東京都住民の尿中排泄鉛量ならびに血液中鉛量は低値であり，このように低濃度鉛汚染の範囲では，鉛量に応じた Cp の尿中排泄関係は認められない．東京都はすでに住民に対する鉛害はなかったことを発表[30]したが，このたび環境庁において東京都をはじめ全国主要都市の気中鉛濃度と人体鉛汚染程度の関係をしらべ，鉛害の危惧はないことの発表がなされた．したがって住民尿中排泄 Cp 水準に居住地域別の有意差がみられた理由として，それが鉛汚染の影響とは考えられないので，複合大気汚染物質の影響，地域住民の生活環境の条件さらに有病性との関係について検討する必要がある．

結　論

昭和46年9月～51年3月の調査期間に，主として20歳以上の東京都住民男474名・女761名を対象として，尿中排泄 Cp 量の性別，年齢別，居住地域別水準および季節による変動をしらべ，さらに尿中排泄鉛量および血液中鉛量との相関関係をも検討した．

1) 尿中排泄 Cp 正常値は男 64.8±35.3μg/l・女 58.6±33.0μg/l であった．年齢による差異は男では高齢にしたがって低値になる傾向であるが，女では年齢による差がない．

2) 尿中排泄 Cp 水準に地域差があった．男女ともに城西・山手地域が高水準であり，このほかに男では多摩郊外Ⅱ地域，女では下町地域が高水準であった．

3) Cp の尿中排泄は夏季と冬季が高値となり，春秋では低値となる．

4) 東京都住民の尿中排泄鉛量および血液中鉛量は低値であった．これら鉛量が低水準では尿中排泄 Cp 量との相関関係は認められず，大気中鉛の人体汚染による鉛害は生じてないと考えられる．

謝辞　本調査研究に当り尿中排泄鉛および血液中鉛測定値応用の承諾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50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，北山孝允：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，14，1，56，1971
5) 三浦　創ほか：産業医学，14，4，17，1972
6) 高久史麿：血液・尿化学検査—その数値をどう読むか—日本臨床，364，180，1973
7) 金井　泉：臨床検査提要，20版，II-47，1691，金原出版，東京
8) 日本血液学会　日本血液学全書編輯委員会：日本血液学全書，6巻II，術式，891，1965，丸善，東京
9) 小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，26-1，246，1975
10) 山本丈夫，祐田泰延，青木　稔，高橋亮司：産業医学，12，5，10，1970
11) 和田　攻，矢野雄三，小野　哲，長橋　捷，豊川行平：日衛誌，29，143，1974
12) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，24，279，1972
13) Kasahara, A.: *Osaka City Medical J.*: 11, 99, 1965
14) 奥谷博俊ほか：産業医学，15，5，1973
15) Nakao, K., O. Wada, and Y. Yano: *Clinical. chem. Acta*, 19, 319, 1968
16) 田口徹也，鈴木庄亮，横橋五郎：産業医学，12，18，1970
17) Schwartz, S., L. Zieve, and C. Watson: *J. Clin. Med.*, 37, 843, 1951
18) Askevold, R.: *J. Clin. Lab. Invest.*, 3, 318, 1951
19) Rimington, C.: *Assoc. Clin. Path., Broadsheet.*, N.S., No. 21, 1958
20) 西川嶺九：公衆衛生集団検診法，214，1960，医歯薬出版，東京
21) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，27-1，223，1976
22) 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
23) 労働省労働基準局長通達：労働の科学，26，54，1971
24) 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
25) 東京都公害研究所：都公害研年報，4，63，1973
26) 佐藤泰仁ほか：東京衛研年報，26-1，265，1975
27) 東京都衛生局：鉛検診成績解析結果報告書，7，1972
28) 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
29) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，野牛　弘：東京衛研年報，25，321，1974
30) 東京都衛生局：公害研究資料，43，1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 219—222, 1976

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III報）
尿中異常陽性成分の出現と尿中排泄 δ-アミノレブリン酸の関係

小笠原　公*, 武士俣　邦　雄*, 霜　田　さと子*

Investigations and Biochemical Studies on the Porphyrin Metabolites (III)
Relationship between Appearance of Abnormal Urinary Components and Urinary δ-Aminolevulinic Acid

KIMI OGASAWARA*, KUNIO BUSHIMATA* and SATOKO SHIMODA*

加鉛ガソリンに基因する鉛害のみならず各種公害の人体におよぼす影響を解明する資料とするため，東京都の主要道路近辺に居住する住民について，δ-アミノレブリン酸（以下 δ-ALA と略す）・コプロポルフィリン（以下 Cp と略す）等ポルフィリン代謝系成分の尿中排泄実態を調査したところ，居住地域別にみてそれら成分の尿中排泄水準に差異があった．この差異を生じたことに対する考察として，鉛汚染の人体影響の有無に関する検討を行った．すなわち尿中排泄 δ-ALA および Cp を測定して尿中排泄鉛量・血液中鉛量測定値との相互関係を吟味した．その結果東京都住民のそれらの鉛量は低値であり，また尿中排泄 δ-ALA および Cp の量的相関関係も成立せず，通常の生活環境の鉛による人体汚染程度では直接的鉛障害はみられないことを明らかにした[1]．

またあわせて被調査者の有病性を推察する尿成分定性試験を行い，尿成分の異常出現と δ-ALA ならびに Cp の尿中排泄水準との関係につき検討したところ，尿ウロビリノーゲン，タンパクおよび糖3成分の異常出現が高率である地域が δ-ALA ならびに Cp の尿中排泄水準が高く，それらは関係深い結果であったことについても報告[1]した．

そこで今回はウロビリノーゲン，タンパク，糖それぞれの尿中異常出現がどのように δ-ALA の尿中排泄に関係しているかにつき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～51年3月を調査期間とし，東京都内主要道路近辺に居住する50保健所管区内住民のうち，鉛害あるいは公害検診の受診を希望する18歳～70歳代の男女を対象とした．

調査人員は尿中排泄 δ-ALA 測定を行ったもの男1,285名・女1,915名であるが，このうちに小学生と中学生が男170名・女145名含まれる．また少数であるが尿定性試験を行い得なかった例もあるのでこれらは除外した．したがって本報告の調査対象者は男1,102名・女1,755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．

尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖およびビリルビン定性試験：第I報と同じく常法[2]によった．

尿中排泄ウロビリノーゲン量測定：採尿当日に試料尿の還元操作を行い，約15時間後佐藤法[3,4]により測定した．

尿中排泄 δ-ALA 量測定：和田らの方法[5]の改善法[6]により測定した．

検査成績および考察

1. 尿成分異常出現と δ-ALA 尿中排泄の関係

尿定性試験にあわせて尿中排泄 δ-ALA 量を測定した調査対象者男1,102名・女1,755名について，スミルノフの棄却検定を行い男24例（2.2%）・女36例（2.1%）の異常値を削除して得られた尿中排泄 δ-ALA 平均値は，男 2.13±0.82mg/l・女 1.89±0.79mg/l であった．この例数には尿定性異常陽性者が含まれる．そこで全調査対象者からあらかじめ男317例（28.8%）・女370例（21.1%）の尿ウロビリノーゲン，タンパクおよび糖3成分の異常陽性者を除外したのち，統計棄却

* 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 尿成分異常陽性種目別の尿中排泄 δ-アミノレブリン酸平均値

種目	性別	測定総数	異常陽性数	異常陽性率 (%)	平均値 (mg/l)	全例の正常値に対する差の検定
ウロビリノーゲン	男		171	15.9	2.55±0.86	P<0.001
	女		171	10.0	2.46±0.70	P<0.001
タンパク	男		31	2.9	2.06±0.86	
	女		81	4.7	1.97±0.81	
糖	男		49	4.5	2.06±0.85	
	女		57	3.3	2.46±0.79	P<0.001
複種	男		52	4.8	2.77±0.93	P<0.001
	女		44	2.5	2.63±0.87	P<0.001
全例	男	1.102	317	28.8	2.01±0.77	
	女	1.755	370	21.1	1.78±0.74	

（男10例・女19例）を行って得られた尿中排泄 δ-ALA 平均値は男 2.01±0.77mg/l（775例）・女 1.78±0.74 mg/l（1,366例）であり，これを正常値とする．すなわち正常値と尿定性異常陽性者が含まれる例の尿中排泄 δ-ALA 平均値とを比較すると，わずかな差ではあるが異常陽性を含むものが高値であった．

つぎに尿定性異常陽性者全例から男14例・女17例の統計棄却を行った男303例・女353例について，尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖それぞれ異常陽性例ごとの尿中排泄 δ-ALA 平均値を算出してみた．その結果を表1に示す．尿成分異常陽性種目別の尿中排泄 δ-ALA 平均値をさきに述べた正常値に比較すると，尿ウロビリノーゲン異常陽性者および複種目成分異常陽性者（尿ウロビリノーゲンとタンパク，尿ウロビリノーゲンと糖，尿タンパクと糖および尿ウロビリノーゲンとタンパクと糖の同時異常陽性者）の平均値は有意に高値であった．尿タンパク陽性者の平均値は有意性が認められず差異がなかった．尿糖陽性者については男においては正常値に近似した値であったが，女では有意に高値であって性による差異があった．以上の結果から考察して，尿ウロビリノーゲン異常陽性者ならびに女の場合，尿糖陽性者が加わっている調査対象集団の尿中排泄 δ-ALA 平均値表現はいくらか高値に表わされていると考える．

2. 居住地域ごとの住民尿成分異常出現と δ-ALA 尿中排泄の関係

東京都民について δ-ALA の尿中排泄実態をしらべたところ，城北・城東・下町・都心ならびに城南地域は，多摩郊外Ⅱ・多摩郊外Ⅰ・多摩近郊および山手地域に比較して有意に高水準であった．尿中排泄 δ-ALA 平均値が比較的高水準であった地域は，尿ウロビリノーゲン，タンパクおよび糖3成分を含めた異常出現が高率であり，それらの成分の尿中排泄にはお互に関連が考えられることをすでに報告[1]した．

居住地域ごとの δ-ALA 尿中排泄水準の比較検討に関する調査対象例は，統計処理法にしたがい異常値棄却のみを行ったものである．したがって尿成分異常陽性者を含んでいる．そこで今回はウロビリノーゲン，タンパクならびに糖それぞれの尿中異常出現からみた δ-ALA の尿中排泄水準の関係について検討を行った．

結果を表2に示す．まず尿ウロビリノーゲン異常出現について検討すると，表1で示した統計棄却後の全調査対象例に対する異常陽性率男15.9%・女10.0%に比較して，男女とも城北・下町・都心ならびに城南地域が高率の出現であって，δ-ALA の尿中排泄水準も高い．城東地域の尿ウロビリノーゲン異常陽性率は低率であったが，女の場合に尿ウロビリノーゲンを含む複種成分出現率が高率である．またこれら以外の地域は尿成分の異常出現が低率であり，尿中排泄 δ-ALA 平均値も低い水準であって，尿ウロビリノーゲンの異常出現と δ-ALA の尿中排泄は関係深い結果であった．

尿タンパクおよび尿糖は男女かならずしも合致しないが城北・城東・下町・都心ならびに城南地域に高率に出現している．しかし前項で述べたように尿タンパク出現および男のみについて尿糖の出現は，δ-ALA の尿中排泄におよぼす影響がないこと，また尿ウロビリノーゲンのように高率な出現ではないことのために，尿ウロビリノーゲン異常出現ほど δ-ALA 尿中排泄水準に影響を与えているとは考えられない．

ウロビリノーゲンは真の有病者でなくても尿中に異常出現することがある．したがってこの成分の検査は肝臓機能状態を知る検査である．しかし肝臓疾患ではそれが比較的強い陽性を示す．そこで尿ウロビリノーゲンが異常陽性であったもののうち，強陽性出現者のみについて吟味したところ，調査全例に対する強陽性率男5.7%（60例）・女2.0%（34例）に比較し，地域別に男女まちまちの出現であり，尿中排泄 δ-ALA 平均値が低水準

表 2　居住地域ごとの住民尿成分種目別異常陽性率
（尿中排泄 δ-アミノレブリン酸量を測定したもの）

居住地域	性別	検査数	ウロビリノーゲン 異常陽性 (%)	ウロビリノーゲン 強陽性 (%)	タンパク (%)	糖 (%)	複種 (%)
多摩郊外Ⅱ	男	127	15.8	10.3	2.3	4.7	2.3
	女	154	7.2	1.3	3.2	1.3	1.3
多摩郊外Ⅰ	男	55	10.8	1.8	3.6	3.6	5.4
	女	66	7.6	1.5	3.0	4.5	0
多摩近郊	男	65	18.5	6.2	0	3.1	10.8
	女	139	12.2	2.1	5.8	2.9	2.9
城西	男	151	14.5	4.6	2.0	2.6	2.6
	女	421	8.2	2.4	3.5	2.5	1.7
山手	男	140	13.6	7.9	2.9	3.6	5.0
	女	233	7.6	0.4	3.4	1.2	0.4
城北	男	109	17.3	2.7	3.6	5.5	4.5
	女	145	13.2	1.4	7.0	2.0	2.7
城東	男	131	6.8	0	4.6	1.5	2.3
	女	162	6.2	0	6.2	4.3	4.9
下町	男	142	21.0	8.4	2.1	9.8	7.7
	女	144	15.4	2.1	7.7	7.7	2.8
都心	男	51	18.0	8.0	4.0	8.0	4.0
	女	94	19.1	9.5	5.3	2.2	4.2
城南	男	107	23.3	4.7	3.7	3.7	6.5
	女	161	10.5	1.9	4.3	6.2	6.2
全例	男	1,078	15.9	5.7	2.9	4.5	4.8
	女	1,719	10.0	2.0	4.7	3.3	2.5

表 3　尿成分異常陽性者除去後の居住地域ごとの住民尿中 δ-アミノレブリン酸平均値

居住地域	性別	測定数	平均値 (mg/l)	全例の正常値に対する差の検定
多摩郊外Ⅱ	男	95	1.83±0.84	P<0.05
	女	134	1.50±0.73	P<0.001
多摩郊外Ⅰ	男	42	1.67±0.56	P<0.001
	女	56	1.52±0.75	P<0.05
多摩近郊	男	44	1.93±0.72	
	女	106	1.54±0.69	P<0.001
城西	男	118	1.84±0.79	P<0.05
	女	354	1.76±0.76	
山手	男	105	1.66±0.66	P<0.001
	女	203	1.69±0.59	P<0.05
城北	男	75	2.05±0.79	
	女	109	1.89±0.77	
城東	男	111	2.14±0.83	P<0.02
	女	127	2.16±0.84	P<0.001
下町	男	84	2.39±0.88	P<0.001
	女	96	2.13±0.81	P<0.001
都心	男	34	2.42±0.74	P<0.01
	女	64	1.79±0.71	
城南	男	67	2.21±0.89	
	女	117	1.86±0.71	
全例	男	775	2.01±0.77	
	女	1,366	1.78±0.74	

である地域でも高率に出現していることから考察して，δ-ALA の尿中排泄水準に地域差があったことは肝臓疾患に起因することではなく，肝臓機能の乱れと関係があると考える．

表3に調査対象全例から男303例（28.1%）・女353例（20.5%）の尿ウロビリノーゲン，タンパクならびに糖異常陽性者を除外したのち，さらに統計棄却を行って得られた地域別の尿中排泄 δ-ALA 平均値を示した．全例の尿中排泄 δ-ALA 正常値男 2.01±0.77mg/l・女 1.78±0.74mg/l に比較して，尿成分異常陽性者が含まれる場合は城北・城東・下町・都心ならびに城南地域の尿中排泄 δ-ALA 平均値が高水準であったものが，尿成分異常陽性者を除外したのち，その地域の平均値について差の検定をしてみると，男について下町・都心地域，女では城東・下町地域だけ有意（$P<0.01\sim0.001$）に高水準を示したのみとなった．このことは尿ウロビリノーゲンおよびこの成分を含む複種成分の異常出現と δ-ALA の尿中排泄とは関係があることになる．

報告[7,8]によると δ-ALA 合成酵素は肝細胞で合成されるし，δ-ALA は肝臓疾患でも尿中に排泄する報告[9,10]があり，とくに黄疸をともなうものに排泄増加が著明であるといわれている．しかし城東地域のように住民尿中ウロビリノーゲン異常陽性率が低率であっても，δ-ALA の尿中排泄平均値の水準が高いところもあったことから考えて，ウロビリノーゲンの尿中異常出現と δ-ALA の尿中排泄とは関係があるにしてもそれが強いとはいいきれない結果であった．われわれは尿ウロビリノーゲン定量も行っている．この値と尿中排泄 δ-ALA 値との相関係数を算出してみると男0.4211（535例）・女0.5460（805例）であり，比較的低い相関度であることを報告[11]している．さらに肝臓疾患との関連を検討するため，肝臓機能障害者にともないやすい尿ウロビリノーゲン強陽性を示した例のみについて尿中排泄 δ-ALA 平均値を算出してみた．その結果は男 2.67±0.95mg/l（60例）・女 2.36±0.68mg/l（34例）であった．この値を表1の尿ウロビリノーゲン異常陽性例の尿中排泄 δ-ALA 平均値と比較すると大差がなかった．尿ウロビリノーゲン定性と定量値はかならずしも一致しないので今後さらに検討の余地がある．尿ウロビリノーゲン強陽性例について尿ビリルビン定性試験を行ったが，尿ビリルビン陽性者はなかった．

結　論

昭和46年5月～51年3月の調査期間に，主として20歳以上の東京都住民男1,102名・女1,755名について，尿ウロビリノーゲン，タンパクならびに糖定性試験と尿中排泄 δ-ALA 量の測定を行い，それらの成分の尿中異常出現と δ-ALA の尿中排泄の関係につき検討した．

1) 尿ウロビリノーゲンおよび尿ウロビリノーゲンを含む複種目成分異常陽性者の尿中排泄 δ-ALA 平均値は，尿成分異常陽性者を除外して得た尿中排泄 δ-ALA 正常値に比較して，男女とも有意に高値であった．したがって尿ウロビリノーゲン異常陽性者が含まれる調査対象例の尿中排泄 δ-ALA 平均値はやや高値に表現されることになる．また尿ウロビリノーゲン強陽性者のみの尿中排泄 δ-ALA 平均値は，尿ウロビリノーゲン異常陽性者の平均値に近似した値であって，特別に高水準とはならない．

2) 尿タンパク陽性者の尿中排泄 δ-ALA 平均値は正常値に対し，有意差がない．

3) 尿糖陽性者の尿中排泄 δ-ALA 平均値は，女のみ正常値に対して有意に高値であり，尿糖陽性者を含む調査対象例のその平均値はいくらか高値に表現される．

4) δ-ALA の尿中排泄水準が比較的高水準である城北・城東・下町・都心ならびに城南地域住民から尿定性異常陽性者を除くと，都心以外のそれらの地域では住民尿中排泄 δ-ALA 平均値が低水準となった．これらの地域は住民尿ウロビリノーゲン異常陽性出現が高率であったことから，δ-ALA の尿中排泄は肝臓機能異常でも生じることがわかった．

（本研究は昭和50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) 小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，26-1，246，1975：27-1，213，1976
2) 金井　泉：臨床検査提要，20版，1961，金原出版
3) 陳　敏馨：臨床検査，6，497，1962
4) 陳　敏馨：臨床病理，11，207，1963
5) Wada, O. *et. al.*: *British J. Ind.*, 26, 240, 1969
6) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，24，303，1972
7) 菊地吾郎：蛋白　核酸　酵素，20，8，69，1975
8) Hayashi, N., B. Yoda, and G. Kikuchi: *Arch. Biochem. Biophys.*, 131, 83, 1969
9) 日本血液学会　日本血液学全書編輯委員会：日本血液学全書，6-II，術式，894，1965，丸善，東京
10) 松山史郎：慶応医学，37，1195，1960
11) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，26-1，252，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 223—228, 1976

中学生を対象とした尿中ポルフィリン代謝系成分の地域的比較検討

武士俣 邦 雄*, 霜 田 さと子*, 小 笠 原 公*

Examination of Regional Difference in the Levels of Urinary Porphyrin Metabolites between Two Groups of Junior High School Pupils

KUNIO BUSHIMATA*, SATOKO SHIMODA* and KIMI OGASAWARA*

Comparative studies were made on the two junior high school pupils, for the assessment of influence by their environmental conditions, on the amounts of lead in their blood and of porphyrin metabolites in urine of their day's first discharge. The two groups of pupils subjected in this study were a total of 296 individuals, one from Katsushika ward Niijuku junior high school (N-school) as a representative of the industrial area, and the other from Hino city Nanao junior high school (H-school) of the rural residential area of Tokyo.

In average, amounts of lead detected from blood in N-school pupils were 9.65±2.71 μg/100g in boy and 7.64±1.73μg/100g in girl, while the ones in H-school pupils were 7.90±2.37μg/100g in boy and 5.13±1.29μg/100g in girl. It is indicating that the specimens from the industrial area showed significantly higher levels of lead in their blood than those from the rural residential area ($P<0.001$). However, no significant difference was observed between these two groups on the detected amounts of δ-aminolevulinic acid in urine. As for the levels of coproporphyrin in urine, they were significantly higher in H-school pupils than in N-school ones, especially in boy, although the higher levels of lead were found in N-school group, and the levels of urobilinogen, an index of liver function, were tend to be higher in the specimens from N-school pupils than those from H-school ones. Thus, in future, it is likely to be necessary to investigate the factors affecting the increase of urinary coproporphyrin in H-school pupils.

昭和45年に大気中鉛による人体影響の危険性が指摘されて以来，都内主要道路交叉点付近に居住する成人（以下一般住民と記す）について，鉛汚染の実態を解明するために，血中および尿中の鉛ならびに尿中ポルフィリン代謝系成分（δ-アミノレブリン酸およびコプロポルフィリン）に関する調査を行ってきた．その成績を詳細に解析したところ，血中および尿中の鉛量が低い現状においては，尿中に排泄されるポルフィリン代謝系成分の変動が，鉛だけによる影響の現れとは断定できない調査結果であったことをすでに報告した[1,2]．しかし，一般住民の尿中 δ-アミノレブリン酸および尿中コプロポルフィリンの排泄実態にもとづいて，棄却測定値の出現率を調べたところ，尿中 δ-アミノレブリン酸に比べると，尿中コプロポルフィリンは約3倍の棄却率であった[3]．これを一般住民には鉛だけによる直接的な影響が認められなかったことと合せて考えると，コプロポルフィリンの尿中排泄変動は，鉛以外の環境関与因子が介入していることがうかがわれた．けれども，本調査が試料の濃淡による測定値変動のある昼間一時尿を用いて行われたことや，尿は季節による排泄量の変化を伴うこと，さらには調査対象例数のバラツキが著しかったために，居住地域による尿中ポルフィリン代謝系成分の濃度差の比較検討が困難であった．しかし，このたび試料としての信頼性が高い早朝一時尿を用いて，中学生の鉛害実態調査を行う機会を得た．各検査成績を推測統計的に解析したところ，鉛によるポルフィリン代謝系尿中成分への影響はなかったが，尿中コプロポルフィリンの濃度水準に居住地域による差を認めた．この尿中コプロポルフィリン濃度の地域差を，居住地域の周囲環境と合せて考えると，コプロポルフィリンの尿中排泄増加をきたす原因の究明が必要であると思われる．また，鉛によらない尿中コプロポルフィリン排泄増加が観察されたことにもとづき，新

* 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

しい尿中コプロポルフィリンの測定意義を環境衛生および公衆衛生の分野から検討する必要があるので報告をする.

検査方法

1. 調査対象および居住地環境について

東京都衛生局が都内に居住する中学生（12歳～15歳）について，鉛害調査として実施している健康診断を受診した生徒の早朝一時尿について検査した.

今回の調査は，比較的に工場が多い城東地区にある葛飾区立新宿中学校の生徒145人（男子78人，女子67人）および地理的には東京の郊外に位置しているとともに周囲を田畑にかこまれた静かな環境の中にある日野市立七生中学校の生徒151人（男子84人，女子67人）について調べた.

2. 検査日および天候について

昭和50年9月8日に，葛飾区立新宿中学校の生徒の検査を行った．なお，同日の天気[4]は晴天で南寄りの風が吹き，平均気温は26.6°（最高31.9°，最低22.7°）であった．昭和50年11月19日に，日野市立七生中学校の生徒の検査を行った．この日の天気[5]は，雨天で北北東の風が吹き，平均気温は12.8°（最高14.1°，最低10.5°）で，新宿中生徒の検査日よりも気温が13°以上も低い日であった.

3. 検査種目と定量分析の方法について

i）血中鉛量

Hessel 法[6]にもとづいて分析を行った.

ii）尿中鉛量

湿性灰化後，ジチゾン・MIBK 抽出法[7,8]にもとづいて分析を行った.

iii）尿中 δ-アミノレブリン酸

和田らの方法[9]を一部改良[10]して分析した.

iv）尿中コプロポルフィリン

著者らが開発した微量けい光法[11]を用いて分析を行った.

v）尿中ウロビリノーゲン

採尿当日に試料の還元操作をなし，翌日に佐藤法[12,13]にもとづいて分析を行った.

4. 推測統計手法[14,15]について

おのおのの測定値を，性別および居住地別に分け，各群についてF分布にもとづいた危険率1％水準において，棄却測定値をまった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を対象として必要な統計数値を求めた.

また，平均値の差の有意性については，Welch の差の検定にもとづいて判定した.

結果および考察

1. 血中の鉛量について

前述した推測統計手法にもとづいて計算した中学生の血中鉛量は，葛飾区立新宿中学校（以下新宿中と記す）生徒：男子 9.65±2.71μg/100g (n=77)，女子 7.64±1.73μg/100g (n=69) および日野市立七生中学校（以下七生中と記す）生徒：男子 7.90±2.37μg/100g (n=83)，女子 5.13±1.29μg/100g (n=63) であった．この両校生徒の同性間における平均値の差は，推測統計的な検定によると，危険率0.1％以下という高い信頼度で，新宿中生徒の方が有意に高いと判定された．さらにF分布にもとづいた危険率1％における棄却限界上限値は，新宿中の生徒：男子 16.9μg/100g および女子 12.3μg/100g に比べ，七生中の生徒：男子 14.2μg/100g および女子 8.6μg/100g と低値であった．またこれらの棄却限界上限値をこえる測定値の出現率は，新宿中の男子1.28％および女子6.76％と，七生中の女子の5.97％であった．なお，両校生徒の男女間の血中鉛量を比べると，危険率0.1％以下の水準で男子が有意に高い結果であった．これは一般住民における男女間の差の関係[2]と同じであった.

大井ら[16]は，都区内に住むハトと郊外に住むハトの血中鉛量を調べたところ，きわめて有意な地域差を認め，これは鉛汚染のていどによるものであると報告している．また原田ら[17]は，名古屋市内の鉛中毒要観察学童の健康管理として，空気清浄な山間過疎地への転地保養は，血中鉛量を低下させる効果があったと発表している．以上のことから考えると，新宿中生徒と七生中生徒のあいだの血中鉛量の差は，居住地区による環境因子とくに大気汚染のていどの違いによるものと推察される．ちなみに，1972～1974年までの降下煤塵中亜硫酸ガスの平均濃度は，新宿中のある城東地域では 0.41～0.6mg/Day/100cm² であり，他方七生中のある多摩地域は 0.21～0.4mg/Day/100cm² であったことを佐藤ら[18]は報告している.

2. 尿中の鉛量について

すでに述べた推測統計手法にもとづいて，中学生の早朝一時尿中に排泄された平均鉛量を計算したところ，新宿中の生徒：男子 5.15±2.25μg/l (n=74)，女子 5.08±2.7μg/l (n=66) および七生中の生徒：男子 4.77±1.78μg/l (n=82)，女子 4.58±1.66μg/l (n=66) であった．この両校生徒の尿中鉛量の平均値を同性間で比較すると，その差は危険率0.1％以下の水準で男女ともに新宿中生徒が高いという有意性が得られた．また，F分布にもとづいた危険率1％水準における棄却限界上

限値は，新宿中生徒：男子 11.2μg/l，女子 12.4μg/l および七生中生徒：男子 9.5μg/l，女子 9.1μg/l であった．なお，この棄却限界上限値をこえる測定値の出現率は，新宿中の男子5.13%および七生中の男子1.21%であり，女子には棄却した測定値はなかった．

本調査における中学生の早朝一時尿中に排泄された鉛量に関する実態は以上のとおりであり，尿中鉛は血中鉛量が高い新宿中生徒が高くなっている．これは生活環境にもとづく鉛暴露実態を反映していると考えられる．この点については，熊城[19]が岡山市内の交通環境の明らかに異なる3地区，すなわち旧市内，郊外および山間部の小学校5年生の男子の尿中鉛量を調べ，旧市内に住む生徒は他の2地区に比べて，危険率5%水準で有意に高かったと報告していることからも明らかである．

3. 尿中 δ-アミノレブリン酸濃度について

新宿および七生の両校中学生の早朝一時尿中に排泄された δ-アミノレブリン酸（以下 δ-ALA と記す）測定値の実態を表わした測定値散布図を Fig. 1 に示す．なお，散布図中の実線は平均値の位置を，また破線は棄却限界上限値の位置を記入したものである．

Fig. 1 に示した尿中 δ-ALA 測定値プロットのバラツキを見ると，両校男女生徒のいずれも平均値を中心にきれいな正規分布型をしていることがわかる．各群の尿中 δ-ALA 測定値を前述した推測統計的手法にもとづいて計算した平均濃度は，新宿中生徒：男子 3.15±1.02mg/l，女子 3.06±0.97mg/l および七生中生徒：男子 3.23±1.03mg/l，女子 3.1±0.84mg/l であった．この尿中 δ-ALA の平均濃度は，両校生徒の同性間に推測統計的な有意の差は認められなかった．このことを先に述べた血中および尿中の鉛量が危険率1%水準において新宿中生徒が高かった結果と合せて考えると，現状ていどの鉛量では δ-ALA の尿中排泄増加はきわめて少ないといえる．これは，すでに著者ら[1,2]が一般住民の男女性について，鉛量が低い場合の δ-ALA の尿中排泄実態として報告したことと同じ結果であり，現在までの成績では老若による鉛害の強弱は認められなかった．このようなことから考えると，生体反応に対して鉛が，閾値に達しない限り，鉛の直接的な影響としての尿中 δ-ALA の増加は観察されないものと思われる．

なお，中学生の尿中 δ-ALA の平均濃度を一般住民のそれと比較すると，危険率0.1%の水準で中学生のほうが高いという差の有意性が得られた．これは，著者らが尿中に排泄される δ-ALA の量は高令化に伴って低下していることを認めた報告[3]を，さらに裏付ける結果であると共に，成長期の旺盛な代謝によるものと推察される．

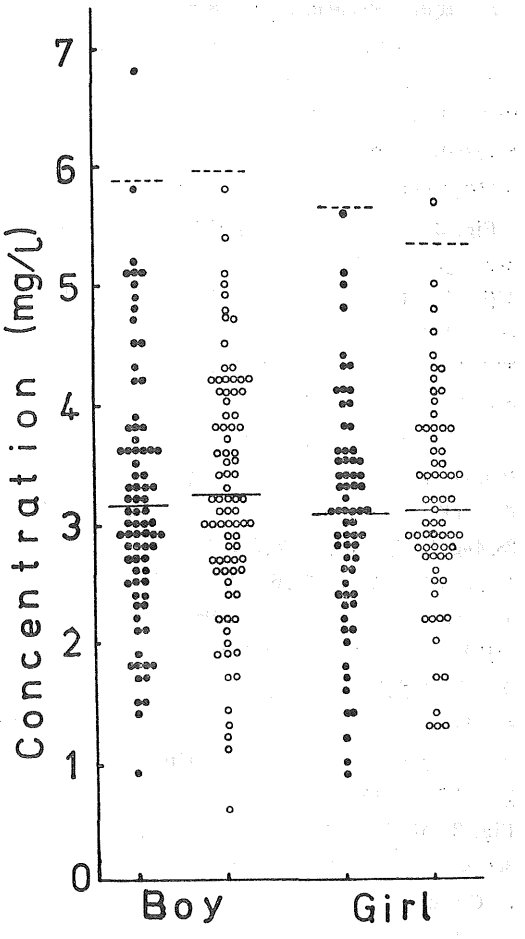


Fig. 1. Urinary Levels of δ-Aminolevulinic Acid in Two Groups of Junior High School Pupils
●Katsushika Ward Niijuku Junior High School
○Hino City Nanao Junior High School
Solid Line : Mean Value
Dotted Line : upper Rejection Limit

また友国ら[20]は，岡山市内に居住する男子中学生161名の早朝尿中の δ-ALA 濃度を測定し，その実測値にもとづいた平均濃度は 2.99±0.99mg/l であり，危険率5%における統計的上限値は 4.93mg/l であったと報告している．この友国らが得た男子中学生の尿中 δ-ALA の濃度は，著者らの得た両校男子中学生の尿中 δ-ALA の濃度よりも低くなっている．これは調査年の違いや，生活環境の差などを反映しているものと考えられる．

4. 尿中コプロポルフィリン濃度について

新宿および七生の両校中学生の早朝一時尿中に排泄されたコプロポルフィリン（以下 Cp と記す）測定値の実態を表わした測定値散布図を Fig. 2 に示す．なお，散布図中の実線は平均値の位置を，また破線は棄却限界上限値の位置を記したものである．

Fig. 2 に示した尿中 Cp 測定値プロットのバラツキをよく見ると，両校の男女生徒ともに高濃度側にゆがんだ代表的なF分布型であり，前述の尿中 δ-ALA の場合とは趣を異にしている．さらに七生中生徒の尿中 Cp 測定値は，新宿中生徒の尿中 Cp 測定値よりも全体的に高濃度側に押し上げられていることがわかる．

このような分散実態における尿中 Cp 測定値の平均濃度を，前述した推測統計手法のF分布の危険率1％水準で計算したところ，新宿中の生徒は：男子 53.6±28.4μg/l，女子 65.8±38.3μg/l であり，他方七生中の生徒は：男子 77.8±30.6μg/l，女子 76.4±28.6μg/l であった．この尿中 Cp の平均濃度を両校生徒の同性間で比較したところ，男子は危険率0.1％以下の水準で，また女子は危険率10％以下という低い信頼度ではあったが，男女ともに七生中の生徒のほうが有意に高いと判定された．両校女子生徒間の尿中 Cp 平均濃度の差の有意性が危険率10％以下と低い信頼度であったのは，Fig. 2 の散布図が示すとおり，七生中生徒の尿中 Cp 測定値の分散は一峰性であるのに対し，新宿中生徒の尿中 Cp 測定値の分散が二峰性であるために平均値が引き上げられていることが原因となっている．なお女性のポルフィリン代謝系尿中成分濃度の差を比較するときの難しい条件として，生理や女性ホルモンなどが急性ポルフィリン尿症の誘因となることがあげられる[21]．それゆえに尿中ポルフィリン代謝成分の濃度差の比較研究は，女性よりも男性における成績の信頼度が高いといえる．

なお，両校生徒の尿中 Cp 濃度のF分布における危険率1％水準での棄却限界上限値は，新宿中生徒：男子 129.6μg/l，女子 169.1μg/l および七生中生徒：男子 159.7μg/l，女子 153.6μg/l であった．これらの棄却限界上限値をこえる測定値の出現率は，新宿中生徒：男子 6.41％，女子2.97％および七生中生徒：男子8.33％，女子7.46％であり，全体として七生中生徒は新宿中生徒の2倍の棄却測定値出現率であった．

鉛の影響によって尿中に多量に排泄されるといわれている Cp の平均濃度および棄却測定値の出現率は七生中生徒に高く，血中および尿中の鉛量は新宿中生徒に高くなっており，両校生徒の鉛量と尿中 Cp 濃度の関係は全く反対であった．また，尿は気温による濃縮影響が

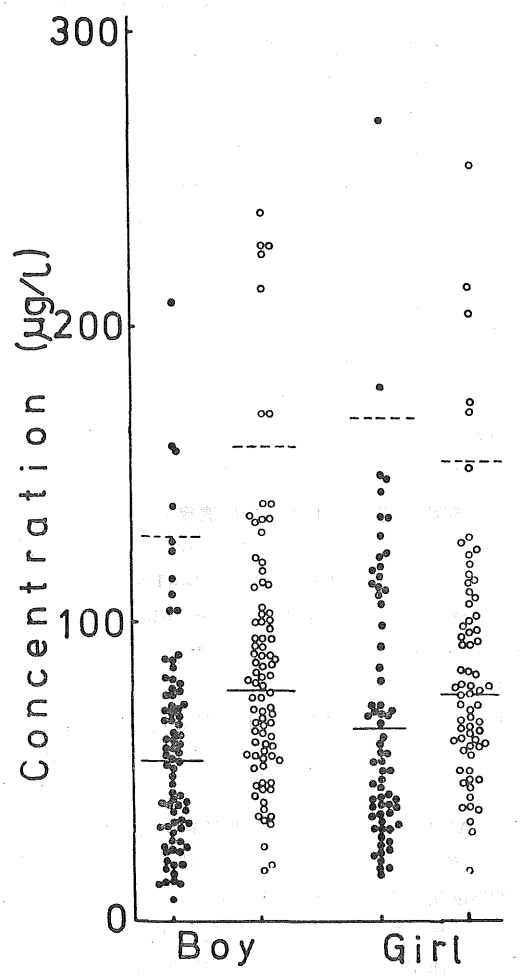


Fig. 2. Urinary Levels of Coproporphyrin in Two Groups of Junior High School Pupils
●Katsushika Ward Niijuku Junior High School
○Hino City Nanao Junior High School
Solid Line : Mean Value
Dotted Line : upper Rejection Limit

考えられるが，両校生徒の検査日の気温は前述してあるとおり七生中生徒の検査日は新宿中生徒の検査日よりも13° 以上も低い日であり，七生中生徒の尿中 Cp 濃度が高かったのは尿試料の濃縮によるものでないと考えられる．

以上の背景にもかかわらず両校生徒の尿中 Cp 濃度に有意差が認められたのは，両校生徒の生活環境の相違や調査時節の差異に関連する因子によるものと推察される．すなわち，生活環境の面で七生中の生徒は空気清浄な環境の中にあるが，特に北風の吹く冬期においては新

宿中の生徒よりも耕地塵埃に含まれる化学物質を吸入する機会が多いことにより両校生徒の尿中 Cp 濃度に差が生じたのか，くわしく調査するとともに基礎的研究を行う必要があると考える．また，七生中の生徒を調査した時期は気温変化の著しい季節の変りめであり，このことが生体におよぼす影響も無視できない．しかし，小笠原ら[22]は都民の尿中 Cp 濃度を調べ，総平均濃度にくらべ9月は有意に高いが11月は差がなかったと報告している．また，Cp の尿中排泄増加は肝機能障害の際にも観察されているので，この点に関する検討を以下に記述する．

5. 尿中ウロビリノーゲン濃度について

新宿および七生の両校中学生の早朝一時尿中に排泄されたウロビリノーゲン（以下 Ug と記す）測定値の実態を表わした測定値散布図を Fig. 3 に示す．なお，散布図中の実線は平均値の位置を，また破線は棄却限界上限値の位置を記入したものである．

Fig. 3 に示した肝機能の目安である尿中 Ug の測定値プロットのバラツキをよく見ると，尿中 Cp の場合と同じように，高濃度側にゆがんだF分布型であるが，尿中 Cp の場合とは反対に新宿中生徒の測定値が全体的に高目の測定値となっていることがわかる．このような分散実態における尿中 Ug 測定値の平均濃度を，F分布にもとづく危険率1%水準で計算したところ，新宿中生徒：男子 2.33±0.99mg/l，女子 2.93±1.34mg/l および七生中生徒：男子 2.26±1.07mg/l，女子 2.25±0.88mg/l であった．この尿中 Ug 平均濃度を両校生徒の同性間で比べたところ，男子の間に有意差は認められなかったが，女子では危険率0.1%以下の水準で新宿中生徒が有意に高いと判定された．また，F分布の危険率1%水準における棄却限界上限値は，新宿中生徒：男子 4.98mg/l，女子 6.55mg/l および七生中生徒：男子 5.12mg/l，女子 4.63mg/l であった．なお，これらの棄却限界上限値をこえる測定値の出現率は，新宿中生徒：男子8.97%，女子5.97%および七生中生徒：男子2.38%，女子4.48%であった．これらは，前述した尿中 Cp の棄却測定値の出現率とは反対に，全体として新宿中生徒は七生中生徒の2倍の棄却率であった．

以上のような成績から考えると，肝機能の目安としての尿中 Ug 濃度は新宿中生徒に高く，先に述べた尿中 Cp 濃度が七生中生徒に有意に高かったのは肝機能障害にもとづくものでないと結論づけられる．

また，この中学生の尿中 Ug 平均濃度を，すでに著者ら[3]が報告した一般住民の昼間一時尿における値に比べると，このたび調べた中学生の値のほうが高い結果であった．このことについては，肝機能の目安としての尿中 Ug の測定意義や尿試料を採取する時刻などを吟味しながら解析してみる必要があると考える．

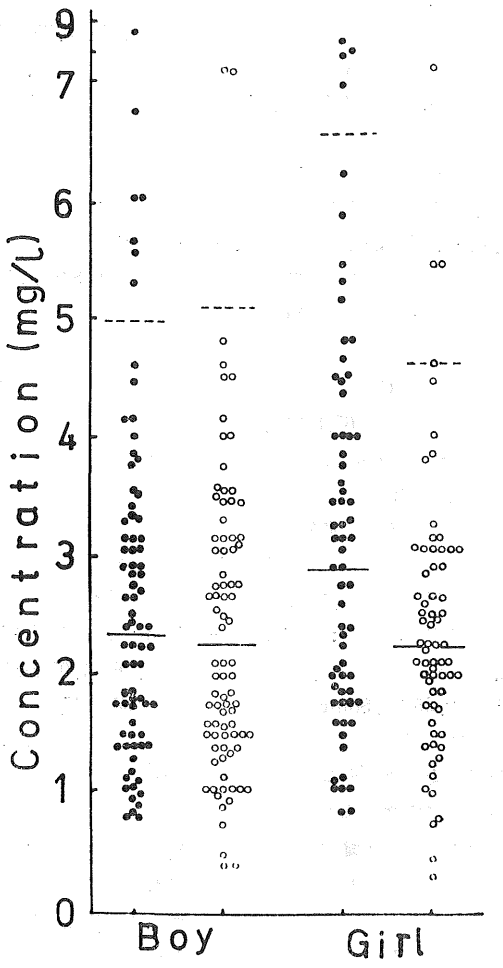


Fig. 3. Urinary Levels of Urobilinogen in Two Groups of Junior High School Pupils
●Katsushika Ward Niijuku Junior High School
○Hino City Nanao Junior High School
Solid Line : Mean Value
Dotted Line : upper Rejection Limit

まとめ

昭和50年度に葛飾区立新宿中学校（新宿中）および日野市立七生中学校（七生中）の生徒を対象として行った鉛害実態調査の結果は次のようであった．

1. 血中鉛量は，新宿中生徒：男子 9.65±2.71μg/100g，女子 7.64±1.73μg/100g および七生中生徒：男子 7.90±2.37μg/100g，女子 5.13±1.29μg/100g であった．またこの平均血中鉛量は，男女とも危険率0.1%

以下の水準で新宿中生徒のほうが有意に高かった.

2. 尿中鉛量は，新宿中生徒：男子 5.15±2.25μg/l, 女子 5.08±2.7μg/l および七生中生徒：男子 4.77±1.78μg/l, 女子 4.58±1.66μg/l であった. この尿中の平均鉛量は，男女とも危険率 0.1% 以下の水準で新宿中生徒のほうが有意に高かった.

3. 尿中 δ-ALA 平均濃度は，新宿中生徒：男子 3.15±1.02mg/l, 女子 3.06±0.97mg/l および七生中生徒：男子 3.23±1.03mg/l, 女子 3.1±0.84mg/l であった. この尿中 δ-ALA の平均濃度は，男女ともに両校間に有意差を認めなかった.

4. 尿中 Cp 平均濃度は，新宿中生徒：男子 53.6±28.4μg/l, 女子 65.8±38.3μg/l および七生中生徒：男子 77.8±30.6μg/l, 女子 76.4±28.6μg/l であった. この尿中 Cp 平均濃度は，男子は危険率 0.1%以下の水準で，また女子は危険率10%以下の水準ではあるが，男女ともに七生中生徒のほうが有意に高い値であった.

5. 肝機能の目安とされている尿中 Ug の平均濃度は，新宿中生徒：男子 2.33±0.99mg/l, 女子 2.93±1.34mg/l および七生中生徒：男子 2.26±1.07mg/l, 女子 2.25±0.88mg/l であった. この尿中 Ug の平均濃度は，男子では両校生徒間に有意差は認められなかったが，女子では危険率 0.1% 以下の水準で新宿中の生徒のほうが有意に高かった.

以上の各検査種目の成績を総合的に解析すると次のようになる. すなわち，血中および尿中の鉛量はがいして低値であるとともに，鉛量とポルフィリン代謝系尿中成分との間に相対的な関連性は認められなかった. よって，両校生徒には，鉛だけによるポルフィリン代謝障害はなかったと結論づけられる. また，肝機能に関しては，本調査の結果だけでは結論づけられない. しかし，血中および尿中の鉛量ならびに肝機能の目安である尿中 Ug 濃度が，新宿中の生徒に比べて七生中の生徒は低かったにもかかわらず，七生中生徒の尿中 Cp 濃度は高かった. このことは，七生中生徒の生活環境に著しく影響をおよぼしている因子による生体反応としてあらわれていることが想定される. よって，くわしい調査および基礎的研究を行うとともに，鉛障害を伴わない場合の尿中 Cp の測定意義を，環境衛生および公衆衛生の分野から再検討する必要があると考える.

謝辞 本研究を述べるにあたり，血中および尿中の鉛を分析された当所環境衛生研究科の秋山和幸主任研究員，高橋利恵子ならびに長嶋親治の各氏に深謝します.

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究所課題「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」として実施した一部であり，その概要は第57回東京都衛生局学会，昭和51年5月で発表した.）

文　献

1) 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
2) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，野牛　弘：東京衛研年報，25，321，1974
3) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，26-1，259，1975
4) 東京管区気象台：東京都気象月報—昭和50年9月—，5，昭和50年10月25日発行
5) 東京管区気象台：東京都気象月報—昭和50年11月—，5，昭和50年12月25日発行
6) Hessel D. W.: *Atomic Absorption Newsletter*, **7**, 55, 1968
7) 野牛　弘，橋爪六郎，秋山和幸：東京衛研年報，22，187，1970
8) 野牛　弘：衛生検査，20，581，1971
9) Wada, O., K. Toyokawa, G. Urata, Y. Yano, and K. Nakao: *British J. of Industrial Medicine*, **26**, 240, 1969
10) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，野牛　弘：東京衛研年報，24，303，1973
11) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，24，297，1973
12) 陳　敏馨：臨床検査，6，497，1972
13) 陳　敏馨：臨床病理，11，207，1963
14) 鳥居敏雄，高橋晄正，土肥一郎：医学・生物学のための推計学，第4版（1962）東京大学出版会
15) 農林省家畜衛生試験場，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
16) 大井　玄，福田雅夫，関　比呂伸ら：東京衛研年報，23，295，1970
17) 原田　昭，奥谷博俊，栗田英男：日衛誌，28，96，1973
18) 佐藤泰仁，牧野国義，狩野文雄ら：東京衛研年報，26-1，265，1975
19) 熊城一男：日本公衛誌，20，93，1973
20) 友国勝麿，緒方正名：労働の科学，28，23，1973
21) 佐々木英夫：Tokyo Tanabe Quarterly, **No. 15**, 48, 1972
22) 小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，27-1，213，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 229—234, 1976

大気中浮遊粉塵の EDX による組成分析（第2報）

佐藤泰仁*, 溝口 勲*

Component Analysis of Suspended Particulate Matters in Atmosphere by EDX (II)

YASUHITO SATO* and ISAO MIZOGUCHI*

Components and shapes of particulates contained in exhaust gases and flue gases were investigated using Energy Dispersive X-ray Analyser. Flue gases were sampled from cleansing, foundry and refinery factories.

The analysis showed that the shapes of particulates in exhaust gases under idling condition were different from those under constant speed condition (40 km/hr) and that the particulates were various in shapes in flue gases of cleansing factories. Small particulates had an tendency to get together and to make, so-called, solidified matters at the time when they came out in air after heating-processes.

はじめに

大気汚染及び労働衛生分野において，粉塵は有害ガスとともに注目される汚染物質であり，一般環境はもとより，広く発生源においても分析，監視されている．そしてその濃度，量，粒径などの物理的性状はもちろん，粉塵中に含まれている重金属類などの化学的成分，また，それらの生体系への影響についても種々の測定分析及び実験により，粉塵のもつ有害性の実態が解明されてきている．

著者らは，前年度の研究年報[1]において，最近開発され応用されてき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）を装着した電子顕微鏡（Electron Microscope 以下略して E.M. と記す），（分析電子顕微鏡とも称されている）を用い，浮遊粉塵の形態及び組成分析を試み，浮遊粉塵の解析に有効な手法であることの確認ができたと報告を行なった．

今回はその応用研究として同一手法を用い，発生源よりの粒状物がいかなる形状で排出され，また，その組成はどうであるかについて分析を行なったので，その結果について報告する．

測定方法

1） 分析方法

試料の捕集方法及び作成方法は前回と同じ（コロジオン膜をはったカバーグラスを労研式塵あい計に装着する）であるが，分析条件において，今回は E.M. の加速電圧を 40kV で行ない，EDX の分析時間を200秒とし，一万倍の走査透過像についてスポット分析を行なった．そのためか，前回経験したコロジオン膜の破れが起らず，1つの試料について多くの視野の観察が可能であった．また，電顕用メッシュについては金属類のスペクトルが出ないナイロン製のものを使用したため，Noise の小さな EDX スペクトルが得られた．

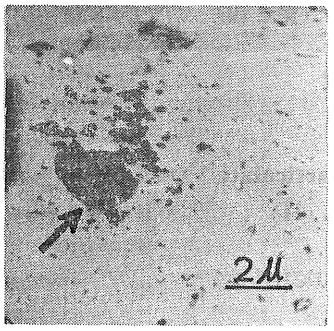
2） 対象発生源

1）自動車排気ガス（アイドリング時）
2）自動車排気ガス（定速 40km/h ）
3）清掃工場煙道排ガス
4）精錬工場及び鋳造工場煙道排ガス
5）高尾山山頂付近空気（Back ground として）

観察結果及び考察

発生源粒状物の1つとして，大気汚染として問題の多い自動車の排気ガスをとりあげてみた．これについては都公害研究所にあるシャーシーダイナモ装置により，アイドリング状態及び定速 40km/h 状態の排気ガスを，

* 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



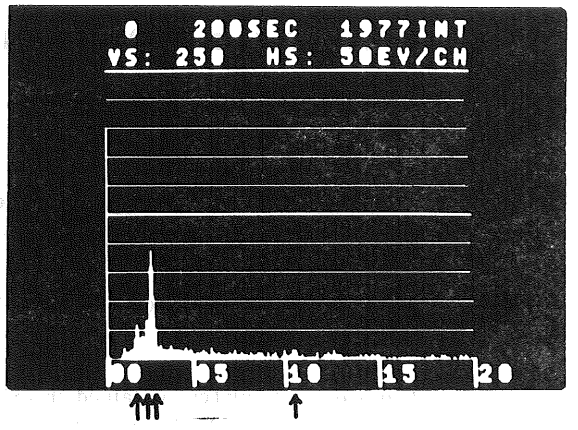
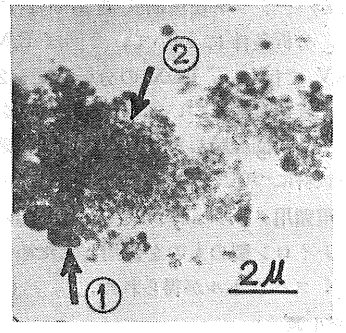
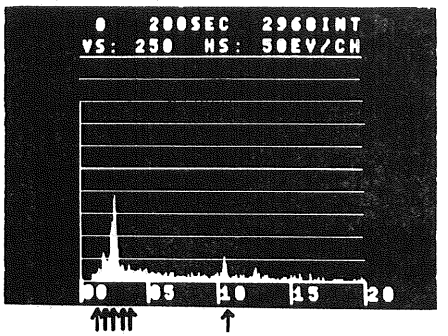


Fig. 1. Exhaust gas Idling
Spectrum of EDX→Analyzed particle





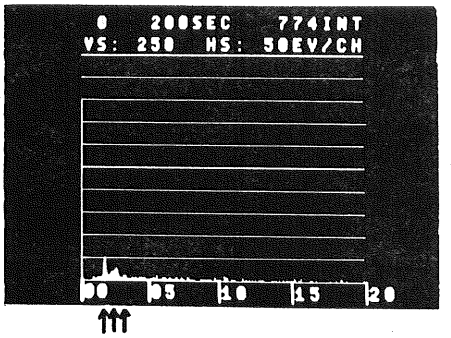
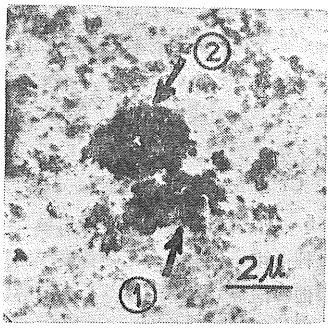


Fig. 2. Exhaust gas (Constant speed 40 km/h)
Spectrum of EDX→Analyzed particle

マフラーより直接，前述の方法でサンプリングした．この時のガソリンにはノッキング防止剤としての四エチル鉛が添加されていたため，アイドリング時及び定速時の粒状物から鉛のスペクトルがみられている．そのほか，多くの試料にみられたものとしてはケイ素，リン，硫黄であった．これらはガソリンの組成中にも含まれており，当然の検出であるが，1つの粒子についても単一組成というのではなく，これら金属類の混合体として排出されていると言える．Fig. 1 はアイドリング時の粒状物の例であるが，粒子はこのように平面状の形態を示し



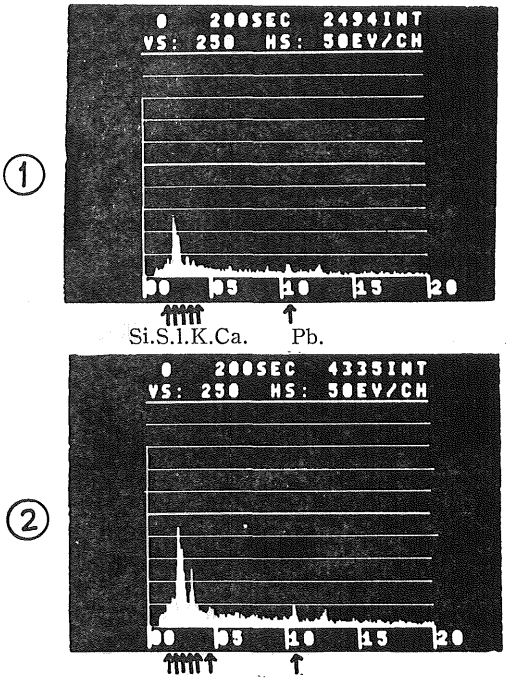
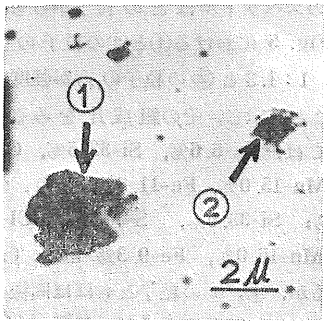


Fig. 3. Flue gas of Cleansing factory
Spectrum of EDX→Analyzed particle



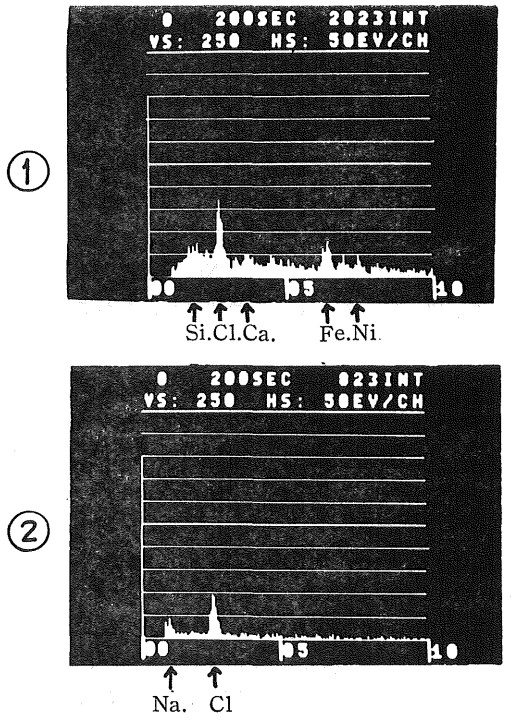


Fig. 4. Flue gas of Refinery
Spectrum of EDX→Analyzed particle

ているのが多く，電顕的粒径は0.2～2ミクロンといった幅であった．一方，定速時のものは Fig. 2 に示した如く球状のものが多く，粒径においてはアイドリング時よりも均一化されており，0.4～1ミクロンと粒径の幅がせばまっている．これにはガソリンのエンジンでの燃焼過程の違いが関与しているものと思われる．

今回の排気ガス中粒状物から検出された組成としては，Na, Al, Cl, Si, P, S, K, Ca, Ti, Fe, Zn, Pb であった．

今回，定量的分析の一過程として，それぞれの組成の積分値から相対的強度を求めた．

尚，McCRONE[2] によると通常状態におけるそれぞれの感度は，今回検出された元素のうち Pb を除いて同一であることが確かめられているので，この積分値により一定の濃度の組成比が判断できるものとして計算した．

なお，Pb については感度補正を行なった．Fig. 2 の①及び②の粒子についてみると，粒子の積分値よりの強度比は3.8：1と①の粒子の方が濃度が高いことを示し，その組成比を求めてみると，①の粒子においては Al-5.5%, Si-10.9%, P-8.4%, S-19.1%, Cl-34.4%, Pb-21.6%であり，②の粒子では Si-46.1%, S-25.4%, Cl-28.5%となり，排気ガス中粒状物は Si, S, Cl, Pb の多い組成と言える．

次は清掃工場での粒状物であるが，東京都の某清掃工場の煙道排ガス用のサンプリング口より採取したが，この付近は 800～900°C の高温下にあるためか，Fig. 3 に示したような一様な粒径の凝結体として排出されていることがみられた．また凝結体とは異なり，破片的形状なもの，綿状のものなどが観察された．そしてこれら凝結体からの EDX スペクトルとしては，Na, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Pb, Fe, Zn, Cu が検出され，なかでも Si, S, Cl はどの粒子からもみられた．

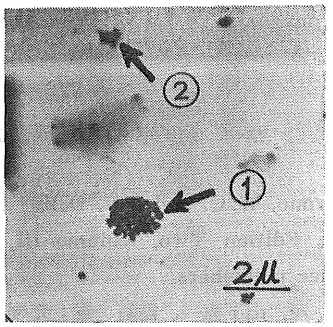
清掃工場では種々雑多なものが焼却されているわけで，高温燃焼の過程でそれらが多様な形となり，放出されているものと思われる．そして，これらの粒径はサブミクロンから数十ミクロンと幅の広いものであり，今回のサンプリングでは凝結体をしている個々の粒子は 0.6 ミクロン前後であり，単一的形状のものは1～3ミクロンという状態であった．

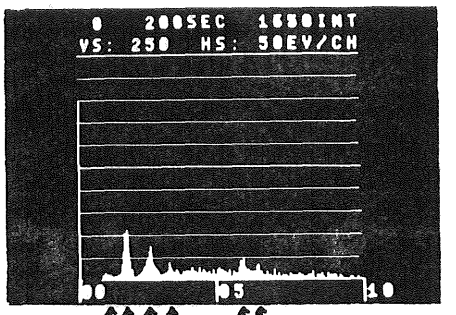
また，Fig. 3 における①と②の粒子の強度比は 1：1.7 であり，②の粒子の組成比を計算してみると，Si-6.8%, P-8.1%, S-24.8%, Cl-22.2%, K-11.7%, Ca-6.7%, Ti-5.3%, Pb-14.4% となり S, Cl, Pb の多い粒子と判断される．

次の発生源は工場よりのものであり，Fig. 4 はステンレス合金類を扱っている精錬工場でのサンプルであるが，バッグフィルターの集塵装置を通して排出しており，排気口でのサンプリングが困難であったため，集塵装置内で行なったが，装置の捕集効率がよいためか，カバーグラス上に粉塵の line がみられず，捕集されないようだったので煙道直下の外気を採取した．粒径的には後述する鋳造工場より大きいものが多く，不定形の存在を示し，工場で扱っている金属類のうち Ni についてははっきりしたスペクトルが得られたが，Cr についてはノイズと同程度で Cr であるという確証はできなかった．

次の Fig. 5 に示した粒状物は鋳造工場でのものであり，ここでは種々雑多な鋼材をその都度，仕様に応じ，鉄や銅，その他の割合で溶解炉に落して溶解させ，型枠に流し込み一定材質の部品を作っているところであり，その溶解炉上から煙道があり，ここでもバッグフィルター集塵装置を経て外に放出してるわけであるが，ここでは装置からの煙道中にあるサンプリング口からの捕集が可能であり，ここからの採塵ができた．分析結果の一例として写真に示したような，サブミクロンの球状粒子が凝結したような形で放出されており，それらが1～2ミクロンの大きさの粒子として存在していることがわかる．また，今回は掲載していないが，溶解炉の直前で採取したものは，5ミクロン以上のものがほとんどで，球状ではなく，鋭角な金属片といったものであり，このような大きなものはバッグフィルターで捕集され，大気中には放出されていないものと考えられる．ここで検出された金属は Fe をはじめ，Cu, Zn, Mn, Mg, Al,(V), であり Fe のスペクトルはどの粒子からもみられている．また，Fig. 5 における①と②の粒子の強度比を求めてみると，1：1.3 と②の粒子の方が強度（濃度）がやや大きいことを示し，その組成比をみると，①の粒子においては，Na-5.6%, Si-32.5%, Cl-23.9%, K-11.7%, Mn-15.0%, Fe-11.3%であり，②の粒子では Na-4.5%, Si-33.5%, S-7.1%, Cl-18.6%, K-11.0%, Mn-16.0%, Fe-9.3% と S（硫黄）が検出されているが，①，②の粒子ともほぼ同様の組成であると言える．最後に，これら粒子の対照とする意味で高尾山山頂でサンプリングを行なったのが Fig. 6 である．ちょうど雨が降った後であったためか，比較的清浄な状態であり，Fe が数サンプル中から検出された程度で，あとは Si 及び Cl が全サンプル中からみられ，地殻からの粉塵組成であろうと判断した．また，これらの電顕的粒径は 0.2～3 ミクロン程度のものであった．

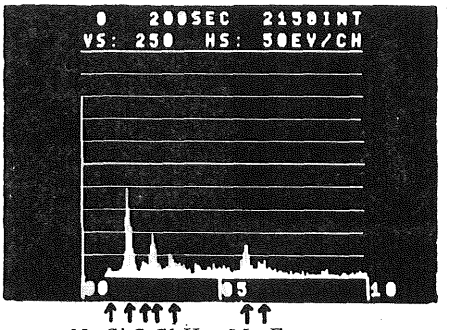
このように EDX 分析は元素組成分析には有効であ





①

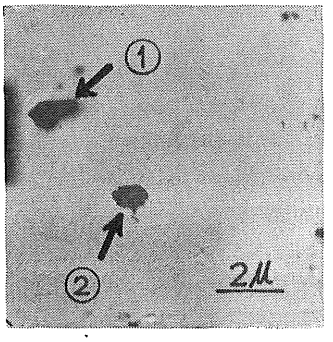
Na.Si.Cl.K. Mn.Fe.

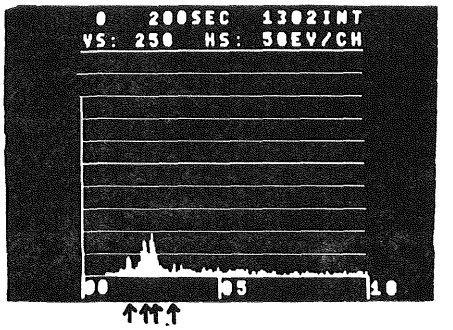


②

Na.Si.S.Cl.K. Mn.Fe.

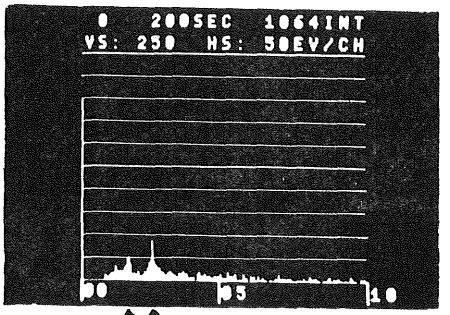
Fig. 5. Flue gas of Foundry
Spectrum of EDX→Analyzed particle





①

Si.S.Cl.K.



②

Si.Cl.

Fig. 6. The top of Mt. TAKAO
Spectrum of EDX→Analyzed particle

るが，さらに進めた存在形態についてはX線回析法に頼らざるを得ず，今後の課題として，X線回析法を併用させて実施したいと考えている．また，EDX 分析についても面分析，線分析への Application があるので追試したい．

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） ナイロン製メッシュを使用したことにより，メッシュからの金属類のスペクトルがみられないため，ノイズが極めて小さく，試料からの EDX スペクトルの定性が容易であった．

（2） 排気ガス中の粒状物から，ガソリンに含まれていた Pb が検出された．また．アイドリング時と定速時の粒子の形状において違いがあることが認められた．

（3） 清掃工場よりの粒状物からも Pb が検出され，形状としては一様な粒径の凝結体を示したもの，破片的なもの，綿状のものなど種々な形で放出されている．

（4） 発生源粒状物においても一般大気環境と同様，Si, S, Cl の組成が多かった．

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50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16回大会1975年11月で発表した．）

文　　献

1) 佐藤泰仁，溝口　勲：東京衛研年報，26-1，272，1975
2) McCrone, W. C. and J. G. Delly: *The Particle Atlas*, Edition Two, volume III, ann arbor science publishers
3) 柳原　茂，山下憲一，篠崎　修：大気汚染研究，10(4)，225，1975
4) 佐藤泰仁，溝口　勲：大気汚染研究，10(4)，194，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 235—241, 1976

病院調剤室における薬塵調査について

佐藤泰仁*, 青木 実*, 溝口 勲*

Hygienic Study of Medicinal Dusts in Hospital Dispensaries

YASUHITO SATO*, MINORU AOKI* and ISAO MIZOGUCHI*

Effects of powder medicine dusts on pharmaceutists were examined in dispensaries of five Tokyo metropolitan general hospitals.

Amounts of suspended particles and fall dusts were measured on two points of each dispensary, point A of near dividing package machine and point B, as control far from point A in the same room. The dust amounts on point A were more than those on point B and besides the analysis of personal samplers showed that pharmaceutists workig near point A were more exposed to the dusts and that the exposed amounts were much more in dispensaries without dust cleaning equipments than in those with well functioned equipments.

The questionaires showed that some of pharmaceutists, working in narrow rooms or in rooms without equipments, were troubled with symptoms such as allergic rhinitis and sore throat.

はじめに

最近の医療の進歩拡大に伴ない，病院薬局の業務内容も複雑化して来ているが，この業務の中でその主流を占めているのは調剤業務である．近年，病院薬局では各種新薬の増加と調剤室の分包機，自動分割装置，混和器などの使用により調剤室内の薬塵による汚染が増大し，いろいろな障害が報告[1,2]され，調剤室勤務者の間では「薬局アレルギー」という言葉でとりあげられている．つまり，「薬局アレルギー」は，職場における発生頻度が大であり，生ずるアレルギー疾患の種類も，好発薬剤も，従来の「薬剤アレルギー」と異なる特徴を示していることにより，薬局勤務者の業務と生活をおびやかす明らかな職業病として，学問的にも，実際的にも，緊急かつ強力な対策を確立する必要がある．このような背景において，今回の調査は調剤室勤務者の健康管理の面から，総務局勤労部衛生管理課より依頼のあった民生局養育院付属病院を含め，衛生局大久保，大塚，豊島，駒込の各病院の調剤室における環境衛生（特に粉塵について）の実態を把握する目的で実施し，あわせて調剤室勤務者への影響をみるため，アンケート調査も行なった．

調査概要

調査期間 昭和51年3月12日～3月26日

調査場所 前述の病院調剤室．尚，調剤室内における測定点としては，調剤業務の中心となる自動分包機周辺（A点）と，対照として同じ調剤室内でA点より5～10m離れ散剤を扱っていない箇所（B点）とした．

測定方法

- 環境条件
  - 温度及び湿度…自記温湿度計
  - 炭酸ガス濃度…北川式 CO_2 検知管
- 粉塵条件
  - 粉塵の粒径分布…光散乱塵埃自動計数装置
  - 粉塵の重量濃度…ローボリュームサンプラー，アンダーセンサンプラー
  - 落下塵重量…シャーレ捕集法
  - 個人暴露濃度…個人サンプラー

アンケート調査

調査結果及び考察

1) 調剤室規模概要について

各病院における調剤室の規模概要を表1に示す．まず一人当りの有効面積であるが，広瀬らの資料[3]によると全国の病院の平均値が 7.1m²/人 であり，大塚及び豊島病院は現場の状況をみても，他と比べて明らかに狭い．

次に気積については，労働安全衛生規則によれば，一

* 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

表 1. 各病院における調剤室規模概要

病院名＼項目	勤務者数	面積	一人当り有効面積	気積	総面積に対する調剤室の比率	散剤（1ヶ月）使用量	全薬剤に対する粉剤の割合	分包機の種類及び台数	空調方式及び除塵装置の有無
大久保	9人	78.08m²	7.8m²/人	27.4m³/人	0.6%	108kg	70%	小西式2台	自然換気 除塵装置 無
大塚	12	41.58	3.1	10.9	0.3	103	30	小西式1台	自然換気 局所除塵器1台
養育院	14	120.38	7.7	20.5	0.4	140	40	小西式2台 パイルパッカー式3台	機械換気 除塵装置 有
豊島	15	72.00	4.3	11.0	0.3	160	30	小西式2台	機械換気 局所除塵器2台
駒込	19	152.28	7.2	18.8	0.4	94	40	小西式2台 パイルパッカー式1台	機械換気 除塵装置 有

人当り 10m³ 以上ということであるが，大塚及び豊島病院は基準値を若干越えている程度であり，現状のままで器材等が増加すればすぐ少なくなり，特に大塚病院では機械換気がなされておらず，現状でも後述するように換気性が悪いことから早急に改善されるべきである．また，病院総面積に対する調剤室面積の比率をみると 0.3～0.6％であるが，朝長[4] の報告によれば全国調査の平均（薬局面積として計算）が 1.7％にあり，2％は必要であると述べており，今回の調査では調剤室だけであるため，その比率が低くなっているが，調剤室その他を含めた薬局面積としても倍程度にすぎず，狭いことは事実である．最近は薬局関係機器も増大しており，調剤室面積は以前の何倍もの広さを必要とすると考えられてきている．更に，調剤室では1ケ月平均100kg 前後の散剤を扱っており，これは大久保病院を除いて，全薬剤に対する割合としては30～40％である．

また，調剤室での自動分包機の種類は，小西式とパイルパッカー式の2通りであり，作業工程をみての薬塵の飛散程度は小西式の方が多く，作業能率において低下にならないような局所フードの設置が望まれる．

2) 環境条件について

各病院の温度及び湿度については，調査期間が春季であり，この時期における適温としては 23～24℃ であるが，駒込病院を除いては比較的良好であった．また，湿度については少なくとも40％台は確保したい値であるが，豊島及び駒込病院では20～25％と小さく，乾燥状態にあるので加湿を考慮したい状況であった．これら温湿度の変化はA，B点とも同様な傾向にあり，調剤室内における温湿度の不均一分布は少ないものと思われる．次に室内の換気状態をみるために炭酸ガス（CO_2）の濃度を一時間毎に追ってみたが，大塚病院においてのみ，作業時間に対応して許容濃度（0.1％）を越える現象がみられるだけで，他の病院は良好であった．大塚病院で CO_2 が高くなる原因としては，場所として空気の流通の悪いところにあり，自然換気にまかされているため，狭い調剤室内に大勢の人が集まることにより，それを浄化でき得ない状況のためであり，現段階での改善策として，適当な位置への換気扇の設置が望まれる．

3) 粉塵条件について

粒径分布 各病院のA点について1時間毎に測定した．それによると大塚病院だけが時間帯によるバラツキがみられたが，ほかは全時間帯の平均値で示した図1のような変化と同じ傾向を示している．大久保病院以外は

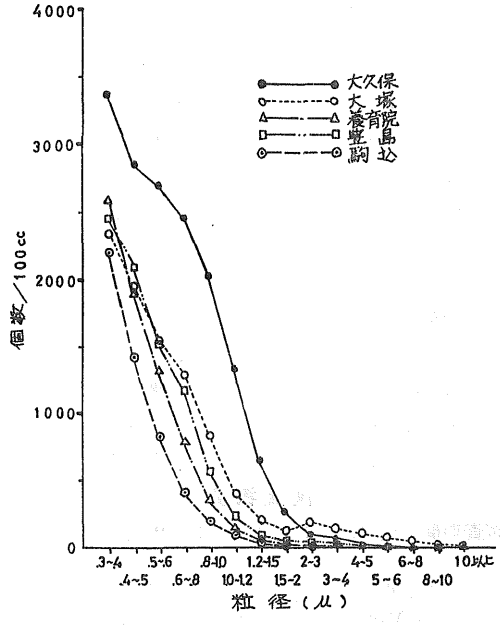


図 1. 各病院A点における浮遊粉塵の粒径分布(平均値)

ほぼ同じようなパターンであることがわかり，大久保病院は個数的に，ほかの病院より多く，とりわけ0.6～1.5 μ の粒子が倍程度多いことがみられた．今回の粒径分布を我々が以前に調査した職場（デパート及びホテル）と比べてみると，0.3～0.6μ の粒子数は極端に少なく，かつ1μ程度の粒子数においても若干少ないことから，サブミクロン粒子が浮遊しているという状態は少なく，密度の大きい粒子が多いためか，浮遊してもすぐ落ちてしまうものと思われた．人間の肺への沈着率を考えた場合，0.5μ前後及び2～3μの粒子が問題になるので，この点から言って，特に大久保病院ではサブミクロン粒子に対して捕集効率のよい集塵器の設置が必要であろう．

重量濃度　浮遊粉塵の重量濃度をみるために，ローボリュームサンプラー（平均吸引速度毎分28 l）によって

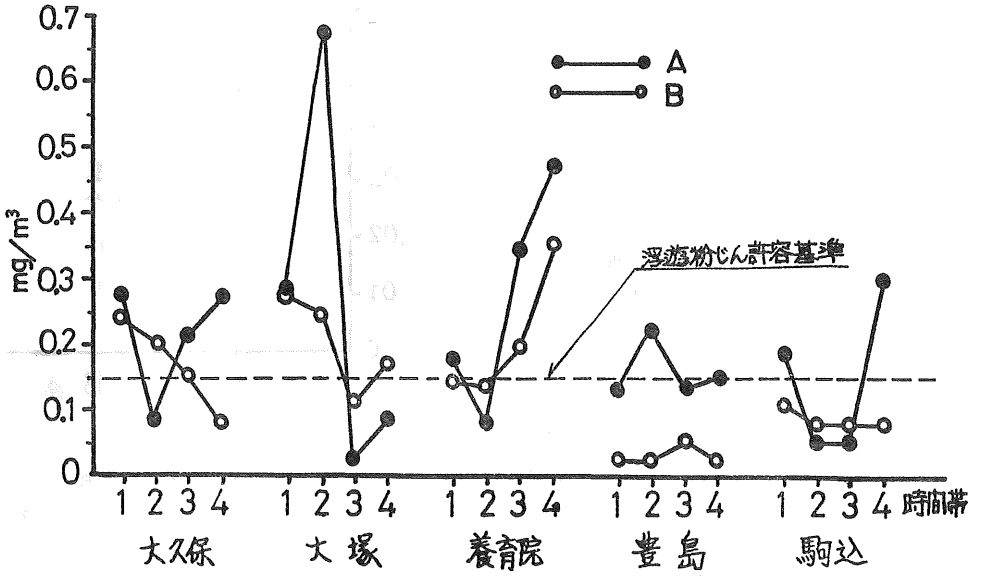


図 2. 各病院における浮遊粉塵量（ローボリュームサンプラーによる）
1…9～11時　2…11～13時　3…13～15時　4…15～17時

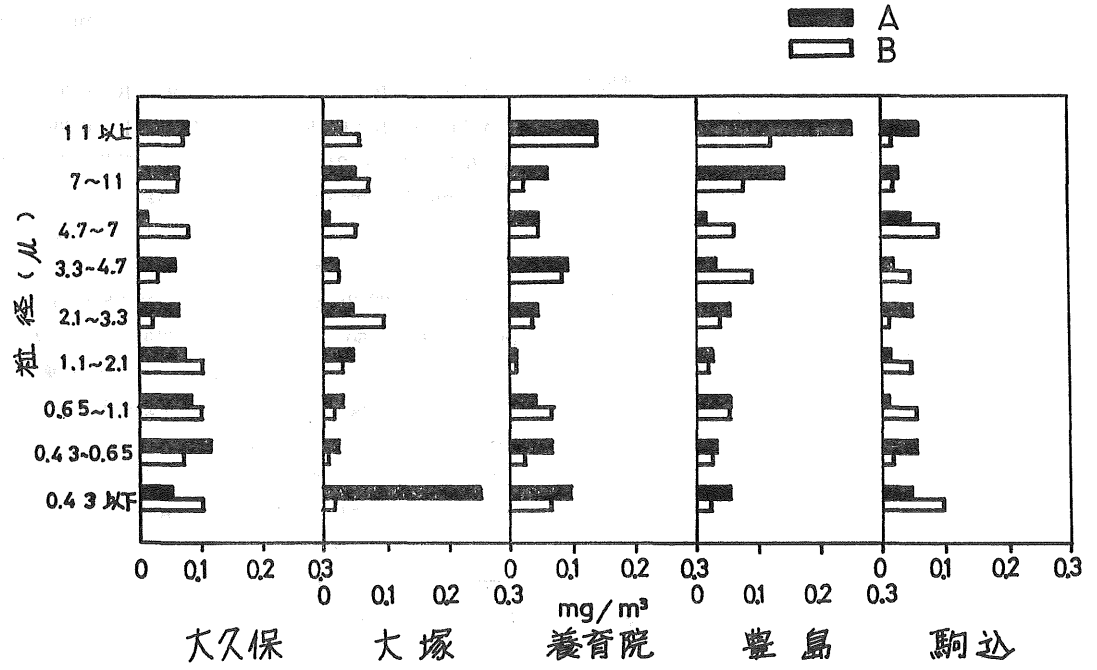


図 3. 各病院における浮遊粉塵量（アンダーセンサンプラーによる）

2時間毎，グラスファイバーろ紙に採塵し，秤量した結果を図2に示す．勤務時間内における総粉塵量は，大久保病院でA点0.859mg/m³，B点0.688mg/m³，大塚病院ではA点1.077mg/m³，B点0.821mg/m³，養育院A点1.091mg/m³，B点0.845mg/m³，豊島病院A点0.659mg/m³，B点0.145mg/m³，駒込病院A点0.609mg/m³，B点0.368mg/m³といずれもA点に比べB点が低い値を示しているが，時間帯によってはB点の方が高い値を示しているところもある．そして調剤室の作業は10～13時がピーク時であるため，この時間帯が高濃度であろうと予測していたが，必ずしもそのような傾向をみせてはいなかった．しかし，大塚病院のA点において，11～13 時の時間帯に 0.674mg/m³ と許容基準値（0.15 mg/m³）の4倍を越える濃度が測定された．ほかの病院でも2～3倍の濃度の時間帯はみられ，薬塵（散剤）の占める割合は多いと思われるが，一般粉塵とあいまって病院調剤室は，粉塵量の多い職場と判断される．

また，豊島及び駒込病院では病院より要望のあったA，B点以外の地下薬剤倉庫前及び調剤室内の吹きだまりと思われる個所についても測定したが，平均して薬局内より高い値を示しており，これには室内気流が相当程度関与しており，地下薬剤倉庫前へは階段を通して1階調剤室の散剤が降下しているためである．更に吹きだまりと思われる個所での高濃度は，空調のための吹き出し空気及び調剤台周辺の集塵のための吸い込み口での吸引空気とのバランスで生じていると思われた．

同じ重量濃度について粒径別にみるために，アンダーセンサンプラー（吸引速度毎分28.3 l）を用い，連続8時間吸引し測定したが，その結果は図3に示す通りである．

これをみると前述したように，大久保病院では重量的にもサブミクロン粒子が多い傾向がみられている．大塚病院のA点で0.43μ以下が 0.25mg/m³ と他に比べ極端に高濃度が測定されたが，これは狭い調剤室での作業の流れのために測定器を分包機の直前に設置せざるを得なかったための測定位置の影響と考えられる．また，全粒径の重量濃度を総計し，先のローボリュームによる総粉塵量との関連をみたが，両者には有意な相関はみられなかった．これには測定器の設置位置（高さ）及びサンプリング口の向き（上及び横）が相当程度関与していると判断される．

落下塵量　散剤の粒径が大きく，かつ密度も大きい粒子は浮遊状態よりも，すぐに落下し皮膚などに付着し，接触性の障害が考えられる．その意味でも落下塵量をとらえることは必要である．我々は落下塵量をみるために

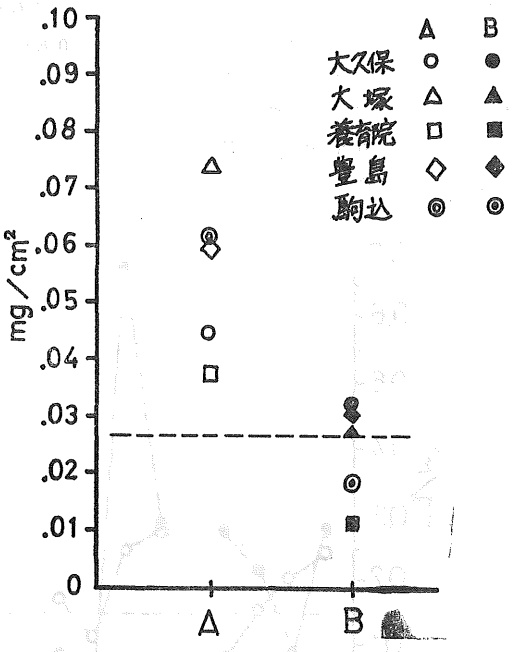


図4. 落下塵量

水をはったシャーレをA及びB点に勤務時間中置いておいた．そしてその重量を秤量し，シャーレ面積当りの重量として図4に示した．図から明らかなように病院によるバラツキがみられるが，A，B点での平均値は0.056mg/cm²，0.024mg/cm²とA点が高い値を示している．末永らの資料[6]による評価法として mg/100cm²・hrをとっているのでこの単位に換算してみると，大久保A点0.56，B点0.40，大塚A点0.93，B点0.35，養育院A点0.48，B点0.15，豊島A点0.75，B点0.39，駒込A点0.78，B点0.24になり，資料の中の愛川の報告0.24～0.45mg/100cm²・hr より若干多い結果となった．また，別な評価法として大気汚染で用いられている降下ばいじん量にならって換算してみた．一番多かった大塚病院のA点は，22.2ton/km²/month，B点8.5ton/km²/monthとB点で50年の都内の平均値程度であり，A点はその2.5倍もあるという計算になり，相当落下塵量が多い．図中の破線ラインは，50年の平均値8.2ton/km²/monthを示すものであるが，このラインより上のところは落下塵量が多いと判断されよう．ちなみにこのラインより下には，養育院及び駒込病院のB点があるのみであった．落下塵量の大小には，調剤者及び分包作業者の作業方法の良し悪しが相当程度影響されるので，調剤台の秤量器付近への局所集塵器の設置とともに，調剤者自身の作業方法の改善を望みたい．

個人暴露濃度　調剤業務（主として秤量，攪拌作業）

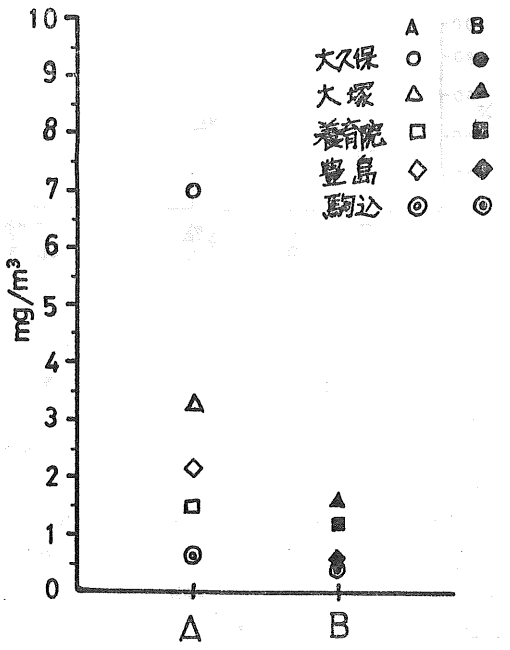


図 5. 個人サンプラーによる重量濃度

をすることで，調剤者自身がどの程度の粉塵を吸入しているかをみるために，調剤者自身（A），及びその他の散剤を扱わない作業従事者（B）に，個人サンプラー（吸引速度毎分5 l）を装着してもらい，業務のピーク時である10～13時にかけて測定した．

結果は図5の通りであり，調剤室設備の良し悪しに関係した濃度を示している．

つまり，大久保及び大塚病院は自然換気で局所型除塵器が1台あるだけであり，豊島病院は機械換気ではあるが，局所型集塵器が2台という実状であった．これに比べ養育院及び駒込病院は機械換気が完備なうえ，調剤台自身及びその周辺部に現状で考えられている一応の集塵装置が施されており，薬塵対策を考えた調剤室のモデルと言える．

個人暴露量にも前述の落下塵と同様，調剤者自身の調剤方法にも左右されるが，集塵装置の完備（散薬台の下または裏への集塵口，撹拌器の集塵カバーなど）の有無による影響が相当程度あることが推定された．

今回の暴露濃度の評価として，木村[7,8]の報告では薬品の混合作業をする人の平均的レベルとして9.2mg/m³があり，これから判断して大久保病院での7mg/m³はこれと同等であるが，ほかの病院ではこれより少ない量であった．個人暴露濃度は粉塵の発生源と作業者との位置関係，とくに作業場内の気流の条件などによって，その濃度には著るしい相違が生じることがあり，1回の測定では不十分で，今後多くの調剤者について実施したいと考えている．

4） アンケート調査結果について

薬塵の影響と思われる諸症状が実際にどの程度起っているかをみるため，アンケート調査（回収率86%）を実施した．その質問事項は，勤務年数，症状としてアレルギー性鼻炎，接触性皮膚炎等を有したことがあるか否か，調剤時の保護具の使用状況，症状が増悪するのはどういう時かなどである．

アンケートの結果，まず調剤室勤務者の年齢構成及び性別比をみると20歳台が過半数を占めており，若い人が多い職場であることがいえ，男女別では大久保病院を除いては女性の占める割合が多い．また，勤務年数については，1年未満，3～4年，10年以上がほぼ同数あり，今回調査したなかには，比較的新しい病院が含まれているための結果と思われる．薬塵による影響（薬局アレルギー）については，個人的体質が大きく左右すると思われ，これら性別，勤務年数との間には明らかなる関係は見い出されなかった．次に，我々があげた症状（喘息，じんま疹，アレルギー性皮膚炎，湿疹，アレルギー性鼻炎，アレルギー性結膜炎，咽頭異和感，気管支炎）について経験したかどうかの質問に対して「経験したことがある」，「今も続いている」について各病院毎に有症状者の割合としてみたのが図6である．病院毎の人数が一定でないので比較しにくいが，大久保，大塚，豊島の各病院では平均33%（10人として3人強）の人がいずれかの症状を経験している．また，「今も続いているか」になるとその割合は低下しており，症状としては短期間

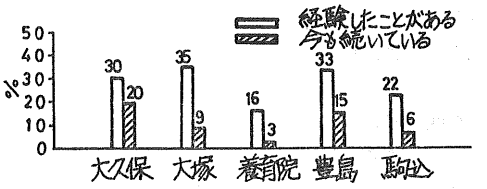


図 6. 各病院毎の有症状者の割合

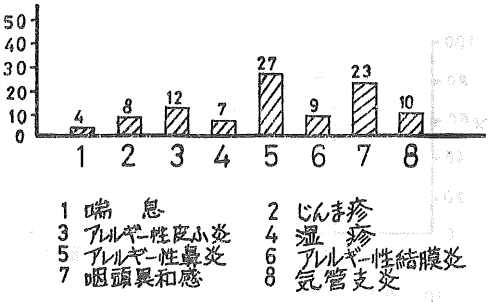


図 7. 各症状を「今までに経験した」と答えた割合

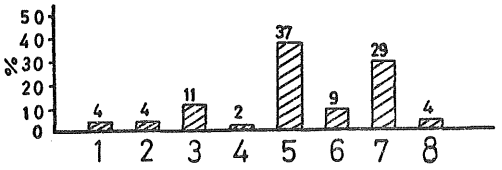


図 8. 各症状が「今も続いている」と答えた割合

のものであると推察される．図7として経験した症状の内訳を示したが，症状として高い割合を示しているのはアレルギー性鼻炎と咽頭異和感であった．そしてそれらの症状が「現在も続いているか」に対しても前述の症状が多いことがわかる（図8）．更に，これらの症状が増悪する時として，「アレルギー性鼻炎」については散薬秤量時，風邪気味の時，冷気にあたる時など，「咽頭異和感」については冬などの乾燥期，散薬調剤時，疲労時などを訴えており，調剤室の環境状態は事務室等と異なり，特殊作業環境としての環境衛生基準が必要であると思われた．また，上記症状経験者及び継続者のうち「薬局に勤務してから起った」と回答した人の割合を図9に示したが，大塚及び豊島病院でその割合が大きいことが

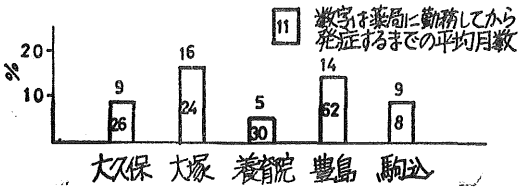


図 9. 各病院毎の「薬局に勤務してから起った」と答えた人の割合

注目されよう．これには何度か前述しているように，調剤室の狭さ，集塵設備の不十分さなどが関連しているものと思われる．棒グラフの中の数字は症状が起きるまでの期間（月数）を示しているが，病院自体が新しく，したがって調剤室勤務年数が少ない駒込病院を除いて，ほかの病院でみると2～5年で症状が起きることを示しており，急性的な初期症状は個人個人により現われる時

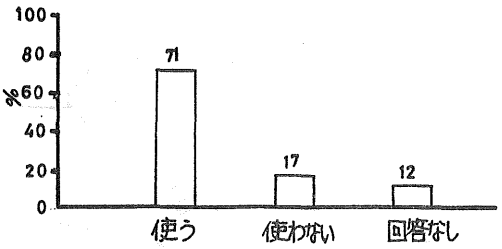


図10. 調剤の時「保護具を使いますか」に対する回答

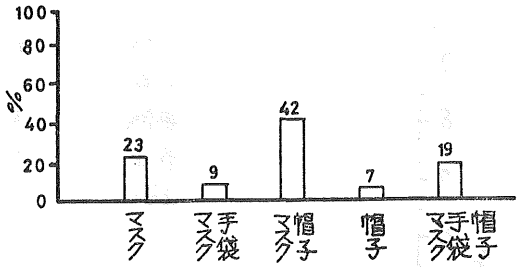


図 11.「使う」と答えた人の保護具の内訳

期は異なると思われるが，環境状態（特に薬塵に対して）の悪い職場に5年以上勤務すると慢性的影響も生じるものと思われる．次に，薬塵に対する防禦の面から「調剤時何らかの保護具を使いますか」に対する回答を図10及び図11に示す．病院による差はなく，全体で「使う」と答えたのは71%であり，予想に反し意外と少なかった．これには「慣れ」からくるこれら保護具使用のわずらわしさがあると思われた．保護具の内容をみると，一番多いのがマスクと帽子類（女性の場合三角巾）の併用で，次いでマスクのみ，マスクと手袋と帽子類という順であった．完全防護の点からは最後の組み合わせが望ましいが，仕事の仕易さなどからか，三者を着用する割合は少なかった．アンケートの最後に現在での問題点について述べてもらったが，一番多かったのが集塵設備の不備，調剤室の狭さであり，逆に言えば，これらを改善することで調剤室の薬塵に対するより進んだ解決策になり得るであろう．

結　語

今回の調査の結果をまとめてみると次のようなことがあげられる．

1) 調剤室内の浮遊粉塵量，落下塵量とも他の職場よりも多く，A点とB点ではその濃度に差がみられるので，分包機周辺（調剤台自体も含む）の局所集塵が必要である．

2) 調剤による散剤の飛散程度には調剤者の調剤方法による影響があるが，集塵設備（分包機への吸引フードの設置，散薬台の下または裏面への集塵口の設置，撹拌器への集塵カバーの設置など）の整備の良し悪しによる濃度の差が，特に個人暴露濃度の場合みられた．

3) 分包機については小西式とパイルパッカー式があり，落下塵量及び使用操作からみて，使用頻度の高い小西式の方が散剤の飛散が大きい．

4) スペース的に狭い病院（大塚及び豊島）では何らかの症状を訴えている率が高い．

5) 調剤室勤務者からの症状としては，アレルギー性

鼻炎，咽頭異和感が多い．

謝辞 今回の実態調査に際し，事務的な面で御協力いただいた総務局勤労部衛生管理課石津喜美子主査並びにデータ等の整理に御尽力いただいた職業病検診センター兵藤篤子氏に対して厚く謝意を表します．

文 献

1) 真木義次：月刊薬事，18(1)，81，1976
2) 笛木隆三：ファルマシア，7(5)，364，1971
3) 広瀬朝次ほか：薬剤学別冊，34(1)，61，1974
4) 朝長文弥：月刊薬事，18(1)，95，1976
5) 佐藤泰仁ほか：未発表資料
6) 末永泉二ほか：薬剤学，26(3)，169，1966
7) 木村菊二：労働科学，51(6)，313，1975
8) 木村菊二：労働科学，51(3)，135，1975
9) 福沢 寿ほか：薬剤学別冊，28(1)，6，1968
10) 水野謹爾ほか：薬剤学別冊，31(1)，60，1970
11) 平岡栄一ほか：薬剤学別冊，35(1)，13，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 242—246, 1976

大気中における塩素系炭化水素の挙動

多田宇宏*, 太田与洋*, 溝口 勲*

Behavior of Chlorinated Hydrocarbons in the Urban Air

TAKAHIRO TADA*, TOMOHIRO OHTA* and ISAO MIZOGUCHI*

The concentrations of CH_3CCl_3, CCl_4, C_2HCl_3 and C_2Cl_4 in urban air were measured intermittently every half hour at a station located in Ohta ward, Tokyo, from 10 September to 27 October '75, in order to evaluate the influences of the meteorological conditions on them and their diurnal changes. Each average value on cloudy days was higher than that on clear days, and that of rainy days was lower than that on clear days. CH_3CCl_3, CCl_4, C_2HCl_3 and C_2Cl_4 were appreciably correlated with other air pollutants, such as CO, SO_2, suspended particulate matter. Standard deviation for each chemical was observed almost as large as average value. These results showed the effects of meteorological conditions and industrial activities on the concentrations of the chlorinated hydrocarbons.

緒 言

最近，大気中に存在する低級ハロゲン化炭化水素についての研究が，各方面で活発になっている[1-4]．

先に，太田らは，メタン，エタン，エチレン，などの塩素誘導体が大気中に存在することを指摘し[5]，塩素系炭化水素のトリクロルエタン（以下，CH_3CCl_3と記す），四塩化炭素（以下，CCl_4と記す），トリクロルエチレン（以下，C_2HCl_3と記す），およびパークロルエチレン（以下，C_2Cl_4と記す），を1年間，1月，1回，都内26カ所でサンプリングを行ない，分析した．そして，天候，風向，風力，などの条件による濃度の変化との関連を知り，これらの物質の発生源である工業地域と濃度分布との関連について報告した[6]．

今回は，これに引き続き，自動ガス採取装置を用いて，都内大田区において，昭和50年9月10日から10月27日までの1カ月あまり，30分間隔で，ガスクロマトグラフを用いて連続測定を行ない，天候のこれら汚染物質濃度に与える影響，および1日の時間変化について，調査したので報告する．

分 析 法

従来，この種のサンプリングに用いられたガラス注射器では，保存期間中に多少のガス交換が起るため，現場でサンプリング直後に分析する必要がある．このため自動ガス採取装置を用いて，1m*l*の空気を30分ごとに採取し，電子捕獲型検出器（ECD）の付いたガスクロマトグラフに自動的に注入し，得られたガスクロマトグラムのピークの高さを標準ガスで得た検量線によって濃度に換算した．

装置 自動ガス採取装置；日本クロマト工業株式会社製，自動ガスサンプラー，ガスクロマトグラフ；島津GC—3BE．

測定条件 カラム；ガラスカラム，3×210mm 充てん剤；シリコンDC—200，20%，ChromosorbW—AW カラム温度；60° 検出器；ECD（線源 ^{63}Ni）感度；10^2 レンジ；4 キャリヤーガス；N_2（流量 60m*l*/min）

検量線 真空ビンを用い，標準的な2段階希釈法によって標準ガスを作った．

1*l* 真空ビンを，洗浄後 300° に加熱しながら真空ポンプで4時間脱気を行ない，吸着物質が認められなくなったものを用い，標準物質は，和光純薬工業の試薬特級を使用した．

CH_3CCl_3, C_2HCl_3, C_2Cl_4, CCl_4 をそれぞれ 10m*l*, 10m*l*, 10m*l*, 1m*l* ずつを混合し，そこから 1μl をとり，1*l* 真空ビンに入れ気化させ，さらにそこから 3m*l* をとり 1*l* 真空ビンで希釈した．得た標準ガスの濃度はそれぞれ，177ppb, 195ppb, 171ppb, 18ppb と計算された．標準ガス，10μl, 20μl, 40μl, 70μl, 100μl, 150μl, 200μl をガスタイトシリンジで採取し，ガスクロマ

* 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

トグラフに注入し，得たガスクロマトグラムのピークの高さによって検量線を作成した．

また，標準ガスが低濃度であるので，希釈のさい真空ビンなどへの吸着の有無を検討するため，はじめの標準ガスより濃度が3分の1の標準ガスを作り，検量線を作成した結果，さきの検量線と一致したことから，吸着による影響は，ないものと判断した．

結果および考察

結果 各物質についての測定日ごとの24時間の平均濃度値を Table 1 に示した．CH_3CCl_3 と C_2HCl_3 はともに最高値は9月12日，最低値は10月26日であった．そして，各物質の最高値と最低値の比は，CH_3CCl_3, 10.7, CCl_4, 3.6, C_2HCl_3, 25.6, C_2Cl_4, 19, であり，かなりの日間変動があった．また全測定期間を通じての各時間ごとの平均値濃度を，Table 2 に示した．各物質の

Table 1. Daily average concentrations for each chemical (ppb)

		CH_3CCl_3	CCl_4	C_2HCl_3	C_2Cl_4
September	10	3.0	0.27	4.7	3.4
	11	2.8	0.29	6.3	8.5
	12	4.1	0.37	10.7	8.1
	13	2.3	0.51	5.0	3.9
	14	0.6	0.20	0.8	1.3
	16	0.8	0.14	4.0	14.6
	17	0.8	0.22	3.2	5.3
	18	3.6	0.32	5.9	5.6
	19	1.9	0.33	2.9	3.7
	20	0.8	0.18	0.6	1.9
	22	2.2	0.18	7.3	10.6
	23	1.3	0.25	3.3	4.3
	24	0.9	0.21	1.3	2.7
	25	0.9	0.17	2.0	3.0
	26	1.7	0.21	3.2	3.4
	27	1.5	0.28	3.8	5.2
	28	1.9	0.22	3.3	4.5
	29	1.1	0.19	2.0	4.4
	30	1.1	0.18	2.4	3.5
October	1	0.9	0.17	1.8	3.9
	2	2.2	0.26	4.6	10.0
	3	2.5	0.48	5.2	10.0
	4	2.6	0.44	4.8	9.3
	5	1.4	0.39	2.3	3.8
	6	1.1	0.17	1.7	3.0
	11	3.0	0.42	4.5	13.7
	12	3.4	0.35	5.6	8.4
	13	1.5	0.22	3.3	5.3
	15	0.7	0.17	1.3	5.9
	16	1.5	0.27	3.2	3.4
	25	0.4	0.16	1.3	1.8
	26	0.4	0.18	0.4	0.8
	27	1.1	0.22	2.0	3.3

Table 2. Hourly average concentrations for each chemical (ppb)

Time (hours)	CH_3CCl_3	CCl_4	C_2HCl_3	C_2Cl_4
0 — 1	1.6	0.27	3.6	4.3
1 — 2	2.0	0.34	4.9	4.3
2 — 3	2.1	0.26	4.2	3.9
3 — 4	2.1	0.26	4.5	4.0
4 — 5	1.9	0.45	4.4	4.0
5 — 6	1.9	0.39	3.6	3.9
6 — 7	1.8	0.29	3.2	3.8
7 — 8	1.8	0.41	2.3	3.5
8 — 9	1.8	0.30	3.2	3.6
9 — 10	2.3	0.29	4.6	4.3
10 — 11	1.9	0.30	4.1	6.0
11 — 12	1.8	0.25	3.6	7.1
12 — 13	1.7	0.23	3.2	6.2
13 — 14	1.6	0.26	3.1	5.2
14 — 15	1.6	0.24	2.9	5.6
15 — 16	1.6	0.25	3.3	5.8
16 — 17	1.8	0.21	3.9	6.6
17 — 18	1.5	0.22	3.4	7.3
18 — 19	1.3	0.22	3.3	8.0
19 — 20	1.6	0.20	3.0	8.4
20 — 21	1.3	0.20	3.9	5.8
21 — 22	1.3	0.21	2.6	4.9
22 — 23	1.4	0.30	2.8	4.9
23 — 24	1.4	0.26	2.6	4.5

最高値および最低値の時間は，CH_3CCl_3, 9時台，21時台，CCl_4, 4時台，20時台，C_2HCl_3, 9時台，23時台，C_2Cl_4, 19時台，7時台，であった．また，ガスクロマトグラムの一般的なものとして9月10日22時53分に測定

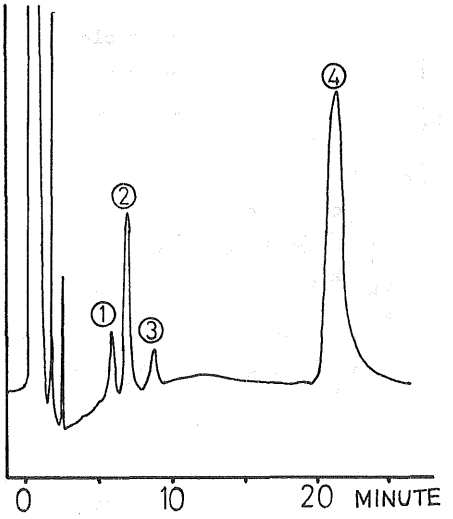


Fig. 1. Typical example of gas chromatogram
①CH_3CCl_3 ③C_2HCl_3
②CCl_4 ④C_2Cl_4

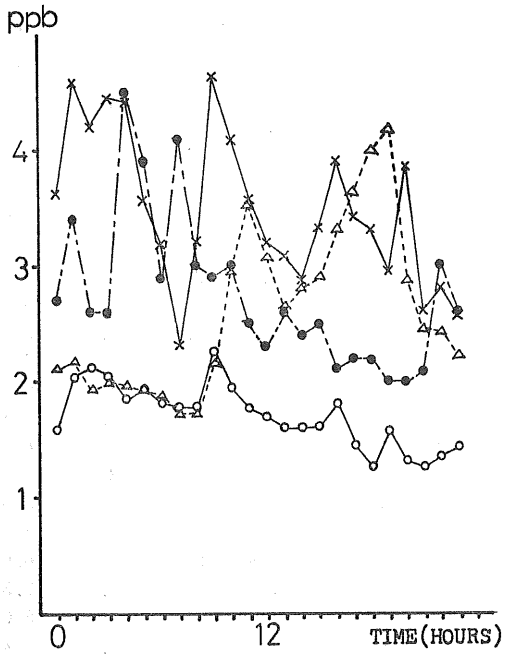


Fig. 2. Diurnal variation of average concentrations for each chemical
○——○CH_3CCl_3
●- - -●CCl_4
×——×C_2HCl_3
△……△C_2Cl_4

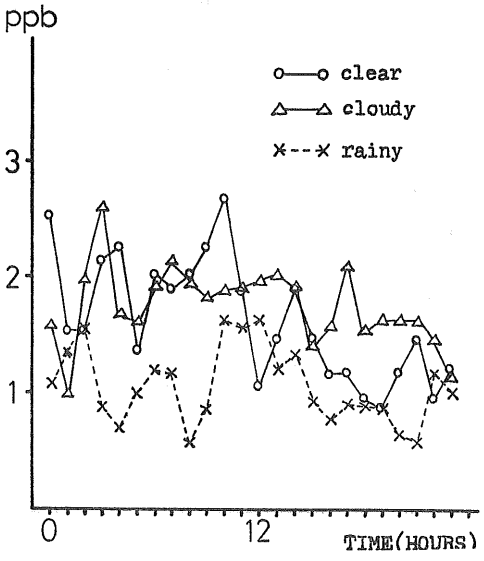


Fig. 3. Diurnal variation depending on weather for CH_3CCl_3

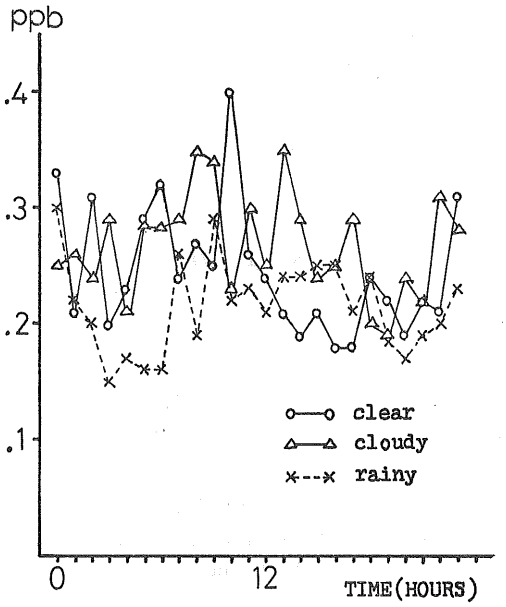


Fig. 4. Diurnal variation depending on weather for CCl_4

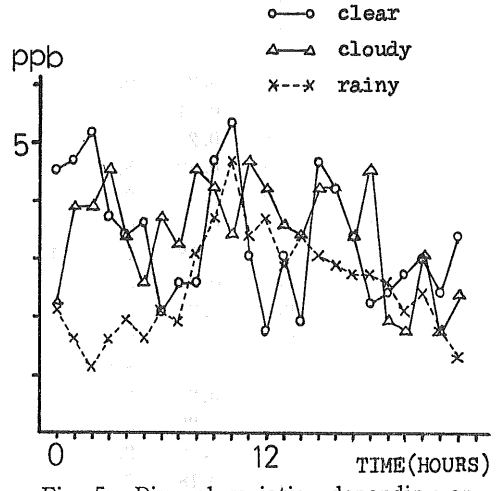


Fig. 5. Diurnal variation depending on weather for C_2HCl_3

したものをFig. 1に示した．Fig. 2には，全測定期間を通しての各時間ごとの平均濃度値の時間変化を示した．これによると，CH_3CCl_3 と C_2HCl_3 とは，かなり類似した形を示していることがわかる．C_2Cl_4 は，0時台から徐々に減少し，7時台で最低値となり，9時台から増加しはじめ11時台で午前中のピークに達し，13時台でいったん減少し，14時台から再び増加しはじめ19時台で最高値に達する．その後21時台まで急激に減少した．CCl_4 は，午前中高く，午後に低い傾向が認められた．Fig. 3 から Fig. 6 までは，CH_3CCl_3, CCl_4, C_2HCl_3, C_2Cl_4 の

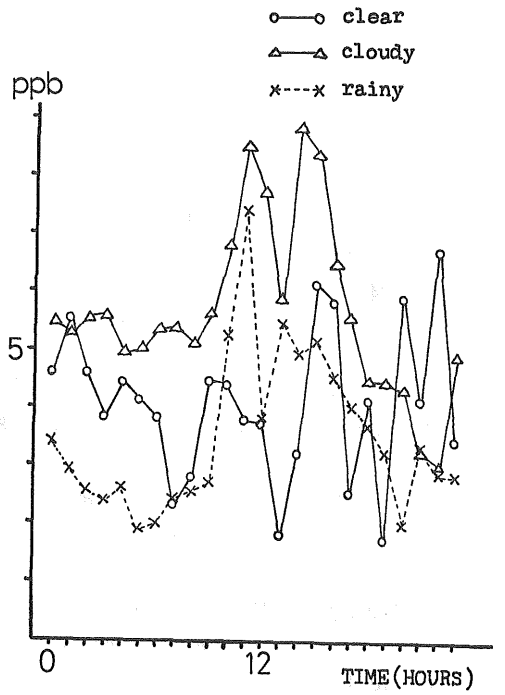


Fig. 6. Diurnal variation depending on weather for C_2Cl_4

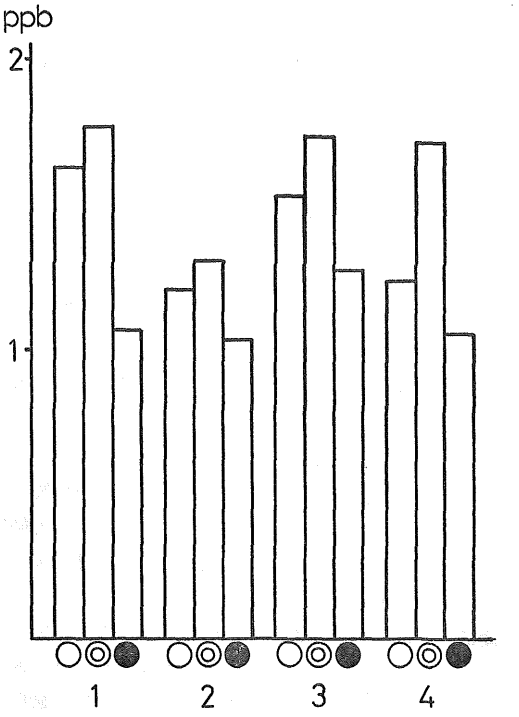


Fig. 7. Total average concentration depending on weather for each chemical

1. CH_3CCl_3
2. $CCl_4\times5$
3. $C_2HCl_3\times0.5$
4. $C_2Cl_4\times0.3$

○ clear
◎ cloudy
● rainy

晴，曇，雨，に分けた各時間ごとの平均濃度値の時間変化を示した．各物質とも，時間変動がかなり認められ，また8時台以前および20時台以後は，雨の時が，晴，曇の時より低い傾向がみられた．CCl_4は，12時台から17時台まで，C_2HCl_3，C_2Cl_4，では，10時台から14時台まで晴の時が，曇，雨の時より低い傾向が認められた．Fig. 7には，晴，曇，雨，における各物質の平均濃度値を示した．ここでは，四物質とも曇，晴，雨，の順に濃度が減少していくことが認められた．

また，これら四物質を他の大気汚染物質である一酸化炭素，亜硫酸ガス，オゾン，大気中浮遊じんあい，との相関をみたところ，オゾン以外の物質と相関があることが認められた．

全測定の平均濃度値および標準偏差，最高値，最低値（単位 ppb）は，CH_3CCl_3，1.7±1.7，20.6，0.2以下，CCl_4，0.27±0.27，6.21，0.1，C_2HCl_3，3.5±3.7，47.1，0.8以下，C_2Cl_4，5.7±5.5，52.6，0.2以下であった．

考察 各物質に共通して測定値のばらつきが大きい．このことは，測定場所が，京浜工業地帯の北側に隣接する位置であったために，これらの物質が，発生源から発生したのち，充分拡散されないうちに測定してしまうためと，天候，風向，風速による影響もかなり受けたためと考えられる．CH_3CCl_3 と C_2HCl_3 は，Table 1 での最高値，最低値とも同じ日であり，Fig. 2 においても9時台にピークがあり，そのあと徐々に値が減少していくという類似したグラフの形を示した．このことは，これら二つの物質の発生源が，同一の産業活動によるものであることを推定させる．C_2Cl_4 の Fig. 2 でのグラフの形は，クリーニング業の活動の時間とよく一致していた．このことは，クリーニング業が，発生源であることを裏付けている．

つぎに，サンプリング時刻を，晴，曇，雨，の三つのグループに分け，これらの物質の天候における濃度値をみてみると，平均濃度値は，Fig. 7 で示したように各物質とも，曇，晴，雨の順に減少していくことが認められた．このことは，雨は，これらの物質を大気中から除くという洗浄効果があるものと推定される．また曇りの日には，逆転層が形成されやすく，これらの物質を拡散させにくいという効果があるためと考えられる．このことから晴れた日が曇りの日よりも低い濃度であるということは，晴れた日は汚染物質が拡散されやすく，曇りの

日は拡散されにくいということが主な理由であると考えられる.

CH_3CCl_3, CCl_4, C_2HCl_2, C_2Cl_4, について, CO, SO_2, O_3, 紫外線, 大気浮遊じんあい, との7時台, 11時台, 15時台における相関をみてみると, これら四物質と O_3, 紫外線との間には, ほとんど相関はみられなかったが, CO, SO_2, 大気浮遊じんあい, との間には相関がみられた. これらのことから塩素系炭化水素は, 他の大気汚染物質である CO, SO_2, 大気浮遊じんあい, などと同じように大気中の濃度は, 産業活動や, 気象条件が大きな影響を与えていると考えられる.

C_2HCl_3—NO_2系の反応装置を用いた実験では, C_2HCl_3は, かなりの光化学反応性のあることが報告されている[7]. これらのことも晴れの日の日中の濃度減少に関与している可能性があるが, しかし, これらの物質の光化学反応性をフィールド実験で見つけることは, 汚染物質の発生が一定でなく, また, 気象条件の影響が大きいことからも困難なものとおもわれる.

謝辞 今回の調査にあたり, サンプリングにご協力いただいた衛生局公害保健課の人見達雄氏, ならびに適切な助言をいただいた当研究所水質研究科の森田昌敏研究員に深謝いたします.

(本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「大気中有機化合物の総分析」の一部として実施したものである.)

文　献

1) Lovelock, J. E. : *Nature*, **230**, 9, 1971
2) Lovelock, J.E., R.J. Maggs, and R.J. Wade : *Nature*, **241**, 194, 1973
3) Murray, A.J. and J.P. Riley : Nature, **242**, 37, 1973
4) Simmonds, P.G., S.L. Kerrin, J.E. Lovelock, and H. F. Shair : *Atmospheric Environment*, **8**, 209, 1974
5) 太田与洋, 溝口　勲 : 大気汚染ニュース, **85**, 3, 1974
6) Ohta, T., M. Morita, and I. Mizoguchi : *Atmospheric Environment*, **10**, 557, 1976
7) Bruce, W.G. Jr., L.H. Philip, J.B. Joseph, and C.N. Richard : *Environmental Science & Technology*, **10**, 58, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 247—250, 1976

大気中ハロゲン化炭化水素測定への Gas Phase Coulometry の応用

瀬戸　博*, 秋山和幸*, 溝口　勲*

An Application of Gas Phase Coulometry for Determination of Atmospheric Halocarbons

HIROSHI SETO*, KAZUYUKI AKIYAMA* and ISAO MIZOGUCHI*

The evaluation of gas phase coulometry for measurement of atmospheric halocarbons and its practical conditions were studied. It was necessary to set the proper conditions of carrier gas flow rate, ECD temperature and pulse frequency which affect the accuracy of coulometry. Applicable compounds for gas phase coulometry in atmospheric halocarbons were CCl_3F, CH_3I, CCl_4, $C_2H_3Cl_3$ and C_2Cl_4.

緒　言

電子捕獲型検出器（Electron Capture Detector 以下 ECD と略記す）はハロゲン，酸素，イオウ化合物，多核芳香族炭化水素などに対し高感度の応答を示すため農薬，PCB などの環境汚染物質の分析に広く利用されている．

1971年，Lovelock ら[1]は ECD による Gas Phase Coulometry の理論と実験的証明を報告している．この方法は ECD 内でキャリアガスの電離によって生じた電子が，親電子化合物1分子につき1個吸収されるとすれば，吸収された電気量を測定することによりファラデーの法則から被測定物質の量が計算できるという原理に基づいている．イオン化率が100％以下の場合には2個の同質な ECD を直列に接続することによりイオン化率を求め補正すればよい．したがってこの方法の利点は第1に絶対測定であること，大気の超微量分析において難しいとされる標準濃度ガスが不要となること，第2に未知物質でも濃度の測定ができること，第3にイオン化率のデータが保持時間とともに化合物の同定に役立つことである．

本方法の応用例[1,3,7,10,11]はまだ少なく，分析条件，精度，適用できる化合物の種類などについてじゅうぶん明らかにされていない．そこで筆者らはこれらの点について検討を行ない大気中ハロゲン化炭化水素の測定法としての評価を試みたので報告する．

理　論

2個の同質な ECD を直列にガス流路に接続し，化合物ABのWモルによりそれぞれの ECD から X_1, X_2 クーロンという信号が得られたとする．ABのイオン化率がじゅうぶんに高くかつ濃度が低い場合には

$$X_1=PQ \tag{1}$$

$$X_2=P(Q-PQ) \tag{2}$$

$$P=1-X_2/X_1 \tag{3}$$

Q はファラデーの法則 $Q=96{,}500\ W$ を満たす電気量である．

式(1)(3)から

$$W=\frac{X_1}{96{,}500\left(1-\frac{X_2}{X_1}\right)} \tag{4}$$

t℃ のとき試料を V ml 注入すれば，体積濃度 C_{AB} は(5)式により求められる．

$$C_{AB}=\frac{8.5\times10^{-4}\times(273+t)X_1}{V\left(1-\frac{X_2}{X_1}\right)} \tag{5}$$

実　験

装置　概念図を Fig. 1 に示した．ガスクロは島津製 GC-5A，検出器は ^{63}Ni 10mc ECD で2個直列に接続されている．各々の ECD からの信号は島津エレクトロメータ EM-5S を通じて2ペンレコーダで記録される．ECD 電源は島津 EVS-5（電圧 50V，パルス周波数500Hz，12KHz可変）を使用した．カラムは長さ 150 cm，内径 0.3cm のガラスカラム，充てん剤は Silicone DC-200 10％ on Chromosorb W-AW 60—80mesh である．

カラム温度45℃，試料口温度50℃，キャリアガスは高

* 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

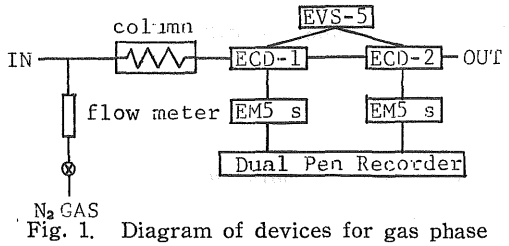


Fig. 1. Diagram of devices for gas phase coulometry

純度窒素を用いた.

標準濃度ガス 窒素ガスによる希釈法を用いた. 原液数 μl を正確にマイクロシリンジにとり, 1 l 真空びんを用いて清浄な窒素ガスにより2段階に希釈し 5～26 ppb とした. この程度の濃度ならば窒素ガス中の不純物の影響は無視できる.

大気試料採取方法 20～500 ml のガラスびん中の空気をじゅうぶんに交換したのちアルミ箔数枚を中蓋とし固く締める. 予備実験により外部とのガス交換がないことを確認した. この状態で測定地点から持ち帰り8時間以内にマイクロシリンジでアルミ箔を貫通し試料びん中の空気を適当量採取しガスクロに注入する.

GC-MS による同定 GC-MS 用試料は 日本オゾン製臭気濃縮装置により 100～200l を濃縮して得た. GC-MS システムは島津 LKB 9000 型を用いた. 作動条件はつぎのとおりである. カラム：300cm×0.3cm ガラスカラム, 充てん剤：10% Silicone DC 200 on Chromosorb W-AW 60—80 mesh, 温度：サンプル注入部 50℃, カラムオーブン 30℃, セパレータ 180℃, キャリアーガス：ヘリウム10ml/min検出器：TICM, 加速電圧：35KV, イオン化室温度230℃, 励起エネルギー：70eV

結果および考察

分析条件の検討 (1)既知濃度の CCl_4 および CCl_3F の注入量とピーク面積との関係を Fig. 2 に示した. 濃度が低ければじゅうぶんに直線性がある. しかしさらに高濃度になると直線からはずれ上方にわん曲する. 感度が上昇したような印象を与えるが, これは ECD 内での副次的な反応によりみかけのイオン化率が高くなるためと考えられる. クーロメトリーの場合には直線の範囲内で測定できるように濃度とサンプル量を加減しなければならない. (2)キャリアガス流速の影響を Fig. 3, 4 に示した. Fig. 3 は流速を上げるとイオン化率が低下すること, Fig. 4 は流速とクーロメトリーの正確さとの関係を示し CCl_4 では影響がないが CCl_3F では流速を上げると不正確になりクーロメトリーができないことを示している. 以上のことからキャリアガス流速はなるべく遅くすることが必要である. しかし過度に低速にすることは再結合の問題があり避けねばならない. (3) ECD 温度の影響を Fig. 5, 6 に示した. ECD 温度を上げるとイオン化率は若干下がるが実際の濃度に近づき正確となる. 試料注入量を一定にし ECD 温度を変化させるとピーク面積は温度の上昇とともにわずかずつ増加する. これは電子捕獲係数が温度とともに増加し解離型電子捕獲反応をしているためと思われる. イオン化率が低下するのは DET. 2 の方がピーク面積の増加が大きくなるためだが, その理由は今のところ不明である. (4) ECD 電源パルス周波数の影響を Table 1 に示した. CCl_4, CCl_3F ともにパルス周波数が高くなるとイオン化率は大幅に低下する. また感度も 500Hz の場合を 100 とすれば 12KHz では37～45%となりいずれも半分以下に低下する. クーロメトリーの正確さという点でもパルス周波

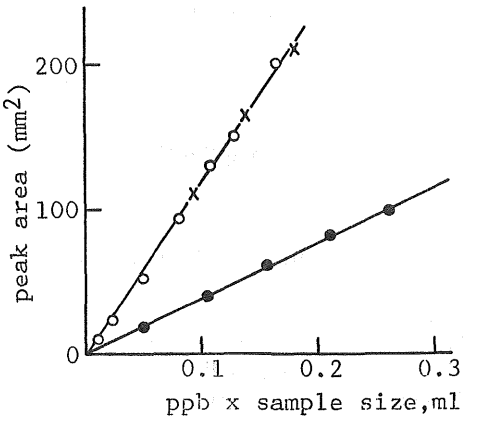


Fig. 2. Peak area *vs* solute concentration for CCl_4 and CCl_3F, Flow rate ; 20ml/min, ECD temp. ; 250°C
× CCl_4(f=500Hz) ○ CCl_3F(f=500Hz)
● CCl_3F(f=12KHz)

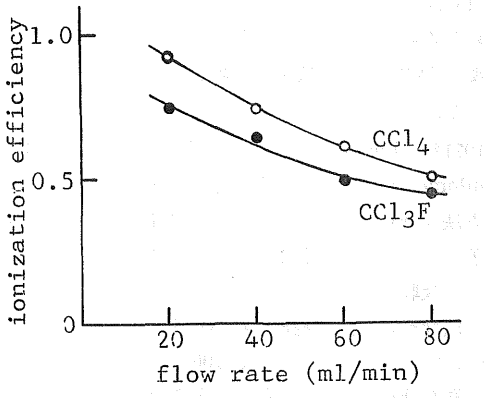


Fig. 3. Effect of flow rate on ionization efficiency (P), ECD temp. ; 250°C, Pulse freq. ; 500Hz

Table 1. Effect of pulse frequency on coulometric response

Compounds	Ionization efficiency f=500Hz	12KHz	Sensitivity 500Hz=100	Accuracy 500Hz=100
CCl_3F	0.76	0.30	40	93
CCl_3H	≒0	≒0	37	—
CCl_4	0.91	0.45	45	79

Flow rate ; 20m*l*/min, ECD temp. ; 200°C

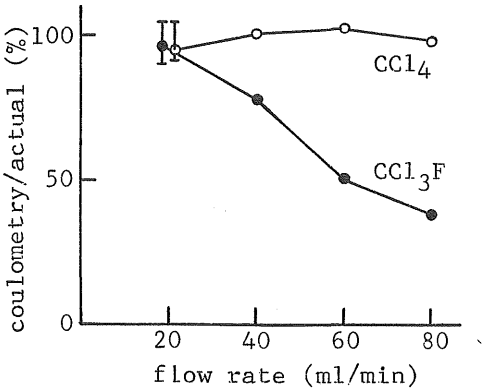


Fig. 4. Effect of flow rate on coulometric response. ECD temp. ; 250°C, Pulse freq. ; 500Hz

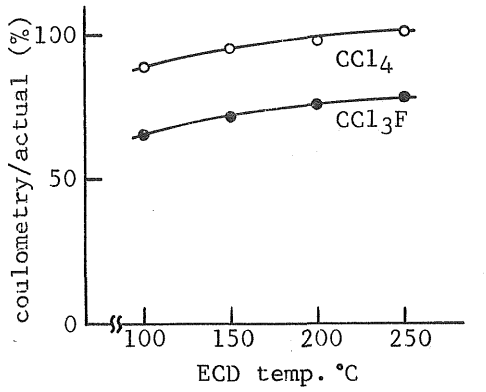


Fig. 6. Effect of ECD temperature on coulometric response. Flow rate ; 40m*l*/min, Pulse freq. ; 500Hz

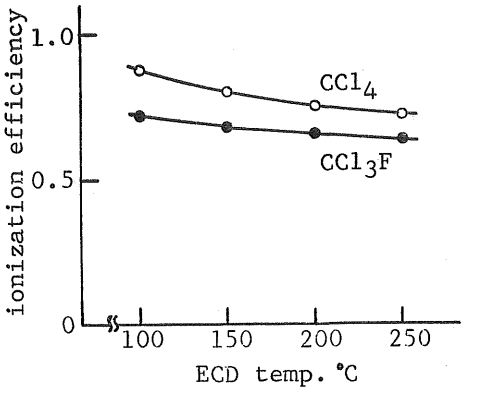


Fig. 5. Effect of ECD temperature on ionization efficiencies. Flow rate ; 40m*l*/min, Pulse freq. ; 500Hz

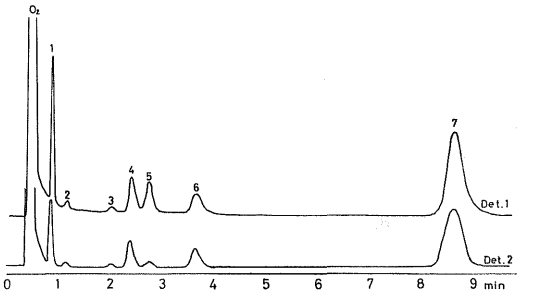


Fig. 7. Typical chromatogram of air sample Flow rate; 40m*l*/min., ECD temp.; 250°C, Pulse freq.; 500Hz

数は低い方が適当である.

分析条件を検討した結果 Gas Phase Coulometry は測定範囲，キャリアガス流速，ECD 温度およびパルス周波数を適当に設定すれば高感度な絶対測定法として使用できることが確認された.

ECD 感受性の大気中微量物質の測定 代表的なガスクロマトグラムを Fig. 7 に示した. 酸素のピーク以後に現われる各々のピークに番号をつけ保持時間，イオン化率，マススペクトルなどのデータを各標準物質と比較同定した. 結果を Table 2 に示す.

マススペクトルにより各種の炭化水素が同定されたが，それらの中には Table 2 のハロゲン化炭化水素と保持時間が重なるものもある. しかし ECD の検出感度の特異性から10^6～10^7 程度の応答比を期待でき，これらの妨害物質の影響は通常の大気濃度ならばほとんど無視できるものと思われる.

検出された 8 種類のハロゲン化炭化水素のうちクーロメトリーが適用できるのは CCl_3F, CH_3I, $C_2H_3Cl_3$,

Table 2. Identification & gas phase coulometry of atmospheric halocarbons

Peak No.	Compounds	Ret. time (min.)	Masses (*m/e*)	P	Concentration (ppb)
1	CCl_3F	1.7	101, 103	0.76	0.1—1.4
2	CH_3I	2.2	*	0.64	—
	CH_2Cl_2	2.4	49, 51, 84, 86	≒0	**
3	$CHCl_3$	3.9	83, 85	≒0	**
4	$C_2H_3Cl_3$	4.9	97, 99	0.21	0.3—2.0
5	CCl_4	5.7	117, 119	0.91	0.1—0.4
6	C_2HCl_3	7.5	93, 128	≒0	**
7	C_2Cl_4	19.0	164, 166	0.56	0.3—2.5

Column ; Silicone DC-200 60—80 mesh 150cm 40°C, Flow rate ; 20ml/min.
P : Ionization efficiency
* not obtained mass spectra
** not amenable to analysis (P≒0)
Detectable limits of CCl_3F, $C_2H_3Cl_3$, CCl_4, C_2Cl_4 were 6, 27, 6, 30 ppt respectively

CCl_4, C_2Cl_4 の5種類である．表中の濃度は都内大気をクーロメトリーにより分析した結果である．但し CH_3I は CH_2Cl_2 とじゅうぶんに分離しないので濃度は求めなかった．

これまでにも大気中ハロゲン化炭化水素の測定報告はいくつかあり[2-4] 環境汚染上から注目されている．特に成層圏のオゾン層を破壊するといわれている CCl_2F_2, CCl_3F のようなクロロフルオロカーボン類は世界的な問題となっている．このような ppt オーダーの大気中ハロゲン化炭化水素を分析する手段は2つに大別できる．ECD によるガスクロマトグラフィー[2,6]と GC-MS による Mass monitor[8,9] の方法である．前者は高感度ではあるがカラムの分離が悪い場合，選択性に欠けまた塩化ビニルモノマーのように応答の低い化合物もあり測定できる化合物は限られる．後者は適当に濃縮さえすれば極めて選択性の高い分析方法であり総分析に適する．この手法により新たに CH_3Cl を大気中から検出したという報告[9] もある．

ECD を用いた Gas Phase Coulometry [1,3,7,20] はイオン化率の高い CCl_3F, CH_3I, CCl_4, C_2Cl_4 などに対しては高感度，絶対測定という他の方法にない利点を有しておりすぐれた分析方法であるといえよう．しかしイオン化率の比較的低い化合物では誤差が大きいので本法で分析するのは適当でない．

結　語

Gas Phase Coulometry による大気中ハロゲン化炭化水素の分析を行ない分析条件，測定可能な化合物の種類などについて検討した．精度を向上させるにはキャリアガス流速を遅く，ECD 温度は高く，パルス周波数は低く設定することが必要である．検出された大気中ハロゲン化炭化水素のうちクーロメトリーが適用できる化合物は CCl_3F, CH_3I, CCl_4, $C_2H_3Cl_3$, C_2Cl_4 であった．

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「大気中有機化合物の総分析」の一部として実施したものである．）

文　献

1) Lovelock, J.E., R.J. Maggs, and E.R. Adlard: *Anal. Chemistry*, 43, 1962, 1971
2) Murray, A.J. and J.P. Riley: *Nature*, 242, 37, 1973
3) Lovelock, J.E., R.J. Maggs, and R.J. Wade: *Nature*, 241, 194, 1973
4) Simmonds, P.G., S.L. Kerrin, J.E. Lovelock, and F.H. Shair: *Atmospheric Environment*, 8, 209, 1974
5) Molina, M.J. and F.S. Rowland: *Nature*, 249, 810, 1974
6) Chih-Wu Su and E.D. Goldberg: *Nature*, 245, 27, 1973
7) Willkniss, P.E., J.W. Swinnerton, R.A. Lamontagne, and D.J. Bressan: *Science*, 187, 832, 1975
8) Grimsrud, E.P. and R.A. Rasmussen: *Atmospheric Environment*, 9, 1014, 1975
9) Grimsrud, E.P. and R.A. Rasmussen: *ibid.*, 9, 1010, 1975
10) Lillian, D. and H.B. Singh: *Anal. Chemistry*, 46, 1060, 1974
11) Singh, H.B., D. Lillian, and A. Appleby: *ibid.*, 47, 860, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 251—253, 1976

東京都における大気中有機フッ素化合物の測定 (1)トリクロロフルオロメタン

瀬戸 博*, 秋山和幸*, 溝口 勲*

Measurement of Atmospheric Fluorocarbons in Tokyo Area (1) Trichlorofluoromethane

HIROSHI SETO*, KAZUYUKI AKIYAMA* and ISAO MIZOGUCHI*

Recently chlorofluorocarbons (CCl_3F, CCl_2F_2 etc.) are used widely as refrigerants and aerosol propellants. Concentrations and regional distribution of CCl_3F in Tokyo area were surveyed. Levels of CCl_3F in central parts and suburbs of Tokyo were 0.22-1.42 ppb (av. 0.53) and 0.17-0.26 ppb (av. 0.22), respectively. Heavy pollution in central parts of Tokyo may be associated with numerous sources such as buildings which were using CCl_3F as refrigerants for turbo type air conditioners.

緒 言

フロンあるいはフレオンで知られる一連の有機フッ素化合物（正式にはChlorofluorocarbonであるが便宜的にフロンと略記する）は冷媒，エアロゾル用噴射剤，発泡剤，溶剤などに大量に使用されるようになり全世界での年生産量は約百万トンにのぼっている（Table 1）．その大部分はフロン11（CCl_3F）とフロン12（CCl_2F_2）である．フロンガスが大気中に蓄積し成層圏に達した時オゾン層を破壊することが最近指摘[1,3]され，その結果予想される紫外線量増加による人間の健康や生態系に及ぼす影響が心配されている．

フロン汚染は地球化学的観点からとらえられるべきであるが，最大のフロン発生源とみられる大都市とその周辺に焦点を当てることは汚染の実態を把握する上で意義のあることであろう．今回筆者らはフロン11について測定法を検討し東京都における濃度範囲，地域差などについて知見を得たので報告する．

実 験

試薬 フロン11（Fluorotrichloromethane）東京化成工業（株）特級

試料採取方法 地上高1m付近の大気を前報[4]と同様に採取した．

分析 ガスクロマトグラフィーは島津GC-5Aを用いた．使用条件は次のとおりである．カラム：150cm×0.3cmガラスカラム，充てん剤：Silicone DC-200 10% on chromosorb W-AW 60—80mesh，カラム温度45°C，キャリアガス：高純度窒素ガス 20m*l*/min，検出器：^{63}Ni 10mc ECD 250°C，パルス周波数：500Hz．同定のためDOP，Silicone OV-17，Bentone 34+DDP，Sebaconitorileなど充てん剤を変えて保持時間が既知物質と同一であることを確認した．また前報[4]と同様にマススペクトルにより確認した．

標準ガス濃度決定 ㋑パーミエーションチューブ法 パーミエーションチューブは㈱ガステック製テフロンチューブ（内径3mm，肉厚0.5～1mm，有効長5～10cm）を使用し，次式により濃度を決定した．

$$C=\frac{K\times Pr\times L}{F}$$

C：発生ガス濃度（ppm），Pr：浸透速度（ng/min/cm），L：有効長（cm），F：キャリアガス量（m*l*/min）K：定数

浸透速度Prは次式で与えられる．

$$Pr=\frac{m\times 10^6}{L\times T}$$

m：減量（mg），T：経過時間（min）

㋺希釈法 あらかじめ0℃に保った液状のフロン11の数μlを正確にマイクロシリンジにとり1*l*真空ビンを用いて窒素ガスにより2段階に希釈し5～26ppbとした．

* 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

Table 1. Quantities of chlorofluorocarbons produced in Japan & in the world

Year	Chlorofluorocarbons ($\times 10^6$kg) Japan [9]	world*[10]
1963		214
1964		236
1965		287
1966	18	318
1967	22	364
1968	26	420
1969	31	497
1970	36	544
1971	50	604
1972	50	707
1973	59	782

* $CCl_3F+CCl_2F_2$
(not included other compounds)

結果および考察

標準ガス濃度決定 前述の希釈法の再現性は良好でクーロメトリー[4]で求めた値とも一致し信頼できるものと思われる．一方，パーミエーションチューブ法では浸透速度 Pr の大きさによって精度が異なり Pr の小さいものは誤差が大きいことが判明した．すなわちPr=2.2ng/min/cm のチューブではクーロメトリーによる理論値の0.4～2.3%ときわめて低いが，Pr=139 のチューブでは81%とかなり改善された．今後さらに改良する必要があろう．なお本分析方法の検出限界は3.68×10^{-14}g で1 m*l* のサンプルの場合 6 ppt であった．

東京都および近郊の大気中フロン11の濃度について 測定期間は1975年6月から1976年2月まで，採取地点は比較的工場の多い地域としてA：大田区蒲田，B：板橋区志村，商業地としてC：千代田区神田，D：新宿区大久保，住宅地としてE：渋谷区神宮前，F：狛江市，G：八王子市，H：埼玉県西浦和を選んだ．

Table 2. Concentrations of chlorofluorocarbon (CCl_3F) in Tokyo area ppb

Location	A	B	C	D	E	F	G	H
N	9	8	9	13	9	10	7	5
Min.	0.16	0.22	0.22	0.31	0.18	0.17	0.19	0.10
Max.	0.55	0.75	1.26	1.42	0.38	0.26	0.26	0.20
Au.	0.34	0.42	0.52	0.53	0.25	0.22	0.22	0.15
S.D.	0.16	0.20	0.39	0.38	0.06	0.03	0.03	0.04

A : Kamata Ohta-ku, B : Shimura Itabashi-ku,
C : Kanda Chiyoda-ku, D : Ohkubo Shinjuku-ku,
E : Jingumae Shibuya-ku, F : Komae city,
G : Hachiohji city, H : Nishi-Urawa Urawa city

Table 2 に示すように都内大気のフロン11濃度範囲は0.16～1.40ppb であった．大きな地域差はないが都心部は最低値，最高値，平均値とも高く住宅地では低い傾向を示した．これはフロン11の用途と関係があるものと思われる．すなわちフロン11は大部分がターボ式冷凍機用として工業用，商業用の大型空調装置に用いられている．都心部にはフロン11の発生源としてターボ式冷凍機を空調に用いるビル，デパート，映画館などが多いため濃度が高いのであろう．そこで，ターボ式冷凍機を使用している四つのビル内のフロン11濃度を測定したところ 5.3ppb, 1.10ppb, 1.06ppb, 0.72ppb で外気と比べて明らかに高濃度であることが認められた．神田，大久保で1.25ppb, 1.40ppb が測定されたことがあるが，付近でエアロゾルの使用や放出があったのか，気象条件のため放散せず滞留したためではないかと思われる．

拡散性の強い物質であるにもかかわらず，東京およびその近郊という割合狭い範囲で測定しても人間活動による汚染であることが結果に表われている．現在の地表付近の濃度は最低0.1ppb 程度，平均的には 0.2～0.3ppb 程度，都心部では 0.3～0.6ppb 程度である．既知のデータはカリフォルニア州ラ・ジュラピエル 0.37 ppb[5,6] サンジェゴ0.29ppb[5]，ワシントン DC 0.16～0.38ppb ニューブランズウィック 0.37ppb[7] などで東京とほぼ同程度である．フロンがどのように上空に拡がっていくかを調べた Zafonte ら[8] の報告によれば地表付近（フロン12＝1～3 ppb）から上空にいくに従って濃度は減少し約4000フィート～16000フィートでほぼ一定(フロン11＝0.060ppb，フロン 12＝0.090ppb）になるという．また海洋での濃度は0.075～0.086ppb で年々増加しつつある[6] という．これらの知見を総合すればフロンは主として都市部で放出され水平，垂直方向へ気団の移動とともに対流圏内を拡散し蓄積されつつあると言える．今回は，フロン12については測定しなかった．しかし生産量や今までの報告から大気中にはフロン11よりも多量に存在しているとみてよいであろう．

すでに全世界で数百万トンのフロンが大気中に放出された．フロン汚染における我国の寄与率は生産高から推定すると5～7%であり決して少なくない．フロンは水に溶けず化学的に安定でしかも生物学的にも代謝される過程がほとんど知られていないため，現在の規模で生産され続ければ大気中濃度はますます増加すると思われモニタリングの必要があろう．なお，フロン問題は，フッ素汚染の一つの形態にすぎず最近特に盛んになってきた有機フッ素化学の発展に伴ない新しいフッ素汚染が生ずる可能性もあることを指摘しておきたい．

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「大気中有機化合物の総分析」の一部として実施したものである）

文　献

1）Molina, M.J. and F.S. Rowland : *Nature*, **249**, 810, 1974

2）Cicerone, R.J., R.S. Stolarski, and S. Walters : *Science*, **185**, 1165, 1974

3）Turco, R.P. and R.C. Whitten : *Atmospheric Environment*, **9**, 1045, 1975

4）瀬戸博，秋山和幸，溝口勲：東京衛研年報，**27-1**, 513, 1976

5）Chih-wu Su and E.D. Goldberg : *Nature*, **245**, 27, 1973

6）Wilkniss, P.E., J.W. Swinnerton, R.A. Lamontagne, and D.J. Bressan : *Science*, **187**, 832, 1975

7）Lillian, D and H.B. Singh : *Anal. Chemistry*, **46**, 1060, 1974

8）Zafonte, L., N.E. Hester, E.R. Stephens, and O.C. Talor : *Atmospheric Environment*, **9**, 1007, 1975

9）通産省，化学工業統計年報

10）Howard, P.H. and A. Hanchett : *Science*, **189**, 217, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 254—257, 1976

生体試料における水銀濃度の年代的推移

二島太一郎*, 池田真悟*, 野牛弘*
溝口勲*, 寺井稔**, 戸村健児***

Chronological Shift in Mercury Concentration of Human Tissues

TAICHIRO NISHIMA*, SHINGO IKEDA*, HIROSHI YAGYU*, ISAO MIZOGUCHI*,
MINORU TERAI** and KENJI TOMURA***

Chronological shift of mercury concentration were examined with human tissue samples such as brain, liver, spleen, lung, heart, kidney of humans from 1925 to 1973. Comparison of mercury concentrations in hairs and umbilicalcords between a human sample of B.C. and some samples of 1478 to 1880 was also carried out. High value of mercury concentration were at random found in both recent and old tissues. There was no tendency of increasing or decreasing in tissue mercury concentration according to date.

まえがき

水銀が社会の進歩の過程で，様々な便益を人間にもたらしたことは否定し得ない事実である．その使用の歴史は古く，ヨーロッパでは紀元前から，我国では奈良朝時代からといわれている[1]．昭和30年前後から発生をみた水俣病以来水銀についての関心が高まり，生命をおびやかす有害物質の元兇とみなされるにいたった．

世界で使用された水銀量は最盛期約1万トン，我国では約2,500トンにのぼり，この約7～8割以上が環境へ放出されていた．他方地圏から水圏へ流入する水銀量は約5,000トンといわれており[2]，このぶんは水銀の自然サイクルに相当するから，現在の人間活動は，自然の営みの2倍以上の水銀サイクルの中で営まれていることになる．そこで，このような環境のなかで生活する生物の水銀蓄積量が，近年大幅に高まったであろうとの想像が当然生じる．この疑問を明確にするために，最近人間の古い保存臓器[3-5]，博物館保存標本[4-6]あるいはグリーンランドの大陸氷[7,8]を調べてみようとする試みがなされてきた．

著者らも同様の目的で，我国に保存されていた古い生体試料を用いて，その水銀含有量が年代的に変化しているかどうかを明らかにし，現在実施中の一連の水銀に関する疫学調査のための解析資料にすることを意図し，本研究を行なった．

実験の部

1. 試料 (1) 人の保存臓器：東京大学医学部および順天堂大学医学部の病理学教室より分与された，1925～1973年までのホルマリン保存臓器．(2) 人の頭髪および臍帯：科学警察研究所より恵与された紀元前および1478～1880年までの産毛，頭髪および臍帯．

2. 測定法 立教大学原子力研究所 TRIGA II 型原子炉（熱中性子束 5×10^{11}n/cm^2, sec）で，約30時間中性子を照射して放射化し，Ge (Li) 検出器と4,000チャンネル波高分析器で測定した．

3. 試料の調整 臓器は薄く切り，ろ紙で可能なかぎり水分を除去し，毛髪は10% EDTA 溶液および脱イオン水で洗滌したのち，シリカゲルデシケータ中で乾燥，臍帯はそのままをそれぞれ一定量ポリエチレン袋に入れ密封して分析に供した．

実験結果

1. 臓器 各臓器中の総水銀量（湿重量当り，ppm）の結果は表1に示した．

1973年の各臓器に比較してそれ以前のものは全般に水銀濃度が高く，特に1959年以前のものにおいて顕著

* 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 Laboratry of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都立大学理学部
*** 立教大学原子力研究所

表 1 各臓器中総水銀濃度

No.	年代	年齢	性	大脳	肝臓	腎臓	心臓	脾臓	肺臓	甲状腺	骨	胃	副腎
1	1925	28	f	—	27	—	—	19	25	—	—	—	—
2	1933	66	m	—	—	170	—	—	—	—	—	—	—
3	1943	56	m	—	70	—	—	—	—	—	—	—	—
4	1946	57	m	—	—	—	—	—	—	—	—	23	—
5	1947	54	f	—	10	—	—	—	—	—	—	—	—
6	1952	47	f	—	12	—	—	—	8	—	—	—	—
7	1953	18	m	—	87	—	—	44	45	37	49	—	24
8	〃	15	f	—	380	—	—	530	—	—	540	—	200
9	〃	20	m	—	28	—	28	—	51	—	27	—	—
10	〃	37	m	—	40	—	—	—	—	—	—	—	—
11	1956	33	m	—	1600	—	—	980	—	—	—	—	—
12	1958	70	f	—	—	—	28	9.2	1.3	—	—	—	—
13	1959	29	m	1.8	3.1	2.9	1.1	1.3	5.2	—	—	—	—
14	〃	50	m	—	4.6	6.5	2.8	—	1.6	—	—	—	—
15	1960	62	m	—	3.5	4.3	—	—	—	3.2	—	4.0	—
16	〃	65	m	0.5	2.3	3.2	0.8	2.5	3.3	—	—	—	—
17	1973	61	m	1.0	—	1.1	0.5	—	0.5	—	—	—	—
18	〃	61	f	—	—	—	—	—	4.7	—	—	—	—
19	〃	40	f	—	—	2.6	—	—	—	—	—	—	—
20	〃	5	f	2.2	0.6	1.0	—	—	0.3	—	—	—	—
21	〃	63	m	0.6	2.5	—	0.8	—	—	—	—	—	—
22	〃	51	m	—	0.7	2.1	—	—	0.4	—	—	—	—
23	〃	78	m	—	—	—	—	—	0.4	—	—	—	—
24	〃	70	m	—	0.6	1.0	—	—	—	—	—	—	—
25	〃	62	m	—	1.0	1.7	—	—	3.1	—	—	—	—
26	〃	34	m	2.1	—	—	—	—	1.9	—	—	—	—

（湿重量当り，ppm）

であった．したがって，年代別の水銀濃度推移を比較検討するにはいたらなかった．この異常値の原因を明らかにするため，残余の試料の幾つかについて，硫硝酸湿式灰化後原子吸光法によって測定した値と比較したが，測定値間の差は約 10% 程度であった．この結果から，古い臓器のあるものには，水銀化合物の添加が考えられた．

2. 頭髪と臍帯 産毛，頭髪，臍帯，頭髪を結んでいた紙ひもおよび便についての結果を表 2 に示した．

1478～1880 年の産毛 10 試料は，No. 1（1478 年）の 60 ppm と極端に高い値もあれば，No. 8（1832 年）の 3.9 ppm，No. 15（1865 年）の 5.7 ppm と現代の値と変らないものもあった．

頭髪は，外国で発掘された No. 19（1925 年発掘），No. 20（紀元前のミイラと確認されたエジプト人，発掘年代不明）の水銀濃度は低く，それぞれ痕跡および 0.4 ppm であった．これに対し，我国で発掘された No. 10 のミイラ（1838 年死亡）は 237 ppm で極端に高い濃度であった．

臍帯中の水銀濃度範囲は 1.4～92 ppm（乾燥重量当り）で，湿重量当りの濃度に換算してみても高い傾向が認められた．なお No. 21（1805 年の頭髪を結んでいた結ひも），No. 22（1873 年の女性の便）はともに高い値を示した．

以上の知見から，年代別の水銀濃度を比較して，その推移を推定することは困難であった．

考　察

1973年代の各臓器中水銀含有量はおおむね喜田村ら[11]の報告値に一致していたが，それ以前の古い試料に一部異常と考えられる値が測定されたため，目的に沿った解析は困難であった．

現在まで人の保存臓器については幾つかの報告がある．Kevorkian ら[4]は，1913～1972 年のものについて調べたところ，1939年以前の試料に高い水銀値が認められたと報告しているが，西村ら[5]はホルマリン固定胎児標本について，1912～1974年までの肝，腎および大脳皮質について調査した．その結果，現代と50～60年前あるいは12～13年前の諸臓器間に，水銀値の差を認めていな

表 2 頭髪および臍帯中総水銀濃度

No.	年代	産毛	頭髪	臍帯	性	備考
1	1478	60.0	—	—	M	文明9年
2	1724	—	1.4	—	M	享保8年
3	1724	—	7.8	—	f	享保8年
4	1795	—	—	10.0	M	寛政6年
5	1805	—	16.0	—	M	文化2年
6	1815	—	43.0	—	M	文化12年
7	1825	—	—	16.0	M	文政7年
8	1832	3.9	—	—	M	天保12年
9	1837	9.9	—	1.4	M	天保7年
10	1838	—	237.0	—	M	天保8年，ミイラ，没年
11	1842	—	53.0	—	?	天保2年
12	1847	19.0	—	20.0	f	弘化3年
13	1860	14.0	—	11.0	?	安政6年
14	1861	16.0	—	92.0	M	文久元年
15	1865	5.7	—	2.9	?	慶応元年
16	1871	21.0	—	4.4	M	明治3年
17	1873	—	—	19.0	f	明治5年
18	1880	18.0	—	—	?	明治12年，東本願寺の毛綱
19	1925	—	TRACE	—	?	アメリカインデアン，ミイラ，発掘
20	B.C.	—	0.4	—	?	エジプト人，ミイラ
21	1805	—	—	—		10 ppm，紙ひも
22	1873	—	—	—		27 ppm，No. 17の便

（乾燥重量当り，ppm）

い．寺井[3]は比較的新しい1962～1970年の脳，肝および腎に，有意ではないが増加の傾向があったと報告している．これらの報告から見ても，人の水銀蓄積量の年代推移は明らかにされていない．

産毛，頭髪および臍帯は，臓器の結果同様一部に異常値を測定した．しかし，No. 2, No. 3, No. 8 および No. 15 の水銀濃度が，現代の毛髪に近似していたことは興味ある知見であった．No. 10, No. 18, No. 19, No. 20 を除く試料は，群馬県安中市在の旧家に保管されていた一族のもので，試料はすべて和紙に包まれうるし塗の木箱に保管されていた．

このような状態で，異常に高い水銀値に影響を与える原因を考えると，(1)長期間の保存によって空気中の微量の水銀を徐々に吸着したか，(2)これら試料に何かの目的（例えば防虫剤として）で水銀化合物を使用していたかである．しかし，(1)は現代のそれと近似した値を示す毛髪もあったところから，原因としては弱い．したがって(2)が最も有力であると考えられるが，資料等の不足から明らかには出来なかった．このように，人体試料を材料として水銀の年代推移を明らかにすることは材料の性質，保管上の条件などによって困難なことが多いので，他の材料を使ってこの問題を明らかにしようとする試みがなされている．

Evans[6]は五大湖の淡水魚について，1937～1971年の間に水銀の増加を認め，水銀のこの地域における汚染の増大に警告を発していた．

Miller[7]，Barber[8]らは共に博物館保存魚類標本を分析し，前者は1878年から最近までのカツオ，マグロ，カジキに，水銀が増えた証拠はなかったとし，後者も1883～1972年の魚類例えば，ハダカイワシ，ソコダラなどの深海魚に前者と同様な結論を報告している．我国では西村ら[12]が，1951～1973年のサンコウメヌケについて調査しているが，やはり水銀の増加を認めていない．

これらの報告について，清水ら[13]は測定値の算出方法に疑問をなげかけている．それは長期間のホルマリン溶液中保存で，試料中の水分含有比が低下しているにもかかわらず，単に湿重量当りの濃度で算出しているので，生鮮魚肉のそれより高い分析値になっているとし，著者らの試算によればもっと低い濃度になると主張している．

以上の知見からみて，魚体中の水銀濃度が近年高まったという明確な結論は導きだせないが，それでは環境中の水銀量は増加しているのかという疑問について，Weiss[9]，Can[10]らはグリーランドの大陸氷について調査した結果を報告している．前者は1952年以降大気から降り積った水銀量は増加していたとしているが，後者はこれに反論し，1850～1940年代の大陸氷中のそれは近年と変らなかったと報告した．

人間の生産活動により排出された水銀は，大気中へ放出され，降り積って増加している可能性は否定出来ないが，その微量な水銀量の増加をどのように検出していくかは今後の大きな課題であると考える．

これらの知見から，人間社会が自然環境へ放出している水銀は，現在のところ特別な地域を除いては増加していない．またそのなかに生きている生物中の水銀レベルを顕著に高めるまでにはいたっていないと考える．しかし，清水ら[13]も指摘しているように，水銀汚染が進んでいるという仮説を立てて，魚や人間の調査，対策を進めていくべきであろう．

結　論

人間の古い組織を材料として，そのなかに蓄積されている水銀量の年代推移を明らかにするために，1925年以降のホルマリン保存臓器，紀元前および1478年以降の頭

髪，1795年以降の臍帯について総水銀量を測定したが，一部に異常な測定値を検出したため，明確な結論を引き出すまでにはいたらなかった．

謝辞 貴重な試料をご恵与された，東京大学医学部志方俊夫助教授，順天堂大学医学部橋本敬祐教授，高木俊孝助教授，科学警察研究所須藤武雄室長に深く感謝の意を表します．

（本研究は昭和50年東京都衛生局プロジェクト研究課題として実施したものである．）

文　献

1）小池久米雄：化学と工業，**28**，94，1975
2）滝沢行雄：食の科学，**18**，46，1974
3）寺井　稔：日本公衛誌，**19**，412，1972
4）Kevorkian, J., D.P. Cento., J.F. Uthe, and R.A. Hagstrom : AJPH, 63, 931, 1973
5）西村秀雄，宇野豊三，上田政雄：昭和48年度環境庁公害委託研究費報告書，1-6，1974
6）Evans, R.J. : *Envion. Sci. Tech.*, **6**, 401, 1972
7）Miller, G.E., P.M. Grant, R. Kishore, F.J. Steinkruger, F.S. Rowland, and V.P. Guinn : *Science*, **175**, 1121, 1972
8）Barber, R.T. and Aiyasami Vijayakumar : *ibid.*, **178**, 636, 1972
9）Weiss, H.V. : *ibid.*, **174**, 692, 1971
10）Carr, R.A. and P.E. Wilkniss : *ibid.*, 181, 843, 1973
11）喜田村正次，住野公昭，早川清子，柴田孝子：日衛誌，**28**，109，1973
12）西村雅吉，松永勝彦：化学と工業，**28**，568，1975
13）清水　誠，土井陸雄：科学，**43**，357，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 258—263, 1976

人における血液と毛髪中の総水銀およびメチル水銀濃度とその相互関係

二島太一郎*, 池田真悟*, 多田宇宏*
野牛弘*, 溝口勲*

Total Mercury and Methylmercury Concentrations in Blood and Hair and Their Interrelationship

TAICHIRO NISHIMA*, SHINGO IKEDA*, TAKAHIRO TADA*,
HIROSHI YAGYU* and ISAO MIZOGUCHI*

Methylmercury as well as total mercury concentration of blood and hair derived from human which had many chances to eat fishes were significantly higher than those of control human blood and hair. Positive correlations between total mercury and methylmercury concentration in blood and hair were found in each group of human samples. Positive correlation of mercury concentrations between blood and hair of normal human was also found. In samples from fish-eaters, however, such a correlation was never found. This results were caused by the fact that total and methylmercury concentration in hair from fish-eaters were widely distributed.

まえがき

前報[1]において，一般健康人の血液と毛髪の総水銀量について，両者の相互関係とそれぞれにおける正常濃度範囲，さらに魚介類多食者について同様の調査を実施し，対照者群と数量的な比較を行なった．その結果，魚介類喫食頻度が血液および毛髪中の総水銀量に，最も影響を与えている要因であることを確認した．今回は前報において測定しなかったメチル水銀を測定し，魚介類多食者群と対照者群における血液および毛髪中の総水銀量，無機水銀量，総水銀量にしめるメチル水銀の割合について綜合的な解析をした知見を報告する．

実験方法

1. 被検者 前報[1]記載の者から，対照者群として都内各区在住男性30名，女性26名計56名，魚介類多食者群41名（男性のみ）を無作為抽出した．

2. 試料の調整 1971年に報告した方法[2]に準拠した．

3. 定量方法 (1) **総水銀測定法** 1971年報告[2]の方法にしたがい，血液，毛髪は硫酸，硝酸と過塩素酸で湿式灰化し，還元気化原子吸光法で測定した．(2)**メチル水銀測定法** 血液 3 g，毛髪 0.2 g を 12 m*l* の共栓遠沈管に精秤し，血液は 6 N 塩酸を等量，毛髪は 3 N 塩酸 3 m*l* を加えてよくふりまぜたのち，血液は24時間，毛髪は1時間放置して，ベンゼン 4 m*l* で抽出した．遠沈管を10分間 3500 rpm で遠心し，ベンゼン層を次の条件で測定した．

装置：島津 GC-4 BM (Ni : ECD)，カラム：ガラスカラム 4mm×1 m，充填剤：5% DEGS，カラム温度：175°，注入孔温度：200°，検出器温度：195°

実験結果

各群の血液および毛髪のそれぞれの最高値，最低値，範囲，算術平均値，標準偏差，変動係数および平均値の差の検定 ($P<0.01$) 結果は，Table 1～8のとおりである．

1. 血液について メチル水銀(以下 Me-Hg と略記)，総水銀 (T-Hg と略記) および無機水銀濃度 (In-Hg と略記) は，魚介類喫食の影響を反映して多食者群が対照者群に比較しそれぞれ有意に高いことが認められたが，対照者群男女間には性差が認められなかった．

総水銀量にしめるメチル水銀量の割合（以下 Me-Hg/T-Hg と略記，%）は，対照者群男性よりも多食者群に有意に高いことが認められた．多食者群と対照者群女性および対照者群男女間に有意な差は認められない．

2. 毛髪について 血液中の Me-Hg, T-Hg および In-Hg と全く同じ動態を示し，多食者群がそれぞれ有意

* 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. Me-Hg Concentration of Blood in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	9.4	4.7	3.6
Min	2.4	0.1	0.4
R	7.0	4.6	3.2
Mean	4.7	1.7	1.4
SD	1.7	1.0	0.7
CV	0.36	0.61	0.53
1		t =8.52*	t =9.13*
t-test 2	ϕ=69		t =1.05
3	ϕ=65	ϕ=54	

* P<0.01

Table 2. T-Hg Concentration of Blood in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	15.1	6.7	6.2
Min	3.9	1.3	1.4
R	11.2	5.4	4.8
Mean	7.3	3.2	2.6
SD	2.4	1.3	1.0
CV	0.33	0.40	0.38
1		t =8.42*	t =9.46*
t-test 2	ϕ=69		t =2.02
3	ϕ=65	ϕ=54	

* P<0.01

Table 3. In-Hg Concentration of Blood in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	11.4	4.6	3.0
Min	0.0	0.1	0.0
R	11.4	4.5	3.0
Mean	2.6	1.5	1.1
SD	2.1	0.9	0.7
CV	0.81	0.6	0.62
1		t =3.00*	t =4.16*
t-test 2	ϕ=58		t =1.72
3	ϕ=52	ϕ=54	

* P<0.01

Table 4. Me-Hg/T-Hg Ratio of Blood in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	100.0	92.3	100.0
Min	24.5	4.2	18.2
R	75.5	88.1	81.8
Mean	66.4	52.5	56.5
SD	18.8	22.8	21.7
CV	0.28	0.43	0.38
1		t =2.76*	t =1.95
t-test 2	ϕ=69		t =−0.65
3	ϕ=65	ϕ=54	

* P<0.01

Table 5. Me-Hg Concentration of Hair in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	32.4	13.2	12.0
Min	4.4	2.2	0.8
R	28.0	11.0	11.2
Mean	13.1	5.6	3.2
SD	5.9	2.5	2.0
CV	0.44	0.45	0.64
1		t =6.52*	t =8.21*
t-test 2	ϕ=69		t =3.78*
3	ϕ=65	ϕ=54	

* P<0.01

Table 6. T-Hg Concentration of Hair in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	57.9	17.1	13.9
Min	9.5	2.6	1.2
R	48.4	14.5	12.7
Mean	20.7	6.8	4.2
SD	9.1	3.1	2.3
CV	0.43	0.45	0.55
1		t =7.89*	t =8.91*
t-test 2	ϕ=69		t =3.46*
3	ϕ=65	ϕ=54	

* P<0.01

Table 7. In-Hg Concentration of Hair in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	45.5	3.9	3.4
Min	0.0	0.0	0.0
R	45.5	3.9	3.4
Mean	7.5	1.3	1.0
SD	8.4	0.9	0.7
CV	1.11	0.74	0.67
1		$t=4.69^*$	$t=4.88^*$
t-test 2	$\phi=41$		$t=1.03$
3	$\phi=41$	$\phi=53$	

* $P<0.01$

Table 8. Me-Hg/T-Hg Ratio of Hair in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	100.0	100.0	100.0
Min	21.4	60.0	40.0
R	78.6	40.0	59.6
Mean	67.9	81.7	74.8
SD	24.6	11.1	13.4
CV	0.36	0.13	0.17
1		$t=-2.83^*$	$t=-1.30$
t-test 2	$\phi=69$		$t=2.06$
3	$\phi=65$	$\phi=54$	

* $P<0.01$

Table 9. Hair/Blood Ratio of Me-Hg Concentration in Fish-eater and Control

	Fish-eater	Control	
	1 (M)	2 (M)	3 (F)
n	41	30	26
Max	780.8	740.0	875.0
Min	88.5	152.8	88.9
R	692.3	587.2	786.1
Mean	309.6	354.2	265.1
SD	163.0	142.2	183.2
CV	0.52	0.39	0.68
1		$t=1.20$	$t=1.04$
t-test 2	$\phi=69$		$t=2.05$
3	$\phi=65$	$\phi=54$	

に高く，また対照者群男女間に，Me-Hg および T-Hg の性差が認められた（男>女）．

Me-Hg/T-Hg は，多食者群よりも対照者群男性が有意に高く，血液の場合とは逆であった．また対照者群男女間に性差が認められた（男>女）．

3. 血液と毛髪中の Me-Hg の濃度比率（毛髪 Me-Hg /血液 Me-Hg） 血液中の Me-Hg に対して，毛髪中の Me-Hg がどのくらいの割合で存在しているかを知るために算出したのが Table 9 である．各群間に有意の差を認めなかった．このことは，魚介類喫食によって，体内への Me-Hg 取込量が増加しても，血液と毛髪中の Me-Hg 分布の割合は変動が少ないことを示唆している．

4. 血液および毛髪中における水銀量の相関性と相互関係 各群に分けてそれぞれの相関行列を Table 10～12に示した．

血液における各因子間の相関関係は，対照者群男女および多食者群ともほぼ同じような結果であった．すなわち，T-Hg と Me-Hg, In-Hg に，Me-Hg と T-Hg, Me-Hg/T-Hg, In-Hg と T-Hg, Me-Hg/T-Hg に有意の相関が認められた．

毛髪では，各群ともに In-Hg において一部相関関係が異なるが，主要な因子間の関係は血液の場合とほぼ同じ傾向を示していた．血液と毛髪中のそれぞれの因子の相互関係は，対照者群男女において，血液中の T-Hg および Me-Hg と毛髪中のそれらは極めて高い正の相関が認められたが，女性の血液中 In-Hg と毛髪中の In-Hg, Me-Hg 間に正の相関関係が認められることが，男性と相違するところであった．これに対して多食者群は，対照者群と全く異なり，すべての因子が血液と毛髪の間に有意の相関を示していなかった．この原因は，Fig. 1 に示した血液と毛髪の T-Hg および Me-Hg の分布状態から見て，血液中の T-Hg および Me-Hg に対応する毛髪中のそれらが，極めてバラツいていることに起因している．

考　察

1 血液について 血液中の T-Hg, Me-Hg および In-Hg は，魚介類喫食頻度の影響により，その濃度が上昇することを確認した．同様な結果は過去の報告[3,4]でも得られているが，Me-Hg の測定値については魚介類喫食量から考えて，疑問が残る報告[3]があった．対照者群男女に見られる測定値の性差は，T-Hg については前報[1]と同様有意の差を認めたが，Me-Hg は性差がなかった．T-Hg の性差についての一般的な考え方として，男性が女性より体重当りの魚介類喫食量が多いためとされているが，この知見から考えて，そう簡単な説明では解

Table 10. Correlation of Mercury Concentration between Blood and Hair in Control(M)

		Blood				Hair			
		T-Hg	Me-Hg	In-Hg	M/T	T-Hg	Me-Hg	In-Hg	M/T
Blood	T-Hg		0.723*	0.617*	0.021	0.575*	0.582*	0.333	0.096
	Me-Hg	*		−0.097	0.646*	0.685*	0.677*	0.440*	0.046
	In-Hg	*			−0.706*	0.049	0.068	−0.021	0.086
	M/T		*	*		0.279	0.279	0.172	0.029
Hair	T-Hg	*					0.965*	0.705*	−0.056
	Me-Hg	*	*			*		0.493*	0.199
	In-Hg					*	*		−0.720*
	M/T							*	

r=(29 : 0.01)=0.455<*

Table 11. Correlation of Mercury Concentration between Blood and Hair in Control (F)

		Blood				Hair			
		T-Hg	Me-Hg	In-Hg	M/T	T-Hg	Me-Hg	In-Hg	M/T
Blood	T-Hg		0.706*	0.646*	−0.079	0.672*	0.798*	0.075	0.431
	Me-Hg	*		−0.084	0.612	0.472*	0.511	0.089	0.202
	In-Hg	*			−0.776*	0.502*	0.573*	0.009	0.390
	M/T		*	*		−0.098	−0.121	0.027	−0.186
Hair	T-Hg	*		*			0.959*	0.551	0.065
	Me-Hg	*	*	*		*		0.291	0.324
	In-Hg					*			−0.730*
	M/T							*	

r=(25 : 0.01)=0.487<*

Table 12. Correlation of Mercury Concentration between Blood and Hair in Fish-eaters

		Blood				Hair			
		T-Hg	Me-Hg	In-Hg	M/T	T-Hg	Me-Hg	In-Hg	M/T
Blood	T-Hg		0.520*	0.724*	−0.353	0.236	0.266	0.070	−0.046
	Me-Hg	*		−0.212	0.552*	−0.035	0.238	−0.206	0.233
	In-Hg	*			−0.850*	0.299	0.112	0.246	−0.241
	M/T		*	*		−0.313	−0.014	−0.330	0.316
Hair	T-Hg						0.440*	0.777*	−0.397*
	Me-Hg					*		−0.224	0.536*
	In-Hg					*			−0.807*
	M/T					*	*	*	

r=(40 : 0.01)=0.393<*

決出来そうにもない．恐らく性の差による水銀代謝に基本的な違いがあると推考する．

Me-Hg/T-Hg は，魚介類の喫食量に応じて高くなる傾向を認めた．このことは，腸管から吸収された Me-Hg が一部は分解されるにしてもその量に応じて血液中に取込まれていることを示すものであろう．対照者群男女の割合はほぼ同じで，52.5，56.5%であったが，この点について他に報告を見ない．このことから，一般的な食生活においては，Me-Hg，T-Hg をほぼ半々に食品から取込んでいることが考えられる．

2. 毛髪について 各測定値は血液中のそれと同じく多食者群に有意に高い結果を得た．

対照者群男女の性差は，T-Hg および Me-Hg に認められた（男>女）．このことは，水銀の排泄機関である毛髪への移行が，男女で異なることを示唆している．Me-Hg/T-Hg は対照者群男性に比較して多食者群は有意に低く，女性と比較しても低い傾向にあった．この結果は毛髪の場合と逆である．この原因は，腸管から吸収された Me-Hg が，ある限度を越えて組織に蓄積されると，有機水銀は無機水銀よりも組織における binding site との結合力が弱いといわれている[5]ところから，CH_3Hg^+ となって組織から離脱しこれが何らかの修飾を受けて，無機水銀となり毛髪へ排泄されるものと考えられる．

3. 血液と毛髪中の He-Mg の濃度比率　T-Hg の両者における濃度比率は(毛髪／血液)，対照者群男性 252/1，女性179/1，多食者254/1で，女性が有意に低いことを報告[1]してきた．Me-Hg 濃度比率は，265/1～479/1の範囲にあり各群間に有意差を認めなかった．T-Hg と Me-Hg の比率を比較すると，後者は血液中の Me-Hg に対して毛髪中の Me-Hg が多いことを示している．

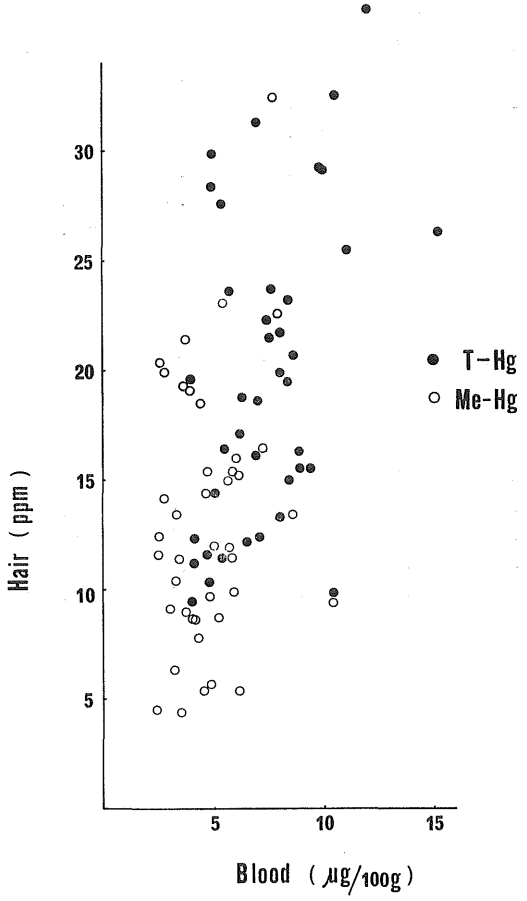


Fig. I. Correlation of T-Hg and Me-Hg concentration between Blood and Hair in Fish-eaters

4. 血液および毛髪中における水銀量の相関性と相互関係　血液および毛髪中の各因子間の相関関係は，ほぼ同様な結果を示した．血液と毛髪の各因子の相互関係は，対照者群男女においては T-Hg と Me-Hg に有意の相関が成立したが，多食者群においては無相関であった．この原因は Fig. 1 に見るように，血液中の T-Hg および Me-Hg に対応する毛髪中のそれらが，個々に大きくバラツいていることである．この知見から水銀汚染の指標としては，毛髪よりも血液中の T-Hg および Me-Hg を評価することの方が，より正確な情報を得られるであろう．しかし，毛髪は過去の汚染を追跡する指標としては，血液よりもまさっている．それは熊本水俣病[6]あるいは新潟水俣病[7]の疫学調査で実証されている．

結　論

一般的な食生活をしている成人男女56名，魚介類多食者41名（男性）について，同一人の血液と毛髪中の T-Hg および Me-Hg を測定し次の結果を得た．

1. 血液中 Me-Hg は対照者群男性 1.7±1.0（平均値±標準偏差，μg/100g），女性1.4±0.7，多食者群4.7±1.7で多食者群が有意に高く，対照者群男女に差を認めなかった（$P<0.01$）．毛髪中の Me-Hg は，対照者群男性 5.6±2.5 ppm，女性3.1±2.0，多食者群13.1±5.9で多食者群が有意に高く，対照者群男女に性差を認めた．

2. 血液中の Me-Hg/T-Hg は，対照者群男性 52.5±22.8%，女性56.5±21.7，多食者群66.4±18.8で，多食者群と対照者群男性に有意差を認めた．対照者群男女に性差を認めなかった．毛髪中 Me-Hg/T-Hg は，対照者群男性 81.7±11.1，女性 74.8±13.4，多食者群 67.9±24.6で，対照者群男性と多食者群に，対照者群男女に有意差を認めた．

3. 血液と毛髪中の Me-Hg の濃度比率（毛髪／血液）は，対照者群男性 479.9±431.7，女性 265.1±183.2，多食者群 309.6±163.0で，各群間に差を認めなかった．

4. 血液と毛髪中における T-Hg および Me-Hg は，各群に正相関を認めた．両者の T-Hg，Me-Hg の相互関係は，対照者群男女においては正相関を認めたが，多食者群においては無相関であった．

文　献

1）二島太一郎，池田真悟，多田宇宏，野牛　弘，長崎

護：東京衛研年報，25，341，1974
2）二島太一郎，池田真悟，多田宇宏，野牛　弘：東京衛研年報，23，277，1971
3）山中すみへ，西村正雄，矢崎　武，上田喜一：日衛誌，26，124，1971
4）Robert, C.W.: *Mercury in tne Environment,* 153, 1972, CRC Prees, Ohio
5）Clarkson, T.W. and L. Magos: *Biochem. J.*, 99, 62, 1966
6）松島義一，野口敏子：衛生化学，12，106，1966
7）椿　忠雄：災害医学，11，1383，1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 264—269, 1976

都内興行場で集められたゴミの中のダニ，昆虫相 第2報

中田英吉*，吉川 翠*

Mite and Insect Fauna in Dusts Collected from Seats and Floors of Theaters in Tokyo. II

EIKICHI NAKADA* and MIDORI YOSHIKAWA*

Dust samples were collected from seats and floors of twelve theaters in Tokyo for examinations of mites and insects.

At least 41 species belonging to 25 families of mites were identified to be contained in the dust of theaters. The most common mites were *Dermatophagoides farinae, D. pteronyssinus,* and Tarsonemidae. A number of the tropical rat mite, *Ornithonyssus bacoti*, were recovered from one of the theaters. The mites of Pyroglyphidae were somewhat abundant on the inside-seats of show-halls. Psocoptera insects were collected more from the floors than from the seats.

The mite and insect faunae of theaters were examined using the method of numerical taxonomy of Sokal and Sneath (1963). The dendrograms of correlation coefficients and distance coefficients of seats and floors showed that the inside- and outside-seats of show-halls had similar faunae while the inside- and outside-floors of show-halls and the floors of food-stands had similar faunae.

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ヒヨウヒダニ類などが存在している．

筆者らは1973年1月に都内10か所の興行場でゴミを集め，その中のダニ，昆虫相をしらべ，前報[1]に掲載した．今回はさらに2か所を追加して同じ時期に再度調査を行い，その結果をまとめたので，ここに報告する．

1. ゴミの採集と検査方法

筆者らの第1報と同様の方法で行った．1976年1月19日から1月24日にわたり，1973年に調査した10か所の興行場の他に，2か所の興行場を追加し，映写場内の客席，床，映写場外の客席，床および売店付近の床の計5か所について，日立電気掃除機（集塵用紙袋を用いて集めるもの）でゴミを採集した．各個所について掃除機の実動時間は約3分であった．採集されたゴミは，検査時まで約 6°C の冷蔵室に保存された．

検査は，28メッシュ篩（目の開き 0.59 mm）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，最初に中性洗剤（ライポン F 粉剤）の0.2%以下の水溶液を加えて遠心分離した後，液の吸引濾過により濾紙上に浮遊物を取出し，沈澱物にさらに飽和食塩水を加え，前と同様の操作により浮遊物を取出し，それぞれの浮遊物から実体顕微鏡下でダニ，微小昆虫を取出した．

2. 結 果

採取されたダニ，昆虫の大部分は死骸で，体の一部がかけたり，頭のみのものもあり，また幼若期のものもあって，同定の困難なものが多かった．

表1は採取されたダニ類で，*印の生きていたと見なされるものは，ハリクチダニ Raphignathidae と思われるもの1匹，ヒゲダニ *Histiostoma* の hypopus 8匹，サヤアシニクダニ *Glycyphagus destructor* 1匹，コナヒヨウヒダニ *Dermatophagoides farinae* 2匹であった．

その他はすべて死骸で，イエダニ *Ornithonyssus bacoti* は合計11匹となった．シラミダニ科 Pyemotidae は1973年の調査ではとれなかったが，今回は *Pediculaster* 2匹，*Pseudopygmephorus* 1匹，その他が採取された．動植物を刺す口器を持つ種類として，コハリダニ科Tydeidae は *Tydeus, Lorryia, Paralorryia* の3属，ヒメ

* 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. List of Acarina collected from dusts of twelve theaters, Tokyo, January 1976.

Mesostigmata	
Dermanyssidae	
Ornithonyssus bacoti	11
Ascidae	
Proctolaelaps hypudaei	5
Proctolaelaps	34
? *Proctolaelaps*	8
Melichares (Blattisocius) keegani	5
? *Melichares (Blattisocius) keegani*	2
? *Melichares(Blattisocius)dentriticus*	4
Lasioseius sp.	2
Others	2
Ameroseiidae	
Kleemannia plumosus	47
? *Kleemannia plumosus*	10
Kleemannia sp.	4
Phytoseiidae	
Typhlodromus (Amblyseius) sp.	7
? *Typhlodromus (Amblyseius)*	1
Others	5
Laelapidae	
? *Androlaelaps casalis*	3
Others	3
Others of Mesostigmata, larva	1
Trombidiformes	
Tarsonemidae	239
Pyemotidae	
Pediculaster	2
Pseudopygmephorus	1
Others of Pygmephorini	1
? Eupodidae	5
Tydeidae	
Tydeus	2
Lorryia	2
Paralorryia	12
Bdellidae	1
? Raphignathidae	1*
Tenuipalpidae	
Brevipalpus sp.	6
Pentamerismus sp.	1
Cheyletidae	
Cheyletus malaccensis	31
? *Cheyletus malaccensis*	19
? *Cheyletus eruditus*	1
Cheyletus	7
Cheyletiella sp.	2
Others	2
Sarcoptiformes	
Anoetidae	
Histiostoma, hypopus	8*+20
Acaridae	
Tyrophagus putrescentiae	3*+25
Chortoglyphidae	
Chortoglyphus arcuatus	4
? *Chortoglyphus arcuatus*	2
Saproglyphidae	3
Glycyphagidae	
Glycyphagus destructor	1*
? *Glycyphagus domesticus*	2
Glycyphagus	2
Pyroglyphidae	
Dermatophagoides pteronyssinus	94
Dermatophagoides farinae	2*+149
Dermatophagoides	22
Hirstia domicola	1
Euroglyphus maynei	11
Oribatei	
Cosmochthoniidae	
Cosmochthonius	27
Haplochthoniidae	39
Oppiidae	
Oppia sp.	10
Quadroppia quadricarinata	2
Suctobelbidae	
Suctobelbella sp.	1
Oribatulidae	
Oribatula sp.	1
Zygoribatula sp.	1
Oripodidae	2
Others of Oribatei	4
Total	925

*...Individuals regarded as living.
Others were regarded as dead.

ハダニ科 Tenuipalpidae はブドウヒメハダニに似た *Brevipalpus* sp. 6匹，フトゲヒメハダニに似た *Pentamerismus* sp. 1匹，ツメダニ科はフトツメダニ *Cheyletus malaccensis* 31匹以上，ウサギツメダニに似た *Cheyletiella* sp. 2匹などが採取された．チリダニ類はヤケヒヨウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* 94匹以上，コナヒヨウヒダニ *D. farinae* 149匹以上，イエチリダニ *Hirstia domicola* 1匹，シワダニ *Euroglyphus maynei* 11匹が採取された．

表2は昆虫類とカニムシで，*印の生きていたと見なされるものは，鞘翅目の幼虫1匹，チヤタテムシの *Liposcelis* 1匹，トビムシ類 Collembola 1匹であった．その他はすべて死骸で，チャバネゴキブリ *Blattella germanica* 26匹以上，ノコギリヒラタムシ *Oryzaephilus surinamensis* の成虫が10匹，幼虫23匹，チヤタテムシ Psocoptera では，ヒラタチヤタテ *Liposcelis bostrychophilus* 7匹その他があり，頭だけのものが多く種類不明の *Liposcelis* と思われるもの295匹となり，ま

Table 2. List of Insecta and Pseudoscorpiones collected from dusts of twelve theaters, Tokyo, January 1976.

Orthoptera	
Blattoidea	
Blattella germanica	26
? *Blattella germanica*	3
Blattella germanica, egg capsule	1
Others	23
Coleoptera	
Oryzaephilus surinamensis, adult	10
Oryzaephilus surinamensis, larva	23
Tribolium castaneum, adult	3
Gibbium psylloides, adult	10
Pseudeurostus hilleri, adult	1
Dermestidae, adult	1
Anobiidae	
Lasioderma serricorne, adult	3
Others, larva	1
Others of Coleoptera, adult	7
Others of Coleoptera, larva	1*+17
Lepidoptera, larva	7
Psocoptera	
Liposcelidae	
Liposcelis bostrychophilus	7
Liposcelis entomophilus	3
? *Liposcelis entomophilus*	5
Liposcelis simulans	5
? *Liposcelis simulans*	6
Liposcelis	1*
? *Liposcelis*	295
Diptera	
? Muscidae, adult	1
Culicidae, adult	2
Hemiptera, larva	1
Hymenoptera	
Formicidae	2
Collembola	1*+20
Pseudoscorpiones	1
Total	487

*...Individuals regarded as living.
Others were regarded as dead.

たカニムシ目 Pseudoscorpiones 1匹などがとれた.

表3は，吸血性のイエダニを採取場所別に示したもので，No. 9の興行場で多くとれた.

表4は，多数採取された次の3種類，ヒヨウヒダニなどを含むチリダニ類，ホコリダニ，チヤタテムシを客席，床別および興行場別に示したものである.

チリダニ類は映写場内の客席に多く，合計137匹となった.

ホコリダニは，No. 2の興行場の映写場外の客席と売店床，No. 10の興行場の映写場内の客席などに多く，チヤタテムシは No. 12 の興行場の映写場内の床，No. 9 の興行場の映写場外の床に多かった.

Table 3. Distribution of *Ornithonyssus bacoti* at seats and floors of theaters, Tokyo, January 1976.

No. of theaters	Inside of show-hall		Outside of show-hall		Food-stand
	Seat	Floor	Seat	Floor	Floor
1	0	0	0	0	1
9	0	1	2	4	1
10	0	0	0	1	0
12	0	0	1	0	0

Note : All individuals were regarded as dead.

No. 6 と No. 7 の興行場の映写場内の客席はビニールカバーがしてあり，その他の興行場はフエルトまたは布地のカバーがしてあったが，ビニールカバーのみの No. 6 と No. 7 の興行場は，ダニ，昆虫がほとんど発見されず，No. 6 の興行場でケナガコナダニが2匹発見されたのみであった.

映写場外の床にジュータンを敷いてある興行場は No. 8, No. 10, No. 12 で，その他の興行場は P タイル，コンクリートなどであった．ジュータンを敷いてあるところがすべてダニ，昆虫が多いという特徴は見られなかった.

3. Dendrogram による場所別のダニ，昆虫相の検討

3.1 Dendrogram の作成方法 前報の方法と同様に，Sokal and Sneath (1963)[2] の numerical taxonomy の計算方法に従った．Original data matrix の OTU (operational taxonomic unit) に客席，床別または興行場別をとり，character にダニ，昆虫の種類をとった．ダニ，昆虫のうち1～2匹しかとれなかった種類，1か所にしかとれなかった種類などで character から除いたものがある．客席，床別の original data matrix を表5に示す.

Matrix の各数値は，第1報ではダニ，昆虫の発見された場所の数を現わしたが，今回は，場所ごとのダニ，昆虫の発見された実数を logarithmic scale の round number に置換した数値（1～5匹を1，6～25匹を2，26～125匹を3で表わした）を合計した.

この original data matrix から数値を標準化して相関係数および距離係数 distance coefficient (平均の相違距離を現わす) を求めた．相関係数については

Table 4. Distribution of Pyroglyphidae, Tarsonemidae and Psocoptera at seats and floors of twelve theaters, Tokyo, January 1976.

No. of theater	Inside of show-hall						Outside of show-hall						Floor of Food-stand		
	Seat			Floor			Seat			Floor					
	Pyro.	Tar.	Pso.	Pyro.	Tar.	Pso.	Pyro.	Tar.	Pso.	Pyro.	Tar.	Pso.	Pyro.	Tar.	Pso.
1	4	1	0	0	1	3	6	7	1	1	10	3	3	6	9
2	1	3	0	1	3	5	1	41	0	0	12	18	3	36	4
3	14	0	0	1	0	0	0	5	0	1	6	2	0	1	0
4	9	7	0	1	0	1	3	1	0	0	0	0	0	1	0
5	10	5	0	1	0	3	1	0	1	2	0	2	2	0	0
6	0	0	0	1	0	3	1	0	0	7	1	3	1	0	1
7	0	0	0	2	1	3	2	2	1* +5	0	17	10	1	1	1
8	1* +10	10	0	0	0	4	0	3	0	8	4	24	3	3	10
9	17	0	0	1	0	13	3	0	1	1	0	69	1*+2	0	13
10	12	20	0	9	0	3	9	1	2	0	1	2	0	0	2
11	4	9	0	25	1	10	18	7	2	0	0	3	1	0	1
12	55	11	0	9	1	72	8	0	3	1	0	2	1	0	7
Total	137	66	0	51	7	120	52	67	16	21	51	138	18	48	48

Note : Pyro.——Pyroglyphidae, Tar.——Tarsonemidae, Pso.——Psocoptera
*——Individuals regarded as living.

Table 5. Original data matrix for operational taxonomic units of five places (seats and floors) of theaters and thirty-three characters of Acarina and Insecta.

Characters	OTU				
Acarina and Insecta	1	2	3	4	5
O. bacoti	0	1	2	2	2
Proctolaelaps	0	1	2	3	0
M. (B.) keegani	0	1	1	2	0
Others of Ascidae	0	0	0	2	2
Kleemannia	0	2	1	3	2
Phytoseiidae	0	2	1	4	2
Laelapidae	0	3	0	2	0
Tarsonemidae	13	5	12	11	9
Pyemotidae	0	0	2	1	0
Tydeidae	1	1	1	2	6
Tenuipalpidae	0	0	0	1	3
Cheyletus	3	4	3	5	2
Others of Cheyletidae	0	1	0	2	1
Histiostoma	1	0	3	2	2
T. putrescentiae	2	1	5	4	1
C. arcuatus	1	0	2	1	0
Saproglyphidae	0	0	1	1	0
Glycyphagidae	1	1	1	1	0
D. pteronyssinus	12	6	9	4	5
D. farinae	13	10	10	5	6
E. maynei	5	0	0	1	1
Cosmochthonius	1	4	1	6	0
Haplochthoniidae	2	6	2	6	4
Others of Oribatei	0	1	3	5	5
Blattoidea	0	8	6	6	9
O. surinamensis	0	2	1	4	3
T. castaneum	0	0	0	1	1
G. psylloides	0	3	0	3	1
Anobiidae	0	0	0	2	1
Others of Coleoptera	0	1	1	2	1
Lepidoptera	0	2	0	2	1
Psocoptera	0	15	8	16	13
Collembola	0	2	0	3	1

No. in matrix—Numbers of Acarina and Insecta collected from each place, were represented as round numbers of logarithmic scale (1～5 individuals—1, 6～25 indiv.—2, 26～125 indiv. —3) and totaled.
OTU—Operational taxonomic units
1—Seats of the inside of show-hall
2—Floors of the inside of show-hall
3—Seats of the outside of show-hall
4—Floors of the outside of show-hall
5—Floors of food-stands

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 dendrogram を作成した．

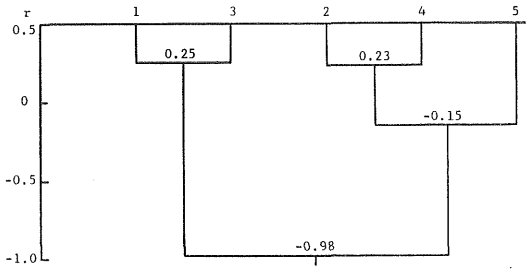


Fig. 1. Dendrogram of correlation coefficients(r)among seats and floors of theaters. (Based on the WVGM clustering procedure, using Spearman's sums of variables method for calculating.)
1, 2, 3, 4, 5—The same marks as in table 5.

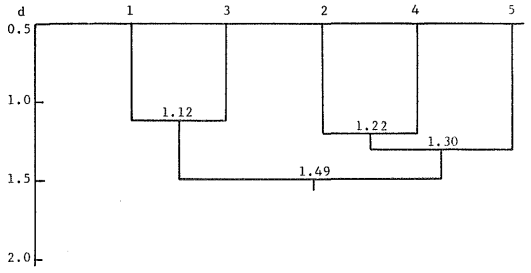


Fig. 2. Dendrogram of distance coefficients (d) among seats and floors of theaters. (Based on the WPGM clustering procedure, using simple averages of distance coefficients for calculating.)
1, 2, 3, 4, 5—The same marks as in Table 5.

3.2 Dendrogram OTU を客席，床別にとった場合の相関係数の dendrogram が図1，距離係数の dendrogram が図2である．図1では No.1（映写場内の客席）と No. 3（映写場外の客席）が，相関係数がもっとも高く0.25の値で一群を形成し，No. 2（映写場内の床）と No. 4（映写場外の床）が一群となり，それに No. 5（売店床）が連結する大きな一群が形成された．距離係数の図2でも，同様に映写場内外の客席が一群，映写場内外の床および売店床が大きな一群となった．

OTU を興行場別にとった場合の dendrogram を図3，4に示す．相関係数の dendrogram 図3では，同じ建物で地下と地上に分かれている興行場 No. 1 と No. 2, No. 9 と No. 10, No. 3 と No. 4, 地下にあって隣接した No. 5 と No. 6 の興行場がそれぞれ最初に一群を形成した．距離係数の図4では，お互に接近した

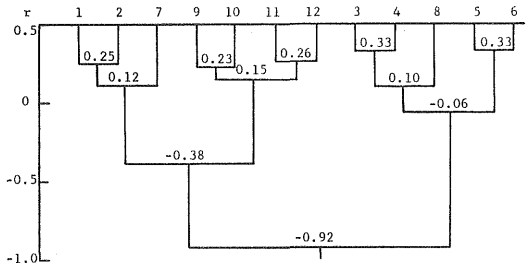


Fig. 3. Dendrogram of correlation coefficients (r) among twelve theaters. (The calculating method is the same as Fig. 1's.)
No. 1～12—No. of theaters.

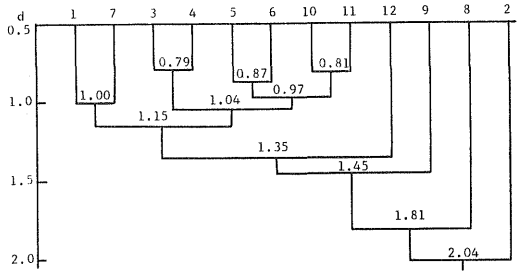


Fig 4. Dendrogram of distance coefficients (d) among twelve theaters. (The calculating method is the same as Fig. 2's.)
No. 1～12—No. of theaters.

興行場で最初に一群を形成したものは，No. 3 と No. 4, No. 5 と No. 6 であった．

4. 考 察

4.1 検査方法と結果についての考察 筆者らの前報に述べた如く，検査工程による若干のダニの紛失 (Spieksma et al 1967[3], 大島 1970[4], 1971[5], 1973[6], 篠原ら 1970[7] 参照)，顕微鏡下での多少のダニの検出の見落しなどが考えられるが，一定の検査方法で行ったので，各場所についての量的比較はある程度可能と考えられる．

イエダニが，1973年の調査と異なり，No. 9 の興行場で多くとれた．各興行場についての虫の実数の合計または dendrogram 作成に用いた数値の合計による興行場間の X^2 検定は有意差となった．No. 9 の興行場に宿主のネズミがいたことが考えられる．

チリダニ類は，虫の実数の合計による客席，床の間の X^2 検定は有意差となった．映写場内の客席はビニールカバーをしてあった興行場を除けば，チリダニが多く見

られ，人の坐る客席はチリダニが多いものと思われる．

ホコリダニは，虫の実数の合計による客席，床の間の X^2 検定は有意差となった．映写場内の床はホコリダニが少ないものと思われる．

チヤタテムシは，虫の実数の合計または dendrogram 作成に用いた数値の合計による客席，床の間の X^2 検定が有意差となった．チヤタテムシが客席，とくに映写場内の客席に少なく，床に多いことが特徴と思われる．

4.2 Dendrogram についての考察 客席，床別についての，相関係数，距離係数の dendrogram (図1, 2) の形が似ていることから，映写場内外の客席が類似したダニ，昆虫相を持ち，映写場内外の床および売店床が類似したダニ，昆虫相を持つことが考えられる．

興行場別の dendrogram については，相関係数の dendrogram (図3) で，お互に接近した興行場がそれぞれ最初に一群を形成したが，距離係数ではその傾向が見られなかったことから，はっきりした特徴がないものと考えられる．1973年の調査[1]の相関係数の dendrogram では，地下の興行場が大きな一群となる傾向が見られた．

5. 総 括

(1) 1976年1月中～下旬に，都内12か所の興行場で，映写場内の客席，床，映写場外の客席，床および売店付近の床の計5か所について，電気掃除機によりゴミを採集した．

ゴミを28メッシュ篩で大ゴミと小ゴミに分け，大ゴミについては肉眼，拡大鏡でしらべて虫を採取し，小ゴミについては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下でしらべ，ダニ，微小昆虫を採取した．

(2) 採取されたダニおよび昆虫の大部分は死骸であった．ダニは25科に属する少なくとも41種以上，昆虫は14科に属する少なくとも17種以上が採取された．多数とれたものはホコリダニ，ヒヨウヒダニ *Dermatophagoides*，チヤタテムシであった．

イエダニが一つの興行場で多く見られた．ヒヨウヒダニを含むチリダニ類は映写場内の客席にやや多く見られ，チヤタテムシが客席よりも床に多くとれた．

(3) 場所別のダニ，昆虫相の検討を，Sokal and Sneath (1963) の numerical taxonomy の方法により dendrogram を作成して行った．映写場内外の客席が類似したダニ，昆虫相を持ち，映写場内外の床および売店床が類似のダニ，昆虫相を持った．

謝辞 イエダニの同定については国立科学博物館浅沼靖博士から，ササラダニの同定については横浜国立大学青木淳一博士から，シラミダニの同定については東京肛門医院黒佐和義博士から，それぞれ援助をいただいた．ここに厚く感謝の意を表する．

文 献

1) 中田英吉，千種 翠：東京衛研年報，26—1，280，1975
2) Sokal, R.R. and P. H. A. Sneath : *Principles of numerical taxonomy*, 290, 1963, W. H. Freeman and Co., San Francisco
3) Spieksma, F. Th. M. and M. I. A. Spieksma-Boezeman : *Acarologia*, 9, (1), 226, 1967
4) Oshima, S. : *Jap. J. Sanit. Zool.*, 21(1), 1, 1970
5) 大島司郎：衛生動物学の進歩，第1集，203，1971，学術書出版会，東京
6) 大島司郎：都市設備研究，4，20，1973
7) 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.*, 27-1, 270—273, 1976

光化学スモッグの涙液リゾチームおよび pH への影響

福田雅夫*, 大沢誠喜*, 岡和田紀昭**, 溝口勲*

Effects of Photochemical Smog on Tear Lysozyme and pH

MASAO FUKUDA*, MASANOBU OHSAWA*, NORIAKI OKAWADA**,
and ISAO MIZOGUCHI*

Tear samples were collected from dozens of high school students in Tokyo. Subjects exposed to oxidant (0.17 ppm) showed statistically significant depression of lysozyme and pH levels in their tears. But in this group lysozyme activities of students who complained of eye irritation were higher and pH levels of them were significant lower than those of students who had no symptoms. It is likely that eye irritation relates to reduction of pH in the tear.

When egg lysozyme was exposed to ozone (0.1 ppm) for 40 minutes, its activity showed 65% decrease. Ozone is considered as a suppressing factor of lysozyme activity.

緒　言

光化学スモッグ時に眼がいたい，涙が出る，チカチカするなど，眼の刺激症状を訴える人は多く，他覚症状として一過性の角結膜炎，眼球結膜血管の拡張による眼の充血が認められている[1-3]．しかしその被害症状が光化学スモッグによるものかどうか，臨床的に判断するのは極めて困難である．Sapse[4,5] らはロスアンジェルスにおいて，光化学スモッグ時に調査したところ，眼刺激症状を訴えた人の涙液リゾチームは正常人にくらべ平均60%減少した．しかし眼刺激症状のない人についての検討はなされていない．われわれは光化学スモッグによる眼粘膜刺激症状の客観的指標探究を目的として，涙液リゾチーム，pH を用いて眼刺激症状の無い人についても調べ，汚染濃度との関係を明らかにした．そしてその被害をもたらす原因物質について若干の知見をえたので報告する．

方　法

1. 調査対象

1975年6月から7月にかけて，東京都大田区の日体荏原高等学校の1クラスを対象に午後1時～3時の間に行った．対象人数は6月4日39名，6月9日37名，6月19日28名，7月4日39名であった．

2. 活性リゾチーム量および pH の測定方法

涙液の採取方法は，直径 4 mm の消毒したろ紙（東洋ろ紙 No. 5 B）をピンセットで被験者の外し部にのせ，ろ紙が涙液で湿潤したら直ちに取り出して，滅菌試験管に入れ 4°C で保存した．活性リゾチーム量の定量方法は Lyso-plate 法[6-8] を用いた．それは Micrococcus lysodeikticus (150 mg/m*l*) を含有する厚さ2 mm の寒天プレート上に，採涙したろ紙とヒト標準リゾチーム溶液（250 μg/m*l*, 617 μg/m*l*, 1233 μg/m*l*）1 μl を含ませたろ紙を置き，37°C にて6時間後に形成された Lysis-zone の直径を測定し定量する方法である．pH の測定はBTB試験紙を用い，試験紙を結膜のう内に貯溜している涙液にひたし，ただちに比色を行った．なお採涙は右眼，pH 測定は左眼を用いた．

3. 活性リゾチーム量を低下させる原因物質の検索方法

直径 6mm のろ紙に 5 mg/m*l* の卵白リゾチーム溶液を 3 μl 含ませ，湿度100%のチャンバー内で5・10・20・40分間曝露をおこない，Lyso-plate 法で測定した．検量線は 1 mg/m*l*, 2 mg/m*l*, 5 mg/m*l* の卵白リゾチーム溶液を使用した．曝露物質および濃度は，オゾン 0.1 ppm, 0.2 ppm, SO_2 40 ppm, CO 800 ppm, NO_2 200 ppm, NO 150 ppm+NO_2 300 ppm, アクロレイン 50 ppm, ホルムアルデヒド 25 ppm, PAN 10 ppm であった．コントロールは室内空気を用いた．

* 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
** 名古屋大学医学部眼科学教室

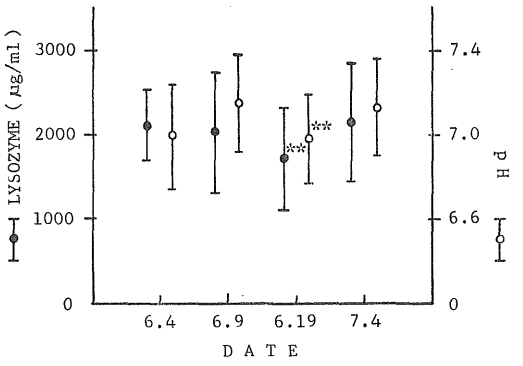


Fig. 1. Lysozyme and pH levels in tear
** P<0.01 compared to July 4

Table 1. Air Pollutants levels at sampling times of each day

	6.4	6.9	6.19	7.4
Ox ppm	0.11	0.12	0.17	0.03
O_3	0.11	0.11	0.16	0.01
NO_2	0.04	0.05	0.04	0.07
NO	0.003	0.003	0.003	0.06
CO	0.5	0.7	1.5	3.2
SO_2	0.02	0.03	0.03	0.01

Table 2. Average values and standard deviations of Lysozyme and pH levels in tear

Date	n	Lysozyme(μg/ml)	pH
6.4	39	2117±426	6.99±0.25
6.9	37	2032±712	7.15±0.23
6.19	28	1700±599**	6.98±0.21**
7.4	39	2166±700	7.13±0.23

**P<0.01 compared to July 4

Table 3. Percentages of changes in Lysozyme and pH levels on June 19 vs. July 4

	Decrease	Invariable	Increase
Lysozyme	70	4	26
pH	70	11	19
Lysozyme & pH	48	0	4

結　果

1）採涙時のオキシダント濃度は6月4日，0.11 ppm, 9日 0.12 ppm, 19日 0.17ppm, 7月4日 0.03 ppm で，6月9日が最も高く7月4日はコントロールの意味で行った（Table 1). Fig. 1, Table 2 のごとくコントロールの7月4日の活性リゾチーム量は平均 2166 μg/ml, pH は7.13にくらべ，オキシダント濃度の最も高かった6月19日はそれぞれ 1700 μg/ml, 6.98 で共に有意の低下を示した（P<0.01). 又6月19日の活性リゾチーム量は6月4日，9日のそれとくらべても低下を示した（P<0.01, P<0.05). 6月19日の個々人についての変化を7月4日とくらべると活性リゾチーム量の低下を示した人は70%，不変4%，上昇26%，pH の低下を示した人は70%，不変11%，上昇19%であった．又両方とも低下した人は48%，不変0%，上昇4%であった（Table 3). 生徒達はわれわれが採涙する前は授業を受けており，目刺激症状を訴えた者は少なく，採涙時には症状はなかった．目刺激症状を訴えた人は Table 4 のごとく6月4日2名（5%），9日8名（22%），19日6名（21%）であった．6月19日の目刺激症状を訴えた人の活性リゾチーム量および pH を同日の症状のない人と比較すると，症状を訴えた人の pH は6.82，無い人7.03と症状を訴えた人の pH がより低下した（P<0.05). しかし症状を訴えた人の活性リゾチーム量は逆に上昇傾向を示し，6月4日，9日においても同様の傾向を示した．6月19日の症状のない人の活性リゾチーム量はコントロール日の7月4日にくらべ有意の低下を示した（P<0.01）が，症状を訴えた人は低下傾向を示すにすぎなかった．pH は逆に症状を訴えた人は有意の低下を示し（P<0.01）症状のない人は低下傾向を示すにすぎなかった．6月4日の pH は症状の有無にかかわらずコントロール日にくらべ低下を示した（P<0.05).

Table 4. Average values and standard deviations of Lysozyme and pH levels with or without eye irritation

Date	Eye Irritation	n	Lysozyme (μg/ml)	pH
6.4	+	2	2135± 285	7.00±0.00
	−	37	2116± 433	6.99±0.26
6.9	+	8	2156±1055	7.20±0.18
	−	29	1997± 577	7.13±0.24
6.19	+	6	1878± 636	6.82±0.16
	−	22	1657± 579	7.03±0.20
7.4	−	39	2166± 700	7.13±0.23

2）Fig. 2 のごとくオゾン 0.1 ppm 20分間曝露を行うと，活性リゾチーム量は68%に減少し，40分間曝露で65%の減少を示した．オゾン 0.2 ppm を5分曝露行うだけで65%に減少し，40分間曝露で37%に減少した．しかし，SO_2 40 ppm, CO 800 ppm, NO_2 200 ppm, NO 150 ppm+NO_2 300 ppm, アクロレイン 50 ppm, ホルムアルデヒド 25 ppm,PAN 10 ppm を40分間曝露行

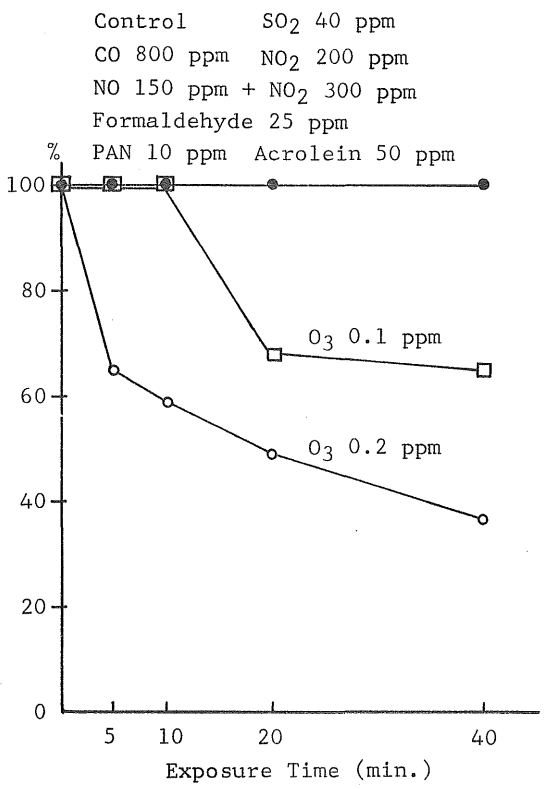


Fig. 2. Variation of Lysozyme levels with exposure time to several air pollutants

っても減少を示さなかった.

考　　察

光化学スモッグ時に涙液活性リゾチーム量および pH が減少するメカニズムは，第1に大気中の酸化性物質が直接涙に溶けこむこと，第2に鼻腔上気道より汚染物質を吸入することにより2次的に変動を起こす径路が考えられる.

涙液の活性リゾチーム量および pH が顕著な低下を示した6月19日は午後2時にオキシダント濃度が 0.21 ppm と最大になり，採涙した3時では 0.17 ppm であった．又6月9日は午後1時に最大 0.17 ppm で，採涙した3時では 0.12 ppm までオキシダント濃度が下ったので，活性リゾチーム量，pH とも低下が認められなかった．Pietsch[9] はオキシダント濃度が 0.19 ppm の時調査を行い涙液の活性リゾチーム量は低下を示したが，0.16 ppm の時低下しなかったと報告している．石川[10] らは都内の中学校で調査を行い，11項目の眼科的検査を行った．オキシダント濃度が最大 0.17 ppm の日の活性リゾチーム量は非スモッグ日にくらべ低下傾向を示し，pH は有意の低下を示した．しかし他の検査では違いは認められなかった．以上の事からオキシダント濃度が 0.17 ppm 付近に活性リゾチーム量の低下をきたす閾値があると考えられる.

眼刺激症状を訴えた人は症状のない人にくらべ活性リゾチーム量は上昇傾向を示したが，pH は有意の低下を示した．この事より眼の刺激症状は pH の低下と関連があると考えられるので今後例数を増やして検討する予定である．眼刺激によって活性リゾチーム量が上昇傾向を示したのは，チカチカすると感じた時から採涙時までに2時間位あり，採涙時には眼刺激症状はない事から，生体内で2次的にリゾチームを産生したと考えられる．Sapse らはロスアンジェルスで大気汚染管理局が「スモッグによる眼の刺激は軽～中程度」と発表した日に調査を行い，眼刺激症状を訴えた人の活性リゾチーム量は正常人にくらべ60%減少し，さらに被験者をエアコンディションの部屋に数時間居させた後測定すると，正常人にくらべ60%上昇したと報告している．Sapse らは採涙時に眼刺激症状を訴えている人のみ調べたが，われわれは眼刺激症状のない人も調べ活性リゾチーム量が顕著に低下したことを認めた．又眼刺激症状を訴えた人が21%に対し，活性リゾチーム量，pH の低下した人が各々70%もおり，眼刺激症状を自覚しなくても客観的生体反応としてとらえることができた.

光化学スモッグは複合汚染であるから，活性リゾチーム量および pH を低下させる原因物質を見出すことはむずかしいが，オゾンはリゾチームを酸化させ Trp 62 が N ホルミルキヌレニンに変化して不活化をおこすという報告[11] があり，われわれの in vitro の実験も活性リゾチーム量低下へのオゾンの寄与を確証したものと言えよう．また，フィールド調査においてオゾン濃度が 0.16ppm に上昇した時，活性リゾチーム量の低下を認めたことからも，オゾンは活性リゾチーム量を低下させる一因子であると考えられる.

結　　論

光化学スモッグ時に涙液の活性リゾチーム量および pH は有意の低下を示した．眼刺激症状を訴えた人の活性リゾチーム量は症状のない人にくらべ高い傾向を示し，pH は逆に有意の低下を示した．眼刺激症状は pH の低下と関係していると考えられる.

in vitro の実験より，オゾンは活性リゾチーム量を低下させる原因物質の一因子であることを認めた.

謝辞　試料ガスの一部を提供して下さった東京都公害研究所大気部に感謝の意を表します.

（本研究は昭和50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，そ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）三上理一郎，工藤翔二：日本臨床，**31**，2039，1973
2）三上理一郎：日本胸部疾患学会誌，**11**，723，1973
3）蒲山久夫，鈴木弘一，石崎百合子：臨床眼科，**26**，465，1972
4）Sapse, A. T., B. Bonavida, Jr., W. Stone, and E. E. Sercarz : *Am. J. Ophthl.*, **66**, 76, 1968
5）Sapse, A.T., B. Bonavida, W. Stone Jr., and E.E. Sercarz : *Ophthalmologica Additamentum ad*, **158**, 421, 1969
6）岡和田紀昭，梶尾高根，矢地通子，市川　宏，伊藤機一，川口昭恵：眼科臨床医報会，**68**，1012，1974
7）仁科甫啓，武藤良知，山口　潜：臨床病理，**21**，37，1973
8）Osserman, E. F. and D. P. Lawlor : *J. Exp. Med.*, **124**, 921, 1966
9）Pietsch, R.L. : *Environmental Protection Agency*, 1972 PB 224537
10）石川　哲ら：光化学大気汚染による健康影響調査東京班調査報告書，47，1975，環境庁大気保全局
11）崎山文夫，夏木令子：生化学，**46**，709，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 274—279, 1976

大気汚染物質と急性自覚症状との関連性（第一報）
各々の特質の基礎的統計的解析

牧野国義*, 溝口 勲*, 沖野哲郎**, 山本幹夫**

Relation between Air pollutants and Acute Subjective Symptoms (1)
Each Feature and Fundamental Statistical Analysis

KUNIYOSHI MAKINO*, ISAO MIZOGUCHI*, TETSURO OKINO**,
and MIKIO YAMAMOTO**

The daily incidences of symptoms were investigated with about 150 students of Nittai Ebara senior high school at Ohta-ku in Tokyo for 24 days during period from June to July in 1975. Then environmental factors were ozone, sulfur dioxide, nitrogen oxides (nitrogen monoxide and nitrogen dioxide), carbon monoxide, suspended particulate matter, temperature, humidity, ultraviolet, visible ray and wind velocity. Each symptom was compared with them.

Eye irritation, sore throat and shortness of breath as characteristic symptoms caused by photochemical smog had high correlation with ozone, sulfur dioxide, Pindex and PI defined as combined air pollution indices. The high correlation between the respiratory symptoms and sulfur dioxide may have been connected with little distance between the school and the sources of sulfur dioxide.

The symptoms, such as eye irritation and sore throat, caused by photochemical smog showed higher correlation with air pollutants except those of students who caught cold in those days. Playing sports caused numbness which was heavy symptom.

1. 緒 言

光化学スモッグは年々増加し，今や初夏の到来を示す年中行事の観を呈するようになった．このような光化学スモッグ被害の増加に対してその対策が必ずしも充分ではなく，人体影響についても未だ解決されていない点が少なくない．この光化学スモッグによる人体影響の研究方法の一つとしてアンケートによる自覚症調査が行なわれており，本研究もこの方法を採用している．アンケート調査法の長所として，機器を使用する調査と比較して簡便であり，大量処理も可能であることが挙げられるが，欠点として主観要素が強く，普遍性に乏しいことが挙げられる．この主観要素による欠点を補うため通常この資料を統計処理に付している．したがって統計処理方法も調査項目のデザインなどとともに重要である．

われわれはこれらを考慮し，アンケート調査を行なった結果興味ある知見を得たので，これを二報に分け，ここに報告する．

2. 方 法

(1) 調査方法

調査期間は昭和50年6，7月のうち在校時間の長い(Am. 8：00～Pm. 3：00) 24日間について，東京都大田区にある日体荏原高校男子生徒約150人を対象として調査した．日体荏原高校の大気汚染の程度を知るために，比較的近い都内7測定点（大気汚染常時測定室）の大気汚染物質濃度との比較を Table 1, 2 に示し，日体荏原高校測定室の風向分布を Fig. 1 に示した．

自覚症調査は日めくり方式で，毎日授業終了時Table 3に掲げた分類の症状があった場合，その項目をチェックする方法を採用した．

汚染物質資料として同校校舎屋上にある測定室の資料を使用した．汚染物質にはオゾン（オキシダントが測定器不備のためオキシダントの代用を兼ねる），亜硫酸ガス（正確には無水硫酸をも含み，硫黄酸化物と記すべきであるが一般的な亜硫酸ガスと記す），一酸化炭素，窒

* 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
** 帝京大学医学部公衆衛生学教室

Table 1. Comparison of 7 monitoring sites with monthly mean air pollution values

	Ox.(pphm)		SO_2(pphm)		NO(pphm)		NO_2(pphm)		NOx(pphm)		CO(ppm)		SPM(mg/100m³)	
Month	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7
M. site														
Tochomae	3.4	3.4	1.8	1.6	3.7	7.6	4.0	4.5	7.8	12.1	2.7	3.8	8.2	9.6
Kojiya	3.7	3.1	2.9	2.6	2.3	3.2	2.9	3.1	5.2	6.2	1.2	1.4	6.6	8.5
Setagaya	4.5	3.9	2.3	2.1	1.2	2.1	3.6	3.7	4.8	5.9	1.6	1.0	7.6	6.8
Shibuya	3.7	3.0	1.9	0.9	1.3	2.2	3.2	2.6	4.5	4.7	2.3	2.5	5.8	6.3
Harumi	3.0	2.5	2.5	2.9	1.5	2.6	4.8	5.0	6.3	7.7	0.9	1.1	5.5	5.8
Shiba	3.4	2.7	2.1	2.2	2.3	2.8	4.1	3.6	6.3	6.4	1.5	1.5	5.3	5.2
Meguro	4.2	3.8	2.0	1.9	2.3	3.3	4.5	4.8	6.8	8.1	1.3	1.3	4.8	5.5
Ebara	2.5	2.6	1.1	1.0	0.9	2.2	3.8	3.7	4.7	5.9	1.0	1.6	7.1	6.9

Table 2. Comparison of 7 monitoring sites with monthly maximum air pollution values

	Ox.(pphm)		SO_2(pphm)		NO(pphm)		NO_2(pphm)		NOx(pphm)		CO(ppm)		SPM(mg/100m³)	
Month	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7	6	7
M. site														
Tochomae	19.0	18.0	5.0	6.0	22.0	29.0	12.0	14.0	25.0	35.0	9.0	16.0	40.0	46.0
Kojiya	29.0	20.0	7.0	11.0	8.0	11.0	9.0	9.0	7.0	18.0	4.0	6.0	30.0	58.0
Setagaya	22.0	24.0	5.0	9.0	8.0	12.0	9.0	12.0	15.0	19.0	4.0	5.0	21.0	41.0
Shibuya	20.0	18.0	6.0	3.0	7.0	14.0	10.0	8.0	13.0	17.0	6.0	7.0	22.0	30.0
Harumi	21.0	18.0	8.0	8.0	7.0	22.0	11.0	14.0	14.0	28.0	3.0	6.0	30.0	29.0
Shiba	23.0	19.0	5.0	8.0	10.0	10.0	13.0	9.0	17.0	18.0	4.0	5.0	20.0	28.0
Meguro	28.0	25.0	5.0	8.0	14.0	22.0	12.0	14.0	24.0	29.0	9.0	12.0	22.0	36.0
Ebara	19.5	24.0	7.6	11.6	8.5	55.0	9.0	14.0	13.8	65.0	2.5	5.0	25.7	33.8

Table 3. Classification of subjectives symptoms

No.	Symptoms
1.	Common cold
2.	Diarrhea
3.	Headache
4.	Vertigo
5.	Eye irritation
6.	Sore throat
7.	Nose complaints
8.	Nosebleed
9.	Strange odour
10.	Cough
11.	Phlegm
12.	Shortness of breath
13.	Nausea
14.	Abdominal pain
15.	Numbness
16.	Lethargy

素酸化物（一酸化窒素，二酸化窒素），浮遊微粒子を，気象要素には温度，湿度，紫外線量，可視光線量，風速を使用した（以下これらを汚染要素と総称する）．湿度以外の汚染要素では在校時間内の最高時間値を採用した（湿度は日中低下することから最低1時間値とした）．さらに複合大気汚染指標として，L.R. Babcock の提唱した Pindex[1] およびさきにわれわれが提唱した PI[2] をも汚染要素として採用した．なお，Pindex はオキシダント，亜硫酸ガス，窒素酸化物，一酸化炭素，浮遊微粒子，炭化水素の合成要素であるが[3]，日体荏原高校では炭化水素欠測のため加算されていない．また PI はオキシダントと温度との合成要素である[2]．

（2）分析方法

本報では各相関分析（自覚症状訴症率—汚染要素，自覚症状訴症率間）を主とし，自覚症状と汚染要素との関係，風邪の影響，運動の影響および他のフィールドとの比較について検討した．

3. 結果および考察

（1）日体荏原高校の位置的条件

日体荏原高校の位置的条件は Table 1 のように月平均値では他に比べ高くないが，月最高値では Table 2 のように比較的高い．これは Fig. 1 の風向分布からわかるように調査期間中では東風が多く，次いで南風となっている．日体荏原高校の東側には東京湾が近く，南側には京浜工業地帯が連らなっている．亜硫酸ガスが月最

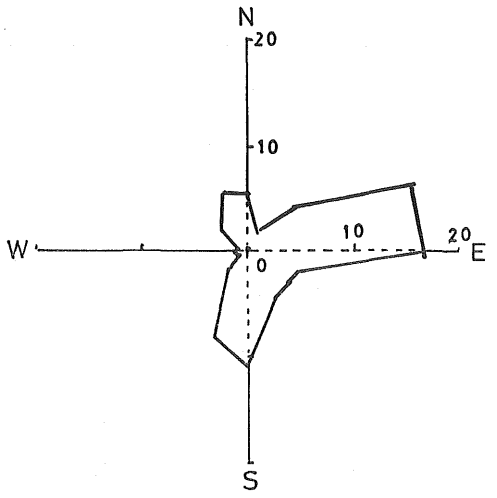


Fig. 1. Wind direction during examined period from June to July in 1975 at Nittai Ebara senior high school

高値を示したときはほとんど南風で，日体荏原高校は京浜工業地帯の影響を受け易い地域にあると言える．また近くに幹線道路（第二京浜，環状8号線）があり，この影響も考えられる．光化学スモッグは主に南方向からの風のときに発現し易いことから，平均濃度が低いわりには光化学スモッグ被害の受け易い地域であると考えられる．

（2）自覚症状と汚染要素との相関

Table 4 は各自覚症状の平均および最大訴症率で，このうち症状8（鼻出血）は訴症率が非常に低いので以下の分析より除外する．

各自覚症状訴症率と各汚染要素の大きさとの相関係数を有意水準により並べ換え，示したのが Table 5 である．症状5（眼刺激），6（のど刺激），12（息苦しい）が亜硫酸ガス，オゾン，Pindex, PI ととくに高い有意性を示している．上記症状はいずれも光化学スモッグの特徴的症状といわれている症状群で，光化学スモッグの発現を示すオゾンや複合汚染指標としての Pindex および PI の妥当性を裏付けるとともに，亜硫酸ガスがこれらの汚染要素以上の高い有意性を示したことは日体荏原高校が前記のように京浜工業地帯の影響を受け易い地域に位置していることと深く関連することが推察される．Table 2 のように日体荏原高校では亜硫酸ガスの月最高値が比較的高く，そして亜硫酸ガスは症状10（咳），7（鼻症状），11（たん）の呼吸器系症状との有意性が他の汚染要素に比較して高い．このことも上記関連性を示すものと考えられる．温度，湿度が症状16（だるさ）と有意な相関を示すことは不快指数がこれらを組み合わせて作られることから，その関連性もうなずけるところであるが，症状2（下痢），14（腹痛）が浮遊微粒子や二酸化窒素と一群をなすことは必ずしも理解できるものでない．これについてはさらに詳細な検討が必要であると思われる．なお，温度と高い有意性を示す症状が少ないが，これは調査期間が夏季に限定されているので，温度差が小さいことによると考えられる．一年間の調査[2]では温度も自覚症訴症に寄与するところは大きい．

（3）自覚症状間の内部相関

各自覚症状訴症率間の相関係数を有意水準の高さにより並べ換え，Table 6 のように示した．比較的一群となっているがとくに症状12（息苦しい），6（のど刺激），10（咳），7（鼻症状），11（たん）が非常に高い有意性を示した．光化学スモッグによる自覚症状群間には高い相関が考えられるが，(2)と異なり症状5（眼刺激）と他の症状との有意性が若干低く，いわゆる光化学スモッグによる影響として多少の相違がみられる．これは亜硫酸ガスの影響の大きいことや後述の風邪の影響などによることが考えられる．

（4）風邪の影響

今回の調査では Table 4 のように風邪をひいている者が非常に多く，全期間を通じて1/4強の者が風邪をひいていた．風邪をひくことが大気汚染の影響と全く無関

Table 4. Mean, Maximum on the rate of subjective symptoms and date of the maximum

Symptom No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Mean	26.26	6.47	15.66	9.96	12.30	10.71	18.85	0.61
Max	35.96	13.79	26.13	14.96	79.53	32.28	29.13	2.33
Date max	6.30	6.23	6.06	6.06	6.06	6.06	6.06	6.18
Symptom No.	9	10	11	12	13	14	15	16
Mean	3.29	10.46	8.94	4.53	2.36	8.26	1.66	18.99
Max	14.96	31.50	16.54	27.59	5.41	12.28	7.02	29.01
Date Max	6.06	6.06	6.06	6.06	6.09	6.30	6.25	6.17

Table 5. Correlation between each subjective symptom and each pollution factor

P.＼S.	5	6	12	9	10	13	3	4	7	11	2	14	16	1	15
SO_2	A	A	B	C	B	C	C		B	B	C				
O_3	A	B	B	B	C	C		C							
Pin.	A	B	B	C	C	C	C	C							
PI	A	B	C	C		C	C								
Temp.	C					B		C					B		
Hum.								C					C		
SPM						C					C	C			
NO_2											C	C			
CO												B			
WV													C		
NO															
NOx															
UV															
VR															

(A ; 0.1%, B ; 1%, C ; 5%, each shows more than significance level of correlation coefficient)

Table 6. Correlation between subjective symptoms

	12	6	10	5	7	11	3	4	9	13	14	2	1	15	16
12		A	A	A	A	A	B	A	A	C					
6			A	A	A	A	A	B	B	C					
10				A	A	A	A	B	B						
5					B	A	B	A	B						
7						A	A	B	C	C					
11							C	B	C	A					
3								B	C	B					
4									A						
9															
13															
14															
2															
1															
15															
16															

係とは言えないけれども，少なくとも光化学スモッグの急性影響としては無視し得ると考えてもよいであろう．ただ今回の調査では母数が充分大きいとは言えないので風邪をひいている者も母数に入れて分析した．そして参考のためにこれらの者を除外して Table 5, 6 同様に分析し，Table 7, 8 に示した．それぞれについて比較すると，自覚症状と汚染要素との相関について大体一致しているが，光化学スモッグによると思われる一群の症状と汚染要素との相関について有意性が高くなっており，自覚症状間の内部相関でも有意性が高まっている．有意性の高まりがそのままより正確であることを意味するものではないが，風邪というフィルターを除いたことでより明瞭になったと推察される．したがって母数が充分大きい数の場合には風邪をひいている者を母数より除外した方が光化学スモッグの急性影響を研究する場合適当であると思われる．

（5）運動の影響

運動の影響は多くは運動負荷を与えた場合の訴症への影響として考えられるが[4]，アンケート調査ではこの方法を採用することが困難で，われわれは運動中またはその直後に訴症した者がどの程度いるかを知ることにより，運動が訴症に与える影響を若干でも知ることができると考えた．Table 9 に症状3～16（Table 2 参照）の運動中またはその直後に訴症した場合の平均訴症率および全体の平均訴症率とその百分率を示した．百分率の高い順に症状12（息苦しい），5（眼刺激），15（しびれ）

Table 7. Correlation between each subjective symptom except those of students catching cold in those days and each air pollution factor

P.＼S.	5	6	10	9	12	3	4	7	11	2	14	16	13	15
SO_2	A	A	A	B	B	B	C	A	A					
O_3	A	B	B	A	B	B	B							
PI	A	B	B	B	B	B	C							
Pin.	A	B	B	B	B	C		C			C			
Temp.	C					C	B							
NOx	C					A								
SPM	C	C	C							C				
NO_2										C	C			
CO										B				
Hum.									C		C			
WV											C			
NO														
UV														
VR														

Table 8. Correlation between subjective symptoms except those of catching cold in those days

	5	12	6	7	10	11	3	9	4	13	16	2	14	15
5		A	A	A	A	A	A	A	A	C	C			
12			A	A	A	A	A	A	A					
6				A	A	A	A	B	B	C	C			
7					A	A	A	B	C	B	C			
10						A	B	A	B					
11							B	B		B				
3									C	B	B			
9									B					
4											C			
13														
16														
2														
14														
15														

となっている．運動は息苦しさをもたらすことが多いのでこれが高いのは当然とも言えるが，他の2症状は運動により感覚が鋭敏になったことを示し，とくにしびれのような重症状の訴症に寄与するとの結果は興味深い．

（6）他のフィールドとの比較

光化学スモッグは単一の原因による汚染ではなく，光化学反応物質やこれに寄与する紫外線量，温度などが異なれば，光化学反応物質の状態（成分，量など）もまた異なり，さらに被害をうける側の状況（運動中であるとか室内に居るなど）によってもその被害は異なる．しかし，これらが全体として類似している場合にはフィールド間の共通性，相違性について検討することができる．われわれは先に目黒区内[2]や世田谷区内[5]で同種の調査を行なっており，3フィールドで共通の自覚症状と汚染要素との相関を有意水準により，Table 10 に示した．なお，調査期間は5月～8月以内である．日体荏原高校の調査では目黒区内の調査に比べ，全体的に相関が高く，亜硫酸ガスの影響も大きい．逆に世田谷区内の調査に比べ相関が低い．しかし，これら3フィールド間での明確な差を指摘するには至らず，さらに詳細な検討が必要である．

4. 結　論

東京都大田区の日体荏原高校の男子生徒約150人を対象として昭和50年6，7月のうち24日間，16項目の自覚症状調査を行ない，検討した結果次の様な知見を得た．

(1) 眼刺激，のど刺激，息苦しいという自覚症状が亜

Table 9. Mean on the rate of subjective symptoms during or directly after playing sport and its percent against total mean

Symptom No.	3	4	5	6	7	8	9
Mean	2.56	1.13	3.26	1.61	1.76	0.05	0.58
Total mean	15.66	5.96	12.30	10.71	18.85	0.61	3.29
Percent	16.4	19.0	26.5	15.1	9.4	8.8	17.5
Symptom No.	10	11	12	13	14	15	16
Mean	1.39	1.09	1.64	0.47	1.43	0.43	3.05
Total mean	10.46	8.94	4.53	2.36	8.36	1.66	18.99
Percent	13.3	12.1	36.3	20.0	15.0	25.6	16.1

Table 10. Correlation comparison among 3 fields

P.	Ox. (O_3)			SO_2			Temp.			Hum.			Pindex			PI		
S.	N	Y	M	N	Y	M	N	Y	M	N	Y	M	N	Y	M	N	Y	M
3	C	A	A	C	A	C					B		C	B		C		A
4	C	B			B		C			C	C	B	C	A		C		
5	A	A	A	A	A	B	C		C		B		A	A		A		A
6	B	A	A	A	A	A					A		B	A		B		A
10	C	B	A	B	A	B					A		C	B				B
11		B		B	A						A			C				
12	B	A	A	B	B	B		C	B		A	C	B	B		C		B
13				C	C		B				C		C			C		
14		C			C						A			C				
16		C					B			C	B							

(N ; Nittai Ebara senior high school, Y ; Yahata junior high school, M ; schools at Meguro-ku)

硫酸ガス，オゾン，Pindex, PI と高有意な相関を示し，光化学スモッグと密接な関係を有すると思われる．さらに日体荏原高校の位置的条件より亜硫酸ガスは咳，鼻症状，たんの訴症にも関連する．

(2) 上記の自覚症状のうち眼刺激以外の呼吸器系の症状間に高有意な相関があり，亜硫酸ガスの影響の大きいことを示すとともに，風邪をひいている者を母数から除外したとき，眼刺激を含めて上記自覚症間に高有意な相関があった．調査母数が充分大きい場合には風邪をひいている者を調査母数より除外した方がよいと思われる．

(3) 運動はしびれのような重症状の訴症に寄与すると思われる．

(4) 3フィールド（日体荏原高校，目黒区内，世田谷区内）での自覚症状と汚染要素とを比較したが，明確な差異は得られなかった．これはさらに詳細な検討を必要とする．

今回の調査では調査母数の小さいことが統計処理上大きな欠点となった．また連続した調査期間でないことも限定条件となった．このようにいくつかの知見が得られたけれども，不充分な点も多く，今後これらを解決し，さらに検討する必要があるものと考える．

謝辞 本報の資料整理から分析まで多大なる御協力を下さいました帝京大学医学部寺尾浩明講師ならびに山田和枝氏に深謝致します．

（本研究は昭和50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）Babcock, L. R. : *J. Air Pollution Control Assoc.*, 20(10), 653, 1970

2）牧野国義，溝口　勲：日本公衛誌，22（8），421, 1975

3）大気汚染研究全国協議会：環境庁昭和47年度公害調査研究委託事業報告書，1973

4）大森　実：公害と対策，10（10），1043, 1974

5）溝口　勲：東京衛研年報，26-1, 289, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 280—286, 1976

大気汚染物質と急性自覚症状との関連性（第二報）多変量解析による検討

牧野国義*, 溝口 勲*, 沖野哲郎**
山本幹夫**

Relation between Air Pollutants and Acute Subjective Symptoms (2) Multivariate Analysis

KUNIYOSHI MAKINO*, ISAO MIZOGUCHI*, TETSURO OKINO**
and MIKIO YAMAMOTO**

In this part, multivariate analysis among each symptom and some air pollutants was described.

The multiple correlation analyses, 3 factors (symptom 1, air pollutants 2) and 6 factors (symptom 1, air pollutants 5). In the case of 3 factors, air pollutants which involved ozone or sulfur dioxide had high correlation with many symptoms. The factor, which involved humidity or suspended particulate matter and were not significant with any symptoms in correlation analysis, were significant with some symptoms in multiple correlation analysis.

The multiple regression analysis of factors which showed high significance level correlation analysis in 6 factors was investigated. The primary combined regression values correlated higher with symptoms than Pindex and PI which were combined air pollution indices.

In the principal component analysis by symptoms and air pollutants, it was supposed that the first principal component was the factor associated with photochemical smog such as ozone, eye irritation and sore throat and the second was the primary air pollutants such as nitrogen oxides and carbon monoxide.

1. 緒 言

前報では自覚症状と汚染物質および気象要素（以下これらを汚染要素と略す）との相関分析を行ない，個々について直接的関連性を述べ，風邪が光化学スモッグの急性自覚症状を調査する上でどの様に影響するか，また運動中またはその直後の訴症が全体のどの程度を占めているか，さらに他のフィールドとの比較に及び，光化学スモッグによる自覚症状と汚染要素との関係について検討した．しかし光化学スモッグにおいては，光化学反応物質（汚染物質）や反応条件（温度，湿度，紫外線量など）が異なれば反応生成物（オゾン，オキシダントなど）の状態も異なるので，これらの要素を総合的にみた上で検討しなければならない．したがって自覚症状と汚染要素との対応を1対1と考えるのでなく，複数の汚染要素や全体的関係を考える必要がある．この考え方にもとづく解析法が多変量解析で，本報で多変量解析法により検討し，以下の結果を得たのでここに報告する．

2. 分析方法

（1） 使用資料

使用資料は全て前報と同じであり，資料の詳細は前報に掲載した．

（2） 解析方法

多変量解析の手法として重相関分析，重回帰分析，主成分分析を行なった．これらについては以下に述べる．なお解析には帝京大学医学部公衆衛生学教室のコンピュータ（FACOM 230-50）を使用した．

（3） 重相関分析

多変量解析で最も頻度多く使用される方法が重相関分析である．自覚症調査の研究においても，自覚症状訴症に寄与する因子として単因子のみ考慮すれば足りると考えることはできない．したがって相関分析のみでなく，重相関分析を行なう必要がある．しかしながら，この分野で重相関分析を行なった報告は少ない[1,2]．その理由として繁雑であることが考えられるが，コンピュータの

* 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
** 帝京大学医学部公衆衛生学教室

利用によりわれわれはこれを解決することができた.

自覚症状訴症に寄与する因子として，前報に掲げたようにオゾン，窒素酸化物（一酸化窒素，二酸化窒素），亜硫酸ガス，一酸化炭素，浮遊微粒子，温度，湿度，紫外線量，可視光線量，風速を採用した．これらの因子のうちから因子数2および5を選び解析した．因子数を2から11まで変えて分析することも可能であるが膨大な量となり，よって恣意的ではあるが上記のように限定した.

（4） 重回帰分析

重回帰分析も重相関分析同様各分野で多く使用されている統計的手法で，目的変数がn個，説明変数がm個ある場合，目的変数は

$$y_i=a_0+\sum_{j=1}^{m}a_i x_{ij}+e_j \quad (i=1,\ m,\ j=1,\ n)$$

と表わすことができる[3]．ここで a_0 は切片，a_i はi番目の説明変数についての回帰係数，e_j はj番目の目的変数についての残差である．したがって，j番目のデータでの自覚症訴症率を y_j，これに寄与するi番目の因子を x_{ij} とすると，自覚症訴症率はこれに寄与する因子の一次結合により説明することができる．ただし，この場合に残差 e_j を無視できることが条件であり，無視できる場合とは重相関が有意であることを意味する．重回帰分析を言い換えれば，回帰係数を求めることにより，自覚症状訴症率の光化学スモッグへの関連をも表わすことができる．この意味で，前報で述べた複合大気汚染指標のPIおよびPindexも回帰係数と同義であると考えられる．重相関分析で有意な重相関を示した因子の組み合わせ（自覚症訴症に寄与する因子数2および5）から新たに複合大気汚染指標を設定することができる．またHorieらは重回帰分析を利用して大気汚染閾値設定を試みており[4]，今後検討する必要がある.

（5） 主成分分析

主成分分析も上記重相関分析，重回帰分析と同様に多変量解析において基本的な統計的手法である．主成分とは説明変数の一次結合よりなる総合特性値をいい，次式により表示される[3].

$$z_j=\sum_{i=1}^{m}l_{ji}x_i \quad (j=1,\ n) \quad \text{ただし，} \sum_{i=1}^{m}l_{ji}^{\,2}=1$$

ここで x_i はm個のうちのi番目の説明変数で，z_j はn段階に重みづけしたうちのj番目の総合特性値つまり主成分で，jが1のときの z_1 を第1主成分と呼び，以下第j主成分と呼ぶ．l_{ji} は重みづけ後の第j主成分のi番目の説明変数の係数である．したがって自覚症状と汚染要素とからなる説明変数について総合特性値つまり主成分を重みづけにより求めることができる.

3. 結果および考察

（1） 重相関分析

各自覚症状と前記10種汚染要素とにおける重相関分析を行なった．Table 1 (a) に掲げた症状のうち，風邪（症状1），下痢（症状2）は相関分析の結果より，鼻出血（症状8），吐気（症状13），しびれ（症状15）は訴症率が低いことから繁雑を避け除外した（前報参照）．また説明変数は Table 1 (b) の汚染要素のうち2因子または5因子で，この重相関分析の結果を有意水準（危険率0.5, 1, 5, 10%）により分けて，各々 Table 2, 3 に図示した.

自覚症状と汚染要素2因子との重相関では Table 2 のように症状5（眼刺激），6（のど刺激），12（息苦しい），3（めまい）がオゾンまたは亜硫酸ガスを含む因子との重相関で高い有意性を示した．しかし，症状9（異臭），4（めまい）がオゾンを含む因子と高い重相関を示したのに対し，症状7（鼻症状），10（咳），11（たん）は亜硫酸ガスを含む因子と高い重相関を示した．この相違は訴症の原因の異なることを示し，前者が光化学スモッグによる訴症であるのに対し，後者は亜硫酸ガスを主とする大気汚染による訴症を示唆するものと考えられる．さらに前報の相関分析では有意性を示していない自覚症状と浮遊微粒子または湿度が重相関では高有意であることは浮遊微粒子または湿度が間接的に関連すると考えられるが，明らかでなくこれらについては別に検討の

Table 1. The number of symptoms and air pollution

(A)Symptom factors	(B)Air pollution factors
S 1. Common cold	P 1. Ozone
S 2. Diarrhea	P 2. Sulfur dioxide
S 3. Headache	P 3. Carbon monoxide
S 4. Vertigo	
S 5. Eye irritation	P 4. Nitrogen monoxide
S 6. Sore throat	
S 7. Nose complaints	P 5. Nitrogen dioxide
S 8. Nosebleed	P 6. Nitrogen oxides
S 9. Strange odour	P 7. Suspended particulate matter
S 10. Cough	
S 11. Phlegm	P 8. Temperature
S 12. Shortness of breath	P 9. Humidity
	P 10. Ultra-violet
S 13. Nausea	P 11. Visible ray
S 14. Abdominal pain	P 12. Wind velocity
S 15. Numbness	
S 16. Lethargy	

Table 2. Multiple correlation (3 factors)

p.\s.	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16
1— 2			C		A	A	C	C	D	C	C				
3			C	D	A	A		C		D	C				D
4			C	D	A	B		C	D		C				
5			C	C	A	A		C			C				
6			C	D	A	A		C			C				
7			C	C	A	B		C			C				
8			C	D	A	A		C	C		C	D			C
9			C	C	A	B		C		D	C	D			D
10			C	D	A	A		C	D		C				
11			C	D	A	A		C	D		C				
12			C	D	A	B		C			C				D
2— 1			C		A	A	C	C		C	C				
3			C		A	A	C	C		C	B	D			
4		C	C		A	A	C		B	C	B	C			
5			C		A	A	C		C	C	B	D			
6		B	C		A	A	C	D	C	C	B	C			
7		C	C		A	A	C	D	D	C	C	D			
8			C		A	A	C	D	C	D	C	C			C
9			C	C	A	A	C	D	C	C	B	C			C
10			C		A	A	C	D	C	C	C	D			
11			C		A	A	C	D	C	C	C	D			
12			C		A	A	C	D	D	D	B	C			C
3— 1			C	D	A	A		C		D	C				D
2			C		A	A	C		D	C	B	D			
4															
5															
6		D													
7		C			D						D				
8												D			C
9					D	D									
10															
11															
12															D
4— 1			C	D	A	B		C	D		C				
2			C		A	A	C		B	C	B	C			
3															
5		C										C			
6		C										D			
7		C			D	D						C			
8												C			C
9					C	D						C			
10															
11															
12															D
5— 1			C	C	A	A		C			C				
2			C		A	A	C		C	C	B	D			
3															
4		C										C			
6		C										C			
7		C			C	C			B		D				
8												C			C

p.\s.	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16
7— 1			C	C	A	B		C			C				
2			C		A	A	C	D	D	C	C	D			
3		C			D	C					D				
4		C			D	D						C			
5		C			C	C			B		C				
6		C			A	B			D		C	D			
7		C			D	C						D			
8		C			D	D					C	C	D		C
9		C	D	D	A	B					C	A			C
10		C			C	D						D			
11		C			C	D						D			
12		C			D							D			C
8— 1			C	D	A	A		C	C		C	D			C
2			C		A	A	C	D	C	C	C	C			C
3												D			B
4												C			C
5												C			C
6												C			C
7		D				D						C			C
8					D						D	C	D		C
9				D	D	C	D					C			C
10					D							C			C
11												C			C
12												D			B
9— 1			C	C	A	B		C		D	C	D			D
2			C		A	A	C	D	C	C	B	C			C
3					D	D						C			C
4					C	D						C			C
5					C	D						C			C
6		C			D	D						C			C
7				D	A	B					C	A			C
8				D	D	C	D					C			C
9					C	B	C			C	C	A			C
10					C	C		D		B	C	A			C
11												C			B
12															
10— 1			C	D	A	B		C	D		C				
2			C		A	A	C	D	C	C	C	D			
3															
4															
5															
6															
7															
8												D			
9												C			C
10												A			C
11															D
12															D
11— 1			C	D	A	A		C	D		C				
2			C		A	A	C	D	C	C	C	D			
3															
4															
5															D
6		C													
7			C	D								D			
8															
9															
10															
11															
12															

| | | |

1,2,5,7,8		A	C		C		D		1,4,5,9,12	C	C	D	D		C
9		A	C		D		D		10,12	C	C	D	D		D
10		B	C	D	D		D		7,8,9	C	C				
12		A	C				D	D	10	D	C				
8,9		C	C		D	D			12	D	D	D			D
10		C	C	D	C		D		9,10	C	C				
12		C	C		D			C	12	D	C	D			D
9,10		C	C	D	D	C	D		10,12	D	C	D			
12		C	C		D			D	8,9,10	C	C				
10,12		B	C	D	D		D	D	12	C	C				D
7,8,9		C	C			D			10,12	D	C				D
10		C	C	D		B			9,10,12	C	C				D
12		C	C					D	5,7,8,9	C	C		C		
9,10		C	C	D		B	D		10	C	D		C		
12		C	C					D	12	C	D		C		C
10,12		C	C						9,10	C	C				
8,9,10		C	C			C	D		12	C	C				C
12		C	C			D		D	10,12	C	D		D		D
10,12		C	C					D	8,9,10	C	C				
9,10,12		C	C			C	D	D	12	C	C		D		C
3,4,5,7		C	C	D	C		D		10,12	C	D				C
8		C	C		C				9,10,12	C	D				C
9	D	C	B						7,8,9,10	C	C				
10		C	C	D	C				12	C	C				D
12		C	C		D			D	10,12	D	D				D
7,8		C	C		D				9,10,12	C	D				D
9	D	C	C				D		8,9,10,12	C	C				D

必要があると思われる．

つぎに因子数の多い汚染要素5因子と自覚症状との重相関分析では膨大な数となり処理上困難であるのでTable 3 のように限定因子について（光化学スモッグではオゾンが不可欠要素であるのでこれを固定した）検討した．有意水準から上記重相関と比較すると，危険率0.5% 以上で有意を示す重相関は少ない．しかしこれは多因子重相関を軽視できるとは意味していない．自覚症訴症の原因は必ずしも単一でなく，多くの場合複数原因による．また訴症が光化学スモッグによるとしても，いつも光化学スモッグの影響が同じとは言えない．寧ろ高い重相関を示した場合，汚染要素各因子がどのような構成のとき訴症に寄与するかの検討，つまり重回帰分析に歩を進めねばならない．

（2） 重回帰分析

重回帰式は説明変数の結合により目的変数を表示しようという試みで2（4）で述べたように残差の大きいつまり重相関の有意水準の低いものには意味がない．したがって今回は6因子（自覚症状1因子と汚染要素5因子）の重相関で高い有意水準を示したものについて検討した．そして光化学スモッグの最も代表的自覚症状として眼刺激が考えられるので，症状5（眼刺激）の重回帰式について検討した．Table 4 に重回帰式を構成する汚染要素とその重回帰式を示す．重回帰式はいずれも切片が大きく，未知要素の大きさを物語っている．したがってさらに異なった構成の重回帰分析の必要がある．重回

Table 4. Combinations among air pollution factors and those regression equation

No.	Combination	Regression equation
1	1,2,3,5,7	(Symp.)=15.2+0.897(1)+3.33(2)+0.288(3)−5.05(5)+1.00(7)
2	1,2,4,5,7	(Symp.)=15.9+0.958(1)+3.36(2)+1.07(4)−5.62(5)+1.01(7)
3	1,2,4,5,12	(Symp.)=5.83+1.04(1)+4.18(2)+1.22(4)−3.09(5)+1.21(12)
4	1,2,5,7,8	(Symp.)=21.4+1.01(1)+3.18(2)−5.20(5)+1.07(7)−0.256(8)
5	1,2,5,7,10	(Symp.)=14.5+0.864(1)+3.29(2)−5.00(5)+1.04(7)−0.146(10)
7	1,2,5,7,12	(Symp.)=10.7+0.819(1)+3.54(2)−4.76(5)+1.02(7)+0.896(12)

帰式の回帰係数の組み合わせにより自覚症状訴症率を適確に表示できる場合には被害の面から大気汚染の程度または光化学スモッグの程度を表わすとも言え，前報で述べた複合汚染指標 PI や Pindex と同等の意味をもつ．これを検索するためこれら回帰係数の組み合わせにより，前報同様の相関分析を行ない，その結果を Table 5 に図示した．有意水準では Table 4 の6種類のどの組み合わせも非常に類似しており，前報の PI や Pindex と比較するとこれらよりも有意水準が高い（前報 Table 5 参照）．ただ調査母数が充分でないことや切片が高いことなどで，これらの組み合わせを最終結果とは考えられないが，さらにより適当な複合汚染指標の設定に充分な手がかりを与えると思われる．

（3） 主成分分析

自覚症状や汚染要素には各々の因子間で相関があり（内部相関），また前報相関分析で述べたように自覚症状と汚染要素との間にも相関関係がある．したがってこれらを総合的に判断する場合には各々の特性値（測定値）を用いるよりも2（5）で述べた総合特性値（主成分）を用いた方が単位の混在による不利を防止できる．この特性値から総合特性値への変換をチェックするため，各主成分の固有値と寄与率を求める必要があり，Table 6 にこれを示す．これによると寄与率が60%に達するのは第3主成分まで採り入れたときで，Fig. 1 に第1主成分から第3主成分までの変動を自覚症状，汚染要素両者の高い因子順に示す．第1主成分では光化学スモッグと関係深いと前報で考えられたオゾン，亜硫酸ガスや眼刺激，のど刺激などの因子が高く，第2主成分では窒素酸化物，浮遊微粒子，一酸化炭素が高く，これらはいずれも大気一次汚染物質であること，また紫外線量や可視光線量などの気象要素が非常に低いことから，第2主成分は大気汚染または清空度を表わすと考えられる．第3主成分では症状10（咳），14（腹痛），7（鼻症状）が高いが，この意味については明確でない．第4以下の主成分では固有値が低くこれらは議論より除外する．Fig. 2 に第1主成分と第2主成分との分散図を示す．オゾンや亜硫酸ガスが症状5（眼刺激）や6（のどの刺激）などと一群を形成することがわかる．

Table 5. Correlation between subjective symptoms and the regression value by multiple regression analysis (cf. Table 2.)

s.	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16
No. 1			B	C	A	A	B	C	A	B	A				
2			B	C	A	A	B	C	A	B	A				
3			B	C	A	A	B	B	B	B	A				
4			B	C	A	A	B	C	A	B	A				
5			B	C	A	A	B	C	A	B	A	C			
6			B	C	A	A	B	C	A	B	A	C			

(A ; 0.1%, B ; 1%, C ; 5%, each shows more than significance level)

Table 6. Proportion of eigen value

Principal component	1	2	3	4	5
Eigen value	9.915	5.746	4.228	2.008	1.921
Proportion	29.683	46.885	59.543	65.795	71.546

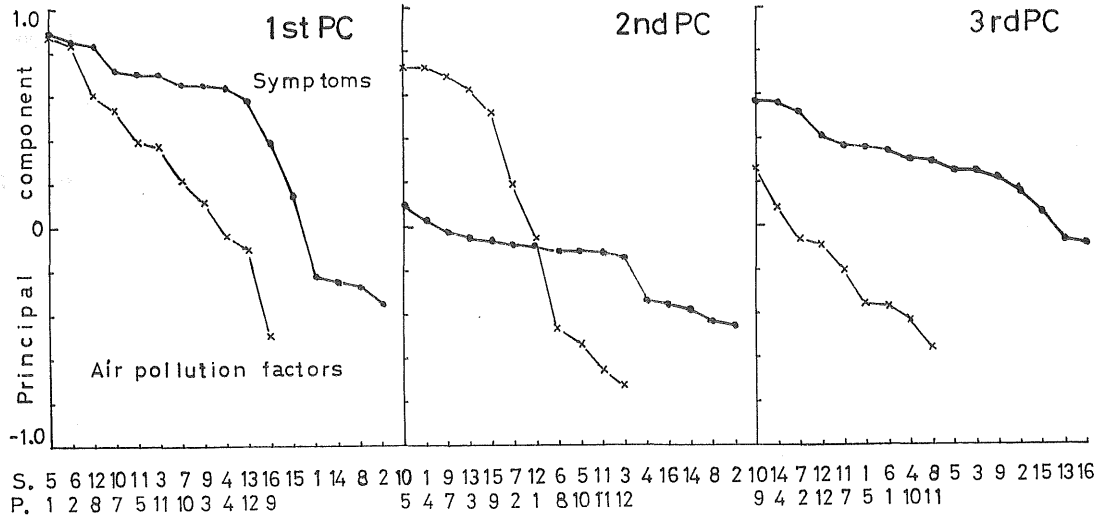


Fig. 1. Principal components from the 1st to the 3rd

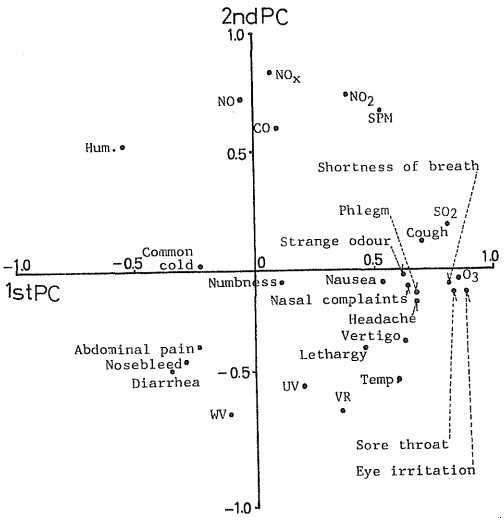


Fig. 2. Distribution of the 1st PC vs the 2nd PC

4. 結　論

日体荏原高校の自覚症調査データにより前報にひき続き，重相関分析，重回帰分析および主成分分析を行ない次のような知見を得た．

(1)　重相関分析

重相関の説明変数として便宜的に2因子および5因子について検討した．前者では相関分析（前報）で有意水準の高い因子を含む因子の重相関がやはり高い有意水準を示した．また浮遊微粒子または湿度を含む因子と自覚症状との重相関で，例えば眼刺激と浮遊微粒子—湿度は各々の相関（眼刺激と浮遊微粒子，眼刺激と湿度）の有意水準が低かったのにかかわらず，重相関では高い有意水準を示した．そして後者の重相関では全体的に有意水準が低い．因子の採択が便宜的であることによると思われる．

(2)　重回帰分析

光化学スモッグの特徴的症状である眼刺激と高い有意水準を示した重相関（自覚症状1因子，汚染要素5因子）の重回帰分析を行なった．この重回帰分析による回帰式の値を指標（1因子）として各自覚症状との相関分析を行なうと，複合汚染指標の PI や Pindex よりも高有意な相関が得られた．

(3)　主成分分析

第1主成分は光化学スモッグに関係深い因子が高く，第2主成分は1次的大気汚染の程度を表わす因子（1次汚染物質）が高い．第3主成分以下については明らかでない．

以上日体荏原高校における自覚症調査について，前報にひき続き本報では多変量解析により検討した．重相関分析では3因子，6因子についてのみ行なったがこれら以外の因子数での分析も必要である．また重回帰分析では6因子で，うち1因子をオゾンとする場合について検討したが，他の場合についても検討する必要がある．ただし膨大な量となり，コンピュータにより処理は可能であっても解析には充分の注意が必要で，的を絞って検討しなければならない．主成分分析では採択因子に一考の余地があり，採択の可否による影響を把握する必要がある．

謝辞　コンピュータ処理および分析で帝京大学医学部公衆衛生学教室の山田和枝氏，寺尾浩明講師に多大な御協力をいただきました．ここに深謝致します．

（本研究は昭和50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) 牧野国義，溝口　勲：日本公衛誌，22(8)，421，1975
2) 関沢理子，遠藤立一ら：東京公害研年報，5，206，1974
3) 奥野忠一，久米　均ら：多変量解析法，30，1975，日科技連出版
4) Horie, Y.: *J. Air Pollution Control Assoc.*, 25 (11), 1148, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 287—292, 1976

東京都区内の大気汚染物質分布のコンピュータ解析

牧 野 国 義*

Computer Analysis of Air Pollutants Distribution in Tokyo Metropolis

KUNIYOSHI MAKINO*

The distributions of air pollutants in Tokyo metropolitan area are drawn with electric computer. The area is devided by 0.3 (East-West) ×0.6 (North-South) km-mesh and the degree of air pollution in each mesh is calculated approximately with plate equation method. Air pollutants are oxidant, Pindex, which is a combined air pollution index, and the regression value by multiple regression analysis in a study of symptoms.

Usually the distribution of air pollution is drawn roughly. In this method the distributions of combined indices such as Pindex and the regression values which are not drawn usually are able to be estimated as well as local air pollution. This distributions are drawn more precisely than others.

1. 緒 言

現在大気汚染物質（SO_2, Dust など限られたものについて）の分布状態は公害局の頒布雑誌などの粗近似作成された図により知ることができる．大気汚染分布図は一般にいくつかの測定点で求められた値により定められるが，一測定点により代表され得る地域はその分布する物質が広域的に均一であるか局所性が強いかにより異なる．気象要素である温度，湿度などは比較的広域を代表し得るものと考えられ，また風速も建築物などの障害物を別にすれば比較的広域を代表し得ると考えられる．しかしながら大気汚染物質は人工発生源より排出され，あるいは排出ガスをもとに大気中で生成（光化学反応）したものが拡散するのであるから，当然局地的濃度差が生じると考えられ，温度や湿度と比較すると局所性が強い．したがって大気汚染物質の分布図を作成する場合には要求される精度に応じてその地域を代表し得るだけの数の測定点が必要で，しかもその地域内で万遍なく分布していなければならない．東京のような広い地域で精度よく汚染分布図を描くには相当数の測定点を必要とするがこれを満たすことは実質的に困難である．したがって大きなブロック（例えば区）に分ける方法や測定点以外の点の値を推定する方法が考えられる．現在描かれている大気汚染物質分布図は前者によるものが多く，後者によるものは少ない．または粗に描かれている．これは手間がかかること，一応測定点のみの値の近似で間に合わせられること，推定方法として適当な方法が知られていないことなどと思われる．しかし，分布図が不正確で現実には高濃度を示す地域が低い値を示したり，またその逆もあり得るので，しかるべき方法の検索により，より正確な分布図の作成が必要であると思われる．

昨今，コンピュータ使用の需要は増大の一途を辿り，あらゆる分野でコンピュータが使用されていると言っても過言ではない．コンピュータの省力化への貢献は周知であり，新分野の開拓にも大いに寄与している．大気汚染研究においてもシミュレーションをはじめ多く使用されているが，大気汚染分布図の作成に使用された例は少ない[1]．コンピュータの活用により，より正確に汚染分布の状態が把握できるとともに，膨大なまたは複雑な計算を要する指標などの分布の状態をも把握できるので，東京都区内の大気汚染分布図の作成を目的とした本研究を行なった．

2. 方 法

（1） 使用資料およびコンピュータ

使用した資料は大気汚染常時測定室測定結果報告（昭和50年6月～8月）より，Table 1 に示した18カ所を測定点として Table 2 の項目について行なった．使用

* 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. Address of located monitoring sites

No.	Address
1	8-1, Marunouchi 3 chome, Chiyoda-ku
2	24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku
3	1-3, Ohshima 3 chome, Koto-ku
4	26-11, Ohmori minami 1 chome, Ohta-ku
5	21-27, Wakabayashi 4 chome, Setagaya-ku
6	1, Udagawa 1 chome, Shibuya-ku
7	66-7, Itabashi 2 chome, Itabashi-ku
8	2-3, Arakawa 2 chome, Arakawa-ku
9	181, Shikahone, Edogawa-ku
10	16-31, Shakujiidai 1 chome, Nerima-ku
11	46-8, Saginomiya 3 chome, Nakano-ku
12	10, Harumi 1 chome, Chuo-ku
13	4, Shirogane 2 chome, Minato-ku
14	18, Himonya 4 chome, Meguro-ku
15	13-1, Tateishi 5 chome, Katsushika-ku
16	2401, Shimane 2 chome, Adachi-ku
17	14-11, Kitamachi 1 chome, Nerima-ku
18	36, Kugayama 5 chome, Suginami-ku

したコンピュータは FACOM 230-50 である．

（2） 推定方法

推定方法は次のようである．23区を平面座標に位置づけ，汚染物質濃度を高さとする．座標表示をすれば，各測定点の座標を，(x_i, y_i, z_i) $(i=1, 18)$ と表わすことができる．任意な点 P(x, y) の高さ z を推定するために，P に近い3測定点 A (x_1, y_1, z_1)，B(x_2, y_2, z_2)，C (x_3, y_3, z_3) よりなる三角形 ABC の平面方程式を求め，P は三角形 ABC と同一平面上にあると考える．このようにして全地域について各々求めた平面方程式より濃度を推定する．推定精度は東西に 0.3km，南北に 0.6km のメッシュである．ただし，23区全域を18測定点のみで推定した場合，とくに近接測定点間に濃度差が大きい場合に三角形外の点での推定値に大きな誤差を生じる可能性がある．よって近接した測定点を結ぶ直線上に定点を設け，これを補助測定点として測定点の数を増して誤差の増大を防止した．

なお，アウトプット形態として今回は5段階のランクづけをした明暗による分布図を作成した．

（3） 大気汚染物質

今回以下の大気汚染物質（または要素，以下略す）について分布図を描いた．

（i） オキシダント濃度（1時間値）

（ii） 月平均値による複合汚染指標－Pindex

(iii) 重回帰分析の回帰式による値 (RE)

$$(RE)=15.2+0.9(O_3)+3.3(SO_2)+0.3(CO)-5.0(SO_2)+1.0(SPM)$$

ここで各々の単位は O_3(pphm)，SO_2(pphm)，CO(ppm)，SPM (mg/100 m³) である．

(ii) の Pindex は L.R. Babcock の提唱した複合汚

Table 2. Summary of air pollution values at 18 monitoring sites

			Monitoring sites																	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
(1)	Ox 6.6	13H	14	17	11	15	16	16	17	23	13	9	17	13	15	18	13	13	17	12
(2)	(PPHM)	14H	16	19	9	19	19	18	15	21	10	7	20	12	16	21	12	10	14	12
(3)		17H	19	16	21	21	20	20	10	17	19	6	14	21	23	19	18	11	8	15
(4)	7.15	11H	18	16	23	18	24	16	14	15	17	17	16	18	14	25	21	19	15	21
(5)		12H	16	19	21	20	24	17	19	20	17	31	28	18	16	21	21	24	26	26
(6)		13H	12	16	18	13	19	18	17	13	16	29	26	15	19	16	19	16	25	25
(7)	8.13	13H	6	14	5	11	23	9	13	8	5	20	21	5	13	24	7	7	18	24
(8)		14H	7	14	9	16	17	8	13	8	10	26	21	8	8	19	10	6	17	25
(9)		15H	8	12	12	13	20	10	17	11	13	24	21	10	10	22	12	9	19	12
(10)	8.28	13H	11	17	13	11	15	12	20	16	9	20	17	13	10	17	12	12	19	19
(11)		14H	9	14	12	6	14	10	15	17	11	17	15	11	11	14	13	14	17	15
(12)		15H	9	16	11	12	14	11	19	14	10	21	18	13	11	15	10	13	18	19
(13)	Pindex	6M	1.6	1.2	0.9	1.1	1.3	1.4	1.9	0.9	1.0	1.0	1.1	1.0	1.2	1.2	0.9	1.1	1.1	1.1
(14)		7M	2.1	1.0	1.0	3.7	1.3	1.4	1.9	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	0.9	1.1	1.1	1.0
(15)		8M	1.7	0.9	0.8	1.0	1.0	1.1	1.5	1.0	0.7	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9
(16)	Regression	6M	14.2	18.5	11.0	21.1	17.4	16.5	9.5	21.5	20.7	18.5	12.9	7.0	10.4	7.9	20.5	13.1	15.0	16.6
(17)		7M	13.3	20.8	20.3	47.5	14.8	16.4	13.4	21.2	20.6	22.9	18.7	7.3	12.8	6.2	20.3	14.7	16.4	19.2
(18)		8M	7.5	19.5	8.3	21.1	11.4	12.0	14.8	20.5	19.8	14.6	15.2	8.3	10.1	8.2	18.0	13.7	12.0	15.2

染指標であり[2]，(iii) の重回帰分析は大田区日体荏原高校で行なった自覚症調査によるもので[3]，眼刺激に対する汚染要素の重相関（6変数）で最も有意な場合の回帰係数である（Pindex の構成要素のうち炭化水素の資料を得ていないので計算されていない．実際の Pindex は約1割増となる）．

3. 結果および考察

18測定点の各汚染物質濃度を Table 2 に示す．この中で（1）から（12）まではオキシダント高濃度日のうちの1時間値4日分で（高濃度時抽出），(13) から(15) までは Pindex，(16) から (18) までは回帰式による値である．

以上から Fig. 1 説明のように（1）から（12）までオキシダント濃度分布を示した．分布の5段階の内訳は 20 pphm 以上，16 pphm 以上，12 pphm 以上，8 pphm 以上，8 pphm 未満である．（1）から(3）の6月6日の分布では，13時の高濃度地域が14時には若干の拡がりを示し，15，16時には気候の影響で減少したので略したが，17時に都内南部一帯に高濃度を示した．（4）から（6）の7月15日の分布では，12時にかなりの地域で高濃度を示したが，この日には東京，埼玉を中心に大量の光化学スモッグ被害がでている．また（7）から（9）の8月13日の分布では，西部地域の濃度が高く，前の2日とはかなり様相が異なる．(10) から (12) まではやはり被害の多かった8月28日の分布である．このように時間変化を追うことにより発生，移動，消滅のサイクルをみることもできる．

今迄大気汚染分布図は単一汚染物質に限られていたがコンピュータは複合汚染指標の分布図の作成を可能にした．(13) から (15) は Pindex を計算した分布図で（前述のように実際よりやや低い），2.0以上，1.6以上，1.2以上，0.8以上，0.8未満のようにランクづけしている．7月がこの中で高い値を示す地域が広い．オキシダント濃度の分布と比較すると，各ランクのとり方にもよるが複雑で，近距離でも Pindex がかなり異なることがあると思われる．

(16) から (18) は上記 (iii) により，眼刺激訴症率でランクづけしている．その各々は1.6%以上，1.2%以上，0.8%以上，0.4%以上，0.4% 未満に分けられる．ただし，0.4%未満はほとんど見られない．Pindex が都心部に比較的高い値を示したのに対し，この回帰値は周辺部に高い値の地域が多く好対照を示している．

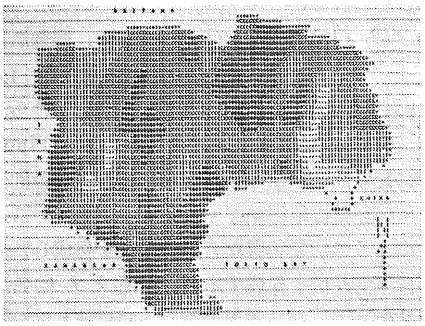
以上のように汚染物質などの分布図を作成したが，このほかにも分布図を作成する用途が考えられる．例えば，光化学スモッグ被害量分布や風向風速頻度分布などである．ただし，本報の分布図作成法に問題点がいくつか考えられる．第1に平面方程式による近似では平面を構成する三角形外の点での推定に誤差を生じ易いこと，第2に文字により明暗を出しているが，各ランクの明度差が一定といえるかどうか，また本報では5段階に分けているが適当かどうかそしてダブルパンチの必要はないかなどさらに検討しなければならない．

4. 結　語

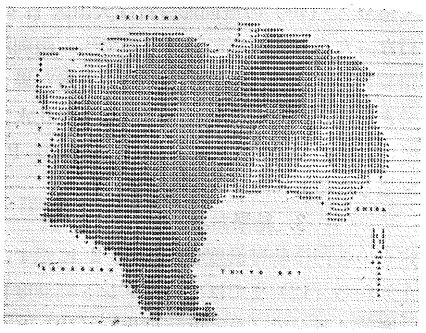
大気汚染物質（オキシダント）や複合大気汚染指標（Pindex）および眼刺激訴症率と大気汚染物質との重回帰分析による回帰式の値の都内汚染分布図を作成した．大気汚染状況が必ずしも減少傾向にあるとは言えない現在，大気汚染の実態把握やその対策は早急になされねばならない．本報の大気汚染分布図の作成により複雑化した大気汚染の実態把握をより容易にできると考えられる．また分布図の作成には大気汚染分布のみでなく，被害量分布などを描く場合にも本報を利用することができる．しかし，近似方法や表示方法にさらに検討すべき点があり，今後これらの点を改良したいと考えている．

文　献

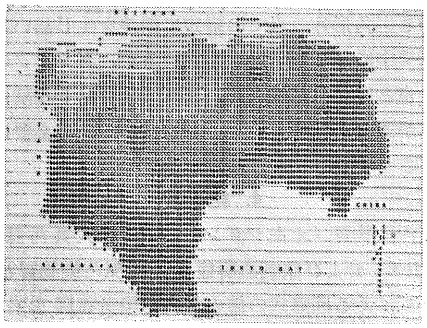
1) 佐野平治，若狭喜作ら：大気汚染研究，10(4)，435，1975
2) Babcock, L.R.: *J. Air Pollution Control Assoc.* 20(10), 653, 1970
3) 牧野国義，溝口　勲：東京衛研年報 27-1, 274, 1976



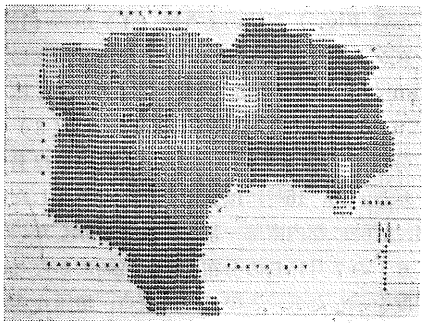
(1)



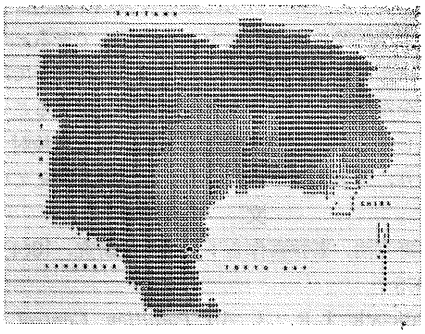
(2)



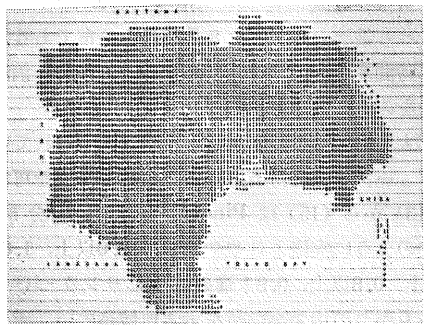
(3)



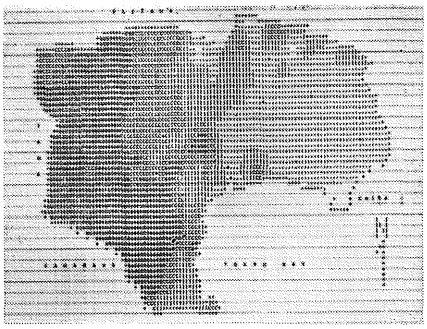
(4)



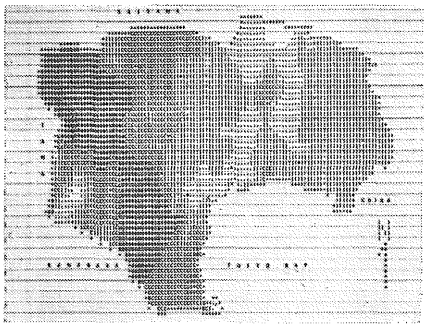
(5)



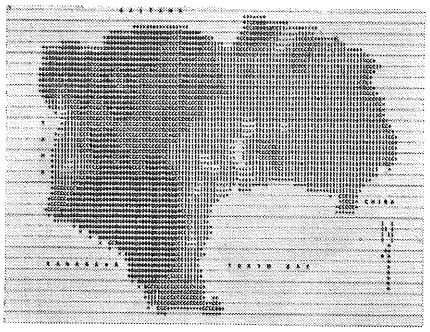
(6)



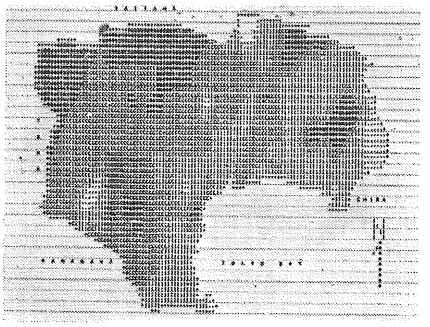
(7)



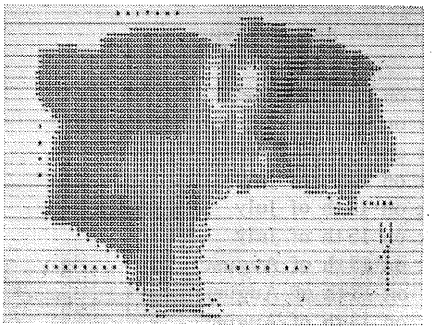
(8)



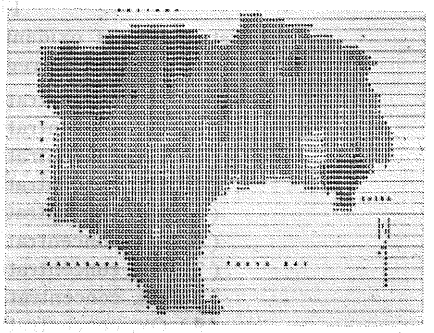
(9)



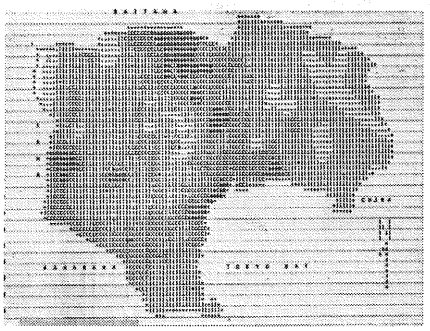
(10)



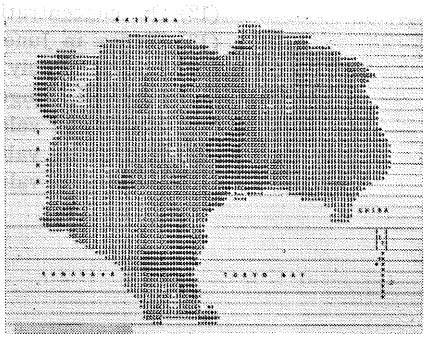
(11)



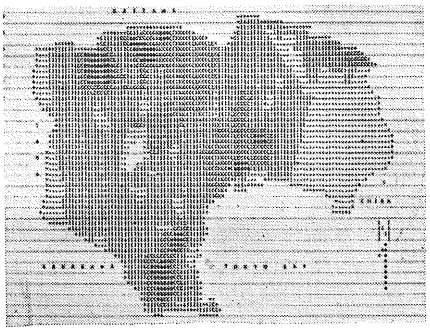
(12)



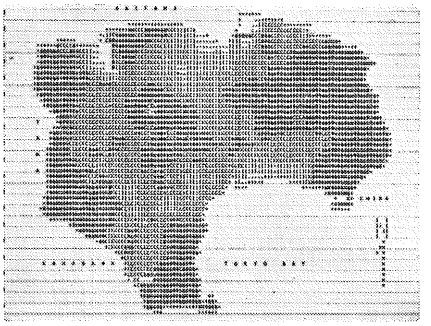
(13)



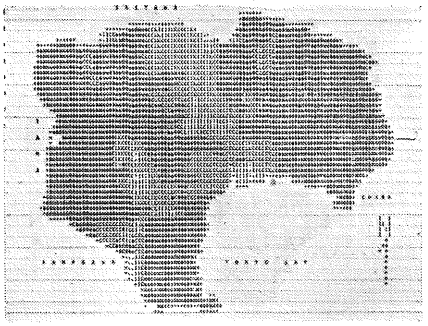
(14)



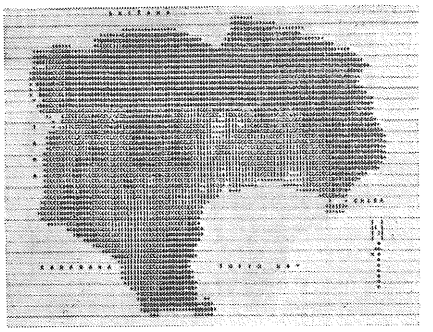
(15)



(16)



(17)



(18)

Fig. 1. Explanation
Distribution of oxidant concentration, Pindex and the regression values by multiple regression analysis

(1) Ox. concentration at 13 o'clock on 6 th of June
(2) Ox. concentration at 14 o'clock on 6 th of June
(3) Ox. concentration at 17 o'clock on 6 th of June
(4) Ox. concentration at 11 o'clock on 15 th of July
(5) Ox. concentration at 12 o'clock on 15 th of July
(6) Ox. concentration at 13 o'clock on 15 th of July
(7) Ox. concentration at 13 o'clock on 13 th of August
(8) Ox. concentration at 14 o'clock on 13 th of August
(9) Ox. concentration at 15 o'clock on 13 th of August
(10) Ox. concentration at 13 o'clock on 28 th of August
(11) Ox. concentration at 14 o'clock on 28 th of August
(12) Ox. concentration at 15 o'clock on 28 th of August
(13) Pindex in June
(14) Pindex in July
(15) Pindex in August
(16) Regression value in June
(17) Regression value in July
(18) Regression value in August

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 293—294, 1976

サーモフォーム加温時に発生する気体の分析

太田与洋*, 溝口 勲*

Analysis of Gases Emanated from Warmed Thermoform

TOMOHIRO OHTA* and ISAO MIZOGUCHI*

Thermoform is used for the duplication of the brailled matters in the facilities for the blind people. The gases, which are always emanated from the warmed thermoform on vacuum forming processes, were analyzed. The major chemical was identified by means of mass-spectrometer and infrared spectrometry to be trichloroethylene. Quantitative analysis was made with gaschromatography equipped witn electron capture detector. About 0.7mg of trichloroethylene was emanated from one thermoform sheet when it was warmed at 120-130°C for 50 minutes. This value is high enough to require local ventilation system.

I. はじめに

サーモフォームは盲人用点字の複製のために使用される合成シートで，米国カリフォルニア州のある企業により製造販売され，世界的に使用されている．日本国内でも福祉施設など数カ所で使用されている．あらかじめ点字が打たれた台紙に，この合成シートをのせ，それに電熱ヒータを上部に持つ上ブタをかぶせ，シートをポンプで台紙に吸い付けている間にシートを加熱して成型するものである．この連続操作の過程で生ずる気体が，操作する者に不快を与える程の異臭を持っている．今回はこの気体の分析を行なった．

II. 実　　験

(1) シートの分析

テトラヒドロフランでこのシートを溶かし薄く引き延ばし，日本分光製赤外線分光器で透過赤外吸収スペクトルを得た (Fig. 1).

(2) 発生気体の捕集

内径 3cm，長さ 30cm のパイレックス管の中にサーモフォームを3枚入れ，その外壁に電気抵抗線を巻き，一端はシリコンゴムで栓をし，他端を真空ラインに接続できる様にジョイントを溶接した．温度を測定するために熱電対をパイレックス管外壁とニクロム線の間に入れておいた．真空ラインの他のひとつのジョイントにトラップ管を付けた．加温する前にパイレックス管とトラップ管とライン全体を 10^{-2} torr 以下に排気しておいた．次に液体窒素でトラップ管を冷却し，トラップに接続されている状態で 120°C～130°C に加温した(サーモフォームは使用時には約 140°C の空気にさらされることになる)．この状態を50分間続けて，発生する気体を凍結させて捕集する．サンプル捕集の前後にブランクの捕集をした．

(3) 定性分析

捕集したサンプルは，最初，光路長 10cm の赤外用ガスセルに移し，ガスの凝縮を防ぐために加温して，赤外線吸収スペクトルを得た (Fig. 2)．次にこのサンプルを質量分析計に導入して，マス・スペクトルを得た (Fig. 3).

(4) 定量分析

あらかじめ特級 n-Hexane 3m*l* をトラップ管の中に入れておき，発生する気体を，液体窒素温度で固着させた後に，n-Hexane に溶解した．この溶液を ECD 付きガス・クロマトグラフで定量を行なった．カラムは Silicone DC 200, 20%, 2.1m のガラスカラムを用いた．カラム温度は 60°C であった．

(5) 労働環境濃度測定

検知管を用いて，東京都障害者福祉会館の作業室で測定を行なった．サーモフォームを25枚連続使用したときにトリクロルエチレンは 1ppm 以下であった．トリクロルエチレンのヒータ面での熱酸化により生成すると考えられるホスゲンは 0.025ppm の検出限界以下であっ

* 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

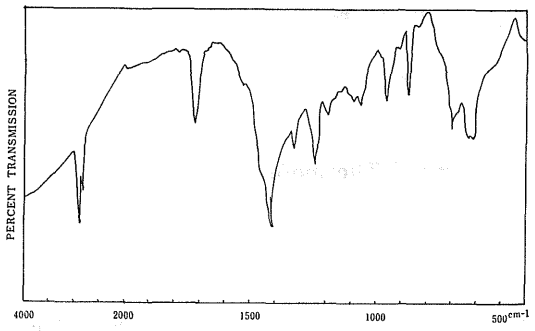


Fig. 1. IR spectrum for enveloped thermoform sheet

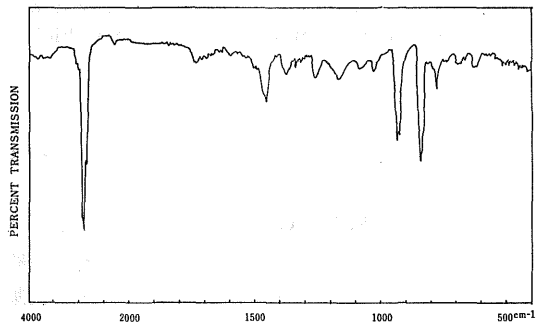


Fig. 2. IR spectrum for trapped gases emanated from warmed thermoform sheet

た.

III. 結果と考察

Fig. 1 と標準スペクトル[1]を比較することにより，このシートは塩化ビニールと酢酸ビニールの共重合樹脂であることが明らかとなった．Fig. 2 と標準スペクトル[2]との比較により発生する気体の主成分はトリクロルエチレンであること が推定され，Fig. 3 のマス・スペクトルによりこのことが確定された．

トリクロルエチレンがこの種のシートに多量に含まれていることは意外であるが，重合過程で，チャージ・トランスファー剤として混入され．重合完了後塩ビモノマーは洗浄するがその際，この条件では残留してしまうと

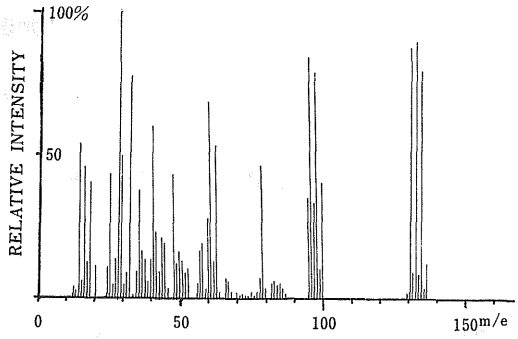


Fig. 3 Mass spectrum for trapped gases emanated from warmed thermoform sheet

のことである[3]．

トリクロルエチレンの発生量が，加温時間にそのまま比例すると考えるなら，間口 4m，奥行き 6m，高さ 3m の作業室内で50分間連続操作すると平均として 2ppb 程度に達すると考えられるが，特に狭くて換気の悪い室内では局所的に高濃度に達するおそれがある．しかし労働環境基準 75ppm までは容易に達しないと考えられる．

米国立ガン研究所の報告によればトリクロルエチレンに発ガン性があるとされているが，新たな基準で考察を加えなければならなくなる可能性も出てくるかも知れない．

謝辞 今回の分析調査を行なうにあたり，試料を提供された，東京都障害者福祉会館の各位に感謝の意を表するとともに建設的なご意見をいただいた当所秋山和幸主任研究員に，また技術的な協力をいただいた食品添加物研究科容器包装担当の各位に深謝します．

文　献

1) *Infrared Spectroscopy, Its Use in the Coating Industry*, 1969, Federation of Societies for Paint Technology U.S.A.

2) *The Aldrich Library of Infrared Spectra*, 1975, Aldrich Chemical Company, U.S.A.

3) Personal communication: R.H. Dasteel

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 295—296, 1976

尾の旋回と軀幹のスリヨセ現象—ラットのメチル水銀中毒における早期神経症状

関　比呂伸*, 湯目邦雄*, 大沢誠喜*, 今野ヒロ子*
糞輪佳子*, 野牛　弘*, 大井　玄*

Tail Rotation and Leaning against Contact Object—Early Neurological Signs in Rats with Methylmercury Poisoning

HIRONOBU SEKI*, KUNIO YUNOME*, MASANOBU OHSAWA*, HIROKO KONNO*, KEIKO MINOWA*, HIROSHI YAGYU* and GEN OHI*

Though the crossing and/or paralysis of the hind legs have been held as the characteristic neurological signs of methylmercury poisoning in rats, we have found that they manifest unrecognized neurological signs—tail rotation and leaning toward contact object—under optimal conditions by several weeks earlier than those hind leg signs.

緒　言

ラットの有機水銀中毒にともなう神経症状としては，従来後肢の交差ないしはマヒが確実な徴候とされてきた．しかし，これらは全身状態の劣悪化，体重減少がすでに始まりつつある時点で初めて出現するものであり[1]，治療効果の判定ないしは初期症状の指標としては満足すべきものでなかった．今回我々はラットのメチル水銀投与実験において上記症状よりもはるか早期に現われ，かつ極めて顕著な神経症状を見出したので報告する．

方法・材料

離乳直後の雄性ウィスター系ラットに，20ppmHg の塩化メチル水銀を含む低セレン飼料 (Se, 0.1ppm) を投与し，立直り反射，姿勢，歩行，棒上の位置保持，尾の運動，からだのスリヨセなどの観察を週3回，体重測定を週2回行った．

結　果

体重の増加は，メチル水銀投与群において8週目にプラトーに達し，それ以後減少していった (図)．

種々の行動の変化を観察したなかで最も初期に認められたのは尾の持続的旋回現象であり，実験開始後35日目に現われ始め，46日目には全匹陽性となった．これはラットの尾を前方にして腹部をつかみ，持ち上げた際，尾の旋回がおこるもので，その際動物の軀幹の長軸を水平に保ったままにする．旋回速度は毎秒1～3回であり，旋回方向は軀幹の長軸に関して時計方向 (clockwise) に身体を傾ける際には，時計の針の進む方向となり，逆にすると旋回方向も逆になる．これに対して，コントロールのラットは全く尾を旋回させないか，させても一，二度で止まる．次に現われた症状は，からだのスリヨセ現象で実験開始後46日目から58日目の期間において発現した．この症状は，観察者の指をラットの体側部に触れるとラットはその指に身体を寄せてくる．そして，症状が進行するとラット同士は互いに身体を寄せあうようになった．その次に現われたのは後肢の交差・マヒで，これらの症状は投与後58日目から67日目までの間で発現した．その他の神経症状のパラメーターにおいて変化は観察されなかった．

Table

Neurological Sign	Days*
Tail Rotation	38.9±4.1**
Leaning against Contact Object	51.3±3.8
Crossing and/or Paralysis	59.6±2.6
Weight Loss	57.3±4.3

* Days from the start of methylmercury
** Mean±S.D.

* 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

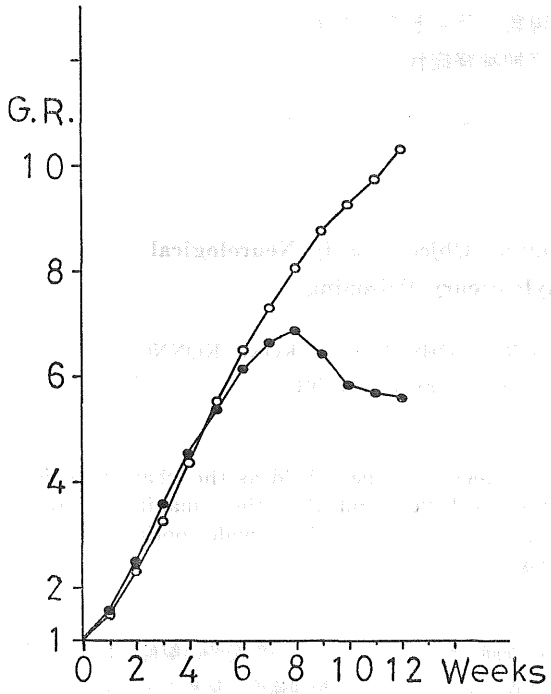


Figure: Growth Rate (G.R.)
The growth rate is expressed as weight/weight at start.
——○——: Control Group
——●——: 20 ppmHg Group

考　察

ラットのメチル水銀中毒における早期神経症状を調べるための観察において尾の旋回，軀幹のスリヨセ現象が従来の神経症状よりも早期に現われることを見出した．

旋回現象が発現してから後肢の交差・マヒが現われるまでの所要日数は平均20.7日であり，身体のスリヨセ現象から後肢の交差・マヒの発症までの日数は平均8.3日であった．しかも，尾の旋回および身体のスリヨセ現象の発症時において体重は増加しつづけていた．

尾の旋回の神経学的意義は未だ不明であるが，内耳を片側ないしは両側破壊しても，目を閉じさせても旋回の方向は変らないことからこれらの反射回路を経ないものと考えられる．一方，軀幹のスリヨセ現象は体重減少や後肢の交差・マヒの直前に現われ，異常歩行の様相を示し，マヒの前駆的な症状と考えられる．

要　約

ラットにおけるメチル水銀中毒の神経症状は，後肢の交差ないしはマヒであるとされてきたが，これらの症状は，体重減少など全身的な衰えが顕著になった段階で初めて発現するものであった．

我々は3週令の雄性ラットに 20ppmHg のメチル水銀を含む飼料を与えた場合，上記症状の発現よりも2～3週間早く尾の旋回現象が現われ，1週間早く軀幹のスリヨセ現象が認められるのを見出した．これらをメチル水銀中毒の治療効果を測定する場合に臨床的なパラメーターとして用いられることが期待される．

（本研究は昭和50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たものである．）

文　献

1) Miyakawa, T., M., Deshimaru, S., Sumiyoshi, *et al.*: *Acta Neuropath.*, 15, 45, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 297—299, 1976

ラットのメチル水銀中毒における亜セレン酸ナトリウムとチオラ (2-mercaptopropionyl glycine) の臨床的効果の比較

今野 ヒロ子*, 関 比呂伸*, 蓑輪 佳子*
湯目 邦雄*, 野牛 弘*, 大井 玄*

Evaluation of Selenite as a Therapeutic Agent for Methylmercury Poisoning in Rats

HIROKO KONNO*, HIRONOBU SEKI*, KEIKO MINOWA*,
KUNIO YUNOME*, HIROSHI YAGYU* and GEN OHI*

In an attempt to investigate if selenium can be usable as a therapeutic agent, clinical potency between selenite and Thiola (2-mercaptopropionyl glycine) was compared. Irrespective of their administration route, both selenite and Thiola had definitely favorable effect in terms of weight gain and improvement of neurological signs. It appeared that subcutaneous administration of selenite showed most remarkable efficacy.

緒　言

メチル水銀中毒症においては特異的な神経障害を呈し，かつ，これには効果的な治療方法はいまだ見出されていない．現在に至るまでその治療法の原理は水銀と結合して体外排泄を促進するキレート剤の投与を行うものであった．しかし，一旦障害を受けた神経組織は通常その回復はきわめて緩徐である．近年セレンが有機，無機水銀の毒性を緩和することが見出されたが[1-3]，その保護的作用はキレート剤とは異なる原理に基づくもののようである[4-7]．我々はセレンがメチル水銀中毒発現の予防のみならず治療に用いられる可能性があるか否かをみるために，メチル水銀による神経症状発現直後のラットを用い，キレート剤としてわが国で開発された 2-mercaptopropionyl glycine（商品名，チオラ）とその効力を比較した．

実験方法

Wistar 系雄ラット5週令を5群に分け，20ppm メチル水銀（以下 MMC と略す）含有飼料を与えた．各群30匹（コントロールは35匹）で1ケージ5匹ずつに分け，週2回体重測定し，毎日神経症状の発現と死亡数を観察した．そして，神経症状が発現した時点に basal diet に切換え，下記に示すような処置を30日間続けた．

最近の我々のラットの MMC 中毒実験において，20ppmHg 飼料を与えているラットで1ケージ5匹中1匹が神経症状の発現（後肢の交差あるいはマヒの出現）を示すと MMC 飼料の投与を中止しても最終的には残りのラット全部あるいはほとんどが神経症状の発現を示すことを観察した．つまり，その時点において，1ケージ中の全てのラットが神経症状を示す量の MMC を食べていたとみなしてよいと思われる．従って今回はこの現象を利用して，1ケージ5匹中1匹でもラットが神経症状を3日間連続示した時点を神経症状の発現とした．

A group	basal diet	control
B	〃	Se 0.25mg/kg/day (SC)
C	〃	Se 20ppm (Tap Water)
D	〃	Thiora 25mg/kg/day(SC)
E	〃	Se 0.25mg/kg/day(SC)+ Thiola 25mg/kg/day(SC)

セレンは亜セレン酸ナトリウムを用い，皮下投与の場合は等張化したものを，経口投与の場合は水道水に溶か

* 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

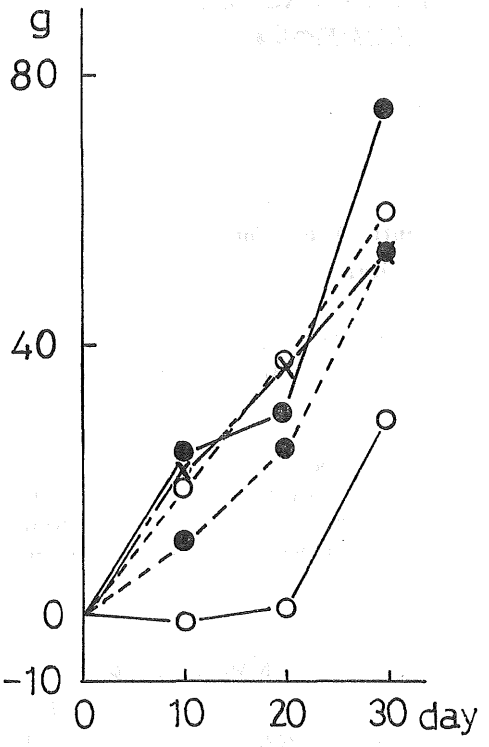


Fig. 1. Weight Gain of Neurological Sign after ceasing MMC treatment
A ; ○— B ; ●— C ; ●---
D ; ○--- E ; ×-—

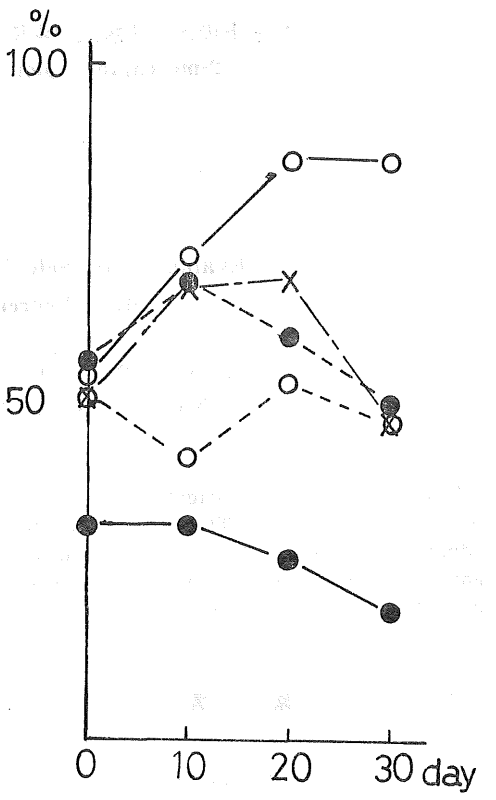


Fig. 2 Manifestation Rate of Neurological Sign after ceasing MMC treatment
A ; ○— B ; ●— C ; ●---
D ; ○--- E ; ×-—

したものを自由に飲水させた．また，チオラは緩衝液にして皮下投与した．コントロール群については，生理的食塩水を皮下投与した．Basal Diet については低セレン，20%蛋白質含有飼料を用いた．

結　果

ラットに MMC を投与開始して4週目ぐらいまでは，体重の増加がみられ，5週目あたりで体重の増加が止まり，それからしだいに体重の減少がみられた．神経症状の発現は体重の減少と同時に出現し始めた．最初の神経症状の発現は38日目に3ケージにみられ，その後1週間の間に全ケージに出現した．この時点からのセレン，チオラ単独投与群，セレン＋チオラ投与群，コントロール群の体重変化は Fig. 1 の如くである．すなわち，セレン，チオラを投与しなかったA群は，Basal Diet に切換えて20日目頃までは体重の増加がほとんどみられないが，30日目においては 28g 増加していた．一方治療を開始したB，C，D，E群については，10，20日と日が経つにつれて体重の増加がみられ，30日目においてはB群 75g，C群 54g，D群 60g，E群 53g とA群に比べて約2倍以上の増加がみられた．特にセレンを皮下投与したB群については，A群の約3倍の体重増加がみられた．次に神経症状の変化については，Fig. 2 に示す如くであるが，A群については10，20，30日と日が経つにつれ神経症状の発現が増加し，0日では54%であったのが30日目の時点においては86%になっていた．またC，E群についても同じような傾向がみられ，10，20日目においては0日の時より神経症状の発現が増加しているが，30日目においては，0日の神経症状の発現状態よりやや減少している傾向がみられた．D群については，10，20日目はC，E群と少し違ったパターンを示すが30日目の時点におけるそれはC，E群と同様，ほとんど最初の神経症状の発現状態になっていた．またB群については，セレンを皮下投与開始してから10，20，30日と日が経つにつれ神経症状の発現が抑制あるいは予防され，最初32

%の発現がみられたのに対し30日目においては約1/2の19%になっていた．また死亡数は1匹もいなかった．Fig. 1, 2 の結果から治療をしなかったラットについては，神経症状の発現が日を経つにつれ増加し体重の増加もあまり良くなかった．また，治療を与えたラットについては，最終的には神経症状の発現を抑制あるいは予防させることができ，体重の増加もコントロールと比べ非常に良いということがわかった．

考　察

1ケージ5匹中1匹のラットにMMC中毒による神経症状の発現がみられた時，そのケージの MMC 投与を中止しても最終的にはほとんどのラットが神経症状を呈することが，我々の今までの実験と同様に今回の実験においても実証された．しかし，神経症状が発現した時点において，ラットにセレン，チオラを投与することにより，その発現を予防あるいは抑制させることができることもわかった．また，神経症状の発現時点（0日）における割合は，B群を除いてほとんど50%のラットが発症しているが，B群は32%とその発症の割合が少ない．これは，ラットの個体差によるものと思われる．しかし，その影響があるにしろ，治療効果が一番良かったのは，B群のセレンの皮下投与によるものであると思われる．また，セレンの皮下，経口との投与方法の違いにより治療効果にもかなり差がみられるが，これは，経口投与による腸管吸収から全身循環の移行や標的器管への到達が皮下投与よりも遅くなるためなのかもしれない．さらに，セレンの経口投与とチオラの経皮投与を比べてみると，治療効果はチオラの方がより早く効果を示すかの如くみられるが，最終的にはほぼ同じ効果を示している (Fig. 1)．またセレンとチオラを同時に投与した場合による治療パターンはセレンの経口投与型に近いパターンを示すかの如く見受けられる．全身状態を表わす一指標として体重の増加がある．MMC 投与中止後 basal diet に切替えたのみの群では体重はごくわずか減少を示した後約20日間体重増加はみられないのに対し，キレート剤（チオラ），セレン，あるいはその両者を投与した群では直ちに体重の増加が起る．この増加度はセレン，チオラ皮下投与，セレン（皮下投与）＋チオラ（皮下投与）群においてもっとも著しく，セレン経口投与群では最初緩徐に，10日目頃から著しくなる．この現象はセレン，チオラ投与群では生理的に活性型のメチル（ないしは無機化された）水銀の体液中における濃度が，その体外排泄ないしは不活性化作用により直ちに減少するのに反し，basal diet に切りかえた群では体内に蓄積されたメチル水銀が動員 (mobilize) されてくるためこの活性型水銀濃度が投与中止後，ある期間減少しないからであろうとも解釈されよう．また，今回の結果をさらに詳しく調べるために，MMC 投与中止後0，10，30日目に摘出した臓器を用い各臓器内における総水銀量，メチル水銀量，セレン量がどのような分布状態になっているか観察する必要があると思われる．

要　約

セレンがメチル水銀中毒発現の予防のみならず治療に用いられる可能性があるか否かをみるために，メチル水銀による神経症状発現直後のラットを用い，2-mercaptopropionyl glycine（商品名，チオラ）とその効力を比較した．投与方法の如何を問わず，キレート剤（チオラ），セレンを投与したグループでは，神経症状の発現を抑制する働きが認められ，かつ，体重の増加，神経症状の改善もみられた．また，上記の効果は皮下投与によるセレン投与群において最も著しいと判定された．

（本研究は昭和50年度東京都衛生局「プロジェクト研究課題」として実施したものである．）

文　献

1) Ganther, H.E., C. Gouide, and W.G. Hoekstra: *Science*, 175, 1122, 1927
2) Parizek, J. and I. Ostadalova: *Science*, 15, 142, 1966
3) Ohi, G., S. Nishigaki, and H. Yagyu: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 527, 1975
4) Stillings, B.R., H. Lagally, and J. Soares: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243, 1973
5) Koeman, J.H., W.H.M. Peeters, and J.J.M. Goeij: *Nature*, 245, 385, 1973
6) Chen, R.W., P.O. Whanger, and S.C. Fang: *Pharmacol. Res. Commun.*, 6, 571, 1974
7) Burk, R.F., K.A. Foster, and P.M. Greenfield: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 145, 782, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 300—302, 1976

都市環境中における突然変異誘起物質の検出

蓑輪佳子*, 松下 秀**, 工藤泰雄**, 善養寺 浩**
大沢誠喜*, 野牛 弘*, 大井 玄*

Mutagenic Activities Detected in the Environment of Tokyo Metropolitan Area

KEIKO MINOWA*, SHIGERU MATSUSHITA**, YASUO KUDOH**,
HIROSHI ZEN-YOJI**, MASANOBU OHSAWA*,
HIROSHI YAGYU* and GEN OHI*

In an attempt to detect mutagens in our urban environment, pigeon-blood, river water and air samples were tested in the simple *Salmonella*/microsome test system.

No mutagenic activity was demonstrated in the pigeon-blood or in the water specimens. On the other hand the air samples collected in both downtown Tokyo and residential area showed significant potency to produce revertant colonies in TA100: air volume yielding 500 colonies was about 40 m^3 at the Kojimachi and Kojiya Health Center and 100 m^3 at the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health.

緒　　言

近年，大量の人工的物質の生産により，生活環境はもちろん自然環境が，人体への害，生態系の破壊などの問題を引き起こす場となっている．

これらの中で重要なものの一つは，突然変異誘起物質であり，この検出法として微生物を用い，変異原をスクリーニングする法がこれまで Ames らによって確立され改良されてきた[1-7]．

これは，多くの発ガン物質がもつ突然変異誘起作用を検出するもので，操作技術が簡単かつ経済的で短期間に検索できるという点で，特にその有用性が注目されているものである．ここでは，人為的に環境中に放出されている発ガン物質をとりまく生物群及び無機的環境のうち，いくつかを取り上げ現在見いだされている鋭敏なスクリーニング方法において，検出可能であるかをみたものである．

試料・方法

1. 試料

1) a-Benzpyrene（以下 B(a)P と略す）

2) ハト血液　A多摩動物園　B浅草寺　C渋谷駅D亀戸（日本製粉工場内）1975年11月～1976年1月にかけて以上4地点で捕獲したドバトの成鳥各6羽からヘパリン処理した注射器で心臓採血を行ない，溶血後全血を試料とする．

3) 河川水　A目黒川（大崎橋）B隅田川（小台橋）C隅田川（蔵前橋）D新河岸川（志茂橋）1976年2月各地点で採水後，KD濃縮装置により100倍濃縮，試料とする．

4) 大気　A麹町保健所　B糀谷保健所　C都立衛生研究所　1976年5月 High Volume Air Sampler によって glass fiber filter に吸引捕集し，その試料をソックスレー抽出装置で10時間ベンゼン抽出を行ない，減圧濃縮後ジメチル硫酸に溶解させ用いた．

2. 使用菌株

Salmonella typhimurium TA 100, TA 98[7] B.N. Ames (Calf. Univ., U.S.A.) より入手

3. 方法

Ames の方法[3,4] を用い変異原の検出を行なった．その際，肝ミクロゾーム分画酵素（S－9）として PCB (AC1254) で誘導したラットの肝臓を用いた．

* 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
** 同微生物部細菌第一研究科
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

結　果

1. 既知の発ガン物質 B〔a〕P 5 μg/plate は TA100 の菌株において約500 colonies を生じ，強い突然変異誘起作用がみられた．S－9(－) では陰性となり，ここに S－9 分画の代謝活性を確認した．

2. 都内4地点で捕獲したハト血液における突然変異物質の検出は Fig. 1, 2 のとおりである．自然復帰突然変異の値は TA98 では 36, TA100 では 101 であることと比べると，両方共に全地区の検体が若干の高値を示しているが，この微生物検査ではある程度のバラツキは当然で，この程度でハト血液中に突然変異誘起物質が存在するとはいえない．よって，この実験結果ではハト血液と現実の環境汚染とのはっきりした相関関係は得られなかった．

3. 4地点における河川水についてもハト血液同様，突然変異誘起性はみられなかった．

4. 大気の汚染度のすすんでいる地点として麹町，糀谷保健所の2ケ所，比較的清浄な地点として当衛研屋上を選び，突然変異誘起性をみた．その結果，大気量 100 m^3 当たりの粉塵重量を比べると，12.6mg, 12.4mg さらに 9.0 mg となり，これは Fig. 3 と相関があるように思われる．TA100 において 500 colonies を生じる大気量は麹町・糀谷で約 40 m^3, 当衛研では 100 m^3 で変異原による汚染が明瞭である．又，これは B〔a〕P 約 5 μg におけるコロニー数に相当するものであり，S－9 の添加の有無による差は大気ではなかった．麹町・糀谷でみられるように試料中の変異原濃度が上昇すると，

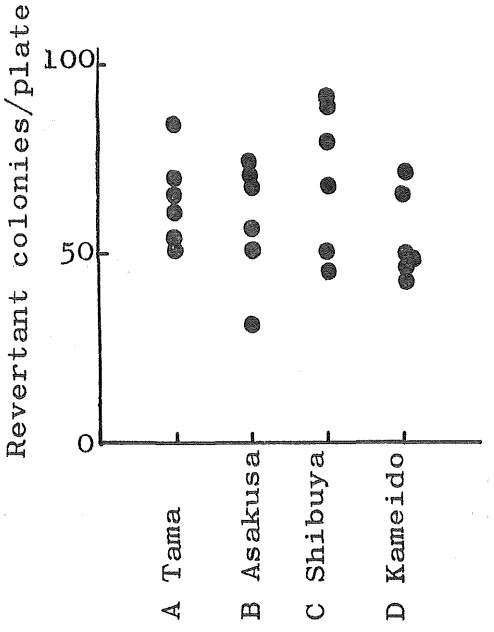


Fig. 1. TA98, S—9(+)

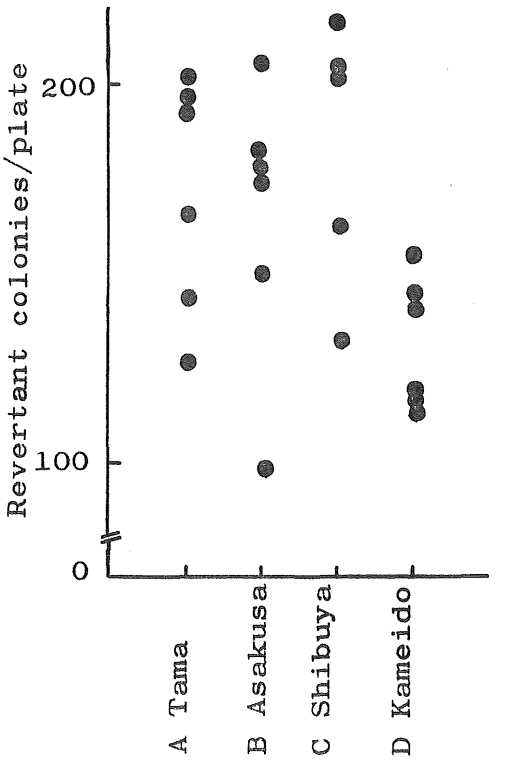


Fig. 2. TA100, S—9(+)

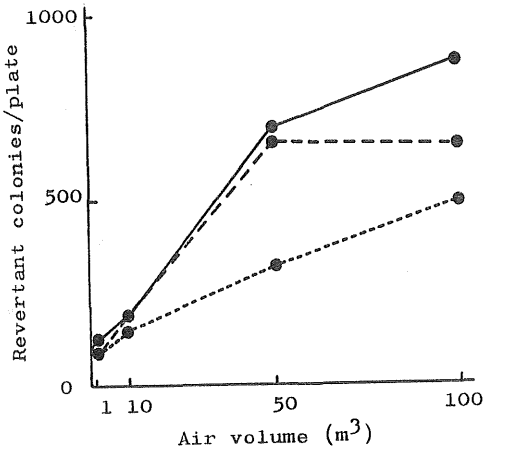


Fig. 3. TA100, S—9(+)
—— Kojimachi H.C.
--- Kojiya H.C.
····· Eiken (Tokyo)

その毒性のために菌が死ぬ事も考えられる．

考　察

年々ガンによる死亡が増加する傾向の中でガンの発生と環境汚染との間に何らかの相関関係があるとされている．例えば，米国における白人男子の胃ガンの発生は食生活などの文化的因子に起因するところが大であり，一方，膀胱ガンは人口の集中した大都市及び工場地帯（特に有機薬品使用地区）において，多く発生していることが報告されている[8]．しかし，どの程度発ガン物質が環境中に放出され，どのような経路を経て，人体に影響を及ぼしているかについては解明されていない．

ハトが鉛，p-ジクロルベンゼンによる環境汚染のきわめて敏感な生物指標[9]であり，比較的限られた地域にのみ生息する特性に着目しハトを突然変異誘起物質による環境汚染の生物指標として選ぶ一方，生物をとりまく環境で，ここ20～30年都市化の弊害を受け哀れな様相と化した都市河川水及び大気を試料とし，環境中にどの程度発ガン物質が存在しているか検索を試みた．

ハトの血液及び河川水では突然変異誘起性，地域差は観察されず，これより環境中に突然変異誘起物質が放出されていないか，もしくは放出されながら，検出されなかったとの2点が考えられる．後者には 1) 検出方法そのものに限界がある．六価クロム汚染地区であるD地点で検出されないのは，発ガン性をもつ重金属類がこの方法で検出不可能という情報[10]と一致しているとも思われる．2) 発ガン物質が，ハトでは速やかに代謝をうけ排泄されるか，河川水では希釈，沈澱，酸化などの変化をうけ検出されないなどの原因が考えられる．

大気においては変異原が3地点で検出され粉塵量との関係がみられたが，この変異原の発生源については不明確な点がある．今回は大気の汚染度として粉塵量を主に考え，3地点を選択したが他の粉塵中の性質を考慮し採取地点を選ぶ必要がある．例えば工場密集地域，住宅地域，交通量の多い地域など地域的特性が明瞭な所を選ぶことにより，発生源及び地域差もおのずから知るところとなろう．さらに気象条件，季節による変化をみることも今後の課題と考えられる．環境空気中には多環芳香族炭化水素の存在が確認されているが，これらには体内で代謝をうけ発ガン性を示すものが多く考えられるが，ここではS－9の添加による差は認められず，代謝による影響をうけないものが多いと考えられ興味ある点と思える．

これまで個々の化合物について突然変異誘起性の有無を試験した研究は数多く，最近ではタバコ[6]や染髪剤[11]などに発ガン成分を示す報告もある．今後，環境中の発ガン物質のスクリーニングにこれらの指標が有効かどうか否定的因子について検討を加えながら，新しい指標も加え検討していく必要があろう．

要　約

都市環境中の突然変異誘起物質検出スクリーニングとして，*Salmonella typhimurium* 変異株を利用した方法により，ハト血液，河川水及び大気中における変異原の検出を行なった．

指標としてのハト血液，河川水では変異原の存在は認められず，大気についてのみ検出された．TA100 株において 500 colonies を生じる大気量は麹町，糀谷保健所で約 40 m^3，当衛研では約 100 m^3 であるが，これは発ガン性物質 B(a)P 5 μg により生ずるコロニー数に相当するものである．

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「環境汚染物質の点検」として実施したものである．）

文　献

1) Ames, B.N., P. Sims, and P.L. Grover: *Science*, **176**, 47, 1972
2) Ames, B. N., E. G. Gurney, J. A. Miller, and H. Bartsch: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3128, 1972
3) Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee: *ibid.*, **70**, 2281, 1973
4) Ames, B. N., F. D. Lee, and W. E. Durston: *ibid.*, **70**, 782, 1973
5) Durston, W. E. and B. N. Ames: *ibid.*, **71**, 737, 1974
6) Kier, L. D., E. Yamasaki, and B. N. Ames: *ibid.*, **71**, 4159, 1974
7) Mccann, J., N. E. Spingarn, J. Kobori, and B. N. Ames: *ibid.*, **72**, 979, 1975
8) Hoover, R., T. J. Mason, F. W. Mckay, and J. F. Fraumeni, Jr.: *Science*, **189**, 1005, 1975
9) Ohi, G., H. Seki, K. Akiyama, and H. Yagyu: *Bull. Environ. Contami. Toxicol.*, **12**, 92, 1974
10) Personal Communication
11) Searle, C. E., D. G. Harnden, S. Venitt, and O. H. B. Gyde: *Nature*, **255**, 506, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 303—307, 1976

メチル水銀のラット臓器別半減期の試算（その 2）

野 牛 弘*, 大 井 玄*, 関 比呂伸*
西 垣 進**, 田 村 行 弘**, 久保田憲太郎***

Biological Half Lives of Methylmercury in the Organ Compartments of a Rat (Part II)

HIROSHI YAGYU*, GEN OHI*, HIRONOBU SEKI*, SUSUMU NISHIGAKI**,
YUKIHIRO TAMURA** and KENTARO KUBOTA***

The compartmental analysis of rat organ was studied by means of the computer, FACOM 230-50 and HITAC 8450, in methylmercury. A device of dynamic programing, which is the steepest descent method, promises a good result. That is, a biological half life of alimentary tract is 40 minutes; blood, 6 hours; liver, 1 hour 22 minutes; kidney, 32 hours 18 minutes and the carcass, 49 hours 41 minutes.

本課題について，昭和49年度東京都立衛生研究所年報に第3回目までの試算結果を報告したが，いずれも卓上電子計算機（RICHOMONROE 1766, OLIVETTI P652）によったものである．しかし，その後東京都立工業技術センターの大型電子計算機 FACOM 230-50 および国立公害研究所の HITAC 8450 を使用する機会を得たので，それまで「血液から肝への移行係数」と「血液からその他の臓器への移行係数」を等しいとした仮定条件等を取り去り，また「1変数の解を求める NEWTON 法」のかわりに多変数の解を求める「ダイナミック・プログラミング」[1] の一つである最急降下法[2] を考案し，第4回目の試算結果を得たので報告する．

I 試算に使用した動物実験成績

1. 動物実験の概要

(1) 第1回亜急性実験[3]：メチル水銀 20 ppm 含有飼料にて 40 日間飼育．41 日～61 日の間は普通飼料で飼育．

(2) 第2回亜急性実験：メチル水銀 20 ppm 含有飼料にて40日間飼育．

(3) 実験動物：ウイスター系雄ラット

2. 臓器内総水銀濃度測定値

第1回実験値：略[4]

第2回実験値：表1

第1回及び第2回実験値を併せると表2となる．

3. 補足データー：実験値に片寄りのおそれがあるので排泄比として Cikrt[5] の実験値及び浮田[6] の実験値を利用した．（ラット，アイソープ利用）

Cikrt の実験：静脈注射後24時間にして尿尿中排泄比4.9となる．

浮田の実験：皮下注射後5日にして尿尿中排泄比1.35となる．

II 解析方法

1. メチル水銀体内代謝図

2. 各 Compartment における総水銀の増減式

$$\frac{dQ_1q_1}{dt}=dA+\lambda_{31}Q_3q_3-(\lambda_1+\lambda_{12})Q_1q_1 \quad \cdots\cdots ①$$

$$\frac{dQ_2q_2}{dt}=\lambda_{12}Q_1q_1+\lambda_{52}Q_5q_5-(\lambda_{23}+\lambda_{24}+\lambda_{25})Q_2q_2 \quad \cdots\cdots ②$$

$$\frac{dQ_3q_3}{dt}=\lambda_{23}Q_2q_2-\lambda_{31}Q_3q_3 \quad \cdots\cdots ③$$

$$\frac{dQ_4q_4}{dt}=\lambda_{24}Q_2q_2-\lambda_4Q_4q_4 \quad \cdots\cdots ④$$

* 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食品研究科
*** 国立公害研究所環境生理部

表1 第2回実験臓器内総水銀濃度

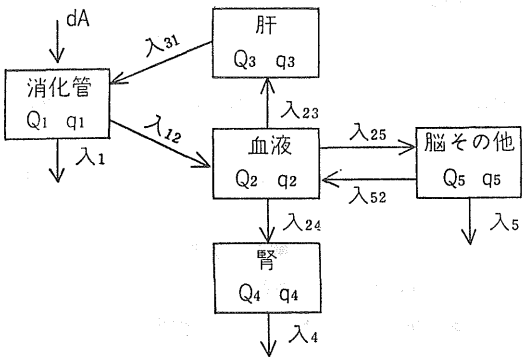
臓器名	TOTAL Hg (ppm)		
	5日	25日	40日
消化管	4.3	9.7	13.0
血液	30.5	86.2	122.0
肝	6.9	22.2	35.1
腎	25.5	97.2	78.5

表2 臓器内 TOTAL 水銀濃度 (ppm)

実験日	時間	消化器 Q_1	血液 Q_2	肝 Q_3	腎 Q_4
5日	120/120	* 4.3	* 30.5	* 6.9	*25.5
20日	360/480		110.0	33.6	
25日	120/600	* 9.7	* 86.2	*22.2	*35.1
40日	360/960	*13.0	*122.0	*35.1	*78.5
41日	24/984		147.0	44.0	83.0
47日	144/1128		132.0	38.0	78.0
54日	168/1296		82.0	34.0	63.8
61日	168/1464		65.0	24.2	75.2

* 印は第2回実験値

$$\frac{dQ_5q_5}{dt}=\lambda_{25}Q_2q_2-(\lambda_5+\lambda_{52})Q_5q_5 \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots ⑤$$



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

図1 メチル水銀体内代謝図

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．

$$0=dA+\lambda_{31}Q_3q_{3\infty}-(\lambda_1+\lambda_{12})Q_1q_{1\infty} \cdots\cdots\cdots\cdots ⑥$$

$$0=\lambda_{12}Q_1q_{1\infty}+\lambda_{52}Q_5q_{5\infty}-(\lambda_{23}+\lambda_{24}+\lambda_{25})Q_2q_{2\infty} \cdots ⑦$$

$$0=\lambda_{23}Q_2q_{2\infty}-\lambda_{31}Q_3q_{3\infty} \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots ⑧$$

$$0=\lambda_{24}Q_2q_{2\infty}-\lambda_4Q_4q_{4\infty} \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots ⑨$$

$$0=\lambda_{25}Q_2q_{2\infty}-(\lambda_5+\lambda_{52})Q_5q_{5\infty} \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots ⑩$$

4. 補足方程式

経口投与したものが，尿中に排泄されるまでの時間を t とし，消化管からの吸収率を C とすれば，

$$(1-\lambda_1)^t=1-(1-\lambda_{12})^t=C \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots ⑪$$

となる．

更に恒常状態時の尿尿排泄比を $\alpha:1$，その他と尿排泄比を $\beta:1$ とすれば，

$$\lambda_1Q_1q_{1,\infty}:\lambda_4Q_4q_{4,\infty}:\lambda_5Q_5q_{5,\infty}=\alpha:1:\beta \cdots\cdots ⑫$$

となる．

5. 計算方法

(1) 計算前提 ア，昨年度報告の第3回目の試算によって求まった移行係数群によって求められる「20ppm メチル水銀含有飼料を無限に投与した時の各臓器濃度」を試算の初期値とする．イ，第1回実験値と第2回実験値に差があるので，係数を掛けることにする．(B(10)) ウ，著者らの実験と Cikrt，浮田の排泄比とを同等のウエイトで取扱う．

(2) 計算の理論[7]及び流れ

ア，理論：或る物質を定量ずつ生体に毎日同経路で投与を続け，「臓器のある物質の半減期」が常に変わらな

```
C 4A1 1     MAIN PROGRAM
C       10 (ENSE N) XINJIC=I1,FRIGRAM N), 88C8, *MET(YL*FRCUFY
        DOUBLE PRECISION A(22),C(6),B(10),R(9),C(10),4,R60
        LO 999 I=1,22
        A(I)=9.L5C
  999   CONTINUE
        C(1)=15.EC  ---------消化管濃度 (g)
        C(2)=20.L0  ---------血 液 〃   〃
        C(3)=9.L0   ---------肝   〃   〃
        C(4)=3.L0   ---------腎   〃   〃
        C(5)=253.D0 ---------その他 〃   〃
        B(6)=25.L0  ---------単位時間経口投与量 (μg)
        B(1)=0.D0   ---------皮ふ尿排泄比 (β)
        B(2)=6.4D0  ---------消化吸収時間 (t1)
        B(3)=1.244D0--------昼尿排泄比 (α)
        B(4)=10.87D0--------消化管濃度 (q1,∞)  恒常時  変数初期値
        B(5)=201.8D0--------血 液 〃 (q2,∞)
        B(6)=62.6D0 ---------肝   〃 (q3,∞)
        B(7)=148.8D0 --------腎   〃 (q4,∞)
        B(8)=29.1D0 ---------その他 〃 (q5,∞)
        B(9)=.3632E-1-------入 2 5
        B(10)=1.D0  ------第2回：第1回実験値比
        CALL REFL(B,C)
        4=.3E0  ----------------キザミ幅
        X50=5   ----------------キザミ幅の縮少回数
        CALL CONC(C,B,R,R60) ------実験シミュレーション
        A(1)=R60  ----------------Xの記憶
        A(18)=A(1)
  360   WRITE(6,228)B,A(1),N50
   22   FORMAT(1H0,8HB        =,D14.7,5X,8HT        =,D14.7,/,1X,8HA        =,D1
        14.7,5X,8H0L1     =,D14.7,5X,8H0C8     =,D14.7/1X,8H0P3     =,D14.7,5X
        2,8H0L4     =,D14.7/1X,8H0D5     =,D14.7,5X,8HLAME A25=,D14.7,5X,8HFAC
        31OR =,D14.7/5X,6HCHI 2=,D14.7,5X,3HN1=,I2)
        WRITE(6,20)B(3),R
   20   FORMAT(1H ,17HIHOUKEISU/4HOR   /5X,D14.7/12X,4D14.7/12X,,5E14.7)
        R(1)=.693D0/(R(1)+R(2))
        R(3)=.693D0/(R(3)+R(4)+R(5))
        R(6)=.693D0/R(6)
        R(7)=.693D0/R(7)                    臓器別半減期の計算
        R(9)=.693D0/(R(8)+R(9))
        WRITE(6,30)R(1),R(3),R(6),R(7),R(9)
   30   FORMAT(1H ,25HBIOLOGICAL HALF LIFE/HOUR/12X,16HDIGESTIVE TRACT=,D1
        10.3,5X,6HBLJDE=,D10.3,5X,6HLIVER=,D10.3/12X,7HKIDNEY=,D10.3,5X,7H
        2THERS=,D10.3)
        WRITE(6,21)
   21   FORMAT(1H0,110(1H-))
        LO 333 I=1,3,2
        B(I)=B(I)+4
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(I+1)=R60
        IF(A(18).LE.A(I+1))GO TO 661
        A(18)=A(I+1)
        CALL REFL(B,C)
  661   B(I)=B(I)-4
  333   CONTINUE
        LO 777 I=2,8,2
        B(I)=B(I)+4*10.D0
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(I+1)=R60
        IF(A(18).LE.A(I+1))GO TO 662
        A(18)=A(I+1)
        CALL REFL(B,C)
  662   B(I)=B(I)-4*10.D0
  777   CONTINUE
        LO 666 I=5,7,2
        B(I)=B(I)+4*10.D0
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(I+1)=R60
        IF(A(18).LE.A(I+1))GO TO 663
        A(18)=A(I+1)
        CALL REFL(B,C)
  603   B(I)=B(I)-4*100.D0
  666   CONTINUE
        B(9)=B(9)+4*1.D-2
        IF(B(9).GE.1.D0)GO TO 609
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(19)=R60
        IF(A(18).LE.A(19))GO TO 609
        A(18)=A(19)
        CALL REFL(B,C)
  609   B(9)=B(9)-4*1.D-2
        B(10)=B(10)+4
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(21)=R60
        IF(A(18).LE.A(21))GO TO 610
        A(18)=A(21)
        CALL REFL(B,C)
  610   B(10)=B(10)-4
        DO 222 I=1,3,2
        B(I)=B(I)-4
        IF(B(I).LE.0.D0)GO TO 112
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(I+9)=R60
        IF(A(18).LE.A(I+9))GO TO 112
        A(18)=A(I+9)
        CALL REFL(B,C)
  112   B(I)=B(I)+4
  222   CONTINUE
        DO 555 I=8,2,2
        B(I)=B(I)-4*10.D0
        IF(B(I).LE.0.D0)GO TO 113
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(I+9)=R60
        IF(A(18).LE.A(I+9))GO TO 113
        A(18)=A(I+9)
        CALL REFL(B,C)
  113   B(I)=B(I)+4*10.D0
  555   CONTINUE
        DO 444 I=5,7,2
        B(I)=B(I)-4*100.D0
        IF(B(I).LE.0.D0)GO TO 114
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(I+9)=R60
        IF(A(18).LE.A(I+9))GO TO 114
        A(18)=A(I+9)
        CALL REFL(B,C)
  114   B(I)=B(I)+4*100.D0
  444   CONTINUE
        B(9)=B(9)-4*1.D-2
        IF(B(9).LT.0.D0)GO TO 120
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(20)=R60
        IF(A(18).LE.A(20)) GO TO 120
        A(18)=A(20)
        CALL REFL(B,C)
  120   B(9)=B(9)+4*1.D-2
        B(10)=B(10)-4
        IF(A(18).LT.0.D0)GO TO 121
        CALL CONC(C,B,R,R60)
        A(22)=R60
        IF(A(18).LE.A(22))GO TO 121
        A(18)=A(22)
        CALL REFL(B,C)
  121   B(10)=B(10)+4
        IF(A(18).GE.A(1))GO TO 600
        DO 990 I=1,10
        B(I)=C(I)
  990   CONTINUE
        A(1)=A(18)
        GO TO 300
  600   4=4*.1D
        N50=N50-1
        IF(N50)400,400,300
  400   STOP
        END
```

表 3　理論値と実験値の比較表

実験日	消化管濃度	血液濃度	肝濃度	腎濃度	その他濃度	全体濃度
5 日	5.2	40.9	12.4	22.5	6.0	8.7
	(4.3)×1.18=5.1	(30.5)×1.18=36.0	(6.9)×1.18=8.14	(25.5)×1.18=30.0		
20日	10.6	101.8 (110)	31.2 (33.6)	72.0	22.5	27.9
25日	12.0	117.0	35.8	84.1	26.5	32.7
	(9.7)×1.18=11.4	(86.2)×1.18=101.7	(22.2)×1.18=26.2	(97.2)×1.18=114.7		
40日	15.0	151.0	46.3	111.3	35.7	43.4
	(13.0)×1.18=15.3	(122) ×1.18=144.0	(35.1)×1.18=41.4	(78.5)×1.18= 92.6		
41日	12.3	137.0 (147)	42.3 (44)	110.0 (83)	35.5	42.1
47日	10.0	111.5 (132)	34.3 (38)	89.7 (78)	30.1	35.2
54日	8.1	90.8 (82)	28.0 (34)	72.9 (63)	24.5	28.7
61日	6.6	74.0 (65)	22.8 (24.2)	59.4 (75)	20.0	23.4

下段（ ）内実験値

いとすると体内臓器内の物質濃度は恒常状態となる．従って恒常状態は臓器半減期（移行係数）の函数であり，また逆に臓器半減期は恒常状態の函数である．

いま動物実験を行い，ある物質を投与したとすると，体内臓器内のある物質濃度は時間とともに変化してゆく，この変化の状態は臓器別半減期の函数で表わされ，また先の恒常状態の臓器濃度の函数としても表わされる．よって恒常状態の臓器濃度からある実験の理論値を算出することが出来る．この理論値 X_{exp} と実験値 X_{obs} との値より $\chi^2=\sum(X_{obs}-X_{exp})^2/X_{exp}$ を算出す

```
CHART 2 SIMULATION PROGRAM OF EXPERIMENT

      SUBROUTINE CONC(Q,B,R,R60)
      DOUBLE PRECISION Q(6),B(10),R(9),QD(5),QDN(5),G(15),S(3),R60,Z,Z1
     1ZZ
      R(5)=B(9)
      Q(6)=25.D0  ----------1時間に25 μgを経口投与する
      R(1)=Q(6)*B(3)/(Q(1)*B(4)*(1.D0-B(3)+B(1)))
      R(8)=R(1)/Q(5)*Q(1)/B(8)*B(4)/B(3)*R(1)
      R(7)=R(1)/Q(4)*Q(1)/B(7)*B(4)/B(3)
      R(4)=R(7)/Q(2)*Q(4)/B(5)*B(7)
      Z1=(1.1D-R(1))**B(2)
      Z=1.D0-Z1
      Z2=DLOG10(Z)
      R(2)=1.D0-10.D0**(Z2/B(2))
      R(6)=((RR(1)+R(2))*Q(1)*B(4)-Q(6))/Q(3)/B(6)
      R(3)=R(6)/Q(2)*Q(3)/B(5)*B(6)
      R(9)=R(5)/Q(5)*Q(2)/B(8)*B(5)-R(8)
      CALL SIMPLC(Q,R,G) ----------定数の計算
      DO 800 I=1,5
      QD(I)=0.D0
      QDN(I)=0.D0
800   CONTINUE
      R60=0.D0          ----------χ²をゼロとする
      N2=120            ----------120時間サイクルをまわす
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)  ----------体内シミュレーションサイクル
      R60=(QD(1)-4.3D0*B(10))*(QD(1)-4.3D0*B(10))/QD(1)+(QD(2)-30.5D0*B(
     110))*(QD(2)-30.5D0*B(10))/QD(2)+(QD(3)-6.9D0*B(10))*(QD(3)-6.9D0*B
     2(10))/QD(3)+(QD(4)-25.5D0*B(10))*(QD(4)-25.5D0*B(10))/QD(4)+R60
      N2=360
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      R60=(QD(2)-110.D0)*(QD(2)-110.D0)/QD(2)+(QD(3)-33.6D0)*(QD(3)-33.6
     1D0)/QD(3)+R60
      N2=120
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      R60=(QD(1)-9.7D0*B(10))*(QD(1)-9.7D0*B(10))/QD(1)+(QD(2)-86.2D0*B(
     110))*(QD(2)-86.2D0*B(10))/QD(2)+(QD(3)-22.2D0*B(10))*(QD(3)-22.2D0
     2*B(10))/QD(3)+(QD(4)-97.2D0*B(10))*(QD(4)-97.2D0*B(10))/QD(4)+R60
      N2=360
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      R60=(QD(1)-13.0D0*B(10))*(QD(1)-13.0D0*B(10))/QD(1)+(QD(2)-122.0D0
     1*B(10))*(QD(2)-122.0D0*B(10))/QD(2)+(QD(3)-35.1D0*B(10))*(QD(3)-35
     2.1D0*B(10))/QD(3)+(QD(4)-78.5D0*B(10))*(QD(4)-78.5D0*B(10))/QD(4)+
     3R60
      Q(6)=0.D0  ----------経口投与をやめる
      CALL SIMPLC(Q,R,G)
      N2=24
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      R60=(QD(2)-147.0D0)*(QD(2)-147.0D0)/QD(2)+(QD(3)-44.0D0)*(QD(3)-44
     1.0D0)/QD(3)+(QD(4)-63.0D0)*(QD(4)-63.0D0)/QD(4)+R60
      N2=144
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      R60=(QD(2)-132.0D0)*(QD(2)-132.0D0)/QD(2)+(QD(3)-38.0D0)*(QD(3)-38
     1.0D0)/QD(3)+(QD(4)-78.0D0)*(QD(4)-78.0D0)/QD(4)+R60
      N2=168
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      R60=(QD(2)-82.0D0)*(QD(2)-82.0D0)/QD(2)+(QD(3)-34.0D0)*(QD(3)-34.0
     1D0)/QD(3)+(QD(4)-63.8D0)*(QD(4)-63.8D0)/QD(4)+R60
      N2=168
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      R60=(QD(2)-65.0D0)*(QD(2)-65.0D0)/QD(2)+(QD(3)-24.2D0)*(QD(3)-24.2
     1D0)/QD(3)+(QD(4)-75.8D0)*(QD(4)-75.8D0)/QD(4)+R60
      DO 801 I=1,5
      QD(I)=0.D0
      QDN(I)=0.D0
801   CONTINUE
      S(1)=0.D0
      S(2)=0.1D0
      S(3)=0.1D0
      N2=24
      Q(6)=98.1D0/B(2)  ----------58 μgを静注する
      CALL CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      R60=R60+(S(1)/S(2)-1.35D0)*(S(1)/S(2)-1.35D0)/S(1)*S(2)+13.1D0
      DO 802 I=1,5
      QD(I)=0.D0
      QDN(I)=0.D0
802   CONTINUE
      S(1)=0.D0
      S(2)=0.D0
      S(3)=0.D0
      N2=120
      Q(5)=88.D0/Q(5)----------58 μgを皮下注射
      CALL CYCLE2(Q,R,QD,QDN,G,S,N2)
      R60=R60+(S(1)/S(2)-1.35D0)*(S(1)/S(2)-1.35D0)/S(1)*S(2)+13.1D0
      RETURN
      END
```

入の計算

5日目のχ²計算

20日目のχ²計算

25日目のχ²計算

40日目のχ²計算

41日目のχ²計算

47日目のχ²計算

54日目のχ²計算

61日目のχ²計算

Clarkの実験

経田の実験

```
CHART 3 CALCULATION PROGRAM OF DEFINITED NUMBER

      SUBROUTINE SIMPLC(Q,R,G)
      DOUBLE PRECISION Q(6),R(9),G(15)
      G(1)=R(6)*Q(3)/Q(1)
      G(2)=Q(6)/Q(1)
      G(3)=1.D0-R(1)-R(2)
      G(4)=R(2)*Q(1)/Q(2)
      G(5)=R(9)*Q(5)/Q(2)
      G(6)=1.D0-R(3)-R(4)-R(5)
      G(7)=R(3)*Q(2)/Q(3)
      G(8)=1.D0-R(6)
      G(9)=R(4)*Q(2)/Q(4)
      G(10)=1.D0-R(7)
      G(11)=R(5)*Q(2)/Q(5)
      G(12)=1.D0-R(8)-R(9)
      G(13)=Q(1)*R(1)
      G(14)=Q(4)*R(7)
      G(15)=Q(5)*R(8)
      RETURN
      END
```

```
CHART 4 ONE CYCLE OF SIMULATION IN BODY

      SUBROUTINE CYCLE(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      DOUBLE PRECISION Q(6),R(9),QD(5),QDN(5),G(15)
      DO 888 I=1,N2
      QDN(1)=G(1)*QD(3)+G(2)+G(3)*QD(1)
      QDN(2)=G(4)*QD(1)+G(5)*QD(5)+G(6)*QD(2)
      QDN(3)=G(7)*QD(2)+G(8)*QD(3)
      QDN(4)=G(9)*QD(2)+G(10)*QD(4)
      QDN(5)=G(11)*QD(2)+G(12)*QD(5)
      DO 888 J=1,5
      QD(J)=QDN(J)
888   CONTINUE
      RETURN
      END
```

```
CHART 5 ONE CYCLE OF SIMULATION IN BODY, NO.2

      SUBROUTINE CYCLE2(Q,R,QD,QDN,G,N2)
      DOUBLE PRECISION Q(6),R(9),QD(5),QDN(5),G(15)
      DO 888 I=1,N2
      QDN(1)=G(1)*QD(3)+G(2)+G(3)*QD(1)
      QDN(2)=G(4)*QD(1)+G(5)*QD(5)+G(6)*QD(2)
      QDN(3)=G(7)*QD(2)+G(8)+QD(3)
      QDN(4)=G(9)*QD(2)+G(10)*QD(4)
      QDN(5)=G(11)*QD(2)+G(12)*QD(5)
      S(1)=S(1)+G(13)*QDN(1)
      S(2)=S(2)+G(14)*QDN(4)
      S(3)=S(3)+G(15)*QDN(5)
      DO 888 J=1,5
      QD(J)=QDN(J)
888   CONTINUE
      RETURN
      END
```

```
CHART 6 SUBROUTINE PROGRAM OF TRANSFER

      SUBROUTINE REPL(B,C)
      DOUBLE PRECISION B(10),C(10)
      DO 888 I=1,10
      C(I)=B(I)
888   CONTINUE
      RETURN
      END
```

る．この χ^2 を最小にするように恒常状態臓器濃度を変えてゆき，χ^2 がそれ以下に下らなくなったときの恒常状態濃度即ち臓器半減期（移行係数）が求めるその生体の固有値である．

イ，計算の流れ

a．II 節2項①～⑥の微分方程式を漸化式に変換し，体内シミュレーションの計算式とする．

b．計算変数初期値にそれぞれについてキザミ幅を加えたもの，とキザミ幅を減じたもので理論値を計算し，χ^2 を算出する．この χ^2 群の中で最も小さな χ^2 を出した変数の組合せを初期値として次の計算を行う．この場合変数ごとにキザミ幅に差をつけた．

(3) 計算プログラム

ア，主プログラム …… CHART 1
イ，実験シミュレーション …… CHART 2
ウ，定数の計算サブルーチン …… CHART 3
エ，体内シミュレーション
　計算サブルーチン …… CHART 4
オ，体内シミュレーション及び
　排泄総量計算サブルーチン …… CHART 5
カ，置換サブルーチン …… CHART 6

6. 試算結果

(1) 変数の解

$\alpha = .1417820 \times 10$　　$\beta = .8326673 \times 10^{-16} \fallingdotseq 0$

t=0.1360000

$q_{1,\infty}$=20.53680ppm　　λ_{25}=0.0434294

$q_{2,\infty}$=212.2160ppm　　FACTOR=1.184050

$q_{3,\infty}$=15.1722ppm

$q_{4,\infty}$=160.6500ppm

$q_{5,\infty}$=52.2354ppm

(2) 臓器別移行係数および半減期

消化管 $\begin{cases}\lambda_1 = 0.04758972 \\ \lambda_{12} = 0.9999999\end{cases}$ 39分43秒

血液 $\begin{cases}\lambda_{23} = 0.07014365 \\ \lambda_{24} = 0.002436172 \\ \lambda_{25} = 0.04342970\end{cases}$ 5時間58分12秒

肝 $\lambda_{31}=0.5075649$ 1時間21分55秒

腎 $\lambda_4=0.02145429$ 32時間18分5秒

その他 $\left\{\begin{array}{l}\lambda_5=0.6514815\times10^{-19}\fallingdotseq0\\ \lambda_{52}=0.01394792\end{array}\right\}$ 49時間41分6秒

(3) 20 ppm メチル水銀含有飼料40日間投与実験体内臓器総水銀濃度理論値と実験値との比較

前項で求まった移行係数を使用して投与実験をシミュレーションさせると表3上段の理論値をうる．これを下段の実験値と比較する．

第1回実験と第2回実験とは同一条件で行ったのであるが，データに差があるように思われたので前述のごとく係数を掛けることにして試算を行った．係数は1.18であることが算出された．これを第2回実験値に掛けて比較観察する．$\chi^2=47.1>\chi^2(25,0.05)=37.7$ 従って適合しているとは言えない．しかし肝の実験値20日と25日の値が逆転しているし，また腎の実験値25日と40日が同じく逆転している．よってこれを逆転させて χ^2 を算出すれば $\chi^2=32.0$ となり $\chi^2(25,0.01)=34.4$ より小となり，よく適合していることになる．

III 考察および結論

先に Kopple ら[8]が鉛の体内代謝を3コンパートメントで算出したが，これは鉛がコンパートメントの一つである骨に専ら蓄積するために，骨以外は二つのコンパートメントに集約して解析したものであろう．

メチル水銀においては，血液に最も蓄積されているが同時に血液以外の体内諸臓器に広く一様に分布されていると思われる．また，尿中排泄，尿中排泄，皮ふからの排泄を考え，更に消化管・血液・肝の3角の循環路を考えた．これに対し，消化管からの吸収は門脈系であるから肝へ移行すべきとの意見もあるが，さしあたり消化管より血液へ，血液から肝へ，肝から消化管へとの循環をするものとして計算を行った．血液から腎への移行のほかに当然腎から再吸収されて血液への移行も考えるべきかも知れない．

しかし，第 II-1 項に示す5コンパートメントの9移行係数および第2回実験値対第1回実験値の係数を加えた10変数の解をうるには高速の最新大型計算機でも数時間の計算時間を要し，計算機の使用制限によりなかなかはかどらないものである．しかも数時間の後に得られたものが本当の正解であるかは数多くの初期値群を入れて，反覆してはじめて言えるものであろう．

ここに求まる解はすべて近似値であるから厳密に言えば，絶対に正解ぴたりに出ることはない．いま正解が唯一つであったとしても，近似値は無限に存在することとなる．従って求まった解が正解に最も近いものであると認めるには数回の反覆計算は必要不可欠である．

本報告で記載した計算方法は基本計算方法であり，その後の研究により約10倍の計算速度を持つ計算方法を考案したので，研究調整室プロジェクト研究「動物を指標とした環境汚染物質の点検」昭和50年度報告に概略を報告したので参照されたい．

早い計算方法だとそれだけ早く試算結果は出てくる．しかし，それが最も正解に近くなるかどうかは保証されない．時にはこの報告に記載した基本計算方法でなければならない場合もある．従って同じ計算方法を初期値群をかえて反覆するほかに計算方法も変えて計算することもまた必要なことである．

本計算方法により得られた移行係数の中で消化管の移行係数の総和が1を越えていることは，本解がまだ正解に近づけうることを意味している．これには計算時間単位を時間から分単位に短かくしなければならない．現在15分単位で計算するようプログラムの変更を行っているので，今後の研究の進展が期待出来よう．

文 献

1) 尾形克彦：ダイナミック・プログラミング，1973，培風館
2) 戸川隼人：数値計算入門，1975，オーム社
3) Ohi, G., S. Nishigaki, H. Seki, Y. Tamura, T. Maki, H. Maeda, S. Ochiai, H. Yamada, Y. Shimamura, and H. Yagyu: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **32**, 527, 1975
4) 野牛 弘，大井 玄，関比呂伸，西垣 進，田村行弘：東京衛研年報，**26**-1, 305, 1975
5) Cikrt, M. and M. Tichy: *Environ. Res.*, **8**, 71, 1974
6) 浮田進之助：科学，**41**, 557, 1971
7) 野牛 弘：FACOM EDP 論文集，第9集，1976
8) Kopple, J.D., M. B. Rabinowitz, and G. V. Wetherill: *Science*, **182**, 725, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 308—311, 1976

飲料水の安全性に関する研究（第1報） 水中の蛍光物質について

森田昌敏*, 三村秀一*

Studies on the Safety of Drinking Water Part 1 Fluorescent Substances in Water

MASATOSHI MORITA* and SHUICHI MIMURA*

I 緒　　言

ここ20年間にわたって水質，特に上水道源の水質は急速に悪化してきた．特に有機物による汚染が顕著に増加してきており，これは上流地域の都市化にともなう家庭排出物，工業化にともなう産業廃棄物そして農業の近代化にともなう農薬と肥料の使用量の増大等の結果として構造的に生じている．このような有機物質による汚濁はいくつかの化学的あるいは生物化学的指標―たとえば全有機炭素量（TOC），化学的酸素要求量（COD），生物化学的酸素要求量（BOD）―によって評価されてきたが，分光学的な手法もまたこれを反映する情報を与えるものとして考えられてきた[1-3]．小倉等は紫外部吸収スペクトルを陸水の有機汚濁評価に応用することを試みた[4,5]．最近 Hall と Lee は湖水の有機物をゲルクロマトグラフィーで分画した後スペクトル的な特徴づけを行った[6]．しかしながら，蛍光スペクトルの水質汚濁への応用は未だ殆んど手がけられていない[7]．

蛍光現象は多くの有機および無機の化学物質に見いだされる現象である．天然物質の中には蛍光を示す物質は極めて多数あり，従って一般河川水の示す蛍光の大部分は天然物に起因すると考えるのが自然であろう．合成化学物質の中で特に蛍光に関して重要な意味をもって環境中に放出されているのは蛍光染料特に蛍光増白剤であると考えられる．蛍光増白剤は，多種類の化合物の総称ではあるが，その生産高は年産1万t近くにも達し，使用形態も全く開放型であるため環境中への流出量は大きいからである．

河川水に，あるいは水道水に紫外線を照射すると青色あるいは紫色の蛍光を発する．この蛍光はおそらく中に含まれる極めて多数の化合物の発する蛍光の総和から成りたっており，その一つ一つの分離は極めて困難である．本研究では全体の蛍光強度と河川の有機性汚染物との関連について調査した．また蛍光増白剤の定量に関してもアプローチを試みた．

II 実　　験

II—1. 試料

河川水は多摩川の中下流域（是政橋より多摩川大橋まで）の水を試料とした．また水道水としては都水道局水質センターより供与をうけた都内4か所の浄水場の原水および浄水を用いた．試料水は東洋ろ紙製 No. 2 のろ紙を用いてろ過し，検水とした．

II—2. 分析法

メチレンブルー活性物質量（MBAS），過マンガン酸カリウム消費量，塩素イオン濃度は上水試験法により測定した．蛍光スペクトルは日立 MPF 4 型蛍光光度計を用いて測定した．

III 結果と考察

III—1. 河川水の蛍光スペクトル

多摩川の水をろ過した後，蛍光光度計にかけ，得られた励起スペクトラムを図1に示す．河川水は 400 nm 付近に幅広いピークをもつスペクトラムを通常与える．これは多摩川の水に限らず，江戸川，善福寺川でも同様であった．この励起スペクトルはラマン散乱の影響を合せて観察したものであるので，最純度の水においてもピークをもって現われてくるものである．しかし通常の河川水は，蒸留水に較べて，はるかに高い強度のスペクトルを与え，このことは河川水が蒸留水よりも，はるかに多くの蛍光性物質を含有していることを意味する．なお図1のスペクトルは河川水を凍結乾燥した後メタノールで抽出した成分の励起スペクトルである．主なピーク位置，ピークの形に変化がみられる．650 nm 付近の小さなピークはクロロフィルに帰属される．

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

励起スペクトルの強度が河川の一般的な汚染とどのような関係があるかを調べるために，多摩川の水について化学的酸素要求量（過マンガン酸カリウム消費量），塩素イオン濃度を測定し，励起スペクトルのピーク強度（EA_{max}）との相関を調べた．（図2，3）塩素イオンは生活汚染の指標と考えられ，また COD は溶存有機物量の指標であるが，両者共に EA_{max} と弱い相関が認められた．(EA_{max} − Cl^-：n=33, r=0.72 また EA_{max} − COD：n=33, r=0.78)．従って有機汚濁の指標としての蛍光スペクトルの利用は一つの有望な方法と考えられる．励起スペクトルは非常に多数の物質に起因する混合スペクトルであるため，高能率な分離手段をもってし

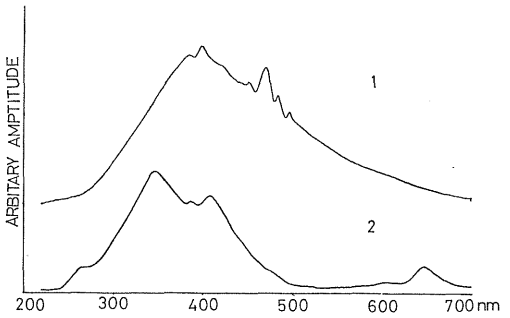


Fig. 1 Excitation spectra of river water.
1: river water, 2: methanol extract of freeze-dried river water.

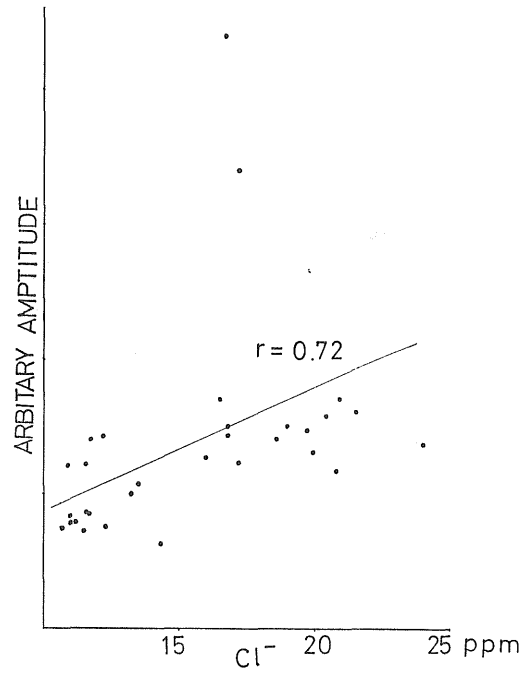


Fig. 2. Correlation between chlorine content and excitation spectra amptitude at 400 nm.

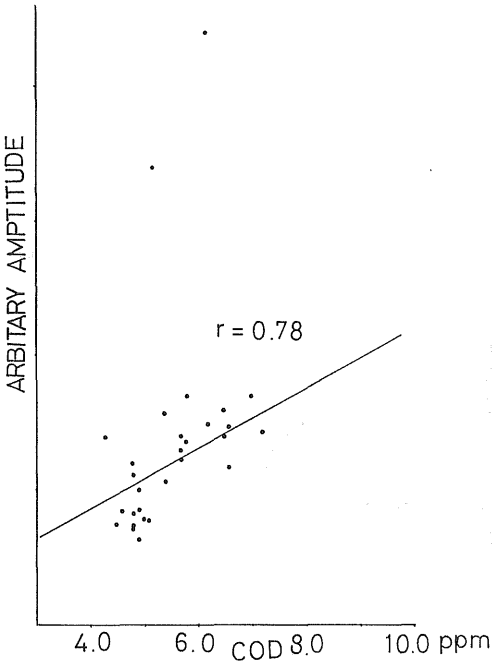


Fig. 3. Correlation between chemical oxygen demand and excitation spectra amptitude 400 nm.

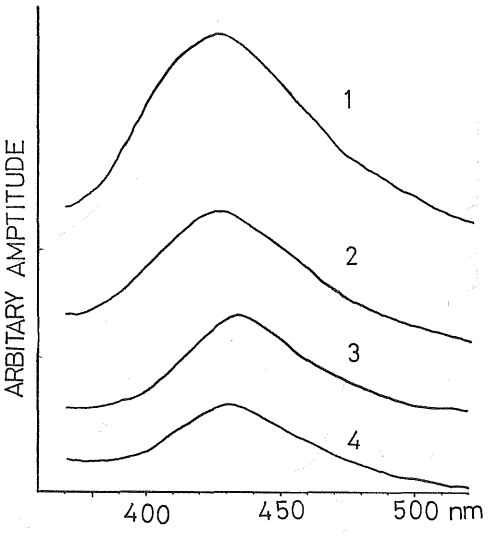


Fig. 4. Emission spectra of river water and several fiber whitening agents by the excitation of uv. light (350 nm).
1: river water, 2: Whitex BO, 3: Kayaphor CBS, 4: Kayaphor LSK.

ても，その中味について吟味することは困難であろう．構成成分の蛍光スペクトル的特性化は今後の課題である．

合成化学物質のうち，この蛍光物質群に対して最も重要に寄与しているのは蛍光増白剤である．蛍光増白剤は数十種類以上の品目が日本でも市販されており，個々の物質の同定，定量は極めて困難である．これらの一群の化合物の特徴は，350 nm 付近に極大吸収をもち，430 nm 付近に極大蛍光スペクトルを示すことである．図4に一例を示す．この特徴に着目して，350 nm の励起光

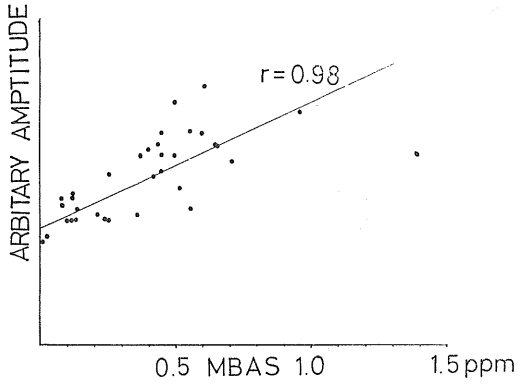


Fig. 5. Correlation between emission amptitude and the quantity of methyleneblue active substances.

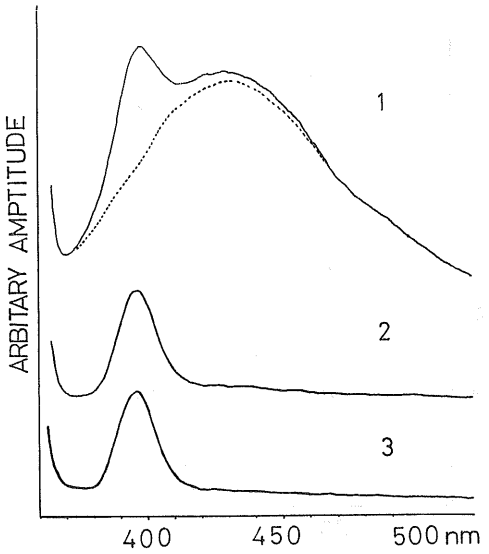


Fig. 6. Emission spectra of distilled water, tap water and raw water at water supply.
1: raw water, 2: tap water, 3: redistilled water.

Table 1. Excitation spectra amptitude of raw water and treated water at water supply. (relative values)

Water supply	Amptitude	
	Raw water	Treated water
Asaka	88	15
Nagasawa	119	12
Higashimurayama	44	8
Kanamachi	213	15
Distilled water		7

により 430nm に発光するものを“蛍光増白剤様物質”と名づけ，その水中における定量化を試みた．蛍光増白剤は合成洗剤と共に使用されるので，河川水中の蛍光増白剤と合成洗剤量との間には高い相関が予想される．図5に多摩川における“蛍光増白剤”相当蛍光強度と“メチレンブルー活性物質量”とをプロットした．両者の間には極めて高い相関が見いだされた．($n=33$, $r=0.98$) メチレンブルー活性物質量が0のところでの“蛍光増白剤様物質量”はかなり高い値を示しており，このことは単純にその蛍光強度を蛍光増白剤に帰属すると過大評価を与えることを意味する．精密な定量のためには，結局個々の物質を適当な手段で定量する必要がある．

“蛍光増白剤様物質”量を代表的な蛍光染料の1つ Whitex BO の蛍光強度より換算すると，“メチレンブルー活性物質”量の大体1～2%程度であった．蛍光増白剤が洗剤中に 0.5% 程度添加されていることを考慮すると幾分高い値を示している．今後，個々の物質について更に分析を精密化する必要がある．

III—2. 水道水の蛍光スペクトル

水道水用原水と処理水の励起スペクトル強度を比較すると表1のようになる．処理水の EA_{max} は明らかに水道水原水の 1/10 程度に低下しており，通常の浄水処理（凝集沈殿塩素処理）がこれらの物質の除去に有効であることがわかる．

図6に 350 nm の励起光による蛍光スペクトルを示す．原水において認められる 430 nm に極大をもつ幅広いピークは処理水ではほとんど完全に消失しており，この種の物質は通常の浄水処理で非常に有効に処理されているものと考えられる．つまり蛍光増白剤は現在の処理でほとんど水道水中には残留しないと考えられる．

結　論

蛍光光度法を河川の汚濁を評価する手段として応用した．励起スペクトルは多摩川の下流に進むに従ってその強度が増加し，河川の汚濁と密接な関係があることが判

明した．また 350 nm の光で励起され，430 nm での発光を用いて"蛍光増白剤物質"による蛍光と定義し，その界面活性剤との相関を調べた．"蛍光増白剤様物質"に起因する蛍光強度はメチレンブルー活性物質量と高い相関を示し，河川のこの種の汚染に対し家庭用洗剤の寄与の重要性が暗示された．水道水中には，この種の物質は検出されなかった．

（本研究は昭和50年度当研究所調査研究課題「飲料水の安全性に関する研究」として実施したものである）．

参考文献

1) Fushs, W. and E. Kohler: *Mitt. Ver. Gross-kesselbesitzer*, **47**, 107, 1957
2) Wilson, A.L.: *J. Appl. Chem.*, **9**, 501 1959
3) Mrkva, M.: *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **41**, 1923, 1969
4) Ogura, N. and T. Hanya: *Nature*, **212**, 758, 1966
5) Ogura, N. and T. Hanya: *Int. J. Oceanol. Limnol.*, **1**, 91, 1967
6) Hall, K.J. and G.F. Lee: *Water Res.*, **8**, 239, 1973
7) Traganza, E.D.: *Bull. Mar. Sci.*, **19** (4), 897, 1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 312-315, 1976

水道水の塩素処理により生じる悪臭物質

大橋則雄*, 森田昌敏*, 三村秀一*

Malodorous Substances induced by Chlorination in Supplied Water

NORIO OHASHI*, MASATOSHI MORITA* and SHUICHI MIMURA*

Test of odor threshold and analysis of tap water were made on two types of malodorous substances induced through chlorination which is conventionally used for disinfection in water supply.

One is chloro-derivatives of aliphatic amines. Most of them gave an irritation to eyes, nose and throat. Odor threshold in water of these materials has maximum strength in the medium chain length of 4-8 carbons and reaches to the level of 10^{-9}.

The other one is bromo-derivatives of phenol. Among the derivatives, 2-bromophenol, 4-bromophenol, 2,4-dibromophenol, 2,6-dibromophenol and bromochlorophenol were identified in household tap water in Tokyo by GC-MS. In the same gaschromatographic conditions, no bromophenols were found in unchlorinated water at the metropolitan water supply indicating that these materials were produced through chlorination. The bromine might have its source in river water in the form of bromide ion. Odor threshold of these materials is as low as in the level of 10^{-9}.

I 緒　　言

飲料水の殺菌に有効な方法として広く塩素処理が行なわれ効果をあげている．塩素剤は細菌汚染に対して有効[1]な反面，水中の化学物質と反応して，異臭，着色の原因となる化合物を生成することも知られている[2]．そこで筆者らは今までにも問題のあったフェノール類[3,4]とアミン類[5]をとりあげ，塩素化による生成化合物の同定および生成化合物の臭いき値について検討を行なった．なお都内の浄水場の原水，処理水，実際に供給されている水道水について同様の検討を行ない知見を得たので報告する．

II 実　　験

II—1. 試薬

ベンゼンはマリンクロット社製を用い，特にことわりのない試薬は特級または一級をそのまま用いた．pH6.8緩衝液はリン酸一カリウムと無水リン酸二ナトリウムで調製した．実験に用いたアミン類は Table 1 にあげたとおりである．

II—2. 装置

ガスクロマトーマススペクトルの測定には島津 LKB—9000型を用いた．

II—3. 分析

II—3—1) アミン含有水への塩素添加

シクロヘキシルアミン，脂肪族アミン類の水溶液の臭いき値とアミンに次亜塩素酸ナトリウム水溶液を添加した場合の臭いき値を pH 6.8 の条件下で求めた．測定は Burttschell ら[6]の方法を参考にした．あらかじめ，おおよそのいき値を求めておき，それが中間の値となるように，水道水を活性炭ろ過して得た無臭水でアミンを5段階に倍々希釈して検液とした．緩衝液で pH 6.8 として全容 100 m*l* を 200 m*l* 共栓三角フラスコにうつした．測定者は5人以上を対象とし低濃度の溶液からテストした．測定の結果は上限と下限の値を切り捨てて，中間の値を採用した．また添加した遊離塩素濃度は臭気測定の妨げとならない程度(約 0.1 ppm)に加えた．次に，刺激臭の生成が pH にどの様に影響されるかしらべるた

* 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

Table 1. Odor Threshold Concentrations of Aliphatic Amines and Their Chloro-derivatives.

	TO of Free Amine (mg/l)	TO of Chlorinated Amine (mg/l)
Methylamine	200	—*
Ethylamine	200	—*
Propylamine	2000	1
Isopropylamine	2000	1
n-Butylamine	100	0.02
n-Amylamine	10	0.004
n-Hexylamine	10	0.001
n-Heptylamine	5	0.004
n-Octylamine	10	0.004
Dimethylamine	2000	—*
Trimethylamine	2000	—*
Diethylamine	2000	—*
Triethylamine	2000	—*
Cyclohexylamine	100	0.06

* No significant change in odor was demonstrable through chlorination

めにアミルアミンについてのみ，前記と同様の操作で臭いき値を求めた．さらに，臭気物質を同定するために，pH 6.8に調製したアミン水溶液に次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し，生成物をクロロホルム抽出し分析した．

II—3—2) クロロフェノールの分析

都内浄水場の原水と処理水，数か所の水道水について分析を行なった．検水 1 *l* に 5N 水酸化ナトリウム溶液 10 m*l* を加え，ベンゼン 50 m*l* で2回抽出する．水層に 6N 塩酸 15 m*l* を加え，ベンゼン 100 m*l* で2回抽出し，ベンゼン層を分取して無水硫酸ナトリウムで脱水した後，減圧濃縮した．この濃縮液を GC—MS で測定した．MS の測定は6秒毎に行ない，得られた MS を磁気テープに記憶させ，測定終了後に得られた m/e をプロットさせることによりフラグメントグラムを得た．

GC—MS の測定条件 GCカラム：TenaxGC^{R} 2m 温度：カラム 240°，試料注入口 260°，セパレーター 270°，イオン源 310°，イオン化電圧 20 eV (TIC)，70 eV (MS) トラップ電流：60 μA キャリアガス：ヘリウム 30 m*l*/min

III 結 果

III—1. アミンと塩素との反応

塩素を添加した場合としない場合とのアミン水溶液の臭いき値を Table 1 に示す．塩素を添加した場合，炭素数4から8の脂肪族アミンで強い粘膜刺激性の臭気を発した．しかし，刺激臭は一昼夜の放置でほとんど消失した．

Table 2 に示すように液性と刺激臭の生成は中性で最高となり，酸性側では時間の経過とともに次第に刺激臭が強まり，アルカリ性側では刺激臭は認められなかった．

Table 2. Effect of pH on Odor Threshold of Chloro-derivative of *n*-Amylamine.

pH	TO of Chlorinated Amylamine (mg/l)
1.2	10
4.4	0.1
6.8	0.004
9.7	—
12.8	—

アミン刺激臭物質の同定は困難であった．シクロヘキシルアミンの場合，抽出したクロロホルム溶液から一昼夜の放置により無色の針状結晶を生成した．この結晶は赤外吸収スペクトルによりシクロヘキシルアミン塩酸塩であることが同定されたが，この物質からは刺激臭を発しない．

III—2. クロロフェノールの分析

浄水場原水からはハロゲノフェノールは観察されなかったが，処理水と水道水からはブロモフェノール，ブロモクロロフェノールが観察された．得られたフラグメントグラムを Fig 1 に示す．

IV 考 察

IV—1. アミン類の N—クロリドは強い刺激臭をもつことが知られている[7]．したがって，アミンへの塩素添加により生成する刺激臭物質はN—クロルアミンと推定される．N—クロルアミンはアミンと遊離塩素との反応により生成し，酸性側ではその生成は遅く，アルカリ性側ではアミンは次亜塩素酸イオンにより酸化される．

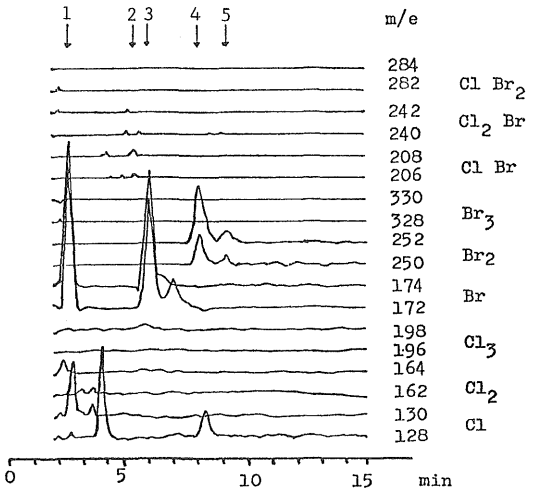


Fig. 1. Mass Fragmentgram of Household Tap Water.

1 : 2-Bromophenol
2 : Bromochlorophenol
3 : 4-Bromophenol
4 : 2, 4-Dibromophenol
5 : 2, 6-Dibromophenol

したがって中性領域で最大の生成をするものと思われる．N—クロルアミンは室温で徐々に分解していき，複雑な分解生成物とアミン塩酸塩を生成するものと思われる．アミン刺激臭物質の臭いき値は炭素数4から8の直鎖脂肪族アミンで著しく低濃度であり，直鎖脂肪酸も炭素数4から7の臭いき値が最も低濃度であることは匂いの科学として興味深い[7]．

IV—2. 原水中に微量のフェノールが含まれている場合，塩素化により著しく臭気が強まることは古くから知られている．Burttschell[6] は，クロロフェノールの臭いき値について詳しく報告している．しかし，都内の水道水中にはクロロフェノールはほとんど観察されず，ブロモフェノール，ブロモクロロフェノールが観察された．Beller[8] は，水の塩素処理によりエタノールからクロロホルム，ブロモクロロホルムの生成を報告している．森田[9] は，水道水中よりこれらの物質を検出し，実験室で生成機構を確認した．臭素源は河川水中に含まれる臭素イオンであると推定している．臭素イオンは塩素処理により容易に酸化され臭素となる．都内水道水中に観察されたブロモフェノール，ブロモクロロフェノールも同様の機構で生成したものと思われる．Dietzler[10] は，フェノール，クロロフェノールに塩化ブロムを作用させてこれらの物質の生成を報告している．実際に，フェノールを検出した河川水に次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して，一昼夜の後に抽出分析したところ，クロロフェノールにともなってブロモフェノール，ブロモクロロフェノールが生成した．都内水道水中からクロロフェノールがほとんど観察されなかったのは一見奇妙であり，充分な数の試料で追試する必要がある．

Table 3. Odor Threshold Concentrations of Bromophenols and Chlorophenols.

	TO ($\mu g/l$)
2-Bromophenol	2
4-Bromophenol	50
2, 4-Dibromophenol	6
2, 6-Dibromophenol	35
2-Chlorophenol	2
4-Chlorophenol	100
2, 4-Dichlorophenol	2

IV—3. ブロモフェノールの臭いき値についての報告は無かったので，クロロフェノールの臭いき値とともに測定し比較した．Table 3 に示すように，ブロモフェノールもクロロフェノールと同様に低濃度で刺激臭を発した．ブロモフェノールは数 ppb のレベルで観察されたものもあり，おいしくない水の原因物質の一つとなる可能性が高い．

V 結　論

水道水中の刺激臭物質の発生原因について検討し，特に，アミン，フェノール等の化学合成物質と塩素との反応により生成することが判明した．塩素処理は殺菌効果があり，浄水過程では欠くことの出来ない方法であるが，近年の様に有機物による河川の汚濁の進行とともに，塩素処理により有機塩素化合物が生成されることが究明されている[11,12]．森田は，水道水中からクロロホルムを検出した報告をしている．一方，最近 NCI[13]（米連邦ガン研究所）から，クロロホルムの発ガン性を示す動物実験結果が発表され，新たに社会的問題が提起されている．また，Jolley[12] は，2次処理水に塩素を添加して反応時間が45分で生成する塩素系有機化合物のうち17の物質を同定し定量している．そのうち，5—クロロウラシル，4—クロロレゾルシノール[14] は，0.001 mg/l のレベルで水に順化されていないこいの卵のふ化率が有意に減少したと報告している．塩素処理による生成物質の生物学的影響の評価は，今後究明されるべき課題であろう．

（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，研究の一部は日本公衆衛生学会第33回1974年10月，第34回1975年10月で発表した．）

文　献

1) G. V. ジェームズ著　内藤幸穂訳：水処理技術事典，34，1965，日本評論社

2) Adams, B. A.: *Water & Water Eng.*, **33**, 387, 1931

3) Barnhart, E. L. and G. R. Campbell: *Water Pollution Control Series*, Environmental Protection Agency, ORM Grant No. 12020 EXG, March, 1972

4) 西脇仁一，石橋多聞編：公害・衛生工学大系 II，234，1966，日本評論社

5) 吉田教授からの私信

6) Burttschell, R. M., A. A. Rosen, F. M. Middleton, and M. B. Ettinger: *J. A. W. W. A.*, **66**, 703, 1974

7) E. アムーア著　原俊昭訳：匂い ― その分子構造，135，1970，恒星社厚生閣版

8) Beller, T. A., J. J. Lichtenberg, and R. C. Kroner: *J. A. W. W. A.*, **66**, 703, 1974

9) 森田昌敏，三村秀一：東京都研究調整室　昭和49年度プロジェクト研究中間報告，64，1974

10) Dietzler, Andrew, Bradly, Kenneth B.: *Chem. Abst.*, 71, 49547, 1969

11) Glaze, W. H. and J. E. Henderson: *J. W. P. C. F.*, **47**, 2511, 1975

12) Jolley, R. L.: *J. W. P. C. F.*, **47**, 601, 1975

13) 朝日新聞：昭和51年6月10日付（夕刊）

14) Gehrs, C. W., L. D. Eyman, R. J. Jolley, and J. E. Thompson: *Nature*, **249**, 675, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1 316—320, 1976

PCB およびカネミライスオイル中のポリ塩素化ジベンゾフラン

中川順一*, 森田昌敏*, 秋山和幸**
樋口育子*, 三村秀一*

Polychlorinated Dibenzofurans in PCBs and Kanemi Rice Oil

JUNICHI NAKAGAWA*, MASATOSHI MORITA*, KAZUYUKI AKIYAMA**,
YASUKO HIGUCHI* and SHUICHI MIMURA*

Polychlorinated dibenzofurans were identified and determined by gaschromatography-mass spectrometry in PCB preparations and Kenemi Rice Oil. The concentration of PCDFs was highest in KC400 among all PCB Preparations examined. PCBs used in chemical factory as heat transfer agent had a higher level of PCDFs. Kanemi Rice Oil contained as much as 2.7 ppm of PCDFs. Heating PCBs at high temperature gave rise to a formation of PCDFs and the reaction was catalysed by transition metals. Possible formation mechanism of PCDFs is discussed.

はじめに

1968年10月に起ったカネミライスオイル事件は，米ぬか油の製造工程の一つである脱臭工程で熱媒体として使用していた PCB がパイプからもれ，食用油に混入したことが原因であると考えられている．患者の PCB 平均摂取量は，約2gであり 0.5gの非常に少ない量でも皮膚への症候は表われている．しかし，このレベルでの PCB 摂取は，動物を用いての毒性実験から考え，中毒症状が表われるにはあまりにも少ない量であると思われる．カネミライスによる発症に関し，倉恒[1]らはライスオイル中，およびカネミ中毒患者の肝臓に，ポリ塩素化ジベンゾフラン（以下，PCDF と略す）を検出し，本物質の寄与を指摘してきた．PCDF は，Vos ら[2]，および樫本ら[3]の実験から PCB よりはるかに強い毒性をもっている．また最近，Risebrough[4]，樫本[5]，倉恒[1]，並びに Roach ら[6]は，PCB 中に PCDF が含まれていることを報告している．我々は，カネミライス，および16の PCB 中の PCDF を分析し，またあわせて PCB の加熱による PCDF の生成諸条件を検討した．

実験の部

1. 試料

1—1. PCB サンプル

カネミライスオイル（カネミ倉庫株式会社）は，1968年2月12日に製造されたものを用いた．PCB として鐘ケ淵化学製カネクロール KC300, KC400, KC500, KC600，アメリカ Monsant 社製アロクロール T64, T241, T1242, T1248, T1254, T1260，ドイツ Bayer 社製クロフェン A30, A40, A50，フランス Prodelée 社製フェノクロール Dp4, Dp5, Dp6 を用いた．（いずれもロット番号は不明）またあわせて熱媒体として3年間使用した PCB（使用条件は不明）アロクロール T1248 についても分析を行った．

1—2. 加熱 PCB

PCB（アロクロール T1248）1gを内径 8 mm，長さ 200 mm のガラス封入管に封入し，一つは N_2, O_2，空気ふん囲気下 250°, 270°, 300°, 330° の温度条件下のもとに，3日，1週間，2週間，3週間加熱，一つは空気ふん囲気下で $CuCl_2$, $CoCl_2$, $FeCl_3$, $NiCl_2$, $CrCl_3$ 各 10 mg を添加したものを，1週間加熱，また N_2，空気ふん囲気下で水酸化ナトリウム 100 mg を添加し1週間加熱したものをつくり分析に供した．

2. 分析操作

2—1. フロリジルカラムクロマトグラフィー

PCB 1g をn-ヘキサン 2 ml に溶解しフロリジル（60–100 mesh, 650° 4時間活性）をつめたガラスカラム（内径 10 mm，高さ 300 mm）上部に吸着させ，次い

* 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
** 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

で n-ヘキサン 200 m*l*, 5% エーテル－ヘキサン混液50 m*l* で PCB を除去したのち，アセトン 100 m*l* で PCDF を溶出させる．アセトン区分を KD 濃縮器で5 m*l* にしたのち，窒素ガスふきつけにより 500 μl に濃縮した．

2—2. 測定条件

濃縮液はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー GC-MS（島津 LKB 9000）を用いて定量した．測定条件は下記に示す．カラム Dexil 2% Chromosorb WAW (100/200) 3 mm × 2 m, キャリヤーガス He 30 m*l*/min, イオン化電圧 70 eV, カラム温度 270°, インジェクション温度 300°, セパレーター温度 300°, イオン源温度 310°．マススペクトラは，コンピューターシステム（MS-PAC）により 2-18 分の間5秒間かくで取り，192 のマススペクトラを磁気テープおよびビジグラフ上に，また *m/e*: 270, 306, 340, 374, のマスナンバーをグラフ用紙にプロットし定量した．

結　　果

1. PCDF の回収率

最初に Vos はフロリジルカラムクロマトグラフィーのエーテル－ヘキサン区分から2つの PCDF を分離した．しかし，フロリジルカラムクロマトグラフィーにお

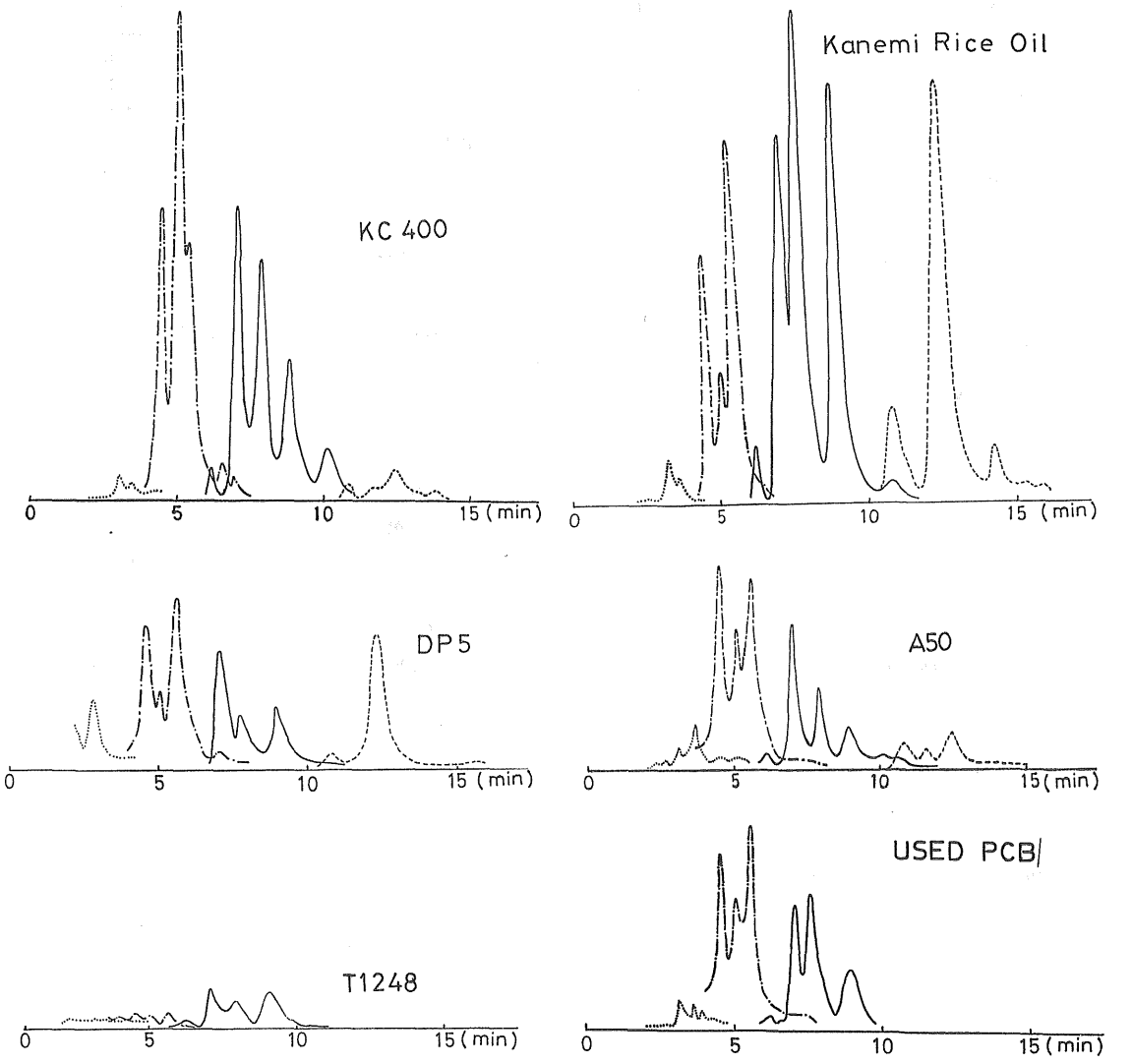


Fig. 1. Mass fragmentgrams of PCDFs in Kanemi Rice Oil and commercial PCBs
····· Tri-CDF　—·—·— Tetra-CDF　——— Penta-CDF

Table 1. PCDFs concentration in Kanemi Rice Oil and PCB samples (ppm)

	Tri-	Tetra-	Penta-	Hexa-	Total
Kanemi Rice Oil	0.02	0.52	1.33	0.81	2.68
DP4	—	1.7	1.6	0.5	3.8
DP5	—	4.6	2.7	2.6	9.9
DP6	0.2	2.1	2.6	5.6	10.3
KC300	—	6.7	1.6	—	8.3
KC400	0.3	12.2	10.4	0.9	23.8
KC500	0.2	1.7	1.1	3.1	6.1
KC600	—	0.2	0.5	0.4	1.1
T64	—	4.8	9.4	2.0	16.2
T241	—	2.4	2.7	0.8	5.9
T1242	—	2.3	2.2	—	4.5
T1248	—	0.5	2.3	—	2.8
T1248*	0.3	5.8	5.6	0.7	12.4
T1254	—	0.1	3.6	1.9	5.6
T1260	—	0.8	0.9	0.5	2.2
A30	1.6	2.3	1.0	—	4.9
A40	1.5	5.4	6.9	—	13.8
A50	0.7	8.3	4.1	1.8	14.9

* used PCB

Table 2. PCDFs concentration in PCB after heating at 300°C

	N_2	Air	O_2
3 days	1.3, 2.1 ppm	1.3, 1.9 ppm	(1.4), (1.7) ppm
1 week	2.1	81.7, 1.8	3.3
2 weeks	0.9	36.8	3.0
3 weeks	1.1		1.9

いて PCDF が低レベルである場合 (<0.05 μg/g フロリジル), この方法では PCB の分離が不完全で, しかも PCDF の回収率はよくない. 一方アセトン溶出法では低レベルの PCDF であっても 90%以上の高い回収率を得ることができた.

2. PCB 中の PCDF 濃度

PCB 中の PCDF の測定値を Table 1, PCDF のマスフラグメントグラムを Fig. 1 に示す. カネミライスオイル中の PCDF 組成は, KC 400 ともいくぶん異なっており, また PCB シリーズ中では KC 400 の PCDF 濃度が一番高い値であった.

3. PCB から PCDF の生成条件

3—1. N_2, O_2, 空気のふん囲気下で 300° の温度条件のもとで加熱したものを一定時間後とり出し分析した結果を Table 2 に示す. この結果より, N_2 ふん囲気下では PCDF の増加は認められず, 空気ふん囲気下では 2 週間目のものに著しい増加を認めた. そして O_2 ふん囲気下では, 1 週間目に著しく増加したものと多少の増加をみたものの両方が測定された. O_2, または空気ふん囲気下で加熱したものは, 褐色, または黒色に変色すると同時に, 塩酸ガスの生成が観察された. またアセトン区分よりポリ塩素化ビフェニロールが, GC-MS 上で検出された.

3—2. PCB に金属を添加し空気ふん囲気下で加熱した結果を Table 3 に示す. これらのうち Cu, 並びに $FeCl_3$, 240°, 2 時間と表記したものは, 封管したものではなくコンデンサーをつけ加熱したものであるが, 明らかに封管したものと比べて PCDF は増加している.

3—3. Fig. 2 に PCB を N_2 ふん囲気下で, NaOH を添加したものと, 並びに O_2 ふん囲気下のものを 270° で 1 週間加熱したもののマスフラグメントパターンを示した. 明らかに, この二つの間にはトリ, テトラで相異があり, 異なる PCDF 生成メカニズムを示唆している.

考　察

カネミライスオイル中の PCDF について, 倉恒らは 5 ppm, また宮田らは 1.6 ppm であったと報告している. さらに我々の測定値は 2.7 ppm であった. 倉恒

Table 3. Effect of metals or metals ions on PCDFs formation through the heating PCBs under the presence of air

Metal	Temp. (°C)	Hours	Tri- (ppm)	Tetra- (ppm)	Penta- (ppm)	Total (ppm)
Nil	270	168	0.9	0.9	0.7	2.5
$FeCl_3$	220	48	1.6	1.6	1.1	4.3
	240	2	1.6	10.0	1.3	21.9
	250	48	2.3	1.8	1.7	5.8
	270	168	*	3.0	0.7	*
$CuCl_2$	270	168	0.6	1.1	1.0	2.7
$NiCl_2$	270	168	0.4	1.1	0.9	2.4
$CoCl_2$	270	168	0.3	4.9	0.4	5.6
$CrCl_3$	220	48	0.1	0.6	0.3	1.0
Copper	240	2	5.2	5.4	1.2	11.8

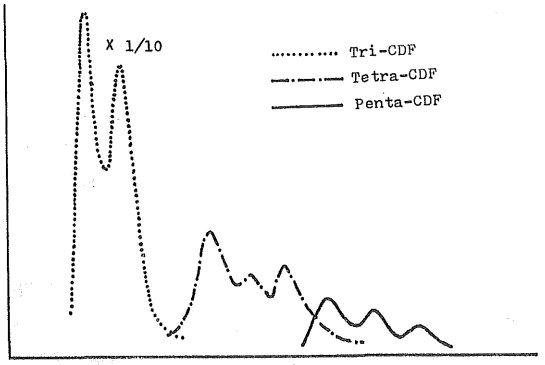


Fig. 2-1. Gaschromatogram of PCDFs formed through the reaction of PCBs with NaOH at 270°C in nitrogen

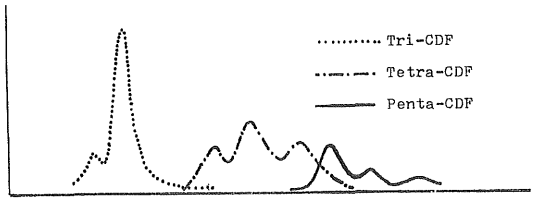


Fig. 2-2. Gaschromatogram of PCDFs in PCBs heated for 1 week at 270°C in O_2 atmosphere

ら，宮田らの分析法は，フロリジルカラムクロマトを行ったのち，さらにアルミナカラムを用い ECD 付 GC で分析する方法である．しかしこの方法では GC 上クロルナフタレン，および PCB のピークが主要な PCDF のピークに重なり誤差が生ずる欠点がある．ライスオイル中の PCDF は異常に高く PCB 248 ppm に対し PCDF は 2.7 ppm であり PCB と PCDF の比は 90：1 である．この割合はライスオイルに混入した熱媒体 KC 400 の PCB 対 PCDF の比の約 450 倍と非常に大きい．この原因はたまたま試料とした KC400 に異常に高く含有されていたか，または熱媒体として使用中に生成したという二つのことが考えられる．PCB の加熱実験において，Table 2 の結果は PCDF 生成のためには酸素が必要であることを示している．しかし，3 週間の加熱では PCDF が余り高くない．この要因として長時間加熱は PCDF を再分解する可能性が考えられる．またカネミライスオイル事件の熱媒体がステンレスパイプからもれたということと，および酸素化あるいは自動酸化反応では，せん移金属が解媒作用をもつことを考え合わせ，金属存在下での PCDF の生成を試みた．Table 3 の結果から明らかなように PCDF の生成には，金属イオンが有効な触媒として働いている．また封管した状態では，酸素と PCB のモル比が 1：8 であることを考慮し，コンデンサーをつけ酸素が十分にある条件下で行なった結果は加熱前の約10倍の PCDF が生成した．PCB 中に PCDF が存在する理由の一つとして，PCB の製造過程すなわち NaOH を添加して行なう蒸留工程において生成すると考えられている．Fig. 2-1 と 2-2 の結果より PCDF 生成メカニズムは異なる．Fig. 3 に O_2 ふん囲気下と NaOH 添加の条件下でのそれぞれ生成メカニズムを示す．NaOH を添加して加熱した場合，まず典型的な求核置換反応が起り，ヒドロキシルイオンがオルト位のクロルと置換し塩素化ビフェニロールができる．次いで塩基により脱塩酸し閉環する．この反応の場合，塩素数の多いほどオルト位のクロルは脱離しやすく，またクロルがパラ位にある場合の方が電子吸引性が強いためオルト位のクロルは脱離しやすいことが知られている．以上のことを考え合わせ PCDF 誘導体は，3 の位置にクロルをもつ PCDF が主組成を

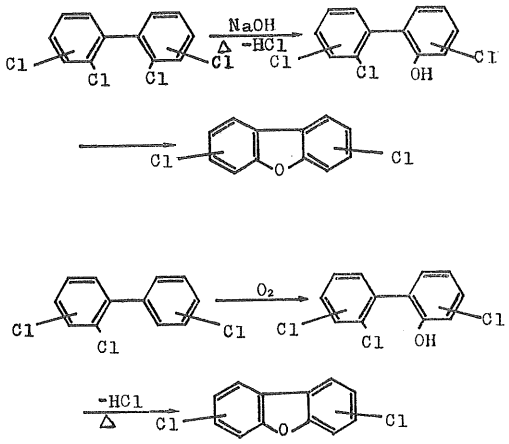


Fig. 3. Posturated mechanism of PCDFs formation through heating PCBs with NaOH or in air

成しているのではないかと考えられる．加熱実験に用いた PCB (T1248) は，4塩化のものが主で次に3塩化，5塩化が多く含まれているが，以上のことから PCDF の生成に際しては，6塩化，5塩化のものが多く反応しトリ，テトラの PCDF が増加している Fig. 2 のマスフラグメントパターンが得られたと考える．しかしこの反応はもっと複雑な系で起っており，さらに PCDF の生成メカニズムを解明するためには，位置のきまっている PCB からの加熱実験を今後検討する必要があるだろう．

謝辞 本研究にあたりカネミライスオイルを提供下さった大阪府立公衆衛生研究所の宮田秀明研究員に感謝いたします．

（本研究の一部は公衆衛生学会第34回1975年10月および食品衛生学会第31回1976年5月で発表した．）

文　献

1) 長山淳哉，増田義人，倉恒　徳：日本衛生学会誌，**30**, 123, 1975
2) Vos, J.G., J.H. Koeman, H.L. van der Mass, M.C. ten Noever de Brauw, and R.H. de vos: *Food Cosmet. Toxicol.* **8**, 625, 1970
3) 宮田秀明，中村彰夫，樫本隆：大阪府立公衆衛生研究所，研究報告，食品衛生編，第10号，9, 1972
4) Bowes, G.W., M.J. Mulrihill, B.R. Simoneit, A.L. Burlingame, and R.W. Reisebrough: *Nature*, **256**, 305, 1975
5) Miyata, H., A. Nakamura, and T. Kashimoto: *Food Hygienic Society of Japan* **17**, 227, 1976
6) Roach, J.A.G. and I.H. Pomerantz: *Bull. of Environ. Contam. and Toxicol.* **12**, 338, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1 321—325, 1976

水中のフタル酸エステルの塩素化

高橋保雄*, 森田昌敏*, 山崎堅吉*
三村秀一*

Chlorination of Two Phthalic Acid Esters (DBP and DEHP) in Water

YASUO TAKAHASHI*, MASATOSHI MORITA*, KENKICHI YAMAZAKI*
and SHUICHI MIMURA*

Chlorination of two phthalic acid esters (DBP and DEHP) was investigated in dilute aqueous solution under low concentrations of chlorine. Two or three derivatives were produced through chlorination and one of them was a chlorinated phthalic acid ester which had one chlorine displaced the alkyl group of phthalic acid esters.

Chlorinated phthalic acid esters, however, were not detectable in tap water of Tokyo metropolitan area.

緒　言

近年，水道水及び水道原水中の有機物質に関する研究が報告されつつある．その有機物質の中でも特に，フタル酸エステルは水道水中に高レベル（数 ppb）で検出され，新しい環境汚染物質として認識され始めた[1]．

一方，水道の浄水処理過程における塩素処理により，しばしば毒性の高い難生分解性な有機塩素化合物を生成することが，いくつか報告[2]されている．

フタル酸エステルと塩素の反応については，児玉ら[3]は高濃度の塩素で反応させ，塩素誘導体が出来ること．Glaze ら[4]は下水の高塩素処理（塩素で 1000 ppm 程度）により，芳香環の塩素化されたフタル酸エステルの生成することが報告されている．しかし，その化学構造また，反応条件については全く解明されていない．

そこで，著者らは，水道水中に最もよく検出されているフタル酸ジブチル（以下 DBP と略す）フタル酸ジ-2-エチルヘキシル（以下 DEHP と略す）を用いて，浄水場における塩素処理法にもとづいて実験し，塩素誘導体の同定，生成する条件などについて検討したので，ここに報告する．

実験の部

I　試薬

n-ヘキサン（Malinekrot 残農用），硫酸（SSG），リン酸一水素ナトリウム，リン酸二水素カリウム（特級），次亜塩素酸ナトリウム，フタル酸ジブチル，フタル酸ジ-2-エチルヘキシル

II　機器

ガスクロマトグラフィー（以下 GC と略す）は島津 4BMPFE の機種を使用し，使用条件は以下の通り．カラム Dexsil 300 (3%) 2m×3ϕ，カラム温度 DBP 230° DEHP 255°，検出器温度 DBP 260° DEHP 285°，キャリヤーガス N_2，流速 55 ml/min，検出器 Ni^{63} を用いた ECD，レコーダー速度 10 mm/min

ガスクロマトグラフィーマススペクトロメーター（以下 GC-MS と略す）は島津 LKB9000 の機種を使用し，使用条件は以下の通り．カラム Dexsil 300 (3%) 2 m ×3ϕ，カラム温度 DBP 235° DEHP 260° セパレーター温度 DBP 260° DEHP 280°，キャリヤーガス He，流速 31 ml/min，加速電圧 70eV，イオン化室温度 310°

III　試験操作

III—1　フタル酸エステルから塩素処理により誘導される反応生成物の同定

DBP 1.50 ppm の溶液 400 ml に対し，0.5 規定のリン酸緩衝液 40 ml を加えて，pH 6.8 にし，更に，有効残留塩素 2800 ppm の次亜塩素酸ナトリウム 8 ml（有効残留塩素濃度 51 ppm）を添加し，これを室温で

* 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

一昼夜放置した．この溶液に 200 m*l* のヘキサンを加え，15分間振とう抽出し，この 8 *μl* を GC に注入した．DBP と塩素との反応生成物質が生成されたことを確認したのち，残りのヘキサン抽出液を 1 m*l* に濃縮して，その 15 *μl* を GC-MS に注入した．

DEHP については 1.27 ppm 溶液を使用して，上記操作を行った．

III—2 フタル酸エステルから塩素処理により誘導される反応生成物の生成条件

(1) 反応時間と生成物質量

DBP 1.50 ppm 溶液 1 *l* に 0.5 規定リン酸緩衝液 100 m*l* を加え，pH 6.8 にし，これを 25° の恒温槽に入れ，一昼夜放置した．この溶液から 100 m*l* を採取し，これを 50 m*l* のヘキサンで15分間振とう抽出した．これをブランク（0時間）とし，残りの溶液に有効残留塩素 2800 ppm の次亜塩素酸ナトリウム（25°に調整したもの）18 m*l* を加え，25° の恒温槽に入れ，この溶液を 4，8，24，48，58時間毎に 100 m*l* を採取し，それぞれ 50 m*l* のヘキサンで15分間振とう抽出する．各時間毎のヘキサン抽出液 8 *μl* を GC に注入した．

DEHP については 1.27 ppm の溶液を用いて，上記操作を行い，50 m*l* ヘキサン抽出液は 4 *μl* を GC に注入した．

(2) フタル酸エステル，次亜塩素酸ナトリウムの各濃度の変化と生成物質量

DBP 1.49 ppm, 0.298 ppm, 0.060 ppm 溶液 100 m*l* を各濃度別に 4 個ずつ作り，それぞれに 0.5 規定リン酸緩衝液 100 m*l* を加えて，pH 6.8 にし，次に各々に有効残留塩素 2800 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを 2.0 m*l*, 1.0 m*l*, 0.5 m*l*, 0.25 m*l* を加えて（有効残留塩素濃度 51 ppm, 25 ppm, 12 ppm, 6 ppm），これらを 25° の恒温槽に入れて，約60時間放置した．それぞれの DBP 溶液に 50 m*l* のヘキサンを加え，15分間振とう抽出した．反応生成物質量は DBP 誘導体の標準物質がない為，DBP の絶対濃度が同一量になるように GC に注入し，生成量を比較した．すなわち，DBP 1.49 ppm, 0.298 ppm 溶液の比較は，1.49 ppm の 50 m*l* のヘキサン抽出液 8 *μl*，0.298 ppm の 50 m*l* のヘキサン抽出液の10倍濃縮液 4 *μl* を GC に注入した．同様に，DBP 0.298 ppm, 0.060 ppm 溶液の比較は，0.298 ppm の 50 m*l* のヘキサン抽出液の10倍濃縮 2 *μl* を GC に，0.060 ppm の 50 m*l* のヘキサン抽出液の20倍濃縮液 5*μl* を GC に注入して行った．

DEHP についても，0.66 ppm, 0.264 ppm の溶液を用いて，上記と同様の操作を行い，0.66 ppm DEHP 溶液の 50 m*l* ヘキサン抽出液を 4 *μl*，0.264 ppm DEHP 溶液の 50 m*l* ヘキサン抽出液の 5 倍濃縮液を 2 *μl*，GC に注入して行った．

III—3 水道蛇口水における塩素化フタル酸エステルの検索

蛇口水 10 *l* にヘキサン 800 m*l* を加えて，20分間振とう抽出し，このヘキサン層を 2 m*l* まで濃縮した．ヘキサン層 2 m*l* を硫酸で20分間振とうし，硫酸処理を行い，この硫酸層を水（蒸留水をヘキサンで2回抽出し，フタル酸エステルを除いたもの）で2回洗滌した後，この硫酸層が全く発熱しないように冷却しながら，別に用意した冷水（フタル酸エステルを除いたもの）約 23 m*l* を加えた．この硫酸層にヘキサン 5 m*l* を加えて20分間振とう抽出し，ヘキサン層から 8 *μl* を GC に附した．

結果と考察

I 塩素化反応生成物の同定

(1) DBP の塩素処理反応生成物は，図1に示す如く，ガスクロマトグラム上に，DBP に引き続いて2本のピークが認められ，何らかの DBP 反応生成物が生成されていることが確認された．ピークBには GC-MS

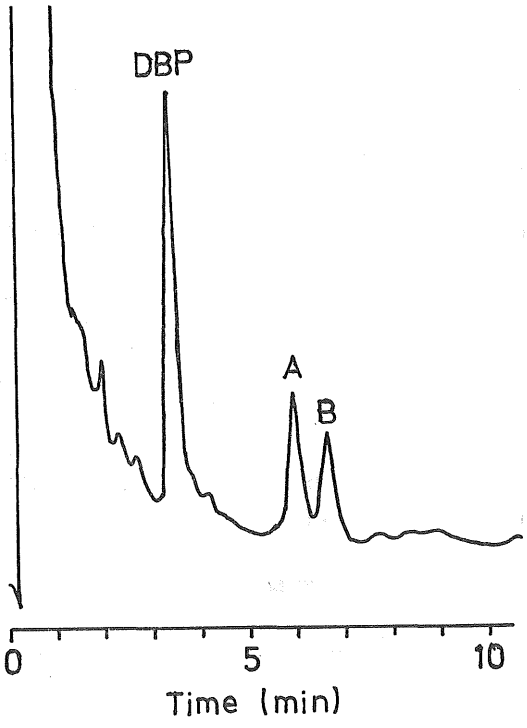


Fig. 1. Gas chromatogram of DBP chlorinated in water.

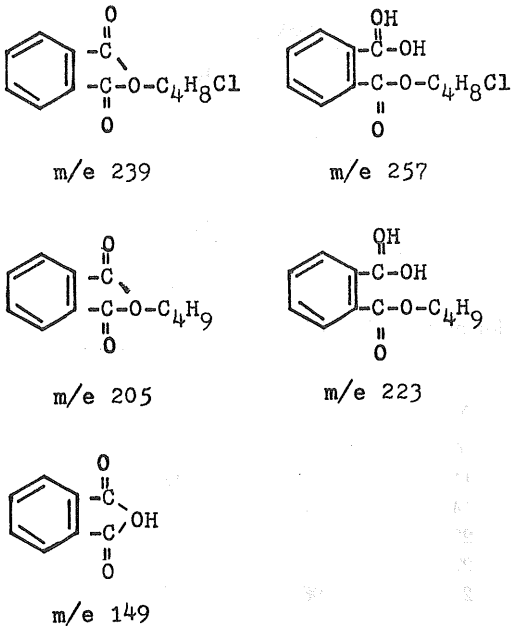


Fig. 2. Mass fragmentions of monochlorodibutyl phthalate.

による分析の結果，*m/e* 239, 241 及び *m/e* 257, 259 に相対強度 3：1のフラグメントイオンピークがみられ，このことは塩素が1個存在するということを示唆している．更に，DBP 骨格からくる *m/e* 149, 205, 223 のフラグメントイオンピークが確認できる．これらのフラグメントイオンピークは図2に示す化学構造物質と推定される．すなわち，ピークBは DBP と次亜塩素酸ナトリウムが反応し，DBP の側鎖アルキル基の水素の一つが塩素と置換した DBP 塩素化反応生成物であると推定される．ピークAには塩素が存在する時の特有のフラグメントイオンピークは存在しない．しかし，DBP 骨格からくるフラグメントイオンピーク *m/e* 149, 205, 223 は存在する．このことから，ピークAは塩素化されていない DBP 反応生成物，おそらく，酸化生成物と推定される．

(2) DEHP の塩素処理反応生成物は，図3に示す如く，ガスクロマトグラム上に，DEHP に引き続いて3本のピークが認められ，何らかの DEHP 反応生成物が生成されていることが確認された．GC-MS で分析した結果ピークYには *m/e* 313, 315, に相対強度比3：1のフラグメントイオンピークがみられ，これは塩素が1個存在することを示唆している．更に，DEHP 骨格から由来する *m/e* 149, 167, 279 のフラグメントイオンピークが確認できる．これらのフラグメントイオンピークは図4に示す化学構造物質と推定される．すなわち，ピークYは DEHP の側鎖アルキル基の水素の一つが塩素と置換した DEHP の塩素化反応生成物であると推定される．ピークX, Z には塩素が存在する時の特有のフラグメントイオンピークは存在しない．しかし，DEHP 骨格からくるフラグメントイオンピーク *m/e* 149, 167, 279 は存在する．このことから，ピークX, Zは DEHP の塩素化されていない反応生成物，おそらく，酸化生成物と推定される．

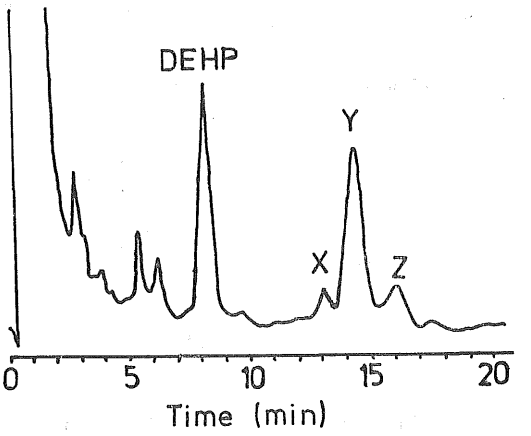


Fig. 3. Gas chromatogram of DEHP chlorinated in water.

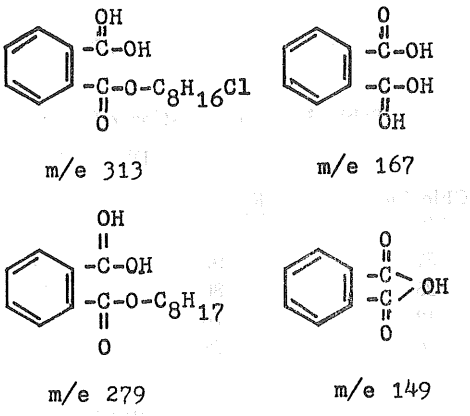


Fig. 4. Mass fragmentions of monochlorodi-2-ethylhexyl phthalate.

II フタル酸エステルの塩素化反応生成物の生成条件

(1) 反応時間と生成物質量

DBP, DEHP と次亜塩素酸ナトリウムの反応は表1，表2に示す如く，比較的ゆっくり反応し，約24時間で反

Table 1. Time course of chlorination of DBP.

Time (hour)	DBP (ppm)	Peak (mm) A	Peak (mm) B
0	1.50	0	0
4	1.48	18	10
8	1.42	21	14
24	1.42	30	22
48	1.42	33	25
58	1.43	29	24

Table 2. Time course of chlorination of DEHP.

Time (hour)	DEHP (ppm)	Peak (mm) X	Peak (mm) Y	Peak (mm) Z
0	1.27	0	0	0
4	1.24	11	49	12
8	1.11	14	74	17
24	0.91	22	96	26
48	0.86	27	107	31
58	0.78	27	96	33

Table 3. Concentration effect of DBP and chlorine on the formation of derivatives.

Chlorine (ppm)	DBP 1.49 ppm Residual DBP (mm)	Peak (mm) A	Peak (mm) B	DBP 0.298 ppm Residual DBP (mm)	Peak (mm) A	Peak (mm) B
51	97	34	24	—	—	—
25	80	44	24	84	47	35
12	76	48	27	77	45	30
6	78	56	23	81	52	29

Chlorine (ppm)	DBP 0.298 ppm Residual DBP (mm)	Peak (mm) A	Peak (mm) B	DBP 0.298 ppm Residual DBP (mm)	Peak (mm) A	Peak (mm) B
51	—	—	—	64	26	15
25	62	31	20	60	30	16
12	55	27	17	62	34	18
6	58	35	19	68	25	11

応生成物が一定値に達する．大部分の DBP は未反応のまま，すなわち，ごく一部の DBP が次亜塩素酸ナトリウムと反応しているにすぎない．しかし，DEHP の場合は半量近くが反応する．

(2) DBP, DEHP の各濃度の変化と生成量

DBP の濃度，次亜塩素酸ナトリウムの濃度を高くして反応させても，表3に示す如く，反応生成物量には明らかな影響が観察されなかった．また，くり返し実験を行った場合，反応生成物が確認されない場合もあり，今後の課題として，更に，追試する必要がある．

DEHP の場合においてはその濃度および次亜塩素酸ナトリウムの濃度を高くすると，反応生成物の量は明らかに増加する傾向を示している．

III 水道蛇口水中における塩素化フタル酸エステルの検索

DBP, DEHP の塩素化フタル酸エステルは検出されなかった．

結　論

水道蛇口水から，DBP, DEHP の塩素化反応生成物は検出されなかった．このことから，現在の河川のフタル

Table 4. Concentration effect of DEHP and chlorine on the formation of derivatives.

Chlorine (ppm)	DEHP 0.66 ppm				DEHP 0.264 ppm			
	Residual DEHP (mm)	Peak (mm) X	Y	Z	Residual DEHP (mm)	Peak (mm) X	Y	Z
51	55	10	39	9	58	3	17	6
25	57	6	22	7	45	3	16	6
12	62	2	11	2	52	3	16	5
6	57	2	16	5	52	3	9	4

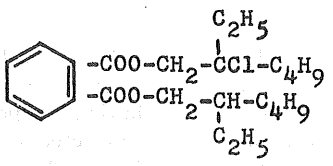


Fig. 5. Probable structure of monochlorodi-2-ethylhexyl phthalate.

酸エステル濃度レベル（数 ppb）では，現在浄水場で行う塩素処理量では，ほとんど生成されないものと考えられる．しかし，実験的には高濃度の DBP, DEHP と塩素の反応では塩素化フタル酸エステルが生成する．また，DEHP の方が DBP より塩素との反応が容易に進行することがわかった．

塩素化フタル酸エステルについては，DEHP では，側鎖アルキル基の枝分れしたところの水素が塩素と置換されたもの，図5であると推定される．一方，DBP では側鎖アルキル基のどの水素が塩素と置換されたかは解明できなかった．今後，核磁気共鳴装置を使用して検討する必要がある．

（本研究の概要は水道学会第26回金沢市大会1975年5月で発表した．）

文　献

1) 森田昌敏，中村弘，三村秀一：東京衛研年報，24, 351, 1972
2) Barnhart, E.L. and G.R. Campbell: *Water Pollution Control Series*, EPAORM Grant No. 12020 EXG, March, 1972
3) 児玉剛則，高井義治：公害と対策，10 (12), 1357, 1974
4) Glaze, W.H. and J.E. Henderson, IV.: *J. Water Pollut. Control Fed.*, 47 (10), 2511, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 326—331, 1976

水中微量アクリルアミドの定量法

中村 弘*, 三村秀一*

A Method for the Determination of Trace Acrylamide in Water

HIROSHI NAKAMURA* and SHUICHI MIMURA*

An improved method for the determination of residual acrylamide in water at levels likely to arise from the use of acrylamide polymers or copolymers in water treatment is proposed here. A water sample was brominated at least for 6 hours in a refrigerator after addition of pottasium bromide and bromine water, and the 2,3-dibromopropionamide obtained was extracted with ethyl acetate. The extract was determined by electron-capture gas chromatography using a column packed with Chromosorb W (AW-DMCS) coated with 15 per cent ethylene glycol succinate. As a replicated sample test, acrylamide dissolved in tap water at concentrations of 50, 5, 1 and 0.5 $\mu g/l$ was determined with relative standard deviation of 2, 2, 4 and 7 per cent, respectively.

For the sample waters containing little amount of acrylamide less than 1 $\mu g/l$ and the highly contaminated any interrupter, a florisil clean-up technique enabled them to be determined by electron-capture gas chromatography.

In this method, acrylamide in waters at the range of 0.0001-1 mg/l was determined with high recovery and very little interference.

緒　言

下水道工事に使われたアクリルアミド系地盤凝固剤が附近の井戸水に混入し，一家5人がアクリルアミド中毒にかかるという痛ましい事件が，昭和49年3月，福岡県に起った[1]．当時はこれらの地盤凝固剤が無制限に使われていたため，ほかにもアクリルアミドが井戸水に混入したり[2]，魚類被害を与えた事件[3]がみられた．その後，これらの事件が端緒となり，この毒性[1,4,5]の強いアクリルアミド系地盤凝固剤の使用は厳しく規制された[6]．

しかし，アクリルアミドは毒性の少ない[7]ポリマーあるいはコポリマーとして，下水処理，工場廃水処理，スラッヂ処理などに高分子凝集剤として使われるのを初めとして，土壌改良剤，繊維の改質および樹脂加工，紙力増強剤，接着剤などとしても使われ，我国における年産量も3万トン（1974年）に達している．

これら高分子凝集剤などとして使われるアクリルアミドポリマーおよびコポリマー中には，通常未反応のアクリルアミドモノマーが残留している．これらアクリルアミドモノマーは水に易溶性であるため，下水あるいは工場排水などと共に，環境中に流出することは当然考えられることであり，水道原水などに混入する恐れも十分にある．幸にして，我国においては水道の浄水処理にはその使用が認められていないが，英国，米国などでは浄水処理にも使われ，たとえば，英国においては，浄水中にアクリルアミドモノマーが平均で 0.25 $\mu g/l$ 以下，最大でも 0.5 $\mu g/l$ 以下となるようにその使用量が規制されている[9]．環境中に流出したアクリルアミドモノマーが速やかに分解するか否かは，今のところ明確ではないが[8,10]，少なくとも，現在の水道の浄水処理ではほとんど分解除去されないといわれる[8]．

水中の微量アクリルアミドの測定法については Croll らの報告[9]およびその追試報告[11,12]などがある．しかし，未だ定った測定法はなく，このため，関係方面からその確立が強く望まれている．筆者らは 1 mg/l 以下の微量の水中アクリルアミドの定量法，特に，臭素化後，ECD ガスクロマトグラフィーにより測定する方法について検討したところ，良好な結果が得られたので報告する．

実験方法

1. 装置および器具　1) ガスクロマトグラフ：ECD 付ガスクロマトグラフ（島津 GC-5A 型）

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

2) 冷蔵庫：庫内温度 3～10° のもの

3) クデルナ・ダニッシュ濃縮装置（以下KD濃縮装置と略す）

4) フロリジルクロマトカラム：内径 13 mm，長さ 300 mm，ガラス製

2. 試薬 1) 臭化カリウム：試薬特級 2) 臭素水：蒸留水に臭素を飽和させたもの 3) 酢酸エチル：試薬特級酢酸エチルを炭酸ナトリウム（5%）水溶液の等容および塩化カルシウム飽和水溶液で洗い，無水硫酸マグネシウムを加えて脱水したのち蒸留した．4) n-ヘキサン：残留農薬試験用（マリンクロット） 5) エチルアルコール，アセトン，ベンゼン：残留農薬試験用（和光純薬） 6) 無水硫酸マグネシウム：試薬，500° で2時間以上加熱した．7) アクリルアミド：電気泳動用アクリルアミド（和光純薬）をベンゼンより再結晶した．8) アクリルアミド標準液：アクリルアミドを蒸留水に溶かし，1.0 μg/m*l*, 0.1 μg/m*l* および 0.01 μg/m*l* のアクリルアミド標準液とした．9) 2,3-ジブロモプロピオンアミド（以下2,3-DBPAと略す）：アクリルアミドよりCroll らの方法[9]により合成し，融点（132°），元素分析（C 15.6%，H 2.17%，N 6.1%，Br 69.3%），マススペクトル（*m/e* 151, 149, 135, 133, 108, 106, 70, 44）などにより確認した．10) 2,3-DBPA 標準液：2,3-DBPA を酢酸エチルに溶かし，5～200 ng/m*l* の2,3-DBPA 標準液とした．11) フロリジル：フロリジン社製，130° で6時間加熱した．

3. 試験操作：アクリルアミドの臭素化：検水 100 m*l*（アクリルアミドとして 0.01～12 μg）を 200 m*l* ビーカーにとり，6規定硫酸を用いて pH 1.0 とし，これを 200 m*l* 共栓付三角フラスコに移し，臭化カリウム 30 g を加え完全に溶かす．次に，これに臭素水 5 m*l* を加えよくまぜ，冷蔵庫に入れ 6～24 時間放置する．

2) 2,3-DBPA の抽出：臭素化の終った溶液に1モルチオ硫酸ナトリウム溶液を加え過剰の臭素を分解したのち，300 m*l* 分液ロートに移し，酢酸エチル 50 m*l* ずつで3回抽出する．抽出液は合わせ無水硫酸マグネシウム約 5 g を加えて脱水する．

3) ガスクロマトグラフィーによる定量：脱水剤をろ別した酢酸エチル抽出液はKD 濃縮装置に入れ，2,3-DBPA 濃度として 5 ng/m*l* 以上となるように濃縮する．これを下記条件に設定したガスクロマトグラフに5 μ*l* 注入し，得られたガスクロマトグラムのピーク面積あるいはピーク高を測定する．同時に，2,3-DBPA 標準溶液から検量線を作成し，検水の濃縮溶媒中の 2,3-DBPA 濃度（*c*）を求める．検水中のアクリルアミド濃度（C）は次式により求める．

$$C(\mu g/l)=c\times\frac{b}{a}\times\frac{71}{231}\times\frac{100}{y}$$

a：検水量（m*l*） *b*：溶媒の濃縮量（m*l*）

c：溶媒中の 2,3-DBPA 濃度（ng/m*l*）

y：最終回収率（%）

なお，最終回収率が求めにくい試料では標準添加法による定量が有効である．

ガスクロマトグラフ条件：Column: 15% Ethylene glycol succinate on Chromosorb W(AW-DMCS), 80-100 mesh, glass on column, 3 mmφ (*i.d.*)×1 m (*l*). Detector: electron capture (^{3}H 300mCi or ^{63}Ni 10 mCi). Temperature: detector 220°(^{3}H), 250° (^{63}Ni), column 200° (^{3}H, ^{63}Ni), injection port 210° (^{3}H), 230° (^{63}Ni). Carrier gas: N_2 35 m*l*/min.

4) フロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリンアップ：検水中のアクリルアミド濃度が 1 μg/*l* 以下あるいは上記方法で妨害ピークの多い場合はクリンアップ操作を必要とする．クリンアップ操作は次の二つの方法が可能である．

A法：(1) 酢酸エチル抽出液をKD濃縮装置に入れ，酢酸エチルを留去したのち，残留物を n-ヘキサン約 50 m*l* に溶解する．(2)予め活性化したフロリジル 10 g を n-ヘキサンに懸濁させクロマトカラムに充填し，これに n-ヘキサン溶液を加え，過剰の n-ヘキサンは流す．(3) エチルアルコール・n-ヘキサン（1：49）混液 100 m*l* を流速 5 m*l*/min で流したのち，エチルアルコール・n-ヘキサン（1：4）混液 100 m*l* で溶離する．(4)溶離液をKD濃縮装置に入れ濃縮する．

B法：(1)酢酸エチル抽出液の酢酸エチルを留去したのち，残留物をベンゼンに溶解する．(2)ベンゼンに懸濁したフロリジル 10 g をカラムに充填し，(1) のベンゼン転溶液を加え，過剰のベンゼンは流す．(3)アセトン・ベンゼン（1：19）混液 100 m*l* を流速 5 m*l*/min で流したのち，アセトン・ベンゼン（2：3）混液 100 m*l* で溶離する．(4)溶離液を濃縮する．

結果および考察

1. 臭素化法の検討：アクリルアミドを臭素化する方法は Croll ら[9]が紫外線照射下に臭素水を作用することを試み，その後，いくつかの追試報告[11,12]がある．また，深町ら[13]は塩酸酸性下で臭化カリウムおよび臭素酸カリウムを加えて臭素化を行なっている．しかし，いずれの方法も臭素化率が悪く約60%程度である．特に，紫外線照射による方法は妨害イオンが多く(Table 2)，汚

Table 1. Effects of pH on the bromination of acrylamide

pH	Recovery of acrylamide as 2,3-dibromopropionamide (%)
1	91
2	89
5	60
10	31

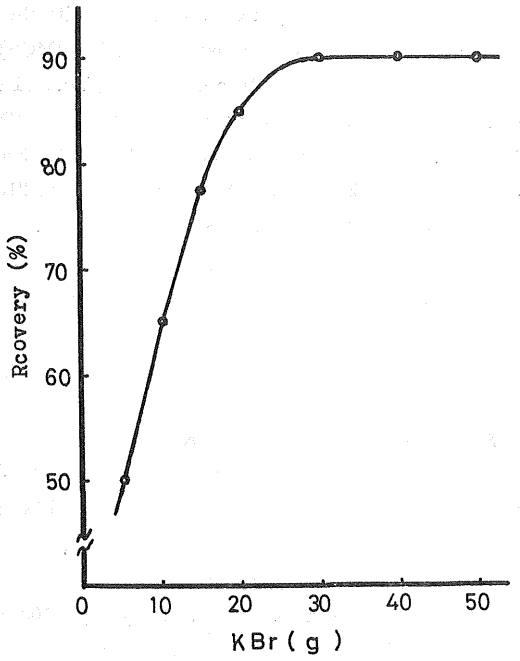


Fig. 1. Effect of pottasium bromide amount on the bromination of acrylamide

濁水，海水など[10]では測定が困難であった．筆者らは多量の臭化カリウムの存在のもとで臭素水を反応させる方法[14]について，pH，臭化カリウム量，反応時間，温度および妨害イオンなどについて検討した．pH は Table 1 に示すように 1.0 が最もよく，臭化カリウム量は検水 100 m*l* に対し 30 g 以上で最高の収率を示した (Fig. 1)．また，反応時間は冷蔵庫内では 6 時間以上がよく (Fig. 2)，反応温度は 50° までは温度の高いほど短時間で臭素化される傾向を示した．しかし，できるだけ反応条件を一定にするため，冷蔵庫中に放置する方法を選んだ．急を要する場合には 50° で 1 時間反応させる方法も可能である．

妨害イオンによる影響はこの方法では比較的少なく，紫外線照射法で認められた塩素イオン，アンモニウムイオン，亜硝酸イオンなどでの妨害はほとんど認められなかった．しかし，亜硫酸イオンではやや妨害が認められた (Table 2)．しかし，この妨害は検水をイオン交換樹脂 (アンバーライト IRA-400) に通すことにより除くことができた．

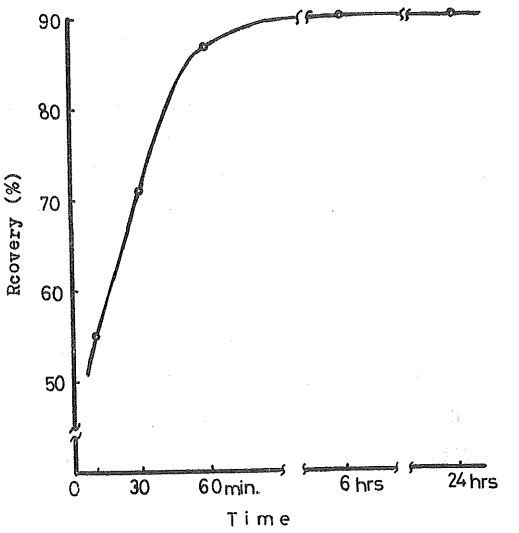


Fig. 2. Effect of time in a refrigerator on the bromination of acrylamide

2. 2,3-DBPA の抽出：Croll ら[9] は 2,3-DBPA の抽出溶媒として酢酸エチルについて検討し，抽出率はよいが妨害物が多いという理由でジエチルエーテルを使用している．しかし，酢酸エチルは蒸留精製することにより，妨害物のほとんどを除くことができ，また，臭素化の終った溶液をそのまま，pH 調整なしに抽出できる利点がある．すなわち，pH 1.0 で酢酸エチル 50 m*l* ずつで 3 回抽出することにより，2,3-DBPA のほぼ 100 %が抽出できた．なお，抽出溶媒の脱水剤には，高温加熱により不純物の除去可能な無水硫酸マグネシウムを使用した．

3. ガスクロマトグラフカラム充填剤の検討：2,3-DBPA 検出用のカラム充填剤の液相には主として FFAP (10%) が用いられているが[9,11-13]，試薬，溶媒，ポリエチレン容器あるいはろ紙などから，2,3-DBPA とほとんど同じ保持時間をもつ物質が認められ，試薬および溶媒の精製，使用器具の洗浄などに格別の注意が必要であった．そこで，Table 3 に示すカラム充填剤液相 5 種について，2,3-DBPA に対する感度および妨害物質について調べた．その結果，15% EGS が 2,3-DBPA に対する感度および試薬，溶媒などからの妨害物質との分離

Table 2. Interference ions on the bromination of acrylamide (Compared with ultraviolet irradiation method[9])

Interference ions*	Amount added (mg/l)	Peak height ratio on gaschromatograms	
		$KBr+Br_2$ Method	$UV+Br_2$ Method
—	—	1.00	1.00
Cl^- (as NaCl)	1,000	0.99	0.05
NO_2^- (as $NaNO_2$)	100	1.01	0.02
SO_3^{--}(as Na_2SO_3)	1,000	0.81	0.78
$S_2O_3^{--}$(as $Na_2S_2O_3$)	1,000	0.98	—
NH_4^+ (as $(NH_4)_2SO_4$)	100	1.00	0.05
Linear alkylbenzene sulfonate (LAS)	10	0.98	—

* All samples contain 50 μg/l of acrylamide

Table 3. Comparison of gas chromatographic column packings on the detection of 2,3-dibromopropionamide

Liquid phase*		Sensitivity for 2,3-DBPA	Interference**
Neopentyl glycol succinate (NPGS)	15%	Low	−
Tween 60	15%	Low	−
Butane 1,4-diol succinate (BDS)	3%	High	(+)
Free fatty acid polyester (FFAP)	10%	High	(+)
Ethylene glycol succinate (EGS)	15%	High	(−)

* On Chromosorb W (AW-DMCS), 80–100 mesh

** Interference based on same retention time substances from reagents, solvents, plastic materials and filter papers

がよく，2,3-DBPA の測定には最も適当であった．

4. クリンアップ法の検討：n-ヘキサン 50 ml およびベンゼン 50 ml にそれぞれ 2,3-DBPA 2.5 μg を溶解し，130° で活性化したフロリジル 10 g をつめたカラムに通したところ，いずれも，2,3-DBPA がフロリジルに完全に吸着された．よって，脱着溶媒として次の三つの溶離液について検討したところ，それぞれ下記の割合の洗浄液，溶離液が有効であった．

(1) ジエチルエーテル・n-ヘキサン (1：4) 混液 250 ml による洗浄後，同 (1：1) 混液 200 ml による溶離

(2) エチルアルコール・n-ヘキサン (1：49) 混液 100 ml による洗浄後，同 (1：4) 混液 100 ml による溶離

(3) アセトン・ベンゼン (1：19) 混液 100 ml による洗浄後，同 (2：3) 混液 100 ml による溶離

(1) については 130° で活性化したフロリジルでは溶離が困難であったので，70° で活性化したフロリジルを使用した．しかし，テーリングが認められ，回収率も 85% にとどまった．(2)および(3)においては 2,3-DBPA の分離がよく，いずれも回収率はほぼ 100% を示した．

Fig. 3 にその溶離パターンを示す．いずれの方法においても，洗浄過程において，油脂類およびフタル酸エステル (DOP, DBP) などはほぼ完全に除去できた．なお，n-ヘキサンおよびベンゼンに対する 2,3-DBPA の溶解度 (20°) はそれぞれおよそ 0.02 g/l および 2.0 g/l であるので，特に，n-ヘキサンに転溶する場合には注意を要する．

Fig. 4 に工場廃水 100 ml にアクリルアミド 0.05 μg を添加し (0.5 μg/l)，臭素化後，酢酸エチル抽出およびA法によるクリンアップを行ない，1 ml に濃縮した試料のガスクロマトグラムを示す．

5. 回収率：水道水にアクリルアミドをそれぞれ50, 5, 1 および 0.5 μg/l となるように加えた試料について回収率を求めた．結果は 1 μg/l 以上で約 90% を示し，1 μg/l 以下ではやや回収率が低下し 0.5 μg/l で 80% を示した (Table 4)．

6. 河川水，下水および工場排水中のアクリルアミド：上記方法で多摩川，中川の表流水および都内三下水処理場における流入水および放流水ならびにポリアクリルアミド製造工場および製紙工場の排水についてアクリルアミドの測定を行なった．結果を Table 5 に示す．河

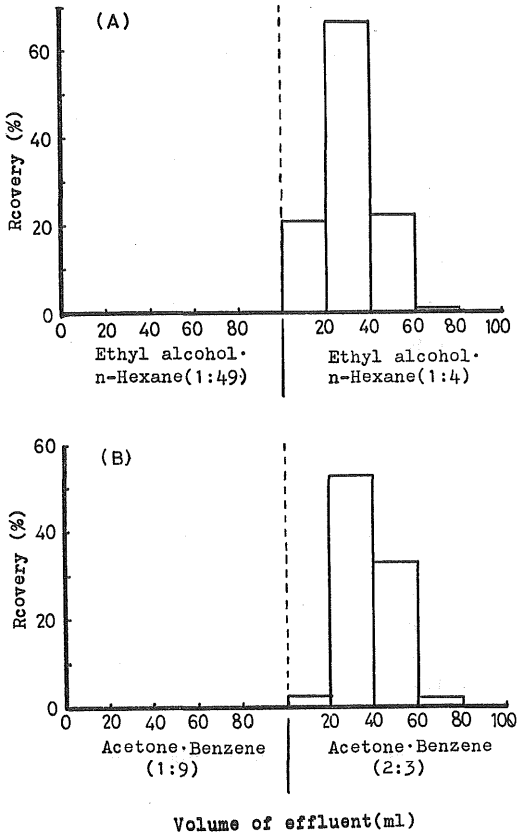


Fig. 3. Elution patterns of 2,3-dibromopropionamide from florisil column

川水および下水からは検出限界の 0.1 μg/l 以上のアクリルアミドは検出されなかった.

要　約

水中の微量（1 mg/l 以下）のアクリルアミドの定量法について検討した. pH 1.0 に調整した検水に多量の臭化カリウムを加えて溶解したのち，臭素水を加えて6時間以上冷蔵庫中に放置した. この操作により，検水中のアクリルアミドの約 90%が 2,3-DBPA に臭素化された. 次に過剰の臭素を分解し，酢酸エチルで抽出したのち，これを ECD ガスクロマトグラフィーにより定量した. 検水中のアクリルアミド濃度が 1 μg/l 以下の場合あるいは下水，工場廃水など汚濁水中のアクリルアミドを測定する場合には，酢酸エチル抽出液をフロリジルによりクリンアップする必要があった. フロリジルに吸着した 2,3-DBPA の溶離にはエチルアルコール・n-ヘキサン（1：49）混液による洗浄後，同（1：4）混液による溶離あるいはアセトン・ベンゼン（1：19）混液による洗浄後，同（2：3）混液による溶離が有効であった. また，ガスクロマトグラフィーにおけるカラム充填剤には 15% EGS on Chromosorb W (AW, DMCS) が試薬，溶媒などに含まれる不純物による妨害が少なく，かつ，2,3-DBPA に対する感度も高いことから最も適当と思われた.

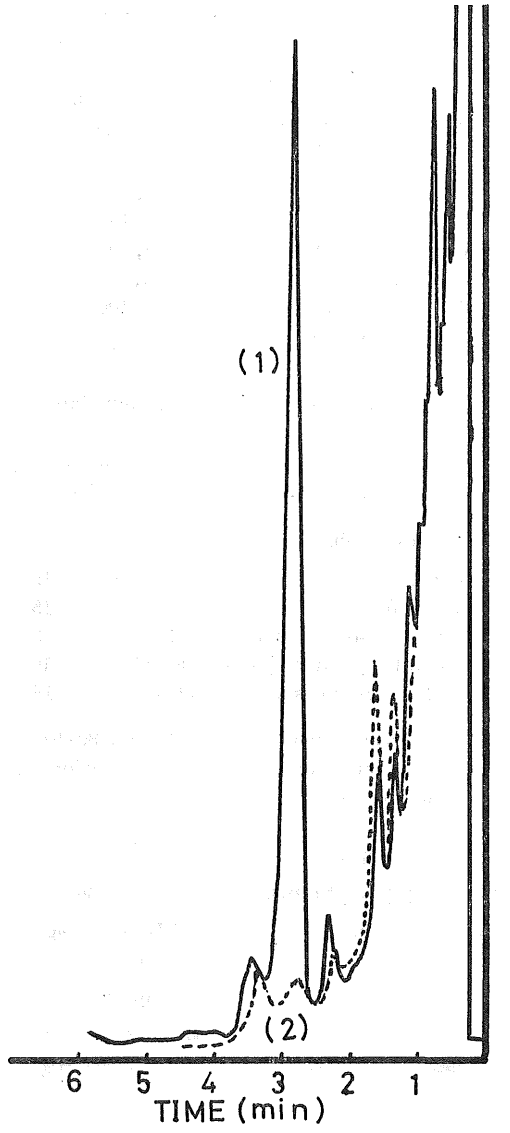


Fig. 4. Gas chromatograms of 2,3-dibromopropionamide after florisil clean-up
(1) Industrial effluent +0.5 μg/l acrylamide
(2) Industrial effluent blank

（本研究の概要は第34回日本公衆衛生学会総会昭和50年10月に発表した.）

Table 4. Recoveries of acrylamide as 2, 3-dibromopropionamide

Acrylamide concentration added to tap water ($\mu g/l$)	Recovery of acrylamide as 2, 3-dibromopropionamide (%)	Relative standard deviation (%)
50	91	2
5	89	2
1	87	4
0.5	80	7

Table 5. Acrylamide concentrations in some river waters, sewages and industrial effluents

Sample	Acrylamide concentration ($\mu g/l$)
Naka river (Nakagawa-bridge)	0.0
Tama river (Tamasuido-bridge)	0.0
Sewage (Morigasaki plant, influent)	0.0
(Morigasaki plant, effluent)	0.0
(Mikawashima plant, influent)	0.0
(Mikawashima plant, effluent)	0.0
(Shibaura plant, influent)	0.0
(Shibaura plant, effluent)	0.0
Industrial effluent	
(Polyacrylamide manuf.)	110
(Polyacrylamide manuf.)	6.3
(Paper mill)	0.0

Detection limit 0.1 $\mu g/l$

文　献

1) 福岡県衛生公害センター：アクリルアミドによる環境汚染および毒性に関する研究，153 pp. 1975
2) 都立衛生研究所：未発表
3) 中村有治：水，17 (9)，16，1975
4) McCollister, D.D., F. Oxen, and V.K. Rowe: *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, **6**, 172, 1964
5) Kurperman, A. S. : *Jour. pharmacol. Exp. Therap.*, **123**, 180, 1958
6) 建設省：薬液注入工法による建設工事の施行に関する暫定指針について，建設省官技発第160号，1974
7) McCollister, D.D., *et al.*: *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, **7**, 639, 1965
8) Croll, B.T., G.M. Arkell, and R.P.J. Hodge: *Warter Research*, **8**, 989, 1974
9) Croll, B.T. and G.M. Simkins: *Analyst*, **97**, 281, 1972
10) 有満秀信，池袋逸人，熱渡巌：水道協会雑誌，**487**，31，1975
11) 有満秀信：水道協会雑誌，**473**，10，1974
12) 針間矢研二，有本敏之：第25回全国水道研究発表会講演集，225，1974
13) 深町和美，江崎義憲，森本昌宏ほか：第12回全国衛生化学技術者協議会講演要旨，51，1975
14) 北九州市衛生研究所：投稿中

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 332—334, 1976

陸水中の微量オルトリン酸の分析法

岡 本 寛*, 土 屋 悦 輝*, 山 崎 堅 吉*, 三 村 秀 一*

Micro-determination of Orthophosphate in Inland Water

YUTAKA OKAMOTO*, YOSHITERU TSUCHIYA*,
KENKICHI YAMAZAKI* and SHUICHI MIMURA*

A micro-determination of orthophosphate was improved in order to apply for the trace amount of orthophosphate in inland water. The method involves the extraction of phosphomolybdate by organic solvent and colorimetry by thiocyanate complex of molybdenum (V), The best conditions were studied for high recovery and low interference.

The optimum conditions of hydrochloric acid and ammonium molybdate for the extraction were found to be 0.75N and 0.2%, respectively. The following concomitant ions were found not to interfere the determination within the concentrations: 3,000 ppm of Na^+, 1,000 ppm of K^+, 200 ppm of Ca^{2+}, 100 ppm of Mg^{2+}, 25 ppm of Fe^{3+}, 10 ppm of F^- 5,000 ppm of Cl^-, 250 ppm of NO_3^-, 5 ppm of NO_2^-, 30 ppm of SiO_3^{2-}, 0.1 ppm of As^{5+}.

Sensitivity by this method was improved by twenty times than the ordinary method of molybdenum blue extraction.

緒　　言

現在，自然水域の富栄養化は水質公害のなかでも最も重大な問題の一つであり，湖沼に限らず，河川，貯水池，河口水域でも起こりつつある．このような状況下で，藻類生産の制限因子の一つである微量のオルトリン酸イオンの分析法の確立が必要である[1]．従来，オルトリン酸イオンの定量方法として，黄色のモリブドリン酸を吸光光度法で測定する方法，モリブドリン酸を溶媒で抽出し，その紫外部吸収によって測定する方法[2]，モリブドリン酸を溶媒で抽出し，有機層を洗浄後，アルカリ性の緩衝液でモリブデンを水層に逆抽出し，モリブデン酸イオンの紫外部吸収を 230 nm で測定する方法[3]，黄色のバナドモリブドリン酸を吸光光度法で測定する方法[4]，モリブドリン酸の還元生成物を吸光光度法で測定する方法，又はその還元生成物を有機溶媒で抽出し，吸光光度法で測定する方法などがあるが，いずれも感度が低く，微量のオルトリン酸の分析法としては不適当である．

著者らは K. Sugawara らにより研究された，モリブドリン酸を n-ブタノール—クロロホルム混合溶媒で抽出し，有機層を洗浄後，分解してモリブデンをチオシアン酸錯体として比色する方法[5]を検討，改良して，河川水，湖沼水の微量オルトリン酸イオンの定量に応用したところ，定量性，感度いずれにおいても良好な結果が得られたので報告する．

実 験 の 部

1. 試薬　塩酸，n-ブタノール：脱水後蒸留，クロロホルム：希水酸化ナトリウム溶液で洗浄，脱水後蒸留，n-ブタノール—クロロホルム混合溶媒：n-ブタノール3容をクロロホルム7容に加える，10%モリブデン酸アンモニウム溶液，洗浄液：塩酸 66 m*l* に水を加えて全量を 1 *l* とし，n-ブタノール 60 m*l* を加えて混合，1 N 水酸化ナトリウム溶液，硫酸 (1+1)，(0.3%) 過マンガン酸カリウム溶液，過酸化水素水 (1+10)，塩酸 (1+1)，硫酸第一鉄アンモニウム溶液：硫酸第一鉄アンモニウム（6水塩）7 g を硫酸 (1+1) 1 m*l* と水に溶かして 100 m*l* とする，20%チオシアン酸カリウム溶液，塩化第一スズ溶液：塩化第一スズ（2水塩）12 g を塩酸 20 m*l* に溶かし，水で 100 m*l* とし，金属スズを入れ，かっ色びん中に保存，酢酸 n-ブチル，リン酸標準

* 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

原液：105° で乾燥したリン酸一カリウム 1.432 g をとり，水で 1 l とする．なお試薬は特にことわりのないかぎり特級を用いた．

2. **定量方法**　検水 250 ml (PO_4^{3-} として 0.25～2.0 μg 含む）を 500 ml の分液ロートにとり，塩酸 18 ml, n-ブタノール 15 ml, 混合溶媒 10 ml を加えて 1 分間振とうする．静置して 2 層に分離したのち，溶媒層を捨て，モリブデン酸アンモニウム溶液 5.5 ml を加えて振り混ぜ10分間静置し，混合溶媒 15 ml, 10 ml で 2 回，2 分間ずつ振とう，抽出し，溶媒層を 100 ml の分液ロートに移す．洗浄液 50 ml を加え 1 分間振とうし，静置し 2 層に分離したのち，溶媒層を他の 100 ml の分液ロートに移し，洗浄をさらに 1 回くりかえす．溶媒層をさらに他の 100 ml の分液ロートに移し，水酸化ナトリウム溶液 25 ml を加え 1 分間振とうし，15分間静置する．溶媒層を捨て，水層を 100 ml のビーカーに移し，硫酸 (1+1) 5 ml を加え，赤外ランプで溶媒を蒸発させたのち，過マンガン酸カリウム溶液を滴加し，加熱して酸化する．これに過酸化水素水を添加して過マンガン酸イオンおよびマンガンの酸化物を分解し，引きつづき加熱して，過剰の過酸化水素を分解する．冷後 100 ml の分液ロートに移し入れ，塩酸 (1+1) 4 ml, 硫酸第一鉄アンモニウム溶液 1 ml, チオシアン酸カリウム溶液 5 ml を加えて振り混ぜ，水で 40 ml にする．これに塩化第一スズ溶液 10 ml を加え，振り混ぜてチオシアン酸鉄を脱色するとともにモリブデンを発色させる．これに酢酸 n-ブチル 5.0 ml を加えて振り混ぜ，静置後水層を捨て，さらに塩化第一スズ溶液 10 ml を加えてよく振り混ぜる．静置後溶媒層を脱脂綿でろ過し，塩化第一スズの小片の入った 10 mm の吸収セルに移し 470 nm で吸光度を測定する．

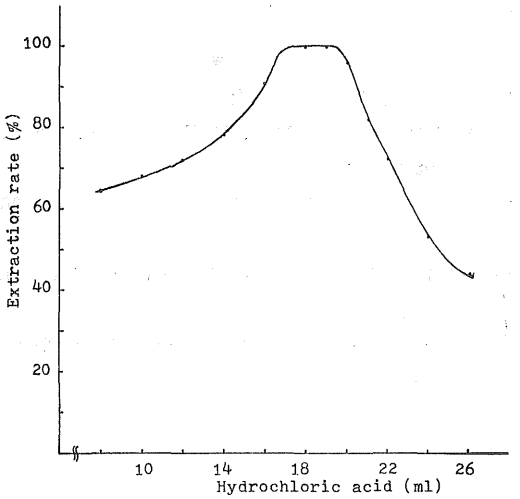


Fig. 1. Effect of the acidity on the extraction of phosphomolybdate

結果と考察

1. **酸濃度の検討**　PO_4^{3-} 50 μg を取り塩酸を 8～26 ml 加え，水を加えて全量を 268 ml とし実験の部 2. の定量方法に従い，抽出，それぞれ同じ濃度の塩酸溶液で洗浄を行ない，水酸化ナトリウム溶液 25.0 ml により逆抽出し，溶媒層を捨て水を加えて 100 ml とし，モリブデン酸イオンの紫外部吸収を 230 nm で測定して，酸濃度と抽出率（最高の吸収を 100% とした）の関係を検討した．Fig. 1 に示すように 17～19 ml の塩酸で，ほぼ100%の抽出率を示した．

よって本法では検水 250 ml に塩酸 18 ml を加えることにした．

2. **モリブデン酸アンモニウム濃度の検討**　PO_4^{3-} 50 μg を取り水を加えて 250 ml とし，塩酸 18 ml を加え，混合溶媒で飽和後溶媒層を捨て，モリブデン酸アンモニウム溶液を 4～7 ml 加え，実験の部 2. の定量方法に従い，抽出，洗浄を行ない，水酸化ナトリウム溶液 25.0 ml により逆抽出し，水層に水を加えて 100 ml とし，モリブデン酸イオンの紫外部吸収を 230 nm で測定して，モリブデン酸濃度と抽出率（最高の吸収を 100 %とした）の関係を検討した．Fig. 2 に示すように5～6 ml のモリブデン酸アンモニウム溶液でほぼ 100% の抽出率を示した．

よって本法では検水 250 ml にモリブデン酸アンモニウム溶液 5.5 ml を加えることにした．

3. **共存物質の影響**　共存物質の影響を 1 μg/250 ml

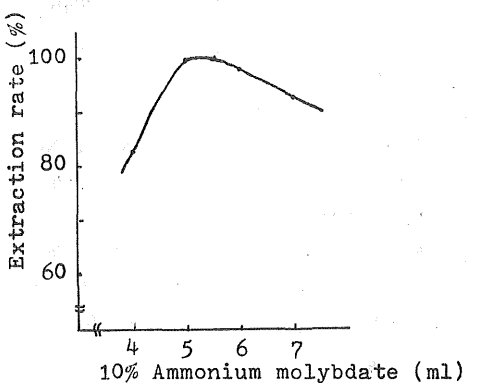


Fig. 2. Effect of ammonium molybdate concentration on the extraction of phosphomolybdate

Table 1. Effect of Ions (added PO_4^{3-}=1.00 μg)

Ions concentration	(ppm)	Found PO_4^{3-}(μg)	Recovery (%)
Na^+	3,000	1.01	101
K^+	1,000	1.05	105
Ca^{2+}	200	1.06	106
Mg^{2+}	100	1.01	101
Fe^{3+}	25	1.06	106
F^-	10	1.00	100
Cl^-	5,000	1.01	101
NO_3^-	250	1.01	101
NO_2^-	5	1.00	100
SiO_3^{2-}	30	1.06	106
As^{5+}	0.1	1.04	104

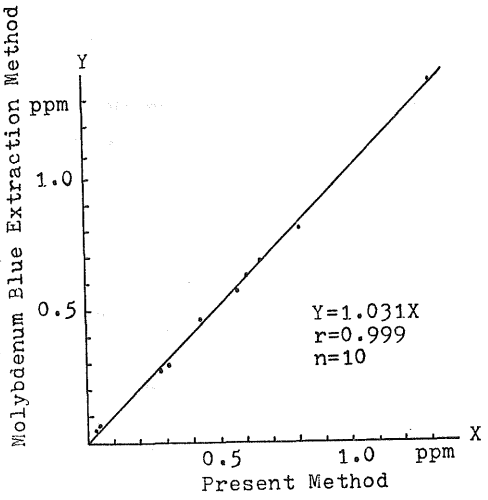


Fig. 3. Regression line of orthophosphate determined by present method and molybdenum blue extraction method

のリン酸標準液について検討した結果を Table 1 に示す．この結果より通常の河川水，湖沼水ではほとんど共存物質の影響はないものと考えられる．

なお，用いた試薬は Na^+, Cl^- については容量分析用標準試薬を，K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, F^-, NO_3^-, NO_2^- については特級試薬を用いた．Fe^{3+} については塩化第二鉄（6水塩）を6N塩酸に溶かしてエーテルで抽出し，0.1N 塩酸で逆抽出しエーテルを蒸発させた溶液を用いた．SiO_3^{2-} については原子吸光用 Si 標準液（Si 1000 ppm）を塩酸で中和し，初めに Dowex 50×8 H^+ 型，次に Amberlite IR-45 Cl^- 型のイオン交換樹脂に通し，PO_4^{3-} を除去した溶液を用いた．

4. 工場排水試験方法（JISKO 102-1971）との比較

多摩川の河川水（7検体），三宅島大路池の湖沼水（2検体）およびその付近の井水（1検体）を用いて，本法（X）と工場排水試験方法（モリブデン青抽出法）（Y）の比較をした．その結果を Fig. 3 に示す．回帰方程式は Y=1.031X，相関係数 r=0.999 となり，両法に差はみとめられなかった．

結　論

モリブドリン酸のモリブデンを比色定量する方法による河川水，湖沼水中のオルトリン酸イオンの定量法について検討した．

本法により (1)河川水，湖沼水の微量オルトリン酸イオン (1 ppb～8 ppb) を精度よく定量できる．(2)通常の河川水，湖沼水では共存物質の影響はないものと考えられる．

文　献

1) 堺好雄：下水道協会誌，10, 50, 1973
2) Wadelin, C. and M.G. Mellon: *Anal. Chem.*, 25, 1668, 1953
3) Lueck, C.H. and D.F. Boltz: *Anal. Chem.*, 30, 183, 1958
4) Quinlan, K.P. and M.A. Desesa: *Anal. Chem.*, 27, 1626, 1955
5) Sugawara, K. and S. Kanamori: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 34, 258, 1961

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 335—341, 1976

イソシアヌール酸添加による残留塩素の持続効果と殺菌力について

笹野英雄*, 池島伸至*, 押田裕子*, 栃本博*
菊地洋子*, 神真知子*, 黒田静夫**, 原田裕文*

On the Stabilization and Sterilization Effect of Residual Chlorine by the Addition of Isocyanuric Acid to Pool Water

HIDEO SASANO*, NOBUYUKI IKEJIMA*, HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO*, YOKO KIKUCHI*, MACHIKO JIN*, SHIZUO KURODA** and HIROFUMI HARADA*

Effect of the addition of isocyanuric acid (ICA) to the conventionally used chlorination agent was investigated on the stabilization and sterilization activity of residual chlorine.

Isocyanuric acid gave rise to the depression of oxidation potential but it gave a resistance of residual chlorine to the decomposition by ultra-violet ray.

Moreover, the addition of isocyanuric acid stabilized the residual chlorine effectively and give no decreased sterilization activity both in laboratory and public pool works.

緒　言

水の殺菌，消毒剤として最も普及しているのが塩素剤である．現在プール水の消毒に使用されている塩素剤の代表的なものは，液体塩素，次亜塩素酸ナトリウム，次亜塩素酸カルシウム（錠剤，顆粒）であるが，プールを管理する者にとって，残留塩素を基準[1]（遊離残留塩素 0.4 ppm 以上または総残留塩素 1.0 ppm 以上）に維持することはプール水行政検査結果（Table 1）に示すように非常にむずかしい．最近塩素の消耗速度を抑える薬剤として，イソシアヌール酸が使用されるようになった．イソシアヌール酸(S-Triazine-1,3,5-Trihydrozen-2,4,6-Trion) は尿素の熱分解によって得られる化合物で，1958年以来消毒剤である塩素化イソシアヌール酸とともに使用され，塩素の安定効果が認められた薬剤である．今までにもイソシアヌール酸およびその塩素化合物に関する情報[2-26]が報告されているが，いずれも塩素安定剤としての効果を認めている．ところが殺菌力への影響については，実験室，遊泳用プールの両条件で行った実験結果について賛否両論が報告されている．そこで筆者らはプール水の衛生管理の向上を目的とし，塩素剤にイソシアヌール酸を添加した際の殺菌力におよぼす影響，安定化の効果を明らかにするために本研究を行った．

実験の部

(1) **使用薬剤**：次亜塩素酸ナトリウム（以下 NaClO と略す），ジクロールイソシアヌール酸カリウム（以下 KCl_2 ICA と略す），トリクロールイソシアヌール酸（以下 Cl_3 ICA と略す），イソシアヌール酸（以下 ICA と略す），クロラミンT．**(2)残留塩素測定法**[27]：オルトトリジン法，ヨード滴定法．**(3)細菌試験**：大腸菌群試験．**(4)紫外線照射試験**：暗箱内の 500 m*l* ビーカー中の試料に UV (2537Å) を照射した．**(5)酸化力試験**：300m*l* 共栓三角フラスコ中に Fe^{2+}（硫酸第一鉄アンモニウム）溶液 200 m*l* と各塩素剤を入れ，ICA 30 ppm 添加の有無による $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ の変化をオルトフェナントロリン法により測定した．塩素濃度は 1—6 ppm，接触時間は 2.5 時間および 24 時間である．**(6)使用プール**：静水 50m プールおよび流水滝付プール．

結果と考察

(1) **ICA 添加による残留塩素の持続効果**：Fig. 1—5

* 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, Sibazakicho 3 chome, Tachikawa, 190 Japan
** 東京都臨床医学総合研究所

Table 1. Result of Admistrative Examination on swimming pool in Tokyo.

Year	1971	1972	1973	1974	1975
Total number of pool	322	317	230	310	342
Adaptable pool	129	133	107	158	139
	(40.06%)	(41.96%)	(46.52%)	(50.97%)	(40.64%)
Unadaptable pool	193	184	123	152	163
	(59.94%)	(58.04%)	(53.48%)	(49.03%)	(59.36%)
Contents of Unadaptable Items					
pH	10	10	7	5	2
$KMnO_4$ consumed	1	0	1	1	1
Turbidity	1	0	0	0	0
Residual chlorine	185	176	117	148	163
	(57.45%)	(55.52%)	(50.87%)	(47.74%)	(49.66%)
Coliform group	13	14	11	5	10

Table 2. Sterilization Activity of Sodium Hydorochloride.

Time of contact (sec)	F	T	BGLB	F	T	BGLB	F	T	BGLB
5	0.05	0.15	+	0.05	0.25	+	0.50	0.85	+
30	0.05	0.15	+	0.05	0.25	+	0.45	0.80	+
60	0.05	0.15	+	0.05	0.25	+	0.40	0.60	−
90	0.05	0.10	+	0.05	0.20	−	0.25	0.50	−
120	0.05	0.10	+	0.05	0.20	−	0.25	0.45	−
150	0.05	0.10	+	0.05	0.20	−	0.25	0.45	−
300	0.05	0.10	+	0.05	0.20	−	0.15	0.40	−
600	0.05	0.10	+	Tr	0.20	−	0.15	0.35	−
pH	6.7			6.5			6.6		
$KMnO_4$ Consumed (ppm)	10.18			10.33			10.52		

F: Free residual chlorine (ppm), T: Total residual chlorine (ppm), Tr: Trace

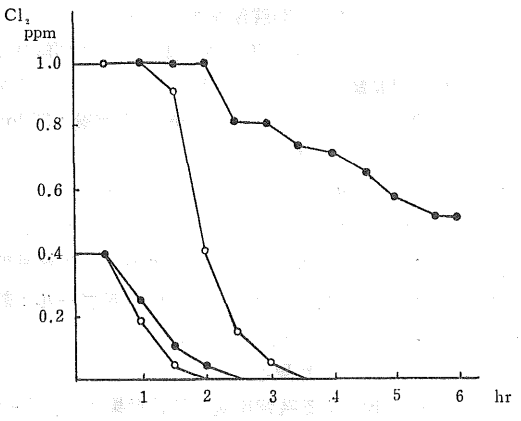


Fig. 1. Fffect of ICA on the stabilization of residual chlorine (KCl_2 ICA).
—●— 30 ppm ICA
—○— 0 ppm ICA
Weather: Fine in the sun (Gentle wind)

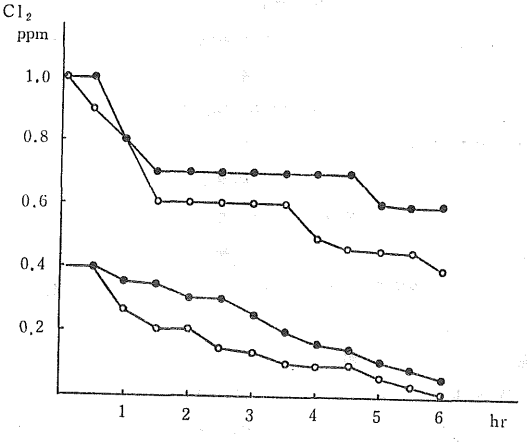


Fig. 2. Effect of ICA on the stabilization of residual chlorine (KCl_2 ICA).
—●— 30 ppm
—○— 0 ppm ICA
Weather: Cloudiness (Windless)

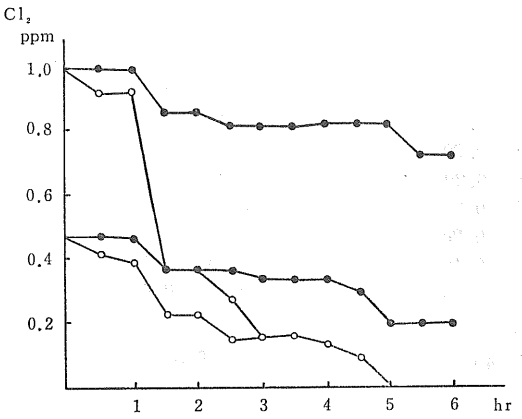


Fig. 3. Effect of ICA on the stabilization of residual chlorine (NaClO).
—●— 30 ppm ICA
—○— 0 ppm ICA
Weather: Fine in the sun (Gentle wind)

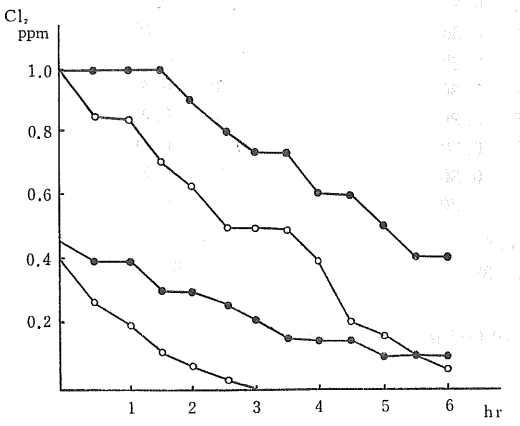


Fig. 4. Effect of ICA on the stabilization of residual chlorine (Cl_3 ICA).
—●— 30 ppm ICA
—○— 0 ppm ICA
Weather: Fine in the sun (Gentle wind)

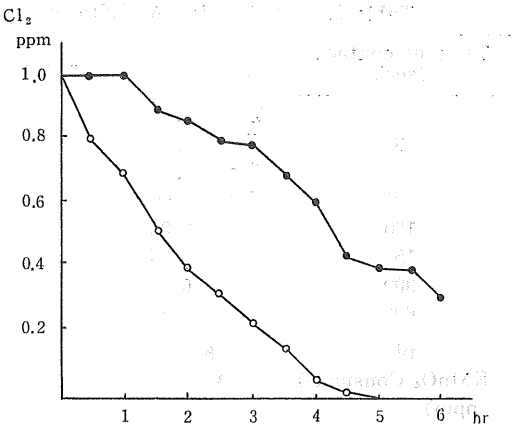


Fig. 5. Effect of ICA on the stabilization of residual chlorine (Cl_3 ICA).
—●— 30 ppm ICA
—○— 0 ppm ICA
Weather: Fine in the shade (Gentle wind)

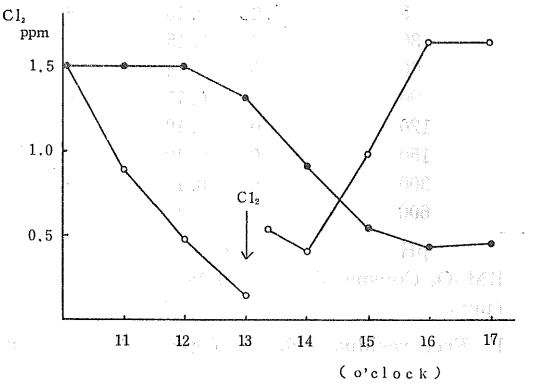


Fig. 6. Effect of the stabilization of residual chlorine in field pool.
—○— Flowing Water
—●— Still Water (30 ppm ICA)
Weather: Fine-Cloudy (Gentle wind)

は 1 l ビーカー中に各塩素剤を蒸留水に溶かした溶液 500 ml を入れ，ICA (30 ppm) を添加した試料と無添加の試料の残留塩素の持続効果を検討したものである．Fig. 6 は屋外プールの実験結果である．その結果，ICA 添加による残留塩素の持続効果は，クロラミンTを除くいずれの塩素剤でも認められ，残留塩素濃度が 1.0 ppm 以上および日照条件下のものほど対照試料との間に有意差を認めた．ICA は残留塩素と結合，分離を容易に行いながら塩素の分解を遅らせているものと思われる．クロラミンTはそれ自身が反応の遅い結合型塩素であるため，ICA 添加による持続効果に有意差が認められなかったものと思われる．

(2) **ICA 添加による残留塩素の殺菌力への影響**：小瀬ら[24]は残留塩素に ICA 30 ppm を添加すると塩素の殺菌効果が低下すると報告している．筆者らは殺菌力試験を行うに当り，ICA 添加量を決めるために NaClO に 30, 100, 200, 300 ppm の ICA を添加し，E. Coli を用いて殺菌力試験を行った．その結果 ICA 30—300 ppm 間で殺菌力に有意差を認めなかったので，以後の

Table 3. Sterilization Activity of Sodium Hydrochloride in 30 ppm Isocyanuric Acid.

Time of contact (sec)	F	T	BGLB	F	T	BGLB	F	T	BGLB
5	0.05	0.01	+	0.15	0.35	+	0.50	0.60	+
30	Tr	0.05	+	0.15	0.25	−	0.40	0.50	−
60	Tr	0.05	+	0.10	0.20	−	0.35	0.45	−
90	Tr	0.05	+	0.10	0.20	−	0.25	0.40	−
120	0	0.05	+	0.05	0.20	−	0.25	0.40	−
150	0	0.05	+	0.05	0.20	−	0.25	0.40	−
300	0	0.05	+	0.05	0.15	−	0.15	0.40	−
600	0	Tr	+	Tr	0.10	−	0.15	0.40	−
pH	5.8			6.1			6.2		
$KMnO_4$ Consumed (ppm)	10.62			10.49			10.52		

F: Free residual chlorine (ppm), T: Total residual chlorine (ppm), Tr: Trace

Table 4. Sterilization Activity of Potassium Dichloroisocyanuric Acid.

Time of contact (sec)	F	T	BGLB	F	T	BGLB	F	T	BGLB
5	0.05	0.15	+	0.30	0.35	+	0.40	0.50	+
30	0	0.15	+	0.20	0.35	+	0.40	0.50	+
60	0	0.15	+	0.20	0.35	+	0.40	0.50	−
90	0	0.15	+	0.15	0.30	−	0.35	0.45	−
120	0	0.10	+	0.15	0.30	−	0.35	0.45	−
150	0	0.10	+	0.15	0.30	−	0.35	0.40	−
300	0	0.10	+	0.10	0.30	−	0.20	0.35	−
600	0	0.10	+	Tr	0.30	−	0.15	0.35	−
pH	6.8			6.8			6.7		
$KMnO_4$ Consumed (ppm)	10.18			10.33			10.52		

F: Free residual chlorine (ppm), T: Total residual chlorine (ppm), Tr: Trace

Table 5. Sterilization Activity of Potassium Dichloroisocyanuric Acid in 30 ppm Isocyanuric Acid.

Time of contact (sec)	F	T	BGLB	F	T	BGLB	F	T	BGLB
5	Tr	0.25	+	0.40	0.45	+	0.70	0.80	−
30	Tr	0.25	+	0.35	0.45	+	0.70	0.80	−
60	Tr	0.25	+	0.35	0.45	+	0.50	0.80	−
90	Tr	0.20	+	0.30	0.45	−	0.45	0.80	−
120	Tr	0.20	+	0.30	0.45	−	0.45	0.70	−
150	Tr	0.20	+	0.25	0.45	−	0.40	0.70	−
300	Tr	0.20	+	0.15	0.40	−	0.35	0.60	−
600	Tr	0.20	+	0.15	0.40	−	0.35	0.60	−
pH	6.8			6.5			6.4		
$KMnO_4$ Consumed (ppm)	11.24			11.72			10.68		

F: Free residual chlorine (ppm), T: Total residual chlorine (ppm), Tr: Trace

Table 6. Sterilization Activity of Trichloro-isocyanuric Acid.

Time of contact (sec)	F	T	BGLB	F	T	BGLB	F	T	BGLB
5	Tr	Tr	+	0.15	0.25	+	0.30	0.70	+
30	Tr	Tr	+	0.05	0.10	−	0.25	0.60	−
60	0	Tr	+	Tr	0.05	−	0.20	0.55	−
90	0	Tr	+	Tr	0.05	−	0.15	0.50	−
120	0	Tr	+	0	0.05	−	0.15	0.45	−
150	0	Tr	+	0	0.05	−	0.10	0.45	−
300	0	Tr	+	0	0.05	−	0.10	0.40	−
600	0	Tr	−	0	Tr	−	Tr	0.40	−
pH	4.9			4.4			4.0		
$KMnO_4$ Consumed (ppm)	10.68			12.23			12.73		

F: Free residual chlorine (ppm), T: Total residual chlorine (ppm), Tr: Trace

Table 7. Sterilization Activity of Trichloro-isocyanuric Acid in 30 ppm Isocyanuric Acid.

Time of contact (sec)	F	T	BGLB	F	T	BGLB	F	T	BGLB
5	0.05	0.15	+	0.20	0.35	+	0.45	0.60	+
30	Tr	0.15	+	0.15	0.30	−	0.35	0.50	−
60	Tr	0.15	+	0.10	0.25	−	0.25	0.45	−
90	Tr	0.10	+	0.05	0.20	−	0.20	0.40	−
120	Tr	0.10	+	0.05	0.20	−	0.15	0.40	−
150	Tr	0.10	+	0.05	0.20	−	0.15	0.35	−
300	Tr	0.10	+	Tr	0.15	−	0.05	0.35	−
600	Tr	0.10	+	Tr	0.15	−	Tr	0.35	−
pH	6.9			5.5			4.4		
$KMnO_4$ Consumed (ppm)	11.85			13.21			12.77		

F: Free residual chlorine (ppm), T: Total residual chlorine (ppm), Tr: Trace

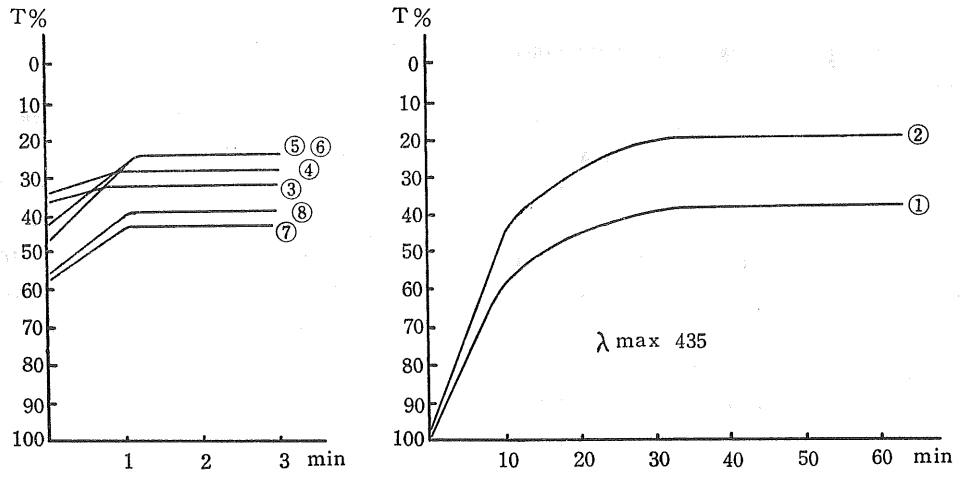


Fig. 7. Change on Standing Time of Color of Residual Chlorine Produced with *o*-Tolidine.

実験は ICA 添加量 30 ppm で行った．本実験は蒸留水中で行ったもので，その操作方法は河川水中の大腸菌群を普通寒天培地を用いて 37°, 24 時間培養したものを平板培地上より白金耳でかき取り，生理食塩水に $3.0\times10^8/ml$ の割合で浮遊させた液を，各塩素剤溶液 200 ml に 20 ml の割合で混合し，接触時間を5秒から10分後までとり，殺菌効力を比較検討したもので，その結果は Table 2—5 の通りで各塩素剤とも ICA 添加，無添加の間に殺菌力に有意差を認めなかった．

(3) 紫外線に対する抵抗性：残留塩素が UV により分解 ($HClO\rightarrow HCl+O$) されることから，500 ml ビーカー中に ICA 30 ppm を添加した 0.4 ppm, 1.0 ppm の NaClO 溶液 500 ml に水面上 10 cm から UV (2537Å) を暗箱中で照射し，ICA 添加，無添加のものについて残留塩素と塩素イオンの変化から ICA の UV に対する抵抗性を検討した．その結果 ICA 添加は残留塩素の分解を遅らせることがわかった．ICA 添加は日照下で残留塩素の持続に有効と思われる．

(4) ICA 添加による有効塩素の酸化力におよぼす影響：各塩素剤に ICA を添加した溶液に Fe^{2+} を加えた試料について，$Fe^{2+}\rightarrow Fe^{3+}$ への酸化率を ICA 添加，無添加溶液について 2.5 時間，24 時間の接触時間で試験した．その結果は小瀬ら[24]の報告と同様 ICA 添加により酸化力の低下がみられた．結合型塩素であるクロラミンTに ICA を添加しても酸化力の低下がみられなかったことから，NaClO, KCl_2 ICA, Cl_3 ICA から生ずる HClO が ICA と結合し，Fe^{2+} を酸化する反応速度が低下するものと思われる．今回の実験では酸化力の低下と殺菌力の間に相関関係を認めなかった．塩素の殺菌機構説にも発生機酸素説，酵素阻害説等があり，この点については今後検討する予定である．

(5) ICA 添加による残留塩素のオルトトリジン反応におよぼす影響：オルトトリジン反応による呈色の最大吸収値までに要する経時変化を Fig. 7 に示した．NaCOl, KCl_2 ICA, Cl_3 ICA については，ICA 添加の有無にかかわらず約 60 秒で最大吸収値を示し，1 時間を経過しても呈色は安定であった．クロラミンTについては，最大吸収値を示すのに30—40分を要した．この結果，オルトトリジンによる塩素型の分類では，塩素化イソシアヌール酸の水溶液は遊離型として測定される．

(6) 屋外プールにおける実験結果：静水プールについては，残留塩素初濃度 1.5 ppm, ICA 30 ppm で 6.5 時間後も残留塩素濃度 0.4 ppm 以上を保ち，この間1時間おきに行う大腸菌群試験の結果もすべて陰性5(−)であった．流水プールは静水プールと同じ条件でスタートしたが，2時間後には残留塩素濃度が 0.4 ppm 以下になった．流水プールは滝による曝気や，流水による攪拌等残留塩素濃度維持のために厳しい条件下にあるので，液体塩素の連続注入や，錠剤と併用して ICA 添加を行えば，従来法よりも残留塩素濃度の維持が容易になるものと思われる．なお当プールの入泳者総数は3724名，(晴〜曇) であった．

結　論

ICA 添加による残留塩素の持続効果は，特に高濃度，日照下で有効であり，賛否両論ある殺菌効果についても今回の実験では効力の低下を認めなかった．以上からプール水の残留塩素濃度維持管理に，オルトトリジン測定法による遊離残留塩素濃度を 1.5—2.0 ppm, ICA 濃度 30 ppm で行うと長時間にわたりプール水水質基準の 0.4 ppm 以上に保つことが可能となり，殺菌効果にも有意差を認めなかったので，プール水の衛生管理上有効な手段である．

謝　辞　本研究にあたり試料を提供された四国化成の塚本正彦氏およびプール実験に際し御協力下さった府中保健所の須藤尚義氏，花岡　暉氏，永井敏江氏に感謝します．

(本研究の概要は水処理技術 17(5)1976に発表した.)

文　献

1) 厚生省環境衛生局長通知環衛第 5080 号：遊泳用プール水の水質基準について，1965
2) Roth, E.S.: Review of Studies on The Cyanurates, *Swimming Pool Weekly and Swimming Pool Age*, 170, 1968
3) Gilcreas, F.W. and Morgan, G.B.: Chlorinated Cyanurates and The Affection of Cyanuric Acid, *Swimming Pool Age*, 37 (12), 1963
4) Stuart, L. S. and L. F. Ortenzio: Swimming Pool Chlorine Stabilizers, *Soap and Chemical Specialties*, 40 (8) 79, 112, 1964
5) Andersen, J.R.: A Study of The Influence of Cyanuric Acid on The Bactericidal Effectiveness of Chlorine, *A.J.P.H.* 55 (10) 1629, 1965
6) Robinson, E.D. and E.W. Mood: An Evaluation of The Inhibitory Influence of Cyanuric Acid Upon Swimming Pool Disinfection, *A.J.P.H.* 57 (2) 301, 1967
7) Kowalski, X. and T.B. Hilton: Comparison of Chlorinated Cyanurates with Other Chlorine Disinfectants, *Public Health Reports*, 81 (3),

282, 1966

8) Mulliken, R. S.: Molecular Compounds and Spectra II, *J.A.C.S.*, 74, 811, 1952

9) Zettler, T.T. and J.Q.Selsor: Which Chlorine Sanitizer Should You Use?, *Swimming Pool Age*, 40(7), 22, 38, 1966

10) Wallis, A.P.L.: An English Report on Cyanurate Use, *Swimming Pool Weekly and Swimming Pool Age*, 182, 1968

11) Nelson, G. D. and G. F. Brautigam: Chlorine Cyanuric Acid Reaction Explained, *Swimming Pool Age*, 42(9), 12, 1968

12) Robinton, E. D. and E. W. Mood: Cyanuric Acid's Effect on Swim Pool Sanitation, *Swimming Pool Age*, 42(1), 104, 1968

13) Fitzgerald, G.P. and M.E. Der Vartanian: Pseudomonas Aeruginosa for Evaluation of Swimming Pool Chlorination and Algicides, *Applied Microbiology*, 17(7), 415, 1969

14) Fitzgerald, G.P. and M.E. Vartanian: Factors Influencing The Effectiveness of Swimming Pool Bactericides, *Applied Microbiology*, 15(3), 504, 1967

15) Petrie, E. M. and D. P. Roman: Chlorine Sanitizing Compounds, *Soap and Chemical Specialties*, 34(8), 67, 99, 1958

16) Swatek, F. E., Raj, H., and G. E. Kalbus: The Chlorinated Cyanurates, *Swimming Pool Age*, 41(7), 52, 1967

17) Ortenzio, L.F. and L.S.Stuart: The Behavior of Chlorine-Bearing Organic Compounds in The A.O.A.C. Available Chlorine Germicidal Equivalent Concentration Test, *Journal of The* A.O.A.C., 42(3), 630, 1959

18) Morgan, G. B., F. W. Gilcreas, and P. P. Gubbins: Cyanuric Acid-An Evaluation, *Swimming Pool Age*, 40(5), 31, 1966

19) Gaglierd, A.M.: Operators Conduct Field Tests on Cyanuric Acid Disinfection, *Swimming Pool Weekly and Swimming Pool Age*, 52, 1973

20) Ortenzio, L. F. and L. S. Stuart: A Standard for Efficacy of Germicides and Acceptability of Residual Disinfecting Activity in Swimming Pool Water, *Journal of The A.O.A.C.* 47(3), 540, 1964

21) Anon: Free or Combined? Chlorine Residual from Cyanurates, *Swimming Pool Age*, 24, 1963

22) Saldick, J.: Biodegradation of Cyanuric Acid, *Applied Microbiology*, 12, 1004, 1974

23) Inorganic Chemical Division/800 N. Lindbergh Blud./St. Louis, Missouri 63166: How Monsant Stabilizes Chlorine in Swimming Pools... and Helps Reduce Disinfection Costs, *Technical Bulletin*, 1-291

24) 小瀬洋喜，森崎信夫：プールの衛生管理に関する研究（第10報）プール水中の塩素に対するイソシアヌール酸の影響，日公衛誌，18(12)，725，1971

25) 小瀬洋喜，森崎信夫：プールの衛生管理に関する研究（第11報）イソシアヌール酸添加時の塩素の殺菌作用，日公衛誌，18(12)，731，1971

26) 小瀬洋喜，森崎信夫：プールの衛生管理に関する研究（第12報）イソシアヌール酸添加時の残留塩素の動向，日公衛誌，19(1)，7，1972

27) 日本水道協会：上水試験方法，1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 342—349, 1976

下水道未整備地域の水質汚濁について（第1報）

栃本 博*, 笹野英雄*, 池島伸至*, 押田裕子*
菊地洋子*, 黒田静夫**, 原田裕文*

Water Pollution in the Area without Sewage Works (I)

HIROSHI TOCHIMOTO*, HIDEO SASANO*, NOBUYUKI IKEJIMA*,
HIROKO OSHIDA*, YOKO KIKUCHI*, SHIZUO KURODA**
and HIROFUMI HARADA*

緒　言

現在大都市周辺の地域は，ベッドタウンとして発展しているが，その反面下水道の整備は非常に遅れているのが現状であり，その流域の中小河川は著しく汚濁が進んでいる[1]．東京都多摩地区もその例で，家庭雑排水等の急激な増加により，流域の河川は著しく汚濁が進行し，その汚濁は西部の山間部まで迫ってきている．またこれに伴って，当然飲料水源としている地下水および伏流水にも汚染は進行している[2]．今後流域下水道計画により，約10年間で市街化区域全域の下水道が整備される予定であるが，その間における水質汚濁の進行もまた計り知れないものがあると予測される．

このような河川の水質汚濁に関する報告は，大河川については数多くみられるが，中小河川の報告例は少ない．そこで今回，一地区を流れる小河川を選び，その水質調査を行ない，その汚濁状況あるいは汚濁原因等を解析し，現状における対策を検討した．

調査対象および方法

1. 調査対象河川　今回の調査には，つぎのような理由から東京都西多摩郡日の出町を流れる平井川[3]を選んだ．

(1) 町の全域が平井川の流域となっており，流入する排水の大部分が，家庭雑排水，し尿処理水に由来するので，検討が容易である．

(2) かつて清流であった川が，最近汚濁河川へと変化しつつあり，町としてその対策に迫られている．

この平井川は，日の出町の西北部に源を発し，町の中央を流れ，秋川市を経て多摩川に合流する長さ 16.5km の小河川である．この河川は，農業用水，漁業水域および河川遊泳場として，またその伏流水は，水道原水および工業用水として利用されている．日の出町は，昭和51年現在人口 11396人，面積 28.18 km² で，将来は流域下水道計画により，下水道が整備される予定である．

2. 調査方法　今回はこの平井川の水質および流量，また水道原水（伏流水）ならびに浄化槽放流水の水質について調査を行なった．そしてさらに比較対照試料として，多摩川の多摩川橋，秋川の秋留橋の2地点における水質調査もあわせて行なった．平井川の採水地点（図2）は，本流6地点，3つの支流にそれぞれ1地点，計9地点を選び，比較対照の2地点とともに，昭和50年2月から51年1月までの1年間，毎月1回の水質調査を行なった．また流量は平井川本流の6カ所の採水地点について測定を行なった．水道原水は，幸神浄水場，落合浄水場の原水について，昭和50年4月，7月，10月の3回，また浄化槽放流水は，4基の浄化槽を選び，毎月1回水質調査を行なった．

3. 検査項目および検査方法　河川水の検査項目は，pH（ガラス電極法），BOD（アジ化ナトリウム変法），過マンガン酸カリウム消費量（酸性一直火5分法），アンモニア性窒素（ネスラー法），りん酸イオン（モリブデンブルー法），塩素イオン（硝酸銀法），陰イオン界面活性剤（メチレンブルー法），総硬度（EDTA 法），導電率，大腸菌群数（デソ法），一般細菌数の計11項目である．また日の出町は，昭和48年セメント工場による重金属汚染で問題となった地域であるため[4,5]，カドミウム，鉛，総水銀（原子吸光法），クロム（ジフェニルカルバジッド法）についても測定を行なった．流量は，JIS K 0102 解説の浮子による方法を用いた．

* 東京都立衛生研究所多摩支所　190 東京都立川市柴崎町 3—16—25
* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16—25, Sibazakicho 3 chome, Tachikawa, 190 Japan
** 東京都臨床医学総合研究所

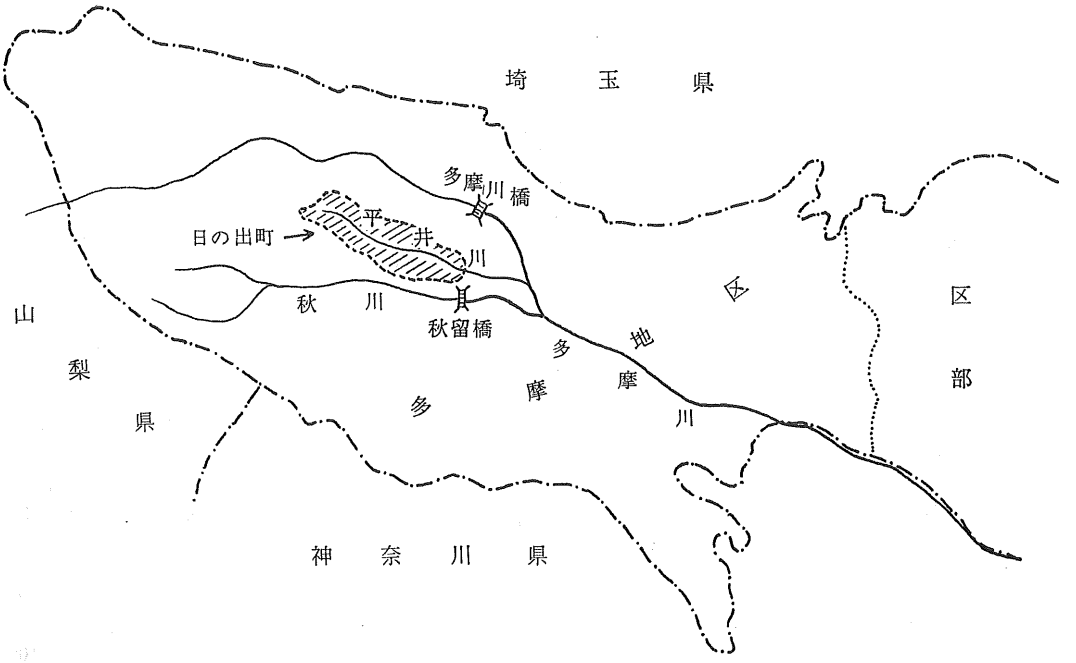


図1　日の出町と平井川の位置

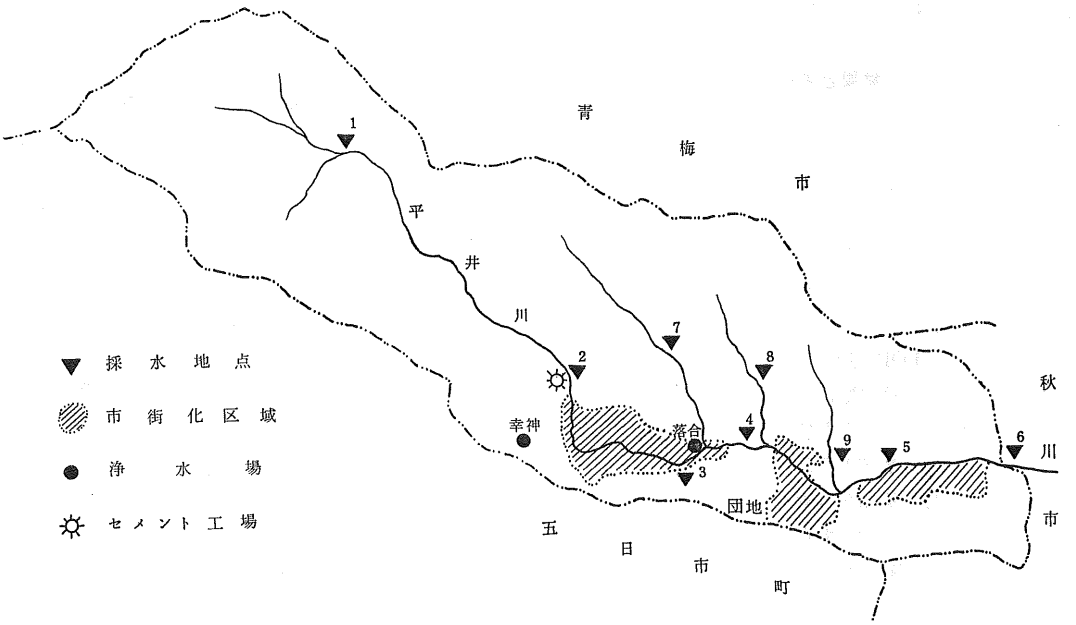


図2　採水地点と市街化区域

表1 平 井 川

採水地点	1	2	3	4	5
pH	7.8 7.2～8.5	8.0 7.4～8.7	8.1 7.5～9.1	7.8 7.2～8.4	8.1 7.2～8.8
BOD (ppm)	0.6 0.0～2.5	1.2 0.0～4.5	0.8 0.0～1.8	0.8 0.0～2.5	2.0 0.1～8.6
過マンガン酸カリウム消費量 (ppm)	2.4 0.6～4.7	7.2 0.6～31.6	4.0 1.3～10.4	2.7 0.8～7.2	4.4 2.4～14.6
アンモニア性窒素 (ppm)	0.02 0.00～0.04	0.06 0.00～0.37	0.05 0.00～0.32	0.02 0.00～0.05	0.06 0.00～0.20
リン酸イオン (ppm)	0.04 0.01～0.10	0.07 0.01～0.34	0.13 0.01～0.38	0.06 0.02～0.13	0.20 0.04～0.38
塩素イオン (ppm)	4.6 2.9～7.1	4.9 4.0～6.1	9.2 4.2～15.7	7.2 5.4～9.6	8.1 6.4～10.2
導電率 ($\mu\mho$/cm)	130 98～163	157 116～206	247 156～336	209 173～244	230 196～273
硬度 (ppm)	46 32～ 70	55 46～ 72	84 50～120	75 62～ 96	78 68～ 92
陰イオン界面活性剤 (ppm)	0.02 0.00～0.09	0.03 0.00～0.19	0.03 0.00～0.24	0.04 0.00～0.24	0.07 0.00～0.35
大腸菌群数 (1 ml中)	20×10 $5\sim18\times10^2$	20×10^2 $7\sim20\times10^3$	94×10 $35\sim71\times10^2$	26×10 $17\sim82\times10$	13×10^2 $24\sim46\times10^2$
一般細菌数 (1 ml中)	25×10^2 $73\sim20\times10^3$	16×10^3 $55\sim11\times10^4$	68×10^2 $11\times10\sim28\times10^3$	30×10^3 $15\times10\sim11\times10^3$	11×10^3 $50\times10\sim61\times10^3$

水道原水は，水道法水質基準項目について上水試験法により測定した．また浄化槽放流水の検査項目は，上記河川水の項目中，過マンガン酸カリウム消費量を除き，別に浮遊物質を加えた．

結果と考察

1. 河川水 定点における年間測定結果の平均値および範囲を表1に示した．今回の調査によると，pH 以外の測定値は全般的に平井川の方が，対照の2地点より高い値を示しており，特にりん酸イオン，塩素イオン，大腸菌群数，一般細菌数に著しい差がみられ，汚濁が進んでいることがわかる．さらに平井川は，本流はもちろん支流までも汚濁されていることが明らかとなった．また定点間において，BOD，過マンガン酸カリウム消費量，りん酸イオン，大腸菌群数，一般細菌数に大きなばらつきがみられた．これらのうち特に大腸菌群数，一般細菌数は，対照に比べて数倍から20倍も検出された地点があった．一方総硬度，導電率は対照の地点の約2倍を示していることから，平井川と対照との水質の差異は，地質的なものが大きく影響していると思われる．

つぎに最高値，最低値について平井川と対照河川とを比較すると，pH を除いて各項目とも平井川の方が変動の著しいことがわかる．これは平井川が，多摩川，秋川に比べて，小河川のため流入する排水の影響を著しく受けることが原因となっている．対照の2地点の pH が高いのは，藻類の発生状況から，その炭酸同化作用の影響と思われる．

平井川と対照の2地点との汚染の差を考察するために，流域面積当りの人口密度を比較すると，平井川の定点6では，404人/km^2，多摩川橋では 107人/km^2，秋留橋では 198人/km^2 となる．この人口密度と塩素イオン濃度とは，相関性を示しているが，これはこれらの河川へ流入する排水のほとんどが，家庭雑排水，し尿処理水に由来し，BOD, COD, 大腸菌群数等は，後に示すように，沈殿，吸着等の自浄作用に大きく影響されるのに対し，塩素イオンはそれらの作用をほとんど受けないことが原因となっている．

なお今回の調査では，カドミウム，鉛，水銀およびクロムは全く検出されなかった．

つぎに流量の変化を図3に示した．定点2，3では変化はみられず，定点4より下流は，支流との合流により急激に増加する．この流量にそれぞれの定点における年間平均値を乗じて，1日平均負荷量を算出し，各定点間の濃度および負荷量の変化のパターンを比較検討した．BOD, COD, 大腸菌群数，一般細菌数は，定点2と5に，アンモニア性窒素，りん酸イオンは定点3と5に，陰イオン界面活性剤は定点5に濃度と負荷量のピークが

の　水　質

6	7	8	9	多摩川橋	秋留橋
8.2	7.9	8.3	7.6	8.5	8.1
7.6～8.6	7.3～8.5	7.7～9.0	6.8～8.1	7.6～9.7	7.0～9.6
1.1	0.7	1.4	0.7	1.1	0.7
0.0～2.7	0.0～2.9	0.3～2.4	0.4～1.3	0.3～2.1	0.0～1.1
3.3	3.8	4.6	4.4	3.1	2.7
1.8～7.1	1.6～5.9	2.9～6.8	2.1～6.6	1.8～5.9	0.8～6.7
0.04	0.04	0.06	0.08	0.04	0.04
0.00～0.12	0.00～0.07	0.01～0.16	0.02～0.25	0.00～0.08	0.00～0.07
0.14	0.15	0.02	0.23	0.07	0.04
0.02～0.25	0.05～0.31	0.02～0.38	0.02～0.64	0.03～0.16	0.01～0.06
7.8	7.3	7.9	8.9	3.2	4.4
6.6 ～10.2	5.9 ～9.6	6.1 ～9.9	5.9 ～14.1	2.8 ～4.1	3.4 ～5.6
223	182	250	130	107	120
182～255	141～244	205～318	92～209	97～127	101～145
77	65	104	42	36	40
66～ 84	52～ 82	70～186	20～ 99	30～ 43	33～ 51
0.03	0.03	0.11	0.04	0.06	0.01
0.00～0.12	0.00～0.10	0.00～0.42	0.00～0.10	0.00～0.13	0.00～0.04
75×10	37×10	11×10^2	70×10	35×10	11×10
$15\sim24\times10^2$	$11\sim17\times10^2$	$15\sim82\times10^2$	$69\sim19\times10^2$	$0\sim12\times10^2$	$4\sim38\times10$
46×10^2	17×10^3	44×10^2	26×10^3	36×10^2	12×10^2
$20\times10\sim20\times10^3$	$11\times10\sim94\times10^3$	$12\times10\sim20\times10^3$	$40\times10\sim24\times10^4$	$22\times10\sim17\times10^3$	$39\sim24\times10^2$

みられる．一方塩素イオン，硬度は定点3と5に濃度のピークがみられるが，負荷量のピークはみられない．このことは，前者は沈殿，吸着等の自浄作用[6]をうけており，これに対して後者は，希釈による影響の大きいことが推定される．特に定点5は，各項目の濃度，負荷量とも飛躍的に増加しているが，これは定点5に近接している上流域に最も人口が集中しており，そのため排水の流入量の多いことが原因となっている．

今回調査した日の出町における平井川の過去の水質測定データは，ほとんど報告されていない．そこで 5 km ほど下流の多摩川合流点における平井川の水質測定データを図 4[7,8] に示した．この資料から，昭和42年頃から汚濁が進行しつつあることがわかる．これはほぼ平井川の下流域に人口が増加し始めたのと一致している．これに対して日の出町の人口の推移は，昭和45年頃から増加しつつあり，この現象と平行して，排水路が整備され，さらにし尿の浄化槽処理も普及[9]し，家庭用雑排水や浄化槽放流水が直接河川に流入するようになったため，日の出町を流れる平井川の水質汚濁も進行したものと思われる．このほか，全町の簡易水道の完成によって，使用水量が増加したことも一つの因子であろう．

2. 水道原水　今回の浄水場の原水の水質と昭和38年以降当研究所で分析した資料とを表4に示した．この資料では原水の汚染の進行は，ほとんどみられない．この理由として，浄水場より上流の地域は，過去十数年間ほとんど人口の変動がなく，浄化槽の設置数もごく限られており，多少の汚染があったとしても，伏流水であるためその影響を直接うけにくいことが考えられる．一般細菌数についてみた場合，浄水場に近接した河川水に比較して，原水はかなり低い値を示している．

3. 浄化槽放流水　表5に各浄化槽の水質測定結果の年間平均値および範囲を示した．pH，総硬度を除いて，各項目とも最高値と最低値の差が著しいことが特徴である．浄化槽の管理状況を BOD 値と大腸菌群数からみると，各浄化槽とも平均値は 20 ppm 前後であるが，時時突発的に高い値を示し，浄化槽の管理の難しさがわかる．町では平井川が漁業水域となっているため，BOD 5 ppm で規制しているが，この数値を維持するには，当然三次処理を行なわなければならない．また大腸菌群数については，No 3 以外はほとんどの月が検出しており，一般細菌数とともに高い値を示している．

今回の河川水水質調査において，定点9に浄化槽放流水の影響がみられ，アンモニア性窒素，りん酸イオンが他の定点に比べて高くなっている．その原因は，浄化槽放流水（浄化槽 No 3, No 4 が上流に設置されている）の排水量が，家庭雑排水に比べて，圧倒的に多いためと

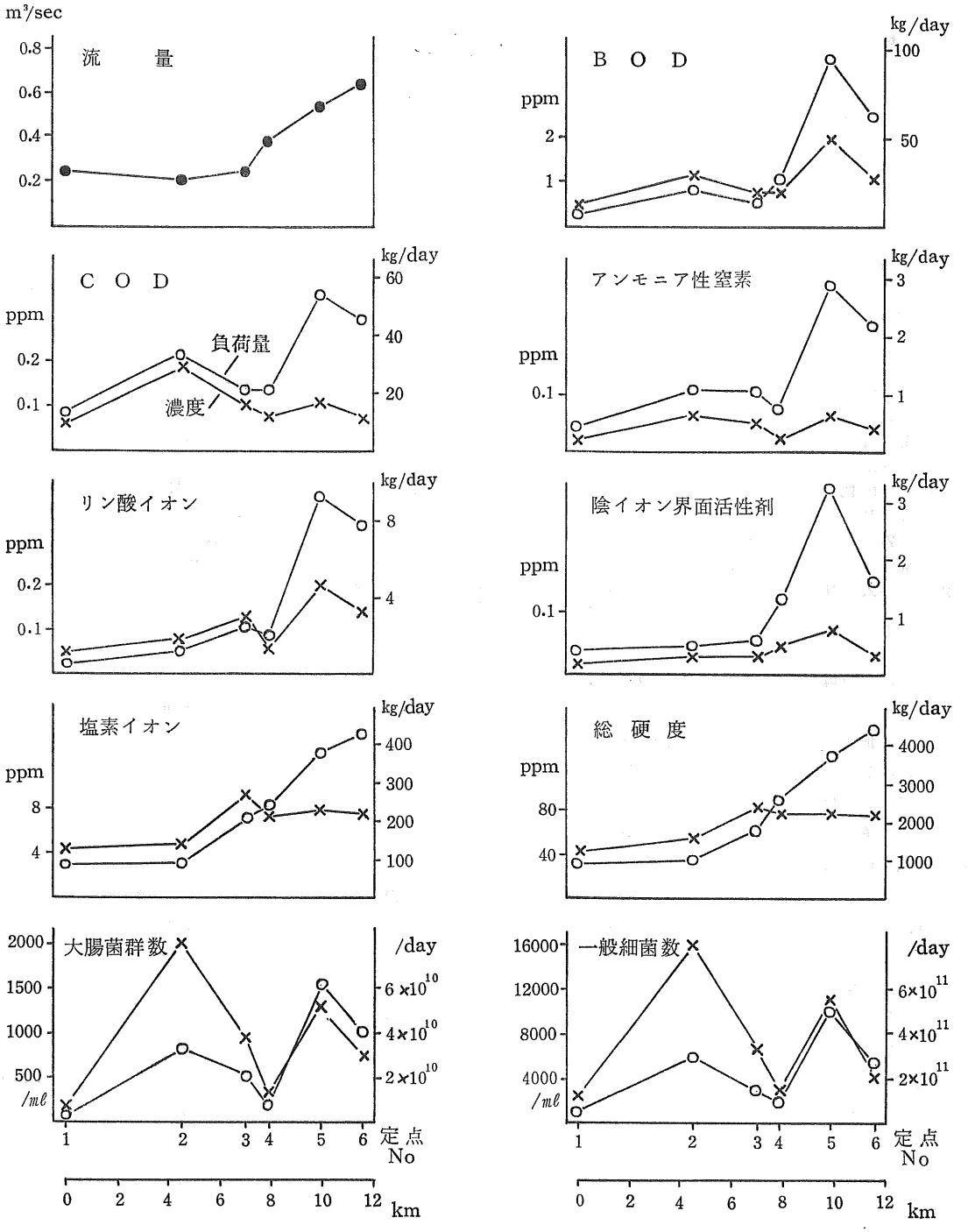


図 3　平井川の流量，濃度，負荷量の関係

表2　日の出町の人口推移

年度	30	40	45	46	47	48	49	50	51
人口	8485	8152	8520	8836	9387	9843	10269	11001	11396

（日の出町役場資料）

表3　日の出町の浄化槽設置届出数

年度	13	30	39	40	42	44	45	46	47	48	49	50
事業所	1	2	1	1	1	2	1	5	4	8	3	4
一般家庭	0	0	0	0	0	0	2	0	8	8	27	25

（日の出町役場資料）

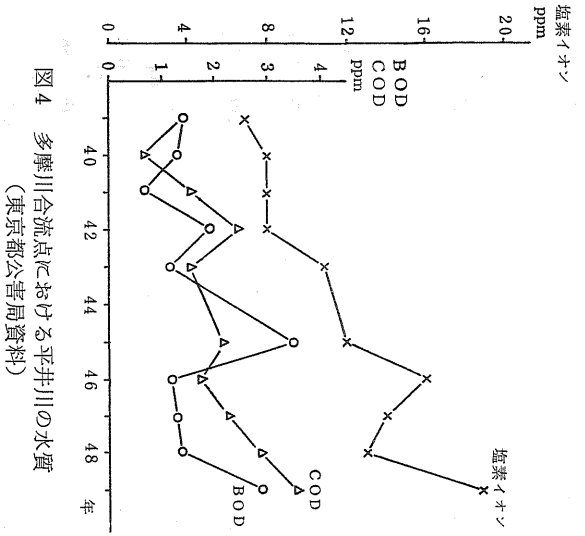


図4　多摩川合流点における平井川の水質（東京都公害局資料）

表4　浄水場原水の水質

	幸神浄水場									落合浄水場						
採水年月	38.1	41.2	47.2	47.10	48.4	49.8	50.4	50.7	50.10	45.2	47.2	47.10	48.4	50.4	50.7	50.10
pH	6.7	7.0	7.2	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.2	7.2	7.3	7.2	7.2	7.2	7.3
過マンガン酸カリウム消費量 (ppm)	0.9	0.8	0.9	0.6	1.5	1.2	0.7	0.7	0.8	1.0	0.5	0.5	0.3	0.2	0.2	0.1
アンモニア性窒素	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
亜硝酸性窒素	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
硝酸性窒素 (ppm)	2.5	1.0	4.5	1.0	2.0	1.5	2.5	3.0	1.5	3.0	5.5	3.0	5.0	3.5	5.0	1.5
塩素イオン (ppm)	8.7	9.1	3.5	7.0	6.3	4.3	2.8	6.4	4.2	7.8	5.7	7.7	7.7	5.7	8.5	5.6
総硬度 (ppm)	100	82	92	96	106	92	90	100	94	84	84	90	82	82	80	80
蒸発残留物 (ppm)	131	163	151	135	125	152	141	216	167	132	148	127	121	158	179	150
鉄 (ppm)	0.04	0.04	0.06	0.04	0.15	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.04	0.06	0.02	0.02
陰イオン界面活性剤 (ppm)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
大腸菌群数 (50 m*l*中)	+	+	+	+		+	+	+	+		−	+		−	+	+
一般細菌数 (1 m*l*中)	4	2	45	30		26	14	11	34		6	1		6	0	2

表5 浄化槽放流水の水質

	No. 1 大久野病院 172 人槽	No. 2 日の出ケ丘病院 350 人槽	No. 3 芳洋会佳伸苑 150 人槽	No. 4 泉会日の出舎 85 人槽
pH	7.9 6.8～12.2	7.4 6.4～8.1	7.9 7.3～8.6	7.5 6.9～8.0
BOD (ppm)	26.8 1.8～139	20.4 3.1～45.0	22.1 1.3～98.0	13.5 3.7～55.0
浮遊物質 (ppm)	52 2～223	61 0～191	11 1～29	10 0～53
アンモニア性窒素 (ppm)	2.7 0.30～11.0	4.6 0.14～17.4	27.0 0.72～43.4	10.1 0.70～20.6
リン酸イオン (ppm)	3.1 0.27～ 7.0	2.4 0.32～ 5.7	5.2 0.10～14.2	3.7 0.66～10.0
塩素イオン (ppm)	32.1 24.6～41.3	43.8 38.2～67.5	38.6 9.5 ～49.8	33.3 25.9～42.4
導 電 率 ($\mu\mho$/cm)	441 327～566	470 368～588	602 259～847	490 377～610
硬 度 (ppm)	91 72～134	84 72～ 98	95 82～107	78 66～ 86
陰イオン界面活性剤 (ppm)	0.89 0.03～7.6	0.18 0.01～0.96	0.08 0.01～0.34	0.74 0.00～6.7
大腸菌群数 (1 ml中)	60×10^2 0 ～64×10^3	73×10^2 48×10^3～40×10^3	48×10^2 0 ～30×10^3	40×10^3 0～22×10^3
一般細菌数 (1 ml中)	48×10^3 40×10～43×10^4	44×10^3 32×10^2～34×10^4	50×10^3 $46\times56\times10^4$	14×10^3 $43\times16\times10^5$

考えられる.

結 論

今回は大都市周辺を流れる中小河川の汚濁河川へと変化しつつある小河川，平井川をとりあげて，その水質調査を行ない，その汚染状況，特徴，過程，原因を考察し，また浄化槽放流水および水道原水の水質について検討した．平井川の汚濁原因としては，次のことが考えられる.

(1) 人口の増加にともない流入する排水量が増加した.

(2) 従来汲み取り処理を行なっていたし尿を，浄化槽で処理する傾向が増加したが，その管理が不十分であった.

(3) 排水路が整備されたため，家庭雑排水が河川へ直接流入した.

(4) 簡易水道の完成によって，使用水量が急激に増加した.

以上のことから，平井川の水質汚濁は，さらに進行すると思われ，水道原水の汚染も憂慮される．そこで下水道が整備されるまでの，平井川の水質汚濁対策としては，排水路には集水桝を設置し，沈殿処理を行なったのち，河川へ放流すると同時にその管理を十分行なう．一方浄化槽で処理を行なう場合は，その管理を十分行ない，放流水の水質管理の徹底をはかる．工場排水等についても必ず排水処理を行ない，管理の徹底が望まれる.

なお定点2の汚濁原因および定点6の流量の増加については，伏流水との関係もあり，今後も調査を継続する予定である.

謝辞 本調査を実施するに当り，採水を行ない，多くの資料を提供された日の出町役場衛生課の方々に深謝いたします.

(本研究の概要は，日本薬学会第96年回名古屋大会1976年4月で発表した.)

文 献

1) 環境庁：環境白書，177，1975，大蔵省印刷局
2) 藤沢正吉，矢口久美子：第 33 回日本公衆衛生学会講演集，374，1974
3) 山本荘毅：水，(5)，28，1974
4) 本間 慎，白田和人：環境科学総合研究会第1回研究会予稿集，132，1975
5) 小野塚春吉：環境科学総合研究会第1回研究会予稿集，134，1975

6）和田安彦，中山不二雄，児島　猛：用水と廃水，18，179，1976
7）東京都公害局：都内河川内湾の水質調査資料，1974
8）東京都公害局：都内河川内湾の水質，1972，1973，1974
9）石橋多聞：飲み水の危機，90，1970，東京大学出版会

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 27-1, 350—354, 1976

Plesiomonas shigelloides の生態学的研究
2 健康人および各種動物における本菌保菌状況

池島伸至*, 新井輝義*, 楠　淳*, 神　真知子*
伊藤　武**, 坂井千三**

Ecological Surveys of *Plesiomonas shigelloides*
2. The Isolation from Intestinal Contents and Mesenteric Lymph Nodes of Domestic Animals, Dogs and Cats and Faeces of Human Being

NOBUYUKI IKEJIMA*, TERUYOSHI ARAI*, JUN KUSUNOKI*, MACHIKO JIN*, TAKESHI ITOH** and SENZO SAKAI**

A survey was conducted to see the distribution of *Plesiomonas shigelloides* in total of 10,529 specimens, consisting of 9,196 human faeces, 513 intestinal contents of cattle, swine and poultry, and 820 intestinal contents and mesenteric lymph nodes of dogs and cats.

P. shigelloides was isolated from 20 (3.6%) out of 551 intestinal contents and mesenteric lymph nodes of symptomless dogs and 25 (9.3%) out of 269 intestinal contents of cats. The organism was not isolated from the human being, cattle, swine and poultry.

62 strains isolated from dogs and cats were typed to 17 serotypes. Predominant serotypes of the dogs isolates were O8 : H2, 017 : H2 and O28 : H3, and those for cats were O3 : H2, O18 : H2, O29 : H3 and O30 : H1. On the other hand, most of the serotypes were found to be a similar pattern with the strains isolated from human gastroenteritis due to *P. shigelloides*.

緒　言

Plesiomonas shigelloides（以下 *P. shigelloides* と略す）は Ferguson ら[1] によって最初ヒトの下痢症例から分離された．その後 Schmid ら[2]，Sanyal ら[3]，Sakazaki ら[4] および堀ら[5] などによって本菌と下痢症との関連が検討されている．

一方著者らは，*P. shigelloides* の生態学的研究を意図し，前回はその一環として東京都内の河川水および淡水魚腸管内容物における本菌の分布を調査した．その結果，河川水や淡水魚腸管内容物から *P. shigelloides* が検出され，本菌の分布はかなり広範囲であることが示唆された[6]．今回はさらに，健康人，家畜，家禽，イヌおよびネコにおける本菌の保菌状況を調査したので，その成績を報告する．

調査対象および方法

1. 被検材料

健康人ふん便：1975年2月～1976年6月の期間に赤痢菌およびサルモネラの保菌者検索用として当研究所に搬入された東京都内在住の健康成人 9,196 名のふん便を対象にした．

ウシ，ブタおよびニワトリ：1975年11月～1976年6月の期間に東京都内某と畜場で解体されたブタ 310 頭およびウシ 105 頭の直腸内容物あるいは回盲部内容物である．ニワトリは東京都内の某食鳥肉処理所で解体されたニワトリ 98 羽の直腸内容物および盲腸内容物を被検材料とした．

イヌおよびネコ：1974年10月～1975年12月に東京都内2箇所の犬管理事務所で殺処分されたイヌ 551 頭およびネコ 269 頭の直腸内容物，回盲部内容物および腸間膜リ

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

ンパ節である.

2. *P. shigelloides* の分離同定

各被検材料からの本菌分離方法は，前報[6]に従った．すなわち，ＳＳ寒天平板，DHL 寒天平板またはマッコンキー寒天平板に直接塗抹し，37°，18～24 時間培養した．各平板培地に出現した *P. shigelloides* と疑われる集落について，前報と同様に Ewing ら[7]の方法に従って詳細な各生化学的性状検査を行ない同定した．*P. shigelloides* と同定された菌株の血清型別は，国立予防衛生研究所の坂崎利一博士および島田俊雄技官に依頼した．

3. 薬剤感受性試験

腸内細菌研究班の方法[8]に従い，寒天平板を用いた定量希釈法により行ない，最小発育阻止濃度（MIC）を求めた．供試薬剤は，Streptomycin (SM), Chloramphenicol (CP), Tetracycline (TC), Kanamycin (KM), Aminobenzylpenicillin (AB-PC) および Nalidixic acid (NA) の6剤である．

成　績

1. 各種材料からの *P. shigelloides* の検出状況

各種材料からの *P. shigelloides* の検出状況を Table 1 に示した．

イヌ：イヌは 551 件中 20 件から *P. shigelloides* が検出され，その陽性率は 3.6% であった．陽性例のうち2件については直腸内容物と回盲部内容物から同時に本菌が検出され，他の18件は回盲部内容物，直腸内容物および腸間膜リンパ節のいずれかの部位から本菌が検出された．各被検材料ごとの検出率は Table 1 に示すごとく，回盲部内容物は 2.1%，直腸内容物では 1.5%，腸間膜リンパ節は 1.6% であった．

ネコ：ネコは 269 件中25件から本菌が検出され，その陽性率はイヌの場合よりやや高く 9.3%であった．陽性例25件は回盲部内容物および直腸内容物のいずれか一方の部位から本菌が検出され，その検出率は回盲部内容物では 1.9%，直腸内容物では 7.4% であった．腸間膜リンパ節はすべて陰性であった．

ブタ，ウシおよびニワトリ：ブタ直腸内容物 310 件，ウシ回盲部内容物48件および直腸内容物 105 件，ニワトリ盲腸内容物および直腸内容物各98件からは *P. shigelloides* は検出されなかった．

健康人：健康成人ふん便 9,196 件からも本菌は検出されなかった．

2. 分離菌株の生化学的性状

イヌおよびネコから検出された 62 菌株の *P. shigelloides* の主要生化学的性状は Table 2 に示すとおりである．イヌおよびネコ由来株の生化学的性状は特に差異は認められない．分離菌株はブドウ糖を発酵的に分解するがガス非産生，ＶＰ反応陰性，チトクロム・オキシダーゼ陽性，イノシットを分解するがマンニットは非分解，リジン脱炭酸試験陽性であった．これらの性状は前報[6]の河川水や淡水魚由来株の諸性状とまったく一致している．

3. 分離菌株の血清型別

分離菌株の血清型は Table 3 に示すごとく，イヌ由

Table 1. Isolation of *P. shigelloides* from dogs, cats, swine, cattle, poultry and human being

Material	No. of examined	No. of positive (%)
Dogs		
Cecal contents	374	8 (2.1)
Rectum contents	551	8 (1.5)
Mesenteric lymph nodes	374	6 (1.6)
Cats		
Cecal contents	269	5 (1.9)
Rectum contents	269	20 (7.4)
Mesenteric lymph nodes	269	0
Swine		
Rectum contents	310	0
Cattle		
Cecal contents	48	0
Rectum contents	105	0
Poultry		
Caecum contents	98	0
Rectum contents	98	0
Human being		
Faeces	9,196	0

Table 2. Biochemical characteristics of strains isolated from dogs and cats

Test	Dogs (29 strains)		Cats (33 strains)	
	+	−	+	−
Indol	29	0	33	0
Voges-Proskauer	0	29	0	33
Methyl red	29	0	33	0
Citrate, Simmons'	0	29	0	33
Hydrogen sulfide (TSI)	0	29	0	33
Urease	0	29	0	33
Gelatin	0	29	0	33
Lysine decarboxylase	29	0	33	0
Arginine dihydrolase	29	0	33	0
Ornithine decarboxylase	29	0	33	0
Cytochrome oxydase	29	0	33	0
Glucose	29	0	33	0
Gas from glucose	0	29	0	33
Lactose	17	12	20	13
Mannitol	0	29	0	33
Inositol	29	0	33	0
Arabinose	0	29	0	33
Salicin	17	12	17	16
Trehalose	29	0	31	2
Motility	29	0	33	0

Table 3. Serotypes of *P. shigelloides* isolated from dogs and cats

Serotypes O antigen : H antigen	Dogs	Cats
1 : 2	1	
2 : 1		2
3 : 2	1	6
8 : 2	2	1
13 : 2	1	
14 : 2	1	
17 : 2	4	
18 : 2		3
19 : 2		2
19 : 3	2	
21 : 2	1	
23 : 1		1
27 : 3		1
28 : 3	3	
29 : 2		1
29 : 3		3
30 : 1		3
17 : UT*	2	
19 : UT	7	
30 : UT	2	
UT : 1		1
UT : 2	1	4
UT : 3		2
UT : 5	1	
UT : UT		3
Total	29	33

* UT=Untypable

来の29株中16株は坂崎ら[9]の血清型で9菌型に型別された．残りの13株中11株はO抗原は型別されたが，H抗原は型別不能，また2株はH抗原は型別されたがO抗原は不明であった．高頻度に型別された血清型は，O17：H2およびO28：H3であった．なお，4例の被検材料では同一被検材料から2～3種の異なる血清型菌が検出された．ネコの場合は，分離菌株33株中23株が10菌型に型別され，高頻度に型別された血清型はO3：H2，O18：H2，O29：H3およびO30：H1であった．7株はH抗原は型別されたがO抗原は型別不能，3株はOおよびH両抗原とも型別不能であった．ネコの場合においても，*P. shigelloides* 陽性例25例中7例は同一被検材料から2～4種の異なる血清型菌が検出されている．

4. 分離菌株の薬剤感受性試験

イヌおよびネコから検出された62菌株についてのSM，CP，TC，KM，AB-PCおよびNAの各薬剤に対する最小発育阻止濃度（MIC）をTable 4に示した．イヌ由来菌株とネコ由来菌株の6種の薬剤に対する感受性は同様な傾向が認められた．すなわち，CP，TCおよびNAに対してはいずれの菌株も感受性であったが，SMに対しては供試した62菌株のうち54菌株（87.0%）が耐性であり，KMに対しては15菌株（24.1%），AB-PCに対しては7菌株（11.2%）がそれぞれ耐性であった．またイヌ由来株のうち1菌株はSMに対して高濃度耐性

Table 4. Antibiotics sensitivity of *P. shigelloides* isolated from dogs and cats

Antibiotics	Source	MIC (mcg/ml)									
		> 100	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
SM	Dog	1		1	23	4					
	Cat			2	27	4					
CP	Dog					3				6	20
	Cat									6	27
TC	Dog								20	8	1
	Cat								21	11	1
KM	Dog				8	17	4				
	Cat				7	25	1				
AB-PC	Dog			4	3	4	12	4	2		
	Cat					5	16	10	2		
NA	Dog									22	7
	Cat								2	30	1

Number of tested strain was 29 cultures isolated from dogs and 33 cultures isolated from cats. SM=Streptomycin, CP=Chloramphenicol, TC=Tetracycline, KM=Kanamycin, AB-PC=Aminobenzylpenicillin, NA=Nalidixic acid

株であった.

考　察

これまでに家畜，家禽，イヌ，ネコなどからの *P. shigelloides* の分離例は極めて少なく，Schmid ら[2] がヒツジ，ヤギおよびウシから，また坂崎ら[4] は健康イヌの腸間膜リンパ節からの本菌の分離例を報告しているにすぎない.

著者らは，前報[6] において，*P. shigelloides* が河川水や淡水魚に分布することを明らかにした．その際，家畜が本菌を保菌し，家畜の屎尿やと場排水などによって河川水が本菌で汚染されたものと推察した．ところが今回の調査では，ブタ，ウシおよびニワトリからは1例も本菌が検出されず，これらの動物における本菌保菌率は極めて低いことが明らかにされた．なお，これらの調査は11月から6月に行なったもので，前報の河川水や淡水魚では冬期よりも夏期に *P. shigelloides* が高く検出される傾向が認められたことから，家畜における本菌保菌も季節的な変動が想定されるので，今後さらに調査する必要があろう.

一方，イヌやネコにおける本菌の保菌率は高く，イヌでは 3.6%，ネコは 9.3% であった．しかも，ヒトの下痢症例から検出される血清型菌[9]（O3：H2, O13：H2, O17：H2, O19：H2 および O23：H1）がイヌやネコからも多数検出されている．このことは，イヌやネコがヒトの生活と深いつながりをもつ動物であることからヒトにおける本菌感染症の重要な感染源であることを示唆する．また，堀ら[5] の *P. shigelloides* による集団下痢発生例では，成人に比して10歳未満の子供の方がはるかに発病率が高く，症状も発熱を伴う重とくなものであったことから，本菌は幼児や子供に対して感受性が高いものと思われる．従って本菌の保菌率が比較的高いイヌやネコなどの愛がん動物と接触する機会が多い幼児や子供と本菌感染症との関連については今後さらに検討する必要があろう.

著者らは，本調査期間に粘血性下痢を呈したイヌから *P. shigelloides*（O21：H2, O8：H2 および O17：H2）がふん便の直接分離培養で純培養状に検出された例を経験した．この事実から本菌のイヌに対する病原性が示唆され，その点についても今後さらに詳細な検討を進めてゆきたい.

イヌおよびネコから検出された菌株と前報[6] で報告した河川水および淡水魚由来株の生化学的性状，薬剤感受性パターンおよび血清型は極めてよく一致し，由来による特徴は認められなかった．本調査で分離された菌株の生化学的性状は Ewing ら[7] が報告した性状と極めてよく類似している．しかし，オルニチンの成績では Ewing らの分離株の45%が陽性であったのに対し，著者らの分離株では全株とも陽性であった.

P. shigelloides のヒトからの検出例は，大部分が下痢症患者や集団下痢症例[1-5,9-13] からであって，本菌の健康人における保菌状況についてはほとんど検討されていない．著者らはヒトの保菌実態を明らかにする目的で検討したが，東京都在住の健康成人からは1例も検出されず，健康人における本菌保菌は極めて少ないものと思われる．ただし，今回の調査対象は18歳以上の成人に限られ，Geizer ら[14] は6歳以下の幼児のふん便756件中1件

(0.56%) から本菌を検出していることから，ヒトにおける本菌保菌率は年齢による差異があるのかも知れない．

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，過去における散発例や集団発生例の症例から疑うべくもないであろう．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もほとんど検討されていなかった．しかし，著者の本研究により，*P. shigelloides* の自然界における分布と本菌感染症の感染源の一部を解明し得たものと思われる．

結　論

P. shigelloides の生態学的研究の一環として 1974～1976年に健康成人，家畜，家禽，イヌおよびネコにおける本菌の保菌状況を調査した結果，以下の成績を得た．

1. 東京都内の犬管理事務所で殺処分されたイヌおよびネコの腸管内容物と腸間膜リンパ節について *P. shigelloides* の検索を行なった結果，イヌ551件中20件 (3.6%)，ネコ269件中25件 (9.3%) から本菌が検出された．

2. 健康成人ふん便9,196件，ブタ腸管内容物310件，ウシ腸管内容物105件，ニワトリ腸管内容物98件からは *P. shigelloides* は検出されなかった．

3. イヌおよびネコから検出された *P. shigelloides* 62菌株の血清型は17菌型に型別され，高頻度に型別された血清型は，O3：H2，O17：H2，O18：H2，O28：H3，O29：H3および O30：H1であった．

4. イヌおよびネコ由来菌株62株は，CP, TC および NA に対しては感受性であったが，SM に対しては54菌株 (87.0%)，KM に対しては15菌株 (24.1%)，AB-PC に対しては7菌株 (11.2%) が耐性であった．

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の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 N.D. Henderson: *J. Bact.*, **54**, 179, 1947
2) Schmid, E.E., T. Velaudapillai, and G.R. Niles: *J. Bact.*, **68**, 50, 1953
3) Sanyal, S.C., S.J. Singh, and P.C. Sen: *J. Med. Microbiol.*, **8**, 195, 1975
4) Sakazaki, R., S. Funaoka, R. Nakaya, and H. Fukumi: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **12**, 355, 1959
5) 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
6) 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：東京衛研年報，**26-1**，343，1975
7) Ewing, W.H., R. Hugh, and J.G. Johnson: *Studies on the Aeromonas Group*, Communicable Disease Center Atlanta, Georgia, United States, Public Health Service, 1961, 1972
8) 善養寺浩，坂井千三：腸管系病原菌の検査法，111，1967，医学書院，東京
9) 島田俊雄，坂崎利一：日細菌誌，**29**，95，1974
10) 上田貞善，山崎茂一，堀　道紀：日本公衛誌，**10**，67，1963
11) Graevenitz A.V. and A.H. Mensch: *New Eng. J. Med.*, **278**, 245, 1968
12) 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
13) Cooper R.G. and W.B. Geraldine: *J. clin. Path.*, **21**, 715, 1968
14) Geizer, E., K. Kopecky, and E. Aldova: *J. Hyg. & Epidemiol.*, **10**, 190, 1966

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

Amino Acid Composition and an Unusual Heat-stability of *Vibrio parahaemolyticus* Enteropathogenic Toxin

H. Zen-Yoji, Y. Kudoh, H. Igarashi, K. Ohta and T. Hoshino: *Proceedings of the 10th Joint Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel*, 249-260, 1975

Amino Acid composition and an unusual heat-stability of *Vibrio parahaemolyticus* purified enteropathogenic toxin were investigated.

The toxin was composed of 18 amino acids, and number of amino acid residues was estimated to be 352, when calculated from the value of molecular weight of 45,000. The toxin had only one N-terminal phenylalanine, and the sequence of the first 38 amino acid residues from the N-terminus was determined.

It was also demonstrated that purified toxin had peculiar thermostability. That is, heating of the toxin at 60C resulted in complete inactivation of hemolytic activity, mouse lethality, gunea pig skin reactivity with antisera, but heating at 100C exhibited no such effects. When the toxin inactivated at 60C was reheated at 100C-heated toxin were markedly diminished by subsequent heating at 60C.

By polyacrylamide gel disc electrophoresis, it was proved that heating at 60C induced aggregation of the active toxin to an insoluble non-toxic form, and that reheating at 100C resulted in partially reversal reaction with the release of soluble active toxin.

Thus, it is conclusive that the paradoxical behavior of *Vibrio parahaemolyticus* enteropathogenic toxin by heating is due to a change of the toxin molecules.

腸炎ビブリオ腸管病原毒素の産生条件の検討と毒素の熱安定性 1. 産生毒素の定量的測定法と毒素の産生条件について

太田建爾：感染症学雑誌，49 (12)，825，1975

腸炎ビブリオ感染症における下痢の発現には，この菌が産生する外毒素性の病原毒素が主役を演じていることが最近著者らにより明らかにされた．

そこで腸炎ビブリオ中津川株の培養上清より得られた腸管病原毒素の定量的検出法として，抗精製毒素血清を利用した Oudin 法および我妻血球寒天平板を用いた溶血法について検討した．その結果，Oudin 法では 1 μg/ml の毒素量を検出する事が可能であったが，溶血法では最少検出毒素量は 3 μg/ml であった．

さらに，腸炎ビブリオの毒素産生を，培地の種類，培養温度，通気，塩化ナトリウム濃度，振とう速度，培養時間の諸条件を上記の方法を用いて検討した．その結果，毒素産生の至適条件は 5 %塩化ナトリウム加 2 %ペプトン水で，35°C，18時間の振とう培養（振幅 10 cm，120回/分）であった．この培養条件は，患者，海産食品あるいは海水から分離された神奈川現象陽性株，30株の全てで本毒素の産生が証明され，その産生毒素量は 2.5～32.0 μg/ml であった．これに対して，保菌者あるいは海産物から分離された神奈川現象陰性株，10株では本毒素の産生は認められなかった．

さらに，30株の神奈川現象陽性株により産生された毒素は，中津川株由来の毒素と免疫学的に同一であることが確認された．

腸炎ビブリオ腸管病原毒素の産生条件の検討と毒素の熱安定性 2. 本毒素の生物活性，免疫学的性状および物理化学的性状に及ぼす熱の影響について

太田建爾：感染症学雑誌，49 (12)，834，1975

腸炎ビブリオ中津川株より得た腸管病原毒素の生物活性，免疫学的性状および物理化学的性状に及ぼす熱の影響について検討した．その結果，精製毒素は特異な耐熱性を示し，60°C の加熱により，その溶血活性，マウス致死性，モルモット皮内反応は完全に不活化された．また，抗毒素血清を用いたゲル内沈降反応による抗体反応性も失活した．しかしながら，100°C 加熱毒素では，これらの諸活性は安定であった．さらに，60°C の加熱により失活した毒素を，100°C で再加熱すると活性の復元が示されたのに対して，100°C 加熱で安定であった毒素は，60°C の再加熱により，その諸活性は失活した．

上記の現象をポリアクリルアミド・ゲル・ディスク電気泳動により検討した結果，60°C の加熱毒素では毒素分子が aggregation を起して不溶化し活性が消失するが，100°C の再加熱では，この aggregate からの可溶性の活性毒素の部分的な解離が認められた．

この様に，腸炎ビブリオ腸管病原毒素の加熱に対する特異的な態度は，毒素分子の構造変化によることが示唆された．

小児 *Yersinia* 感染症，特にその臨床症状について

篠塚輝治，河野陽一，今井トシエ，善養寺浩，丸山務：日本小児科学会雑誌 80 (5)，342—348，1976

1972年11月から1974年10月までの2年間，都立墨東病院の小児科外来患者1156例について病原菌の検索を行ない，20例の *Yersinia* 症を確認した．この陽性率（1.7%）は赤痢のそれ（0.3%）よりも高く，小児下痢症の中で *Yersinia* 症の重要性を示唆するものである．

Yersinia が検出された20例の患者の臨床症状は下痢（100%），発熱（95%），腹痛（55%）が主で，その他嘔気（30%），嘔吐（20%），発疹（20%）などもみられ，また鼻汁，咳咽頭痛などの上気道症状は20例中15例（75%）に認められた．

Yersinia enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis

善養寺浩：*Medical Technology* 4 (6)，435，1976

最近注目されている病原菌の1つの知識として，*Yersinia enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の感染症，菌学および検査法について解説した．

ブドウ球菌食中毒原因菌の菌型とエンテロトキシン産生

寺山武：モダンメディア，21，436，1975

ブドウ球菌食中毒ならびに食中毒と関係のない各種由来黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型とそれらのエンテロトキシン産生性について検討した成績を述べた．食中毒由来菌のコアグラーゼ型がII，III，VI，VII型に限られるのに，これら以外の型の菌の自然界における分布に違いがみられないことから，食中毒原因菌はこれら4コアグラーゼ型のものに限られるであろうと推論したが，エンテロトキシン産生においてはコアグラーゼI，IV，V型菌も，II，III，VI，VII型菌とまったく変らないという結果が得られ，私共の推論には大いなる矛盾を生じた．こうした矛盾があるにもかかわらず，なぜ食中毒事件では限られたコアグラーゼ型の菌だけが認められるのか，これは現在謎として残されている．

黄色ブドウ球菌 No. 100 の変異株が産生するエンテロトキシン A の精製とその性状

山田澄夫，五十嵐英夫，寺山武：日本細菌学雑誌，31，409，1976

多量の高純度ブドウ球菌エンテロトキシンAを得るために，*Staphylococcus aureus* 13N-2909 株を用い，4% NZ-amine 培養上清を出発材料として，Amberlite CG-50 および CM-cellulose chromatography と Sephadex G-75 のゲル沪過によって本毒素の精製を試み，得られた精製毒素の物理化学的性状を検討した．前記培養上清 80 *l* から，3段階だけの精製操作により 99% 以上純化された精製毒素 380 mg が得られ，その回収率は約36%であった．

精製毒素は核酸，炭水化物および脂質を含まず，277 nm に極大吸収，250 nm に極小吸収をもつ典型的なタンパクであった．精製毒素の沈降定数（S_{20w}）は 2.71 S，分子量はSephadex G-75 のゲル沪過で 26,000，SDS-polyacrylamide gel 電気泳動で 27,000，沈降平衡法で 30,000 と推定された．精製毒素は isoelectrofocusing で pH 7.0 と pH 6.5 の2つの大きな画分と pH 8.0 の小さな画分に分画された．

精製毒素の血清学的反応性は60C 3時間および80C 5時間の加熱によって50%，100C 2時間の加熱によって完全に失活した．この50%失活が80Cより60Cでより早く起ることが注目された．

精製毒素は214のアミノ酸残基から成り立っていることが推定された．

Experimental Diarrhea in Cynomolgus Monkeys by Oral Administration with *Clostridium perfringens* Type A Viable Cell or Enterotoxin

T. Uemura, G. Sakaguchi, T. Itoh, K. Okazawa and S. Sakai: *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 28 (3), 165–177, 1975

Purified *C. perfringens* type A enterotoxin fed orally in an amount of 5 mg caused both vomiting and diarrhea in the monkey only when the gastric juice had been neutralized. Exposure of enterotoxin to pH 4.0 or below rapidly destroyed the activity. All three monkeys receiving sodium bicarbonate and 2.4×10^{10} viable cells grown in DS medium developed diarrhea, and only one of them vomited once. The diarrhea lasted for 13, 18 and 19 hr. The symptoms were similar to those reported in human cases of *C. perfringens* food poisoning. These results have confirmed that *C. perfringens* food poisoning should be categorized as a true "intravital intoxication".

The reversed passive hemagglutination test detected enterotoxin directly in most fecal samples. This method may be applicable for diagnosis of human cases of *C. perfringens* food

poisoning.

健康人からの *Edwardsiella tarda* および硫化水素産生性大腸菌の検出

寺山武，善養寺浩，小野川尊，天野祐次，鈴木健：感染症学雑誌，**50**，10，1976

1973年1～12月の1年間に東京都内の学童255,896名と食品取扱者97,704名について腸管病原菌の検索を行なった際に，TSI 寒天と LIM 培地を用いた簡易同定試験の結果から *E. tarda* と推定される菌を92株検出した．

これらの菌株について精細な生化学的性状を調べた結果，*E. tarda* と同定されたもの26株，H_2S を産生する以外は大腸菌の性状を示す菌群66株とに分けられた．

E. tarda と H_2S 産生性大腸菌とは食塩耐容性において明瞭に区別された．

E. tarda は成人1例（0.001%）学童25例（0.01%）から H_2S 産生性大腸菌は成人9例（0.01%），学童57例（0.02%）から検出された．*E. tarda* および H_2S 産生性大腸菌は成人よりも学童の方からより多く検出された．

E. tarda および H_2S 産生性大腸菌は4～11月の間に検出されたが，1～3月および12月には1例も検出されず，季節的分布が示された．*E. tarda* には抗生剤耐性菌は少なく，26株中わずか1株が SM 100 μg/ml 以上の耐性を示したにすぎなかったが，H_2S 産生性大腸菌66株中41株（62.1%）は耐性菌であった．H_2S 産生性大腸菌の耐性パターンはSMやTC単剤，SM・TC2剤のものが多かった．

細菌性赤痢とその類似疾患に対する Fosfomycin の治療成績

善養寺浩，寺山武ら：感染症学雑誌，**49**，843，1975

われわれは細菌性赤痢とその類似疾患426例について，FOM の治療効果を検討するとともに，これらの患者から分離された赤痢菌126株とサルモネラ79株，および腸炎ビブリオ5株について諸種抗菌剤および FOM に対する試験管内感受性を測定し，つぎの成績を得た．

1. 患者分離株についての FOM 感受性をみると，赤痢菌，サルモネラ，腸炎ビブリオともに 50～100 μg/ml の MIC を示すものはなかったが，フレキシネル菌以外はいずれも比較的高い値（ソンネ菌 12.5 μg/ml，サルモネラ 3.12～1.56 μg/ml，腸炎ビブリオ 25 μg/ml）を示すものが多かった．

2. 細菌性赤痢，腸炎ビブリオ腸炎，病原大腸菌腸炎に，細菌学的，臨床的にすぐれた効果を示し，とくに細菌性赤痢では対排菌有効率97.5%というきわめて良い成績が得られた．

3. サルモネラ腸炎については，除菌の面からのみいえば必ずしも満足すべき成績ではない（67.8%）が，臨床成績を含めて，現在本疾患に常用される他の薬剤の成績と勝るとも劣らない成績が得られた．

4. 副作用は軽微で，特に投薬を中止するにいたったものは1例のみであった．9.4%にみられた軟便持続は，投与終了後速やかに回復した．造血機能，肝機能および腎機能に対する影響はほとんどみられなかった．

感染性腸炎に関する研究　その7　新しく注目された感染性下痢症

善養寺浩：綜合臨床，**25**（5），1402—1407，1976

赤痢診定患者で赤痢菌を含む既知病原大腸菌が検出されないもののなかには，その症候から細菌感染と推測される事例が多い．今後これらの原因を追求するため最近注目されはじめた菌について細胞侵入型腸炎と毒素型腸炎に分け，前者には *Yersinia, Edwardsiella tarda*，後者として大腸菌 O158，*Klebsiella pneumoniae* A型ウェルシュ菌，*Bacillus cereus* についての考察を試みた．

日本における食中毒の近況

辺野喜正夫：昭和医学会雑誌，**35**（6），444—453，1975

わが国における食中毒の発生状況を1950年より1974年まで分析した．その顕著な変化として第1に死亡者の著しい減少があげられる．第2に食中毒の原因物質は，1950年代は自然毒による食中毒の比率が高かったが，1960年代になり急に細菌性食中毒の比率が上昇しその傾向は一層高まりつつある．第3は食中毒の大部分を占める細菌性食中毒の原因菌はサルモネラから腸炎ビブリオが主体になり，現在腸炎ビブリオ（56%），ブドウ球菌（28%），サルモネラ（10%），病原大腸菌（2%），その他（3%）の順となっている．第4に原因究明率は1960年頃まで25%であったが，1961年を境に急に好転し，1961年33%，1965年55%，1970年以降約67%に上昇した．第5に事故の規模は細菌性，化学性および自然毒による食中毒の順であるが，致命率はその逆の関係にある．第6に化学物質による食中毒は1950年代前期まで全原因物質の約20%を占めていたが，次第に減少し，現在は年間5～10件程度にすぎない．以上の分析結果の原因等について考察し，併せて食中毒原因細菌の推移についても総括して述べた．

細菌性食中毒（綜説）

辺野喜正夫：感染症，6（3），81—88，1976

細菌性食中毒について，その定義と分類，発生状況，おもな細菌性食中毒（サルモネラ，ブドウ球菌，ボツリヌス菌，腸炎ビブリオ，病原大腸菌，ウェルシュ菌およびその他の細菌による食中毒）について最近の発生状況，病原性，特徴等についてやや詳しく述べ，併せて予防についても触れた．

わが国のおもな細菌性食中毒の動向

辺野喜正夫，坂井千三：日本公衛誌，23，258，1976

わが国でみられる細菌性食中毒のうち，発生頻度と危険性の点から重視されるものは，ブドウ球菌，サルモネラ，腸炎ビブリオおよびボツリヌス菌による食中毒である．そこで本報では，これらの食中毒の現況と問題点およびその予防について解説した．

食品衛生検査

坂井千三，寺山武：検査と技術，4，297，1976

食品衛生検査の意義とその概要について述べたが，紙面の都合で詳しい試験検査法について述べることはできなかった．食品細菌検査に関しては臨床検査技師教育において重要な教科である微生物学と，その検査法の知識技術がそのままフルに活用されるので，この面についてそれほど詳しい記載がなくとも，読者には十分理解していただけると思う．食品衛生検査の分野が衛生検査技師や臨床検査技師の活躍の場であることを，一人でも多くの方々に理解していただければ著者の望外の喜びである．

ファージ型別（phage-typing）

潮田弘：検査と技術，4，146，1976

多くの病原細菌は生化学的性状や血清学的型別により細かい分類がなされている．しかしながら，中にはこれらの方法による分類，型別が極めて困難か，あるいは不可能な場合がある．他の方法として，バクテリオファージの持つ宿主特異性を利用したファージ型別（phage-typing）法がある種の菌に適用されていることを述べた．

生化学的性状などにより菌種までの同定は比較的容易であるが，それから先，血清型別法などが確立されていないものの一つに黄色ブドウ球菌がある．そこで，国際的に最も普及し，利用度の高い，黄色ブドウ球菌のファージ型別法を紹介した．高力価のファージを得るための増強法および型別不能株の取扱いなどについて述べた．

東アフリカにおける肝疾患とかび

板倉英世，山下裕人，瀬戸口智彦，寺尾英夫，神田哲郎，川崎洋介，水沼武二，一言広，諸角聖，和宇慶朝昭：*Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, **No. 2**, 22, 1976

肝硬変をはじめそれに関連する肝疾患の発生要因および病変像について，我々はマイコトキシンや肝炎などの観点から実験的に，また病理解剖学的に検索をすすめている．目下，世界的に肝疾患の多発地帯の一つである東アフリカ（ウガンダ，ケニア）において食品に着生する真菌類の分離およびその毒性を検索する一方，肝疾患患者の肝生検や病理解剖をおこなうことによって毒性真菌類の分布や肝炎罹患の実態を疫学的に調査したその成績について報告した．

1975年秋に発生したインフルエンザ流行の検索成績と病因となったA香港型ウイルスのHA抗原分析

岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子：臨床とウイルス，4（2），93，1976

東京都内における1975年秋～76年2月までのインフルエンザ流行を，ウイルス学的および血清疫学的に究明し結果の分析から流行実態，流行推移ならびに大流行に発展した要因について考察した．

また，今次流行のウイルス株を含めたA香港型インフルエンザウイルス株のHA抗原分析をおこない，その結果からA香港型ウイルスHA抗原は免疫学的に独立した少なくとも3種のHA単位の複合体であり，3者の含有比率の変化に応じて抗原特性が変化するという仮説をのべた．

東京都におけるA型インフルエンザ流行について　その実態と分離ウイルスの抗原分析

岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子：日本医事新報，(2709)，43，1976

1975年秋の都内発生に端を発したインフルエンザ流行は，76年初頭にかけて日本全土にまん延して数年ぶりの大流行となった．この流行に際して患者から分離したインフルエンザウイルスはいずれもA香港型ウイルスであったが，免疫学的に75年春以前の流行株とは明らかに差異があったばかりでなく，それらはいわゆるA東京75型とAビクトリア75型に細分することができた．流行前における一般都民のこれら流行ウイルスに対するHI抗体保有を調査したところ，極めて低度であった．大流行となった一要因と考える．

インフルエンザウイルス連続抗原変異の実態は現在の

ところほとんどわかっていない．著者らは，1968～75年の流行時に患者から検出したA香港型ウイルスについておこなったニワトリ免疫血清および患者血清での試験結果から，HA抗原は免疫学的に独立した数種HAの単位の複合体であり，それらHA単位の含有比率の変化に応じて抗原特性が変化するという連続抗原変異仮説を提唱し，HI価と抗原構成との関連性を数量的に究明した．

Transplacental Transmission of BK Virus in Human

F. Taguchi, D. Nagaki, M. Saito, C. Haruyama, K. Iwasaki and T. Suzuki: *Japan J. Microbiol.*, 91 (5), 395, 1975

腎移植患者の尿から分離されたBKウイルスの人体に対する病原性については全くわかっていない．

著者らは，妊婦におけるBKウイルス抗体保有状況，および胎児臍帯血中の同ウイルス抗体保有状況を解析することでBKウイルスの胎盤通過の可能性を検討した．

MCLS の病因に関する研究　1）細菌学的（特に溶連菌）およびその他の知見，2）ウイルス学的知見

根津尚光：川崎病（MCLS）研究のあゆみ，近代出版，79-80 & 94-95, 1975

細菌学的（特に溶連菌）およびその他の実験研究，ウイルス学的研究をおこない各種の知見を得たが，きめ手となる病因については，いまのところ判明していない．以上得られた知見についてその概略を報告した．

生薬の品質評価に関する研究（第1報）朮類生薬成分の比較

西川洋一，渡辺四男也，瀬戸隆子：生薬学雑誌，29 (2), 139, 1975

漢方薬物療法で繁用される朮類生薬には白朮と蒼朮があり，薬理作用に若干の違いがあるとされていて，日本薬局方（日局）でも基原によって分類しそれぞれ別条に規定している．しかしながら本邦の市場品はすべて輸入品で基原植物，産地，調製法または集荷地などにより種々の名称がつけられ，市場名および日局上の取り扱いが混乱している朮の識別法として日局はバニリン・塩酸反応による主として白朮に含まれる atractylon の反応を採用しているが，品種によって白朮以外に類似の呈色を示すものがあり，これだけでは誤認するおそれがある．そこで，朮類の品質評価を目的として精油から識別指標となる7成分を単離し，これ等を指標として薄層クロマトグラム，ガスクロマトグラムおよびガスクロマトグラムマススペクトルによって基原の明らかな標準試料と市場品を比較対照し基原的考察を行った．

近年の中国産朮類は従来の文献に表われている名称と異った商品名のものが多く，同一商品名でも必ずしも同一基原を表わすものでないので取扱い上注意を要する．なお集荷地および出荷地は基原の考察に重要な示唆を与える．日局の分類による白朮と蒼朮の識別は形態的特徴の他成分的には，バニリン・塩酸反応による atractylon の確認と，蒼朮に含まれ白朮に含まれない atractylodin の検出を併用する必要がある．

発熱性物質およびその除去に関する研究　（第一報）（体温上昇変化パターンおよび Amoebocyte Lysate Test の検討）

下平彰男：日本衛生学雑誌，30 (4), 514-519, 1975

注射剤中の Pyrogen 検出法は，現在，公定書による発熱性物質試験法にしたがって広く行なわれているが，この試験法はウサギの体温上昇値から陽性あるいは陰性の判定を行なうもので，経過時間による体温上昇変化パターンは関与していない．注射剤が Pyrogen 陽性と判定された場合の多くは細菌性 Pyrogen に由来するものと考えられるが，化学物質も見逃がすことはできないと思われ，この両者は体温上昇変化パターンに相違があることが考えられる．そこで細菌性 Pyrogen 4 種および化学的 Pyrogen 3 種の最少発熱量を測定し，それら両者の体温上昇変化パターンを観察した．またカブトガニ血球抽出成分（Amoebocyte Lysate）による Pre-Gel Test がどの程度，パイロジェンを検出し得るかを検討した．その結果，細菌性 Pyrogen の最少発熱量は LPS の種類によって異なり（0.2～10^{-4} μg/kg），体温上昇変化パターンでは細菌性 Pyrogen は注射後1時間半ないし2時間にピークがみられ，2峰性でカーブがゆるやかであるが，化学的 Pyrogen では注射後1時間にピークがみられ，以後急激な下降がみられた．最少発熱量における細菌性 Pyrogen に対する Pre-Gel Test はすべて陽性を示したが，化学的 Pyrogen に対してはすべて反応がなかった．また Pre-Gel Test の細菌性 Pyrogen に対する検出感度は LPS-Y では 10^{-4} μg/kg で Pyrogen Test と同じ感度が得られたが，他の LPS に対しては Pyrogen Test よりも高い検出感度が得られた．

発熱を起こす物質とパイロジェンテスト

下平彰男：薬局，27 (1), 15-20, 1976

治療を目的とした注射剤が予期せずして注射後，悪寒，

戦慄，発熱などを起こすことは甚だ好ましくないことである．これらの現象は注射剤中に溶存する微量のパイロジェン（発熱性物質）によるもので，今世紀の始め頃から多くの研究報告がある．Pyrogen は微生物の代謝産物といわれ，その発熱活性の高いものはグラム陰性菌の菌体内毒素——リン脂質多糖体（LPS)——で，化学構造は解明されており，高圧蒸気滅菌ではその発熱活性は失われない．発熱活性は LPS 抽出の菌体の種類によって異なるが，いずれも μg/kg 単位以下で，もっとも発熱活性の高いものは 10^{-4} μg/kg である．この他，広義の Pyrogen として 2-4-dinitrophenol, naphthylamin, 幻覚剤 LSD ヒマ種子毒素 Ricin などの化学物質もある．Pyrogen 検出法は 1923 年，Seibert 女史の研究報告以後，ウサギ体温による Pyrogen Test が広く行なわれており，現在，各国の薬局方にその試験法が記されている．この試験法はウサギの直腸温測定による生物実験であり，実験動物の選定，飼育環境条件，体温測定法など条件を一定にしなければならない．最近，In vitro による Pyrogen 検出法としてカブトガニ血リンパ液による Limulus Test が注目されている．この Test は操作が簡単な上，LPS 検出感度がウサギの反応よりも高い．しかし著者らの研究結果から Test に用いられる Limuls Lysate の精製純度，検液の薬剤濃度，ゲル化阻害物質などによって，Pyrogen 検出感度が一様ではなく，検討すべき問題が残されている．注射剤の Pyrogen 除去に関する研究は古くから行なわれているが，各種フィルタ・メディアの比較実験結果から高純度の活性炭を焼きつけた活性炭シャンベラン筒の利用が有効性実用性が高いものと思われる．

嫌気フィルムパウチ法による食品中のウエルシュ菌の検出

村上一，神崎政子，春田三佐夫：メディヤサークル，**20**，167，1975

1974年4月から1975年3月までの間に，一般細菌検査の目的で当研究所に搬入された生食用むき身貝類274件，畜肉を主原料とする冷凍食品類15件，ハム・ソーセージ類 151件，魚肉練り製品 15件，および都内某練り製品メーカーの提供による練り製品原料魚の〝すり身〟18件の計 446 件を対象として，A型ウエルシュ菌による汚染状況をフィルムパウチ法により調査した．

調べた食品の内，魚肉練り製品を除いてほとんどの食品が多少の差こそあれ，A型ウエルシュ菌に汚染されていた．特に，生食用のむき身貝類は，247 件中 145 件（58.7%）が10^1/g 以上の同菌に汚染されており，その汚染率が高い時期は，7～8月であった．一方，ハム・ソーセージ類からのA型ウエルシュ菌検出は，151 件中30件（19.9%）と比較的低率の汚染を示した．

また，これらの検体について，従来から行われている嫌気ジャーを用いる平板法による検査と，フィルムパウチ法による検査を同時に実施して，その検査結果を比較してみたところ，両法によって得られた成績の間にはほとんど差が認められず，フィルムパウチ法がウエルシュ菌検出のための日常検査法として十分応用し得るとの結論を得た．

最確数法による生食用むき身貝中の推定腸炎ビブリオ数の測定

村上一，神保勝彦，神崎政子，小久保彌太郎，春田三佐夫，山田満：食衛誌，**16**，247，1975

1973年6月から1975年3月まで，原則として5～10月は毎週1回，その他の月は毎月1回定期的に，東京都中央卸売市場に入荷した生食用むき身バカ貝および赤貝と，その漬水を10件ずつ採取し，腸炎ビブリオ（以下腸ビと略す）汚染の追跡調査を行った．本調査に用いた方法は，貝の場合は10倍試料液，漬水はそのまま，3本ずつの6%食塩加ペプトン水（PW）に，原液は 10 m*l* ずつ，その他は 1 m*l* ずつ接種し，35° 18時間培養後，菌の増殖が認められたものをアラビノース・コリスチン・ペプトン水（ACPW）に1白金耳移植して最確数(MPN) を求めるものである．その結果，推定腸ビ数が10^4/g レベルを越えた時期に，腸ビ食中毒患者が多発する傾向が認められた．漬水の腸ビ数の場合にもこれと同様な傾向がみられた．一方，検体中の一般海洋細菌数は年間を通じて大きな変動は認められず，10^6/g 前後を示した．

陽性反応を示した最高希釈列の ACPW から，TCBS 平板上に分離した株は，すべて神奈川現象陰性であったが，生物学的性状から腸ビと同定された．また，その抗原型を調べたところ，分離株の56.2%が既知の血清型に型別された．しかし，これら分離株の抗原型は，食中毒に関与した流行菌型と関係がなかった．

食品汚染物質と胎児　とくに有機塩素系農薬について

山岸達典：臨床栄養，**46**（5），463—470，1975

本報告は，著者が1970年以降，農薬残留の食品と母体における農薬の体内蓄積ならびに胎児への移行などの関連性について一連の実験的検討を試み，妊娠動物への β-BHC投与による胎仔への影響，牛乳および母乳中の残

留農薬の年間の推移，母体血液ならびに臍帯血液，胎便などを対象にした農薬汚染の実態調査などを実施し，その成績の概要を述べるとともに文献的考察を試み，あわせて若干の私見を述べたものである．

すなわち，母体ならびに胎児，新生児における BHC, DDT, ディルドリンなどの複合農薬の残留問題は，すでに国内で有機塩素剤の生産中止，使用禁止などの規制措置がとられていることから，一般にはその峠をこしたかのように認識されているように思われる．しかしながら過去4年間における母乳中の残留農薬の年次的推移からみて，今日もなお残留濃度には著変がみられない事実を考慮すれば，胎児，新生児の農薬汚染の実態はいまだ楽観視できない状況にある．

この母体，胎児の農薬汚染あるいは他の蓄積性化学物質との複合汚染の問題は，胎児の発育障害，奇形あるいは数世代にわたる子孫の突然変異の発現などの可能性を包蔵しており，等閑視できない問題である．

カドミウム還元法による乳および乳製品中の硝酸塩の定量法

竹葉和江，松本昌雄，春田三佐夫：東京獣医学畜産学雑誌，21/22，165-168，1975

カドミウムカラムを用いて，チーズ中の発酵調整剤（硝酸塩）の定量法への実用性を検討した．カドミウムカラムによる硝酸塩の還元力は101%で，チーズからの回収率はナチュラルチーズで85%，プロセスチーズで90%であった．本法で市販のナチュラルチーズ（15例），プロセスチーズ（18例）中の硝酸塩量を測定した結果，平均値でそれぞれ4.1 (NO_3-N 以下同じ)，4.2 ppm 検出された．また，牛乳（13例），加工乳（10例），生乳（6例），特殊調整粉乳（7例）中の硝酸塩量を測定したところ，それぞれ 0.34, 0.40, 0.33, 0.34 ppm の自然界由来と思われる硝酸塩が検出された．

乳・乳製品の損傷大腸菌群の検出法

松本昌雄，神保勝彦，村上一，春田三佐夫：食品衛生学雑誌，17(1)，85-88，1976

加熱損傷あるいは凍結損傷 *E. coli* を検出する場合，デソオキシコレート寒天や Violet red bile agar などを単一で使用するよりも tryptic soy agar を基層として，それらの選択培地を使用した方が，数倍から数千倍高い測定値が得られた．そこで，アイスクリームを対象に本法の実用性について検討したところ，公定法にくらべて高い測定値が得られた．

東京都における犬，猫およびヒトのトキソプラズマ抗体保有状況について

高橋宗和，和田信省，島崎秀雄，三浦健司，松崎修，松井政友，保坂敏行，山本力，高島利幸，三木博，梅木富士郎：東京都衛生局学会誌，57，106，1976

我々は獣医公衆衛生学の立場から，トキソプラズマ症の防疫対策を確立するため，1975年6月から12月までの7か月間に，都内で捕獲，収集された犬442頭および猫360頭のトキソプラズマ抗体保有状況を調査すると同時に，同時期に集められた一般都民血清297名を対照として，同様な調査を実施した．

その結果，犬はその 15.2%，猫は 35% がそれぞれ抗体陽性を示し，猫は犬に比較して極めて高い陽性率を示した．

一方，一般都民は，その 7.4% が抗体陽性で，高年齢層のヒトほどその抗体保有率が高い傾向がみられた．

食品中の L-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester の分析法

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：食衛誌，17(1)，78-84，1976

L-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (APM) は1974年 FDA において人工甘味料として条件付で許可された．APM はさわやかな甘味を有し，甘味度はショ糖の100～200倍といわれている．しかし水溶液中で長時間保存した場合，あるいは高温，アルカリ性または強酸性溶液中では不安定であり，甘味を失う．分解物のひとつとしてフェニルアラニンが生成されるが FDA はフェニルケトン尿症の人体への影響を考慮して，表示規定を課している．また APM については最近脳障害を起こす可能性があるとの報告もある．

この APM は我が国では食品添加物として認められていないが，近年輸入食品が多く出回っていること，また試験法が見当らないことから分析法について検討を行った．

ろ過，透析またはメタノール抽出により得た試験溶液について，定性法としてはシリカゲルまたはセルロース薄層を用いて薄層クロマトグラフィーを行った後，フルオレスカミン試薬を噴霧し，紫外線照射下で APM のけい光スポットを確認した．確認限度は 2.5 ng であった．

定量はアミノ酸アナライザー（塩基性カラム，ニンヒドリン発色）による方法を検討し，APM を添加した市販食品に応用したところ，その回収率は94～98%であった．

塩化ビニルモノマーの分析法と食品容器からの溶出に

ついて

藤居瑛，渡辺悠二：食品の包装，7(2)，36-45，1976

塩化ビニル樹脂製容器および内容食品中の塩化ビニルモノマー（VCM）の分析法，市販品における実態および東京都の対応について述べてある．

VCM の分析法については塩ビ食品衛生協議会等で定めたガスクロマトグラフ（GC-FID）法がある．しかしこの方法は VCM が常温で気体であることあるいは不揮発性である試料(プラスチック)をテトラヒドロフランに溶解したのち，その液を直接ガスクロマトグラフに注入するなど操作上いくつかの留意すべき点がある．また確認法としてガスクロマトグラフ—質量分析計による方法を検討した結果，マスフラグメントグラフィーを行うことにより VCM の確認定量ができた．この方法は GC-FID 法に比べて感度が数十倍よく，分析所要時間も迅速（約10分）である．

市販品における VCM の実態については昭和50年9月および11月に行った調査結果（269 検体）を述べてある．

斃死カモ中の塩素化炭化水素蓄積量および病理解剖所見

牛尾房雄，深野駿一，道口正雄，阿部学：日本生態学会誌，**26**，13-18，1976

1973年9月下旬から東京都葛飾区中川水域で起ったカモの集団斃死の原因追求およびこれら鳥類の農薬その他の化学物質による汚染状況の把握を目的とし，中川，荒川水域および千葉県五駄沼で死亡または衰弱したカモ18羽および対照群として北海道網走市で銃器により捕獲した8羽について，病理解剖，塩素化炭化水素蓄積量の測定を試みた．

発症したカモの剖検所見では肝臓の著しい肥大が認められ，さらに一部の個体では著しい脂肪変性が観察された．消化器系統においては小腸，大腸，直腸などの充血，弛緩などが観察された．

これらカモの有機塩素系化合物蓄積量は PCB 0.06～5.70 ppm，総 DDT 0.004～0.930 ppm，総 BHC 痕跡～0.190 ppm の範囲にあり，対照群のカモに比較し 5～70倍もの高い濃度を示した．しかし，全供試検体中これら有機塩素系化合物の最高の蓄積量を示したコガモの一試料においても，これらの総計は約 7 ppm にすぎず，現在までに知られている鳥類に対する PCB, DDT, BHC の毒性より考察すると，少なくともこれら塩素化炭化水素がカモの直接的な死因とはなりえないと判断された．

ポルフィリン体の生化学的研究（V） クレアチニン補正に関する検討

武士俣邦雄：衛生検査，25(2)，104-111，1976

一般に尿中成分の定量分析に際して，その試料性質のうえから，尿の希釈および濃縮によって生じる分析測定値の変動が問題になる．

この測定値の変動を是正する目的で，クレアチニン（Cn）は尿の濃淡による排出変動が小さいという理由にもとづき，Cn 排出量に対する尿中成分量という表現で示す補正操作が行われている．この補正効果を尿中の δ-アミノレブリン酸（δ-ALA），コプロポルフィリン（Cp）ならびにウロビリノーゲン（Ug）について詳細な吟味を行った．

1） 尿中 δ-ALA, Cp ならびに Ug の平均排出濃度は，分析測定値よりも Cn 比値において高くなった．これは，Cnの尿中平均排出濃度が，1.0 g/l 以下という低い値であったために，比算出の結果起こったことである．

2） 尿中排出 δ-ALA，Cp ならびに Ug の平均排出濃度は，分析測定値での Cp には性差がないが，δ-ALA および Ug は男性が高い．しかし，Cn 比値では3成分ともに女性が高くなった．これは Cn の平均排出濃度が，男性 0.82+0.43 g/l に比べ女性は 0.59+0.31 g/l と低いことと，他の3成分の性差が小さいことにより，比算出の結果数字上に表現されたためである．

3） 尿中排出 Cn 濃度と δ-ALA, Cp ならびに Ug の排出濃度との相関係数は正で有意性が得られたが，Cn 濃度に対する3成分の Cn 比値との相関係数は逆に負で有意性が示された．このことは，濃厚尿では腎臓における Cn 排出が優先的となり，他の3成分の排出が抑制されているためである．

以上のことから δ-ALA, Cpならびに Ug は，Cn 比算出で一時尿の濃度補正が成立すると認めることは困難である．

また，Cn 補正を行うについては，排出動態を十分に吟味した物質でなければ応用できない．

地下駐車場環境汚染の実態

佐藤泰仁，多田宇宏，青木実，溝口勲：東京都衛生局学会誌，**56**，50-51，1975

都心部における駐車場は，土地の立体的効用の面から地下階をそれに供しているのが現状で，自然換気のほとんどない準密室環境下にある．今回，5つの都営地下駐車場についての環境調査の機会を得たので，環境状態の悪いと思われる冬期に，一酸化炭素（CO）及び浮遊粉塵（S.P.M.）を中心とし，料金所内及び車路の1日の環

境状態及びその変化を把握する目的で，同時測定により実施した．

調査の結果，環境状態の良い駐車場，悪い駐車場があり，それには換気設備及び立地条件の良否が関与していた．そして汚染物の１つであるＣＯの１日の変化は粉塵量及び車の動き（出入り量）の変化と類似の傾向を示している．更に問題の多い粉塵については，粒径分布及び形態について観察すると共に，重金属分析をも行なった．

地下駐車場の料金所周辺の汚染は車の出入り量と密接なる関係があり，料金所内従事者の健康からも，悪い駐車場については給気口の設置など換気設備の改善が望まれた．

Cheyletus malaccensis Oudemans, 1903 の各期の形態

中田英吉：衛生動物，26(2, 3)，151-165，1975

ケナガコナダニを繁殖させた米の中に発見されたフトツメダニ *Cheyletus malaccensis* Oudemans, 1903 を累代飼育し，各期の形態をしらべた．

雌，雄，第２若虫，第１若虫，幼虫，卵の形態記載をし，雄，卵の形態の一部を走査電子顕微鏡写真で示した．

雌の palp の小櫛状毛の歯数の変異，palp の爪の基部突起の変異を示した．*C. fortis* と *C. malaccensis* の区別点とされた palp の爪の基部突起のちがいは種内変異と考えられる．

雄についての次の２つの比率，前背板上の中央後方の対毛間の距離をそれらの毛から同側背板上の後縁毛までの距離で割った比率と，palpal femur の長さを最大幅で割った比率との間に負の相関があった．

各期の相違点として，palp の爪の基部突起が幼若期では明瞭に２つあること，palp，胴体部，脚の若干の部分についての毛の数が幼若期では少なく，各期でそれぞれことなることなどを示した．

各期に共通する特徴として，palp に見られる大きな爪と櫛状毛，周気管の節の数，胴体部に見られる羽状毛，脚の感覚棘，脚の一部の毛の数があげられる．

Volgin (1966, 1969) のツメダニ類の各期の形態的特徴と比較し，supra-generic または supra-specific な各期の特徴として，顎体部腹面の毛，雄の rostrum 両側にある突出部，胴体部の背，腹面の毛の数，第１，４脚の一部を除いた脚の毛の数があげられる．

窒素充てんかんおよび乾燥状態下における育粉中のノコギリヒラタムシの生存能力

中田英吉，千種翠：食品衛生学雑誌，16，41-43，1975

窒素充てんおよび空気充てんの育粉かんに，ノコギリヒラタムシの成虫を入れ，温度を 15°C および 28°C に保ち，生存，繁殖能力をしらべた．窒素充てんで15°C に保存したものでは，成虫は２週間位は生存可能のものがある．

また，相対湿度 0%，27～28°C の状態で，育粉の中の成虫の生存，繁殖能力をしらべた．湿度 0%に近い乾燥状態におかれても，育粉の中のノコギリヒラタムシ成虫は，４週間以上の生存が可能である．

家庭における育粉かんへの害虫の侵入に関する調査

千種翠，中田英吉：食品衛生学雑誌，16，44-47，1975

昭和49年６月～11月に，育粉かん（ポリエチレンふた密閉かん，ねじ込みぶた密閉かん，ふたのせかん，1/4あけかん）を，都心と都下の団地，一戸建，商店５軒ずつ計30軒の家庭に２週間おき，育粉かんに侵入する害虫を調査した．その結果，含水量と侵入害虫の種類数の間には相関があり，育粉かんをおいた場所の湿気が多い場合には侵入害虫の種類も多いこと，また，ねじ込みぶた密閉かんよりもポリエチレンふた密閉かんの方が害虫侵入の頻度が少ないことがわかった．

フトツメダニ *Cheyletus malaccensis* Oudemans, 1903 の染色体

中田英吉：衛生動物，27(1)（講演抄録号），14，1976

フトツメダニ *C. malaccensis* は単為生殖的に雄のみを生じ，雄と一緒にいた雌からは，雌と雄を生じるもののあることを，著者は1972年に報告したが，それらの染色体に関する研究を行った．

スライドグラスの上で卵，成虫の gonad を aceto-orsein 染色液に浸し，カバーグラスをかけて押しつぶす方法により，染色体をしらべた．

単為生殖によって産出された卵は，異常に染色体の多い細胞の混入した卵もあったが，通常 n=2 の haploid であり，それらの卵からはすべて雄を生じた．

雄と一緒にいて，受精したと思われる雌の産出卵からは，n=2 の haploid および 2n=4 の diploid の卵が見られた．それらの雌について F_1 をしらべたところ，雌と雄を生じた．*C. malaccensis* は，n=2 の雄，2n=4 の雌を生じる産雄単為生殖（arrhenotoky）の種類と考えられる．

また，雄の testis，第２若虫（第２若虫からはすべて雌を生じる），雌の ovary の染色体をしらべた．

Local Distribution of Chlorinated Hydrocarbons in the Ambient Air in Tokyo

T. Ohta, M. Morita and I. Mizoguchi: *Atmospheric Environment*, 10, 557-560, 1976

The measurements of four chlorinated hydrocarbons were made in Tokyo air from May 1974 to April 1975. The annual average concentrations were 0.8 ppb (10^{-9}), 1.4 ppb, and 1.2 ppb, for 1,1,1-trichloroethane, carbontetrachloride, trichloroethylene and perchloroethylene respectively. The correlations between the levels of these chemicals and the meteorological data were discussed and these results demonstrated that rain, the eastwind (seabreeze) for Tokyo and strong winds (the maximum velocity of the wind in a day is 10-15 ms^{-1}) contributed to remove these chemicals from air, on the other hand, the cloudiness and the weaker wind contributed to keep these levels high and the southwind contributed to increase them. The distributions peaks of trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane coincided with locations of machine or metal products plants which are the major user of both solvents, and furthermore the distribution of carbontetrachloride showed a good relation with that of chemical factories. However perchloroethylene was distributed rather evenly. The concentration of carbontetrachloride was much larger than the expected value from the annual production compared with that of 1,1,1-trichloroethane, trichloroethylene and perchloroethylene, the reason for this is not clearly understood at present.

光化学スモッグの眼に及ぼす影響について

清水啓一郎，原田万里，宮田幹夫，石川哲，溝口勲：臨床眼科，30(4)，407-418，1976

この分野での疫学的，生化学的，眼科学的，実験的研究をのべ，結論は次の通りである．1. 眼の刺激がオキシダント濃度と良い相関を示し，スモッグの生体影響の指標になりうる．2. スモッグ時に涙のリゾチームとpHが低下している．3. 0.5 ppm のアクロレインで5分間ばくろされるとはっきりとした眼刺激が生ずる．4. 10ppm のアクロレインに兎を二時間ばくろするとフロレッセインで明確に認められる角膜炎を起す．5. この角膜を走査電顕で観察すると角膜表層細胞が二～三層にわたって脱落していた．従って眼刺激大気汚染物質が高濃度であれば角膜への侵襲をおこすことがあきらかにされた．

Effect of Methylmercury on Humoral Immune Responses in Mice under Conditions Simulated to Practical Situations

G. Ohi, M. Fukuda, H. Seto and H. Yagyu: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 15 (2), 175, 1976

A suppression and delay in reaching the peak of primary humoral response in mice was noted when relatively large dosage of methylmercury was administered in a short time period, suggesting the interference with the initial multiplications of antibody producing cells. On the other hand, subchronic administration of low levels of methylmercury in diet (0.5 and 5 ppm) caused no definite suppression on either primary or secondary responses, though they tended to be depressed.

A systematic Determination of Chlorinated Benzenes in Human Adipose Tissue

M. Morita, S. Mimura, G. Ohi, H. Yagyu and T. Nishizawa: *Environ. Pollut.* 9, 175, 1975

Three chlorinated benzenes—1,4-dichlorobenzene, 1, 2, 4, 5-tetrachlorobenzene and hexachlorobenzene—were found to be present in the adipose tissues of residents in the Tokyo metropolitan area. Their mean residual levels were 1.7 μg, 0.019 μg and 0.21 μg/g fat, respectively. Other isomers of chlorinated benzenes were not demonstrably above the level of 0.010 μg/g fat. At this stage it appears important to clarify the source and route of pollution.

Clearance and Tissue Distribution of Hexachlorobenzene in Rats

M. Morita and S. Oishi: *Bull. Environ. Contam. Toxic.* 14 (3), 313—318, 1975

Hexachlorobenzene was applied to rats intraperitoneally and its clearance and tissue distribution was determined. Hexachlorobenzene was found mainly to deposit in fat tissues. Estimated

half life of this material was about 60 days in rats.

飲料水の安全性について

三村秀一：モダンメディア，21(6)，258，1975

河川水，湖沼水の水質汚濁の質的変化に対応して，機器分析による環境汚染物質（特に有機物質）の総点検を行ない，現在まで検索された，フタル酸エステル，塩素化脂肪族炭化水素，塩素化ベンゼン類の環境中，人体脂肪中のレベルを把握し，毒性面からの解析を行なった．また工場周辺の地下水の重金属による汚染調査を行ない，都内におけるこれら物質による汚染地図を作成した．

塩素処理と有機塩素化合物

森田昌敏：用水と廃水 18(2)，143-149，1976

水道水，下水の滅菌のために広く用いられている塩素処理によって有機塩素化合物が生成する例を列記．代表的な例としてクロロホルム，ハロゲン化フェノール等について詳述．生成した有機塩素化合物の生物影響についても記述．

塩素安定剤イソシアヌール酸添加による残留塩素の持続効果と殺菌力について

笹野英雄，池島伸至：水処理技術，17(5)，443-454，1976

イソシアヌール酸は残留塩素の安定剤として使用されている薬剤であり，今までの使用報告例でも持続性についてはすべてその効果を認めている．しかしイソシアヌール酸添加による残留塩素の殺菌力におよぼす影響については，賛否両論があり，著者らはこの点を明らかにするために表題について検討を行なった．その結果，イソシアヌール酸添加による残留塩素の持続効果を認め，殺菌効力にも有意差を認めないことを明らかにした．

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

善養寺浩，寺山武，潮田弘，西脇宗一，肥田野信：**SSSSから分離された黄色ブドウ球菌**
第26回日本皮膚科学会中部支部学術集会（1975. 9，大阪）

潮田弘，寺山武，善養寺浩，竹内正太郎：**ブドウ球菌性TENに関する研究　マウス皮下投与 exfoliative toxin の動態と生菌接種による本毒素の螢光抗体法による追跡**
第34回日本細菌学会関東支部総会（1975. 11，東京）

潮田弘，新垣正夫，寺山武，坂井千三，善養寺浩：**食品および健康人ふん便から検出された Klebsiella の菌種・生物型の比較**
第31回日本食品衛生学会（1976. 5，東京）

Hiroshi Zen-Yoji: **Investigation on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* by the comparison of infectivity of isolates to cultured cells**
Subcommitee on the Taxonomy of *Pasteurella*, *Yersinia* and *Francisella* of the I.C.S.B. (1975. 9, London)

Tsutomu Maruyama and Hiroshi Zen-Yoji: **A proposal on the classification of *Yersinia enterocolitica***
Subcommittee on the Taxonomy of *Pasteurella*, *Yersinia* and *Francisella* of the I.C.S.B. (1975. 9, London)

高野慶雄，木下正彦，永野清一郎，正谷千恵，伊藤英雄，石川一男，小泉清明，吉岡良雄，加藤孝雄，丸山務，柳川義勢：**馬及び緬羊，山羊からの *Yersinia enterocolitica* の分離について**
第57回東京都衛生局学会（1976. 5）

柳川義勢，丸山務，甲斐明美，坂井千三，善養寺浩：**イヌ，ネコにおける *Yersinia* の保菌および抗体保有状況について**
第50回日本感染症学会総会（1976. 6，東京）

今井トシエ，篠塚輝治，丸山務，善養寺浩：**下痢患者からの *Yersinia enterocolitica* の検出について**
第50回日本感染症学会総会（1976. 6，東京）

坂井千三，伊藤武，岡沢久美子，善養寺浩，植村興，阪口玄二：**ウェルシュ菌食中毒患者からのエンテロトキシンの検出および食中毒由来株の本毒素の産生能について**
第49回日本細菌学会総会（1976. 4，東京）

伊藤武，岡沢久美子，坂井千三，宮崎修一，岩崎正和，山本耕一郎，H. Riemann，阪口玄二：**東京都内で分離された Clostridium botulinum の一菌株について**
第49回日本細菌学会総会（1976. 4，東京）

Hiroshi Zen-Yoji and Yasuo Kudoh: **Biochemical Characteristics and serotyping of NAG Vibrios**
11th Joint Conference on Cholera, The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program (1975. 11, New Orleans)

太田建爾，工藤泰雄，五十嵐英夫，松下秀，善養寺浩：**腸炎ビブリオ腸管病原毒素の産生条件の検討及び患者・食品等分離株の毒素産生能**
第9回腸炎ビブリオシンポジューム（1975. 11，千葉）

工藤泰雄，松下秀，善養寺浩：**大腸菌エンテロトキシンに関する研究（1）　CHO-K_1 細胞によるエンテロトキシンの検出**
第49回日本細菌学会総会（1976. 4，東京）

工藤泰雄，善養寺浩，松下秀，丸山務，坂井千三：**大腸菌エンテロトキシンに関する研究（2）　毒素産生性と下痢症との関連**
第35回日本細菌学会関東支部総会（1976. 6，横浜）

坂井千三，工藤泰雄，太田建爾，津野正朗ら：**世田谷区大原一丁目に発生した小集団腸チフスについて**
第57回東京都衛生局学会（1976. 5）

坂井千三，丸山務，伊藤武，善養寺浩：***E. coli* O159 によると推定された6事例の集団下痢症について**
第50回日本感染症学会総会（1976. 6，東京）

和宇慶朝昭，一言広，諸角聖，坂井千三，善養寺浩，直井家寿太：**食品の糸状菌汚染に関する研究　挽肉より検出した Fusarium 属の毒素産生性**
第56回東京都衛生局学会（1975. 11）

和宇慶朝昭，一言広，諸角聖，直井家寿太，坂井

千三，善養寺浩，一戸正勝，倉田浩：**食品の糸状菌汚染に関する研究　挽肉より検出した Fusarium 属の毒素産生性**
第31回日本食品衛生学会（1976.5，東京）

西條頼廣，平田一郎，嵯峨晴世，杉山はな子：**T.P. Reiter 株の凍結保存および凍結乾燥に関する研究**
第48回日本細菌学会第12回レプトスピラシンポジウム（1975.4）

西條頼廣，平田一郎，小野田浩子：**T.P. Nichols 株（病原性株）の色素親和性について**
第49回日本細菌学会（1976.4）

村田以和夫，加納堯子：**ASO 価測定法における溶血法および凝集法の検討**
第22回日本臨床病理学会総会（1975.11，長崎）

矢野一好，柳沢靖子，伊藤忠彦，藪内清，岩崎謙二：**東京都民におけるライノウイルス感染の血清疫学的研究**
第49回日本感染症学会総会（1975.4）

田口文章，長木大三，岩崎謙二，藪内清，矢野一好：**ウサギにおけるヒト由来パポーバ BK ウイルス抗体**
第23回日本ウイルス学会総会（1975.10）

柳沢靖子，藪内清，岩崎謙二，柳下徳雄：**1975年風疹流行時の血清学的検索成績と一般都民の風疹抗体保有状況**
第56回東京都衛生局学会（1975.11）

伊藤忠彦，吉田靖子，山崎清，横山庸子，岩崎謙二：**1975年秋以降の都内におけるインフルエンザ流行のウイルス学的および疫学的調査**
第57回東京都衛生局学会（1976.5）

下平彰男：**注射剤中の Pyrogen 検出方法について（Amoebocyte Lysate Test の検討）**
第34回日本公衆衛生学会（1975.10）

西川洋一，渡辺四男也，瀬戸隆子，安田一郎：**ホ類生薬の成分について**
日本生薬学会千葉大会（1975.10）

西川洋一，渡辺四男也，瀬戸隆子，安田一郎：**ホ類生薬の研究（II），ポリアセチレン化合物について**
日本薬学会第96年会（1976.4）

風間成孔，直井家寿太，宮崎利夫：**真菌多糖類の研究（XXIV）Alternaria solani の細胞壁多糖**
第48回日本生化学会大会（1975.10）

竹葉和江，松本昌雄，村上一，春田三佐夫：**カドミウム還元法によるチーズ中の硝酸塩の定量**
日本獣医公衆衛生学会（1975.2）

松本昌雄，村上文子，竹葉和江，村上一，春田三佐夫：**生乳および牛乳の蛋白還元価について**
日本獣医公衆衛生学会（1975.2）

松本昌雄，神保勝彦，村上文子，村上一，春田三佐夫：**貝漬水の腸炎ビブリオ汚染に関する一考察**
日本獣医公衆衛生学会（1975.2）

神保勝彦，神崎政子，松本昌雄：**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**
東京獣医畜産学会（1975.11）

梅木富士郎，三木博，秋山陽，和田信省：**東京都の野犬およびヒトの抗 *Brucella canis* 抗体保有率**
東京獣医畜産学会（1975.11）

梅木富士郎，田中豊隆，早野剛，木村久一郎，奥沢康司，金子誠二，西尾秀規，村田光明，高島利幸，三木博：**東京都の野犬およびヒトの抗*Brucella canis* 抗体保有状況**
日本獣医公衆衛生学会（1976.2）

梅木富士郎，和田信省，島崎秀雄，高橋宗和，三浦健司，松崎修，松井政友，保坂敏行，山本力，高橋利幸，三木博：**東京都における犬猫およびヒトのトキソプラズマ抗体保有調査**
日本獣医公衆衛生学会（1976.2）

神保勝彦，松本昌雄，村上一，春田三佐夫：**加熱損傷菌の発育に対するピルビン酸ナトリウムの影響**
第29回日本食品衛生学会（1974.10）

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：**魚介類への微量元素の蓄積挙動の研究（第 II 報）マグロ中の水銀及びセレンの体内分布**

第30回日本食品衛生学会（1975.10）

安田和男，勝木康隆，上田工，木村康夫：**かつお体内の重金属分布**
第30回日本食品衛生学会（1975.10.3）

友松俊夫，鈴木二郎，中沢久美子，木村康夫：**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**
第30回日本食品衛生学会（1975.10.3）

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：**食品中のシリコン樹脂に関する研究—II ジメチルポリシロキサンの油脂に対する効果**
第30回日本食品衛生学会（1975.10.2）

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：**食品中の L-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester に関する研究**
第30回日本食品衛生学会（1975.10.3）

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：**食品中のシリコン樹脂に関する研究—III ジメチルポリシロキサンの油脂に対する効果**
第31回日本食品衛生学会（1976.5.20）

神崎政子，小久保弥太郎，神保勝彦，村上一，春田三佐夫：**動物性食品中のウェルシュ菌分布**
第31回日本食品衛生学会（1976.5）

遠藤英美，半田八十三，広門雅子，宇佐美博幸，藤居瑛：**市販食品用洗浄剤の成分分析に関する研究**
第55回東京都衛生局学会（1975.5）

遠藤英美，宇佐美博幸，半田八十三，広門雅子，藤居瑛：**d-ソルビットおよびd-ソルビット液の液性について**
第55回東京都衛生局学会（1975.11）

遠藤英美，宇佐美博幸，広門雅子，中嶋巌，藤居瑛：**d-ソルビットおよび d-ソルビット液の液性について**
第56回東京都衛生局学会（1975.11）

牛尾房雄，西田甲子，深野駿一，道口正雄：**日常食事中の残留性有害物質含有量**
環境科学総合研究会第1回研究発表会（1975.6）

武士俣邦雄，福田向江：**コリンエステラーゼに関する研究（I），ヒト赤血球コリンエステラーゼ活性と血球性状**
第48回日本生化学会大会（1975.10.15，福岡）

武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公：**中学生を対象とした尿中ポルフィリン代謝系成分の地域的比較検討**
第57回東京都衛生局学会（1976.5.19）

武士俣邦雄：**ポルフィリン体の生化学的研究（VIII）溶血に基いた δ-ALA および Cp の尿中排泄動態。**
第25回日本衛生検査学会大会（1976.5.22）

Shun-ichi Fukano, Fusao Ushio and Masao Doguchi: **Polychlorinated Terphenyls and Polychlorinated Biphenyls in Human Fat and Blood in Tokyo**
International Congress of Scientist on the Human Environment (1975.11)

関博麿，大西和夫，田口信夫：**妊娠白ネズミのカルシウム，リンおよびマグネシウム代謝（その1）**
第29回日本栄養食糧学会総会（1975.5）

中村弘：**小笠原父島，母島における水道原水の水質**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

中村弘，斎藤庄次，高橋正博，三村秀一：**防火用貯水槽水の衛生学的研究**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

森田昌敏，大橋則雄，山崎堅吉，三村秀一：**アミン含有水への塩素添加による刺激臭の生成**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

樋口育子，会田朋子，森田昌敏，三村秀一：**シアンの分析に於ける妨害物質とその妨害機構**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

森田昌敏，中村弘，三村秀一：**塩素系炭化水素による環境汚染**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

森田昌敏，三村秀一，西沢恒幸：**パラジクロロベンゼンによる環境汚染**

第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

森田昌敏，三村秀一，大井玄，野牛弘，西沢恒幸：**人体脂および人血中のパラジクロロベンゼン**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

藤沢正吉，矢口久美子：**依頼試験を中心としてみた三多摩地区浅層地下水の動向（第3報）**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

笹野英雄，押田裕子，栃本博，黒田静夫：**フレームレス原子吸光法の検討（第2報）血清中の微量金属の測定について**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

高橋保雄，森田昌敏，山崎堅吉，三村秀一：**フタル酸エステルの塩素処理による影響**
第26回全国水道研究発表会（1975.5）

森田昌敏，会田朋子，樋口育子，三村秀一：**水道水中の有機物質の分析**
第26回全国水道研究発表会（1975.5）

森田昌敏，三村秀一：**人体脂肪組織中の塩素化ベンゼン類**
日本化学会第32春季年会（1975.4）

樋口育子，会田朋子，中川順一，三村秀一：**薬注工法における地下水の汚染調査**
第34回日本公衆衛生学会総会（1975.10）

小輪瀬勉，山崎堅吉，三村秀一：**多摩川における有機塩素系化合物について**
第34回日本公衆衛生学会総会（1975.10）

大橋則雄，森田昌敏，中村弘，三村秀一：**クロロフェノール類による環境汚染**
第34回日本公衆衛生学会総会（1975.10）

森田昌敏，中川順一，秋山和幸，三村秀一：**ポリクロロジベンゾフランおよびテトラクロルジベンゾジオキシンによる環境汚染**
第34回日本公衆衛生学会総会（1975.10）

中村弘：**水中有機物に関する研究　汚濁水中の微量アクリルアミドの測定法について**
第34回日本公衆衛生学会総会（1975.10）

高橋保雄，大橋則雄，小瀬輪勉，山崎堅吉，三村秀一：**東京都内の工場周辺井戸水の重金属汚染**
第34回日本公衆衛生学会総会（1975.10）

Masatoshi Morita: **Hexachlorobenzene in the Environment**
International Congress of the Scientists in Environmental Protection (Nov. 1975., Kyoto)

栃本博，黒田静夫，押田裕子，菊地洋子，笹野英雄，池島伸至：**下水道未整備地域における河川の水質汚染について（第1報）**
日本薬学会第96年会（1976.4）

土屋悦輝，山崎堅吉，三村秀一，岡本敏彦：**水の臭気に関する基礎的研究（III）水中臭気物質の超微量分析法**
日本薬学会第96年会（1976.4）

森田昌敏，中川順一，秋山和幸，三村秀一：**加熱による PCB より PCDF の生成**
第31回日本食品衛生学会（1976.5）

森田昌敏，大石真之，三村秀一，平賀興吾：**ポリ塩素化ジベンゾフラン（PCDFs）のマウスにおける臓器分布と Clearance**
第31回日本食品衛生学会（1976.5）

土屋健三郎，関幸雄，今泉敬七郎，野牛弘，二島太一郎，長崎護：**東京都一般住民の尿中クロム量について**
第44回日本衛生学会総会（1974.4）

二島太一郎，多田宇宏，野牛弘，長崎護：**血液と毛髪のメチル水銀量について**
第44回日本衛生学会総会（1974.4）

千葉百子，二島太一郎，田代明子，菊池正一：**加温処理による血中 ALAD 活性度変化の正常者および鉛暴露者の差違**
第44回日本衛生学会総会（1974.4）

大井玄，福田雅夫，瀬戸博，野牛弘：**メチル水銀のマウス液性免疫機構に及ぼす影響**

第44回日本衛生学会総会（1974.4）

秋山和幸，長嶋親治，高橋利恵子，藤谷和正，野牛弘，長崎護：**東京都内における大気中多環芳香族炭化水素の測定**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

関比呂伸，大井玄，今野ヒロ子，野牛弘：**重金属のラット学習能力に及ぼす影響（酢酸鉛，メチル水銀）**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

今野ヒロ子，関比呂伸，野牛弘，大井玄：**ラット臓器に関するメチル水銀及びセレンの相互作用　セレンのメチル水銀中毒減毒作用**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

溝口勲，牧野国義，佐藤泰仁，大沢誠喜，福田雅夫，野牛弘：**光化学スモッグに関する自覚症状について（第二報　年間の自覚症変化）**
第33回日本公衆衛生学会総会（1974.10）

藤田紘一郎，菊池正一，二島太一郎，池田真悟，野牛弘：**インドネシア・マレーシア各地の原住民の毛髪および血液中水銀量について（第1報）**
第33回日本公衆衛生学会（1974.10）

佐藤泰仁，溝口勲：**大気中浮遊粉塵の EDX による分析**
第15回大気汚染研究全国協議会大会（1974.11）

太田与洋，森田昌敏，溝口勲：**都内大気中の塩素系有機溶剤の分布**
第15回大気汚染研究全国協議会大会（1974.11）

佐藤泰仁，牧野国義，溝口勲，野牛弘：**大気中炭化水素及び塩素系有機溶剤と他の汚染物質との相関について**
第15回大気汚染研究全国協議会大会（1974.11）

溝口勲，大沢誠喜，福田雅夫，野牛弘：**光化学スモッグと赤血球に関する研究（第二報）**
第15回大気汚染研究全国協議会大会（1974.11）

牧野国義，溝口勲，佐藤泰仁，大沢誠喜，福田雅夫，野牛弘：**光化学スモッグによる眼刺激作用の実験的研究（第二報）**
第15回大気汚染研究全国協議会大会（1974.11）

溝口勲，大沢誠喜，福田雅夫，野牛弘，岡和田紀昭，市川宏：**スモッグチャンバーによる涙リゾチームに関する実験的研究**
第15回大気汚染研究全国協議会大会（1974.11）

千葉百子，二島太一郎，田代明子，菊池正一：**ALAD 活性度および活性度比の血中鉛量との相関**
第105回日本産業衛生学会関東地方会（1974.10）

野牛弘，大井玄，西垣進，関比呂伸：**メチル水銀の臓器別半減期の試算（ラッテ）**
第45回日本衛生学会総会（1975.4）

関比呂伸，今野ヒロ子，野牛弘，大井玄：**メチル水銀毒性における保護因子としてのマグロ由来セレンの生物学的有効度**
第45回日本衛生学会総会（1975.4）

菊池正一，二島太一郎：**尿中 ALA 排泄量とクレアチニンの関係**
第45回日本衛生学会総会（1975.4）

二島太一郎，池田真悟，多田宇宏，野牛弘，溝口勲，長崎護，上条宏，中島達也：**母親と新生児における水銀の蓄積とその相互関係**
第55回東京都衛生局学会（1975.5）

二島太一郎：**National Bureau of Standards (NBS) の粉体標準品 (Orchard Leaves, No. 1571) を用いたクロスチェック成績について**
第34回日本公衆衛生学会（1975.10）

藤田紘一郎，菊池正一，二島太一郎，池田真悟，野牛弘：**インドネシア・マレーシア各地の原住民の毛髪および血液中水銀量について**
第34回日本公衆衛生学会（1975.10）

佐藤泰仁，溝口勲：**大気中浮遊粉塵の EDX による分析（第二報）**
第16回大気汚染研究全国協議会大会（1975.11）

佐藤泰仁，牧野国義，狩野文雄，溝口勲，野牛弘：**東京都における降下煤塵及び亜硫酸ガス等の動態**

第16回大気汚染研究全国協議会大会（1975. 11）

牧野国義，佐藤泰仁，狩野文雄，大沢誠喜，福田雅夫，溝口勲：**東京都における降下煤塵成分の地域性に関する統計的検討**
第16回大気汚染研究全国協議会大会（1975. 11）

瀬戸博，秋山和幸，溝口勲：**東京都における大気中有機ふっ素化合物の測定**
第16回大気汚染研究全国協議会大会（1975. 11）

太田与洋，森田昌敏，溝口勲：**都内大気中の塩素系有機溶剤の地域的濃度分布**
第16回大気汚染研究全国協議会大会（1975. 11）

溝口勲：**光化学スモッグによる自覚症状の変動**
第16回大気汚染研究全国協議会大会（1975. 11）

溝口勲，大沢誠喜，福田雅夫，岡和田紀昭：**光化学スモッグ時の涙リゾチームと pH の検討**
第16回大気汚染研究全国協議会大会（1975. 11）

中田英吉：**フトツメダニ *Cheyletus malaccensis* Oudemans, 1903 の染色体**
日本衛生動物学会（1976. 5. 12）

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
直　井　家寿太
大　井　　玄
三　村　秀　一
平　賀　興　吾

昭和51年12月10日　発行

規格表　第 2 類
印刷番号（51)616
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第27-1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　合 同 印 刷 株 式 会 社
東京都墨田区業平 2—9—13
電　話 622—1965（代）

図書室
収受
51.12.23
輸