CODEN : TRENAF

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

図書室
受入
53.12.25
東京都立衛生研究所

29-1

1978

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

序

東京都立衛生研究所研究年報は第1巻が昭和25年5月に発行され，総頁数80頁の薄いものであったが，年代が進むに従って次第に厚さを加えてきた．また内容的にも充実してきたことと自己満足かも知れないが自認している．

今回の第29巻は論文総数114編と分厚なものとなるので，昨年と同様2分冊とされた．研究年報の分冊化はここ3年連続的に行われてきたが，これからは恒久的にならざるを得ないものと思われる．

数年前までは当研究所においても主たる研究論文は学会誌に専ら投稿し，研究年報には掲載されることが少なかったのは事実であるが，最近では研究年報への投稿が増加している．これは研究者の層の増加と，若くなったこと，研究意欲が旺盛なこと，着想が新鮮なことなどが原因と考えられる．

さて，日本における医学文献検索は急速に発展し，国内文献検索も相当広範囲にわたって行われるようになった．従って，いままで眼のとどかないところにあった研究論文は，国内はもとより国外においても検索の網にかかるようになり，しかもその論文が画期的な学術的な意義があれば広く認められ得るようになった．

衛生学界における文献情報検索がコンピューターにより迅速処理されることもあってか，当研究年報掲載の論文別刷も各地より送付方依頼が増加している．

研究年報には各研究室で行なった調査の基礎データーも出来るだけ掲載するよう努力しているが，紙面の都合により掲載出来ないものが多々ある．これらは別に研究報告として印刷するつもりである．

研究年報とともに研究報告も御活用願えれば幸である．

おわりに，本報告書の刊行に当って，編集委員ならびに関係諸氏に献身的に御奉仕いただいたことに深く感謝の意を表する．

昭和53年7月20日

東京都立衛生研究所長　野　牛　　弘

目　次

報文Ⅰ　感染症等に関する調査研究

東京都における海外旅行者下痢症の細菌学的検討（1977年）
……坂井千三，太田建爾，工藤泰雄，津野正朗，松下　秀，大橋　誠…… 1
黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン（A－E）産生に及ぼす塩化ナトリウムの影響
……五十嵐英夫，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，寺山　武，坂井千三…… 6
東京都内の中川流域の泥土および淡水魚におけるボツリヌスC型菌の分布
……伊藤　武，斉藤香彦，稲葉美佐子，坂井千三……13
東京都における過去3年間の腸炎ビブリオ食中毒発生状況と患者分離株の血清型および耐熱性溶血毒産生性
……工藤泰雄，津野正朗，太田建爾，松下　秀，坂井千三……19
東京都において捕獲・抑留された野犬からのイヌブルセラ菌（*Brucella canis*）の分離・同定
……金子誠二，梅木富士郎，村上　一，菊池俊六，木村久一郎，村田光明，高島利幸……24
過去4年間に東京都で捕獲・抑留されたイヌの抗-Brucella canis 抗体保有状況
……金子誠二，梅木富士郎，村上　一，菊池俊六，木村久一郎，村田光明，高島利幸……28
しょう紅熱患者の Immune Response（特にレンサ球菌菌体抗原を中心にして）……加納堯子，飯村　達……31
ポーセライン・ビーズによる簡易菌株保存法の検討
……潮田　弘，寺山　武，五十嵐英夫，新垣正夫，坂井千三……39
腸内ウイルス感染の実態は握（第10報）　1977年の東京都内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……44
急性呼吸器疾患患児のウイルス学的検索成績
……矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二，浦野純子，河野弘子，渡辺悌吉……49
ＢＫウイルスに関する研究　抗核抗体価とウイルスＨＩ価との関係
……藪内　清，矢野一好，柴田タツ美，岩崎謙二，田口文章，和田重次，郡司俊実……54
都内飼育豚におけるインフルエンザウイルスＨＩ抗体保有調査（1977年２月～78年５月）
……岩崎謙二，伊藤忠彦，山崎　清，坂井冨士子……58
1976年４月～77年３月の東京都内インフルエンザ流行検索成績……岩崎謙二，伊藤忠彦，山崎　清……63
1977年４月～78年２月の東京都内インフルエンザ流行検索成績
……坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二……70
1977年における都民の風疹ＨＩ抗体保有調査……吉田靖子，関根整治，岩崎謙二……75
1977年の東京都における日本脳炎疫学調査
……吉田靖子，藪内　清，関根整治，岩崎謙二，三宅　勉，三木　博……79
大気中の毒性カビ分布について……一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三……86
東京築地市場に入荷した日本近海産「サクラマス」（*Oncorhynchus masou*）における広節裂頭条虫プレロセルコイドの検索成績……村田以和夫，大久保暢夫，山田　満，金井日出夫，林　滋生……95
ASO 価測定法における Micro 溶血法および凝集法の検討……村田以和夫，大久保暢夫…… 101
簡易迅速梅毒ＴＰ感作血球凝集反応（TPHA）におけるマイクロタイター法の検討
……堀　幹郎，小林文次，平岡陸左右，宮沢貞雄，村田以和夫，大久保暢夫…… 107

報文 II　医薬品等の安全性に関する調査研究

医薬品・化粧品等の微生物汚染について
……柏木義勝，柴田　実，徳江シゲ子，笠井純子，大久保暢夫，内海正保，伊藤　寛，下村寿一…… 111
起炎性物質に関する衛生化学的研究（第３報）　高速液体クロマトグラフィーによるベルガプテンの定量法……水石和子，風間成孔，中村義昭，原田裕文…… 118
起炎性物質に関する衛生化学的研究（第４報）　TLC によるホルムアルデヒドの同定
……中村義昭，風間成孔，水石和子，原田裕文…… 121
カーボンブラック中の3,4-ベンズピレンについて……鎌田国広，山添律子，原田裕文…… 124
ベンガラ中の微量ヒ素の定量法……江波戸攀秀，伊藤弘一，原田裕文…… 129
家庭用品の衛生化学的研究（第５報）　繊維製品中のクロム含有量について
……植田忠彦，観　照雄，森　謙一郎，西田茂一，原田裕文…… 132
アナログ変換による電子捕獲検出器の直線性の改善……竹内正博，原田裕文…… 137

報文 III　食品等の安全性に関する調査研究

豆腐のセレウス菌汚染の実態とその汚染経路の追跡
……寺山　武，五十嵐英夫，潮田　弘，山田澄夫，新垣正夫，坂井千三，
池島伸至，楠　　淳，新井輝義，神　真知子，入倉善久，友成正臣，
佐野　隆，山田武勝，安部勇三，鈴木廸夫，斉藤　修，能登屋耕二…… 143
ウィンナーソーセージ中の *Clostridium perfringens* および *Bacillus cereus* の挙動に関する実験的研究
……小久保弥太郎，神崎政子，井草京子，村上　一，木村貞司，梅沢勝正，斉藤義蔵…… 153
動物性食品中の *B. cereus* に関する検査法とその応用……神保勝彦，松本昌雄，村上　一…… 158
市販食品からの Klebsiella の検出ならびに食品および健康人ふん便由来株の種と生物型の比較
……潮田　弘，新垣正夫，寺山　武，五十嵐英夫，坂井千三…… 163
東京都における水銀汚染の実態について（第5報）　魚介類中の水銀含有量調査
……雨宮　敬，竹内正博，伊藤弘一，江波戸舉秀，原田裕文…… 167
東京湾のアサリと底質中の重金属分布……堀井昭三，山岸達典，村上　一…… 170
魚介類中の微量元素に関する基礎的研究（第4報）　ブリ体内の重金属およびヒ素分布
……安田和男，勝木康隆，上田　工，直井家壽太…… 177
魚介類への微量元素の蓄積挙動の研究（第5報）　甲殻類中の微量元素
……嶋村保洋，田村行弘，真木俊夫，西垣　進，直井家壽太…… 182
ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）酸化成績体 3,5-3′,5′-tetra-t-Butylstilbene-4,4′-Quinone の合成
とその突然変異誘起性……堀井昭三，山岸達典，松本昌雄，村上　一…… 190
食品中のグリチルリチン酸の分析法……冠　政光，西島基弘，観　公子，中里光男，木村康夫，直井家壽太…… 193
食品中のサッカリンの試験法について……中里光男，西島基弘，冠　政光，観　公子，
有賀孝成，石川ふさ子，藤沼賢司，直井家壽太…… 199
食品添加物中の多核芳香族炭化水素（第4報）　活性炭およびカーボンブラック中のベンゾ(a)ピレンの
分析……中嶋　巌，広門雅子，宇佐美博幸，溝入　茂，遠藤英美…… 203
食品添加物用ポリアルコール類の規格　　プロピレングリコール，グリセリンの定量について
……宇佐美博幸，広門雅子，中嶋　巌，溝入　茂，遠藤英美…… 206
縮合メタリン酸塩の反転腸管法による吸収について
……山岸達典，森本キミ，関　博麿，大西和夫，友成正臣…… 209
縮合メタリン酸塩のウサギ経口投与時の血清無機質およびたんぱく質の変化
……山岸達典，森本キミ，関　博麿，大西和夫，友成正臣…… 213
プラスチック製容器・包装の紫外線吸収剤について（第1報）　市販品における使用実態
……渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，溝入　茂，遠藤英美…… 218
プラスチック製容器・包装の紫外線吸収剤について（第2報）　包装食品の光劣化
……溝入　茂，渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，遠藤英美…… 224
ロングライフミルク容器の衛生化学的考察（第1報）　長期保存による溶出試験
……佐藤憲一，渡辺悠二，吉田令子，遠藤英美…… 230
東京都における PCB 汚染の実態について（第6報）　食品中の PCB 含有量調査
……山崎清子，山野辺秀夫，鈴木助治，原田裕文…… 234
食品中の石油系炭化水素に関する研究（第3報）　東京湾産貝中のパラフィン系炭化水素，3,4-ベンツピ
レンおよび硫黄化合物含量
……井部明広，西島基弘，斉藤和夫，上村　尚，落合節子，永山敏廣，牛山博文，直井家壽太…… 238
食品中のマイコトキシンに関する研究（第10報）　Sterigmatocystin 分析法の検討
……観　公子，西島基弘，冠　政光，中里光男，有賀孝成，石川ふさ子，直井家壽太…… 244
クロレラ常用者間に発生した光過敏症皮膚炎について
……田村行弘，西垣　進，真木俊夫，嶋村保洋，直井家壽太…… 250
N-ニトロソ化合物に関する衛生学的研究（第2報）　各種食品中の揮発性N-ニトロソ化合物の含有量
……真木俊夫，田村行弘，嶋村保洋，西垣　進，直井家壽太…… 256
豆類中のシアンの定量法……勝木康隆，安田和男，上田　工，直井家壽太…… 261
SEM による種々の花粉の観察……前木吾市…… 266
食品中の無機質に関する研究（第2報）　食品中のカリウム，ナトリウムの分析ならびに食事からの摂取
量の評価……友松俊夫，西田甲子，道口正雄…… 273
市販かまぼこの品質検査……西田甲子，深野駿一，牛尾房雄，道口正雄…… 279

報文 IV　生活環境保全に関する調査研究

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5報）　小学生および高校生の δ-アミノレブリン酸尿中排泄の実態……小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子…… 283
ポルフィリン体の生化学的研究（第9報）　ポルフィリン体に対するヨード酸化の影響について……武士俣邦雄，霜田さと子…… 289
小笠原しょ島診療所由来の血清成分値に関する考察……武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，道口正雄，大久保暢夫…… 293
PCT 汚染経路の解明（第5報）　人血液 PCT 濃度の家族別検討……深野駿一，道口正雄，西田甲子，溝口　勲…… 298
ガスクロマトグラフィーおよび質量分析計によるポリ塩化ナフタレン（PCN）の分析……森田昌敏，高橋保雄，三村秀一…… 301
大気汚染物質の年平均濃度分布のコンピュータ解析……牧野国義…… 305
大気汚染物質と急性自覚症状との関連性（第4報）　複合指標と個人特性……牧野国義，溝口　勲，沖野哲郎，山本幹夫，長崎　護…… 311
各種大気汚染物質の家兎角膜表層への影響……大澤誠喜，狩野文雄，福田雅夫，溝口　勲…… 318
走行中の自動車内空気汚染について（第1報）……佐藤泰仁，多田宇宏，青木　実，溝口　勲，野牛　弘…… 325
発癌性粉塵についての研究　ブレーキドラム内粉塵中のアスベスト……佐藤泰仁，溝口　勲…… 331
東京都民の食品からのクロム一日摂取量……多田宇宏，溝口　勲，二島太一郎，秋山和幸，野牛　弘，長崎　護…… 336
毛髪および血液中の水銀量とセレン量について（一般人と魚介類多食者の比較）……二島太一郎，池田真悟，多田宇宏，野牛　弘，溝口　勲…… 339
塩化メチル水銀の *IN VITRO* 抗体産生に及ぼす影響（第2報）　LIPOPOLYSACCHARIDE, CYCLIC AMP との相互作用……瀬戸　博，秋山和幸…… 343
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（第2報）　総水銀，メチル水銀，セレンの臓器内分布……蓑輪佳子，関　比呂伸，今野ヒロ子，大井　玄…… 349
飲料水の安全性に関する研究（第5報）　水道水中の酸性物質……高橋保雄，森田昌敏，三村秀一…… 353
水中の塩素化生成物に関する調査研究　プール水と塩素添加家庭排水の分析……大橋則雄，矢口久美子，門馬康彦，藤沢正吉，友成正臣，森田昌敏…… 357
水中における DDVP の残留と分解に関する研究……押田裕子，栃本　博，菊地洋子，笹野英雄，中村　弘，池島伸至，友成正臣…… 362
三次処理水に関する衛生学的研究（第1報）……中村　弘，斉藤庄次，高橋正博，松本淳彦，根津尚光，三村秀一…… 367
下水道未整備地域の水質汚濁について（第2報）……栃本　博，中村　弘，押田裕子，菊地洋子，笹野英雄，池島伸至，友成正臣…… 374
皇居内濠群の水質……渡辺真利代，松本浩一…… 382
藍藻 *Microcystis* の毒性（予報）……渡辺真利代，大石真之，松本浩一…… 389
都内陸水の生活環境に関する調査研究（第6報）　三宅島大路池のプランクトンおよび水質の周年変化……松本淳彦，土屋悦輝，山崎洋子，大野正彦，松本浩一…… 392
都内陸水の生活環境に関する調査研究（第7報）　三宅島大路池の植物プランクトンおよびクロロフィル量からみた富栄養化の現状（1975年度）……山崎洋子，土屋悦輝，松本浩一…… 400
都内陸水の生活環境に関する調査研究（第8報）　神田川水系善福寺川のユスリカの種類相とその消長……大野正彦，松本浩一…… 405
都内陸水の生活環境に関する調査研究（第9報）　緑藻の一種，*Mougeotia* sp. による臭気物質 P-cresol, Indole, 3-Methylindole の確認……土屋悦輝，松本淳彦…… 411

他誌発表

感染症等に関する調査研究…… 415
医薬品等の安全性に関する調査研究…… 419
食品等の安全性に関する調査研究…… 421
生活環境保全に関する調査研究…… 423

学会発表…… 427

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Bacteriological Investigation of Travellers' Diarrhea
.....S. Sakai, K. Ohta, Y. Kudoh, M. Tsuno, S. Matsushita and M. Ohashi..... 1
Effect of Sodium Chloride on the Growth of *Staphylococcus aureus* and on the Production of Their Enterotoxins A-E
.....H. Igarashi, M. Shingaki, S. Yamada, H. Ushioda, T. Terayama and S. Sakai 6
Demonstration of Type C *Clostridium botulinum* from Sludges and Fresh-Water Fish in the River Nakagawa in Tokyo.....T. Itoh, K. Saito, M. Inaba and S. Sakai.....13
Serotype and Production of Heat-stable (Kanagawa) Hemolysin of *Vibrio Parahaemolyticus* Isolated from the Food Poisoning Cases.....Y. Kudoh, M. Tsuno, K. Ohta, S. Matsushita and S. Sakai.....19
Isolation and Identification of *Brucella canis* from Stray Dogs in Tokyo
.....S. Kaneko, F. Umeki, H. Murakami, S. Kikuchi, K. Kimura, M. Murata and T. Takashima.....24
Incidence of Anti-Brucella canis Antibody of Stray Dogs in Tokyo in the Last Four Years
.....S. Kaneko, F. Umeki, H. Murakami, S. Kikuchi, K. Kimura, M. Murata and T. Takashima.....28
Immune Response of Scarlet Fever Patients Study of Anti-Streptococcal Antibody
..... T. Kanoh and T. Iimura.....31
An Attempt for Simple Preservation of Bacterial Cultures by Drying on Porcelain-Beads
..... H. Ushioda, T. Terayama, H. Igarashi, M. Shingaki and S. Sakai.....39
Epidemiological Survey on Enterovirus Infection (X) Virus Isolation of Specimens taken from Sewage Treatment Plants in Tokyo in 1977
.....K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, K. Iwasaki and M. Benoki.....44
Virus Isolation from Children Suffering from Acute Respiratory Diseases in Tokyo
.....K. Yano, K. Yabuuchi, T. Shibata, K. Iwasaki, J. Urano, H. Kohno and T. Watanabe.....49
Relationship between Antinuclear Antibody and HI Antibody against BK Virus
.....K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, K. Iwasaki, F. Taguchi, S. Wada and T. Gunji.....54
Incidence of Antibodies against Influenza Viruses in Swine Raised in Tokyo
.....K. Iwasaki, T. Ito, K. Yamazaki and F. Sakai.....58
Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo, 1976—1977
.....K. Iwasaki, T. Ito and K. Yamazaki.....63
Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo, 1977—1978
.....F. Sakai, T. Ito, K. Yamazaki and K. Iwasaki.....70
Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants in Tokyo in 1977
..... Y. Yoshida, S. Sekine and K. Iwasaki.....75
Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis Virus in Tokyo in 1977
.....Y. Yoshida, K. Yabuuchi, S. Sekine, K. Iwasaki, T. Miyake and H. Miki.....79
Distribution of Toxigenic Fungi on Airborne
.....H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke and S. Sakai.....86
A Survey on the Infection with Plerocercoids of *Diphyllobothrium latum* in *Oncorhynchus masou* obtained from Tsukiji Central Market, Tokyo
..... I. Murata, N. Ohkubo, M. Yamada, H. Kanai and S. Hayashi.....95
Evaluation of Our Modified Micro Method (Micro-Drop-ASO) for Serodiagnosis on Streptococcal Infection.....I. Murata and N. Ohkubo..... 101
Evaluation of Simple and Rapid Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema Pallidum* Antibodies.....M. Hori, B. Kobayasi, R. Hiraoka, S. Miyazawa, I. Murata and N. Ohkubo..... 107

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Microbiological Contaminations of Drugs and Toiletries, etc.
……Y. Kashiwagi, M. Shibata, S. Tokue, J. Kasai, N. Ohkubo, M. Utsumi, H. Itoh and J. Shimomura…… 111
Hygienic Chemical Studies on Irritants (III) High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Bergapten ……K. Mizuishi, M. Kazama, Y. Nakamura and H. Harada…… 118
Hygienic Chemical Studies on Irritants (IV) Identification of Formaldehyde by Thin-Layer Chromatography……Y. Nakamura, M. Kazama, K. Mizuishi and H. Harada…… 121
Survey of 3, 4-Benzopyrene in Carbon Black……K. Kamata, R. Yamazoe and H. Harada…… 124
Determination of Trace Amounts of Arsenic in Red Oxide of Iron
……K. Ebato, K. Ito and H. Harada…… 129
Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (V) Chromium Contents in Textile Products
……T. Ueta, T. Kan, K. Mori, S. Nishida and H. Harada…… 132
Linearization of Electron Capture Detector Response by Analog Conversion
……M. Takeuchi and H. Harada…… 137

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Survey for Contamination of *Bacillus cereus* in Soy-Bean Curd (Tofu) and Process Control for the Making
……T. Terayama, H. Igarashi, H. Ushioda, S. Yamada, M. Shingaki, S. Sakai, N. Ikejima, J. Kusunoki, T. Arai, M. Jin, Y. Irikura, M. Tomonari, T. Sano, T. Yamada, Y. Abe, T. Suzuki, O. Saito and K. Notoya…… 143
Experimental Studies on the Behavior of *Clostridium perfringens* and of *Bacillus cereus* Incorporated in Vienna Sausage
……Y. Kokubo, M. Kanzaki, K. Igusa, H. Murakami, T. Kimura, K. Umezawa and Y. Saito…… 153
Development of a Selective Enumeration Medium for *B. cereus* in Food of Animal Origin
……K. Jinbo, M. Matsumoto and H. Murakami…… 158
Surveys on the Incidence of Klebsiella in Commercial Foods and Healthy Human Feces, and Identification of Species and Biotypes of their Isolates
…… H. Ushioda, M. Shingaki, T. Terayama, H. Igarashi and S. Sakai…… 163
Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (V) Mercury Content of Fish and Shellfish
……T. Amemiya, M. Takeuchi, K. Ito, K. Ebato and H. Harada…… 167
Distribution of Trace Amounts of Heavy Metals in Short-Necked Clam and Sludge in Tokyo Bay
…… S. Horii, T. Yamagishi and H. Murakami…… 170
Study on Amounts of Trace Elements in Marine Fishes (IV) Distribution of Heavy Metals and Arsenic in Yellowtail Tissue…… K. Yasuda, Y. Katsuki, K. Ueda and Y. Naoi…… 177
Studies on Behavior of Accumulation of Trace Elements in Fish (V) Trace Elements in Crustacea
……Y. Shimamura, Y. Tamura, T. Maki, S. Nishigaki and Y. Naoi …… 182
Synthesis of 3, 5-3′, 5′-tetra-*t*-Butylstilbene-4, 4′-Quinone from Butylated Hydroxytoluene (BHT) and its Mutagenicity……S. Horii, T. Yamagishi, M. Matsumoto and H. Murakami…… 190
Studies on Analysis of Glycyrrhizinic acid in Foods
……M. Kanmuri, M. Nishijima, K. Kan, M. Nakazato, Y. Kimura and Y. Naoi…… 193
Studies on Analysis of Saccharin in Foods
……M. Nakazato, M. Nishijima, M. Kanmuri, K. Kan, T. Ariga, F. Ishikawa, K. Fujinuma and Y. Naoi…… 199
Polynuclear Aromatic Hydrocarbon in Food Additives (IV) Analysis of Benzo (a) pyrene in Active Carbon and Carbon Black
…… I. Nakajima, M. Hirokado, H. Usami, S. Mizoiri and F. Endo…… 203
Standards of Polyols for Food Additives Assay of Propylene Glycol and Glycerin
…… H. Usami, M. Hirokado, I. Nakajima, S. Mizoiri and F. Endo…… 206
On the Absorption of the Polymetaphosphate through the Everted Intestine
…… T. Yamagishi, K. Morimoto, H. Seki, K. Ohnishi and M. Tomonari…… 209
The Effect of Polymetaphosphate on the Salts and Protein Value in Serum in Rabbit
…… T. Yamagishi, K. Morimoto, H. Seki, K. Ohnishi and M. Tomonari…… 213

Investigation on Ultra-Violet Absorbers in Plastics Food Containers and Packages (I) Survey of the Products on the Market
……Y. Watanabe, K. Sato, R. Yoshida, S. Mizoiri and F. Endo…… 218
Investigation on Ultra-Violet Absorbers in Plastics Food Containers and Packages (II) Light-induced Deterioration of Packed Food
……S. Mizoiri, Y. Watanabe, K. Sato, R. Yoshida and F. Endo…… 224
Hygienic Chemical Studies of Long Life Milk Package (I) Migration on Long Term Storage
……K. Sato, Y. Watanabe, R. Yoshida and F. Endo…… 230
Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (VI) Polychlorinated Biphenyl Content of Foods……K. Yamazaki, H. Yamanobe, S. Suzuki and H. Harada…… 234
Studies on Hydrocarbons from Petroleum in Foods (III) Contents of Hydrocarbons, 3, 4 Benzopyrene and Organic Sulfur Compounds in Shellfishes in Tokyo Bay
……A. Ibe, M. Nishijima, K. Saito, H. Kamimura, S. Ochiai, T. Nagayama, H. Ushiyama and Y. Naoi…… 238
Studies on Mycotoxins in Foods (X) Analytical Procedure and Determination of Sterigmatocystin
……K. Kan, M. Nishijima, M. Kanmuri, M. Nakazato, T. Ariga, F. Ishikawa and Y. Naoi…… 244
Photosensitive Derumatitis caused by Chlorella Tablets
……Y. Tamura, S. Nishigaki, T. Maki, Y. Shimamura and Y. Naoi…… 250
Hygienic Studies on the N-Nitroso Compounds (II) Survey of Various Foods for Volatile N-Nitroso Compounds
……T. Maki, Y. Tamura, Y. Shimamura, S. Nishigaki and Y. Naoi…… 256
Determination of Cyanide in Beans
……Y. Katsuki, K. Yasuda, K. Ueda and Y. Naoi…… 261
Morphological Observation of Pollens of Various Species Origin by Scanning Electron Microscopy
…… G. Maeki…… 266
Studies on Minerals in Foods (II) Analysis of Potassium and Sodium Contents in Foods and Estimation of Dietary Intakes……T. Tomomatsu, K. Nishida and M. Doguchi…… 273
Quality of Marketing Kamaboko, a Fish Jelly Product
……K. Nishida, S. Fukano, F. Ushio and M. Doguchi…… 279

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Investigations and Biochemical Studies on the Porphyrin Metabolites (V) The Actual State of Urinary δ-Aminolevulinic Acid Excretion in School Children and High School Students
……K. Ogasawara, K. Bushimata and S. Shimoda…… 283
Biochemical Studies on the Porphyrins (IX) The Effects of Oxidation with Iodine on Porphyrins
……K. Bushimata and S. Shimoda…… 289
Biochemical Analyses on the Sera of Outpatients of the Clinic in Ogasawara Islands
……K. Bushimata, S. Shimoda, K. Ogasawara, M. Doguchi and N. Ohkubo…… 293
Study on the Route of PCT Accumulation in Human Body (V) Analysis of Variance on PCT Concentrations in Human Blood among Some Families
……S. Fukano, M. Doguchi, K. Nishida and I. Mizoguchi…… 298
Gaschromatographic and Mass Spectrometric Characterization of Polychlorinated Naphthalene (PCN) Mixtures……M. Morita, Y. Takahashi and S. Mimura…… 301
Computer Analysis for Annual Mean Concentration Distribution in Air Pollutants……K. Makino…… 305
Relation between Air Pollutants and Acute Subjective Symptoms (IV) Combined Indices and Personal Properties
……K. Makino, I. Mizoguchi, T. Okino, M. Yamamoto and M. Nagasaki…… 311
Effects of Rabbit's Corneal Epithelium by Air Pollutants
……M. Osawa, F. Kano, M. Fukuda and I. Mizoguchi…… 318
Indoor Air Pollution in Automobile (I)
……Y. Sato, T. Tada, M. Aoki, I. Mizoguchi and H. Yagyu…… 325
Studies on Carcinogenic Substances in Suspended Particulate Matters Asbestos Fibers in Brake Drum Dust……Y. Sato and I. Mizoguchi…… 331

Daily Chromium Intake from Diet in Tokyo
.....T. Tada, I. Mizoguchi, T. Nishima, K. Akiyama, H. Yagyu and M. Nagasaki..... 336
Concentration of Mercury and Selenium in Hair and Blood (Control Human and Fish-eaters)
.....T. Nishima, S. Ikeda, T. Tada, H. Yagyu and I. Mizoguchi..... 339
Effect of Methylmercury Chloride on Humoral Immune Responses *in Vitro* (II) Interaction of Methylmercury Chloride with Lipopolysaccharide or Cyclic AMP
.....H. Seto and K. Akiyama..... 343
Evaluation of Selenite as Therapeutic Agent for Methylmercury Poisoning Rats (II) Distribution of Total Mercury, Methylmercury and Selenium in Organs
.....K. Minowa, H. Seki, H. Konno and G. Ohi..... 349
Studies on the Safety of Drinking Water (V) Acidic Organic Compounds in Supplied Water
.....Y. Takahashi, M. Morita and S. Mimura..... 353
Studies on Formation of Organochlorine Compounds through Chlorination in Water Analysis of Swimming Pool Water and Chlorinated Domestic Wastewater
.....N. Ohashi, K. Yaguchi, Y. Monma, M. Fujisawa, M. Tomonari and M. Morita..... 357
Residual Quantity and Degradation of DDVP in Water
.....H. Oshida, H. Tochimoto, Y. Kikuchi, H. Sasano, H. Nakamura, N. Ikejima and M. Tomonari..... 362
Hygienic Studies on Tertiary Treatment Waters (I)
.....H. Nakamura, S. Satio, M. Takahashi, A. Matsumoto, N. Nezu and S. Mimura..... 367
Water Pollution in the Area without Sewage Works (II)
.....H. Tochimoto, H. Nakamura, H. Oshida, Y. Kikuchi, H. Sasano, N. Ikejima and M. Tomonari..... 374
Water Qualities of Inner Moats around the Imperial Palace
.....M. F. Watanabe and K. Matsumoto..... 382
Toxicity of Blue-Green Algae *Microcystis* spp.
.....M. F. Watanabe, S. Oishi and K. Matsumono..... 389
Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (VI) Monthly Variations of Plankton and Water Quality of the Lake Tairo on Miyake Island
.....A. Matsumoto, Y. Tsuchiya, Y. Yamazaki, M. Ohno and K. Matsumoto..... 392
Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (VII) Eutrofication of Lake Tairo on the Miyake Island Evaluated from Species Composition of Phytoplankton and Amount of Chlorophyll-a (1975)
.....Y. Yamazaki, Y. Tsuchiya and K. Matsumoto..... 400
Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (VIII) Composition and Seasonal Distribution of Chironomids in the River Zempukuji
.....M. Ohno and K. Matsumoto..... 405
Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (IX) Odorous Compounds from a Green-alga, *Mougeotia* sp., from the Lake Tairo, Miyake Island Identification of p-Cresol, Indole and 3-Methylindole
.....Y. Tsuchiya and A. Matsumoto..... 411

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

I Papers Concerning on Infectious Diseases and Others 415
II Papers Concerning on Pharmaceutical Hygiene 419
III Papers Concerning on Food Hygiene 421
IV Papers Concerning on Environmental Hygiene 423

THEMES PRESENED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 427

報　　文　Ⅰ

感染症等に関する調査研究

REPORTS I

PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 1—5, 1978

東京都における海外旅行者下痢症の細菌学的検討（1977年）

坂井千三*, 太田建爾*, 工藤泰雄*
津野正朗*, 松下　秀*, 大橋　誠*

Bacteriological Investigation of Travellers' Diarrhea

SENZO SAKAI*, KENJI OHTA*, YASUO KUDOH*, MASAAKI TSUNO*,
SHIGERU MATSUSHITA* and MAKOTO OHASHI*

During the period from January through December 1977, a total of 1,031 fecal specimens obtained from Japanese overseas travellers who just returned to Tokyo was subjected for the presence of enteric bacterial pathogens. At the same time, questionaries were delivered and asked that "whether or not they have been (or had been) suffering from diarrheal diseases during their travelling". Consequently, a total of 104 strains of pathogens consisting of 51 *Vibrio parahaemolyticus*, 19 so-called non-agglutinable(NAG) vibrio, 16 *Shigella*, 14 *Salmonella*, 2 *Vibrio cholerae*, and 2 toxigenic *Escherichia coli* strains was isolated from 91 fecal specimens. Of the 91 specimens, 80 harbored single pathogen, 9 duplicated pathogens, and 2 triplicated pathogens. With regard to the incidences, 38 (26.0%) of 146 travellers with diarrhea and 27 (11.7%) of 230 who had experienced diarrheal diseases had harbored one or more pathogens, while 26 (4.0%) of 655 apparently healthy travellers were also excreting pathogens in their feces.

近年，海外旅行者の急増に伴ない，東南アジア，アフリカなど衛生状態が依然として不十分な発展途上国から旅行者が持ち帰る諸種の腸管感染症が公衆衛生上とりわけ防疫対策の面から新たに大きな問題となってきている[1]．

昨年，和歌山県有田市を中心に発生をみた一連のコレラ事件[2]もその一端を如実に物語るものであり，現在こうした海外由来下痢症はかなりの数にのぼるとみられている．しかし，本邦におけるこれら下痢症の実態やその病原についての報告はほとんどなく，まだ十分解明されるまでに至っていない．

そこで，著者らは海外旅行者下痢症の実態を把握し，今後の予防対策に資するため，昨年1年間東京都におけるコレラの健康監視対象者を中心にその詳細な病原学的検索を行なった．本報ではこれら対象者からの病原菌の検出状況，検出菌の抗生物質感受性試験などの成績について報告する．

材料と方法

検査材料　検査材料にはすべてふん便を用いた．対象者はふん便採取時に下痢症状があったもの146名，旅行中あるいは帰国後下痢症状があったがふん便採取時にはすでに回復していたもの230名および旅行期間中，帰国後を通じてなんら異常を認めなかった健康者655名の合計1,031名である．

ふん便は原則としてグリセリン保存液の入った採便管に2～3g採取して送付されたものであるが，一部はアルカリ性ペプトン水に直接採取，送付された．

検査方法　今回の調査においては病原菌としてコレラ菌，いわゆる non-agglutinable ビブリオ（以下NAGビブリオと略す），腸炎ビブリオ，赤痢菌，サルモネラ，エルシニア・エンテロコリチカおよび大腸菌の7菌種を検査対象とした．

これら各病原菌の分離同定法は善養寺ら[3]の方法に準じて行なった．

血清型別　コレラ菌，腸炎ビブリオ，赤痢菌およびサルモネラの血清型別は市販（東芝化学工業KK製）の診断用抗血清を，NAG ビブリオおよび大腸菌は自家製の診断用抗血清を用い，いずれもスライド凝集反応により行なった．なお，サルモネラのH抗原の決定は自家製の診断用抗血清を用い試験管法により行なった．

* 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

Table 1. Frequency of Detection of Enteropathogens from Overseas Travellers with or without Manifestation of Diarrhea

Classification	No. of stools examined	No. of positives (%)	No. of isolates	*V. cholerae*	NAG vibrio	*V. parahaemolyticus*	*Shigella*	*Salmonella*	*E. coli*
Diarrhea (at present)	146	38(26.0)	45*	1	9	16	12	5	2
Diarrhea (in the past)	230	27(11.7)	30*	1	4	20	3	2	—
Healthy subjects	655	26(4.0)	29*	—	6	15	1	7	—
Total	1,031	91(8.8)	104*	2	19	51	16	14	2

* Two or more organisms of different species or different serotypes were isolated from an identical individual, hence the number of isolates is greater than the number of positives.

Table 2. Isolation of Enteropathogens from Overseas Travellers: Observation by the Countries They Visited

Countries	No. of positives	*V. cholerae*	NAG vibrio	*V. parahaemolyticus*	*Shigella*	*Salmonella*	*E. coli*
Philippines	43	2*	10	28	3	7	—
India	6	—	3	—	3	—	—
Thailand	6	—	1	3	1	1	—
Hong Kong	3	—	1	1	—	—	1
Indonesia	3	—	—	1	1	1	—
Singapore	3	—	—	3	—	—	—
Sri Lanka	2	—	1	—	—	1	—
Korea	1	—	—	—	—	—	1
Malaysia	1	—	—	1	—	—	—
Nepal	1	—	—	—	1	—	—
Pakistan	1	—	—	—	1	—	—
More than 2 countries	15	—	2	10	4	2	—
Unknown	5	—	1	4	1	2	—
Egypt	1	—	—	—	1	—	—
Total	91	2	19	51	16	14	2

*=Number of isolates

大腸菌毒素の検出法　大腸菌の産生する易熱性および耐熱性エンテロトキシンの検出は Kudoh ら[4]の方法にしたがった.

抗生物質感受性試験　日本化学療法学会の標準法[5]に準拠して行なった. 供試薬剤はストレプトマイシン（SM), テトラサイクリン（TC), クロラムフェニコール（CP), 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剤で, 試験の結果, 各薬剤25μg/ml 以上の含有培地に発育した菌株を耐性とした.

実験成績

病原菌の分離状況　1977年1月から12月の1年間における検査対象者別の病原菌検出状況を表1に示した.

ふん便採取時に下痢のあった者では, 146名中38名(26.0%), 採便時にすでに下痢症状のなかった者でも230名中27名（11.7%）からなんらかの病原菌が検出され, また, 健康者からも赤痢菌を含め4.0%と高率に病原菌が検出された.

Table 3. Species and Serotypes of Enteropathogens Isolated from Overseas Travellers

Organisms	No. of isolates	Serological types (No. of isolates)
V. cholerae, biotype *eltor*	2	Ogawa(1), Inaba(1)
So-called NAG vibrio	19	O2(1), O3(1), O5(3), O8(1), O13(1), O24(4), O26(1), O34(1), O44(2), O49(1), O50(1), UT(1)
V. parahaemolyticus	51	O1:K 1(5), O1: K38(1), O1: K56(3), O1:K58(1), O1:KUT(2), O2:K 3(2), O3: K 5(1), O3: K33(3), O3:K54(1), O4: K 4(3), O4:K 8(4), O4: K10(2), O4: K11(1), O4:K12(5), O4: K13(1), O4:K55(1), O4:KUT(1), O6: K18(1), O6:K46(1), O8: K20(1), O8:K39(3), O9:K23(1), O10:KUT(5), O11:K51(1),
Shigella	16	*S. flexneri*; 1b(2), 2a(5), 4a(2), 5(2), 6(1), *S. sonnei* (4)
Salmonella	14	*S. saintpaul* (1), *S. stanley* (1), *S. typhimurium*(1), *Salmonella* B(1), *S. infantis*(4), *S. virchow*(1), *S. newport*(2), *S. enteritidis*(1), *S. anatum*(2), *S. london*(1)
E. coli	2	O138:H28(1*), O148:H28(1**)

UT=Untypable. *=Toxigenic *E. coli* (ST only). **=Toxigenic *E. coli* (LT+ST).

Table 4. Antibiotic Resistance of Enteropathogens Isolated from Overseas Travellers

Organisms	No. of isolates tested	No. of isolates resistant*	Antibiotic resistance pattern				
			SCT	STP	ST	S	T
V. cholerae, biotype *eltor*	2	0					
So-called NAG vibrio	19	1				1	
Shigella	16	14	3	1	5	5	
S. flexneri 1b	2	2	1	1			
2a	5	5			3	2	
4a	2	1				1	
5	2	1				1	
6	1	1			1		
S. sonnei	4	4	2		1	1	
Salmonella	14	3			1	1	1
E. coli	8	2				1	1

*=Those to be able to grow on plates containing 25 μg/ml of an antibiotic.
Antibiotics used were Streptomycin (S), Chloramphenicol (C), Tetracycline (T), Kanamycin (K), Nalidixic acid (N) and Aminobenzyl-penicillin (P).

これら病原菌陽性者91名から検出された菌種は，当所において初めて分離されたコレラ菌を含め6菌種にわたっていたが，検査対象者が異なってもその検出菌種にはそれほど大きな違いは認められなかった．各病原菌別の陽性者の内訳けでは，腸炎ビブリオが最も多く51名，ついでNAGビブリオ（19名），赤痢菌（16名），サルモネラ（14名）となっており，コレラ菌は下痢有症者および採便時すでに下痢のなかった者のそれぞれ1名から分離された．また，大腸菌が2名の下痢有症者から分離されているが，これらはいずれも既知病原大腸菌に一致しない毒素原性大腸菌であった．

なお，各対象者からの病原菌の検出頻度やその検出菌

種は，年間を通じて平均しており，特に季節的なかたよりは認められていない．

つぎに病原菌が検出された91名の旅行先について調査した結果，表2に示すごとく，旅行先が判明した86名のうち，1名（エジプト）を除く85名はいずれも東南アジアであった．東南アジアの国別では，フィリッピンが43名と最も多く，ついでインド，タイなどとなっており，2か国以上の旅行者も15名認められた．

検出菌と旅行国との関係をみると，腸炎ビブリオやNAGビブリオはフィリッピン旅行者に，赤痢菌はインド，パキスタンなどの旅行者に多い傾向であった．

分離菌株の血清型　各検出病原菌104株の血清型別の結果を表3に示した．

2株のコレラ菌はいずれもエルトール生物型で，その血清型は1株が小川型他の1株は稲葉型であった．NAGビブリオは，19株中18株が Sakazaki ら[6] および Shimada ら[7] のO2～O60の血清型に型別され，検出血清型はO24，O5など11菌型であった．腸炎ビブリオ51株のK血清型は21菌型と多彩であったが，検出菌型には特にかたよりは認められなかった．なお，下痢有症者から分離された腸炎ビブリオの大部分は神奈川現象陽性株であった．

赤痢菌ではB群（*S. flexneri*）が16株中12株と多く，本邦ではほとんど検出されない4a，5，6といった血清型がその約半数を占めた．サルモネラの14株は，すべてA～E群に属する9種の血清型に型別されたが，本邦で高頻度に分離される *S. typhimurium* は1株と少なかった．

大腸菌の2株は，いずれも既知病原大腸菌に属さない血清型で，O138:H28の菌株は耐熱性エンテロトキシン（ST）を，O148:H28株は易熱性エンテロトキシン（LT）と耐熱性エンテロトキシンの両者を産生する毒素原性大腸菌であった．

分離菌株の薬剤耐性　分離された104株のうち腸炎ビブリオを除く53株について薬剤感受性試験を行なった．その成績は表4に示すごとくコレラ菌は2株とも感受性菌であったが，NAGビブリオ，赤痢菌，サルモネラおよび大腸菌にはそれぞれ耐性株が認められた．そのなかでも特に赤痢菌は16株中14株（87.5%）と大部分が耐性菌であり，しかもその約65%は多剤耐性菌であった．

考　察

今回の調査で，東京都における海外旅行者下痢症患者の原因の少なくとも約18%（65名）は細菌性によることが確認された．

これら原因の判明した患者65名は，1名を除いていずれもフィリッピンなど東南アジアで罹患したもので，それも原因菌はコレラ菌（2件）をはじめ赤痢菌(15件)，腸炎ビブリオ（36件），NAGビブリオ（13件），サルモネラ（7件）および毒素原性大腸菌（2件）と多種にわたっていた．また，65名のなかにはコレラ菌と赤痢菌，サルモネラとNAGビブリオなどのように2菌種が原因となっているものも認められた．

これまで東南アジアから持ち込まれる下痢症としては，コレラが重視されてきたが，今回の成績からみれば，赤痢や腸炎ビブリオなどの腸管系病原菌による下痢症も，きわめて重要なものであり，コレラと同様，それらに対しても今後十分配慮する必要があろう．

下痢症患者のうち82%は今回原因を明らかにすることができなかった．この一因としては被検材料の一部に発病後日時を経過して材料採取が不適当なものがあったことは勿論，このほか最近海外下痢症の原因菌として注目されてきている毒素原性大腸菌[8]について，一部の患者にしか検討できなかったこと，あるいは Merson ら[9] がその重要性を報告しているウィルスや赤痢アメーバなどについて全く検査していなかったこともあげられよう．

つぎに旅行期間あるいは帰国後を通じて何ら症状を呈さなかった健康者655名について検討した成績では，その26名，4%から病原菌が検出され，この場合もそれらはいずれも東南アジアに旅行したものであった．特にサルモネラの保菌率（1.1%）は現在のわが国の約5倍の[10]，また，赤痢菌の保菌率（0.15%）では150倍以上の[11]高い値を示したことは注目に値する．このような事実は，東南アジアの多くの国においてはこれらの病原菌が依然，広く浸染しており，旅行者がそれらの感染を受ける危険性の高いことを物語るものである．

現在，東南アジアには年間150万余の人々が訪れるといわれる．もし，今回の赤痢菌やサルモネラの保菌率が妥当であるとするならば，毎年，海外から持ちこまれる赤痢菌保菌者は約2,000名，サルモネラ保菌者は約15,000名を数える計算になる．こうした保菌者は患者以上に感染源として重要な存在であり，今後これら海外由来の保菌者を無視した防疫対策はあり得ないといえよう．

結　論

東京都における輸入腸管感染症の実態を明らかにする目的で1977年の1年間，海外で下痢症に罹患した患者を中心に合計1,031名について病原菌の検索を行なった．

その結果，海外旅行下痢症患者146名中38名(26.0%)，下痢症回復患者230名中27名（11.7%），また，何ら異常を認めなかった旅行者655名中26名（4.0%）からそれぞ

れ病原菌が検出された.

これら91名からの検出病原菌は，コレラ菌のほか赤痢菌，腸炎ビブリオ，NAG ビブリオ，サルモネラおよび毒素原性大腸菌の6菌種で，下痢症の原因菌として主要なものは腸炎ビブリオであった.

文　献

1) 斉藤　誠ほか：日感染学誌，50（臨時増刊号），12，1976
2) 岡本亨吉，小寺健一，武田真太郎ほか：日感染学誌，52（臨時増刊号），26，1978
3) 善養寺　浩，坂井千三：腸管系病原菌の検査法，第2版，121，1974，医学書院，東京
4) Kudoh, Y., H. Zen-Yoji, S. Matsushita, S. Sakai, and T. Maruyama : *Microbiol. Immunol.*, 21, 175, 1977
5) MIC 測定法改定委員会：*Chemotherapy*, 22, 1126, 1974
6) Sakazaki, R., K. Tamura, C.Z. Gomez, and R. Sen : *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 23, 13, 1970
7) Shimada, T. and R. Sakazaki : *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 30, 275, 1977
8) Gorbach, S. L., B. H. Kean, D. G. Evans, *et al.* : *N. Engl. J. Med.*, 292, 933, 1975
9) Merson. M. H., G. K. Morris, D. A. Sack, *et al.* : *N. Engl. J. Med.*, 294, 1299, 1976
10) 坂井千三，伊藤　武，津野正朗，岡沢久美子，小野川　尊：日感染学誌，49，481，1974
11) 善養寺　浩，太田建爾，田島光三，津野正朗，工藤泰雄，坂井千三：東京衛研年報，27-1，29，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 6—12, 1978

黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン（A—E）産生に及ぼす塩化ナトリウムの影響

五十嵐 英 夫*, 新 垣 正 夫*, 山 田 澄 夫*
潮 田 弘*, 寺 山 武*, 坂 井 千 三*

Effect of Sodium Chloride on the Growth of *Staphylococcus aureus* and on the Production of Their Enterotoxins A-E

HIDEO IGARASHI*, MASAO SHINGAKI*, SUMIO YAMADA*, HIROSHI USHIODA*, TAKESHI TERAYAMA* and SENZO SAKAI*

Effect of the presence of 0.5 to 10% sodium chloride in Brain Heart Infusion broth on the growth of *Staphylococcus aureus* and on their enterotoxins A-E was studied. When toxin producing strains of *S. aureus* were incubated at 35C for 72 hours, it was found that the addition of sodium chloride in a concentration of 4% in the medium showed strong inhibition of the production of enterotoxins B and C, without a commensurate effect on the growth of the organisms. However, little effect was observed on the production of enterotoxins A, D and E in the presence of 4% or more sodium chloride in the medium.

With regard to the effect of sodium chloride on the generation time of the organisms, the presence of higher concentrations of sodium chloride in the medium prolonged the generation times considerably. However, the cell counts always reached to 10^8/m*l*, even in the presence of 10% of sodium chloride.

食品衛生行政関係者の努力にもかかわらず，わが国におけるブドウ球菌（以下ブ菌と略）食中毒事件[1]は年間200～300件発生しているのが現状である．私どもは，食品に保存料を添加することなく water activity（以下Aw と略）や pH，温度を調節する方法で，ブ菌食中毒の原因物質であるエンテロトキシン（以下 Ent と略）の産生を抑制することによって，本菌食中毒の発生を予防することが可能かどうかを，明らかにする目的で研究を進めている[2]．

これまで黄色ブ菌の増殖とEnt 産生に及ぼす種々の因子の影響に関する研究が多数報告されている[3-8]．しかしながら供試されている Ent 型は Ent B が多く，ブ菌食中毒発生の多い Ent A に関するものが少なく，Ent D およびEに関してはほとんど報告されていない．その理由は，Ent 検出に使用されている方法がゲル内沈降反応のため，その Ent 検出感度が 1μg/m*l* であり，産生量の少ない Ent については，濃縮や部分精製などを行なう必要があり，それらの操作が煩雑かつ長時間を要するためであろう．

そこで，私どもによって開発された，特異性が高く，そして 1 ng/m*l* の検出感度を有する逆受身赤血球凝集反応（reversed passive hemagglutination：以下RPHA と略）[9]を用いて，ブ菌の増殖と Ent A～E 産生に及ぼす Aw の影響を明らかにする目的で研究を進めている．今回は塩化ナトリウム（以下食塩と略）の影響について検討した成績を報告する．

材料および方法

使用菌株は Ent 型の各3株の計15株である．そのうちわけは Ent A 産生株：100, 1560, 4259；Ent B 産生株：243, 42, 274；Ent C 産生株：FRI 361, 108, 251；Ent D 産生株：494, 56, S 92；Ent E 産生株：FRI 326, FRI 918, FRI 921である．

使用培地は Brain Heart Infusion broth（以下 BHI と略：BBL製）に食塩を加えて，最終濃度2，4，6，8，10%（それぞれ Aw は 0.97, 0.96, 0.95, 0.93, 0.92）にそれぞれ調製した．対照培地として，BHI（食塩濃度：0.5%, Aw：0.99）を用いた．これらの培地は中試験管に10m*l* ずつ分注し，121C，15分間滅菌後，実験に用いた．

Aw は水分活性測定器，model 5803（G. Lufft 社,

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

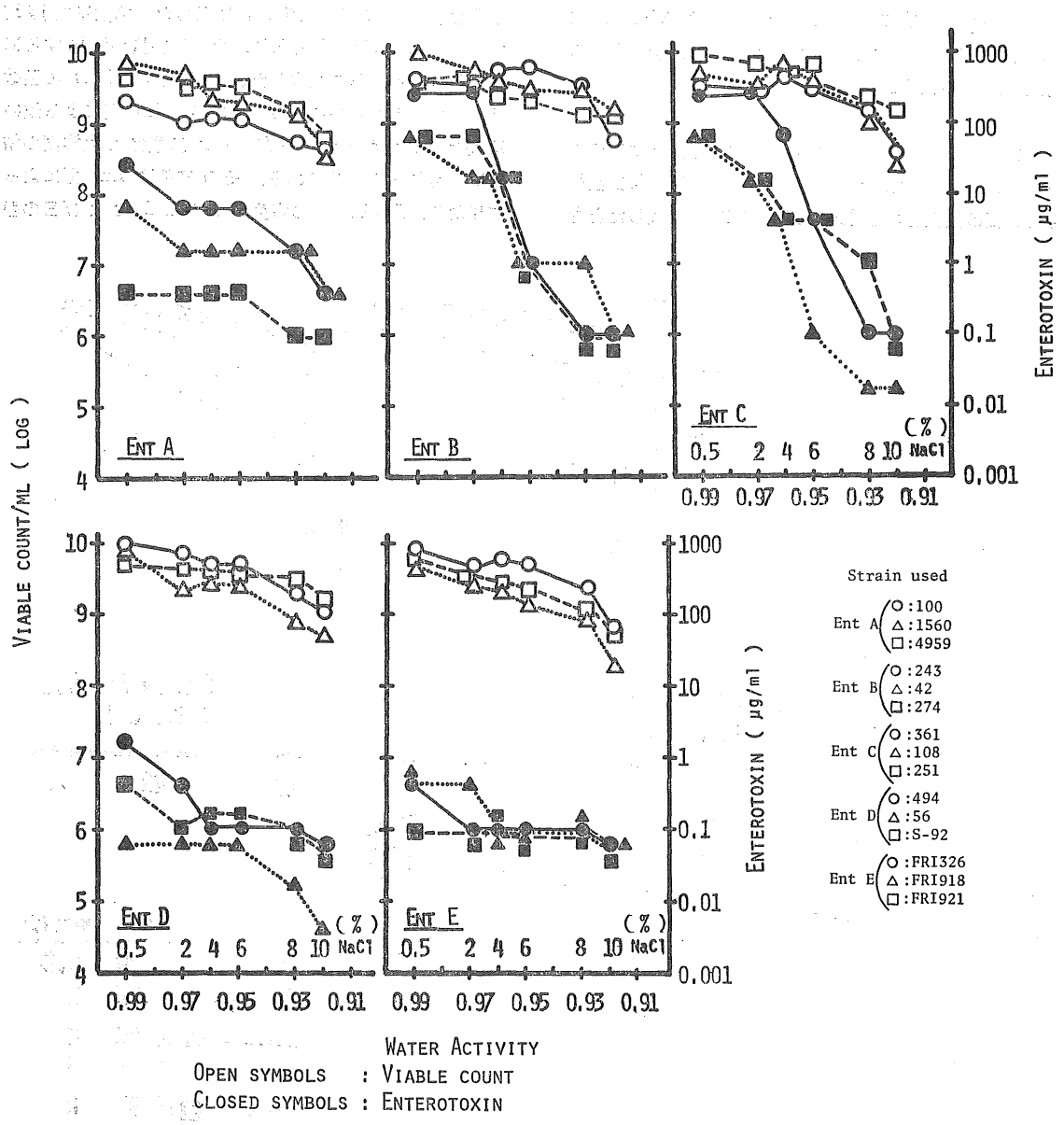


Fig. 1. Effect of Sodium Chloride on Growth and Enterotoxins Production of *Staphylococcus aureus*

西独）を用いて，滅菌後の各培地を測定した．

培養は各菌株を BHI で，35C，18時間培養した後，遠心により BHI で3回洗浄した菌を最終菌数が 10^4/m*l* になるように，各濃度の食塩を含む BHI に接種し，35Cで振盪培養した．

菌数測定は培養4，8，12，18，24，48，72時間の各試料について，標準寒天と直径9cm のプラスチックシャーレを用いる Spiral plating 法（Spiral plater model A：Spiral System Marketing, U.S.A.）[10] により行ない，そのときの平板上のコロニー数より算定した．

エンテロトキシンの定量法は，各培養時間後の試料を Yamada ら[9] によって確立された RPHA によって行なった．しかしながら食塩が，この反応に影響するので，各試料の 0.25m*l* を 0.1M 炭酸水素アンモニウム溶液で平衡化した Sephadex G-25 カラム（0.7×7.0 cm）で脱塩後，凍結乾燥した．この試料を0.25m*l* の0.05 Mリン

酸緩衝液(pH 7.2)に溶解し，Ent 定量のため RPHA に供試した．この操作による Ent の回収率は，予備実験の結果，ほぼ 100 %であった．

成　　績

エンテロトキシンA～Eの各型3株の増殖とエンテロトキシン産生に及ぼす塩化ナトリウムの影響　供試菌株を各濃度の食塩を含む培地で35C，24時間培養したときの菌数と Ent 産生を Fig. 1 に示した．菌数は対照培地でいずれも10^{10}/m*l* であり，食塩添加量が増加するにしたがってわずかに減少した．10%食塩加 BHI の菌数は，各菌株とも10^{8}～10^{9}/m*l* であり，Ent 型による違いは認められなかった．一方，Ent 産生は食塩濃度の増加にともなって抑制される．その抑制は Ent 型によって異なり，Ent B，C の産生が Ent A，D および E の産

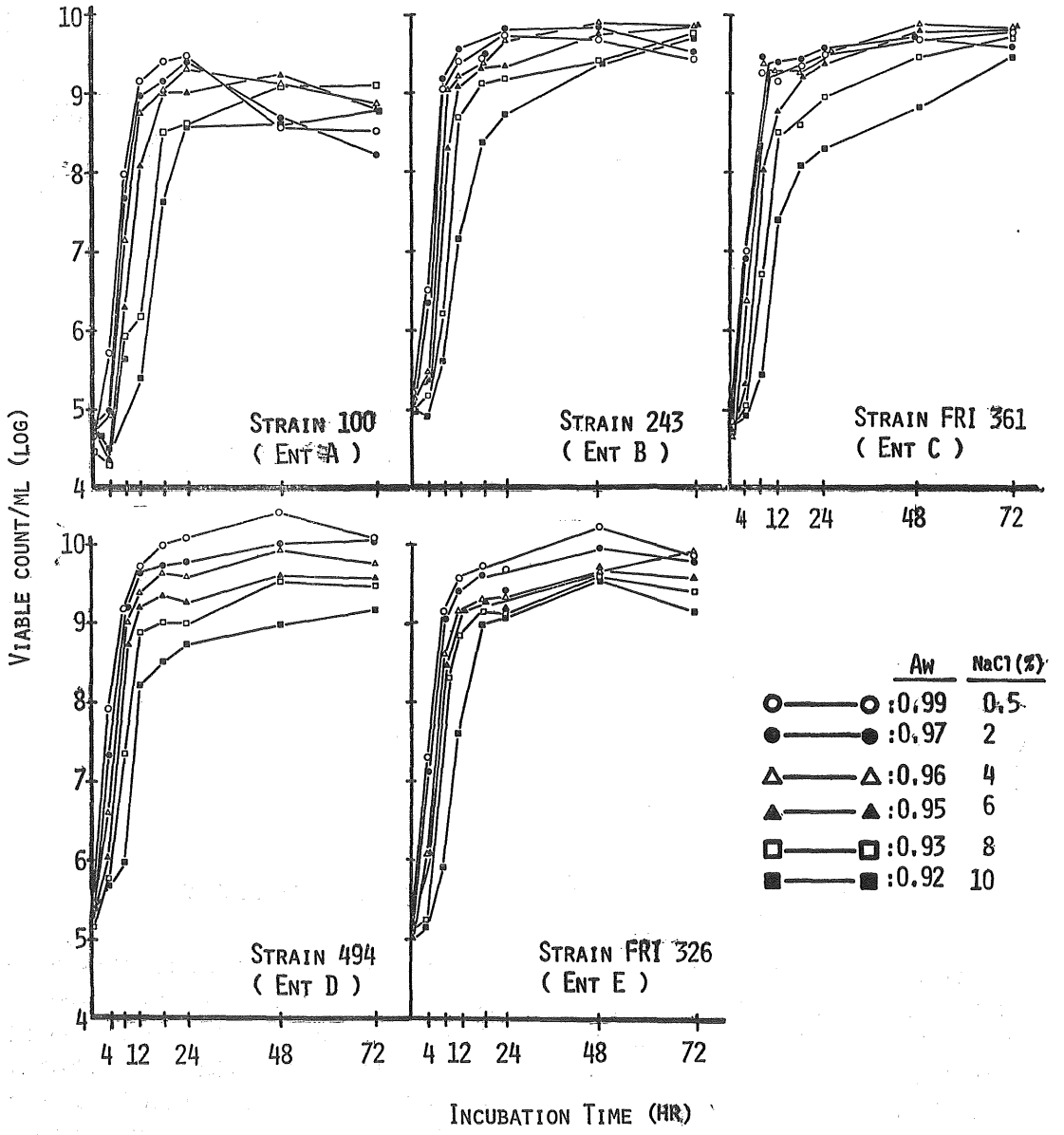


Fig. 2. Effect of Sodium Chloride on Growth and Enterotoxins Production of *Staphylococcus aureus*

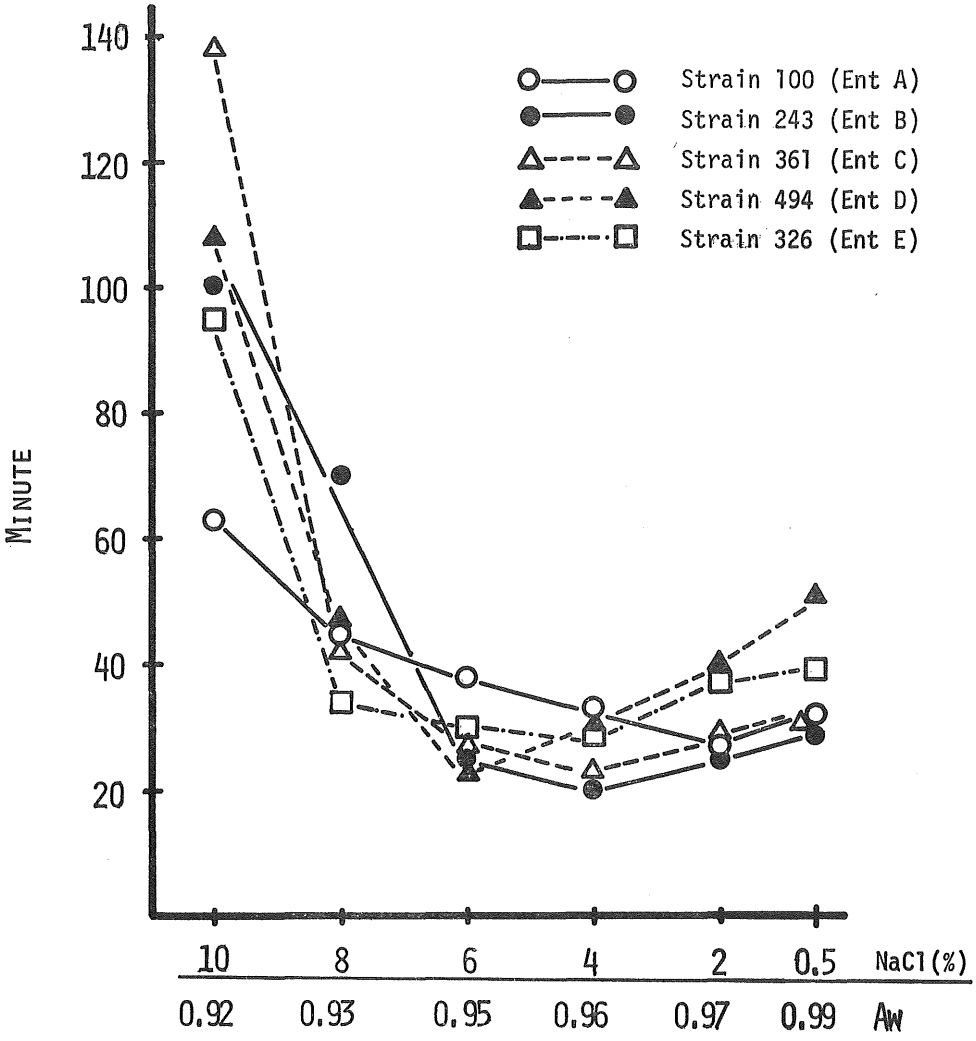


Fig. 3. Effect of Sodium Chloride on Generation Times of *Staphylococcus aureus*

生よりも，著しく抑制されることが明らかになった．この現象はブ菌の菌株差によるものではなく，Ent 型に共通した性状であった．これらの理由から，以後のブ菌の増殖と Ent 産生に及ぼす食塩の影響の実験には，各 Ent の reference 株を用いた．

増殖に及ぼす塩化ナトリウムの影響 Fig. 2 は種々の食塩濃度の BHI を用いて，各 Ent 産生菌の菌数を経時的に測定したものである．各 Ent 型の菌数は食塩濃度の増加とともに，わずかに減少することが認められた．その中でも，とりわけ，Ent B, C およびD産生菌の菌数は，食塩濃度の増加とともに，他の菌株に比較して減少することが認められた．食塩の添加量と Ent 産生菌の増殖との関係を，さらに詳しく検討するために，培養後，4時間と8時間の間の generation time（以下GTと略）を求めて，GTに及ぼす食塩の影響を検討し，その結果を Fig. 3 に示した．各 Ent 産生菌のGTは，食塩濃度が6％までは，30～40分であり，これに対して，食塩濃度が8％になると，GTは長くなり始め，食塩濃度が10％のときの，Ent A～E産生菌のGTは，それぞれ62分，100分，140分，108分，100分であった．このように，10％食塩加培地でのブ菌のGTは，対照培地でのGTと比較すると，2倍以上も長くなっていることが明らかになった．

エンテロトキシン産生に及ぼす塩化ナトリウムの影響

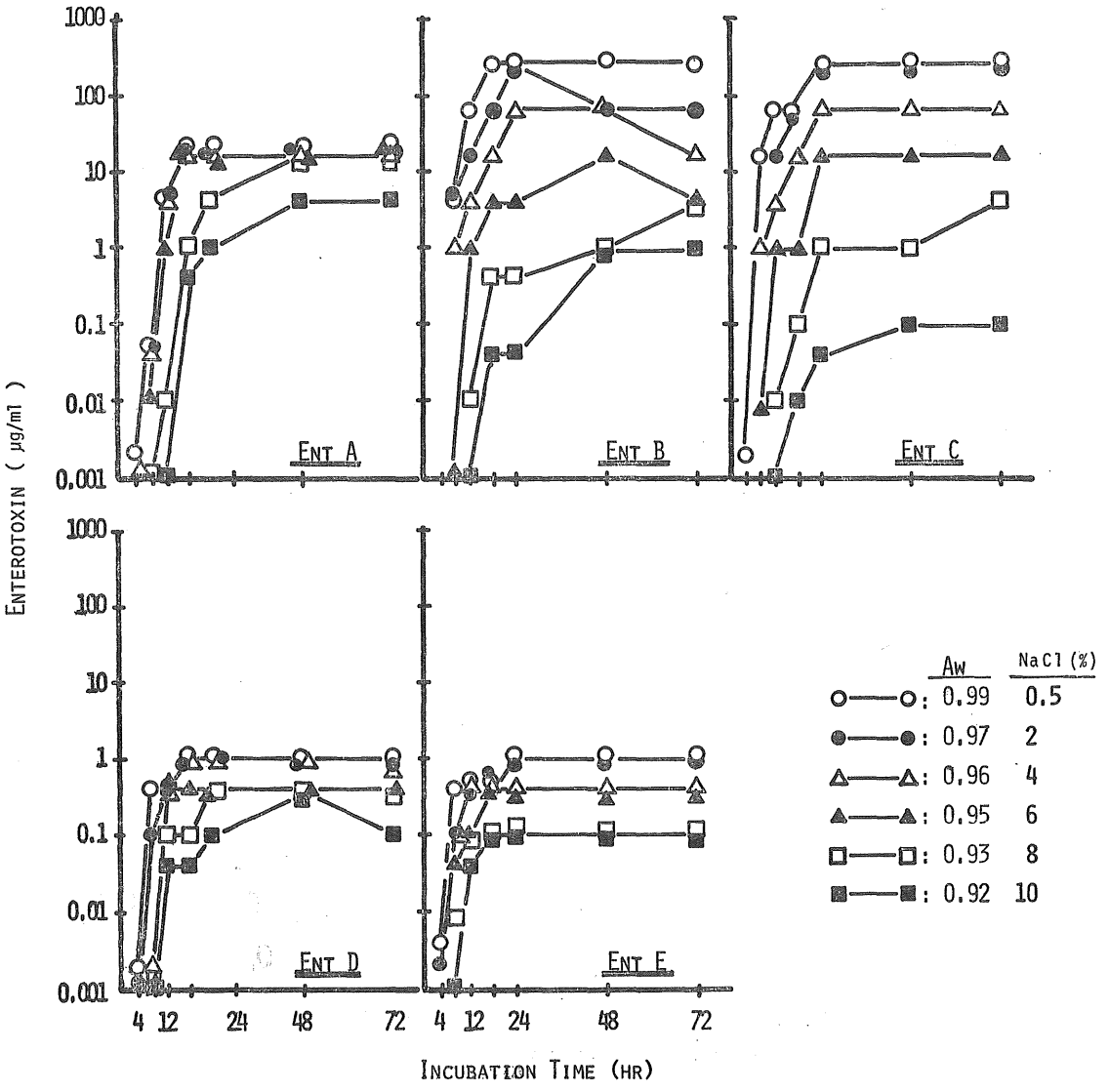


Fig. 4. Effect of Sodium Chloride on Production of Enterotoxin A-E

Fig. 4 は食塩濃度の異なる培地での Ent 産生を経時的に示したものである．Ent 産生は食塩濃度の増加とともに，抑制されるが，その程度は Ent 型によって異なることを明らかにした．すなわち，食塩濃度を2～10%に増加すると，Ent A，D および E 産生は，それほど大きい影響を受けないにもかかわらず，Ent B と C の産生は食塩濃度の増加とともに抑制されることが認められた．対照培地での Ent B および C の産生量は256μg/m*l* であるが，食塩を8%，10%含む培地で18～72時間培養したときの産生量は，0.1～1 μg/m*l* であった．このことは，同じ食塩濃度を含む培地で産生される Ent A 産生量（1～4 μg/m*l*）よりも，Ent B, C の産生量が減少した．このように，Ent 産生に及ぼす食塩の影響は，Ent 型によって異なり，Ent A, D および E の産生よりも，Ent B, C 産生の方が，その影響をより大きく受けることが証明された．対照培地で，4時間培養した後の各型の Ent 産生は，Ent A, C, D および E は1～10ng/m*l* であった．これに対して，Ent B は4時間培養後に検出できず，8時間後に 4μg/m*l* の毒素が検出された．対照培地での Ent 産生は，18～24時間で，各菌株とも

最大となり，それぞれA：16；B：256；C：256；D：1；E：1μg/ml であった．さらに72時間まで培養しても，それぞれの Ent 量の変化は認められなかった．

培地の pH の経時的変化 対照培地の pH は7.30であるが，BHI に食塩を2，4，6，8および10%添加したときの pH は，それぞれ7.27，7.23，7.18，7.15，7.0とわずかながら低下した．これらの培地は pH を修正せずに，それぞれ最終菌数が10^4/ml になるように，洗浄菌を接種後，35Cで培養した．各 Ent 産生菌とも，12～18時間後に，pH が約6.0まで低下し，さらに培養を継続すると，pH は再び上昇し，72時間培養後の pH は，いずれの菌株においても8.5～8.8であった．pH が最低を示す培養時間のときに，いずれの菌株も Ent 産生量が最大近くに達した．

考　察

Scott[11] がブ菌の増殖と Aw に関する研究を行ない，発育できる最低の Aw を0.86と報告して以来，ブ菌の増殖または毒素産生に及ぼす Aw の影響に関する報告が数多くなされている[3-8]．けれども，Ent A または Ent B に関するものがほとんどで，Ent A～E まで一貫した研究の報告はない．

そこで私どもは，Ent の検出感度が1ng/ml と高く，その上，特異性の高い RPHA を用いて，ブ菌の増殖と Ent 産生に及ぼす食塩濃度の影響について検討した．その結果，食塩を添加したためのAw の低下による影響か，食塩そのものによる影響なのか，結論を得ることができなかった．しかしながら，それぞれの食塩濃度を含む培地の Aw を測定してあるので，そのAw 値を用いて，これまで報告されているブ菌の増殖と Ent 産生に及ぼす Aw の影響を，後述のように比較した．

Troller[5,6] は種々の Aw 値に調節した培地を用いて，Ent A およびEnt B 産生菌の増殖と Ent 産生について検討している．その結果によれば，NZ-アミンおよびグリセリンでそれぞれ Aw を調節したときの Ent B 産生菌の増殖は，Aw の低下にしたがって減少している．そのときの毒素産生は，Aw 0.99の対照培地でのみ認められ，それ以下の Aw 値の培地では，ほとんど検出できなかった．このことは，私どもの食塩で調節した培地を用いて行なった成績と多少異なっていた．Ent A 産生菌の増殖は，NZ-アミン，食塩，塩化カリウムで Aw を調節した培地を用いて検討した．その結果，GT に及ぼす Aw の影響は，調節剤の種類によって多少異なっていた．食塩と塩化カリウムの成績は，ほぼ同様で，私どもの成績と一致するが，NZ-アミンで調節した方が前2者よりも，GT に対して強く影響を与えた．また，食塩を用いて Aw を調節した培地での Ent A 産生への影響は，今回得られた私どもの成績と同様であった．

Ent B やC産生量は対照培地で256 μg/ml であるが，食塩を8%，10%に添加した培地での Ent B とCの産生量は，0.04～1μg/ml と著しく低下した．これに対して Ent A 産生量は，1～4μg/ml であり，対照培地での Ent A 産生量（16μg/ml）に比べて，それほど大きい減少ではなかった．このように Aw を調節した培地を用いた Ent 産生実験において，食塩による影響は Ent B やCよりも Ent A，D および Eの方が少ない結果であった．これらのことは，東京都のブ菌食中毒の成績[1] で，約70%が Ent A または Ent A と他の型との複合型によるものであることと関連があるように考えられる．しかしながら，食品中でのブ菌の増殖と Ent 産生に及ぼす食塩の影響が，培地を用いた場合と同様であるかどうか，今後検討しなければならない研究課題である．

Troller and Stinson[8] は Ent AとBの各産生株を用いて，Aw を調節した食品中でのブ菌の増殖と Ent 産生に及ぼすAw の影響について検討している．その成績によると，Ent A と Ent B の産生量は，Aw が0.93（食塩濃度に換算すると8%に相当する）の食品中で，それぞれ1μg/ml と3μg/ml であった．このことは，BHI に食塩を添加した培地を用いた私どもの成績とわずかに異なっている．その違いは，食品からの Ent 検出のために，濃縮やイオン交換体によるクロマトを用いるなど，大変複雑な操作を行なっているので，そのときの回収率も関係しているように考えられる．

今後，さらに食塩以外の Aw 調節剤やグリシンなどの食品添加物として，許可されている薬品との組合せによって，培地または食品の Aw を調節し，これを用いて黄色ブ菌の増殖と Ent 産生の関係を明らかにし，黄色ブ菌食中毒の予防対策の一助にしたい．

結　論

黄色ブ菌の増殖と毒素産生に及ぼす Aw の影響を研究するための手始めとして，食塩を2～10%に含む BHI 培地を用いて，ブ菌の増殖と Ent 産生に及ぼす食塩の影響を検討した．

Ent A～E 型産生ブ菌を各型3株ずつ用い，35C，24時間培養した実験の結果，食塩無添加の対照培地での菌数は，10^{10}/ml であるが，食塩の添加量の増加とともに菌数はわずかに減少し，10%食塩を含む BHI 培地での菌数は，各菌株とも約10^8/ml であった．Ent 産生に及ぼす食塩の影響は，Ent A，D およびEに比較して，Ent B およびCが著しく，菌株の違いよりも，Ent型の違いによる方が大きいことが示された．

各 Ent 型の reference 株を用いて，ブ菌の増殖に及ぼす食塩の影響を検討した．その結果，食塩濃度が 0.5～6％のときのＧＴは 30～40 分であるが，10％食塩添加 BHI 培地での Ent Ａ～Ｅ産生菌のＧＴは，それぞれ62分，100分，140分，108分，100分であった．Ent Ａ～Ｅ産生に及ぼす食塩の影響を検討した結果，対照培地で24時間培養後の Ent Ａ～Ｅ産生量は，それぞれ 16，256，256，1，1μg/m*l* であった．食塩を 8％，10％含有する培地で72時間培養後の Ent Ａ産生量は 1～4μg/m*l* であった．これに対して，Ent Ｂ，Ｃ，ＤおよびＥの産生量は0.1～1μg/m*l* であった．このように Ent Ｂ と Ｃ の産生が Ent Ａ に比較して，食塩によって著しく影響を受けることを明らかにした．

BHI 培地（pH 7.3）に食塩を添加すると，pH が低下し，10％食塩を含有する BHI は pH 7.0であり，これらの食塩を含む培地に，Ent 産生菌を接種し，35Ｃ，12～18時間培養した後の pH は，6.0まで低下し，培養を継続すると，pH は再び上昇し，8.5～8.8に達する．この pH6.0を示す培養時間のとき，いずれの菌株でも En^t 産生が最高値を示した．

（本研究は昭和52年度当研究所調査研究課題「微生物学的立場から見た食品の保存と安全性に関する基礎的研究」として実施し，その概要は日本食品衛生学会第35回学術講演会昭和53年５月および第39回日本細菌学会関東支部総会昭和53年６月で発表した．）

文　献

1) 寺山　武：食衛誌，**18**，142，1977
2) 五十嵐英夫，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，寺山武，坂井千三：第35回日本食品衛生学会講演要旨集，p. 15，1978
3) Genigeorgis, C and W.W. Sadler : *J. Bacteriol.*, **92**, 1383, 1966
4) McLean, R. A., H. D. Lilly, and J. A. Alford : *J. Bacteriol.*, **95**, 1207, 1968
5) Troller, J. A. : *Appl. Microbiol.*, **21**, 435, 1971
6) Troller, J. A. : *Appl. Microbiol.*, **24**, 440, 1972
7) Tompkin, R. B., J. M. Ambrosino, and S. K. Stozek : *Appl. Microbiol.*, **26**, 833, 1973
8) Troller, J. A. and J. V. Stinson : *J. Food Science*, **40**, 802, 1975
9) Yamada, S., H. Igarashi, and T. Terayama : *Microbiol. Immunol.*, **12**, 675, 1977
10) Donnelly, C. B., J. E. Gelchrist, J. T. Peeler, and J. E. Campbell : *Appl. Microbiol.*, **32**, 21, 1976
11) Scott, W. J. : *Adv. Food Res.*, **7**, 83, 1957

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 13—18, 1978

東京都内の中川流域の泥土および淡水魚におけるボツリヌスC型菌の分布

伊藤　武*, 斉藤香彦*, 稲葉美佐子*, 坂井千三*

Demonstration of Type C *Clostridium botulinum* from Sludges and Fresh-Water Fish in the River Nakagawa in Tokyo

TAKESHI ITOH*, KAHIKO SAITO*, MISAKO INABA* and SENZO SAKAI*

A total of 108 sludge samples obtained at 9 sampling stations in the river Nakagawa, 3 stations in the river Shin-nakagawa, and 2 in Tokyo Bay was studied for the presence of *Clostridium botulinum*, both in 1974 and 1976. At the same time, 79 fresh-water fish caught near the sampling stations in the river Nakagawa were also studied for the presence of the organisms. Of the 52 sludge samples in 1974, 28 (53.8%) specimens collected at the stations 1-9 of the river Nakagawa were contaminated by type C *C. botulinum*. It was proved by the demonstration of the type C toxin in the enrichment cultures of the specimens. In the same manner, it was also found that 14 (26.9%) of 56 sludge specimens obtained at 11 sampling stations in 1976 were harboring the type C organism. With regard to fresh-water fish, 9 (11.4%) intestinal contents of crucian carp showed positive results. In these investigations, the presence of type C organisms in the toxin positive enrichment cultures could be proved by the use of the fluorescent antibody technique, although the isolation of the organisms was not successful.

緒　言

1973年，東京都内の中川流域においてカモなどの野鳥のボツリヌスC型中毒の発生がみられ，大量の野鳥が斃死した[1]．その際，著者らは斃死カモの筋胃内容物や発生地域の河川の泥土から多数のボツリヌスC型菌を検出した．このことは，中川流域の河川泥土はもちろん，その河川が流入する沿岸海水および海泥もボツリヌスC型菌に汚染されていることが示唆された．

そこで著者らは，中川流域のボツリヌス菌汚染状況を正確に把握し，今後における本流域での野鳥のボツリヌス中毒あるいはヒトの本中毒発生の予防の基礎資料とするため，野鳥のボツリヌス中毒が発生した約一年後および三年後に，中川河川の泥土および同河川で捕獲した淡水魚を対象にボツリヌス菌の検索を行なったので報告する．

材料および方法

1. 被検材料

1) 泥土　第1回の調査は，1974年6月12日，Fig.1に示す中川河川9カ所，隣接の新中川2カ所および東京湾2カ所計13カ所の地点を対象にした．第2回の調査は，1976年7月6日，第1回の調査と同一カ所の地点13カ所と新中川1カ所（No. 14）を対象にし，各採取地点で各々2件の泥土を採取した．採取した泥土約200gに同量の生理食塩液を加えてよくかくはんし，約10分間静置した後，やや混濁した上層の液を沈降管に移し，10,000 rpm 30分（4℃）間遠心した．その沈渣を 2m*l* の生理食塩液に浮遊させ，被検材料とした．

2) 淡水魚　1974年8月9日，中川で捕獲したフナ74匹，コイ4匹およびナマズ1匹計79匹の淡水魚である．淡水魚はそれぞれ腸管内容物を無菌的に取り出して，生理食塩液 2m*l* を加え，乳剤とし，被検材料とした．

2. ボツリヌス菌の分離・同定

泥土および淡水魚からのボツリヌス菌検索方法の概要は Fig. 2 に示した．

各被検材料は2分し，一方を60℃15分，他方を80℃20分間それぞれ加熱し，直接分離培養と増菌培養を行なった．

直接分離用培地はCW寒天基礎培地（日水製薬）に卵

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

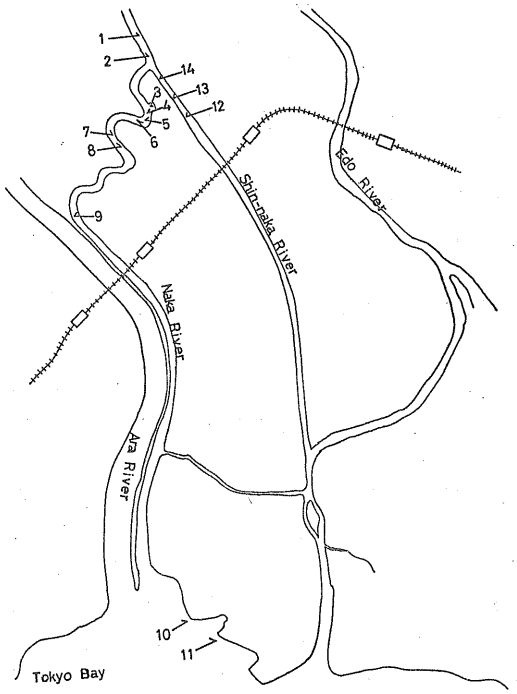


Fig. 1. Site Location for the Collection of Sludge

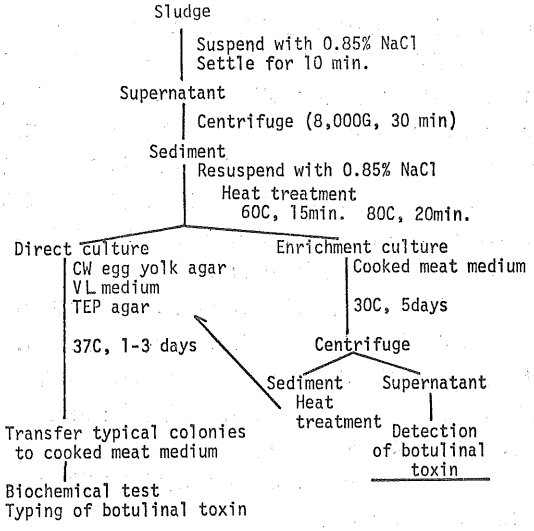


Fig. 2. Scheme for Isolation and Identification of *C. botulinum* from Sludge

黄を10%に加えた卵黄寒天と変法ＶＬ培地（日水製薬）を用いた．前者の培地には，各材料を数白金耳量塗抹し，室温で働く触媒法による嫌気培養を行なった．後者の培地には，東[2]に従って被検材料を10段階希釈し，各希釈列の0.1m*l*ずつを本培地に接種し，ガス噴射法嫌気培養装置（三伸工業）によって Roll tube 法培養を行なった．

増菌培養は，東の変法クックドミート培地[1]に加熱処理被検材料を約0.5m*l*あて接種し，30℃２日間培養後，前記の卵黄寒天と変法ＶＬ培地で分離培養を行なった．

分離菌株の同定は，Holdeman ら[3]や東[2]に従って，各種の生化学的性状検査および後述する方法でボツリヌス毒素の証明を行なって同定した．

3. ボツリヌス毒素の証明

前述の各被検材料の増菌培養液については，Fig. 2 に示すごとく，菌の検出と並行して培養液中のボツリヌス毒素の証明を行なった．すなわち，30℃，４～５日培養後，その3,000rpm 10分間遠心上清をミリポアフィルター（孔径0.45μm）でろ過滅菌し，本ろ液を 15～20g のマウス２匹の腹腔内にそれぞれ0.5m*l*あて接種し５日間観察した．マウスが発症あるいは死亡した場合は，その培養ろ液について，前報[1]に従ってボツリヌスＡ～Ｆの各型抗毒素血清による中和試験を実施して毒素型を決定した．供試したボツリヌス各型抗毒素血清は千葉血清研究所，近藤　久博士および大阪府立大学阪口玄二博士より分与を受けた．

4. 蛍光抗体法によるボツリヌス菌の検出

蛍光抗体法によるボツリヌス菌の証明は，東の変法クックドミート培地に被検材料を接種し，30℃２日間培養液について，直接法で行なった．すなわち，培養液をスライドグラスに塗抹，乾燥し，アセトンで10分間固定．この標本に標識抗体を１滴のせ，湿潤箱に入れ，室温で30分間反応させた．染色標本にリン酸緩衝液（pH 7.1）を十分にそそいで，反応しなかった標識抗体を除去した．緩衝グリセリン液（pH 9.0）で封入し，千代田製蛍光顕微鏡（ＦM200Ａ）で観察した．

蛍光色素標識抗体は市販（Wellcome Reagents Limited）の蛍光色素標識ボツリヌス菌抗体Ａ型，Ｃ型，Ｅ型を使用した．

成　績

1. ボツリヌス菌に対する蛍光抗体法の特異性

河川の泥土および淡水魚の腸管内容物からのボツリヌス菌検索の手段として，蛍光抗体の応用に先立ってあらかじめ市販の蛍光色素標識ボツリヌス菌抗体Ａ型，Ｃ型およびＥ型の特異性について検討した．

Ａ，Ｃ，Ｅ各型のボツリヌス菌蛍光抗体とボツリヌス菌Ａ，Ｂ，Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆの各型との交差反応の成績を Table 1 に示した．Ａ型蛍光抗体に対してはＡ型菌のみでなく，Ｂ，Ｆ型菌にも交差反応があり，Ｃ型蛍光抗体

Table 1. Fluorescent Antibody Reaction of Some Clostridia Strains with Antisera to *C. botulinum*

Organism	No. of strains tested	No. of positive reaction with antiserum		
		Type A	Type C	Type E
C. botulinum				
type A	2	2	0	0
type B	2	1	0	0
type C	5	0	5	0
type D	1	0	1	0
type E	2	0	0	2
type F	2	2	0	0
C. subterminal	1	0	0	0
C. septicum	2	0	0	0
C. sporogenes	5	2	0	0
C. sordellii	2	0	0	0
C. tetani	2	0	0	0
C. chauvoei	2	0	0	0
C. novyi type A	5	0	5	0
C. bifermentans	2	0	0	0
C. absonum	2	0	0	0
C. perfringens	3	0	0	0

には，C型菌以外にD型菌に交差反応がみられた．E型蛍光抗体の場合は，E型菌のみに特異的であった．なお，蛋白非分解のB型QC株はいずれの蛍光抗体でも陰性であった．また，ボツリヌス菌類縁菌との交差反応では，A型蛍光抗体は *C. sporogenes* 5株中2株と，C型蛍光抗体は *C. novyi* と交差反応がみられた．しかしE型蛍光抗体の場合は，類縁菌との交差反応は全く認められなかった．なお，供試したボツリヌス菌のうちC型菌を除く9株は大阪府立大学阪口玄二博士，その他ウェルシュ菌以外の *Clostridium* 属23菌株は金沢大学西田尚紀博士より分与を受けた．

2. 泥土からのボツリヌス菌検出

1) 第1回調査（1974年）

1974年6月に調査した中川，新中川，東京湾13カ所の泥土からのボツリヌス菌検出状況を Table 2 に示した．

直接培養および増菌培養でボツリヌス菌が検出されたのは No. 1 の地点で採取した泥土のみであった．

しかし，増菌培養液の上清中からのボツリヌス毒素検出成績では，13カ所から採取した泥土52件中28件の培養上清にマウス致死毒素が認められた．ボツリヌス抗毒素血清による中和試験では，この28件の培養上清中の毒素はC型抗毒素血清によって特異的に中和された．

蛍光抗体法では，C型ボツリヌス毒素が証明された培養液からはC型蛍光抗体で特異的に染色される杆状の菌体が認められた．

すなわち，調査した13カ所の泥土のうち中川から採取した全例（No. 1～No. 9）の泥土よりボツリヌスC型菌の存在が証明された．なお，中川の No. 1 の地点の泥土から検出されたボツリヌス菌株の毒素型は宮崎ら[4]によってD型菌と同定された．

2) 第2回調査（1976年）

1976年7月に第1回目の調査と同一地点から泥土を採取し，ボツリヌス菌の検索を行なった．

被検泥土56件中14件（25.0%）の培養液よりC型抗毒素血清によって特異的に中和される毒素が証明されたがC型菌を分離することはできなかった．

C型ボツリヌス毒素が証明された地点は，Table 3 に示すように，中川の6地点，(No.1, 4, 6～9)，新中川3地点（No. 12～14）および東京湾2地点(No. 10, 11)である．

3. 淡水魚の腸管内容物からのボツリヌス菌検出

中川で捕獲したフナ74匹，コイ4匹およびナマズ1匹計79匹の腸管内容物からのボツリヌス菌検出成績を Table 4 に示した．

被検材料の直接および増菌培養からはボツリヌス菌は検出されなかった．しかし，60℃15分加熱処理材料の増

Table 2. Distribution of *C. botulinum* in Sludge from the River Nakagawa at 1974

Location	No. of Samples tested	No. of *C. botulinum* isolated	No. of confirmed toxic cultures					
			Type A	Type B	Type C	Type D	Type E	Type F
1	4	1*	0	0	4	0	0	0
2	4	0	0	0	4	0	0	0
3	4	0	0	0	4	0	0	0
4	4	0	0	0	2	0	0	0
5	4	0	0	0	3	0	0	0
6	4	0	0	0	4	0	0	0
7	4	0	0	0	2	0	0	0
8	4	0	0	0	4	0	0	0
9	4	0	0	0	1	0	0	0
10	4	0	0	0	0	0	0	0
11	4	0	0	0	0	0	0	0
12	4	0	0	0	0	0	0	0
13	4	0	0	0	0	0	0	0
Total	52	1	0	0	28	0	0	0

* *C. botulinum* type D

Table 3. Distribution of *C. botulinum* in Sludge from the River Nakagawa at 1976

Location	No. of Samples tested	No. of *C. botulinum* isolated	No. of confirmed toxic cultures					
			Type A	Type B	Type C	Type D	Type E	Type F
1	4	0	0	0	1	0	0	0
2	4	0	0	0	0	0	0	0
3	4	0	0	0	0	0	0	0
4	4	0	0	0	2	0	0	0
5	4	0	0	0	0	0	0	0
6	4	0	0	0	1	0	0	0
7	4	0	0	0	1	0	0	0
8	4	0	0	0	1	0	0	0
9	4	0	0	0	1	0	0	0
10	4	0	0	0	1	0	0	0
11	4	0	0	0	3	0	0	0
12	4	0	0	0	1	0	0	0
13	4	0	0	0	1	0	0	0
14	4	0	0	0	1	0	0	0
Total	56	0	0	0	14	0	0	0

菌培養上清79件中8件，80℃30分加熱処理材料の増菌培養上清79件中2件からそれぞれボツリヌスC型毒素が証明された．これらの10件の培養液中にはC型蛍光抗体で特異的に染色される菌体が確認された．なお，80℃処理材料でC型毒素が検出された2件中の1件からは60℃加熱処理でもC型毒素が証明されている．

以上の結果より，中川で捕獲した淡水魚79匹中9匹（11.4%）の増菌培養液からボツリヌスC型毒素が証明されまた同培養液から蛍光抗体法でC型菌が認められた．

考　察

本邦における土壌中のボツリヌス菌分布については，

Table 4. Incidence of *C. botulinum* in the Gastrointestinal Tract of Fresh Water Fish from the River Nakagawa in Tokyo

Samples	No. of Samples tested	No. of *C. botulinum* isolated	No. of confirmed toxic cultures					
			Type A	Type B	Type C	Type D	Type E	Type F
Crucian carp	74	0	0	0	9	0	0	0
Carp	4	0	0	0	0	0	0	0
Catfish	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	79	0	0	0	9 (11.4)*	0	0	0

* %

中村ら[5]やKanzawaら[6]は北海道全域にわたる調査を行ない，海岸の砂からは13.1%，内陸の河川や湖沼の泥土では18.8%からボツリヌスE型菌を証明し，児玉ら[7]は秋田県下の土壌から高率にE型菌を検出している．関東地方では，小林[8]の調査成績によると，東京，神奈川，茨城，埼玉および千葉の各都県の耕土，川岸，海岸，空地などの土壌からはボツリヌス菌は検出されていない．これまでのところ，本邦での土壌中のボツリヌス汚染は，山口県や九州地方で本菌が検出された報告[9,10]もあるが，北海道や東北地方に濃厚に分布するものと考えられていた．

ところが，著者らは1973年にカモなど野鳥のC型ボツリヌス中毒発生が認められた中川河川底の泥土について，1974年と1976年の2回にかけてボツリヌス菌の分布調査を行なった結果，中毒発生がみられた地域あるいはそれよりかなり離れた中川下流や上流および隣接の新中川の泥土からC型菌が証明され，本流域の泥土はボツリヌスC型菌芽胞で濃厚に汚染を受けていることが確認された．1974年の調査では，東京湾海泥2件からはボツリヌス菌が証明されなかったが，1976年の調査では，ほぼ同一カ所について調査をしたところ，C型菌の汚染が証明された．すなわち，東京湾に流入している中川の泥土がC型菌で汚染されていることから，汚染度は高くないが，東京湾海泥も本菌汚染を受けていることが明らかとなった．

ボツリヌス菌の分布調査で注目されることは，河川や海泥中の本菌汚染と並行して，同地域に生息する魚介類などが本菌を保菌していることである．今回の調査でも，中川で捕獲した淡水魚の腸管内容物からボツリヌスC型菌が証明された．

これらのことより，中川流域では，カモなど野鳥のボツリヌス中毒の再発生が予測され，第1回目の調査の約1カ月後1974年8月22日～10月に，1973年に発生した同地域でカモのボツリヌスC型中毒の再発生が認められ，今後とも同様の発生を繰り返す危険性が十分に予測される．

本邦におけるボツリヌス菌の分布はこれまでの報告ではE型菌が主体であって，土壌からC型菌が証明されたのは著者らの今回の報告が最初である．Wardら[11]はメキシコ湾，Mortojudoら[12]はインドネシヤ，Carrollら[13]はヴェネズェラ，Smithら[14]は英国での泥土や魚介類などからE型菌やA型菌と共にC型菌も証明しており，C型菌の分布は，特定な地域にのみ限局して汚染しているものではなく，広い地域にわたって分布するものと考えられる．なお最近，石川県の湖沼[15]や琵琶湖[16]からもC型菌やD型菌が証明されている．

著者らはカモ[1]やミンク[17]のC型中毒の際には，罹患動物からC型菌の分離に成功しているが，C型菌は寒天平板培地上で集落形成が極めて悪いので，各種の被検材料からC型菌を分離することは容易でない．今回の調査でも，増菌培養上清中にC型抗毒素血清によって中和される毒素が証明されたが，Roll-tube 法などの分離培養を試みてもC型菌を分離することができなかった．ボツリヌス菌検索の一手段として，蛍光抗体法による方法がWalkerら[18]やBacillieら[19]などによって報告されている．著者らも，本法を応用したところ，C型毒素が証明された培養液中からは，C型蛍光色素標色抗体で染色される杆菌が確認できた．C型蛍光色素標色抗体はD型菌および *Clostridium novyi* に交差反応を示し，特異性に問題があるが，菌検索が著しく困難なC型菌では培養液について蛍光抗体法で該菌を確認する方法も推奨できるであろう．

結　論

東京都内の中川流域では，1973年にカモなど野鳥がボツリヌスC型中毒で多数斃死した．本流域におけるその後のボツリヌス菌汚染状況を追跡するため，中毒発生から約1カ年後の1974年6月と，1976年7月に中川および新中川の泥土，東京湾の海泥，および中川河川で捕獲し

た淡水魚についてボツリヌス菌の検索を行なった．

中川9カ所，新中川3カ所，東京湾2カ所計14カ所の地点の泥土について，ボツリヌス菌の分離，培養液中の毒素の証明および蛍光抗体法による菌の確認を行なった結果，中川の9カ所で採取した泥土，新中川の3カ所の泥土および東京湾で採取した泥土からボツリヌスC型菌が証明された．

中川で捕獲したフナ74匹，コイ4匹，ナマズ1匹計79匹の腸管内容物のうち，フナの腸管内容物9件(11.4%)からボツリヌス菌が証明された．

謝辞 稿を終るに当り，ボツリヌス抗毒素血清の分与をうけた千葉血清研究所近藤 久博士および抗血清とボツリヌス菌株の分与をうけた大阪府立大学阪口玄二博士ならびに Clostridium 属菌株の分与をうけた金沢大学西田尚紀博士に深謝する．

文 献

1) 坂井千三，伊藤 武，岡沢久美子，善養寺 浩，辺野喜正夫：東京衛研年報，26-1，14，1975
2) 東 量三：水産生物化学，恒星社厚生閣，東京，1974
3) Holdeman, L. V. and Moore, W. E. C.: *Anaerobe Laboratory Manual*, 67, 1972, Virginia Polytechnic Institute and State University Virginia
4) 宮崎修一，岩崎正和，山本耕一郎，H. Riemunn，阪口玄二，伊藤 武，岡沢久美子，坂井千三：日細誌，31，213，1976
5) 中村 豊，飯田広夫，佐伯 潔，神沢謙三：北海道衛生研究所報，3，1，1954
6) Kanzawa, K., T. Ono, T. Karashimada, and H. Iida: *Proceedings of the First U.S-Japan Conference on Toxic Microorganisms*, 299, 1968
7) 児玉栄一郎，藤沢宗一，坂本昭男，浅野宏治：秋田県衛生研究所報，6，64，1962
8) 小林三郎：弘前医学，12，682，1961
9) Wakamatsu, T.: *Kitasato Arch. of Exp. Med.* **XXV**, 163, 1953
10) 山県 宏：山口県衛生研究所年報，2，22，1959
11) Ward, B. Q., B. J. Carroll, E. S. Garrett, and G. B. Reese: *Appl. Microbiol.* 15, 629, 1967
12) Mortojudo, J. W., E. G. Siagian, F. Suhadi, B. Q. Ward, and W. S. Ward: *J. Appl. Bact.*, 36, 437, 1973
13) Carroll, B. J., E. S. Garrett, G. B. Reese, and B. Q. Ward: *Appl. Microbiol.* 14, 837, 1966
14) Smith, G. R. and C. Moryson: *J. Hyg.*, 75, 371, 1975
15) Serikawa, T., S. Nakamura, and S. Nishida: *Microbiol. Immunol.*, 21, 127, 1977
16) 林 賢一，徳地幹夫：滋賀県立衛生研究所報，12，27，1976
17) 伊藤 武，坂井千三，田渕 清，今井信実：麻布獣医科大学研究報告，1，29，1976
18) Walker, P. D. and I. Batty: *J. Appl. Bact.*, 27, 140, 1964
19) Bacillie, A., J. S. Crowther, and A. C. Baird-Parker: *The Microbiological Safety of Food*, Academic Press London and New York, 317, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 19—23, 1978

東京都における過去3年間の腸炎ビブリオ食中毒発生状況と患者分離株の血清型および耐熱性溶血毒産生性

工藤泰雄*, 津野正朗*, 太田建爾*, 松下　秀*, 坂井千三*

Serotype and Production of Heat-Stable (Kanagawa) Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from the Food Poisoning Cases

YASUO KUDOH*, MASAAKI TSUNO*, KENJI OHTA*, SHIGERU MATSUSHITA* and SENZO SAKAI*

During the period from 1975 through 1977, a total of 141 outbreaks of food poisonings due to *Vibrio parahaemolyticus* involving 3,186 patients had occurred in Tokyo.

Through the results of serological typing made on a total of 1,176 isolates from these food poisoning cases revealed that there was a conspicuous yearly shift of the major prevalent strains. Namely, predominant strains in 1975 were K60 (18.9%) and K13 (16.5%), but in 1976, they were replaced by K 55 (16.7%) and K29 (15.1%), and in 1977, more than half of the isolates were typed into K12 (53.4%).

It was also found that 1,122 (95.4%) of the 1,176 isolates from the food poisoning cases produced heat-stable (Kanagawa) hemolysin, when tested on modified Wagatsuma blood agar or by reversed passive hemagglutination reaction using sheep red blood cells sensitized with specific immunoglobulin against the toxin. This result strongly supports our previous findings that the Kanagawa positive strains are pathogenic for humans.

腸炎ビブリオ食中毒は，1961年厚生省の食中毒精密統計に収録されるようになって以来これまで，依然としてわが国で発生する食中毒の首位の座を占め，その発生件数もほとんど減少をみていない．

この腸炎ビブリオ食中毒の疫学調査には，これまで分離菌株のOおよびK抗原に基づいた血清型別[1]が広く応用され，また本菌の病原性との関連から最近では神奈川現象と呼ばれる特定の条件下で溶血現象にあずかる耐熱性溶血毒の産生性試験[2]も併せて行なわれるようになってきている．

著者らも，東京都内に発生した本菌食中毒の疫学調査の一環として，患者分離株を中心に1961年以降血清型別を，1963年よりは血清型別と併せて神奈川現象試験を行ない，これらが本菌食中毒の診断や疫学の解析にきわめて有効な手段を提供することを報告してきた[3-7]．

本報では，引続き1975年から1977年の3年間に分離された食中毒患者株の血清型および耐熱性溶血毒産生性について検討を加えた成績ならびにこの期間における腸炎ビブリオ食中毒の発生状況の概要について報告する．

材料および方法

供試菌株　1975年から1977年の3年間に東京都内に発生した集団食中毒事例あるいは散発下痢患者から当研究所において分離された菌株である．分離菌株は，1検体から3～5個の集落について血清型別を行ない，同一血清型菌だけが検出された場合は1株とし，いくつかの異なった血清型菌が認められた場合には血清型を異にするごとに1株とした．

なお，分離菌の同定は善養寺ら[8,9]の方法に従って行なった．

血清型別法　K抗原型別は市販（東芝化学工業KK）のK1～K59診断用抗血清を，またO群別はO1～O11の市販抗血清をそれぞれ用い，型のごとくスライド上凝集反応法により行なった．新K抗原型であるTNK13については，1975年に当研究所において腸炎ビブリオ（O5, Kut）集団食中毒事例より分離された神奈川現象陽性株（T-75-319）より善養寺ら[8]の方法に従って得た

* 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

Table 1. Monthly Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Food Poisoning in Tokyo

Year		Month							Total
		May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	
1975	Outbreaks	2	1	17	25	15	3	1	64
	Patients	108	8	169	981	139	249	216	1,870
1976	Outbreaks	1		2	7	9			19
	Patients	13		24	90	396			523
1977	Outbreaks		3	36	5	12	2		58
	Patients		99	516	51	53	74		793
Total	Outbreaks	3	4	55	37	36	5	1	141
	Patients	121	107	709	1,122	588	323	216	3,186

自家製の特異家兎免疫抗血清を用いて行なった．なお，本血清型は1977年に所ら[10]によって提案された新抗原型K60と一致することが後日確認された．

耐熱性溶血毒素産生（神奈川現象）試験　5％ウサギ赤血球加変法我妻寒天培地を用いて行なった[11]．また一部の菌株については，太田ら[12]の方法に従い，菌株の培養沪液から逆受身血球凝集（RPHA）反応により耐熱性溶血毒の直接検出を試みた．この RPHA 反応には抗溶血毒素特異免疫グロブリンで感作した緬羊赤血球を用い，マイクロタイター法で行なった．

結果および考察

腸炎ビブリオ食中毒の発生状況　東京都において1975～1977年の3年間に発生した腸炎ビブリオ食中毒の年次別，月別発生状況を表1に示した．本菌食中毒の発生を年次別にみると，1976年が19事例と少なくなっているがその他の年はほぼ例年なみであった．また月別でみた場合，これまで報告[3-7]してきたように発生はおおむね6～10月にわたっているが，1975年には5月および11月に，また1976年には5月にも発生例がみられた．12～4月にかけてはこれまでの報告と同様本菌による食中毒事例はまったく認められなかった．

本食中毒の発生規模は，1966年頃よりそれまでの1事件当たり平均40名の患者発生から20名前後の規模へと顕著な縮少がみられたが，それ以降は今回の調査期間も含めてほとんど変っていない．

患者由来株のK抗原型の年次別推移　1975～1977年の3年間に分離された腸炎ビブリオ1,176株のK抗原型による血清型別成績を表2に示した．年次により若干の差異はあるが，分離株のうち89.5～96.0％が既知のK1～K59抗原および著者らの新K血清型 TNK13（K60）のいずれかに型別された．出現K抗原型は，1975年が35型，1976年が21型，また1977年が31型と多彩であり，これまでと同様，各年次の主要起因菌型に著しい変動が認められた．

1975年の主要起因菌型は，新K血清型の TNK 13（18.9％），K13（16.5％），K15(10.6％)などで，1974年のK5（13.3％）およびK10（10.6％）から大きく入れ替っている．また，1976年には前年ほとんど検出されなかったK55（16.7％），K29(15.1％)およびK54(10.8％）が主要起因菌型として認められた．1977年には，主菌型は前年0.2％にしか検出されていなかったK12にまた交代し，本菌型は全分離株の実に53.4％と著しく高い割合を占めた．

このように，今回の調査でも腸炎ビブリオ食中毒の大きな特徴の1つともいえる主要起因菌の菌型の変動が観察されたが，その変動傾向にはこれまでの成績からも明らかなように（表3）特に定まったものは認められていない．こうした変動が何に基づくかは現在もなお不明であるが，本菌がその生態からみてヒトの環境に常在性がなく，年毎に新たに海の環境から持ち込まれることが最も大きな原因になっていると思われる．

なお，今回著者らが新K抗原型とした TNK 13は，1975年に118株，1976年に5株分離されているが，この血清型はその後の検討により1977年に所ら[10]によって新K抗原型として提案され，腸炎ビブリオ型別委員会によりK60として承認された血清型と完全に同一であることが確認された（表4）．

耐熱性溶血毒素産生（神奈川現象）試験　患者分離株1,176株の成績を表5に示した．年次により若干の差はあるが，これまでの成績と同様，分離株の大部分（95.4％）は溶血毒素産生株であった．陰性株は約5％に認められたが，これらの菌株はいずれも集団食中毒患者の一部から，原因と推定された同一血清型の溶血毒産生菌とともに随伴的に検出されたもので，その血清型も原因菌

Table 2. Serological Types of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from Food Poisoning Cases in Tokyo

K type	1975 No. of isolates(%)	1976 No. of isolates(%)	1977 No. of isolates(%)
3	7(1.1)	—	1(0.3)
4	28(4.5)	—	3(0.8)
5	14(2.2)	—	2(0.5)
6	4(0.6)	1(0.5)	2(0.5)
7	15(2.4)	14(7.5)	3(0.8)
8	10(1.6)	12(6.5)	7(1.9)
9	4(0.6)	—	1(0.3)
10	45(7.2)	7(3.8)	2(0.5)
11	27(4.3)	5(2.7)	1(0.3)
12	16(2.6)	1(0.5)	195(53.4)
13	103(16.5)	4(2.2)	—
15	66(10.6)	3(1.6)	19(5.2)
17	3(0.5)	—	—
18	1(0.2)	—	2(0.5)
19	3(0.5)	1(0.5)	28(7.7)
20	2(0.3)	4(2.2)	1(0.3)
21	8(1.3)	—	1(0.3)
22	7(1.1)	4(2.2)	6(1.6)
25	1(0.2)	—	1(0.3)
28	3(0.5)	1(0.5)	1(0.3)
29	—	28(15.1)	1(0.3)
30	1(0.2)	—	—
32	—	—	1(0.3)
33	2(0.3)	3(1.6)	1(0.3)
34	2(0.3)	—	1(0.3)
36	1(0.2)	—	—
37	3(0.5)	1(0.5)	1(0.3)
38	2(0.3)	—	1(0.3)
39	4(0.6)	—	1(0.3)
41	—	1(0.5)	—
46	—	—	2(0.5)
49	—	—	2(0.5)
51	1(0.2)	—	1(0.3)
53	1(0.2)	—	—
54	14(2.2)	20(10.8)	1(0.3)
55	2(0.3)	31(16.7)	31(8.5)
56	19(3.0)	1(0.5)	3(0.8)
57	45(7.1)	2(1.1)	—
59	18(2.9)	—	—
TNK13(K60)	118(18.9)	5(2.7)	—
UT	25(4.0)	14(7.5)	42(11.5)
Total	625(100)	186(100)	365(100)

Table 3. Yearly Change in Major Causative K Type Strains of *Vibrio parahaemolyticus* in Food Poisoning in Tokyo

Year	No. of isolates tested	Order of dominant K types				
		1st	2nd	3rd	4th	5th
1964	488	K 3(42.2)	K 9(12.7)	K 8(12.3)	K13(7.8)	K 5(7.2)
1965	608	K33(41.3)	K44(15.3)	K46(8.2)	K 3(8.1)	K12(4.9)
1966	376	K13(36.2)	K33(18.9)	K 5(9.8)	K18(3.7)	K12(3.5)
1967	559	K 7(46.7)	K38(21.6)	K33(8.6)	K 8(3.9)	K 5(2.3)
1968	505	K38(29.8)	K 7(23.0)	K11(9.7)	K 8(9.1)	K12(3.8)
1969	629	K 7(26.2)	K29(8.7)	K12(8.1)	K54(7.6)	K44(5.4)
1970	574	K 7(23.2)	K55(13.9)	K15(12.4)	K54(9.4)	K56(5.1)
1971	822	K 8(24.8)	K 4(24.0)	K56(9.2)	K11(7.9)	K54(5.8)
1972	799	K 8(14.5)	K15(12.3)	K39(9.3)	K12(9.1)	K 4(8.3)
1973	498	K33(30.9)	K12(10.6)	K 7(9.6)	K13(9.4)	K54(8.8)
1974	188	K 5(13.3)	K10(10.6)	K19(10.1)	K54(8.5)	K12(8.0)
1975	625	K60(18.9)	K13(16.5)	K15(10.6)	K10(7.2)	K54(7.2)
1976	186	K55(16.7)	K29(15.1)	K54(10.8)	K 7(7.5)	K 8(6.5)
1977	365	K12(53.4)	K55(8.5)	K19(7.7)	K15(5.2)	K 8(1.9)

Table 4. Antigenic Analysis of K Antigen, TNK13 and K60, by Slide Agglutination Test

Antigen	Antiserum		
	K1-59	TNK13	K60
K1-59	NT*	—	—
TNK13(T-75-319)	—	##	##
K60(KY-V-8)	—	##	##

* NT: Not tested

Table 5. Kanagawa Hemolysin Test of *Vibrio parahaemolyticus* from Food Poisoning Cases in Tokyo

Year	No. of isolates tested	No. of positives (%)
1975	625	605(96.8)
1976	186	173(93.0)
1977	365	344(94.2)
Total	1,176	1,122(95.4)

型とは異にするものであった．なお，今回の成績において，太田ら[12]がすでに指摘しているように，陽性株のなかには毒素産生量が少なく，感度の高い RPHA 反応によってしか陽性を示さない株が認められた．このことは，陰性株の腸炎起病性を論じるうえにおいてきわめて重要な点であり，今後，陰性株が食中毒の原因と推定された場合には，それが真に陰性株によるものであるか否か，より感度の高い方法による結果に基づいて慎重に決定されなければならないことを示唆している．

結　論

1975～1977年にかけて東京都内において計 141 件の腸炎ビブリオ食中毒の発生があった．これらの食中毒あるいは散発下痢症患者から分離された 1,176 株について血清型別を行なった結果，1,095株（93.1%）がK1～K60のK抗原型のいずれかに型別された．

主要起因菌型は，1975年では，K60（18.9%）およびK13（16.5%）；1976年ではK55（16.7%）およびK29（15.1%）；1977年ではK12（53.4%）となっており，これまでに得られた成績と同様，年次による菌型の入れ替りが顕著であった．

分離株の耐熱性溶血毒産生試験の結果では，1,176 株中 1,122 株（95.4%）が陽性であり，本溶血毒産生株が病原株であることを強く支持する結果であった．

文　献

1) The Committee on the Serological Typing of *Vibrio parahaemolyticus*: *Japan. J. Microbiol.*, 14, 249, 1970

2) Miyamoto, Y., T. Kato, Y. Obara, S. Akiyama,

K. Takizawa, and S. Yamai : *J. Bacteriol.*, **100**, 1147, 1969
3) 善養寺 浩, 坂井千三, 寺山 武, 工藤泰雄, 一言広：日本伝染病学会誌, **37**, 195, 1963
4) 善養寺 浩, 坂井千三, 寺山 武, 工藤泰雄, 伊藤武, 斉藤クラ, 長崎 護, 伊藤多美夫, 畑野逸与：東京衛研年報, **15**, 31, 1965
5) 工藤泰雄, 太田建爾, 池島伸至, 伊藤 武, 善養寺浩：東京衛研年報, **22**, 15, 1971
6) 工藤泰雄, 太田建爾, 斉藤香彦, 松下 秀, 坂井千三, 善養寺 浩：東京衛研年報, **26-1**, 25, 1975
7) Kudoh, Y., S. Sakai, H. Zen-Yoji, and R. A. LeClair : International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*, Edited by Fujino, T., G. Sakaguchi, R. Sakazaki, and Y. Takeda, 9, 1974, Saikon. Publ. Co., Tokyo
8) 善養寺 浩, 寺山 武, 工藤泰雄, 太田建爾, 坂井千三：日本細菌学雑誌, **26**, 298, 1971
9) Zen-Yoji, H., R. A. LeClair, K. Ohta, and T. S. Montague : *J. Infect. Dis.*, **127**, 237, 1973
10) 所 光男, 後藤喜一, 山田不二造：日本細菌学雑誌, **32**, 393, 1977
11) 善養寺 浩：感染症学会雑誌, **46**, 113, 1972
12) 太田建爾, 工藤泰雄, 津野正朗, 大橋 誠, 善養寺浩：日本細菌学雑誌, **33**, 82, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 24—27, 1978

東京都において捕獲・抑留された野犬からのイヌブルセラ菌（*Brucella canis*）の分離・同定

金子誠二*, 梅木富士郎*, 村上　一*, 菊池俊六**
木村久一郎**, 村田光明**, 高島利幸**

Isolation and Identification of *Brucella canis* from Stray Dogs in Tokyo

SEIJI KANEKO*, FUJIO UMEKI*, HAJIME MURAKAMI*, SHUNROKU KIKUCHI**, KYUICHIRO KIMURA**, MITSUAKI MURATA** and TOSHIYUKI TAKASHIMA**

During the period from November 1976 through November 1977, a total of 462 stray dogs caught in Tokyo area was subjected for the isolation of *Brucella canis*. The specimens subjected for the isolation of the organisms were spleen, kidney, lymphnodes of hilus hepar, lymphnodes of pulmonis, mesenteric lymphnodes and blood. Consequently, it was found that 8 (1.7%) of 462 dogs had harbored the organisms in their organs without showing any clinical symptoms. The organ from which more frequent isolation of the organisms was made was spleen, followed by lymphnodes of hilus hepar. Among the 8 reservoir of the organisms, 6 were females and rest of the 2 were males. There was no correlation between the presence of circulating antibody in the blood and the presence of the organisms in their organs, since 3 of them had a serum titer of greater than 1 : 320 and the rest of the 5 less than 1 : 160.

緒　言

1966年，米国のCarmichael[1]は，ビーグル犬の繁殖コロニーで流行した死産・流産等を主徴とする疾病の起因菌として，グラム陰性の短桿菌である *Brucella canis* を発見報告した．その後，相次いで米国内の主としてビーグル犬繁殖コロニーで本菌が分離報告[2-4]された．

わが国においては，1973年，東ら[5]により静岡県のビーグル犬繁殖コロニーで，本菌に起因した流産・死産が報告されるにおよんで，国内においても注目を浴びるようになった．その後，一般の患畜からも本菌が分離[6,7]され，広範囲にわたって血清抗体価の調査が行なわれ，本菌による汚染がかなり広範囲に潜在的に分布しているのではないかと疑われるようになった．

われわれは，健康な在来犬の間にどの程度本菌が分布しているかを調査するため，1976年11月より1977年11月までの13カ月間に，都内で捕獲，抑留された野犬462頭の血液，肺門リンパ節，肝門リンパ節，腸間膜リンパ節，脾臓実質，および腎臓実質の合計6種類の検体について *B. canis* の分離を試みた．また，*B. canis* 保菌犬と抗体価との関係をみるために，抗-B. canis 抗体の出現率についても調査したので併せて報告する．

材料および方法

1. 血液および臓器　血液は，動物の安楽死処分に先だって，心臓採血により採取したものを用いた．イヌは処分後，直ちに歯牙による年齢鑑定を行なうと同時に，雄犬では精巣の腫大の有無を，雌犬では経産・未経産を記録し，剖検を行なった．菌分離に用いる前記各臓器は，滅菌器具を用いて，可能な限り無菌的に採取した．採取した臓器は，臓器間の交差汚染を避けるため，直ちにビニール小袋に収納した．

2. 被検血清　斜面に固めた血液より分離した血清は，30分間非働化したのち，検査を実施するまで−20°で凍結保存した．

3. 分離培地　血液または臓器から，直接菌を分離する際に用いるもので，Difco 社製の次の組成の粉末 Tryptose 寒天平板培地である．すなわち，培地1,000m*l*

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都衛生局環境衛生部犬管理事務所

当り，Bacto-tryptose 20g, Bacto-dextrose 1g, 食塩5g, Bacto-agar 15gからなるもので，溶解後pHが7.2になるように調製されたものである．培地は加温溶解後，121°で15分間高圧滅菌し，内径8.5cmのプラスチック平板に 15m*l* ずつ分注し放冷凝固させた．

4. **ゲル内沈降反応用抗原** Tryptose寒天平板に *B. canis* RM-6/66, QE-13並びに分離菌株を濃厚に塗沫し，37°, 48時間好気的に培養する．平板1枚につき1m*l* の0.125 MPBS, pH 7.0を準備し，平板から掻き取った菌を濃厚に浮遊させた．この濃厚浮遊菌液は，80°で2時間加熱後，11,000 r.p.m. 15分間遠心し，可溶性抗原の抽出を行なった．抗原はこのままゲル内沈降反応[8,9]に用いた．

5. **沈降反応用ゲル** 分離菌株を免疫血清学的に同定する際用いるもので，その組成は，Bacto-agar (Difco) 15g, 食塩50gを蒸留水 1,000m*l* に溶解したもので，pH 7.4に調製した．

6. **家兎免疫血清** 免疫用抗原は，Tryptose 寒天平板に *B. canis* QE-13並びにRM-6/66を濃厚に塗沫し，37°, 48時間好気的に培養した後，平板1枚につき1m*l* の生理食塩水中に濃厚に浮遊させ，80° で2時間加熱後，11,000 r.p.m. 15分間遠心した上清を用いた．抗原は4日置きに家兎耳静脈内に注射し，抗-B. cains特異抗体が1：1280以上を示した時に心臓から全採血を行なった．血液は凝固した後，血清を分離し，56° 30分間非働化し，−20°で保存した．

7. **菌分離** 血液は，採取後直ちに0.1m*l* を Tryptose寒天平板上に滴下し，滅菌コンラージ棒で寒天平板上に塗沫した．他の5種類の臓器は，沸とう水中に約5秒浸したのち，新鮮割面を作り Tryptose 寒天平板上に押捺した．検体を接種した平板は37° で1週間培養し，培養後48時間以後に出現した疑わしい集落を釣菌した．これらの株についてグラム鑑別（劉氏グラム変法），カタラーゼテストおよびオキシダーゼテストを実施し，グラム陰性でカタラーゼおよびオキシダーゼ反応陽性の株を推定 *B. canis* とした．これらの分離株についてさらに，4単位の抗-B. canis 特異家兎血清を用いたゲル内沈降反応を実施した (Fig. 1).

8. **試験管内凝集反応** *B. canis* の菌凝集抗原は北里研究所合田朗博士より分与されたQE-13抗原を用いた．抗体調査に用いた術式は山内ら[10]により報告されたCarmichael の変法である．被検血清を1：20倍から0.15MPBS で倍数希釈し，等量の抗原を加えた後，52°で48時間反応させ，50%以上の凝集を示した最高希釈倍数の逆数をその血清の抗体価とした．

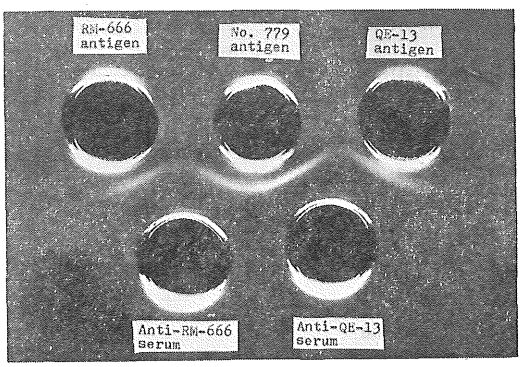


Fig. 1. Antigenic Identity of the Isolates with Pilot Strains of *B. canis* proved by the Micro-ouchterlony Slide Test

成　績

1. **分離株の生化学的性状および血清学的性状** 推定 *B. canis* とした分離株のうち10株について，その生化学的性状および血清学的性状を *B. canis* QE-13 並びに *B. canis* RM-6/66 を対象として以下の項目について検査した．すなわち，L-アラニン，L-アスパラギン，L-グルタミン酸，L-アルギニン，L-リジンおよびDL-オルニチンの酸化，L-アラビノース，D-キシロース，D-ガラクトース，D-リボースおよびD-グルコースの利用の有無，尿素の分解能，硫化水素の産生の有無，それに25,000倍のチオニンに対する耐性の有無について検討した．一方，特異的可溶性抗原産生の検討のためにゲル内沈降反応を実施した．その結果，Table 1に示したように，*B. canis* と生化学的並びに血清学的に同定した分離株はすべて *B. canis* QE-13 およびRM-6/66と同様の性状を示した．血清学的同定法と生化学的同定法が完全に一致したので，その他の推定 *B. canis* とした分離株については生化学的性状検査は行なわず，血清学的性状検査についてのみ実施した．

2. ***B. canis* 分離状況** 推定 *B. canis* とした37株のうち8頭 (1.7%) より分離した16株が血清学的性状により *B. canis* と同定された．脾臓から分離した例が最も多く，6例あった．肝門リンパ節からは4例，肺門リンパ節からは3例，腸間膜リンパ節からは2例，腎臓からは1例それぞれ分離したが，血液からは1例も分離できなかった(Table 2).

3. ***B. canis* 分離陽性犬の剖検所見** *B. canis* に感染したイヌの臨床症状は，雌では妊娠後期の流産，死産，雄では精巣の腫大あるいは萎縮等の他に，全身のリンパ節の腫大が認められる程度である．今回，*B. canis*

Table 1. Comparison of Biochemical and Serological Characteristics of the Isolates

Characteristics	Pilot Strains		*B. canis* Isolates					Other than *B. canis*				
	RM-6/66	QE-13	634	744	766	779-1	779-2	702	755	759	764	777
Oxydation of:												
L-Alanine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
L-Asparagine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
L-Glutamic acid	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
L-Arginine	+	+	+	+	+	+	+	−	−	±	±	±
L-Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Ornithine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of:												
L-Arabinose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-Xylose	±	±	±	±	±	±	±	−	−	−	−	−
D-Galactose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-Ribose	+	+	+	+	±	±	±	−	−	−	−	−
D-Glucose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Decomposition of:												
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S Production	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Thionin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of Specific Soluble Antigen	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−

Table 2. Summarized Results of *B. canis* Isolation

Organ	Dog Numbers from which Isolation is made							
	634	744	766	779	877	878	883	999
Spleen	+	+	−	+	+	−	+	+
Kidney	−	−	−	−	+	−	−	−
Lymphnodes of hilus hepar	−	−	−	+	+	+	+	−
Lymphnodes of hilus pulmonis	−	−	+	−	+	−	+	−
Mesenteric lymphnodes	−	−	−	−	+	−	+	−
Blood	−	−	−	−	−	−	−	−

Table 3. Background of the Dogs from which *B. canis* was isolated

Dog No.	Species	Sex	Age	Antibody Titer
634	Pointer Mongrel	Female	5	1 : 80
744	Mongrel	Female	6	1 : 40
766	Mongrel	Female	1	1 : 40
779	Mongrel	Female	3	1 : 320
877	Mongrel	Male	1	1 : 640
878	Maltease	Female	2	1 : 80
883	Mongrel	Female	3	1 : 1280
999	Mongrel	Male	3	1 : 160

を分離した8頭で剖検に際し異状を認めたものは，No. 799の肝門リンパ節の若干の腫大，No. 877の肺門リンパ節，肝門リンパ節並びに脾臓の腫大であった．一方，臓器塗沫平板については，No. 877およびNo. 833の *B. canis* を分離した各平板には培養48時間を経過した頃より，多数の矮小な白濁した集落が出現し，一見して *B. canis* と思われる集落であった．

B. canis を分離したイヌは，ポインター雑とマルチーズの2頭を除き雑種であり，2頭が雄で6頭が雌であった．また，イヌの推定年齢に関係なく分離され，1：320以上の血清抗体価を示すイヌが3頭であった(Table 3)．

考察および結論

イヌからヒトへの *B. canis* 感染例が，1969年に米国で報告されて以来，*B. canis* 感染症が公衆衛生上重要な問題としてクローズアップされるに至った．

わが国における *B. canis* 感染症の調査研究は，ほとんどが血清抗体価に関するもので，菌分離などに関するものが少ない．これら散見される菌分離報告例は，ほとんどがイヌ繁殖コロニー内のイヌから分離されたものである．このように閉鎖的環境で飼育されたイヌを対象とするのみならず，広く野犬や飼いイヌについて *B. canis* 感染の実態調査を行なうことは，公衆衛生上是非とも必要である．そこで今回，われわれは，都内全域から捕獲した野犬を対象に調査したところ，462頭中8頭(1.7%)から，*B. canis* を分離した．このことから，都内の野犬および飼いイヌがかなり広範囲に *B. canis* に感染しているものと推測される．

本来，イヌのブルセラ症は，血清学的並びに細菌学的検査を併用して診断されるべきと考えられるが，フィールドでは一般に血清学的検査成績だけから診断されている．しかし，今回の調査で *B. canis* 分離犬8頭のうち，5頭が血清抗体価陰性であったことは，*B. canis* 感染症の診断に血清学的並びに細菌学的検査を併用しなければならないことを示唆するものである．

家畜は，血清学的にブルセラ症と診断されると直ちにと殺処分されるが，飼いイヌは，その使用目的からこのような test and slaughter 方式が適用できず，そのためにイヌ相互またはイヌからヒトへの *B. canis* 伝播が危惧されている．しかも，*B. canis* 感染症の治療法が確立されていない現在，被感染犬の早期発見および隔離に努めて本感染症の蔓延を防止しなければならない．それには，野犬および放浪犬を一掃するかたわら，飼いイヌの定期検診を実施し，同時に予防法並びに治療法を開発する必要があろう．要は，飼いイヌの適正飼育と健康管理こそが *B. canis* 感染症予防法の最良策であると考える．

謝辞 *B. canis* QE-13およびRM-6/66を分与された北里研究所合田朗博士に深謝致します．

文　献

1) Carmichael, L. E. : *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **149**, 1126, 1966
2) Hill, W. A., G. L. Jr. Van Hoosier, and N. McCormic : *Lab. Anim. Care*, **20**, 205, 1970
3) Moore, J. A., B. N. Gupta, and G. H. Conner: *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **153**, 523, 1970
4) Morisset, R. and W. W. Spink : *The Lancet*, **2**, 1000, 1969
5) 東　量三，伊佐山康郎：日獣会誌，**26**，111，1973
6) 上田雄幹，曲渕輝夫，三枝順三，浦野　徹，伊藤喜久治，木内吉寛，藤原公策：日獣誌，**36**，539，1974
7) 上田雄幹，三枝順三，藤原公策：日獣誌，**36**，381，1974
8) Diaz, R., L. M. Jones, and J. B. Wilson : *J. Bact.*, **95**, 618, 1968
9) Myer, M. D., V. M. Varela-Diaz, and E. A. Colforti : *Appl. Microbiol.*, **28**-1, 1, 1974
10) 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：日獣会誌，**36**，175，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 28—30, 1978

過去4年間に東京都で捕獲・抑留されたイヌの抗-Brucella canis 抗体保有状況

金子誠二*, 梅木富士郎*, 村上一*, 菊池俊六**
木村久一郎**, 村田光明**, 高島利幸**

Incidence of Anti-Brucella canis Antibody on Stray Dogs in Tokyo in the Last Four Years

SEIJI KANEKO*, FUJIO UMEKI*, HAJIME MURAKAMI*, SHUNROKU KIKUCHI**, KYUICHIRO KIMURA**, MITSUAKI MURATA** and TOSHIYUKI TAKASHIMA**

During the period from May 1974 through November 1977, a total of 1,530 stray dogs caught in both urban and rural area of Tokyo was studied for the incidence of anti-Brucella canis circulating antibody. Consequently, 42 (2.8%) out of 1,530 stray dogs showed positive results, having their agglutination titers of greater than 1 : 320 against *B. canis* QE-13 antigen or 1 : 400 against *B. canis* RM-6/66 antigen. In regard to the period from May 1974 to March 1975, 2 (1.3%) of 157; from April 1975 to March 1976, 14 (2.6%) of 541; from April 1976 to March 1977, 18 (3.1%) of 585; and from April 1977 to November 1977, 8 (3.2%) of 247 stray dogs showed positive results, respectively. However, no significant difference was observed on the incidence of anti-B. canis antibody by the age and sex groups of the dogs.

The increasing positive incidence of anti-B. canis antibody was observed year after year. It is likely that *B. canis* infection is spreading gradually among the native domestic dogs.

緒　言

1962年に米国中西部および南部のビーグル犬繁殖コロニーで，妊娠後期の流産・死産等を主徴とするイヌの感染症が多発し，畜犬業者に多大な経済的損失をもたらした．1966年に至り Carmichael ら[1]は，これらの症状を示すイヌより，その起因菌としてグラム陰性の短桿菌である *Brucella canis* を発見報告した．その後相次いで主としてビーグル犬繁殖コロニーで本症の疑いのあるものが発生し，本菌の分離が報告[2-5]された．わが国においても1973年に東ら[6]が本菌に起因したビーグル犬繁殖コロニーでの流行が静岡県で発生したことを報告した．これを契機に他の地区で飼育されているイヌの間にも本菌による汚染が疑われるようになり，抗体価の調査や，患畜からの菌分離が報告[7]されるようになった．

一方，本菌によると思われるヒトの感染例が米国において報告[8]されるに至り，イヌブルセラ症は公衆衛生上の問題として注目されるようになった．

われわれは東京都で飼育されているイヌの間における *B. canis* の汚染状況を調査するため都内23区，26市，5町，1村の地域で1974年5月より1977年11月までの4年間に東京都犬管理事務所（以下犬管と略記）で捕獲・抑留したイヌ1,530頭の血清について，抗-B. canis 抗体の出現率調査を行なったので報告する．

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合田朗博士より分与された RM-6/66および QE-13抗原を用いた．両抗原は使用に際し Colman 比色計を用いて波長420nmで，RM-6/66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 MPBS, pH 7.2 で希釈調製した．

2. **被検血清** 調査の対象としたイヌ血清は，犬管に4日間抑留されたイヌの心臓から無菌的に採血し，血液凝固後すみやかに血清分離を行ない，非働化した後，−20°に凍結保存した．なお，対象とした1,530頭のイヌについては，歯牙による年齢の推定，経産・未経産，精巣の腫大・萎縮の有無等について同時に調査を実施した．

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都衛生局環境衛生部犬管理事務所

3. 試験管内凝集反応 今回抗体調査に用いた方法は，山内ら[9]により報告された Carmichael の変法である．1974年5月より1975年3月までは *B. canis* RM-6/66抗原を用い，1975年4月より1977年11月までは *B. canis* QE-13抗原を用いた．RM-6/66抗原を用いた場合は被検血清の1：25から，QE-13抗原の場合は1：20からそれぞれ0.15MPBS で2倍段階希釈し，等量の抗原を加えた後，52°で48時間反応させ50%以上の凝集を示した最高血清希釈倍数の逆数をその血清の抗体価とした．抗-B. canis 抗体の陽性限界は，RM-6/66では1：400以上，QE-13では1：320以上とした．

検査成績

1. 抗-B. canis 抗体保有状況 イヌ血清1,530例中の抗-B. canis 抗体の陽性例は42例であり，陽性率は2.8%であった．これら陽性例を性別になながめると，1：320および1：400のもの雄13例（1.6%），雌12例（1.7%），1：640および1：800のもの雄6例（0.8%），雌5例（0.7%），1：1280以上および1：1600以上のもの雄2例（0.3%），雌4例（0.6%）であった（Table 1）．

一方，陽性例を年齢別になながめると，9歳齢を除くすべての年齢にわたって陽性例がみられた．1歳齢では282例中9例（3.2%），2歳齢では329例中7例，3歳齢では308例中8例（3.3%），4歳齢では202例中5例（2.5%），5歳齢では147例中4例（2.7%），6歳齢では86例中4例（4.8%），7歳齢では57例中3例（5.3%），8歳齢では58例中1例（1.7%），10歳齢以上では50例中1例（2.0%）がそれぞれ陽性であった（Table. 2）．

2. 各年度別にみた抗-B. canis 抗体保有状況 抗-B. canis 抗体陽性例を各年度別にみると，1974年5月より1975年3月までは157例中2例（1.3%），1975年4月より1976年3月までは541例中14例（2.6%），1976年4月より1977年3月までは585例中18例（3.1%），1977年4月より1977年11月までは247例中8例（3.2%）がそれぞれ陽性を示し，年々漸増の傾向を示すことがうかがわれた（Table 3）．

考察

東京都で捕獲抑留されたイヌの抗-B. canis 抗体の出現状況を4年間にわたって調査したところ，1,530頭のうち42頭（2.7%）が抗体価陽性を示し，*B. canis* 感染既応歴が疑われた．また，抗体調査と同時に行なった菌

Table 1. Incidence of Anti-B. canis Antibody in Sera of Stray Dogs Classified by Their Sex

Sex	No. of Tested	Anti-*B. canis* Antibody Detected					
		RM-6/66	≦1：50	1：100	1：200	1：400	1：800	1：1600
		QE-13	≦1：40	1：80	1：160	1：320	1：640	1：1280
Male	805		623	113	48	13	6	2
Female	725		597	77	30	12	5	4
Total	1,530		1,220	190	78	25	11	6

Table 2. Incidence of Anti-B. canis Antibody in Sera of Stray Dogs Classified by Their Age

Age	No. of Tested	Anti-B. canis Antibody Detected						
		RM-6/66	≦1：50	1：100	1：200	1：400	1：800	1：1600
		QE-13	≦1：40	1：80	1：160	1：320	1：640	1：1280
1 year old	282		247	19	7	5	3	1
2 years old	329		264	42	16	3	3	1
3 years old	308		223	54	23	6	1	1
4 years old	202		168	24	5	5		
5 years old	147		110	22	11	2	1	1
6 years old	86		67	11	4	1	2	1
7 years old	57		39	10	5	2		1
8 years old	58		49	3	5		1	
9 years old	11		11					
10 years old	50		42	5	2	1		
Total	1,530		1,220	190	78	25	11	6

Table 3. Yearly Incidence of Anti-B. canis Antibody in Sera of Stray Dogs

Period	No. of Tested	Anti-B. canis Antibody Detected					
		RM-6/66	≦1：50	1：100	1：200	1：400	1：800	1：1600
		QE-13	≦1：40	1：80	1：160	1：320	1：640	1：1280
May '74-March '75	157		142	11	2		2	
April '75-March '76	541		452	56	19	8	4	2
April '76-March '77	585		479	56	32	15	2	1
April '77-Nov. '77	247		147	67	25	2	3	3
Total	1,530		1,220	190	78	25	11	6

分離成績[10]（1976年11月より1977年11月まで実施し，菌保有率は1.7％）であったとを考えあわすと，すでに都内で飼育されているイヌの間に *B. canis* 感染が成立しているものと思われる．一方，1974年5月からの抗-B. canis 抗体出現率の年度別推移を追ってみると，この4年間に徐々にではあるが *B. canis* 感染が進行していると思われる．

過去犬管において一疾病が抑留期間中に集団発生した事例は一件も認められなかったが，抑留犬からの *B. canis* 分離，並びに特異抗体を保有しているイヌが認められたことから，4日間の抑留期間とはいえ，イヌ同士の接触感染を最小限に留めることが急務の課題であろう．しかしながら *B. canis* に感染したイヌの臨床症状は体表リンパ節の軽度の腫脹の他に，雌では妊娠後期の流産・死産，雄では精巣の腫大・萎縮を示す程度であり，犬管で捕獲・抑留されたイヌからブルセラ感染犬を臨床的に発見隔離するのは極めて困難な作業といえよう．

わが国で過去問題となったブルセラ症，特に牛のブルセラ症は，罹患牛に直接接する獣医師や畜産農家の人々に感染をおよぼす特殊な職業病的性質が強く，一般の人々が感染するのは，殺菌不足の牛乳を飲用に供することにより生じた．ところが，イヌブルセラ症は保菌動物が愛玩用のイヌであり，ヒトに感染しても軽い症状しか示さないという点が他のブルセラ症とは異なるところである．家庭愛玩犬から飼い主に感染し，ヒトおよびイヌの血液から *B. canis* が分離されたという米国での報告例[8,11]は，ヒトに対して，発熱，悪感，体重の若干の減少をもたらすのであるが，テトラサイクリンやアンピシリン等の投与により間もなく快方に向かったと報告されている．しかしながらイヌブルセラ症がイヌからヒトへ感染することが証明されている現在，ヒトに対して軽度の症状しか示さないからという理由で軽視することはできない．

近年，住宅環境の悪化に伴ない，室内で飼育できる小型愛玩犬が多く飼われるようになり，ヒトとイヌの生活の境界が曖昧になりつつある．このような今日的状況を考え合わすと，イヌからヒトへの *B. canis* 感染は今後も充分考えられることである．ヒトとイヌとの交流の過誤よりヒトの *B. canis* 感染を防止するため，イヌブルセラ症の診断法を確立すると共に，飼い主に対して注意を促すべきであろう．

謝辞　本調査の菌凝集抗原を提供してくれた北里研究所合田朗博士に深謝致します．

文　献

1) Carmichael, L. E. : *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 149, 1126, 1966
2) Moore, J. A., B. N. Gupta, and G. H. Conner: *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 153, 523, 1970
3) Taul, L. K., H. S. Powell, and O. E. Baker : *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 73, 543, 1967
4) Hill, W. A., G. L. Jr. Van Hoosier, and N. McCormic : *Lab. Anim. Care*, 20, 205, 1970
5) Carmichael, L. E. : *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 152, 605, 1968
6) 東　量三，伊佐山康郎：日獣会誌，26，111，1973
7) 上田雄幹，曲渕輝夫，三枝順三，浦野　徹，伊藤喜久治，木内吉寛，藤原公策：日獣誌，36，539，1974
8) Munford, R. S., R. E. Weaver, C. Patton, J. C. Feeley, and R. A. Feldman : *J. A. M. A.*, 231-12, 1267, 1975
9) 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：日獣会誌，36，175，1974
10) 金子誠二，梅木富士郎，村上　一，菊池俊六，木村久一郎，村田光明，高島利幸：東京衛研年報，29-1，24，1978
11) Morisset, R. and W. W. Spink : *The Lancet*, 2, 1000, 1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 31—38, 1978

しょう紅熱患者の Immune Response（特にレンサ球菌菌体抗原を中心にして）

加納堯子*, 飯村　達**

Immune Response of Scarlet Fever Patients (Study of Anti-Streptococcal Antibody)

TAKAKO KANOH* and TATSU IIMURA**

A群レンサ球菌の上気道感染を基盤として発症するしょう紅熱は，これが産生する外毒素により惹起されるものと考えられているが，本症が主に小児に多発するところから，この病像の進展，続発症の出現には免疫系の分化発達の未熟性が考慮されている．

われわれは，先にしょう紅熱患者40例の病週を追って経時的に採取した121例の血清中の IgA, IgM, IgG, IgE 値および ASO 価を測定し，本症患者の免疫応答性に関して検討した所，同年齢群の正常値より著明に高い IgE 値を示す6名（15%）の患者を見出し，この IgE 値は，病状の進展，寛解に従ってその値を変動して行くことを報告した[1]．

レンサ球菌菌体成分に対する IgE 抗体の産生に関しては，大国らがマウス，ラットを用いて証明し，さらにレンサ球菌細胞壁 peptidoglycan (PG) が IgM, IgG クラスの抗体産生にアジュバント活性を示すばかりでなく，IgE 抗体産生に対しても同様の活性を有することを明らかにした[2,3]．

われわれは，しょう紅熱患者におけるレンサ球菌感染と IgE との関連を明らかにする目的で，高 IgE 値を示した6名の血清を用い，レンサ球菌細胞壁由来のたん白抗原を使用し radioallergosorbent (RAST) 法にて本抗原に対し特異的抗体が存在するか否かを検討し，併せて，菌体外代謝産物の1つである nicotinamide adenine dinucleosidase (NADase) 抗体，PGに対する抗体，ならびにダニ，ハウスダスト抗原に対する IgE 抗体の測定を Family study をも含めて検討し，興味ある成績を得たので報告する．

材料と方法

1. 被検血清　主に高 IgE 値を示した6名のしょう紅熱患者血清で，その内訳は，A；6歳男子（1975年12月入院），B；6歳男子（1975年11月入院），C；6歳女子（1976年2月入院），D；6歳女子（1975年11月入院），E；11歳男子（1975年10月入院），F；11歳女子（1975年11月入院）で，各々血清は入院時，退院時（発症後3週間），発症1カ月後，3カ月後の4回に亘り採取し，これら血清は本研究所血清収集保存管理室に使用直前まで凍結保存（−70C）された．その他 1975〜1976 年の間に都立豊島病院に入院した40名のしょう紅熱患者血清と，日本医大病院より分与された急性糸球体腎炎，気管支喘息患者ならびに新生児血清も用いた．

2. レンサ球菌PG分画　日本医科大学，大国博士より恵与されたものである．本分画はA群レンサ球菌（12型）を型の如く培養後，brown cell homogenizer にて菌体を破壊後，細胞壁分画を得，これを DNAase, RNAase ならびに pronase で処理後，Fuller の hot formamid 法にて3回抽出をくり返し，得られた不溶性残渣を PG 分画としたもので，使用にあたり20KC, 20分間の超音波処理を行ない可溶化した．

3. レンサ球菌細胞壁由来たん白抗原　A群レンサ球菌（12型O170株）細胞壁より抽出した抗原物質は，PG分画と同様に大国博士より恵与されたものである．本抗原は細胞壁分画をDNAase, RNAase で処理後，Lancefield の方法に従い加熱塩酸抽出を行ない，さらに，飽和硫安33—60%で得られた沈澱物を精製水で溶解後，透析し，凍結乾燥して作成されたものである．

4. Radioallergosorbent test　測定は Johansson ら[4] の方法に準拠して行なった．すなわち，Br-CN で活性化された Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals 製) にレンサ球菌菌体成分を coupling させて不溶化し，これと患者血清を反応させ，さらに ^{125}I 標識 IgE 抗血清（塩野義製薬製）と反応させて特異的 IgE

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都立豊島病院

抗体量を測定する．

すなわち，活性化 Sepharose 4B 5g を 50 ml の10^{-3} M HCl で膨潤沪過し，ついで洗浄後，これに抗原 25 mg を0.1 M $NaHCO_3$, 0.5 M NaCl の 100 ml に溶解したものを加え，室温で24時間，垂直回転装置を使用して反応させ，続いて抗原結合 Sepharose 4B を遠心し，0.15M炭酸緩衝液（pH 8.4）を用いて3回洗浄をくり返した．結合物はさらに，0.05 M β-ethanolamin, 0.1 M $NaHCO_3$ 50ml に懸濁，室温で振とうしつつ 24 時間反応させた後，0.1 M 酢酸緩衝液（pH 4.0）と 0.5 M 炭酸緩衝液（pH 8.4）を用いて交互に3回ずつ洗浄し，沈渣は，0.1 M 燐酸緩衝液（pH 7.4）150ml に Tween 20を0.1%，ヒト血清（HSA）を0.3%になるように加えた液100ml に浮遊させた．最終的にこの浮遊液の抗原濃度は 50mg/ml である．

測定方法は，抗原結合 Sepharose 4B 液 0.5ml をプラスチックチューブにとり，血清 50μl を混合，垂直振とう回転装置を用い 24 時間，室温で反応させ，1% Tween 20加 0.15 M 食塩水で 3000rpm 6分間，4回洗浄した．沈澱物に^{125}I-抗 IgE 抗血清 50μl（約46000 cpm）を加え，同じく室温で24時間，垂直回転をした．反応後，同一緩衝液，同一回転数で4回遠心洗浄し，沈澱物より上 3mm まで洗浄液を吸引除去，沈澱物の放射能を auto-r-counter で5分間計測した．なお，同一血清を2検体として測定し，測定値はその平均値を使用，^{125}I 標識 IgE 抗血清 50μl の総 count 数に対する検体の count 数の100分率をもって特異的 IgE 抗体価とした．

本方法の基礎的検討としては i) Sepharose 4B と抗原の coupling 時間について検討した．coupling 時間は，coupling した抗原のたん白濃度を，上清中に未結合で残存する抗原たん白の吸光度測定から推定して上清たん白濃度の平衡到達時間を採用した．ii) ^{125}I-Ig E抗血清の作用時間については，経時的に結合生成物の count を測定して定め，iii) 未反応 ^{125}I-IgE 抗血清の除去は，洗浄上清の count 数から洗浄回転数，回数を検討して洗浄効果を判定した．対照には，新生児血清，糸球体腎炎患者血清，喘息患者血清を用い被検血清と同時測定を実施した．

ダニ（*Dermatophagoides farinae*），ハウスダスト（*Greer Labs*）に対する特異的 IgE 抗体の測定は，キット（RAST シオノギ®）添付の使用書に準じて行なった．すなわち，Solid phase は，抗原を coupling した paper disc を用い，この paper disc に被検血清 50μl を加えて振とうしつつ，室温で24時間反応させた．反応後，血清を吸引して除き，0.1% Tween 20 を含んだ緩衝液により disc 洗浄を3回くり返し，^{125}I 標識 IgE 抗血清 50μl を加えて，同じく振とうしつつ24時間反応させた．未反応の ^{125}I-IgE 抗血清は上記の Tween 20で3回洗浄して除去し，paper disc に結合した ^{125}I の放射能を γ-counter で測定した．結果の判定は，各々，duplicate で行なった平均 count 数を対照血清の count 数に比較し，添付の判定表に基づいて検体の IgE 抗体量を0—4の score に分類を行なった．

5. **Streptococcal NADase** Hoechst 社製の ANADase 測定用キット® を使用した．当キットは，わが国において市販されていないが，当キットの測定法検討のため入手したものである．

6. **抗 PG 抗体の測定** ホルマリン固定タンニン酸処理感作赤血球凝集反応を以って行なった．すなわち，1.5%ホルマリン固定ヒツジ赤血球（富士臓器製薬株式会社製）に1：4000濃度のタンニン酸液（1/15M燐酸緩衝液 pH 6.4）を加え，37Cで20分間反応させてこれに可溶化した．PG分画 100μg/ml（1/15M燐酸緩衝液 pH 6.4）の濃度のものを混和し，37Cで40分間反応させ，遠心後，200倍希釈の正常ウサギ血清（NRS）で洗浄し，最終的に1.5%血球浮遊液になるように200倍希釈の NRS で調整した．被検血清は，0.15M食塩水を用いて4倍に希釈し，56Cで30分間非働化した後，37Cで2時間，ホルマリン処理血球で吸収操作を行なって遠心し，その上清を被検血清として供試した．**PG 分画抗体価の測定方法は**，U型 microtiter 用 tray の全穴に NRS の希釈液 25μl を滴下し，これに被検血清 25μl を使用して所定の如く連続2倍血清希釈を行なう．血清希釈後，25μlのホルマリン固定タンニン酸処理PG感作ヒツジ赤血球を滴下して良く振とうし，室温で一夜放置，凝集像から抗体価を測定した．抗体価は，凝集で判定した血清希釈の最高濃度の逆数をもって表示し，対照には未感作ホルマリン固定タンニン酸処理ヒツジ赤血球液を用いた．

7. **Streptococcal NADase 抗体価測定** 基本的には kit に添付されている測定方法に準じたが，被検血清の微量化を計って，以下のように行なった．

被検血清 50μl に 200 μl の 0.15M 食塩水を加えた5倍希釈血清と被検血清 10μl に 290μl の 0.15 M 食塩水を加えた30倍希釈血清を作成し，各々，その 100μl を使用して，連続2倍希釈し，240倍までの希釈血清を調製した．次に，5倍希釈液と30倍希釈液から各々 50μl, 100μl を除き，以後の操作を，各希釈液について，表1に従って実施した．対照には，NADase および血清の代りにキット中の buffer-I 液を用い，被検血清と同時測定を

Table 1. Procedure for Anti-NADase Estimation

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8	
Dilution	1 : 20	1 : 30	1 : 40	1 : 60	1 : 80	1 : 120	1 : 160	1 : 240	
Serum	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	m*l*
Dilution buffer solution-1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	m*l*
NADase	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	m*l*
3.0 min. in a water bath at 37C									
NAD^+	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	m*l*
at 30 sec. intervals.									
7.5 min. in a water bath at 37C (each tube must be incubated for exactly 7.5 minutes. Stopwatch !)									
Appr. 3 min. in a water bath at 60-70C (to halt reaction)									
ADH	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	m*l*
Buffer solution-2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	m*l*
after 10 min. at room temperature measure extinction in the photometer at 366nm using 1 cm glass cuvettes									
Anti-NADase units per m*l* at an extinction of 0.25	50	75	100	150	200	300	400	600	

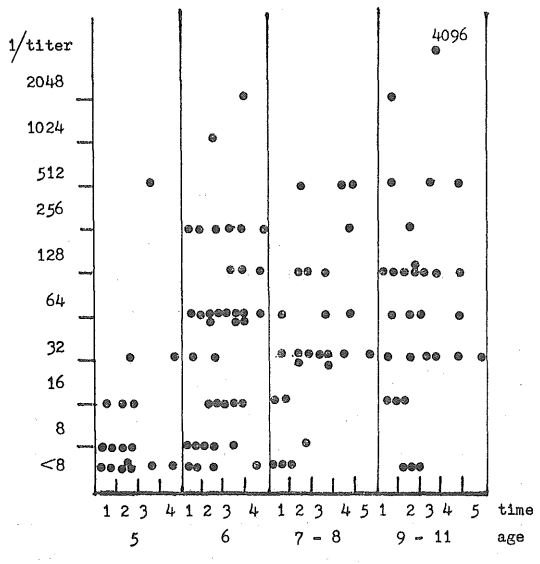


Fig. 1. Time Course of Anti-peptidoglycan Fraction Antibody in 40 Scarlet Fever Cases

行なってそれぞれの366nmにおけるODが≧0.5, ≦0.1であることを確認した.

8. **Family study** 昨年度に調査報告した40人のしょう紅熱患者, およびその家族を対象にして, アレルギーに関する設問を中心としたハガキによるアンケート調査を実施した. その内容は, i) 入院前に扁桃腺炎で発熱したことがありますか. ii) かぜをひき易いですか. iii) 予防注射によって発熱や発疹の経験がありますか. iv) 牛乳, 魚, その他の食物によって発熱, 発疹, 下痢を経験したことがありますか. (原因食は何ですか.) v) 薬を飲んで発疹の経験はありますか. vi) 退院後, 病気に罹りましたか. vii) 薬を塗ったり, はったりすると, かぶれ易いですか. viii) 皮膚病になり易いですか. の各項目で患者および家族の回答を求めた. さらに入院時の問診表より既往歴および治療期間中の臨床検査成績を調査し, IgE との関連性を検討した.

成　　績

1. **PG 抗体価** 6名の被検血清を含む計40名のしょう紅熱患者血清中のPG抗体価の成績を図1に示した. しょう紅熱患者のPG抗体価は＜1：8より1：4096までの広い分布を示したが, これを発症時に見ると1：32以下が全体の80%, この内70%は1：8—1：16以下で1：64以上は, 1：64が3名, 128, 512, 2048が1名ずつであった. この結果から, 発症時のPG抗体価は概して1：32以下で占められるものと思われた. (同年齢群健康人平均抗体価 32.5 (15名))

Table 2. Results of the Tests on High IgE Cases

case	age	time	IgA	IgM	IgG	IgE	ASO	Anti-PG*	Anti-NADase	Anti-IgE		RAST-I**	RAST-II***
			mg/dl			U/ml	Todd units	1/titer	U/ml	cpm	%	cpm	cpm
		1	192	196	1300	1300	<12	—	<50	600	1.4	14000	6500
A	6	2	206	223	1069	940	<12	64	<50	600	1.4	14000	4200
		3	182	165	1270	430	<12	128	<50	600	1.4	9500	4900
		4	180	221	1270	40	<12	64	<50	—		5300	2500
		1	94	158	840	470	12	256	<50	700	1.5	400	400
B	6	2	146	213	1080	430	625	256	<50	600	1.4	—	—
		3	138	342	1200	400	625	256	<50	900	1.9	—	—
		4	146	233	1150	290	833	256	<50	800	1.8	—	—
		1	200	392	2230	800	<12	8	<50	800	1.8	600	500
C	6	2	228	486	2177	620	<12	64	<50	700	1.5	—	—
		3	164	370	1780	500	<12	64	<50	700	1.5	—	—
		1	116	180	990	800	250	256	<50	800	1.8	17000	6300
D	6	2	116	202	1050	960	625	1024	<50	600	1.4	15000	4400
		3	94	177	1050	630	333	2048	<50	600	1.4	15000	3900
		1	165	102	1450	740	333	128	<50	700	1.5	1100	540
E	9	2	232	87	1750	500	833	64	<50	600	1.4	600	—
		3	195	87	1730	350	833	128	<50	600	1.4	500	—
		4	178	125	1430	390	833	64	<50	600	1.4	700	—
		1	158	122	1060	400	333	1128	<50	700	1.5	600	500
F	11	2	204	130	1350	70	333	8	<50	600	1.4	300	—
		3	184	141	1060	270	625	128	<50	600	1.4	—	—
		4	108	140	1230	230	625	128	<50	700	1.5	—	—

* Anti-peptidoglycan fraction antibody ** Dermatophagoides antigen *** Greer labs antigen

退院時のPG抗体価は，1：32以下が全体の70%，1：64以上は，64が3名，128以上が5名であって抗体価の分布において上昇傾向が見られた．

発症後1カ月のPG抗体価は，1：32以下が全体の42%，1：64以上は58%と両抗体価の分布率が逆転して，明確なPG抗体価の上昇傾向が認められた．

6名のPG抗体価は表2から明らかなように測定期間中1：32以下はわずか2血清のみで1：64以上は実に91%，さらに128以上では62%がこの値に相当し，この結果から6名には，PG抗体産生の増強していることが示唆された．

PG抗体価の持続性は，40名および6名のしょう紅熱患者の測定値が測定期間中，明確な抗体価減少傾向を示さないので，少なくとも発症後，3—4カ月は持続性を保持するものと思われた．

2. レンサ球菌細胞壁由来たん白抗原の特異的IgE抗体価 表3に6名の患者と新生児，喘息患者，糸球体腎炎患者および多項目測定用ヒトRIA標準血清NMS-1 (nuclear medical systems, Inc. U.S.A.) のレンサ球菌細胞壁由来たん白抗原に対する特異的IgE抗体価の実測値，ならびに，添加した ^{125}I 標識 IgE 抗血清の総 count 数に対する結合 count 数の百分率を示した．

作成した抗原 Sepharose 4B 結合物と ^{125}I-IgE 抗血清のみの平均 count 数は800cpm，取り込んだ ^{125}I-IgE 血清の百分率は1.6%で，対照に使用した新生児および NMS-1 の上記各値は，同一測定値で400cpm，0.9%が計測された．6名の各測定期間の測定値は，多くが600 cpm 1.4%，最高値でも900cpm 1.9%で測定期間中，測定値に変動も認められなかった．これに対して喘息患者の2名は，各々 1300cpm，2.8%，1100cpm，2.3%，糸球体腎炎患者 2000cpm，4.4%が計測され，6名のしょう紅熱患者の約2—3倍の高値を示した．なお，抗原濃

Table 3. Specific IgE Antibody Levels of Streptococcal M-Protein Fraction

case		time	Anti-IgE (cpm)	%
Scarlet fever	A	1	600	1.4
		2	600	1.4
		3	600	1.4
		4	—	—
	B	1	700	1.5
		2	600	1.4
		3	900	1.9
		4	800	1.8
	C	1	800	1.8
		2	700	1.5
		3	700	1.5
	D	1	800	1.8
		2	600	1.4
		3	600	1.4
	E	1	700	1.5
		2	600	1.4
		3	600	1.4
		4	600	1.4
	F	1	700	1.5
		2	600	1.4
		3	600	1.4
		4	700	1.5
Asthma (non-atopic)			1300	2.8
(atopic)			1100	2.3
Glomerulonephritis			2000	4.4
Newborn			400	0.9
NMS-1 (nuclear medical systems-1)			400	0.9

度を約2倍にした Sepharose 4B を用いて同一血清について計測したが，上記の測定値とあまり変動がなく，今回の測定では，抗原量による特異的 IgE 抗体価の測定値変動はないものと考えられた．

3. Streptococcal NADase 抗体価 6名の NADase 抗体価測定は，先ず，20倍希釈液のみを用いた screening を実施して測定値を求めた．その結果，全血清の吸光度は0.25以下を示したので，表1の基準に従って NADase 抗体価は全例 50 unit 以下と判定した．

4. RAST 値 表2に，6名のダニ，ハウスダスト抗原に対する特異的 IgE 抗体価 (RAST 値) を示した．今回の RAST 測定における判定基準は，使用した対照血清A値が14549cpm，B値，6567cpm，C値，1511 cpm，D値，1019cpm を示したので，RAST の判定基準に準じて，14549cpm 以上を highly positive, 14549—6567cpm を strong positive, 6567—1151cpm を clear positive, 1157—1019cpm を borderline, 1019cpm 以下を negative と 4 score に分類した．

6名の患者の RAST 値を上記に準じて判定すると，患者Aは，ダニ抗原に対し発症時，退院時共に強陽性 IgE 抗体価を示し，発症後1カ月，および3カ月後に至っても陽性の IgE 抗体を保有していた．ハウスダスト抗原に対しても同様で，発症後3カ月まで陽性の IgE 抗体が認められた．患者Dにおいては，患者Aと同様に，ダニ，ハウスダスト抗原に対して強陽性，陽性の IgE 抗体を保有していたが，患者Aと比較して，測定期間中の変動に差が認められなかった．

経時的変動について血清 IgE 値とダニ，ハウスダスト

抗原の IgE 抗体価を対比すると，前記患者A，Dにおいても，また，ダニ抗原に対し borderline を示した患者Eでも，両者の経時的変化は並行して減衰傾向が認められた．未測定血清は，小児採血のため採血量は少なく多項目検査には血清量が不足して，測定不能であり，経時的変化は不明であるが，いずれも，発症時両抗原に対して IgE 抗体価は陰性を示したので，未測定の IgE 抗体価も陰性の成績を与えるものと推定した．

IgE 抗体産生にアジュバント活性を有するＰＧとの関連を推測するために，ＰＧ抗体価と RAST 値を対比すると，全体にばらつき，一定の傾向はみられなかった．しかし，患者Dには異常に高いＰＧ抗体価と IgE 抗体価が見られ，両抗体の変動から両者の関係はかならずしも否定できないように思われた．

5. Family study 成績 40名のアンケート調査で27名の回答が寄せられた．その結果，入院前に扁桃腺炎で発熱を有した患者は44%，同じく両親は11%，風邪に罹患し易い患者，41%，両親11%，予防注射時の発熱，発疹の経験は，患者４%，両親０%，飲食による発熱，発疹，下痢の経験は，患者，両親とも７%で，原因食には魚，牛乳が挙げられた．薬疹の経験は，患者が４%，両親０%，退院後の発病経験は，患者の37%が有り，塗布薬の発疹は，患者の11%，両親７%が有り，皮膚病に罹患し易いと回答した患者，22%，両親，15%であった．

６名の患者については全員の回答が得られず，上記27名との対比した成績は得られなかったが，退院後，耳下腺炎発症１名，飲食による発疹，下痢，薬疹の経験患者１名，扁桃腺炎，風邪に罹患し易い患者３名であった．

治療期間の臨床検査成績によると，40人のしょう紅熱患者では，CRP が陽性 29/40 名（73%），RA 陽性 3/40名（８%），血液検査では，ヘマトクリット（Ht），ヘモグロビン（Hb）値減少例 12/40 名（30%），赤血球（RBC）数減少例3/40名（８%），白血球（WBC）数増加例20/40名（50%），さらに血液像検査においては，好酸球（E_o）数増加例21/40名（53%），好中球（Seg）増加例20/40名（50%），リンパ球（L）数減少例 26/40名（65%），桿状核白血球（St）増加例 18/40 名（45%），好塩基球（Ba）増加例2/40名（５%），血小板数増加例17/40名（43%）が認められた．すなわち，発症時には，白血球数が上昇し，血色素量減少，血小板数増加，血液像は，リンパ球数減少，好中球数増加，さらに，左方移動の傾向が強く，加えて好酸球数増加がみられた．回復時には，各測定値は正常値に復帰したが，白血球数のみが，一般に高値を持続した．

６名の臨床検査成績は，表４に示すように，40人の測

Table 4. Clinical Examinations' Data of 6 High IgE Cases

Patient name	Age	Sex	Appearance of exantheme	Isolation of: throat, nose	History	ASO	CR	RA	Ht	Hb	RBC	WBC	Ret	st	seg	Eo	Ba	L	M	Thrombocyte
A	6	M		+	mumps rubella	50	−	−	43	14.3	440	7500	16		60	9	−	28	3	184800
B	6	M	+	++	measles varicella	50	−	−	36	12.0	413	11800		4	75	1	−	18	2	
C	6	F		−	varicella	50			29	10.7	373	5300								238720
D	6	F	+	−	Asthma	166	++	−	39	13.6	504	8000		3	65	11	−	20	1	504000
E	9	M		+	measles varicella tonsillitis	166	+	−	37	13.4	475	5700	21		57	3	−	27	13	640520
F	11	M	++	++	measles tonsillitis urticaria	196	+		37	12.6	409	8500	16	5	58	4	−	28	5	203240

定値と大差は認められなかった．

既往歴では，発病頻度の高いものから順に列挙すると，麻疹25/40名（63%），水痘22/40名（55%），扁桃腺炎22/40名（55%），風疹15/40名（38%），耳下腺炎12/40名（30%），じん麻疹2/40名（5%），アレルギー性疾患1/40名（3%），喘息1/40名（3%），しょう紅熱の再罹患が1/40名（3%）であった．これに対し6名の既往歴は，麻疹3/6名，水痘3/6名，扁桃腺炎2/6名，耳下腺炎1/6名，風疹1/6名で40名のしょう紅熱患者が示す既往歴の順位，および，その罹患率と大差はなかった．

考　察

今日，溶れん菌感染によって惹起される感染症の発症や病像の進展，あるいはその続発症にアレルギー性機作の関与が推定されており，かような観点から溶れん菌感染，ないしは常在溶れん菌の果す役割についての検討が進められている．

大国らが動物を用いて証明した溶れん菌菌体成分に対するレアギン産生，さらには，レアギン産生にPGがアジュバント活性を示すという証明[2,3,5]は，もとよりこれがヒトの溶れん菌感染症において発現するか否かは不明であるが，しかしPGが生体内で長期に持続して存在する性質を考慮すれば[7,8]，溶れん菌感染症の遷延化，あるいは，続発症の出現に何らかの関与をする可能性は充分に考えられよう．しょう紅熱は，一般には，扁桃腺炎，上気道炎，中耳炎等と同じく単純な溶れん菌感染症に属する．そのため，発熱，発疹，あるいは病像の軽重等，その過程におけるアレルギー的機作との係わりを検討した報告は少ない．われわれは，高い血清IgE値を示し，さらに，そのIgE値がしょう紅熱の病週に従って変動する6名の患者血清を用いてヒトにおけるレンサ球菌菌体成分に対するレアギン産生の可能性を検討した．

1. PG 抗体価から直接生体内においてPGがアジュバント活性を有するか否かを推測することは難しいが，6名のPG抗体価が発症時に高く，高PG抗体を維持したことから宿主の抗体産生に何らかの影響を及ぼしたかも知れない．さらに，PGが示す生物活性の組織障害作用[8-10]，発熱作用[11]，セロトニン遊離作用[12]，また，生体内における強い抵抗性，長期局所持続性という特性[7]を考え合わせると，抗体産生ないしは病変成立の上にPG関与の可能性は否定できないように思われる．同様な方法でPG抗体価を測定した大国らの報告では，リウマチ熱 1：142，急性糸球体腎炎 1：618，リウマチ様関節炎1：134であった．

一般に細菌細胞壁PGの構造ないしは化学組成はほとんど類似しており溶れん菌感染症に出現するPG抗体は，他の細菌のPGとの間に交叉反応が認められる[13]．従って高抗体価は必ずしもレンサ球菌感染の指標とはならないが疾患と並行して明瞭な抗体価変動が認められる場合には，むしろPGの生物活性作用を充分考慮しておくべき必要性があろう．

2. レンサ球菌細胞壁由来たん白抗原に対する抗体価

immune complexによる腎炎惹起にIgE抗体の関与が指摘されている[14]．大国らは，ラット，マウスを用いてA群レンサ球菌菌体のIgE抗体産生を証明したが，最近，品川らと共にレンサ球菌細胞壁抽出たん白抗原を使用し，溶れん菌感染患者77名につきレアギンを測定した．その結果7%に有意な値を確認し，その存在の可能性を報告した[15]．しょう紅熱患者の本抗原に対する特異的なIgE抗体は表3に示したように，新生児，標準血清の1.4～1.8倍に留り，同時測定をした糸球体腎炎，喘息患者3名の測定価は全例とも3－4倍を示した．この測定方法による陽性判定基準は，一般に血清無添加結合抗原と ^{125}I-IgE 抗血清が結合した count 数の1.5－2倍以上と考えられているので，当測定値からはしたがって，しょう紅熱患者血清中にはIgE抗体は存在しなかったと判断された．しかし今回使用した抗原は，その製法からMたん白と M-associated protein を含有することが推測され，さらに，使用した抗原結合 Sepharose 4B が IgE 抗体量の全てを捕捉しているか否か不明であるから，使用した抗原の精製の問題と共に今後なお検討する必要があると考えられた．

3. Streptococcal NADase 抗体価　NADaseは溶れん菌の菌体外産物の1つで特異的に NAD を分解する．NAD は補酵素の group に属し，酸化還元過程に広く利用される生理的に重要な物質である．したがって，溶れん菌が NADase を産生することは先ず病因的意義において興味がもたれる．その生物活性は，leucotoxic actionとして知られており，その抗体価はリウマチ熱，糸球体腎炎に高値が報告されている[16-17]．6名のしょう紅熱患者の NADase 抗体価は，全例 50U/m*l* 以下であり，本測定法による健康者の上限値は，一般に 150U/m*l* と考えられているから，6名の測定値は正常範囲内と判定された．しかしA群溶れん菌中でも NADase 非産生菌が存在するからこの場合には有意な抗体価は認められない．ちなみに6名の検出した菌型は，4, 18, NT (non-typable) で菌検出不能が2名であった．

4. RAST 値　RAST が開発されて以来，アレルギー性疾患の原因物質 allergen の検出が非常に容易になった．今回われわれがダニ，ハウスダスト両抗原による RAST を実施したのは，次の点を考慮した結果による．

i) 急激な血清 IgE 値の上昇, ii) 患者年齢が atopic 素因による IgE 抗体産生の好発年齢であること, iii) 患者および家族のアンケート回答から食餌性 allergen よりも吸入性 allergen が推定された理由による. 測定結果は推測したように, 2名が強陽性, 1名が borderline を示した. 患者2名が示した RAST 値の特徴は, 血清 IgE 値と並行して経時的変化を示すことである. すなわち患者Aは, 減衰的に, Dは抗体価維持の型で経時的変化が認められ, AD共に, 血清高 IgE 値は両抗原による特異的 IgE 抗体産生結果によるものと判断された. その他患者Eにも明確ではないが類似傾向がみられた. B, C, F, 患者は両抗原に対し陰性であり, アンケート回答から薬物, 食餌性 allergen 等が考えられるが, 推測の域を出ない. 以上, RAST 値と既往歴ないし家族歴から6名中の3名はおそらく atopic 素因を有するのではないかと思われる. 従ってその高 IgE 値は恐らく, その素因によって惹起されたものとする可能性が強い. しかし検討すべき問題が残される. 何故, しょう紅熱発症時にダニ特異抗体が高いか? また, 疾患の経時的変化と同一行動を示したのはなぜであろうか? atopic 素因とは, ごく少量の抗原の暴露でも IgE 抗体を産生する遺伝的な素質と解釈されている. ダニ抗原の allergen はたん白質と多糖類の複合と考えられているから[18]溶れん菌菌体と共通抗原を保有するのであろうか? ちなみに溶れん菌菌体, 特に細胞壁成分はヒト, 動物組織と多くの共通抗原を有することが知られている. しかし, 抗原抗体反応は, その特異性によってその有用性が認められるものである. わが国の室内塵のダニの季節変動を調査した報告によると, ダニの増殖のピークは8月で, 冬期は検出率が減少する[19]. 6名のしょう紅熱発症は11, 12, 2月で多量のダニによる吸入作用は否定的である. いずれにしても atopic 素因を有する者がしょう紅熱発症時に各種 allergen に対する IgE 抗体を保有するなら, 合併症ないしは病像の修飾の上に関連する可能性があるかも知れない. われわれは上記2名に生活指導を行なった.

5. Family study および臨床検査成績の結果から, しょう紅熱患者に allergy 性機作が関与するかは明確にできなかったが今後さらに, かかる立場からの検討は重要な資料を提供するものと思われる.

まとめ

われわれは, 血清高 IgE 値を示す6名のしょう紅熱患者血清を用いて, 溶れん菌感染による特異的 IgE 抗体の検出を試みた. 測定は, A群レンサ球菌12型のたん白抗原を抗原に用いた RAST, および IgE 抗体産生にアジュバント活性を有するPGの抗体価測定, 病因的に特異性を示すと思われる NADase の抗体価測定, 患者の atopic 素因を検討するダニ, ハウスダスト抗原を使用した RAST, および Family study 等である. その結果, レンサ球菌菌体たん白抗原に対する特異的 IgE 抗体は検出できなかったが, 6名全員がPG抗体産生に特異性を示すこと, また, 3名にダニ, ハウスダスト抗原に対する特異的 IgE 抗体の存在が証明されて atopic 素因を有することが推定された. 今後, しょう紅熱発症に atopic 素因による影響の検討が示唆された.

謝辞 試料の分与, 測定器材の貸与, および御校閲等数々の御高配を賜わった日本医大の大国博士, 並びに教室各位に心より感謝いたします.

(本研究の一部は第24回日本臨床病理学会総会1977年10月で報告した.)

文献

1) 加納堯子他: 東京衛研年報, 28-1, 15, 1977
2) Ohkuni, H. et al.: *Int. Archs Allergy Appl. Immu.*, 50, 123, 1976
3) Ohkuni, H. et al.: *Exp. Cell. Biol.* 44, 83, 1972
4) Johansson, S. G. O. et al.: *Int. Arch. Allergy*, 41, 443, 1971
5) 大国寿士他: 日本細菌学雑誌, 30, 216, 1975
6) 大国寿士他: *ibid.*, 31, 109, 1976
7) 大国寿士他: *ibid.*, 26, 29, 1971
8) 大国寿士他: *ibid.*, 27, 59, 1972
9) Ginsburg, I. et al.: *Current Research on Group A streptococcus*, p. 210, Excepta Medica Fundation Amusterdam, 1968
10) Goldstein, I. et al.: *ibid.*, p. 165
11) Rotta et al.: *J. Exp. Med.* 130, 31, 1969
12) Rotta et al.: *J. Inf. Dis.* 123, 587, 1971
13) 大国寿士他: 感染症学雑誌, 45-8, 357, 1966
14) Cochrane, C. G.: *J. Exp. Med.* 134, 75, 1971
15) 品川洋一他: 第81回日本小児科学会, 学術集会報告, 1978
16) Bernhard, G. G. et al.: *J. Clin. Invest.* 38, 1942, 1959
17) Stollerman, G. C. et al.: *Streptococci and Streptococcal Diseases*, Academic Press, 1972
18) 宮本昭正: 臨床と研究, 5-5, 4, 1974
19) 大島司郎: 小児外科内科, 7-5, 461, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 39—43, 1978

ポーセライン・ビーズによる簡易菌株保存法の検討

潮田　弘*, 寺山　武*, 五十嵐英夫*
新垣正夫*, 坂井千三*

An Attempt for Simple Preservation of Bacterial Cultures by Drying on Porcelain-Beads

HIROSHI USHIODA*, TAKESHI TERAYAMA*, HIDEO IGARASHI*,
MASAO SHINGAKI* and SENZO SAKAI*

菌株保存には種々の手法[1]が使われるが，その長期間保存法として，継代培養法，凍結法，乾燥法あるいは凍結乾燥法が通常用いられる．各方法とも一長一短があり，菌種により適用範囲がおのずと限定されてくる．

極めて応用範囲が広く，かつ菌株の性状保持が安定していることから，凍結乾燥法を私どもも多くの菌株保存に用いてきた．しかしながら，本法は高価な機械設備が必要であり，手法が繁雑であること，容器が多くの場合ガラス製であるため亀裂や破損が生じ易いこと，また1回の使用に1本のアンプルを必要とするので，頻繁に菌株を使用したいような場合には，その数だけ作製しなければならないなどの問題点がある．

一方，標準菌株などを長期間保存するという目的では凍結乾燥法が適するが，比較的短期間，多数の菌株を保存するような場合あるいはしばしば実験に供する必要がある場合，手軽に行なえて保存性の高い方法が要求される．Hunt ら[2]は各種菌株の液体培養をそのままポーセライン・ビーズ乾燥法によって10カ月間保存に成功し，供試した黄色ブドウ球菌では，継代培養法よりも性状が安定であったことを報告した．また，Miller ら[3]も同種類の多孔性のガラス・ビーズ乾燥法を行ない，20菌属を21年間保存し得たことを報告している．そこで私どもも，このポーセライン・ビーズ乾燥法を用い，多数の菌種，菌株について検討したので，その成績について報告する．

材料および方法

1. 供試菌株

供試した各種菌株の菌種，由来，菌株数は表1，2および3に示した．

2. ポーセライン・ビーズ保存法

1) ビーズの準備　ポーセライン・ビーズは使用前に水洗いしないものは，ブイヨン中に浸漬すると，菌の発育とまぎらわしい白濁沈殿物を生じるので，よく水洗い後乾燥させた．ついで火焔中で有機物などが完全になくなるまで燃焼させ，滅菌小試験管に必要数入れて自然冷却した．

2) シリカゲル入り保存用試験管　着色シリカゲルを小試験管（12×100mm）に4～5 cm の高さまで入れ，ロ紙の小片を入れ，シリカゲルとビーズの混ざりを防ぐようにし，180Cで乾熱滅菌した．乾熱滅菌後，シリコンゴム栓あるいはゴム栓で密栓し，室温においた．

3) 供試菌株の培養法　Brain Heart Infusion Broth (Difco)（以下BHIB と略す）あるいは Tryptic Soy Broth (Difco)（以下 TSB と略す）で37C 1夜培養した．

4) ビーズの乾燥保存法　Hunt ら[2]の方法に準じ，前記培養菌液中に用意した滅菌ビーズを投入し，直ちにとり出し，もとの滅菌試験管に入れた．これをシリカゲルを入れたデシケーターに納め，真空ポンプ（10^{-4}mm Hg）により室温で30分間吸引した．これを1日1回計3回吸引し，4日目に用意した滅菌シリカゲル入り保存試験管に入れ，密栓して室温で保存した(図1，2)．

3. 保存菌株の生死の確認法

保存菌株の生死の判定は菌種によって異なるが，乾燥直後，1カ月，6カ月，1年，2年および3年後にビーズを白金線またはピンセットで無菌的に取り出し，BH

* 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

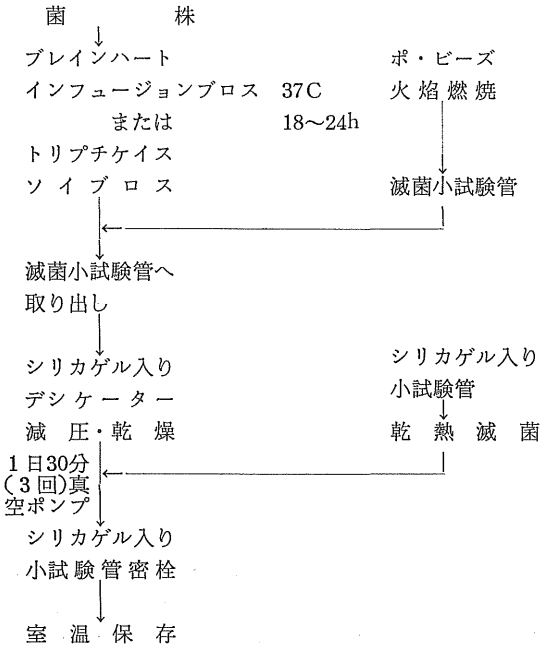


図 1. ポーセライン・ビーズ使用による簡易菌株保存法

ＩＢまたは TSB で 37C 24～120 時間培養後，菌の発育により判定した．

成　績

1. 黄色ブドウ球菌，化膿レンサ球菌およびセレウス菌の保存実験成績

黄色ブドウ球菌，レンサ球菌は 3 年間，またセレウス菌は 2 年間の保存実験成績を表 1 に示した．

黄色ブドウ球菌464株中414株（89.2%）が 3 年後も生存していた．また，エンテロトキシン標準株[4]および変異株73株中60株（82.2%）が生存していたが，コアグラーゼ標準株[5,6]は 7 株中 3 株（42.9%）が生存していたが，特殊な変異株であり，死滅の早いものがみられた．

化膿レンサ球菌は 29 株を供試したが，3 年後に 26 株（89.7%）が生存していた．

セレウス菌は 2 年後18株中15株（83.3%）生存していた．

2. 表皮ブドウ球菌・ミクロコッカスの保存実験成績

各種材料由来表皮ブドウ球菌およびミクロコッカスの 1 年間の保存実験成績を表 2 に示した．耳漏由来表皮ブドウ球菌株は51株中50株（98.0%）と高い生存率を示したが，耳鼻科材料由来株を除く各種臨床材料由来株では65株中33株（50.7%）が生存していたが，各由来株のうち最も生存率が低かった．健康人由来株ではふん便由来株が 100 %の生存率で最も高く，ついで手指由来株92.0

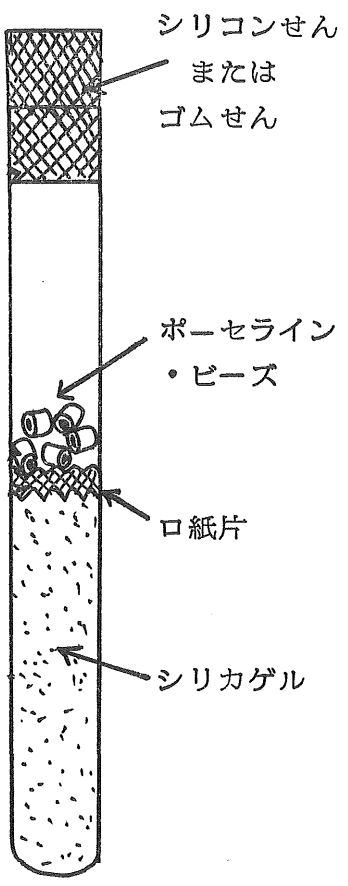


図 2. シリカゲル入り試験管に密栓保存

%，鼻前庭由来株は88.6%の生存率であった．表皮ブドウ球菌は通常の継代培養では 3 カ月程で継代が必要であり，菌株保存に難点があったが，ポーセライン・ビーズによる場合には約 90 %のものが 1 年間保存可能であった．

それに比較して，各種材料由来ミクロコッカスでは，耳漏由来株87.0%の生存率であったが，各種臨床材料由来株33株中 7 株（21.2%）と最も低い生存率であった．

また鼻前庭由来株75.0%，手指由来株70.0%およびふん便由来株66.7%の生存率であった．この各種材料由来の表皮ブドウ球菌およびミクロコッカスの直後，1 カ月，6 カ月および 1 年後の生存率を図 3 に示した．図から明らかなように，各種臨床材料由来表皮ブドウ球菌およびミクロコッカスが極端に生存率が低く，他の由来株では表皮ブドウ球菌に比してミクロコッカスの生存率が全体に10～20%低率であった．

3. グラム陰性桿菌類の保存実験成績

表 1. 黄色ブドウ球菌，化膿レンサ球菌およびセレウス菌の保存実験成績

菌種	由来	菌株数	保存期間 直後	2年	3年	生存率 (%)
S. aureus	市販食品 (1)	90	90/90*	89/90	84/90	(93.3)
	市販食品 (2)	187	187/187		182/187	(97.3)
	市販生肉	105	105/105		83/105	(79.0)
	食中毒原因食品	2	2/2		2/2	(100)
	エンテロトキシン産生変異株	73	73/73		60/73	(82.2)
	コアグラーゼ標準株	7	7/7		3/7	(42.9)
St. pyogenes	臨床材料	29	29/29		26/29	(89.7)
B. cereus	血清型別標準株	18	18/18	15/18	(83.3%)	

* 生存菌株数／供試菌株数

表 2. 表皮ブドウ球菌およびミクロコッカスの保存実験成績

菌種	由来		保存期間 直後	1月	6月	1年	生存率 (%)
S. epidermidis	臨床	耳漏	51/51*	51/51	51/51	50/51	(98.0)
		各種材料	65/65	65/65	45/65	33/65	(50.7)
	健康人	鼻前庭	44/44	44/44	43/44	39/44	(88.6)
		手指	50/50	50/50	50/50	46/50	(92.0)
		ふん便	26/26	26/26	26/26	26/26	(100)
Micrococcus	臨床	耳漏	23/23	23/23	22/23	20/23	(87.0)
		各種材料	33/33	33/33	18/33	7/33	(21.2)
	健康人	鼻前庭	8/8	8/8	8/8	8/8	(75.0)
		手指	30/30	30/30	28/30	21/30	(70.0)
		ふん便	6/6	6/6	5/6	4/6	(66.7)

* 生存菌株数／供試菌株数

腸内細菌10菌属およびコレラ菌（いわゆるNAGビブリオ1株を含む），腸炎ビブリオの保存実験成績を表3に示した．各菌属・菌種ともに供試菌株数が少ないが，室温で3年間保存後，TSBで約1週間復元培養を観察したが，菌の発育の認められたものは，サルモネラの4株中4株，大腸菌2株中2株が発育した．その他生残したものはサイトロバクターが2株中1株，偽結核菌2株中1株であったが，赤痢菌をはじめ，アリゾナ，クレブシエラ，エンテロバクター，セラチア，プロテウス，腸炎エルシニア，コレラ菌および腸炎ビブリオなどはすべて生存できなかった．特にビブリオ属は1月後に供試菌株のすべてが死滅した．

考察

微生物を対象に行なわれる研究においては，研究材料である菌株の保存が研究の重要な基盤となる．

私どもも多種類の多数の菌株を日頃，取扱い，菌株保存については十分な配慮をしているが，ときに大切な菌株を死滅させてしまうこともある．

菌株保存法として，凍結乾燥法は応用範囲が広く，菌株の性状の保持がすぐれているため，一般に広く用いられている．しかし，本法は多種類の菌株を同時に凍結乾燥することは，手技が繁雑となる．そこで，手軽に行なえて，度々実験に供することの可能な菌株保存法の一つとして，ポーセライン・ビーズ法について検討した．

その結果，黄色ブドウ球菌では生存率80～100%とよい成績であり，これまでの報告[2,3]とほぼ一致した．しかるに同じブドウ球菌でも表皮ブドウ球菌では各種由来株のうち，各種臨床材料由来株が特に生存率が低く，1年後に50.7%の生存率であった．その他の由来株では黄色ブドウ球菌と目立った差は認められなかった．さら

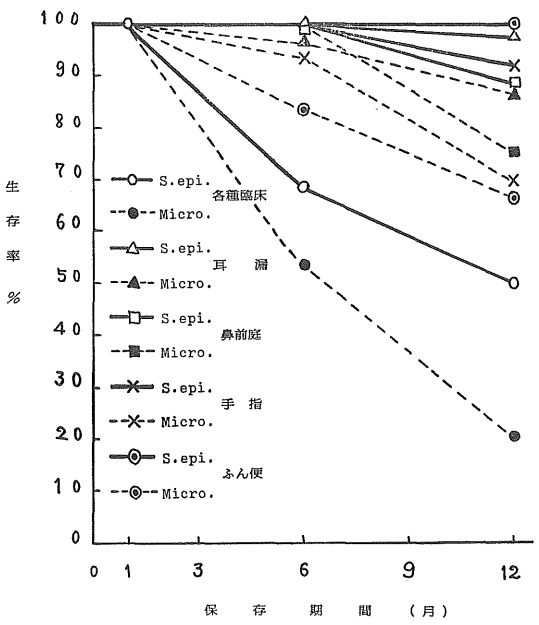


図 3. 各種由来表皮ブドウ球菌とミクロコッカスの生存率比較

表 3. グラム陰性桿菌類の保存実験成績

菌種	菌株数	保存期間 直後	1月	3年
Sh. flexneri	2	2/2*	1/2	0/2
Sh. sonnei	2	2/2	2/2	0/2
S. sofia	2	2/2	2/2	2/2
S. infantis	2	2/2	2/2	2/2
E. coli	2	2/2	2/2	2/2
Arizona	1	1/1	1/1	0/1
Citrobacter	2	2/2	2/2	1/2
Klebsiella	2	2/2	1/2	0/2
Enterobacter	1	1/1	1/1	0/1
Serratia	2	2/2	1/2	0/2
Pr. vulgaris	2	2/2	1/2	0/2
Pr. mirabilis	2	2/2	1/2	0/2
Pr. morganii	1	1/1	0/1	0/1
Pr. inconstance	2	2/2	1/2	0/2
Y. enterocolitica	2	2/2	2/2	0/2
Y. pseudotuberculosis	2	2/2	2/2	1/2
V. cholerae	3	3/3	0/3	0/3
V. parahemolyticus	1	1/1	0/1	0/1

* 生存菌株数／供試菌株数

に，同じFamily に属するミクロコッカスは表皮ブドウ球菌の生存率より低く，菌株由来により21.2%と低い生存率のものから，87.0%と表皮ブドウ球菌と同程度のものまで存在した．

一方，他のグラム陽性菌では，セレウス菌およびレンサ球菌が比較的生存率が高かった．菌株保存法が常に問題となる化膿レンサ球菌は凍結保存法[7]，山井ら[8] のゼラチン・デイスク保存法あるいは各研究室で独自に開発した方法などを用い検討されてきたが，本ビーズ乾燥法により約90%のものが3年経過後も生存したことは貴重な成果であった．

グラム陰性桿菌ではほとんどがこの方法では死滅し，サルモネラと大腸菌のみが生存率100%であった．サルネモラの乾燥に対する抵抗性については Horner ら[9] の報告もあり，水分活性（Aw）を下げた場合でもかなりの抵抗性を示すことが明らかであった．また，コレラ菌などビブリオ属は低温処理などのないこの方法によっても供試した4株がともに死滅し，ビブリオ属はこのビーズ乾燥法が適当ではないものと思われた．

菌株保存は単に微生物が生存しているだけでは不十分であり，分離当初の遺伝的性質が変らないように維持しなければならないわけである．その意味で，乾燥法は継代培養法に比して優れた保存法であるとされているが，近年の報告[10,11]で，乾燥（脱水）により微生物の変異率が高まるということが注目されており，この簡便なポーセライン・ビーズ保存法についても培養条件，乾燥時の菌量，保護物質の添加など各種条件を考慮し，今後検討してまいりたい．

結　論

菌株の簡易な保存法として，ポーセライン・ビーズ乾燥法の生存率を検討した結果，次の成績を得た．

1. グラム陽性菌の保存実験では黄色ブドウ球菌は3年後464株中414株（89.2%）生存し，表皮ブドウ球菌は1年後236株中194株（82.2%），ミクロコッカス100株中58株（58.0%）生存した．また化膿レンサ球菌は3年後29株中26株（89.7%）およびセレウス菌は2年後18株中15株（83.3%）が生存した．

2. グラム陰性桿菌の保存実験の結果は，腸内細菌10菌属のうち，サルモネラ4株中4株，大腸菌2株すべてが生存しており，サイトロバクターおよび偽結核菌は2株中1株が生存した．その他の赤痢菌，アリゾナ，クレブシエラ，エンテロバクター，セラチア，プロテウスおよび腸炎エルシニアはすべて死滅した．またコレラ菌および腸炎ビブリオは特に弱く，1カ月ですべて死滅した．

文　献

1) 根井　外喜男：微生物の保存法, 10, 1978, 東京大学出版会
2) Hunt, G. A., A. Gourevitch, and J. Lein : *J. Bacteriol.*, **76**, 453, 1958
3) Miller, R.E. and L.A. Simons : *J. Bacteriol.*, **84**, 1111, 1962
4) 寺山　武：日細菌誌, **26**, 611, 1971
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) 潮田　弘, 寺山　武, 新垣正夫, 坂井千三, 善養寺　浩：東京衛研年報, **27**-1, 1, 1976
7) 鈴木正俊：最新医学, **27**, 631, 1972
8) 山井志朗, 西本真理子, 新川隆康, 小原　寧, 宮本泰：日細菌誌, **30**, 589, 1975
9) Horner, K. J. and G. D. Anagnostopoulos : *J. Appl. Bact.*, **38**, 9, 1975
10) 田中吉紀, 大西武雄, 有田美知子, 竹田美文, 三輪谷俊夫：凍結及び乾燥研究会会誌, **21**, 100, 1975
11) Webb, S. J. : *Nature*, **213**, 113, 1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, 29-1, 44—48, 1978

腸内ウイルス感染の実態は握（第10報）
1977年の東京都内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 (X)
Virus Isolation of Specimens taken from Sewage Treatment Plants in Tokyo in 1977

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

緒　言

われわれは，下水中のウイルスの消長を経時的に追及することにより，その下水排出地域住民間に発生している腸管系ウイルスの感染流行をは握しようとする目的で，過去10年間にわたり，都内下水処理場下水検体についてウイルス分離試験をおこなってきた．そして，この方法は上記の目的を充分満たし，また労力的経済的にも比較的負担が軽いので，実用性のあるものであることを明らかにした[1,2]．

本報は1977年度の調査成績である．

なお本年は，従来の都内定点下水処理場に加えて，都下多摩地区の5住宅団地の団地専用下水処理場下水検体についても検索した．また，急性熱性上気道炎（以下URIと略す）患児咽頭ぬぐい液からのウイルス分離，ならびに都民のコクサッキーB群ウイルス中和抗体保有率の測定を行ない，下水検体からのウイルス分離状況と対比して検討したので，これらについてもあわせて報告する．

実験材料および方法

下水検体　検体は，従来から定点としてきた都内の3下水処理場と，都下多摩地区5住宅団地の団地専用下水処理場から採取した．採取方法および検体処理方法はすべて既報に準じた[3-5]．

URI患児咽頭ぬぐい液　1977年1月から12月に東京逓信病院小児科外来で受診した患児321名から採取した咽頭ぬぐい液を，ウイルス分離用検体として使用した．滅菌綿棒で患児の咽頭分泌物をぬぐいとり，ただちに少量の組織培養液（MEM）を分注した試験管に入れ，−80° フリーザー内であらかじめ冷却しておいたエタノール中で急速に凍結した後，同フリーザー中に保存した[6]．

健康都民血清　1975年から1977年にかけて毎年6月に採取した3～15歳の健康小児血清660件を用いて，コクサッキーB群1～6型ウイルスに対する中和抗体を測定した．

ウイルス分離同定法　大要は既報に準じた[3-5]．ただし，使用した培養細胞は，FL, HeLa-S 3, HEp 2, Vero #462, BGM, MDCK, HEL-R66 の7種類で，従来の培養試験管にかえて組織培養用マルチトレイFB-24-TC（Flow 社製）を用いた．

中和試験　被検血清は PBS（−）で1：8に希釈し，56°30分非働化した．これに 100$TCID_{50}$/0.05m*l* のウイルスを等量添加混和し，37° 恒温槽内で3時間反応させ，室温に1夜放置した後，CMK 細胞培養マイクロトレイに接種して1週間観察し，細胞変性効果（CPE）を指標に各被検血清の抗体（≧1：8）の有無を調べた．

実験成績および考察

下水検体からのウイルス検出　各下水処理場で採取した下水検体からのウイルス分離試験成績を表1，2にし

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

表 1. 東京都区内の下水処理場下水からのウイルス分離試験成績（1977年）

処理場	検体種類	採取時期(月) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O	生下水 導水渠					P2·3	E11	CB2·3·5	E11	CB5	P2		E11 CB4
	生下水 高段						E11	CB3·4	CB3				
	生下水 低段					E11	P3	E11	E11 CB3·5	CB3	P1		P3
	第2沈殿汚泥	(ND)	(ND)	(ND)			CB4	CB5	E11 CB2·3	CB3	CB3	CB3	
	第2沈殿池水	(ND)	(ND)	(ND)		P2							CB4
S	生下水 S系					P3		E11			E11		
	生下水 K系												
	第2沈殿汚泥 S系							E11					CB4·5
	第2沈殿汚泥 K系							CB3	E11	CB2			CB4
	第2沈殿池水 S系							CB3					
	第2沈殿池水 K系							CB3					
	放流水							CB3	CB3	CB4			
M	沈殿汚泥	E11						CB2	CB5		E11 P2		CB4

注：P1(2·3)＝ポリオ1型(2，3型)ウイルス，CB2 (3·4·5)＝コクサッキーB群2型(3，4，5型)ウイルス，E11＝エコー11型ウイルス，AD2(6)＝アデノ2型(6型)ウイルス，(ND)＝検査せず

表 2. 東京都下多摩地区の住宅団地専用下水処理場下水からのウイルス分離試験成績（1977年）

団地名	検体種類	採取時期(月) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	生下水			CB5		P2·3		E11 CB2	CB5		E11 CB3·4	CB3	CB2
	沈殿池水		E11	CB5	P3			CB3	CB3				
	沈殿汚泥	CB3		CB5	P2·3			E11	CB5		CB2·3	CB3	CB2
B	生下水	E11	E11	E11 CB3		P3	AD2	CB2·5	CB3	CB3	P2 CB3		
	沈殿池水				P2		CB4	CB4	CB4		P2 CB3		
	沈殿汚泥		E11		P3				CB3	CB3	P2		
C	生下水	CB3	CB3		P2·3		CB4	CB4	CB2·5	E11 CB4	P3	P2·3 CB3	CB2
	沈殿池水				P3 CB3				E11 CB2			CB3	
	沈殿汚泥	CB3	CB3	E11	P2	P3	CB4	CB4	CB5	CB3	P2		CB2
D	生下水	P3	E11					E11 CB4	CB2	E11 CB2	E11 CB2·3	P3	CB3
	沈殿池水		(ND)	CB5	P2			E11	CB2		P2		
	沈殿汚泥		(ND)	CB5	P1·2			E11 CB4	CB2·3	P2 CB2	E11 P2 CB3		E11
E	生下水				P1		AD6	CB4	CB2·3	(ND)	E11	P3	
	沈殿池水							E11 CB4	CB2·3	E11		CB5	
	沈殿汚泥								CB2·3	CB3		CB5	P3

表 3. 下水処理場別，月別ウイルス分離状況（1977年）

処理場	ウイルス		1(月)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
都区内処理場	ポリオ	1型										○		
		2					○					○		
		3					○	○						○
	コクサッキーB	2							○	○	○			
		3							○	○	○	○	○	
		4						○	○		○			○
		5							○	○	○			○
	エコー	11	○				○	○	○	○		○		○
多摩地区団地処理場	ポリオ	1型				○								
		2				○	○				○	○	○	
		3	○			○	○					○	○	○
	コクサッキーB	2							○	○	○	○	○	○
		3	○	○	○	○			○	○	○	○	○	○
		4						○	○	○	○	○	○	
		5			○				○	○				
	エコー	11	○	○	○				○	○	○	○	○	○
	アデノ	2						○						
		6						○						

めした．都区内のO処理場では54検体中25検体（46%）から計34株のウイルスを，S処理場では84検体中14検体（17%）から計15株のウイルスを，M処理場では12検体中5検体（42%）から計6株のウイルスをそれぞれ分離した．また，都下多摩地区のA～Dの4団地処理場では計142検体中83検体（58%）から110株のウイルスを，E団地処理場では35検体中14検体（40%）から18株のウイルスを分離した．

各処理場から検出されたウイルスの種類を月別にみると表3のとおりである．まず，ポリオウイルスは例年のとおり春秋の生ワクチン一斉投与時期にのみ検出された．コクサッキーB群ウイルスは夏期を中心にして2～5型が分離された．このように数型のウイルスの混合流行像は1972年以来連続した特色であった．エコーウイルスについては，11型ウイルスが高頻度に分離され，都内に相当濃厚なウイルス散布があったものと考えられた．このエコー11型ウイルスの分離は1971年以来6年ぶりで，71年には5～10月に限って分離されたが，本年はほとんど年間を通じて分離された．しかし，夏季に検出のピークがあったことでは両年共一致した．例年都内における冬季の呼吸器疾患の病因として重要な位置をしめているアデノウイルスは，ほとんど毎年下水検体から高率に分離されているが，本年は6月にわずか2株分離されたのみであった．1977年秋から冬にかけての集団かぜ患者中，われわれの検索した範囲内ではアデノウイルス感染症を疑うものはなかったので，下水からのアデノウイルス分離成績とよく一致した．

次に下水排出地域の住民の年齢構成と下水検体からのウイルス分離率との関係を，人口構成が比較的正確には握しやすい住宅団地について調査すると表4のとおりで，総人口中に占める0～6歳児の割合が高率なほどウイルス分離率も高くなっている．

下水検体種類別のウイルス分離成績を表5にしめす．第2沈殿汚泥からの検出率が最も高く，次いで生下水，第2沈殿池水の順であった．従って，下水からのウイルス分離を能率よく行なうには沈殿汚泥を重点的に検索すればよいと考える．また，沈殿汚泥からのウイルス検出

表 4. 団地別年齢構成とウイルス分離率との関係

団地名	年齢構成（0～6歳）	ウイルス分離試験 検体数	ウイルス分離試験 分離株数	分離率
A	※26.2%	36	26	72.2%
B	25.1	36	23	63.4
C	22.7	36	31	86.1
D	21.1	34	30	88.2
E	15.8	35	18	51.4

※対団地総人口

表 5.　東京都区内下水処理場の検体別ウイルス分離成績（1967—77年）

事項	O処理場			S処理場			M処理場
	生下水	第2沈殿汚泥	第2沈殿池水	生下水	第2沈殿汚泥	第2沈殿池水	第2沈殿汚泥
検査件数	381	102	121	246	336	255	91
陽性件数	263	73	22	78	114	33	40
(%)	(69.0)	(71.6)	(18.2)	(31.7)	(33.9)	(12.9)	(44.0)
分離株数	428	123	25	92	126	36	57

表 6.　下水とURI患児検体からの腸管系ウイルス分離株数の比較（1977年）

ウイルス		下水検体	患児検体
ポリオ	1型	3	
	2	20	3
	3	19	
コクサッキーB	1		2
	2	21	21
	3	43	17
	4	21	1
	5	18	2
エコー	11	36	9
アデノ	1		5
	2	1	8
	3		1
	5		4
	6	1	1
	?		6

?＝型未同定アデノウイルス

率を一層向上させるためには，沈殿汚泥に吸着したウイルスをいかにして効率よく遊出させるかを検討する必要があろう．

URI 患児と下水からのウイルス分離成績の対比　われわれは，本年 URI 患児の病因をウイルス学的に追及する目的で，患児の咽頭ぬぐい液からのウイルス分離をおこなった．その詳細については別に報告した[6,7]とおりであるが，患児からのウイルス分離成績と下水検体からのそれとを対比させると表6のとおりになる．

コクサッキーB群ウイルスは2，3型を中心として両者から検出されたウイルスの種類は比較的よく一致している．また，前述のようにエコー11型ウイルスは本年の下水検体から6年ぶりに高頻度に分離されたが，URI 患児からも相当数検出され，都内に濃厚散布があったことを裏づけた．しかし，アデノウイルスについては両者からのウイルス分離成績の対応はみとめられなかった．

下水検体と URI 患児からの月別ウイルス分離状況を，

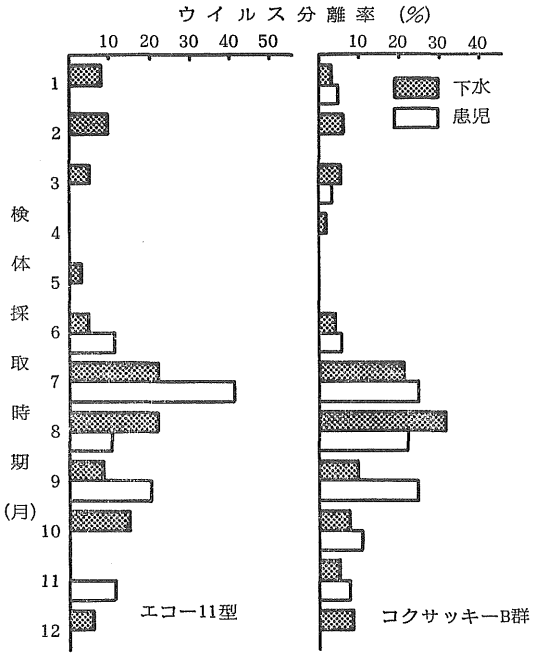


図 1.　下水とURI患児からの月別ウイルス分離率（対ウイルス別分離株総数）

コクサッキーB群ウイルスおよびエコー11型ウイルスにわけて各々の分離株総数に対する百分率で図示すると図1のようになり，両ウイルスはともに夏季を中心に分離され，下水検体と URI 患児からのウイルス分離パターンがよく一致した．

都民のコクサッキーB群ウイルス中和抗体保有状況　1975～1977年に収集した健康児血清660件を用い，コクサッキーB群1～6型ウイルスについてそれぞれの中和抗体保有率（抗体価≧1：8）を調査した．結果を図2にしめした．近年下水検体から高頻度に分離されている2～5型ウイルスに対する抗体は，32～78%と比較的高い保有率をしめしたが，ウイルス分離が低頻度の1型と6型に対する抗体保有率は0～35%と低かった．

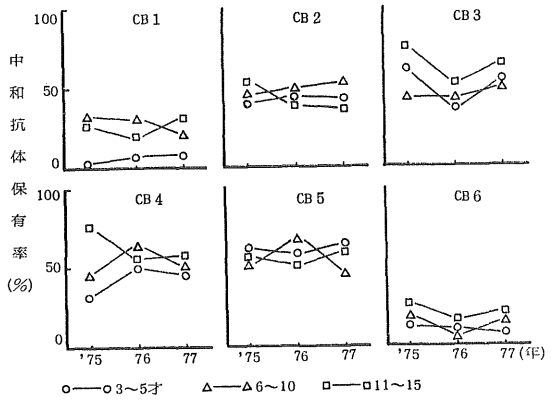


図 2. 東京都民のコクサッキーB群ウイルス型別中和抗体保有率（≧1：8）

以上述べたことから，下水検体を対象とした腸管系ウイルスの調査結果は，その地域住民間の同ウイルスの感染流行実態をよく反映すると考える．

結　論

1. 1977年1～12月に都内において採取した下水検体327件についてウイルス分離試験をおこなった結果，141検体（43%）から計183株のウイルスを検出した．検出ウイルスの内訳は，ポリオウイルス42株(23.0%)，コクサッキーB群ウイルス103株（56.3%），エコー11型ウイルス36株（19.7%），アデノウイルス2株（0.5%）であった．

2. ポリオウイルスは春秋の生ワクチン投与時期にかぎって，またエコーウイルス，コクサッキーB群ウイルスは夏季を中心に検出された．

3. 調査期間中に下水から高頻度に分離されたウイルスは，コクサッキーB群2～5型ウイルスとエコー11型ウイルスであった．特にエコー11型ウイルスは1971年以来6年ぶりに検出された．URI 患児咽頭ぬぐい液からもこの両種ウイルスが高率に，下水検体からのウイルス検出時期によく対応して分離された．

4. 住宅団地専用下水処理場下水検体からのウイルス分離率は，当該団地住民の年齢構成により変化した．すなわち，下水排出地域住民の総人口中に占める0～6歳児の割合が高い程高率であった．

5. 生下水，沈殿汚泥，沈殿池水からのウイルス分離率の比較では，沈殿汚泥が最も高率であった．

謝辞 本調査を実施するにあたり，検体採取に多大のご協力を賜った，東京都下水道局，日本住宅公団，㈱団地サービス環境技術センター，東京逓信病院小児科の関係各位に深甚の謝意を表する．

（本研究は昭和52年度当研究所調査研究課題「再生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) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二：日感染学誌，51，518，1977
2) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二：日感染学誌，52，臨時増刊，67，1978
3) 岩崎謙二，柏木義勝，坂井冨士子ら：東京衛研年報，20，35，1968
4) 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
5) 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
6) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二，浦野純子，河野弘子，渡辺悌吉：東京衛研年報，29-1，49，1978
7) 渡辺悌吉，浦野純子，河野弘子，石原　祐，岩崎謙二，藪内　清，矢野一好：小児ウイルス病研究会抄録集，8，40，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 49—53, 1978

急性呼吸器疾患患児のウイルス学的検索成績

矢野一好*, 藪内清*, 柴田タツ美*, 岩崎謙二*
浦野純子**, 河野弘子**, 渡辺悌吉**

Virus Isolation from Children Suffering from Acute Respiratory Diseases in Tokyo

KAZUYOSHI YANO*, KIYOSHI YABUUCHI*, TATSUMI SHIBATA*, KENJI IWASAKI*, JUNKO URANO**, HIROKO KOHNO** and TEIKICHI WATANABE**

緒　言

小児におけるウイルス感染症では，起因ウイルスが同一であってもケースによって多種多様な臨床症状を訴えることがすでに報告されている[1-4]．ウイルス学的検査結果は，患者自身の治療に直接役立つことは少ないが，その病因ウイルスを明らかにすることができ，また，ウイルス性疾患および流行の実態を正しくは握することができれば，将来の流行予測，および，予防対策の資料として大きな意義がある．

われわれは，小児科受診患児を対象にして病因ウイルスの検索を行ない，検出ウイルスの季節消長，疾患別の検出ウイルスの種類を調査した．また，健康児童材料からウイルス分離を行なって患者背景の疫学的調査も実施した．

材料と方法

患児咽頭ぬぐい液　1977年1月から12月に東京逓信病院小児科で受診した患児551名から咽頭ぬぐい液を採取してウイルス分離試験を行なった．咽頭ぬぐい液の疾患別内訳は，上気道炎（URI）321件，下気道炎（LRI）103件，下痢嘔吐症15件，発疹症54件，その他58件であった．患児の咽頭ぬぐい綿棒は，少量の組織培養液（MEM）を分注した試験管に入れ，あらかじめ−80°のフリーザー内で冷却しておいたエタノール槽内で急速凍結して−80°に保存した．

健康児ふん便　ポリオ流行予測において感染源調査検体として1967〜77年の毎年夏季（8〜10月）に採取した健康児ふん便1,315件をウイルス分離に供した．ふん便は，MEMで10%乳剤として−80°のフリーザー内に凍結保存した．

ウイルス分離　凍結保存した患児の咽頭ぬぐい液，および，健康児ふん便は，細胞接種当日に融解し，3,000 rpm 15分間遠心した．上清に抗生物質を添加し，37°温水槽内で15〜30分間保持した後，下記の培養細胞に接種した．ウイルス分離には，FL, $HeLaS_3$, HEp #2, Vero #462, BGM, MDCK, Vero 355の7種類の系を使用した．MDCK細胞は，インフルエンザウイルスの分離を主目的として使用した．培養方法は，飛田の方法に従ってクリスタルトリプシン（持田），牛血清アルブミン，グルコース等を添加したMEMを維持液とした[5,6]．Vero 355細胞は，石川県衛生研究所の梶氏より分与されたもので，パラインフルエンザウイルスの分離を主目的として使用した．培養は，仔牛血清無添加のMEMにクリスタルトリプシンを添加した維持液を用い，途中，液交換を行ない33°で10日間培養を続けた．各細胞ともウイルス分離培養は，24穴のプラスチックプレート（Costar社製 Cluster 24）を用い，CPEおよび，ヒトO型，ニワトリ，モルモット赤血球のHAを指標に行なった．指標マイナスの場合は，3代まで継代培養を続けた．CPEまたは，HAプラスとなった培養は，既知の各ウイルス株抗血清を用いたHI試験，CF反応，および，Schmidtのプール血清を用いた中和試験によりウイルスの種類，および，その型を同定した．術技は，常法に準じてマイクロ法により行なった[7]．

* 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
**東京逓信病院小児科

表 1. 疾患別ウイルス分離成績

診断名		URI	LRI	下痢嘔吐症	発疹症	その他
検体数		321	103	15	54	58
ポリオ	1型				1	
	2	3				
コクサッキーB群						
	1型	2				
	2	13	4	3	1	1
	3	13	2	1		1
	4	1				
	5	1	1			
エコー	11型	6	3		1	
アデノ	1型	3	2			
	2	7	2		1	
	3	1				
	5	2	1			1
	6	1				
	?	5				
インフルエンザB型		4	1			
パラインフル2型		4				
ヘルペス		1				
ムンプス						1
分離率(%)		20.9	15.5	26.7	7.4	6.9

?：型別未同定

結果と考察

疾患別ウイルス分離成績 1977年1月から12月に採取した小児科受診患児検体551件につきウイルス分離試験を行ない，91件より95株のウイルスを分離した．同一検体より同時に2種の異ったウイルスを分離した例は4例であった．分離したウイルスを疾患別に分けてまとめると表1の通りで，URI 患児検体321件中，65件より67株（20.9%）のウイルスを分離した．検出ウイルスの内訳は，コクサッキーB群が，30株（1型2株，2型13株，3型13株，4，5型1株）で検出ひん度が最も高かった．次いで，アデノ19株（1型3株，2型7株，3型1株，5型2株，6型1株，その他5株），エコー6株(全株11型)，インフルエンザ4株（全株B型），パラインフルエンザ4株（全株2型）であった．LRI 患児検体103件の検索では，15件からコクサッキーB群7株（2型4株，3型2株，5型1株），エコー3株（全株11型），アデノ5株（1，2型2株，5型1株），パラインフルエンザ1株（2型）を分離した．ウイルス検出率は，URI 患児に比べて低率（15.5%）であった．下痢，嘔吐症患児15件の検索では，コクサッキーB群4株（2型3株，3型1株）を分離した．発疹症患児54件からは，ポリオ1型，コクサッキーB群2型，エコー11型，アデノ2型各1株を分離した．インフルエンザ，パラインフルエンザの両ウイルスは呼吸器疾患患児のみから検出されたが，コクサッキーB群，エコー，アデノの各ウイルスは，各疾患材料から検出された．

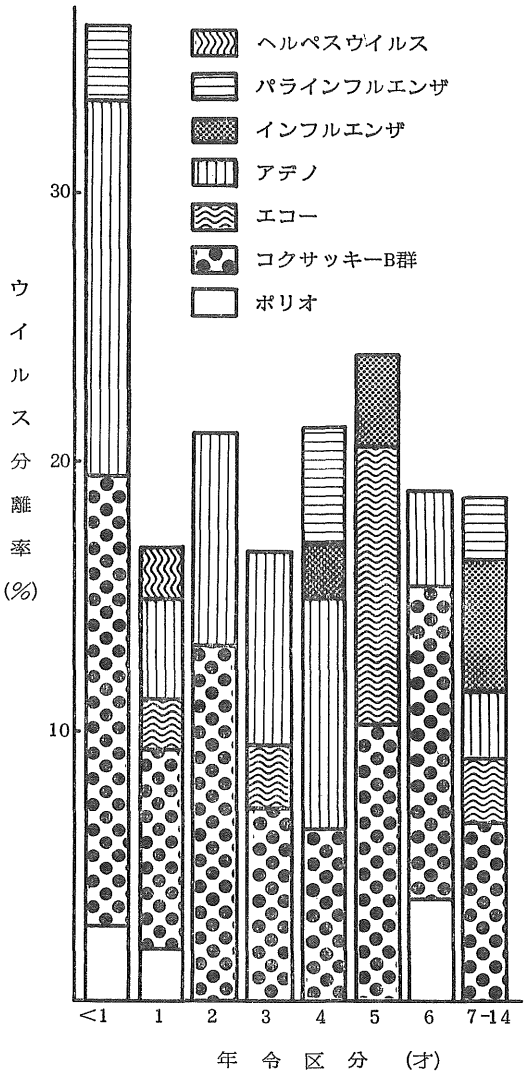


図 1. 上気道炎患児からの年齢別，ウイルス別分離率

年齢別ウイルス分離率 検査例数の多かった URI 患児について，年齢別のウイルス分離率を解析した．結果は図1の通りで最低16.6%最高36.1%の範囲にあり，最

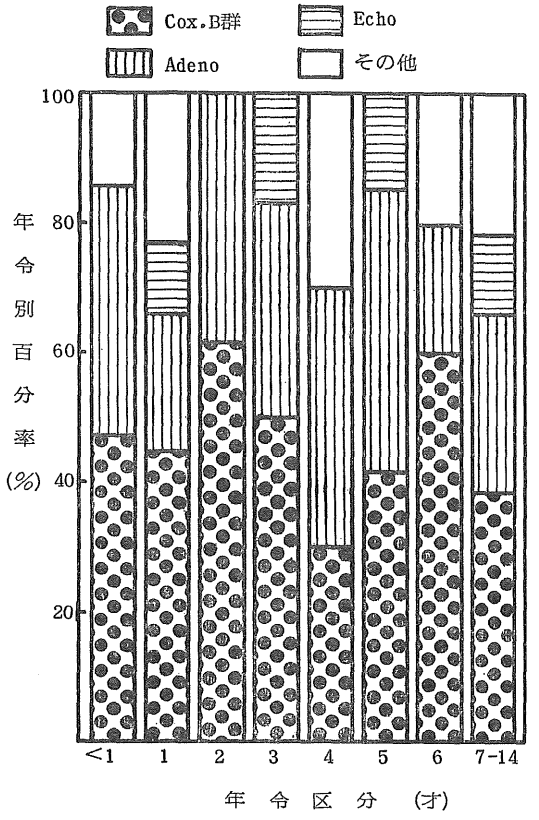


図 2.　上気道炎患児から分離したウイルスの年齢別百分率

表 2.　健康児ふん便からのウイルス分離成績
(1967—77年)

年齢	件数	Polio	Cox.B	ECHO	AD	Reo	分離率
＜1	131	3	4	2	8		13.0%
1	126	7	2	6	14	1	23.8
2	143		7	5	4	1	11.9
3	118		6	1	5	1	11.0
4	94		2		2		4.3
5	102		4	1			4.9
6— 9	363		3	1	3	1	2.2
10—13	238		1	1			0.8
合計	1,315	10	29	17	36	4	7.3

高値を示した1歳以下の乳児群を除くと他の年齢区分群においては，ほぼ一様に20%前後の値を示し，加齢に伴う変化は認められなかった．

URI 患児年齢と感染ウイルス種類との関連性を考察するために，年齢区分ごとの検出ウイルス総数に対する百分率でウイルス種類別の比率を算出すると図2の通りであった．調査した年齢範囲内では，各年齢別の感染ウイルス種類に差異を認めることはできなかった．

1967年から1977年各年次の夏季に採取した健康児ふん便からのウイルス分離成績を年齢別にまとめて表2に示した．分離ウイルスの種類を年齢別にみると，ポリオはワクチン投与年齢に，コクサッキーB群は全年齢層を通じて，アデノおよびエコーウイルスは乳児期を中心に分離される傾向があった．健康児からの年齢別ウイルス分離率は，1歳23.8%，10～13歳0.8%と加齢に伴い極端に減少した．健康児検体の採取季節に対応させる意味で7～10月発生の URI 患児に限ったウイルス分離率を算出して健康児からの分離率と対比させて図示すると図3の通りであった．年齢別のウイルス分離率を比較すると，加齢と共に明らかに減少した健康児に比べて，患児では各年齢間に極端な変動がなかった．また全体のウイルス分離率は，健康児で7.3%，患児で35.5%となった．このような事実から，特に夏から初秋における URI 患児の病因として，エンテロ，アデノウイルスの持つ意義は大きいと考えられる．また，WHO は小児におけるウイルス感染時の死因としてエンテロウイルスの占める比率が最も大きかったという調査結果を報告している[8,9]．

検出ウイルスの月別消長　患児から検出されたウイルスの種類別消長経過を図4に示した．図は，ウイルス種類別の分離株総数に対する百分率で表わした．ポリオは春秋2回の生ワクチン投与時期にのみ検出された．コクサッキーB群，およびエコーは夏から秋にかけて，アデノは初夏にやや多いが，ほぼ年間を通じて検出された．インフルエンザは冬季，パラインフルエンザは秋季に検出された．

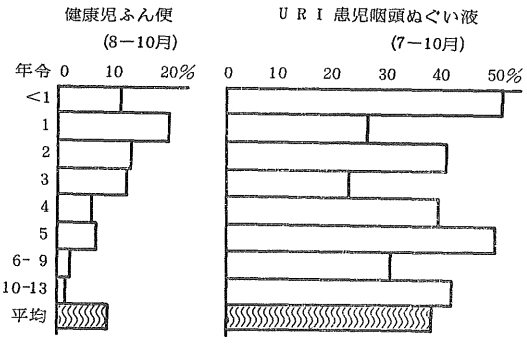


図 3.　健康児ふん便と患児咽頭ぬぐい液からの年齢別ウイルス分離率
(除，ポリオウイルス)

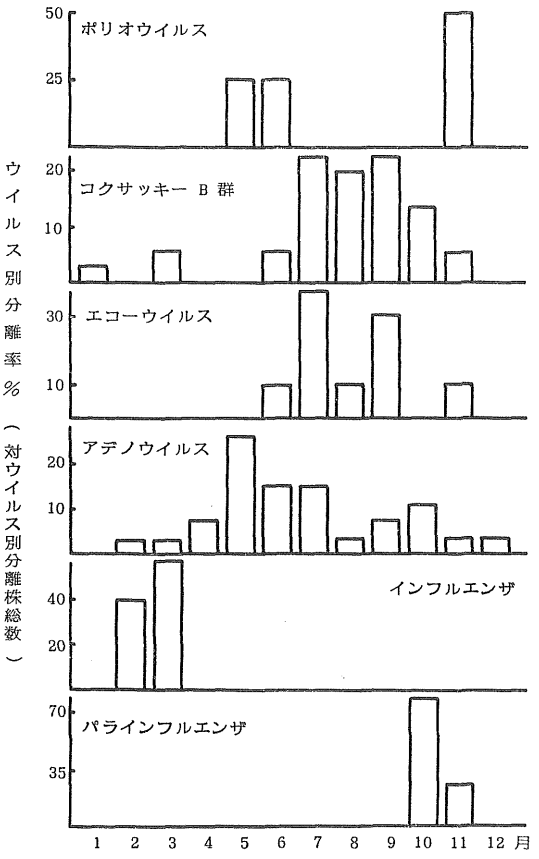


図 4. 患児検体からの検出ウイルス月別消長

培養細胞系別ウイルス分離率 ウイルス分離に供した7種類の培養細胞系の各ウイルス分離率を表3に示した．培養細胞系間のウイルス検出率に顕著な差が認められたウイルスは，エコー11型，インフルエンザB型，パラインフルエンザ2型の3種で，各ウイルスは，それぞれ，FL，クリスタルトリプシン添加 MDCK，同 Vero 355細胞にのみ感受性があった．特定種類のウイルスに限らず多くのウイルスを効率よく検出するためには，いくつかの細胞系を用いることが不可欠である．少なくとも，FL，HEp#2，MDCK，Vero 355 の4種類の細胞系は，必要であると考える．さらに，小児の疾患に重要な意義を持つといわれているライノ，RS，コクサッキーA群等のウイルス検出をカバーするために，HEL，MK，乳のみマウスもウイルス分離試験に供するべきであると考える[3]．

表 3. 細胞別ウイルス分離率

細胞系	ポリオ	コクサッキーB群	エコー	アデノ	インフルエンザ	パラインフルエンザ
FL	75.0%	66.0	100	81.0		
HeLa	50.0	31.8		73.0		
HEp#2	75.0	30.0		50.0		
Vero#462	50.0	38.6		15.4		
BGM	100	56.8		3.8		
MDCK					100	
Vero 355						100
陽性件数	4	44	10	26	5	4

（対ウイルス別陽性件数）

結　論

1977年1月から12月に採取した病院小児科受診患児の急性期咽頭ぬぐい液からウイルス分離を行ない次の結論を得た．

1) 検索を行なった全患児551名中，91名（16.5%）より計95株のウイルスを分離した．分離ウイルスは，コクサッキーB群44株（1型2株，2型22株，3型17株，4型1株，5型2株），アデノ26株（1型5株，2型10株，3型1株，5型4株，6型1株，その他の型5株），エコー10株（全株11型），インフルエンザ5株（全株B型），パラインフルエンザ4株（全株2型），ポリオ4株（1型1株，2型3株），ムンプス，ヘルペス各1株であった．4名の患児からは，同時に異った2種のウイルスを検出した．

2) 疾患別の検出ウイルスの内訳は，URI患児321名中65名よりコクサッキーB群30株，アデノ19株，エコー11型6株，インフルエンザB型4株，パラインフルエンザ2型4株等，合計67株，LRI 患児103名中15名よりコクサッキーB群7株，アデノ5株，エコー11型3株，インフルエンザB型1株，計16株，下痢嘔吐症患児15名中4名よりコクサッキーB群4株，発疹症患児54名よりポリオ，コクサッキーB群，アデノ，エコー11型各1株ずつを分離した．

3) 夏季に採取した健康児ふん便1,315件からのウイルス分離率は7.3%であったが，同一季節に採取したURI 患児咽頭ぬぐい液からの分離率は35.5%であった．健康児からのウイルス分離率は，年齢が長ずるに従って明らかに低下したが，患児からの分離率は，年齢別によって明らかな差はみられなかった．

4) ウイルス検出の季節消長は，ウイルス種類によって特色がみられた．アデノウイルスは年間を通じて分離され，コクサッキーB群，およびエコーウイルスは夏季を中心に，インフルエンザウイルスは冬季を中心に，パラインフルエンザウイルスは秋季を中心に分離される傾向があった．

（本研究の概要は日本感染症学会第52回総会1978年4月で発表した.）

文　献

1) 奥原広治，佐藤七七朗，野呂新一ほか：ウイルス，27，90，1977
2) 畠野靖子，引地一昌，中村智津子ほか：第25回日本ウイルス学会抄録，258，1977
3) 松本一郎，織笠真知子，佐藤成大ほか：第25回日本ウイルス学会抄録，259，1977
4) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二：日感染学誌，52，67，1978
5) 飛田清毅：臨床とウイルス，4，58，1976
6) 梶　哲夫，尾西　一，木村晋亮：臨床とウイルス，5，333，1977
7) 微生物検査必携，第2版，1978，日本公衆衛生協会，東京
8) Assaad, A. and I. Borecka : *Bull. WHO*, 55, 445, 1977
9) 川名林治：日本医事新報，No. 2813, 9, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 54—57, 1978

BKウイルスに関する研究　抗核抗体価とBKウイルスHI価との関係

藪内　清*, 矢野一好, 柴田タツ美*, 岩崎謙二*
田口文章**, 和田重次***, 郡司俊実***

Relationship between Antinuclear Antibody and HI Antibody against BK Virus

KIYOSHI YABUUCHI*, KAZUYOSHI YANO*, TATSUMI SHIBATA*,
KENJI IWASAKI*, FUMIAKI TAGUCHI**, SHIGETSUGU WADA***
and TOSHIMI GUNJI***

緒　言

1971年英国の Gardner らによって腎移植患者の尿から分離されたBKウイルスは，その後の血清疫学的調査から世界各地に広く浸淫していることが明らかとなった[1-3]．しかし，その感染と特定疾患との関連性は，まだ解明されていない[4-6]．Takemoto らは，BK ウイルスの DNA を接種して得られたトランスフォーム細胞を移植したハムスターの血清中に正常細胞の核成分と反応する抗核抗体（ANA）が産生されることを認めた[7]．ANA は，通常自己免疫疾患患者の血清中に検出される．特に，Shaggy 型の染色型を呈する抗 DNA 抗体は，全身性エリテマトーデス(SLE)患者に多く認められている．著者らは，自己免疫疾患とBKウイルス HI 感染との関連性を究明するため，ANA 陽性者におけるBKウイルスHI抗体保有状況を調査し，ANA 価とBKウイルスHI価との関連性を解析した．インフルエンザA型ウイルスに対するHI抗体価についても同様の検討を行なった．

材料と方法

HA抗原　BK ウイルス抗原は，英国の Gardner 博士より分与された原株を CMK 細胞に接種し，増殖させ作成した．培養系は，CPE 出現後，凍結融解し，遠心上清を抗原として用いた．インフルエンザウイルス HA 抗原は，A／足立2／57株，A／愛知2／68株ウイルスを常法に従って発育鶏卵で培養して作成した[10]．

被検血清　ANA 価の測定を目的として，1977年8月から78年2月にスペシャル・レファレンス・ラボラトリーに持ち込まれた患者血清のうち ANA 陽性血清18件，陰性血清20件を選出して被検血清とした．ANA 陽性血清の染色パターン別は，Speckled 型52件，Shaggy 型3件，Shaggy, Homogeneous 混在型31件，Shaggy, Speckled 混在型54件，Shaggy, Speckled, Hemogeneous 混在型45件であった．対照の健康者血清は，調査期間中に健康成人より採取した血清49件である．

抗核抗体価の測定　スライドグラスに塗沫したマウス肝細胞を抗原として蛍光抗体間接法により行なった[8,9]．陽性像を示した被検血清の最高希釈倍数で表現し，さらにその染色像によって Shaggy 型（周辺型），Speckled 型（斑状型），Homogeneous 型（均質型）およびその混在型に分類した．

HI抗体価の測定　BK ウイルスHI抗体価は，ヒトO型赤血球を用いて前報の記載に従って測定した[3]．インフルエンザウイルスのHI抗体価は，ニワトリ赤血球を用い，被検血清は，RDE 処理を行なって常法に従ってマイクロ法で実施した．

結果と考察

健康者血清と患者血清のBKウイルス HI抗体保有

被検血清 254 件のBKウイルスに対するHI抗体価を測定し，結果を表1に示した．健康者，ANA 陽性者，および ANA 陰性者血清の抗体保有率（≧1：16）は，それぞれ 100％，98.4％，95.0％，また，それらの総HI平均抗体価（8×2^n）は，3.80，3.89，3.60となり，直感的にも有意な差があるとは考えられなかった．さらに，これらの平均値の差を統計的に検討したが，5％以

* 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学教室
***スペシャル・レファレンス・ラボラトリー（SRL）

表 1. BKウイルスHI抗体保有状況

検体	HI価 (8×2^n)							
	0	1	2	3	4	5	6	≧7
健康者		2	7	16	7	11	3	3
抗核抗体(+)	3	4	27	47	38	40	14	12
抗核抗体(−)	1		5	3	6	2	2	1

表 2. 抗核抗体価とBKウイルスHI価の相関

抗核抗体価 (5×2^n)	BKウイルスHI価 (8×2^n)							
	0	1	2	3	4	5	6	≧7
1			3	4	3	3	1	
2		1	2	4	3	2		
3		2	3	8	4	3	2	2
4	1	1	5	8	5	11	3	
5			4	11	7	8	2	5
6	1		6	4	5	6	2	1
≧7	1		4	8	11	7	4	4

n＝182　　r＝0.164

表 3. 本実験操作上の抗核抗体染色型群別

群別	ANA染色型
1 群	Speckled 型
2 群	Shaggy 型 Shaggy, Homogeneous 混在型
3 群	Shaggy, Speckled 混在型 Shaggy, Speckled, Homogeneous 混在型

下の危険率で有意性が認められなかった.

ANA 価と BK ウイルス HI 価との相関　供試したANA 陽性血清 185 件全例について, 同一血清におけるANA 価と HI 価との対応関係を表 2 に示した. BKウイルスHI価16倍以上の血清について ANA 価との相関係数値（r）を算出すると, r＝0.16となり, 両者の間に相関性は認められなかった.

ANA 陽性血清を染色型別に表 3 の通りに分類し, Speckled 型を第 1 群, Shaggy 型, Shaggy と Homogeneous 混在型を第 2 群, Shaggy と Speckled 混在型, Shaggy と Speckled と Homogeneous 混在型を第 3 群とした. 同一血清の ANA 価とBKウイルスHI価を対応させてrを算出すると, 図 1 ～ 3 の通りになった. 第 1 群では, r＝0.45となり ANA 価が上昇すればHI価も上昇する正の相関が認められた（図 1）. 第 2 群では, r＝−0.41となり, ANA 価が高ければHI価は低くなる負の相関が認められた（図 2）. 第 3 群では, r＝

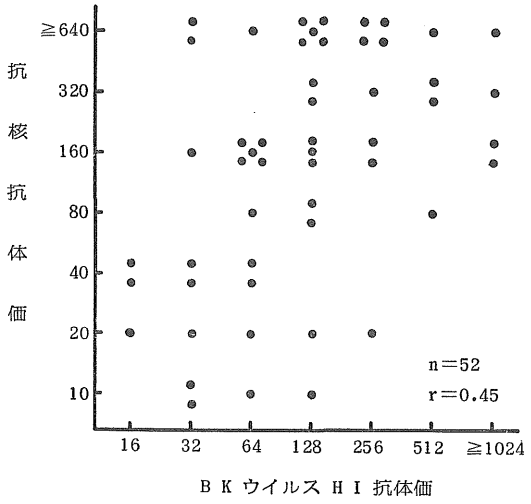


図 1. 抗核抗体価とBKウイルスHI価の相関（第 1 群）

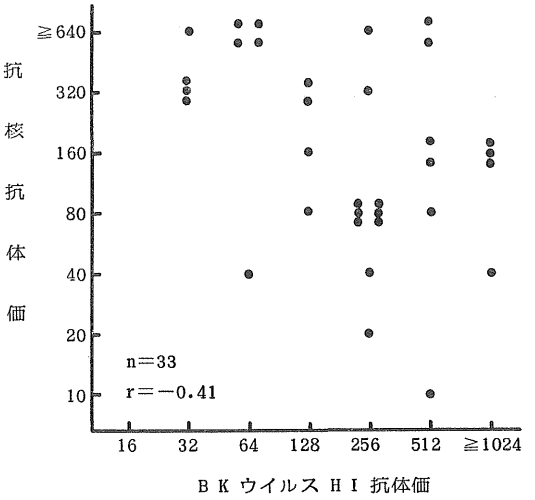


図 2. 抗核抗体価とBKウイルスHI価の相関（第 2 群）

0.12となり, 相関性は認められなかった(図 3). 算出した相関係数値の95%信頼区間は, 図 4 に示した. 第 1 群の r＝0.45は 1 %以下の危険率で, 第 2 群の r＝−0.41は 5 %以下の危険率で統計的に有意性が認められた.

ANA 価とインフルエンザウイルス HI 抗体価の相関

ANA陽性血清115件について測定したインフルエンザA／足立 2 ／57, A／愛知 2 ／68両株に対する HI 抗体価を表 4 , 5 に示した. ANA 染色群別に算出したANA価とインフルエンザウイルスHI価の相関係数値は, r＝−0.22～0.23の範囲内にあり, ANA価とインフルエンザ

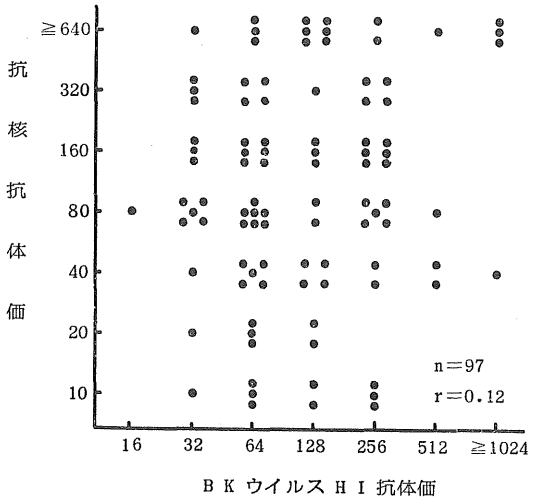


図 3. 抗核抗体価とBKウイルスHI価の相関（第3群）

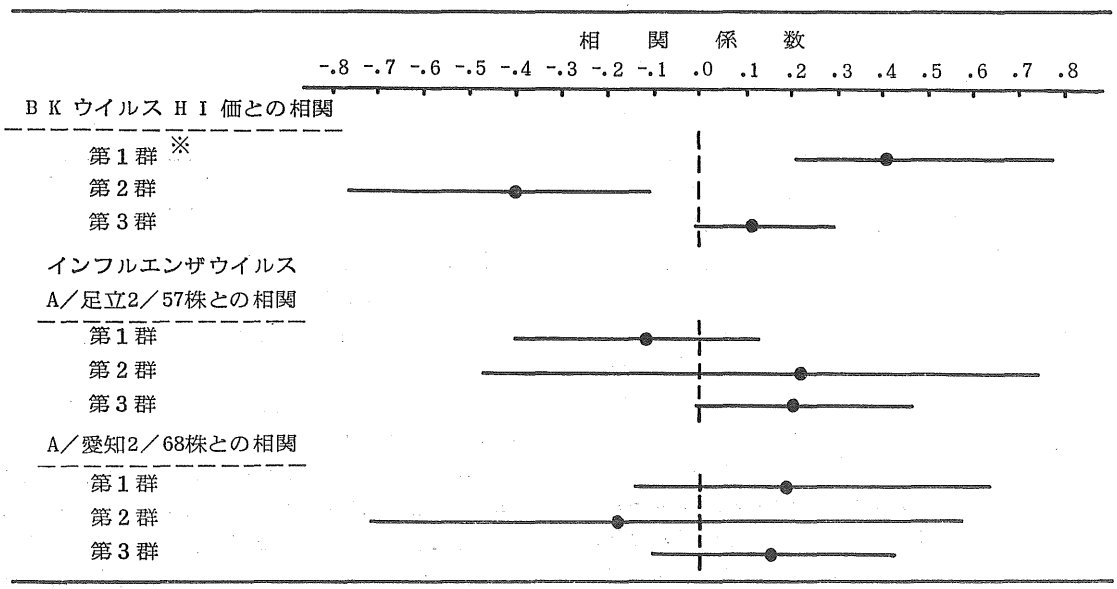
HI価との間に有意な相関性は認められなかった(図4).

一般住民間において浸淫度が普遍的であるBKウイルス，およびインフルエンザA型ウイルス（香港型）について，HI価を測定し同一血清の ANA 価と対応させると，前述のごとく，まったく異った相関性を示した．RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスの場合には，まったく相関がなく，DNA ウイルスである BK ウイルスの場合に特異な相関性を示したのは興味深い．細胞核の糖タンパク成分に対する抗体が関与するSpeckled型では，ANA 価とBKウイルス HI 価との間に正の相関，すなわち，両者の値が並行して上下する関連性が，細胞核の DNA に対する抗体の関与する Shaggy 型では，反対に負の相関，すなわち，一方の値が高ければ他方の値は低いという関連性がみられた．また，両染色型の複合型になると正負の相関が相殺された．Shaggy 型，Speckled 型，Homogeneous 型と分類したものもまったくの純粋型ではなく，実際には比較的なものである．従って，それらの混在比率関係によって，個々の血清における ANA 価と BK ウイルス HI 価との関連性は変わってくることが考えられるので，当然被検血清標本が異ってくれば，算出される相関係数値に若干の変化が出てくるであろう．以上の解析は，単一血清についての試験結果であるので，経時的に採取した同一患者の血清についての調査も行なう必要がある．

結　論

抗核抗体(ANA)陽性血清について BK ウイルス HI 抗体価，および，インフルエンザA型ウイルス HI 抗体価を測定し次の結論を得た．

1) 健康者血清49件，ANA 陽性血清 185 件，ANA 陰性血清20件の3者における BK ウイルス HI 抗体保有率（≧1：16）は，それぞれ，100%，98%，95%，平均 HI 価（8×2^n）は，3.80，3.89，3.60であり，両値とも3者の間に統計学的に有意な差は認められなかった．



※：表3のANA染色型群別による

図 4. 算出相関係数値の95%信頼区間

表 4. 抗核抗体価とインフルエンザウイルスHI価の相関

抗核抗体価 (5×2ⁿ)		インフルエンザHI価 (A/足立2/57) (8×2ⁿ)								
		<1	1	2	3	4	5	6	7	8
	1				1	1	1		1	
第1群	2						1	1	2	
	3					1	1	2	1	1
	4							3	1	
n=45	5				1		3	3	3	1
r=−0.13	6			2		1	1	1		
	≧7				1	1	3	5	1	
	1							1		
第2群	2									
	3					1				
	4		1				1	1		
n=9	5							1		
r=0.23	6								2	
	≧7						1			
	1	2				1	3	3		
第3群	2					2	3		1	
	3	1			2	3	2	2	2	
	4				1	1	3		3	1
n=61	5					2	1	4	3	
r=0.22	6			1	2			3		2
	≧7		1				2	1	2	1

群別は表3の ANA 染色型群別による

表 5. 抗核抗体価とインフルエンザウイルスHI価の相関

抗核抗体価 (5×2ⁿ)		インフルエンザHI価(A/愛知2/68) (8×2ⁿ)								
		<1	1	2	3	4	5	6	7	8
	1	1	1	1	1					
第1群	2				1		2	1		
	3		1			3	1	1		
	4			1		1	1			
n=45	5			1	2	2	5	2		
r=0.13	6		1		2					
	≧7		1	2	2	3	2		1	
	1					1				
第2群	2									
	3					1				
	4		3							
n=9	5									1
r=−0.22	6			1	1					
	≧7		1							
	1				3	3	3			
第3群	2		2	1	1	2				
	3	2	3	1	1	1	2	2		
	4			2	4	4				
n=61	5			1	1	2	4	1		
r=0.15	6		1		2		2	2	1	
	≧7		2	1		1	2	1		

群別は表3の ANA 染色型群別による

2) ANA 陽性血清185件を染色型別に従い，第1群 Speckled 型（52件），第2群 Shaggy 型，Shaggy と Homogeneous 混在型(34件)，第3群 Shaggy と Speckled 混在型，Shaggy と Speckled と Homogeneous 混在型に大別して ANA 価と BK ウイルス HI 価との相関係数値を算出したところ，群別によってきわだった特色がみられた．第1群では正の相関（r=0.45），第2群では負の相関（r=−0.41），第3群では無相関（r=0.12）がそれぞれ認められた．第1群と第2群における相関係数値は，統計的に有意であった．

3) インフルエンザA型ウイルス（A／足立2／57株，A／愛知2／68株）に対する HI 価と ANA 価との間には，各染色型を通じて明らかな相関は認められず，BKウイルスの場合にみられた群別の特色もみられなかった．

（本研究の概要は日本ウイルス学会第26回総会1978年10月で発表した．）

文　献

1) Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman, and B. Hukme : *Lancet.*, 1, 1252, 1971
2) Padgett, B. L. and D. L. Walker : *Prog. Med. Virol.*, 22, 1, 1976
3) 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, 69, 1974
4) Gardner, S. D. : *Brit. Med. J.*, 1, 77, 1973
5) Shah, K. V., R. W. Daniel, and R. Warszawski : *J. Infect. Dis.*, 128, 784, 1973
6) Portolani, M., A. Marzocchi, G. B. Brodon, and M. Laplaca : *J. Med. Microbiol.*, 7, 543, 1974
7) Takemoto, K. K. and M. A. Martin : *J. Virol.*, 17, 247, 1976
8) 奥田正治：臨床検査，18, 396, 1973
9) 河合　忠，岩田　進：臨床検査，25, 5, 1976
10) 武内安恵：微生物検査必携，第2版，183, 1978, 日本公衆衛生協会，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 58—62, 1978

都内飼育豚におけるインフルエンザウイルスＨＩ抗体保有調査（1977年２月～78年５月）

岩崎謙二*, 伊藤忠彦*, 山崎清*, 坂井冨士子*

Incidence of Antibodies against Influenza Viruses in Swine Raised in Tokyo

KENJI IWASAKI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YAMAZAKI* and FUJIKO SAKAI*

緒　言

1976年２月アメリカのニュージャージー州におけるインフルエンザ（以下「イ」と略す）流行時に，患者から豚型「イ」ウイルスに一致するウイルスが検出されたという報告[1]は大きな反響をひきおこした．過去の「イ」流行史から明らかとなったA型「イ」ウイルスの10～15年周期の抗原不連続変異株出現事実に基づいて考えると，現在，人の間で流行しているA香港型「イ」ウイルスは1968年にはじめて出現してから10年近い年月を経過しており，消滅期の近いことが予想されるので，今回検出された豚型ウイルスは次期流行ウイルスの候補として関心がもたれることとなった．

著者らは豚型「イ」ウイルスの都内侵入を監視するとともに，人社会で現在流行しているA型およびB型「イ」ウイルスの感染流行が豚社会へどのように影響しているかを知るため都内飼育豚におけるこれら各ウイルスに対するＨＩ抗体保有状況を調査した．

材料と方法

被検血清　豚血清は都内飼育豚から屠殺時に採取したものである．

「イ」ウイルスHA抗原　豚型，A型，B型ウイルスのHA抗原を実験に供した．供試ウイルス株名は表１の通りである．HA抗原としては各株ウイルス感染鶏卵漿尿液を使用した[2]．

ＨＩ試験　常法[3]に準拠してマイクロタイター法で実施した．血清中の normal inhibitor 除去の比較試験で採用した除去法については本文中に記載したが，その他の試験はすべて RDE 処理血清についてＨＩ試験を行なった．被検血清は normal inhibitor 除去の処理を行なった後，ニワトリ赤血球を添加して非特異凝集素を吸収してからＨＩ試験を行なった．

表 1.　使用ウイルス抗原株

A 型	A/SW 15/30　A/NJ 8/76	(Hsw 1 N1)
	A/新宿1/56	(H1 N1)
	A/熊本1/56　A/足立2/57	(H2 N2)
	A/東京494/72　A/東京452/73 A/東京462F/75　A/東京659/77	(H3 N2)
B 型	B/世田谷3/56　B/杉並66/68　B/大阪2/70 B/群馬1/73　B/神奈川3/76	

成績と考察

豚血清中の normal inhibitor 除去の比較試験　RDE法，KIO_4 法，RDE+KIO_4 法，トリプシン+KIO_4 法の４法における normal inhibitor 除去効果を比較検討した．RDE 法は血清１容に RDE ３容を加え，37°フラン器内で一夜反応させた後56° 30分間加温した．KIO_4 法は血清１容に対して M/100または M/50 KIO_4 を２容加え，37° で１時間反応させた後，２％グリセリンを1/10量と１容の生理食塩液を加え，56° 30分間加温した．RDE+KIO_4 法は１容の血清に２倍濃度 RDE を等量加えて，37° で一夜反応させた後，56° 30分間加温して，２容の KIO_4 を加え，37° で１時間反応後２％グリセリンを添加した．トリプシン+KIO_4 法は血清１容に等量の 4mg/m*l* トリプシン液を加え，56° 30分間反応させた後，KIO_4 処理を行なった．また対照として血清１容に生理食塩液３容を加えて37°に一夜おいたのち56°

* 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. 豚血清の処理法別HI価 (8×2^n)

豚血清 No.	処理法	ウイルス抗原株 A/SW 15/30	A/NJ 8/76	A/足立 2/57	A/東京 659/77	B/大阪 2/70	B/神奈川 3/76
21562	無処理	8	8	6	6	2	2
	RDE	7	8	1	4	—	—
	KIO_4	8	8	—※	2	2	—
	RDE・KIO_4	7	7	—	2	2	—
	トリプシン・KIO_4	7	8	3	6	3	—
21565	無処理	—	—	7	5	2	1
	RDE	—	—	—	—	—	—
	KIO_4	—	—	—	—	2	—
	RDE・KIO_4	—	—	—	—	1	—
	トリプシン・KIO_4	—	—	2	5	1	—
21568	無処理	—	—	6	5	1	1
	RDE	—	—	—	—	—	—
	KIO_4	—	—	—	—	4	—
	RDE・KIO_4	—	—	—	—	—	—
	トリプシン・KIO_4	—	—	2	5	1	—
21575	無処理	7	6	6	6	2	2
	RDE	6	6	—	3	—	—
	KIO_4	7	6	—	2	5	—
	RDE・KIO_4	6	6	—	3	—	—
	トリプシン・KIO_4	6	6	2	6	1	—
21981	無処理	3	2	7	5	2	2
	RDE	3	2	1	3	—	—
	KIO_4	2	2	—	1	1	—
	RDE・KIO_4	2	2	1	3	1	—
	トリプシン・KIO_4	2	2	3	6	4	—

※—：$<8\times2^1$

30分間加温したものを無処理血清とした．35例の豚血清について比較実験を行なったが，そのうちの10例の成績を抽出して表2と3に示した．表2には M/100 KIO_4 処理の事例を，表3には M/50 KIO_4 処理の事例を示した．豚型の A/SW 15/30, A/NJ 8/76 両株に対するHI価は無処理対照と各処理群との間に全く差がみられず，normal inhibitor の影響はなかった．他の人由来の各株では，様々な変化を示した．A/足立2/57, A/東京659/77 両株に対する normal inhibitor はトリプシン＋KIO_4 処理では除去され難かった．B型ウイルスに対する normal inhibitor の除去効果はウイルス株によって差がみられたばかりでなく，B/大阪2/70, B/杉並66/68, B/世田谷3/56各株に対しては normal inhibitor の影響が KIO_4 処理によって増強されることが観察された．この現象は M/100 KIO_4 よりも M/50 KIO_4 の処理時により強くあらわれた．無処理時のHI価に比較して最高64倍の増強がみられた例もあった．以上の実験結果から被検血清の normal inhibitor 除去は RDE 法によるのが最適と判断した．

都内飼育豚の「イ」ウイルスHI抗体保有調査成績

1977年2月～78年5月までに採取した都内飼育豚血清計786例について行なった「イ」ウイルスHI試験結果を表4と5に示した．表4には A/NJ 8/76株，表5には A/東京659/77と B/神奈川3/76両株に対するHI抗体保有状況を採血月別の抗体価分布にまとめて示した．A/NJ 8/76株に対する抗体は77年2月に採取した豚血清50例の検索では全く認められなかったが，3月に採取した血清50例中3例に，4月に採取した血清49例では43例に

表 3. 豚血清の処理法別HI価（8×2^n）

豚血清 No.	処理法	ウイルス抗原株 A/SW 15/30	A/新宿 1/56	A/足立 2/57	A/熊本 1/65	A/東京 494/72	A/東京 452/73	A/東京 462F/75	B/世田谷 3/56	B/杉並 66/68	B/大阪 2/70	B/群馬 1/73
20406	無処理	—※	—	5	3	4	3	2	3	1	1	2
	RDE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KIO_4	—	—	—	—	—	—	—	2	—	4	—
	RDE・KIO_4	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	—
20407	無処理	—	—	5	3	4	3	2	3	2	2	2
	RDE	—	—	1	1	1	—	1	1	1	1	1
	KIO_4	—	—	—	—	—	—	—	5	5	7	—
	RDE・KIO_4	—	—	—	—	—	—	—	1	—	2	—
20409	無処理	—	1	5	1	3	2	2	2	1	1	1
	RDE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KIO_4	—	—	—	—	—	—	—	4	3	7	—
	RDE・KIO_4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20410	無処理	—	1	5	3	5	3	3	4	2	2	2
	RDE	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	KIO_4	—	—	—	—	1	—	—	3	3	6	1
	RDE・KIO_4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20412	無処理	—	1	5	3	4	3	3	4	2	2	4
	RDE	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—
	KIO_4	—	—	—	—	1	—	—	4	4	7	1
	RDE・KIO_4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

※—：$<8\times2^1$

認めた．以後調査月間に多少の差はあったが，かなりの高率でA/NJ 8/76株に対する抗体は検出された．この調査結果は，77年2月以前には都内飼育豚の間に全く存在しなかった豚型「イ」ウイルスが3月以降侵入し，その感染流行が急拡大されたことを示唆している．A/東京659/77，B/神奈川3/76両株に対する抗体保有状況はA/NJ 8/76株に比べると明らかに低く，とくにB/神奈川3/76株で顕著であった．この調査期間中に，77年初頭にはB型「イ」ウイルスの，また78年初頭にはA型「イ」ウイルスの感染流行が都民の間で発生したにもかかわらず[4,5]，都内飼育豚の両株ウイルスに対する抗体保有状況は全期間ほとんど変化を示さなかった．

同一月日に採血した豚血清を飼育場別に分類し，A/NJ 8/76, A/東京659/77両株に対するHI抗体保有状況を表6に示した．両株に対する抗体保有状況は飼育場によって，同一月日採取血清でも，ある飼育場では70%に$\geqq8\times2^3$のHI価がみられるのに他の飼育場ではすべて$<8\times2^1$であるというように極端な差がみられた．このような観察結果は個々の飼育場における豚集団の閉鎖性（一つの飼育場の豚は他の飼育場の豚と屠殺されるまで接触がない）に基づくものと考える．接触一飛沫を主感染経路とする「イ」ウイルスの人社会における感染流行は前述の飼育条件では豚集団には反映し難いことを示唆している．

結　論

1977年2月～78年5月までに採取した都内飼育豚血清786例について，豚型およびA型，B型「イ」ウイルスに対するHI抗体保有を調査して次の結論を得た．

1. RDE法，KIO_4法，RDE+KIO_4法，トリプシン+KIO_4法を応用して，豚血清中のnormal inhibitor除去の比較試験を行なった．豚型ウイルスに対するHI抗体価は処理法による差がみられなかったが，株によってはKIO_4処理を行なうとHI抗体価の上昇を認めるものがあった．結論的にはRDE法が最適と考えられた．

2. 都内飼育豚血清におけるA/NJ 8/76株抗体保有状況の逐月調査結果から，1977年2月以前は全く存在しなかった豚型「イ」ウイルスが3月から侵入しはじめ，

表 4. 1977年2月～1978年5月におけると場豚の抗体保有状況

採血年月日	検査頭数	A/NJ 8/76 株 HI 抗体価 (8×2ⁿ) 0※	1	2	3	4	5	6	7	8
1977. 2. 23	50	50								
3. 23	50	47	2					1		
4. 27	49	6			4	4	17	17	1	
5. 25	50	31				2	9	6		2
6. 22	50	4	1		7	19	8	10	1	
7. 27	48	9		4		13	12	5	3	2
8. 31	49	22	1	3	7	8	3	5		
9. 21	48	9	10	10	7	3	7	2		
10. 26	50	25	4	4	4	6	4	1	2	
11. 16	50	4	2	8	9	12	10	5		
12. 14	49	10	10	7	5	4	6	4	3	
1978. 1. 25	50	22	2		7	7	7	4	1	
2. 22	50	15	6	6	7	3	11	1	1	
3. 22	45	10	1	1	2	7	10	10	4	
4. 19	48		1	4	6	12	18	7		
5. 17	50		1	2	5	12	18	7	3	2
合計	786	264	41	49	70	112	140	85	19	6

※0 : $<8\times2^1$

表 5. 1977年2月～1978年5月におけると場豚の抗体保有状況

採血年月日	検査頭数	A/東京659/77株 HI 抗体価 (8×2ⁿ) 0※	1	2	3	4	B/神奈川3/76株 0	1	2
1977. 2. 23	19	7	9	2	1		17	2	
3. 23	50	5	27	15	3		41	8	1
4. 27	49	6	30	12	1		40	9	
5. 25	48	14	28	3	2	1	47	1	
6. 22	50	6	27	14	2	1	45	5	
7. 27	48	27	13	6	2		45	3	
8. 31	49	21	22	5	1		47	2	
9. 21	48	12	24	11	1		45	3	
10. 26	50	3	22	21	2	2	37	13	
11. 16	50	7	32	11			41	9	
12. 14	49	4	31	12	2		38	18	
1978. 1. 25	50	3	32	14	1		41	9	
2. 22	50	11	32	5	2		46	4	
3. 22	45	7	34	4			38	7	
4. 19	48	4	34	10			33	15	
5. 17	49	4	24	14	6	1	37	12	
合計	752	141	421	159	26	5	631	120	1

※0 : $<8\times2^1$

表 6. 飼育場別と場豚の抗体保有状況

年月日	飼育場	検査頭数	A/NJ8/76株 HI抗体価 (8×2ⁿ)									A/東京659/77株 HI抗体価 (8×2ⁿ)				
			0※	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4
1977年7月27日	立川(荒井)	9	1					2	1	3	2	3	2	3	1	
	〃 (田辺)	5	5									5				
	〃 (井上)	5	3				1	1					4	1		
	瑞穂	6			1		1	3	1			6				
	武蔵村山	23			3		11	6	3			13	7	2	1	
	小計	48	9		4		13	12	5	3	2	27	13	6	2	
1977年8月31日	立川(荒井)	10	3			1	2	1	3			4	6			
	〃 (田辺)	7	7									7				
	〃 (井上)	5	5									2	2	1		
	瑞穂(古川)	22	7	1	3	5	5	1				7	10	4	1	
	武蔵村山	5				1	1	1	2			1	4			
	小計	49	22	1	3	7	8	3	5			21	22	5	1	

※0：$<8\times2^1$

急速にその感染流行が拡大したことが明らかとなった．

3. 豚血清における抗体保有調査結果から，豚の抗体保有状況に人社会におけるA型，B型「イ」ウイルス感染流行実状は直接には反映しないものと考えられた．

文献

1) *Morbidity and Mortality Weekly Report* : 25, 21, 1976

2) 岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子ほか：東京衛研年報，**27**-1, 74, 1976

3) 国立予防衛生研究所学友会：ウイルス実験学総論，219, 1973, 丸善

4) 岩崎謙二，伊藤忠彦，山崎 清：東京衛研年報，**29**-1, 63, 1978

5) 坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎 清，岩崎謙二：東京衛研年報，**29**-1, 70, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 63—69, 1978

1976年4月～77年3月の東京都内インフルエンザ流行検索成績

岩崎謙二*, 伊藤忠彦*, 山崎　清*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo, 1976—1977

KENJI IWASAKI*, TADAHIKO ITO* and KIYOSHI YAMAZAKI*

During the period from April 1976 to February 1977, 168 throat washings of patients with acute respiratory disease were examined for the presence of influenza, parainfluenza and adeno viruses, and 145 paired sera of them were examined on their antibody responses against these viruses. In addition to this, the incidence of HI antibodies in healthy inhabitants in Tokyo against several known influenza virus strains was also studied for clarifing degree of dissemination of the viruses in the community. Results obtained are summarized as follows : 1) Throughout the survey period, a total of 35 strains of B type influenza virus was isolated from the patients involved in the 15 outbreaks. 2) HI test made on 145 paired sera of patients revealed that 83 individuals who were involved in the 2 outbreaks in April and June and in the 20 outbreaks from December 1976 to February 1977, were found to be suffered from the infection of B type influenza virus. 3) Virological and serological investigations made on the specimens revealed that there was no infections due to A type influenza, parainfluenza and adeno viruses. 4) From the results of cross HI test made on the newly isolated and the laboratory stock strains of B type influenza viruses, it was found that antigenic variations have occurred in the newly isolated viruses in considerable degree. Antigenic variations in the virus were also confirmed from the HI test for antibody response of the patients. 5) On observation on monthly incidence of the antibody in healthy subjects, it was assumed that the epidemic of B type influenza virus began in November 1976 and lasted till March 1977.

緒　　言

1976年11月よりはじまった東京都内のかぜ患者流行状況を，集団かぜ患者発生のため実施した都内公立小中学校における学級・学校閉鎖数を指標に推測すると，今次流行の規模はかなり大きく，77年2月上旬を流行ピークとし3月末まで続いたと考えられる．

流行時に採取した患者材料について行なった病因検索試験の結果から，今次流行の主病因ウイルスはB型インフルエンザウイルスであったことが判明した．冬期になるとほとんど毎年，インフルエンザウイルスを病因としたかぜ患者発生流行はおこっているが，B型ウイルス感染流行は1974年[1]以来2年ぶりのものであった．

1975年11月～76年3月のA香港型ウイルス感染流行[2]が終息した直後の76年4月～6月に，76年11月～77年3月の本格的B型ウイルス感染流行に先行してB型ウイルス感染の小流行が散発していたことも確認されている[3]．

これら流行時にかぜ患者から採取した検体について行なった病因ウイルス検索試験結果，新しく検出したB型インフルエンザウイルス株の抗原分析試験成績および今次流行の前後を通じて採取した一般都民血清について行なったA型・B型インフルエンザウイルスHI抗体保有逐月変遷調査成績を述べる．

実験材料と方法

ウイルス分離試験　急性期に採取した患者うがい液を検体として，下記の各ウイルスを検索対象にウイルス分離試験を行なった．インフルエンザウイルス分離はふ化

* 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

鶏卵を，アデノ，パラインフルエンザ，エンテロの各ウイルス分離はFL, HeLa, Hep 2, Vero, CMKの各種細胞培養を使用して行なった．検体処理，ウイルス分離培養および分離ウイルス同定は既報の記載[4]に従って実施した．

血清試験　患者血清は急性期と回復期に採取したものをペアにして，A型・B型インフルエンザウイルスS抗原，アデノウイルスS抗原を用いた補体結合反応試験ならびにA型・B型インフルエンザウイルスHA抗原，1～3型パラインフルエンザウイルスHA抗原を用いたHI試験を行なって病因ウイルスを究明した．

都内居住の健康者から採取した血清については，A型・B型インフルエンザウイルスHA抗原を用いたHI試験を行ない，採血時月別の集計成績から一般都民における抗体保有状況の逐月変遷経過を解析した．

補体結合反応試験およびHI試験は常法[5]に準拠して微量法で実施した．

B型インフルエンザウイルスの抗原分析　B型インフルエンザウイルスの研究室保存株および新鮮分離株について交差HI試験を行ない，得られたHI価を基礎にして供試ウイルス株間のHA抗原類似性を数量的に検討した．解析方法の詳細は前報[6]の記載どおりである．供試ウイルス株間の抗原類似度は実測したいくつかのHI価を基にし一定数式により算出した平均距離係数値で定量的に表現した．平均距離係数値の小さな，すなわち類似度の高い間柄のウイルス株を順次まとめて，より大きな群を作ってゆく連続群形成法を応用して整理すると供試ウイルス株相互のHA抗原類似関係が系統的に数量的に明らかとなる．

実験成績と考察

かぜ患者材料における病因ウイルス検索成績　1976年4月～77年2月までに急性期うがい液，急性期・回復期ペア血清を採取して病因ウイルス検索を行なったかぜ患者168名における集団単位の検索結果を表1に示した．

ウイルス分離試験および血清試験の結果からB型インフルエンザウイルス感染が確認できたのは，35集団の中で22集団であった．A型インフルエンザ，アデノ，パラインフルエンザ各ウイルスの感染が確認できた集団はなかった．B型インフルエンザウイルス感染が確認できた22集団の中で，各1集団における患者発生は1976年4月と6月に，他の20集団では76年12月～77年2月におこった．

35集団の患者から採取できた急性期うがい液168件について，ウイルス分離試験を行ない，15集団36名の患者うがい液からB型インフルエンザウイルスを分離同定した．A型インフルエンザ，パラインフルエンザ，アデノ，エンテロの各ウイルスは全く検出できなかった．

145名の患者ペア血清について行なった血清試験の結果から，22集団89名の患者血清においてB型インフルエンザウイルス抗原に対する有意抗体上昇（8倍以上）を認め，同ウイルス感染のあったことを確認した．145名の患者の中には，A型インフルエンザ，1～3型パラインフルエンザ，アデノ各ウイルス抗原に対する有意抗体上昇を示したものがなかった．

表 1.　1976年4月～77年2月における都内発生かぜ集団の病因ウイルス検索成績

検索時期 年 月 旬	検索集団数	インフルエンザウイルス A型感染集団	インフルエンザウイルス B型感染集団	アデノウイルス感染集団	パラインフルエンザウイルス感染集団
1976 4 中	1	0	1	0	0
下	1	0	0	0	0
6 上	1	0	0	0	0
下	1	0	1	0	0
10 上	1	0	0	0	0
11 上	1	0	0	0	0
中	1	0	0	0	0
12 上	1	0	0	0	0
中	6	0	2	0	0
1977 1 中	7	0	6	0	0
下	11	0	9	0	0
2 上	3	0	3	0	0
計	35	0	22	0	0

感染はウイルス分離，急性・回復期ペア血清における抗体価有意上昇をもって判定した．

表 2. 1976～77年のB型インフルエンザ患者83名の急性期回復期ペア血清におけるA・B両型ウイルス抗原に対するHI抗体保有率と平均抗体価

抗原	血清種類	抗体保有率	平均抗体価	標準偏差
A／東京 494／72	急性期	100.0%	6.1	1.3
	回復期	100.0	6.0	1.2
A／東京 452／73	急性期	100.0	6.8	1.4
	回復期	100.0	6.8	1.4
A／東京 462F／75	急性期	100.0	4.8	1.8
	回復期	100.0	4.8	1.8
B／東京 63／73	急性期	69.9	3.2	1.4
	回復期	95.2	4.9	1.8
B／群馬 1／73	急性期	91.6	3.5	1.5
	回復期	100.0	6.4	2.0
B／神奈川 3／76	急性期	78.3	2.2	1.2
	回復期	98.8	5.7	1.4

平均抗体価，標準偏差値は 8×2^n 値で示した．
抗体保有率はHI価 8×2^1 以上について算出した．

表 3. 1976～77年におけるインフルエンザ患者83名のペア血清インフルエンザB型ウイルスHI試験成績

急性期抗体価	回復期抗体価										
	＜1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	B／東京 63／73										
＜1	4	1	8	2	8	2					
1				2	4	3					
2				1	1	1	2	2		1	
3					4	4	5	2		1	
4					2	7	3	3		1	
5							3	3	1		
6							1	1			
	B／群馬 1／73										
＜1		2		1	1		1	1		1	
1		1			3	1	1	4			
2					1	3	1			4	1
3					1	4	5	3	1	1	
4					2	2	7	3	1	3	1
5						1	6	3	4	1	1
6							1	2	1		1
7									1		
	B／神奈川 3／76										
＜1	1		3		1	4	6	2	1		
1				1	2	5	7	5	3		
2				1	5	4	7	2	2		
3						5	3	3	1		
4							2	4			
5							2	1			

表中のHI抗体価は 8×2^n 値で示した．

ＨＩ試験検索によってＢ型インフルエンザウイルス感染が確認できた患者83名のペア血清について行なったＨＩ試験結果から，供試ウイルス抗原株別の平均ＨＩ抗体価および標準偏差値を算出して表２に示した．

Ａ型ウイルス３株抗原について，急性期と回復期血清の平均抗体価を対比させ，両者の差について統計学的検討を行なったが，いずれの差も５％以下の危険率レベルでは有意でなかった．一方，Ｂ型ウイルス３株各抗原での差はすべて１％の危険率レベルで有意であった．

Ｂ型ウイルス３株各抗原に対するＨＩ抗体価を患者83名の血清について急性期と回復期の対応で整理すると表３のようになった．

回復期血清の抗体価が同一人の急性期血清抗体価に較べて，８倍以上の有意抗体上昇を示す比率は，使用抗原のウイルス株によって変化した．Ｂ型ウイルス３株抗原を用いたＨＩ試験結果の判定でＢ型ウイルス感染が確認できた今次流行時の患者83名について，ウイルス株別の有意抗体上昇をみると，東京63/73株では38名(45.8%)，群馬1/73株では48名（57.8%），神奈川3/76株では62名（74.7%）であった．

約1/4の患者において，今次流行ウイルスと考えられるＢ/神奈川3/76株抗原での有意抗体上昇で認められず非流行ウイルスと考えられるＢ/群馬1/73株またはＢ/東京63/73株抗原で有意抗体上昇を認めた．

これら患者の中には，急性期に採取したうがい液からＢ/神奈川3/76株と類似抗原のウイルスを検出したにもかかわらず，急性期・回復期ペア血清の抗体価比較では，神奈川3/76株抗原に対する抗体の有意上昇がなく，検出ウイルスとは明らかに抗原性状が異った群馬1/73株ないし東京63/73株抗原に対する抗体の有意上昇を示した例があった．

このような現象は，患者が過去において受けた感染ウイルスあるいは接種ワクチンに含まれたウイルスの抗原構造を反映した既往歴反応の結果に関係があると考えられる．

表３に示した成績について，使用抗原ウイルス株別の急性期と回復期血清における抗体価の相関係数値を算出すると，東京63/73株で0.706，群馬1/73株で0.384，神奈川3/76株で0.425となり，強い正の相関性は東京63/73株でのみ観察された．

患者83名の回復期血清における３株ウイルス抗原に対するＨＩ抗体価相互の相関係数値を算出すると，強い正の相関性は群馬1/73株と神奈川3/76株との間で認められた．このような事象は今次流行ウイルス神奈川3/76株のＨＡ抗原構造が東京63/73株よりは群馬1/73株により近似していることを示唆している．

Ｂ型インフルエンザウイルスのＨＡ抗原分析成績　今次流行時に採取した168名の急性期患者うがい液から36株のＢ型インフルエンザウイルスを分離同定した．研究室保存のＢ型インフルエンザウイルス，東京63/73，群馬1/73，岐阜2/73，東京53/73，神奈川3/76と，新鮮分離のＢ型インフルエンザウイルス，東京709/76，東京9/77各株抗原に対する高度免疫ニワトリ血清を用いて行なったＨＩ試験の結果では，新鮮分離ウイルス36株相互の間に抗原構造上の差を認めることができなかった．

今次流行時に検出したＢ型ウイルスのＨＡ抗原構造を，過去の流行Ｂ型ウイルスとの関連で検討する目的で，1968～1977年の流行Ｂ型ウイルス14株，今次流行Ｂ型ウイルス４株のＨＡ抗原および同株高度免疫ニワトリ血清を用いて行なった交差ＨＩ試験の結果は表４に示した．

13の供試血清で測定されたＨＩ抗体価の値を基礎にして算出された供試ウイルス株相互の平均距離係数値を指標にＨＡ抗原類似度を定量的に判定した．距離係数値の最も小さい関連株を順次まとめ，より大きな群を作ってゆく連続群形成法を応用して，供試ウイルス18株における相互のＨＡ抗原類似関係を整理すると図１のようになった．

供試ウイルス株は大略３群に分けることができるが，各群間に明確な線引きをすることは難しい．これら群別と供試ウイルス株の分離年次との関係は複雑であって，1973年流行時の分離株などは３群にまたがって分布している．概括的にみれば，1971年以前の流行時における主流行ウイルスは第１群に，1973年流行時の主流行ウイルスは第２群に，今次流行時の主流行ウイルスは第３群に分類することができる．

今次流行ウイルス株のＨＡ抗原構造が第１群ウイルスよりも第２群ウイルスにより近似していること，東京717/74株のように群別し難いウイルス株の存在すること，同一群内のウイルスであってもウイルス株別によって抗原構造に多少の変化のあることが図１から理解できる．

今次流行に先立って行なわれた予防接種に使用されたインフルエンザワクチンに含まれたＢ型ウイルス抗原は，第２群に属する岐阜2/73株であり，今次流行ウイルスとは抗原的に大きな差があった．

1976年６月～77年３月における一般都民のインフルエンザウイルスＨＩ抗体保有調査　一般都民から，1976年６月～77年３月にかけて逐月的に採集した単一標本血清1,229件について，インフルエンザウイルス，Ａ/熊本22

表 4. 1968～77年B型インフルエンザウイルス流行時の分離株19株の交差HI試験成績

No.	179	204	197	223	222	230	232	242	228	260	262	259	243	244	306		307	308	309	310	311	312	313	314
抗血清	鹿児島	大阪	東京	東京	東京	東京	東京	東京	群馬	岐阜	岐阜	山形	東京	東京	神奈川	神奈川	東京	東京	東京	東京	東京	東京	東京	東京
抗原	1／68	2／70	1065／71	63／73	53／73	69／73	144／73	650／73	1／73	1／73	2／73	1／73	717／74	717／74	1／76	3／76	709／76	709／76	9／77	9／77	15／77	15／77	77／77	77／77
鹿児島1/68	0	−2	−1	0	−6	−6	−6	−6	−6	−6	−6	−5	−6	−6	−6	−3	−5	−3	−6	−6	−6	−4	−6	−6
大阪2/70	−1	0	0	0	−6	−6	−6	−6	−6	−3	−6	−6	−6	−6	−6	−5	−5	−4	−3	−6	−6	−6	−6	−4
東京1065/71	−1	−2	0	0	−6	−6	−6	−6	−6	−3	−6	−5	−6	−6	−6	−5	−4	−3	−3	−6	−6	−6	−6	−4
東京63/73	−1	−3	0	0	−6	−6	−6	−6	−6	−4	−6	−5	−6	−6	−6	−4	−4	−3	−3	−6	−5	−6	−6	−3
東京53/73	−6	−6	−6	−6	0	−1	−1	−1	−2	−1	−3	0	−1	−3	0	0	0	0	−2	−1	0	0	−4	−3
東京69/73	−6	−6	−6	−4	−1	0	−3	−3	−1	−1	−2	−1	−3	−6	−6	−5	−4	−2	−4	−5	−4	−3	−4	−4
東京144/73	−6	−6	−6	−3	0	−1	0	0	−3	−1	−4	−1	0	−1	−1	0	0	0	−1	0	−2	−1	−4	−3
東京650/73	−6	−6	−6	−3	−1	0	0	0	−3	−2	−5	−1	−1	−2	−2	−1	0	0	−1	−1	−2	−2	−5	−4
群馬1/73	−6	−6	−6	−3	−1	0	−1	−2	0	0	0	1	−2	−5	−6	−5	−2	−2	−4	−4	−4	−2	−3	−3
岐阜1/73	−6	−6	−6	−3	−1	0	−2	−2	0	0	0	0	−3	−5	−6	−4	−3	−2	−4	−4	−4	−3	−3	−3
岐阜2/73	−6	−6	−6	−3	−1	0	−2	−2	−1	0	0	0	−3	−6	−6	−4	−4	−2	−4	−4	−4	−3	−4	−3
山形1/73	−6	−6	−6	−6	−1	−1	−1	−2	−2	−1	−2	0	−2	−5	−2	−2	−1	−1	−2	−3	−1	−1	−5	−4
東京717/74	−5	−5	−2	0	−1	−3	−1	0	−2	0	−1	−1	0	0	0	0	0	0	−1	−1	−1	0	−1	0
神奈川1/76	−6	−6	−6	−3	−1	−5	−2	−2	−5	−2	−6	−1	−2	−3	0	0	−1	0	−1	−1	0	0	−2	−2
神奈川3/76	−6	−6	−6	−6	−2	−5	−3	−3	−6	−2	−6	−2	−3	−3	−2	0	−1	−1	−1	−2	−2	−2	−3	−3
東京709/76	−6	−6	−6	−6	−1	−5	−1	−2	−6	−3	−6	−2	−3	−3	0	0	0	0	0	−2	−1	−1	−3	−2
東京9/77	−6	−6	−6	−3	−1	−4	0	−1	−6	−3	−6	−2	0	−1	0	0	0	0	0	0	−1	0	−1	−2
東京15/77	−6	−6	−6	−2	−1	−5	−2	−2	−5	−2	−6	−1	−3	−3	−1	0	0	0	0	−1	0	0	−2	−2
東京77/77	−6	−5	−6	−2	−3	−2	−2	−2	−3	−1	−2	−1	−3	−5	−2	−1	0	0	1	0	−2	0	0	0

表中の抗体価は対応株値に対する比（相対HI価，2の乗数値）で示してある．
−6には−6および＜−6を含む．

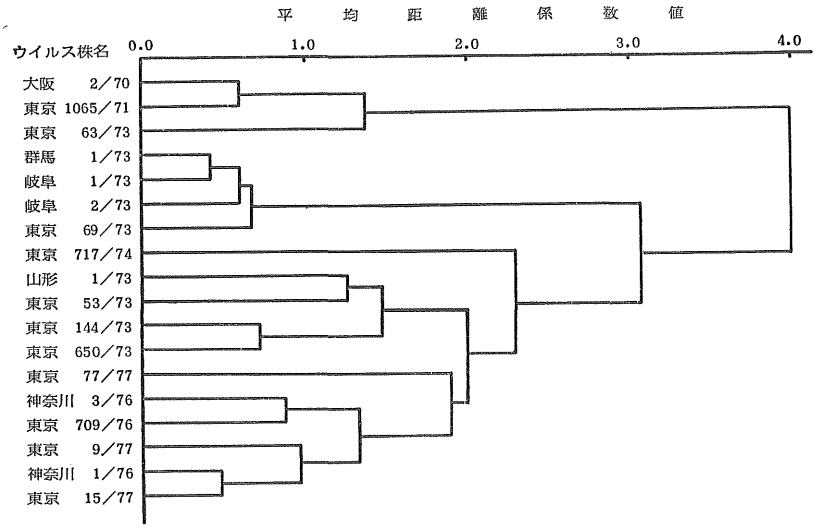


図 1. B型インフルエンザウイルス18株のHA抗原類似関係図

表 5. 1976年6月～77年3月の一般都民におけるインフルエンザウイルスHI抗体保有

年	月	HI抗体価分布											計
		<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		A／熊本 22／76											
1976	6	70	20	12	6	4		1					113
	7	64	12	10	2	1							89
	8	45	25	6	3	1							80
	9	94	35	26	8	8	1						172
	10	86	29	13	11	4							143
	11	76	37	26	14	10	5	1					169
	12	56	32	19	11	6	1	1	1				127
1977	1	82	28	16	10	5	3	1	1				146
	2	34	31	19	9	4	1		1				99
	3	23	23	23	13	7	1	1					91
		B／岐阜 2／73											
1976	6	84	14	11	2	1	1						113
	7	57	13	9	7	1	1	1					89
	8	55	15	6	3	1							80
	9	83	47	29	4	8	1						172
	10	86	21	25	7	3		1					143
	11	71	29	34	17	10	3	3	2				169
	12	47	20	19	18	11	7	4	1				127
1977	1	55	30	21	13	10	11	5	1				146
	2	19	30	18	16	5	7	3		1			99
	3	12	21	15	16	13	8	3	2	1			91
		B／神奈川 1／76											
1976	6	103	7	2		1							113
	7	77	7	2	2	1							89
	8	69	8	3									80
	9	126	32	11	2	1							172
	10	108	20	12	3								143
	11	96	30	21	11	8	1	1	1				169
	12	65	29	12	13	7	1						127
1977	1	86	27	12	8	5	5	1	2				146
	2	45	24	13	8	6	2		1				99
	3	21	27	12	11	9	7	3	1				91

HI抗体価は 8×2^n 値で示した.

/76, B/岐阜2/73, B/神奈川3/76各株のHA抗原を用いて行なったHI抗体保有調査の集計成績を表5に示した.

この調査成績から抗原ウイルス株別に, 各月のHI抗体保有率（HI抗体価16以上）と平均HI抗体価（HI抗体価16以上について）を算出して, 逐月経過をたどると, 両値ともにA/熊本22/76株では比較的変動は少なかったが, B/群馬1/73, B/神奈川3/76両株では76年11月にまず1次の上昇が, 次いで77年2月～3月にかけて2次の上昇が認められた. B型ウイルス抗原に対するHI抗体保有率および平均抗体価の1次上昇は今次流行の本格的開始時期を, また77年2月～3月における2次上昇は流行規模の急拡大時期を反映したと考えられる.

流行開始前におけるB/神奈川3/76株抗原に対する一般都民の抗体保有状況がきわめて低かったことが今次流行拡大の大きな要因であった.

結　論

1976年4月～77年までの間に, 都内で発生した35集団

のかぜ患者について，インフルエンザ，パラインフルエンザ，アデノ，エンテロの各ウイルスを検索対象とした病因ウイルス究明を行なった．また一般都民を対象としたインフルエンザウイルス血中抗体保有状況の逐月調査も行なった．検索・調査の結果は次の通りである．

1） 患者168名から急性期に採取したうがい液について，ふ化鶏卵および7種類の培養細胞を用い，ウイルス分離試験を行なった結果，36名の患者うがい液よりB型インフルエンザウイルスを分離同定した．A型インフルエンザ，パラインフルエンザ，アデノ，エンテロの各ウイルスは検出できなかった．

2） 患者145名の急性期・回復期ペア血清について，補体結合反応試験およびHI試験を利用した病因検索を行ない，89名にB型インフルエンザウイルス感染のあったことを確認した．A型インフルエンザ，1～3型パラインフルエンザ，アデノの各ウイルス感染は確認できなかった．

3） 検索した35集団中，B型ウイルス感染が確認できたのは22集団であり，各1集団は1976年4月と6月に，残り20集団は76年12月～77年2月に患者発生があった．

4） HI試験を利用したB型インフルエンザウイルス抗原分析の結果，新鮮分離株36株の抗原構造はほぼ同一と考えられたが，1971年以前および73年の主流行ウイルスとは明らかな差異を認めた．

5） 一般都民から採集した血清1,229件について行なったインフルエンザウイルスHI試験成績を集計し，HI抗体保有状況の逐月変遷を解析した結果，今次流行はB型インフルエンザウイルス感染であったこと，流行は1976年11月にはじまり，77年1月以後に急拡大したことが明らかとなった．

文　献

1） 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二：東京衛研年報，25，59，1974
2） 岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子：臨床とウイルス，4(2)，93，1976
3） 岩崎謙二：臨床とウイルス，4(3)，39，1976
4） 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二，根津尚光：東京衛研年報，24，81，1972
5） 日本公衆衛生協会：微生物検査必携，1966
6） 岩崎謙二：東京衛研年報，28-1，35，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 70—74, 1978

1977年4月～78年2月の東京都内インフルエンザ流行検索成績

坂井冨士子*, 伊藤忠彦*, 山崎　清*, 岩崎謙二*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo, 1977—1978

FUJIKO SAKAI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YAMAZAKI* and KENJI IWASAKI*

緒　言

1977年初頭のインフルエンザ（以下「イ」と略す）B型ウイルス感染流行が終息した[1]直後，同年4～6月に発生したかぜ患者から従来流行のA香港型（H3N2）とは免疫性状の異った「イ」A香港型（H3N2）ウイルスを分離した[2]．一方，海外のソ連や香港においてAH1型（H1N1）ウイルスの感染流行が確認された[3]．

このような背景を考慮して，1977年末～1978年初頭に予測されたインフルエンザ流行時の検索には大きな関心があった．予期した通りAH3型とAH1型両ウイルスの二重感染流行となった．以下その検索成績について報告する．

材料と方法

ウイルス分離試験　患者急性期に採取したうがい水をウイルス分離の検体とした．検索対象とするウイルス種類を幅広くカバーするため，発育鶏卵のほかに7種の継代細胞を用いてウイルス分離培養をおこなった[5]．

被検血清　診断のためには患者の急性期および回復期のペア血清を，一般都民の抗体保有状況を知る目的には都内居住の健康人青壮年層より採取した血清を用いた．

赤血球凝集抑制試験（HI試験）　検査術式は既報[4]に準じ，マイクロタイターでおこなった．U型プレイトを使用し，抗原および血清の希釈は主としてオートダイリューター（COOK 社製）でおこなった．HA抗原は供試ウイルスを発育鶏卵に接種培養して作成した．

成績と考察

患者の病因検索成績　1977年4月より1978年2月までに発生した「イ」様集団かぜのうち，53集団243名の患者材料についておこなったウイルス分離試験および血清試験の総合的な検索結果を表1に示した．血清試験による感染判定は，患者ペア血清における抗体の有意上昇（4倍以上）を指標とした．集団単位でみると，23集団（43.4%）に「イ」AH3型，16集団（30.2%）に「イ」AH1型ウイルス感染を，6集団（11.3%）に「イ」AH3，AH1両型ウイルス感染の混在を確認した．「イ」AH3型ウイルス感染は，77年4～6月と77年12月～78年2月に，AH1型ウイルス感染は78年1～2月に認められた．今回の都内「イ」流行では先ずAH3型ウイルス感染が先行し，78年1月中旬になってAH1型ウイルス感染が加わり，2月にはAH1型ウイルス感染が主体となった．患者からの検体採取は78年2月末で一応中止したので，その後の推移を明らかにすることができなかっ

表1.　東京都内で発生したかぜ患者集団における病因検索成績

発生年月旬	検査集団数	確認結果（集団数）			
		インフルエンザ			
		AH3型	AH1型	AH3型とAH1型	不明
1977					
4下	1	1			
5中	1	1			
下	5	4			1
6上	1	1			
下	2				2
12上	3	2			1
中	6	3			3
1978					
1中	11	7	3	1	
下	12	4	4	4	
2上	10		8	1	1
下	1		1		

* 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

た．集団発生患者ならびに一部都立病院小児科外来および開業医を訪れた患者より得た急性期うがい水計299件についてウイルス分離試験をおこない，「イ」AH3型88株，「イ」AH1型62株，コクサッキーB群5型1株およびエコー11型3株の各ウイルスを分離した．同一検体より「イ」A型H3，H1の両亜型ウイルスを検出した例はなかったが，「イ」AH3型ウイルスとコクサッキーB群5型ウイルス，「イ」AH1型ウイルスとエコー11型ウイルスを検出した例が1例ずつあった．エコー11型ウイルスが検出された他の患者2名中1名は血清学的に「イ」AH1型ウイルス感染が立証された．残りの1例は血清が得られなかった．

患者273名のペア血清について，「イ」A（H0，H1，H2，H3）型および「イ」B型各ウイルス株抗原を用いてHI試験をおこない，抗体有意上昇の有無により85名（31.3%）に「イ」AH3型ウイルス感染を，89名（32.6%）に「イ」AH1型ウイルス感染を，2名(0.4%）に両亜型ウイルスの感染を確認した．両亜型ウイルス感染を認めた2名の患者は共に急性期血清採取後約1カ月の間隔をおいて回復期血清を採取しているので，両ウイルスの感染時期を明確にすることはできなかった．供試「イ」A2型足立2/57，熊本Y-5/57および「イ」B型東京63/73，神奈川3/76株のウイルス抗原に対する抗体の有意上昇を認めた例はなかった．

表 2. インフルエンザAH3型患者ペア血清の平均HI抗体価（8×2^n）

血清	抗原ウイルス株 東京 494/72	東京 452/73	東京 462F/75	熊本 22/76	東京 659/77
急性期	6.6	6.2	4.1	3.2	2.2
回復期	8.1	7.7	7.0	6.3	5.5

表 3. インフルエンザAH1型患者ペア血清の平均HI抗体価（8×2^n）

血清	抗原ウイルス株 FM 1/47	大町 1/53	USSR 92/77	東京 119/78	東京 258/78
急性期	<1	<1	<1	<1	<1
回復期	3.0	<1	3.7	1.4	2.5

急性期血清における「イ」AH0型ウイルスPR8/34株抗原に対するHI抗体価が<8×2^1（<16）であったH3型ウイルス感染患者73名中，12名（16.4%）は回復期

表 4. 高度免疫ニワトリ血清による新鮮分離株の同定試験

抗原ウイルス株 ＼ 免疫血清 ニワトリNo.	325 A/PR 8/34 (H0N1)	37 A/FM 1/47 (H1N1)	328 A/大町 1/53 (H1N1)	A/USSR 92/77 (H1N1)	155 A/足立 2/57 (H2N2)	296 A/東京 494/72 (H3N3)	299 A/熊本 22/76 (H3N2)	315 A/東京** 659/77 (H3N2)	321 B/神奈川 3/76
ホモのHI価	8192	512	2048	1024	2048	2048	2048	2048	2048
A/PR8/34	0***	−4	<−6	<−5	<−6	<−6	−3	−2	<−6
A/FM1/47	<−8	0	−2	−1	<−6	<−6	<−6	<−6	<−6
A/大町1/53	<−8	−4	0	−2	<−6	<−6	<−6	<−6	<−6
A/足立2/57	<−8	<−4	<−6	<−5	0	<−6	<−6	<−6	<−6
A/東京494/72	<−8	<−4	<−6	<−5	−6	0	−4	<−6	<−6
A/熊本22/76	<−8	<−4	<−6	<−5	<−6	<−6	0	−3	<−6
A/東京659/77(H3)*	−4	<−4	<−6	<−5	<−6	<−6	−1	0	<−6
A/東京81/78(H3)*	−4	<−4	<−6		<−6	<−6	−1	0	<−6
A/東京233/78(H3)*	−4	<−4	<−6		<−6	<−6	−1	−1	<−6
A/東京292/78(H3)*	−3	<−4	<−6		<−6	<−6	0	0	<−6
A/東京388/78(H1)*	<−8	−2	−4		<−6	<−6	<−6	<−6	<−6
A/東京436/78(H1)*	<−8	−2	−1	0	<−6	<−6	<−6	<−6	<−6
A/東京288/78(H1)*	<−8	−2	−3	0	<−6	<−6	<−6	<−6	<−6
B/神奈川3/76	<−8	<−4	<−6	<−5	<−6	<−6	<−6	<−6	0

* ：今次流行時の分離株　　***：相対HI価2^n 値

**：今次流行時の分離株に対する免疫血清

表 5. 1968～77年インフルエンザ流行時の分離ウイルス20株の交差ＨＩ試験成績

No.	161	213	295	233	217	289	256	255	267	268	274	276	272	270	299	315	316	317	318
抗血清	愛知	東京	東京	熊本	東京	東京	東京	東京	東京	東京	東京	東京	山梨	ビクト	熊本	東京	東京	東京	東京
抗　原	2／68	494／72	494／72	1／72	452／73	452／73	364 f／73	825／75	462 f／75	470 f／75	593 f／75	680 f／75	20／75	3／75	22／76	659／77	659／77	663／77	663／77
愛知2/68	0	0	−1	−2	−3	−2	−3	−1	−5	−6	−4	−4	−4	−4	−5	−7	−6	−7	−7
東京494/72	0	0	0	−2	−3	−2	−4	−1	−4	−4	−5	−5	−4	−5	−5	−7	−5	−6	−6
熊本1/72	−4	−4	−3	0	−3	−3	−2	−3	−6	−4	−3	−3	−2	−2	−4	−4	−3	−3	−4
東京452/73	−3	−3	−2	0	0	0	0	0	−5	−2	−2	−1	0	0	−1	−4	−2	−3	−3
東京364 f /73	−4	−4	−3	−1	−1	−2	0	0	−5	−3	−2	−1	0	0	−1	−4	−2	−3	−3
東京825/75	−5	−4	−3	−1	−2	−1	−1	0	−5	−3	−2	−1	0	0	−1	−3	−2	−2	−2
東京462 f /75	−5	−5	−6	−2	−3	−2	−1	−1	0	0	−1	0	0	0	0	−2	−1	−1	−2
東京470 f /75	−6	−6	−6	−1	−3	−3	−1	−1	−1	0	−1	0	0	0	0	−3	−1	−2	−2
東京593 f /75	−6	−7	−6	−2	−4	−3	−3	−2	−4	−3	0	−1	0	0	0	−3	−2	−2	−2
東京680 f /75	−6	−7	−6	−2	−3	−3	−2	−2	−2	−1	0	0	0	0	0	−3	−2	−3	−2
山梨20/75	−7	−7	−6	−3	−4	−3	−3	−3	−4	−3	−1	−2	0	0	−1	−3	−2	−3	−2
ビクトリア3/75	−7	−7	−6	−2	−4	−4	−2	−2	−4	−3	−2	−1	0	0	−1	−4	−3	−3	−3
熊本22/76	−7	−7	−6	−2	−4	−3	−2	−3	−3	−2	−1	−1	0	0	0	−3	−2	−2	−2
東京659/77	−4	−4	−5	−2	−2	−2	−2	−2	−2	−2	−1	−4	−3	−2	−2	0	0	0	−1
東京663/77	−5	−6	−6	−3	−4	−4	−2	−3	−3	−2	−1	−3	−3	−2	−2	0	0	0	0
東京729/77	−4	−4				−2	−2	−4	−3	−4	−1	−3	−3	−2	−1	0	0	0	0
東京740/77	−3	−4				−2	−2	−3	−2	−2	−1	−2	−2	−1	−1	0	0	0	0
東京741/77	−4	−5				−2	−2	−4	−2	−4	−1	−3	−3	−2	−1	0	0	0	0
東京782/77	−3	−4				−2	−2	−2	−2	−3	−1	−2	−2	−1	−2	0	0	0	0
東京838/77	−3	−4				−2	−2	−2	−3	−2	−1	−2	−2	−1	−1	0	0	0	0

表中の抗体値は対応株値に対する比（相対ＨＩ価，２の乗数値）で示した．（−７は＜−７を含む）東京462 f /75＝東京1/75，東京659/77＝東京1/77．

血清中に≧8×2^1（16倍以上）のＨＩ価が認められ，うち２名は４倍以上の有意抗体上昇を認めた．同株に対する急性期血清ＨＩ価が＜8×2^1であったＨ１型感染患者75名のうち，５名（７％）の回復期血清に≧8×2^1のＨＩ価が認められ，うち２名は有意抗体上昇を示した．

Ｈ３型ウイルス感染者30名およびＨ１型ウイルス感染者38名のペア血清について，それぞれＨ３型ウイルス５株およびＨ１型ウイルス５株の抗原を用いてＨＩ試験をおこない，ＨＩ抗体価にあらわれた同一亜型内のウイルス株間の差を検討した．急性期および回復期血清の各ウイルス株に対する平均ＨＩ価を算出し，表２，表３に示した．Ｈ３型ウイルス株に対する急性期および回復期血清の平均ＨＩ価は共に抗原に用いたウイルス株が分離された年代の古い順に高く，抗体上昇の程度は逆に分離年次が新しくなる程高く，東京/494/72株と東京/452/73株に対しては平均ＨＩ価の有意上昇が認められなかった．この結果はＨ３型内の株間の抗原性の相違と患者のＨ３型ウイルスの感染歴の反映によるものと考える．一方Ｈ１型ウイルス感染者血清対Ｈ１型ウイルス各株抗原の試験では，急性期血清の平均ＨＩ価はどの株に対しても＜8×2^1であり，回復期血清の抗体は大町1/53以外の全株に上昇がみられ，USSR 92/77 株で最も高い値が得られた．

「イ」新鮮分離株の抗原分析結果　前述した通り今次流行の検索で「イ」ＡＨ３型ウイルス88株と「イ」ＡＨ１型ウイルスを分離同定した．それらの新鮮分離株の一部の同定試験の成績を表４に示した．表中の数値は，用いた免疫血清の抗体価がそれぞれ異るので比較を容易にするため免疫ウイルス株に対するＨＩ価（ホモのＨＩ価）との比を2^n値であらわした相対ＨＩ価である．すなわち０はホモと同じ，−1はその1/2のＨＩ価を意味する．Ｈ３型新鮮分離株は，A/熊本22/76株およびA/東京659/77株とよく一致するが，古い年代のＨ３型東京494/72株とは明らかに異っている．またＨ３型新鮮分離株とＡＨ

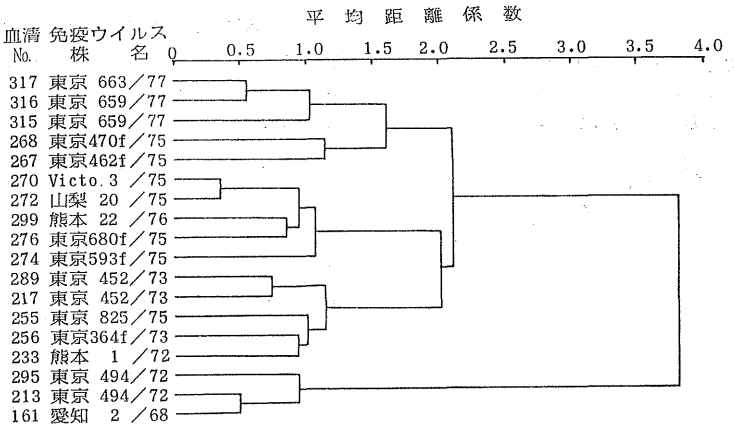


図 1.　A香港型インフルエンザウイルス分離株ニワトリ免疫血清の類似関係図（15株抗原のＨＩ価を基礎にして平均距離係数値を算出）

０型ＰＲ8/34株との間にかなり強い交差反応が認められた．このことは前述したＡＨ３型患者のペア血清にみられたＰＲ8/34株に対するＨＩ価の上昇する現象が単なる偶発的なものでないことを示している．Ｈ３型新鮮分離株は表示した免疫血清に対し，すべて同様の傾向を示し，ウイルス株間に差は認められなかった．既知の「イ」ＡＨ３型ウイルス13株と今次流行Ｈ３型ウイルス７株について高度免疫ニワトリ血清を用いておこなった交差ＨＩ試験の結果を表５に示した．表中の抗体価は，表４と同様相対ＨＩ価 2^n 値で示してある．これら相対ＨＩ価を基礎にして株間の抗原類似度（平均距離係数値）を算出し類似度の高いものを順次まとめてより大きな群を作ってゆく連続群形成法で処理する[2]と図１のようになり供試「イ」ＡＨ３型ウイルスは３群に大別された．今次分離株は1975年春以前の分離株とは大きな差異が認められた．かつ75年秋～76年の分離株とも明らかな差異を認めたが，かなりの類似性があった．ＡＨ１型ウイルス新鮮分離株についての詳細な抗原分析はまだ終了していない．表４に示した通り高度免疫ニワトリ血清に対して新鮮分離株はすべてＨ１型の免疫血清にのみ反応を示したが，個々の価はＨ３型新鮮分離株の場合ほど均一ではなかった．今次流行時のＨ１型ウイルス感染患者38名の回復期血清について，ＦＭ1/47，大町1/53，USSR 92/77株および新鮮分離株東京119/78，東京258/78株抗原を用いてＨＩ価を測定し，同一血清の各株に対する抗体価を対比させて相互の相関関係を算出し，前述した連続群形成法で類似関係を整理すると図２のようになる．大町1/53株を除いた他の供試４株間には若干の差異は認められたが，あまり大きな差ではなかった．患者血清は純粋な免疫血清と異って過去の感染歴による既応反応も無視できず，この種の試験結果による異質の判定は容易であっても等質の判定は慎重を要する．

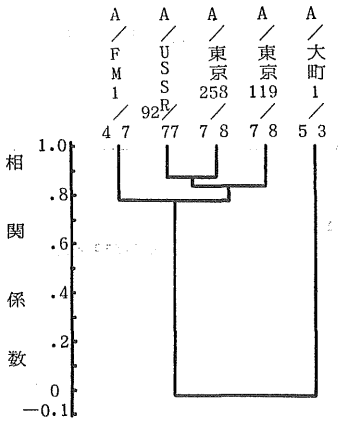


図2.　患者38名のＨ１型各株抗原に対する回復期血清ＨＩ価の相関関係図

一般都民における「イ」ＡＨ３型，ＡＨ１型ウイルスＨＩ抗体保有調査　1977年４～12月と1978年３～４月に採取した一般都民血清1,618件（77年975件，78年643件）についてＡＨ３型ウイルス，ＡＨ１型ウイルス抗原を用いＨＩ抗体価を測定し，それぞれについて年齢区分別に陽性率と平均ＨＩ抗体価を算出し，77年と78年の対比で図３に示した．ＡＨ３型は東京659/77（東京1/77に同じ）株を，ＡＨ１型はＦＭ1/47株を抗原に用い，陽性率は共にＨＩ抗体価≧8×2^2（32倍以上）の比率を，平均ＨＩ抗体価はＨ３型は≧8×2^1（16倍以上），Ｈ１型は≧8×2^2 のＨＩ抗体陽性例について算出した．ＡＨ３型ウイルスに対する78年の抗体陽性率，平均ＨＩ価は共に77年に比べ全年齢区分において一様に上昇した．一方，ＡＨ１型ウイルスに対する78年の抗体陽性率と平均ＨＩ

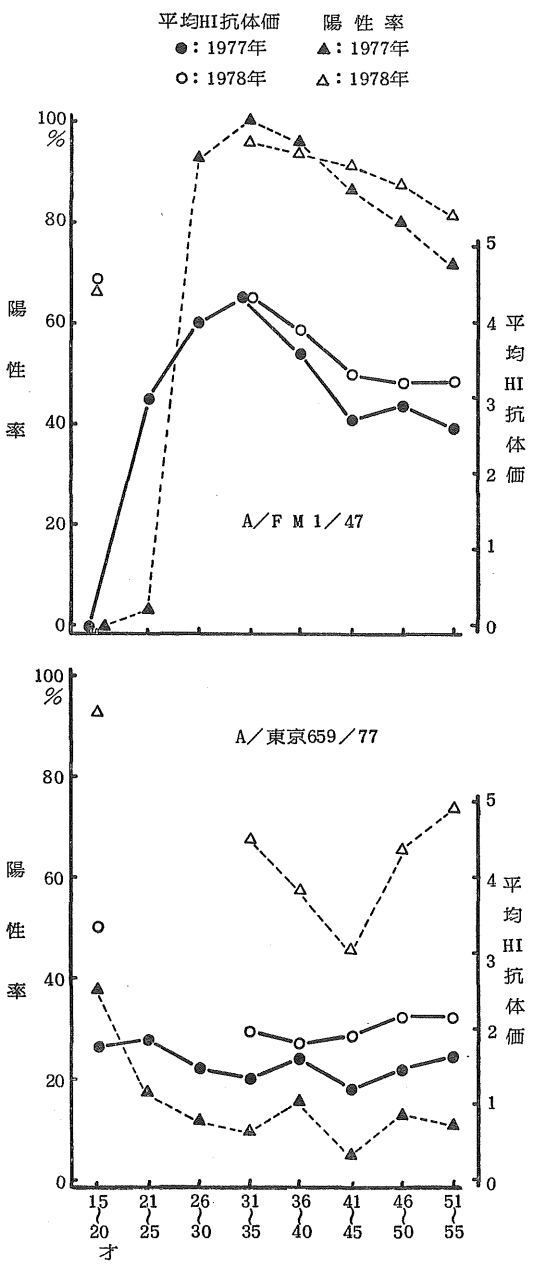


図 3. 1977年4～12月と1978年3～4月の年齢階層別HI抗体保有状況
抗体陽性率：HI価≧8×2² の 血清例数／検査血清例数
平均抗体価：FMIはHI価≧8×2²の平均，東京659はHI価≧8×2¹の平均

価は低年齢層においてのみ明らかな上昇が認められた．78年の調査時点では15歳未満の低年齢者の血清は患者以外からはほとんど得られなかった．小，中学児童生徒間に多くAH3，H1両型ウイルスの感染が発生したことは，今次流行時の患者検体の大半がその年齢者由来のものであったことからも推察された．以上の結果から「イ」AH3型ウイルスの感染流行は広範囲の年齢階層の住民の間で，また「イ」AH1型ウイルスの感染流行は主として低年齢層住民において発生したことが認められた．

結　論

1977年4月～1978年2月に53集団を含め299名のインフルエンザ様患者の病因ウイルス検索をおこない，さらに新鮮分離「イ」ウイルス株の抗原分析および一般都民における「イ」ウイルスHI抗体保有調査を併せおこない次の結果を得た．

1) ウイルス分離，患者のペア血清での抗体上昇を指標に検索した53患者集団の中で23集団に「イ」AH3型ウイルス感染を，16集団に「イ」AH1型ウイルス感染を，6集団にAH3，AH1両亜型ウイルス感染の混在を確認した．

2) 「イ」AH3型ウイルスは77年4～6月と77年12月～78年2月に，「イ」AH1型ウイルスは78年1～2月に患者うがい水から検出した．

3) 交差HI試験を利用した「イ」AH3型ウイルス新鮮分離株の抗原分析の結果は，従来流行のAH3型と明らかに差があったが，1975年秋以降の分離株とはかなりの類似性を認めた．

4) 今次流行時のAH1型ウイルス感染患者回復期血清を用いたHI試験の結果から，今次流行の分離株は，大町1/53株と抗原的に大きな差のあることを認めた．

5) 1977年4～12月と78年3～4月に採取した一般都民血清における「イ」AH3型，AH1型ウイルス抗体保有状況の比較によって今次流行時にAH3型ウイルスは全年齢層にわたって，AH1型ウイルスは主として低年齢層で感染流行したことが明らかとなった．

文　献

1) 岩崎謙二，伊藤忠彦，山崎　清：東京衛研年報，28-1，63，1978
2) 岩崎謙二：東京衛研年報，28-1，35，1977
3) *Wkly Epidem. Rec.* 50-16，401，1977
4) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二，根津尚光：東京衛研年報，24，81，1972
5) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二，浦野純子，河野弘子，渡辺悌吉：東京衛研年報，29-1，49，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 75—78, 1978

1977年における都民の風疹ＨＩ抗体保有調査

吉田靖子*, 関根整治*, 岩崎謙二*

Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants in Tokyo in 1977

YASUKO YOSHIDA*, SEIJI SEKINE* and KENJI IWASAKI*

緒　　言

1976年1月末に都内某高等看護学院内にて風疹患者の集団発生があり，それ以後1978年2月までの2年間にわたって全校生徒を対象に採血し風疹のＨＩ抗体価を測定し，発病者・非発病者におけるＨＩ抗体保有の経時的変動および風疹発病後経過日数と血中抗体価との関連を検討した．

さらに1977年6～8月に一般都民から採取した血清についても風疹ＨＩ抗体保有状況も調査したので報告する．

実験材料および方法

被検血清　1976年1月31日から1978年2月13日までの2年間に計5回にわたって，都内某高等看護学院生徒から採取した血清のべ2,038件について検査した．採血時期・対象者数内訳は表2に記載した．

また1977年6～8月に都内2地区（葛飾区・立川市）で採取した208件の血清についても検査した．供試血清は−20°に凍結保存した．

ＨＩ試験　既報[1,2]に準じて実施した．

検査成績および考察

某高等看護学院生における風疹ＨＩ抗体価の経時的変動　1976年1～2月にかけて当該高等看護学院内に風疹患者の集団発生があった．同学院ではほとんどの学生は他県からの上京者であって寮生活をしており，1976年1月28日に初発患者の発生をみて以来患者数は急増した[3]．同一人から間隔をおいて採取したペア血清でのＨＩ価比較結果で診断した風疹患者の発生状況を表1に示した．1975年4月以前からの在校生間での風疹患者発生は76年3月末までに終息した．1976年4月入学（8回生）者の中には，76年4月14日から76年7月22日の間で1名，76年7月23日から78年2月13日の間で8名の風疹ウイルス感染が血清学的に認められた．1975年4月入学の7回生は76年1月28日の初発患者出現後2月10日までの短期間内に全患者数の96.7%が発症したが，74年4月入学の6回生は76年1月28日から2月27日に全患者数の47.6%が，また76年2月28日から7月22日に52.4%が発生した．1976年入学の8回生では76年から77年の2年間にわたって患者発生がみられた．このような入学年次による風疹患者発生状況の差がみられた．原因として単に在京年数の差としてでなく，その他の背景をも考慮する必要があるだろう．

全校生徒を対象に行った2年間の風疹ＨＩ抗体保有調査の集計結果を表2に示した．5・6回生については，前報[2]に記載した．

短期間のうちに風疹患者が急増した7回生125名の抗体保有率（ＨＩ価≧1：8）は急上昇し，高いＨＩ抗体価をもったものが多くなった．ＨＩ価512の抗体保有率をみると76年1月31日採血時には16.8%であったが，76年2月27日採血時には44.7%となった．その後採取した血清では抗体保有率の上昇はみられず，高いＨＩ価を示した血清も漸次少なくなってきた．

8回生123名の間では1976年4月に入学して以来2カ年間に計9人の風疹患者発生を血清学的に認めたのみであったので，同2カ年の間に全体の抗体保有率も63.2%から75.2%に上昇したにすぎなかった．

9回生125名では1977年4月入学時に抗体保有率（ＨＩ価≧1：8）は71.8%，1024～≧4096と高い抗体価を示したものが16名存在していた．78年2月の抗体保有率（ＨＩ価≧1：8）は70.5%であり，ＨＩ価1024以上の値を示したのは5名に減少していた．またこの間に感染が確認されたものはなかった．

当高等看護学院生徒の学年別平均ＨＩ抗体価の経時的変動を図1に示した．

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

表 1. 某高等看護学院内における風疹患者発生数

学年	5回生 1976. 3卒	6回生 1977. 3卒	7回生 1978. 3卒	8回生 1979. 3卒	9回生 1980. 3卒
学生数	115	121	125	123	125
患者発生期間					
76. 1. 28～76. 2. 27	7	10	29		
76. 2. 28～76. 7. 22		11	1	1*	
76. 7. 23～77. 1. 14				1	
77. 1. 15～78. 2. 13				7	

* 1976年4月14日以降

表 2. 某高等看護学院生における風疹HI抗体価の経時的変動

学年	採血月日	検査数	風疹HI抗体価 <8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	≧4096
7回生 (1978. 3卒)	76. 1. 31	125	27	2	5	9	26	20	15	13	5	2	1
	2. 27	123	4		1	1	13	31	18	26	17	2	10
	7. 22	108	2			2	11	31	35	17	6	2	2
	77. 1. 14	114	3			8	32	42	19	8	1	1	
	78. 2. 13	105	2			1	16	39	30	10	6	1	
8回生 (1979. 3卒)	76. 4. 14	117	43	7	4	12	17	19	13	2			
	7. 22	118	41	2	2	6	11	25	20	11			
	77. 1. 14	111	40	3	6	11	16	25	7	3			
	78. 2. 10	113	28	2	4	5	20	25	19	9	1		
9回生 (1980. 3卒)	77. 4. 18	124	35	1	2	3	7	12	29	19	12	3	1
	78. 2. 10	124	36		2	5	11	25	19	19	5		

表 3. 病日別にみた風疹HI抗体価の変動

病日(日)	検査数	風疹HI抗体価 <8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	≧4096	平均抗体価* n±標準偏差
0～ 2	39	36	2		1								0. 12±0. 52
3～ 5	11	4	2	3	2								1. 27±1. 19
6～ 10	24					1	3	5	2	8	3	2	7. 25±1. 64
20～ 31	41						1	3	6	17	1	13	8. 29±1. 38
150～200	38				1	1	5	15	10	3	2	1	6. 42±1. 34
330～360	36					6	13	11	3	2	1		5. 58±1. 20
730～760	25					1	11	7	2	3	1		5. 92±1. 25

* 平均抗体価＝ 4×2^n

7回生においては短期間内での平均HI抗体価の上昇が著しく，初発患者発生後約1カ月の2月27日採血時がピークであったのに対して，6回生では初発患者発生後6カ月の7月22日まで平均HI抗体価の上昇がみられた．

風疹発病後経過日数と患者血中抗体価との関連を明らかにする目的で，風疹り患者の中で病日のはっきりしている者47名から採取した血清214件について調査した病日別の風疹HI抗体価分布および平均HI価を表3に示した．

風疹り患6病日後からHI価は急上昇した．5病日以

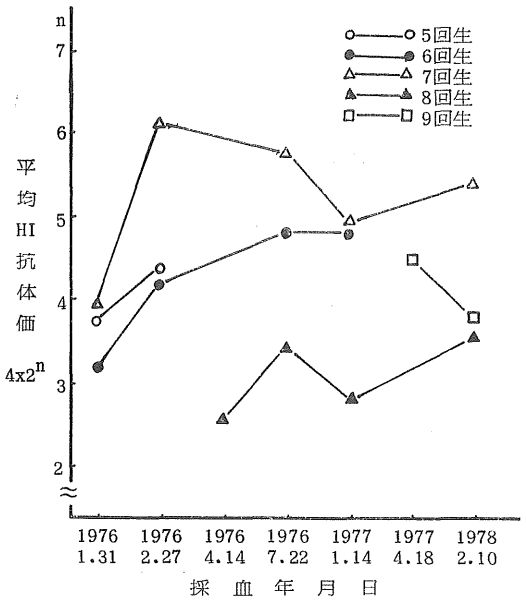


図 1.　某高等看護学院生徒の風疹の平均HI抗体価の経時的変動

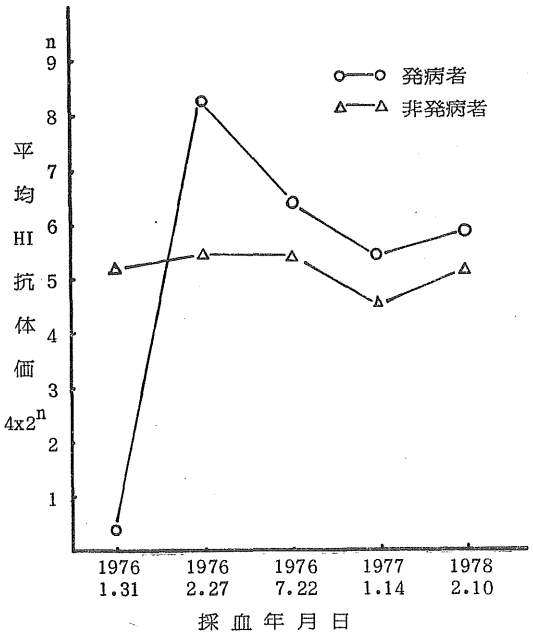


図 2.　風疹発病者・非発病者における平均HI抗体価の変動

内ではHI価64以上を示したものがなかったが，6病日以降760日までの血清ではほとんどが128以上のHI価を示した．病日区分別に平均HI価を算出すると2病日以内では$4\times2^{0.12}$，3～5病日では$4\times2^{1.27}$であったが，6～10病日では$4\times2^{7.25}$と明らかに急上昇した．最高値$4\times2^{8.29}$は，20～31病日の血清で得られた．発病後6カ月を経過すると平均HI抗体価はピーク時の1/4に，1年後では1/8に低下した．2年後は1年後と変わらなかった．

HI抗体価保有分布をみると6～31病日では1024～≧4096という高い抗体価をもっていたものが75.6%と多かったが，6カ月を過ぎると128～512が78.9%，1年以降では64～256が80.3%となった．標準偏差値の大きさが示すように，各患者の血中抗体価は病日をそろえてみても個人によって大きな差がみられた．

2年間を通して5回採血が可能だった7回生90人について，発病者と非発病者にわけた平均HI抗体価の経時変動を図2に示した．

発病者群は21名で，76年1月31日採血時に16名はHI価8以下で，残りの5名は8と16の低い抗体価であった．1カ月後の採取血清の平均HI価は$4\times2^{8.29}$に上昇した．非発病群の平均HI価は2年間ほとんど変わらなかった．

一般都民の風疹HI抗体保有状況　都内の葛飾区と立川市内で1977年6～8月に採取した208件の血清についてHI抗体価の検索を行い，年齢別抗体価分布を表4に示した．

立川市の20歳以上の年齢階層では，抗体価32～512を示したものが33/34（97.1%）であったのに対して，14歳以下では1024以上の抗体価を示したものが26/80(32.5%）であった．14歳以下でHI抗体価1024以上を示したものは，葛飾区内の検体でも24/94（25.5%）と高率であった．14歳以下で高いHI抗体価を示した血清の比率が高かったのは，最近の風疹流行時における感染対象者がこの年齢階層であったことを示唆していると考える．

次に過去5年間に行った一般都民の風疹HI抗体調査成績から年齢階層別平均HI抗体価を算出し，調査年次変遷を図示すると図3のようになる．

5～9歳と10～14歳の年齢階層での1975年から76年にかけての平均HI抗体価の急上昇変化が著明であった．5～9歳の平均HI抗体価の上昇変化は1974～1975年にかけてはじまっており，1975～1976年にかけては5～9歳・10～14歳ともに急上昇変化を示している．このような変化は今次流行が1974～1976年にかけて発生したこと，まず5～9歳での感染ではじまり10～14歳にまで波

表 4. 1977年都内2地区における風疹HI抗体保有状況

地区	年齢階層	検査数	風疹HI抗体価										
			<8	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	≧4096
葛飾保健所	5～9	46	18				1		2	10	12	3	
							60.9*	58.7	58.7	54.3	32.6	6.5	
	10～14	48	8					5	12	14	7	2	
								79.2	72.9	47.9	18.8	4.2	
立川保健所	5～9	40	9					2	12	8	8	1	
								77.5	72.5	42.5	22.5	2.5	
	10～14	40	2						7	14	12	4	1
									95.0	77.5	42.5	12.5	2.5
	20～29	13				2	4	4		3			
						100.0	84.6	53.8	23.1	23.1			
	30～	21	1			3	5	3	3	4	1	1	
						95.2	81.0	57.1	42.9	28.6	9.5	4.8	

* 累積抗体保有率（%）

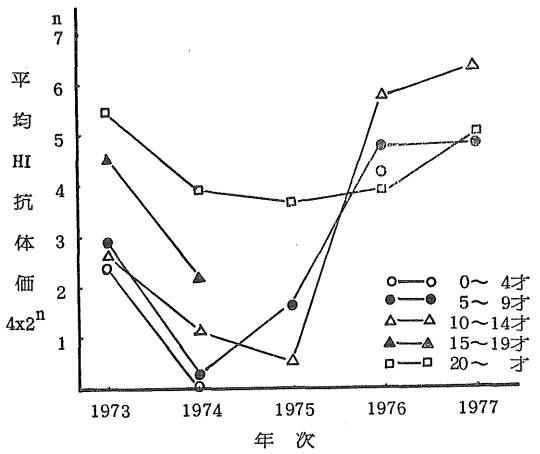


図 3. 年次別・年齢別による風疹の平均HI抗体価の変動

及拡大したことを示唆している．

結果

1976年1～3月に風疹患者の集団発生のあった都内某高等看護学院生徒から2年間にわたって経時的採血を行い，風疹ウイルスHI抗体保有の変動・風疹発病後日数と患者血中抗体価との関連性を究明した．

1) 1976年1～3月の学院内流行を経験した1974・1975年次入学の在校生246名からは，76年7月以降1名の患者発生もなかったが，1976年次の新入学生123名中には，血清学的診断で風疹ウイルス感染の認められた者が9名存在していた．

2) 風疹患者47名について発病後経過病日別に算出した平均HI抗体価は，6病日後より急上昇を示し，20～31病日で最高値 $4\times2^{8.29}$ に達した．6カ月以後の平均HI抗体価は漸次低下し，1年後には最高値の約1/8になった．

3) 過去5年間における一般都民の年齢別平均HI抗体価の年次変動調査では，1975～1976年に5～9歳・10～14歳の年齢階層で著明な抗体価の上昇がみられた．5～9歳の年齢階層では10～14歳に先行して1974～1975年から抗体価上昇がみられた．

謝辞 被検血清採取にあたり格別の御協力をいただいた都立看護学院・葛飾区立葛飾保健所・都立立川保健所の関係者に深謝する．

文献

1) 吉田靖子，横山庸子，岩崎謙二：東京衛研年報，27-1，63，1976
2) 吉田靖子，横山庸子，岩崎謙二：東京衛研年報，28-1，49，1977
3) 深瀬須加子：衛生局学会誌，No. 59，26，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 79−85, 1978

1977年の東京都における日本脳炎疫学調査

吉田靖子*, 藪内清*, 関根整治*
岩崎謙二*, 三宅勉**, 三木博**

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis Virus in Tokyo in 1977

YASUKO YOSHIDA*, KIYOSHI YABUUCHI*, SEIJI SEKINE*,
KENJI IWASAKI*, TSUTOMU MIYAKE** and HIROSHI MIKI**

緒　言

前年にひき続き本年も東京都内における日本脳炎（以下日脳と略す）ウイルス汚染状況を知る目的で，都内飼育ブタを対象に日脳ウイルスに対する抗体獲得率の逐時変遷調査，ＨＩ抗体陰性ブタ血清からのウイルス分離，日脳ウイルスを媒介するコガタアカイエカの出現消長ならびに捕集蚊からのウイルス分離を行なった．

また都民における日脳ウイルス感受性を調査するために，一般都民血清458件について日脳ＨＩ抗体価と中和抗体価を測定した．

実験材料および方法

患者血清　1977年７月と９月に都内伝染病院に収容された日脳疑似患者３名から採取した計７件の血清である．

と場ブタ血清　1977年１～12月に都下多摩地区の飼育ブタから，と殺時に採取した血清計1,250件である．供試血清は−20°に凍結保存した．

健康都民血清　供試血清は1977年６月７日から８月24日にかけて都内居住健康者から採取した血清458件である．供血者の年齢範囲は３～85歳で，居住区域は都内８区および多摩地区２市にわたった．

ＨＩ試験　既報[1-3]に準じ，マイクロタイター法により実施した．抗原は市販品（武田薬品ＫＫ）を４凝集単位／0.025m*l* に調整して使用した．

コガタアカイエカの捕集方法およびウイルス分離同定試験　既報[1-3]に準じた．

検査成績および考察

日脳疑似患者の血清学的検査成績　都内で発生した日脳疑似患者３名はそれぞれ７月21日・７月中旬・８月20日の発病で，年齢は24・30・34歳であった．採取した患者血清７件について日脳ウイルス 中山株・JaGAr 01株抗原を用いＨＩ試験を行なったが，急性・回復期血清の抗体価間に有意上昇がみられず，日脳ウイルス感染は確認できなかった．

1977年全国の届出日脳患者数は真性３名(死者１名)，疑似18名（死者10名）で，真性患者はいずれも熊本県からの報告であった．疑似は東京の３名を含め熊本・福岡・和歌山・高知・宮崎・鹿児島の各県からの報告で，患者発生は初発が1977年７月14日で最終は同年９月10日であった[4]．

都内発生の患者３名の血清は，日脳ウイルス以外のアデノ・エコー６型・ヘルペス・ムンプス・コクサッキーＢ群１～５型の抗原についても検索したが，病因ウイルスを明らかにすることはできなかった．

と場ブタの日脳ＨＩ抗体獲得状況　1977年１～12月に採取した都内飼育ブタ血清について，日脳ウイルス JaGAr 01 株抗原を使用しＨＩ抗体価を測定した．採血日時別の集計成績を表１に示した．

1977年１月26日から８月31日までの抗体価別分布状況ではＨＩ価320以上の高い値を示したものがなかったが，９月７日以降の抗体価別分布では高い値を示したものの出現が目立ち２峰型分布を示した．したがって都内での日脳ウイルス伝播は９月以降盛んになってきたことが示唆される．２ＭＥ感受性抗体がはじめて検出されたのは７月20日採血群の１例であったので，９月以前に都内で日脳ウイルス汚染のはじまっていたことが推測され

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都多摩食肉衛生検査所

表 1. 1977年度東京都のと場ブタの日本脳炎HI抗体獲得状況

採血年月日	検査数	HI抗体価(JaGAr 01)										陽性率(%)	※ウイルス
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	≧2560	(≧1:10)	分離
77. 1.26	50	46	4									8	0/46
2.23	50	50										0	0/50
3.23	50	49	1									2	0/49
4.27	50	50										0	0/50
5.25	50	49		1								2	0/49
6.22	50	47	2		1							6	0/47
7. 6	50	49	1									2	0/49
7.13	50	39	8	1	2							22	0/39
7.20	50	41	7	1			1					18	0/41
7.27	50	48	1	1								4	0/48
8. 3	50	50										0	0/50
8.10	50	44	6									12	0/44
8.17	50	49	1									2	0/49
8.24	50	45	4		1							10	0/45
8.31	50	49		1								2	0/49
9. 7	50	47	2							1		6	0/47
9.14	50	42	4	1					1		2	16	0/42
9.21	50	39	10	1								22	0/39
9.28	50	34	6	2	1	2			1	2	2	32	0/34
10. 5	50	40	3	2	1		2	1			1	20	0/40
10.12	50	34	1	1				2	2	4	6	32	0/34
10.19	50	46				1		1	1	1		8	0/46
10.26	50	39	4	2				1	1	2	1	22	0/39
11.16	50	39	10	1								22	0/39
12.14	50	47	2	1								6	0/47

※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．
(陽性例/検査数)

た．

厚生省発表の全国資料から1977年のブタの抗体獲得率を指標に日脳ウイルス高汚染が推定された地区は，近畿以西20県以外は千葉・茨城・福島の3県にすぎなかった．なお1977年の日本における日脳ウイルス汚染は7月1日沖縄県に始まり，以後徐々に北上し10月6日福島県で終っている[4]．

1963年以降のと場ブタにおける年次別HI抗体獲得率(JaGAr 01株に対するHI価≧1:10)の年次推移を比較するために，今年および過去の代表年次における抗体獲得率の経時変化曲線を図1に示した．

1963～1977年のHI抗体獲得率経時変化曲線のパターンは4つに大別できる．1964年に代表されるタイプAは，7月上旬に抗体獲得率の急上昇がみられ，8月以降ほぼ100%を保っていた(1963～1967年)．1968年に代表されるタイプBは，急上昇がみられるが上昇期がAタイプにくらべて約1カ月遅れ，その後の抗体獲得率の値も50～90%の間で変動があった(1968・1969年)．1972年に代表されるタイプCは，抗体獲得率の最高値がタイプBよりさらに低かった(1970～1972年)．抗体獲得率がさらに低下したタイプDには1973年から1977年が含まれる．1976年および1977年における抗体獲得状況は，7月初めわずかな獲得率の上昇がみられたが，その後における抗体獲得率の急上昇はなかった．

1977年の抗体獲得率の最高値はわずかに32%であったが，7月20日に50頭のブタから採取した血清中1件HI価160を示したものが2ME処理により10以下に，また10月26日採取した血清50件中1件HI価1280を示したものが，2ME処理後透析法で40に低下した．このことから都内飼育ブタの間では7月中旬から10月末まで，かな

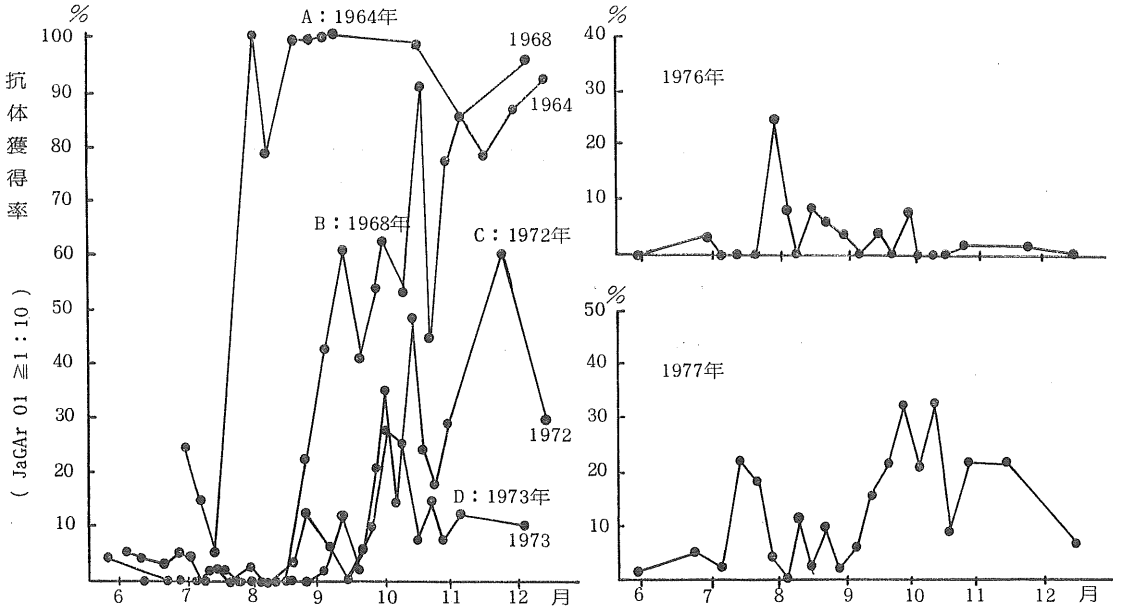


図 1.　東京都におけると場ブタの日本脳炎ＨＩ抗体獲得状況

表 2.　1977年と場ブタ血清の日脳 JaGAr 01株と中山株との抗体保有の相関

		JaGAr 01株に対するＨＩ抗体価										
		＜10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	≧5120
中山株に対するＨＩ抗体価	＜10	1110	72	15	2	3	2					
	10	4	3	1	3							
	20				1		1					
	40							2				
	80							1	3	2		
	160							2	2	5	3	1
	320								1	3	3	2
	640										1	2
	1280											
	2560											
	≧5120											

り長期間にわたって新鮮感染ブタの存在したことが推測された.

前報[5]において過去９年間に行なったブタ血清からの日脳ウイルス分離成績の解析において，Ａタイプに示される日脳ウイルス高汚染率時代の日脳ウイルス感染期間は約２週間，Ｂタイプでは１カ月半，Ｃ・Ｄタイプでは２カ月以上とウイルス低汚染率時代になるほど感染期間は長くなっていることを指摘したが，今年の調査結果でも矛盾はなかった.

表２は1977年に採取したと場ブタ血清1,250件について測定した中山・JaGAr 01 両株抗原ＨＩ価間の相関性を示した．ＨＩ価10以上を示した血清は，JaGAr 01 株では136件（10.9%），中山株では45件（3.6%）で，JaGAr 01 株が高率であった.

JaGAr 01 株・中山株ともＨＩ価10以上を示したブタ血清42件について相関をみると，両者の間には強い正の相関（相関係数0.916）があった．同成績から両株抗原に対するＨＩ価を２のべき数に換算して関係式を示すと，

表 3. 1977年度東京都民の日本脳炎HI抗体保有状況

年齢階層	HI価（中山株）										
	<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	≧2560	計
～ 5	20	2	1	7	3	4	2	2			41
		51.2※	46.9	43.9	26.8	19.5	9.8	4.9			
6 ～ 12	89	51	30	14	9	4	2				199
		55.2	29.6	14.6	7.5	3.0	1.0				
13 ～ 16	21	8	4	1	1						35
		40.0	17.1	5.7	2.9						
17 ～ 30	47	8	2	2	1	1					61
		23.0	9.8	6.6	3.3	1.6					
31 ～ 59	37	14	8	5	2						66
		43.9	22.7	10.6	3.0						
60 ～	15	31	5	4	1						56
		73.2	17.9	8.9	1.8						
（計）	299	1116	55	26	17	9	4	2			458
		50.0	24.7	12.7	7.0	3.3	1.3	0.04			

※累積抗体保有率

年齢階層	HI価（JaGAr 01株）										
	<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	≧2560	計
～ 5	15	5	1	2	1	6	2	4	2	3	41
		63.4	51.2	48.8	43.9	41.5	26.8	22.0	12.2	7.3	
6 ～ 12	60	27	32	30	21	12	6	6	5		199
		69.8	56.3	40.2	25.1	14.6	8.5	5.5	2.5		
13 ～ 16	13	9	7	2	3	1					35
		62.9	37.1	17.1	11.4	2.9					
17 ～ 30	33	10	7	3	4	1	1		2		61
		45.9	29.5	18.0	13.1	6.6	4.9		3.3		
31 ～ 59	27	5	5	10	6	5	5	2		1	66
		59.0	51.5	43.9	28.8	19.7	12.1	4.5		1.5	
60 ～	4	4	13	13	14	6	1		1	1	56
		92.9	85.7	62.5	41.1	16.1	5.4		3.6	1.8	
（計）	153	59	64	59	50	31	15	12	10	5	458
		66.6	53.7	39.7	26.9	15.9	9.2	5.9	3.3	1.1	

JaGAr 01 株値＝1.27＋1.29×中山株値となり，JaGAr 01株値の方が明らかに高値であった．

1977年1～12月に採取したと場ブタ血清1,250件のうちHI価10以下のもの1,110件について，乳のみマウスを用いて日脳ウイルス分離試験を試みたが，ウイルスを検出することはできなかった．

コガタアカイエカの捕集結果 当研究所鶏舎1地点および都心の某公園内4地点に一定日数の間隔でライトトラップを設置して蚊を捕集し，コガタアカイエカの経時的出現消長を調査するとともに，捕集した雌コガタアカイエカについてはウイルス分離を行なった．

気象・環境の変化などによりコガタアカイエカの捕集数も年々減少し，1977年6月13日～10月25日の全調査期間を通じて捕集したコガタアカイエカ総数は187匹であった．捕集蚊からも日脳ウイルスは分離できなかった．

また同期間当研究所鶏舎内に5羽のおとりウサギを飼育し逐週採取血清についてHI試験を行ない，日脳ウイルスHI抗体獲得状況を調査したが，調査期間中は全例

表 4. 1977年における低年齢階層の日本脳炎ワクチン接種歴によるHI抗体獲得状況

年齢階層	ワクチン歴	抗原**	HI抗体価 <10	10	20	40	80	160	320	640	1280	≧2560	抗体保有率 (≧1:10)%		平均抗体価*** n±標準偏差
0～5歳	前年度接種※	N	11	1	1	4	3	4	1	2			16/27	59.3	2.48±2.45
		J	6	4	1	2	1	3	2	4	2	2	21/27	77.8	3.88±3.20
	以前接種	N	2			3			1				4/6	66.7	2.50±2.25
		J	1	1				3				1	5/6	83.3	4.16±3.25
	未接種	N	7	1									1/7	12.5	
		J	8										0/8	0	
6～12歳	前年度接種	N	16	4	5	2	1	1					13/29	44.8	1.00±1.38
		J	11	3	5	3	3	1	2		1		18/29	62.1	2.03±2.22
	以前接種	N	52	39	21	11	5	2	1				79/131	60.3	1.14±1.28
		J	31	21	24	21	15	9	4	4	2		100/131	76.3	2.32±2.01
	未接種	N	5	1									1/6	16.7	0.16±0.40
		J	4	2									2/6	33.3	0.33±0.51
	不明	N	16	7	4	1	3	1	1				17/33	51.5	1.24±1.67
		J	14	1	3	6	3	2		2	2		19/33	57.6	2.33±2.56

* 1976年に接種

** 抗原 N＝中山株, J＝JaGAr 01株

*** 平均抗体価＝5×2^n

表 5. 1977年における地区別による日本脳炎HI抗体保有状況

地域	年齢階層	検査数	抗体保有率(%) 中山	JaGAr 01	保有抗体値 Y(X_0) 中山	JaGAr 01	抗体保有値 X(Y_0) 中山	JaGAr 01	平均抗体価** (n±標準偏差) 中山	JaGAr
区内***	0～5	24	45.8	54.2	8.05	8.69	9.62	12.84	1.70±2.15	2.83±3.14
	6～12	120	57.5	68.2	9.03	9.59	5.44	8.67	1.10±1.23	2.22±2.05
	13～16	23	47.8	65.2	9.38	9.43	3.87	6.31	0.73±0.91	1.43±1.40
	17～30	40	22.5	45.0	5.53	6.61	5.58	9.19	0.42±0.95	1.15±1.83
	31～59	39	41.0	56.4	8.19	8.70	4.51	9.73	0.69±0.97	2.12±2.30
	60～	40	72.5	92.5	10.63	10.54	3.97	8.94	1.00±0.87	2.87±1.69
多摩****	0～5	17	58.8	76.5	6.91	9.13	10.89	15.38	1.88±1.93	3.64±3.40
	6～12	79	51.9	72.1	7.59	8.85	7.23	9.94	1.12±1.54	2.22±2.27
	13～16	12	25.0	58.3	4.57	7.74	10.79	6.65	0.58±1.44	1.08±1.44
	17～30	21	23.8	47.6	4.78	7.06	7.63	9.95	0.47±1.16	1.42±2.13
	31～59	27	48.1	63.0	8.11	8.77	5.84	11.01	0.96±1.28	2.37±2.51
	60～	16	75.0	93.8	9.57	11.77	4.72	9.47	1.00±0.99	3.75±1.84

* Y（累積抗体保有率の平方根値）＝a－b×X(抗体価＝log 2)

** 平均抗体価＝5×2^n

*** 区内（中野区・杉並区・板橋区・練馬区・豊島区・文京区・葛飾区・足立区）

****多摩（町田市・立川市）

に抗体上昇を認めなかった．

一般都民における日脳抗体保有調査　日脳流行季節を直後に控えた6～8月に採取した一般都民血清458件について，日脳ウイルス中山・JaGAr 01の両株を用いHI価を測定し，集計成績から都民の日脳抗体保有状況を調査した．

1977年6月7日から8月24日に都内に居住する3～85歳の一般健康都民458人から採集した血清について検索した結果を表3に示した．

0～5・6～12・13～16・17～30・31～59・60歳以上の6年齢階層にわけてJaGAr 01株および中山株に対するHI抗体保有率（HI価≧1：10）をみると年齢階層によって明らかに差がみられた．各年齢階層とも中山株よりJaGAr 01株に対する抗体価および抗体保有率は高値であった．両株とも抗体保有率値は60歳以上の年齢階層が最高で，17～30歳の年齢階層が最低であった．

HI価別の抗体保有率をみると，0～5歳の年齢階層では高いHI価のところでの保有率が比較的高く，表4のようにワクチン接種歴別に整理すると，1976年度接種者のものに高値を示したものが多く，未接種者の多くは抗体が証明されなかった．

採取被検血清を供血者の居住地によって区内と多摩地区にわけて，両者の抗体保有状況を比較してみた．検索結果は表5に示した．

6歳以上の各年齢階層での比較では，両地区間に明らかな差はみられなかったが，0～5歳の年齢階層では多摩地区の方が保有率・抗体値ともに高値であった．

1968～1977年の各年次に採取した健康都民血清計3,578件について測定した日脳ウイルスHI抗体価の年次別平均値を図2に示した．

平均抗体価の年次推移傾向をみると両株ともにわずかではあるが31歳以上の高年齢者層では逐年低下が，16歳

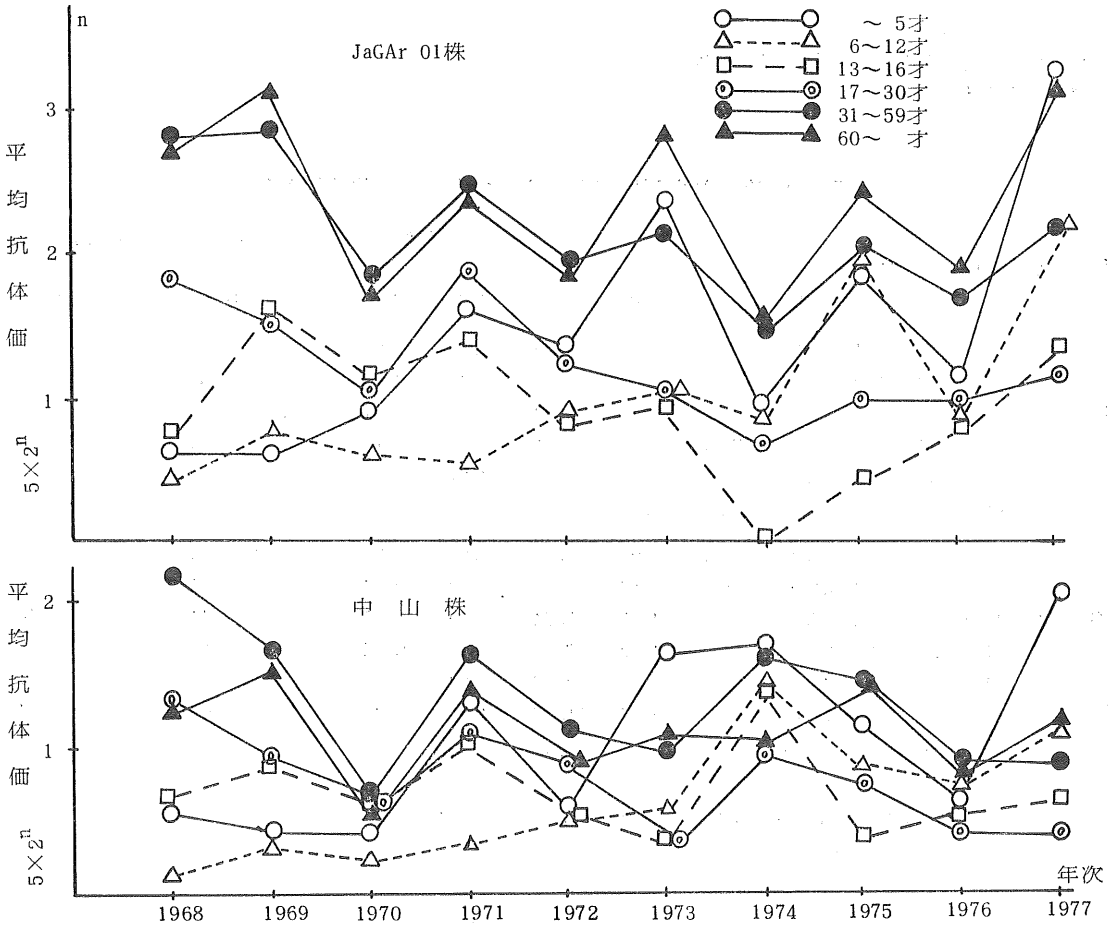


図 2.　各年次別・年齢別の日本脳炎平均HI抗体価の変遷

表 6. 日本脳炎ＨＩ抗体陰性都民（ＨＩ価＜１：10）の中和抗体保有率（ＮＴ価≧１：10）

年　　度	1972	1973	1974	1975	1976	1977
中和抗体陽性例／検査数*	117／166	69／ 86	120／141	98／176	94／177	61／147
中和抗体保有率	70.5%	80.2	85.1	55.7	55.9	41.5
日脳抗体保有数**／全検査数	275／324	302／319	320／341	296／374	262／340	372／458
日脳抗体保有率	84.5%	94.7	93.8	79.1	77.1	81.2

*　ＨＩ抗体陰性者数

**　日脳ＨＩ抗体（中山・JaGAr 01 いずれかの抗体をもっているもの）またはＨＩ価がなくても中和抗体をもっている数

以下の低年齢者層では上昇がうかがわれた．JaGAr 01株に対する平均ＨＩ抗体価は31歳以上の年齢階層で高く，それ以下の年齢階層では低く，両者の間に明らかな差があった．中山株に対する平均ＨＩ抗体価では，JaGAr 01株ほどの明らかな差はみられなかった．

1977年に採取した458被検血清のうち中山・JaGAr 01株抗原に対するＨＩ価10以下であった147件について，プラック減少法[6]により中和抗体価を検索し，その結果を表６に示した．

147件中61件（41.5%）において10以上の中和抗体価がみいだされた．供試血清147件での年齢階層別中和抗体陽性率（抗体価≧１：10）には明らかな差はみられなかった．

結　　論

1977年東京都内における日脳ウイルス汚染状況・一般都民の日脳ウイルス感受性検索など疫学的調査を行ない，次の結論を得た．

1）都内で発生した日脳疑似患者３名の急性・回復期ペア血清７件について抗体検索を行なったが，日脳ウイルスの感染は否定された．

2）1977年１～12月間に，都内飼育ブタを対象にして行なった日脳ウイルス抗体獲得の逐時調査で，獲得率の最高値（９月28日，10月12日）はわずかに32%であったが，新鮮感染を示唆する２ＭＥ感受性抗体陽性例は少数であったが，７月20日～10月26日にわたって検出された．

3）一般健康都民の日脳ＨＩ抗体保有状況は，年齢階層によって抗体保有率（ＨＩ価≧１：10）に差がみられ，60歳以上が最高(92.9%)，17～30歳が最低(45.9%)であった．

4）低年齢階層者群とくに５歳以下では，ワクチン接種歴の有無によって抗体保有率に顕著な差がみられた．

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，25，53，1974
2）吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二ら：東京衛研年報，27-1，66，1976
3）吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二ら：東京衛研年報，28-1，40，1977
4）厚生省保健情報課：全国日本脳炎情報，1977
5）吉田靖子，藪内　清，横山庸子，岩崎謙二：東京衛研年報，28-1，44，1977
6）国立予防衛生研究所学友会：ウイルス実験学各論，150，1969，丸善

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 86—94, 1978

大気中の毒性カビ分布について

一言　広*, 諸角　聖*, 和宇慶朝昭*, 坂井千三*

Distribution of Toxigenic Fungi on Airborne

HIROSHI HITOKOTO*, SATOSHI MOROZUMI*,
TOMOAKI WAUKE* and SENZO SAKAI*

During the period from March to October, 1974, a total of 146 air samples collected at 5 different in-door and 24 out-door sampling stations by the use of an air sampler equipped with the Field monitor was studied for the presence of toxigenic fungi. Of a total of 2,434 isolates obtained from the culture of 146 air samples, 3 of 15 *A. flavus*, 20 of 162 *A. versicolor* and 3 of 5 *A. ochraceus* were found to be the mycotoxin producers. However, 36 strains of *Fusarium* spp. did not produce any toxins.

この20年間，食品における毒性カビ汚染の実態については多くの報告がなされている．著者らも，わが国の市販食品について報告してきた[1-5]．

市販の食品類に見出されるこれらの汚染毒性カビの多くは二次汚染菌と考えられている．一般に食品汚染カビの自然界における汚染源としては緑色植物，果実，動物，下水，土壌および空気など多くのものが考えられている[6]．これらの汚染源のうち，特に土壌と空気は，果実や農産物のマイコトキシン自然汚染例に見られるように，毒性カビ汚染における汚染源として重要な役割を果していると思われる．しかし，汚染源としての直接的証明はこれまでのところなされていない．ただ，農作物における自然汚染の裏付けを目的として，土壌中の毒性カビ分布について，すでにいくつかの報告がある[7-11]．

一方，空中カビについては極めて多くの報告がなされているにもかかわらず，これまでの報告はいずれもヒトの気管支喘息やその他のアレルギー性疾患の原因としてとらえた成績であり[12-22]，毒性カビの分布に関する知見については国の内外を問わず見あたらない．

そこで著者らは，airborne fungi の中にマイコトキシン産生糸状菌がどの程度存在するかについて調査をおこなったので，その成績について報告する．

実験方法

1. 試料採取

空気試料の採取には，Fig. 1 に示した Mini pump RP-3 型(理研工業，東京)に Field monitor (MHWG-37, pore size 0.45μ, 直径 37mm, Nihon Millipore Ltd., 東京) を内径 5mm のゴム管で連結したものを使用した．Air-sampler はそれぞれ，屋外では地上10～15 mの高さに，屋内では床上 120cm の高さに設置した．試料の採取は1974年3月より10月にいたる間で，雨天の日を避け，10時より16時の間に行なった．採取の回数は Table 1 に示したように，屋外試料としては，当研究所の屋上の一地点を定点観測点として43回，都内23区の各1地点を各1回計23回，また屋内試料としては，4軒の家庭の台所を延べ70回と都内の食品製造工場の製品保管倉庫の1地点を計10回行なった．なお，この sampler の一回の吸引空気量は 270l/3h であった．

2. 糸状菌の分離

吸引終了後，Field monitor を air-sampler から取り外し，Field monitor 内の air filter を無菌的に取り出し，25% glucose 含有 potato dextrose agar (PDA) 平板培地に置き，25°C で8日間培養した．その間に平板培地上に出現した糸状菌集落 (Fig. 2) を算出したのち，各集落を純粋分離した．これらの分離株は常法[23]に従って菌種の同定を行なった．

なお，分離培養に上記平板培地のみを用いたのは，air filter が1枚であるためレプリカ法による検出菌数

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

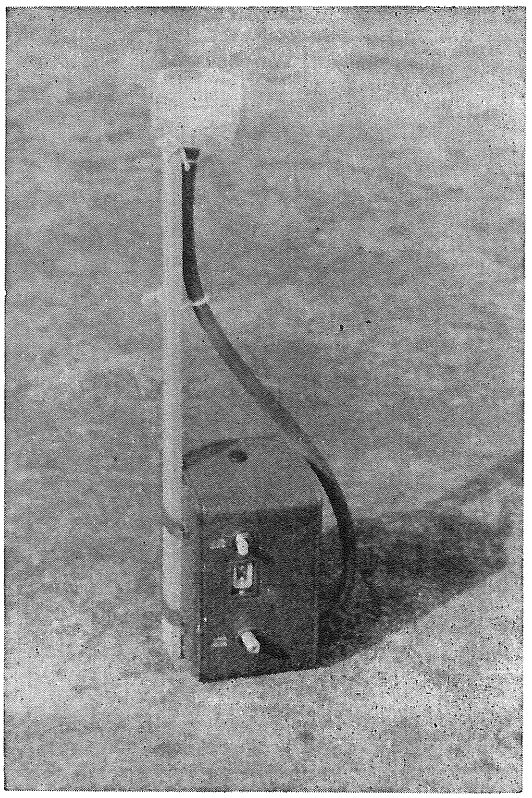


Fig. 1. Air Sampler

の誤差を避けるためと osmophilic fungi の分離をも考慮したためである.

3. 分離菌のマイコトキシン産生試験

分離した糸状菌のうち, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. sydowi* および *Fusarium* spp. などは前報[2]の記載に従い, それぞれ培地中における毒素産生能を調べた. すなわち, aflatoxin 産生用には各 10m*l* の low salt broth[23] (SL), ochratoxin A および sterigmatocystin 産生用には各 10m*l* の yeast extract sucrose broth[24] (YES), Fusarium toxin 産生用には各 10m*l* の 1% peptone 含有 Czapek solution[25] を用い, それぞれ PDA 斜面培地で25°C, 10日間培養した被検菌の胞子一白金耳量を接種した. これらの培地は, aflatoxin および ochratoxin A 産生用には 8 日間, sterigmatocystin の産生用には12日間, また Fusarium toxin 産生用には20日間, それぞれ培養した.

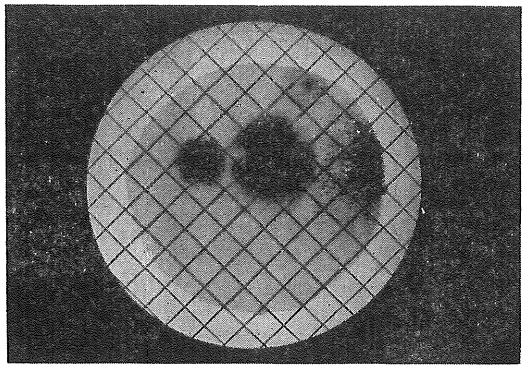


Fig. 2.

培養終了後, 高圧滅菌し, 各 10m*l* の chloroform を加え, 40°C 加温抽出を行ない, さらにこの chloroform 層を無水硫酸ナトリウム中で脱水ろ過したのち, 減圧濃縮により乾固した. これに methanol：1%食塩水 (45：55) 5m*l* および n-hexane 5m*l* を加え, 振とう後 n-hexane を除去し, chloroform 5m*l* を用いて再抽出し,

Table 1. Number of Samples on Each Sampling Site

Sampling site	March	April	May	June	July	August	September	October	Total
Site A indoor	5	5	—	—	5	—	—	—	15
〃 B 〃	5	5	—	—	5	—	—	—	15
〃 C 〃	5	5	3	2	1	4	—	—	20
〃 D 〃	5	5	5	—	1	4	—	—	20
〃 E 〃	—	—	—	9	1	—	—	—	10
〃 F outdoor	10	11	—	—	7	13	2	—	43
〃 G 〃	—	—	—	—	—	—	16	7	23
Total	30	31	8	11	20	21	18	7	146

Sites A-D ; Each of A-D represents the kitchen of individual home.
E ; Warehouse of food factory.
F ; Fixed point for outdoor.
G ; Each one of 23 wards in Tokyo.

Table 2. Frequency of Occurrence of Fungal Species in the Air

Fungus	Fixed point for out door (%)	In door at home (%)	Each one of 23 wards (%)	Warehouse of food factory (%)	Total (%)
Penicillium frequentans	2 (0.4)	110 (8.7)			112 (4.6)
P. funiculosum	14 (2.5)	92 (7.3)			106 (4.4)
P. variabile	7 (1.3)	39 (3.1)			46 (1.9)
P. rubrum	7 (1.3)	17 (1.3)			24 (1.0)
P. roquiforti	7 (1.3)	3 (0.2)			10 (0.4)
P. citrinum	1 (0.2)	7 (0.6)			8 (0.3)
P. spinulosum		6 (0.5)			6 (0.3)
P. viridicatum		5 (0.4)			5 (0.2)
P. chrysogenum		3 (0.2)			3 (0.1)
P. implicatum		1 (0.1)			3 (0.1)
P. fellutanum		2 (0.2)			2 (0.1)
P. oxalicum		2 (0.2)			2 (0.1)
P. cyclopium		2 (0.2)			2 (0.1)
P. palitans		1 (0.1)			1
P. decumbens		1 (0.1)			1
P. citreo-viride		1 (0.1)			1
P. ruglosum		1 (0.1)			1
P. spp.	78 (13.9)	264 (20.9)	112 (24.5)	59 (38.6)	513 (21.1)
Sub-Total	118 (21.1)	557 (44.1)	112 (24.5)	59 (38.6)	846 (34.8)
Cladosporium cladosporioides	112 (20.0)	144 (11.4)	56 (12.2)	22 (14.4)	334 (13.7)
C. cucumerinum	76 (13.6)	108 (8.5)	92 (20.1)	15 (9.8)	291 (12.0)
C. sphaerospermum	25 (4.5)	92 (7.3)	15 (3.3)	6 (3.9)	136 (5.7)
C. macrocurpum	9 (1.6)		13 (2.8)		22 (0.9)
C. herbarum	2 (0.4)	8 (0.6)	1 (0.2)		11 (0.5)
C. spp.		1 (0.1)	1 (0.2)		2 (0.1)
Sub-total	224 (40.1)	353 (27.9)	178 (38.8)	43 (28.1)	792 (32.8)
Aspergillus versicolor	8 (1.4)	132 (10.4)	20 (4.4)	2 (1.3)	162 (6.7)
A. niger	13 (2.3)	5 (0.4)	8 (1.8)	15 (9.8)	41 (1.7)
A. awamori	15 (2.7)		2 (0.4)		17 (0.7)
A. flavus	8 (1.4)	5 (0.4)	3 (0.7)		15 (0.6)
A. chevalieri		7 (0.6)	1 (0.2)		8 (0.3)
A. repens	2 (0.4)	5 (0.4)			7 (0.3)
A. sydowi	1 (0.2)	2 (0.2)	2 (0.4)	1 (0.3)	6 (0.3)
A. amsterodami		3 (0.2)	3 (0.7)		6 (0.3)
A. ruber	3 (0.5)		2 (0.4)	1 (0.7)	6 (0.3)
A. terreus	3 (0.5)	2 (0.2)	1 (0.2)		6 (0.3)
A. ochraceus	1 (0.2)	3 (0.2)	1 (0.2)		5 (0.2)
A. fumigatus	2 (0.4)	1 (0.1)	1 (0.2)		4 (0.2)
A. clavutus		1 (0.1)	1 (0.2)	1 (0.7)	3 (0.1)

Fungus	Fixed point for out door (%)	In door at home (%)	Each one of 23 wards (%)	Warehouse of food factory (%)	Total (%)
A. japonicus	1 (0.2)	1 (0.1)			2 (0.1)
A. candidus	1 (0.2)				1
A. spp.		4 (0.3)	1 (0.2)		5 (0.2)
Sub-total	58 (10.4)	171 (13.5)	46 (10.0)	20 (12.9)	295 (12.1)
Alternaria alternata	24 (4.3)	8 (0.6)		4 (2.6)	36 (1.5)
A. spp.	61 (10.9)	40 (3.2)	36 (7.9)	6 (3.9)	143 (5.9)
Sub-total	85 (15.2)	48 (3.8)	36 (7.9)	10 (6.5)	179 (7.4)
Pestalotia spp.	10 (1.8)	36 (2.8)	12 (2.6)		58 (2.4)
Wallemia	2 (0.4)	32 (2.5)	3 (0.7)	12 (7.8)	49 (2.0)
Fusarium	11 (2.0)	19 (1.5)	6 (1.3)		36 (1.5)
Arthrinium	11 (2.0)	2 (0.2)	3 (0.7)	1 (0.7)	17 (0.7)
Trichoderma	4 (0.7)		9 (2.0)		13 (0.5)
Phoma		7 (0.6)	5 (1.1)	1 (0.7)	13 (0.5)
Paecilomyces		5 (0.4)	4 (0.9)	2 (1.3)	11 (0.5)
Epicoccum	6 (1.1)			5 (3.3)	11 (0.5)
Nigrospora	3 (0.5)		7 (1.5)		10 (0.4)
Curvularia	2 (0.4)		2 (0.4)		4 (0.2)
Tolura		3 (0.2)	1 (0.2)		4 (0.2)
Rhizopus	2 (0.4)				2 (0.1)
Botrytis	1 (0.2)	1 (0.1)			2 (0.1)
Other fungi	22 (3.9)	26 (2.1)	34 (7.4)		38 (3.8)
Yeast		4 (0.3)			4 (0.2)
Total	559	1,264	458	153	2,434

methanol 除去後 chloroform 層を濃縮乾固し，再度 0.5m*l* の chloroform に溶解した．この画分の含有毒素量を薄層クロマトグラフィにより測定した．

実験成績

1. 検出糸状菌の菌種分布

146試料から分離した合計 2,434 株 (0～93 colonies/sample，平均16株/sample) のカビおよび酵母の菌種分布を Table 2 に示した．これらのカビは17以上の菌属にわたって分布がみられた．

検出頻度の高い菌属としては *Penicillium* 34.8% (846株)，*Cladosporium* 32.8% (792株)，*Aspergillus* 12.1% (295株)，*Alternaria* 7.4% (179株)，などであった．その他に *Pestalotia* 2.4% (58株)，*Wallemia* 2% (49株)，*Fusarium* 1.5% (36株) およびその他のいずれも1%以下の10菌属がみられた．

これらの分離株の中の優先菌種は *Cladosporium cladosporioides* 13.7% (334株)，*C. cucumerinum* 12% (291株) および *Aspergillus versicolor* 6.7% (162株) であった．その他比較的多数認められた菌種は，*C. sphaerospermum* 5.7% (136株)，*Penicillium frequentans* 4.6% (112株)，*P. funiculosum* 4.4% (106株)，*P. variabile* 1.9% (46株)，*A. niger* 1.7% (41株)，*Alternaria alternata* 1.5% (36株) および *P.rubrum* 1% (24株) などであった．

2. 分離株の毒素産生性

上記分離株のうち，14株の *A. flavus*，161株の *A. versicolor*，6株の *A. sydowi*，5株の *A. ochraceus* および36株の *Fusarium* spp. について，毒素産生用培地を用いて，各菌株の毒素産生性を調べた．その結果，Table 3 に示したように，2株の *A. flavus* に aflatoxin B_1 と B_2 の産生を，他の1株の *A. parasiticus* に B_1, B_2, G_1 および G_2 の4種の aflatoxin の産生を認めた．*A. versicolor* の20株は sterigmatocystin を産生したが，6株の *A. sydowi* はいずれも sterigmatocystin 非産

Table 3. Mycotoxin Production of Fungal Isolates

Strain		Toxin produced (μg/ml)		Season	Sampling site
Aspergillus flavus	C4-4	aflatoxin B_1	(6.74), B_2	Spring	Home
A. ochraceus	B4-6	ochratoxin A	(0.37)	〃	〃
A. versicolor	B3-12	sterigmatocystin	(4.50)	〃	〃
〃	D5-30	〃	(1.60)	〃	〃
〃	C3-10	〃	(1.46)	〃	〃
〃	C4-8	〃	(0.78)	〃	〃
〃	C3-13b	〃	(0.50)	〃	〃
〃	C3-16	〃	(0.50)	〃	〃
〃	B4-8	〃	(0.50)	〃	〃
〃	C3-13a	〃	(0.16)	〃	〃
A. versicolor	D8-2	〃	(22.40)	Summer	〃
〃	A7-24i	〃	(2.50)	〃	〃
〃	A7-24j	〃	(1.80)	〃	〃
〃	C8-18b	〃	(0.68)	〃	〃
〃	C8-18a	〃	(0.50)	〃	〃
A. parasiticus	9-9F	aflatoxin B_1 (8.11), B_2, G_1, G_2		Fall	Each one
A. ochraceus	10-21N	ochratoxin A	(35.25)	〃	of 23 wards
A. versicolor	9-91	sterigmatocystin	(12.00)	〃	of
〃	9-28S	〃	(2.75)	〃	Tokyo
〃	9-19S	〃	(2.60)	〃	〃
〃	9-10C	〃	(0.60)	〃	〃
〃	10-20B	〃	(0.50)	〃	〃
〃	9-25T	〃	(0.50)	〃	〃
A. flavus	F7-26	aflatoxin B_1	(0.65), B_2	Summer	Fixed point
A. ochraceus	F8-30	ochratoxin A	(42.75)	〃	for
A. versicolor	F9-6	sterigmatocystin	(2.24)	〃	out door

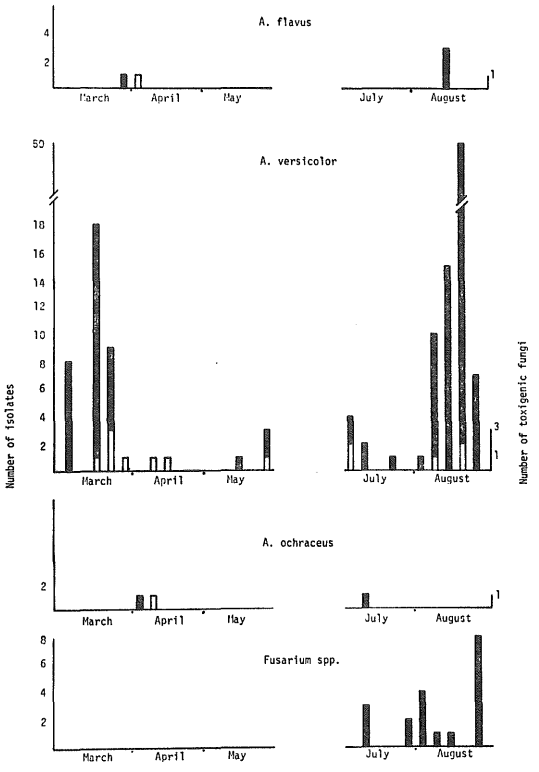
生株であった．また，3株の *A. ochraceus* は ochratoxin A を産生した．

これらの毒性カビのうち，比較的多量の毒素を産生する株としては屋外の定点観測点（Site F）および23区（Site G）のうちの1地点からそれぞれ分離した各1株の *A. ochraceus* にそれぞれ 42μg/ml YES および 35 μg/ml YES の ochratoxin A 産生能を認めた．*A. versicolor* の中では，家庭の台所（Site D）から分離した1株に 22μg/ml YES の産生能を認めた．しかし aflatoxin 産生株の中には特別に見当らなかった．なお，*Fusarium* spp. の36株はいずれも *Fusarium* toxin を産生しなかった．

3. 家庭内の糸状菌分布

都内の任意に選んだ4戸の家庭の台所（Site A, B, C およびD）における平均分離カビ数を Table 2 に示した．それらの地点における春季（3，4および5月）に行なった48回の試料採取の結果，43株のカビおよび酵母を，また，夏季（6，7および8月）に行なった22回の試料採取では 828 株のカビおよび酵母をそれぞれ分離した．これらの分離カビの優先菌種としては *C. cladosporioides* 11.4%（144株），*A. versicolor* 10.4%（132株），*P. frequentans* 8.7%(110株)，*C. cucumerinum* 8.5%（108株），*P. funiculosum* 7.3%（92株）および *C. sphaerospermum* 7.3%（92株），*P. variabile* 3.1%（39株）などであった．

これらの優先菌種の春季における順位は *P. frequentans* 20.7%（90株），*C. sphaerospermum* 17.5%（76株），*C. cucumerinum* 11.8%（51株），*A. versicolor* 9.3%（40株），*P. funiculosum* 5.8%（25株）および *C. cladosporioides* 5.8%（25株）となっており，これ



Schema 1. Distribution of Toxigenic Fungi at the Four Different Homes of Indoor Sampling Sites. Black rod : number of isolates, white rod ; number of toxigenic fungi.

に対し，夏季では *C. cladosporioides* 14.4% (141株), *A. versicolor* 9.6% (94株), *C. cucumerinum* 8.3% (81株), *P. funiculosum* 8.2% (80株), *P. variabile* 4.8% (47株), *P. purpurogenum* 3.7% (33株) および *P. frequentans* 2.6% (25株) の順で，菌種レベルでみた場合は季節的変動が認められる．

毒性カビは3月に5株 (*A. versicolor*)，4月に4株 (*A. flavus*; 1, *A. ochraceus* ; 1 および *A. versicolor* ; 2)，5月に1株 (*A. versicolor*)，7月に3株 (*A. versicolor*) および8月に2株 (*A. versicolor*) の計15株を分離した．その成績を Schema 1 に示した．

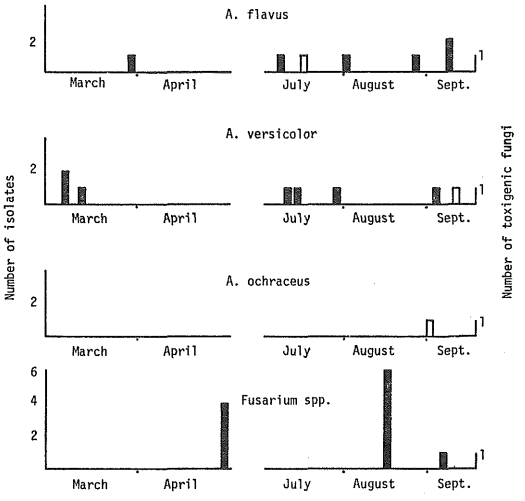
4. 食品製造工場内の糸状菌分布

1974年6月16日より7月1日までの16日間に，都内の食品製造工場の製品保管倉庫 (Site E) において10回の試料採取を行なった．それらの試料から分離したカビは153株で，その成績を Table 2 に示した．菌属として多いものは *Penicillium* 38.6% (59株), *Cladosporium* 28.1% (43株), *Aspergillus* 12.9%(20株), *Wallemia* 7.8% (12株) および *Alternaria* 6.5% (10株) などであった．菌種として同定し得たカビのうち，多いものは *C. cladosporioides* 14.4% (22株), *C. cucumerinum* 9.8% (15株), *A. niger* 9.8% (15株) などであった．なお，2株の *A. versicolor* および1株の *A. sydowi* の中には毒性カビは認められなかった．

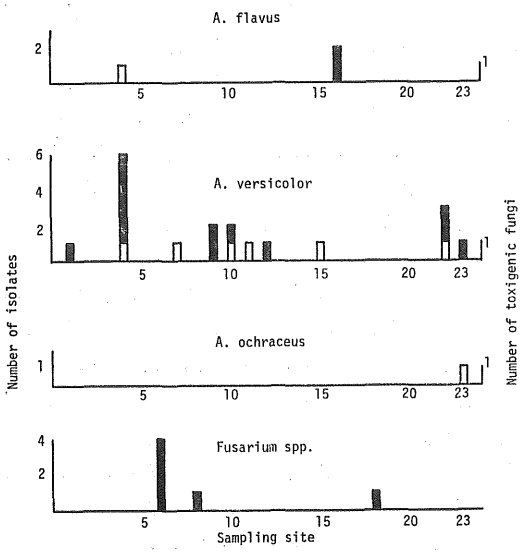
5. 屋外定点観測点における糸状菌分布

屋外の定点観測点 (Site F) では，1974年の春季 (3月および4月) に21回，夏季 (7，8および9月) に22回の試料採取を行なった．その結果，それぞれ199株および360株のカビを分離した．その成績を Table 2 に示した．これらの分離株の優先菌種としては *C. cladosporioides* 20.0% (112株), *C. cucumerinum* 13.6% (76株), *C. sphaerospermum* 4.5% (25株), *A. alternata* 4.3% (24株), *A. awamori* 2.7% (15株), *P. funiculosum* 2.5% (14株) および *A. niger* 2.3% (13株) などであった．

これらの優先菌種の春季と夏季のそれぞれの分布を示すと，春季では *C. cucumerinum* 19.0% (39株), *C. cladosporioides* 18.5% (38株), *C. macrocurpum* 3.9% (8株), *P. roquiforti* 3.4% (7株) および *P. funiculosum* 2.9% (6株)，夏季では *C. cladosporioides* 22.4% (74株), *C. cucumerinum* 10.2



Schema 2. Distribution of Toxigenic Fungi at the Outdoor of Fixed Point. Black rod ; number of isolates, white rod ; number of toxigenic fungi.



Schema 3. Distribution of Toxigenic Fungi at the 23 Wards in Tokyo. Black rod; number of isolates, white rod; number of toxigenic fungi.

% (37株), *A. alternata* 7.9% (24株), *C. sphaerospermum* 7.6% (23株), *P. funiculosum* 3.3% (10株), および *P. variabile* 2.3% (7株) となり, 上位の2菌種と *P. funiculosum* は両季節でほぼ同程度の分布を示したが, その他の菌種は量的にかなりの相違を示した.

また, 毒性カビの分離は7, 8および9月に各1株 (*A. flavus*, *A. ochraceus* および *A. versicolor* 各1株) であった. その成績を Schema 2 に示した.

6. 都内23区の屋外における糸状菌分布

9月5日より10月21日までの47日間に, 都内23区の各1地点 (Site G) で採取した23試料より分離した糸状菌は合計458株であった. その内訳は Table 2 に示したように, 優先菌種としては *C. cucumerinum* 20.1% (92株), *C. cladosporioides* 12.2% (56株) および *A. versicolor* 4.4% (20株) などがみられた. その他 *Penicillium* spp. 24.5% (112株) および *Alternaria* spp. 7.9% (36株) などが多く認められた.

毒性カビは Schema 3 に示したように, 8試料から合計8株(*A. parasiticus*; 1, *A. ochraceus*; 1 および *A. versicolor*; 6) を検出した.

考　察

これまでにわが国で調査された空中カビに関する報告のうち, 比較的近年の例としては朝田[2], 松田[13-15], および高橋ら[17]の報告がある. それらの報告における試料採取, 季節および調査地域などはまちまちであるが, 得られた結論は, いずれも優先菌として *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* および *Alternaria* の4菌属であったとしている.

諸外国の報告例でも, Morrow (U.S.A.)[18], Sandhu (India)[19]および Hyde ら (England)[20] の成績では, 主たる菌属の分布傾向は上記と同じであることを示している. また, Hirsch および Sosman (U. S. A.)[26] は indoor でもこれらの4菌属が多いとしている. しかし, Flensberg (Denmark)[21] や Liebeskind (Israel)[22] の成績では上記4属の中の *Aspergillus* が少なく, 代って *Pullularia*, Yeast および *Fusarium* が多く認められている. Solomon (U.S.A.)[27]はin doorで, 上記4属の他に *Fusarium* も多数認め, out door では *Aspergillus* および *Penicillium* に代って *Fusarium* や *Epicoccum* が多く認められたと述べている.

これらの成績はいずれも airborne fungi をヒトの呼吸器性疾患のあるいはその他の allergy 性疾患の allergen としてとらえた調査成績で, ヒトの生活環境や食品の製造保存における毒性カビの分布を調べる意図は含まれていない.

しかし, Ogunlana (Nigeria)[28] は医薬品や天然薬物の生物的損傷の原因の一つとして airborne fungi を取り上げ, その分布を調べた結果, 上記の報告に見られた優先菌とは異なり, *Alternaria* はみられず, 代って *Curvularia* や *Fusarium* が多かったと報告している.

著者らの今回の成績でも, 優先菌属は *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* および *Alternaria* の4属であった. また, その中の菌種としては *C. cladosporioides*, *C. cucumerium*, *A. versicolor*, *C. sphaerospernum*, *P. frequentans*, *P. funiculosum* などが多く認められ, *Alternaria* 属の中の約 1/6 は *A. alternata* であった. さらに, このように菌種レベルで見ると, in door と out door の差, 季節的および地域的な差がかなり認められた.

一方, 市販の食品の汚染カビとしては上記の4菌属と共に *Wallemia*, *Fusarium*, *Phoma* などもしばしば多数検出されている[1-5,29-38]. このような airborne fungi と foodborne fungi の類似性を, 菌属レベルで見る限りは似ているように思われる. しかし菌種レベルで見ると, その変動の大きさから考えて, 類似点を見出すことは難しい.

これまで airborne fungi としての毒性カビの存在は, 容易に推察できても, 量的・質的な点は不明であっ

た．今回分離した合計2,434株のうち，15株の *A. flavvs*, 162株の *A. versicolor*, 6株の *A. sydowi*, 5株の *A. ochraceus* および36株の *Fusarium* spp. について，それぞれの毒素産生性を検討した結果，3株の *A. flavus*（うち1株は *A. parasiticus*），20株の *A. versicolor* および3株の *A. ochraceus* にそれぞれ毒素産生性を認めた．しかし *Fusarium* 属の中には T-2, Diacetoxyscirpenol および Neosolaniol などの Fusarium toxin 産生株は見出せなかった．これらの毒性カビの検出率はそれぞれ0.12%，0.82%および0.12%で，市販の乾燥食品からの検出率に比べ，いずれもやや低い値ながら *A. versicolor* は他の2菌種に比して圧倒的に多いという傾向は食品の場合と類似していた．

また，毒性カビの分布ではかなりの地域的片よりが見られた．例えば一地点を5カ月間にわたって調査し分離した559株の中に見出された毒性カビはわずか3株であった．これに対し，23地点を約40日の間に各々1回調査して分離された458株の中には8株の毒性カビが認められた．これら両者の検出率はそれぞれ0.54%と1.75%で著るしい差異が認められる．また，4戸の家庭内を5カ月間調査して得た結果では，out door 由来の毒性カビの検出率が0.54%であるのに対し，家庭の in door のそれは1.19%とかなりの距りが見られた．このことは Solomon[27] や Fraizer[6] も述べているように，airborne fungi の量的な面では out door に比し in door は遙かに多く，その理由としてマット，家具，食物，air conditioner など多くの原因が考えられる．さらに家庭内では紫外線の影響も少なく out door に比して毒性カビも含めた糸状菌類の生存・増殖に良好な環境を形成していると思われる．したがって食品およびその加工品類の糸状菌（殊に毒性カビ）の二次汚染の機会は out door よりも in door の方が遙かに多いと考えられる．

結　論

食品のマイコトキシン汚染における汚染源の1つとして，8カ月間にわたり大気中の毒性カビ分布を調べた．

屋内および屋外の29カ所において採取した146回の空気試料から2,434株のカビおよび酵母を分離し，毒性カビとして *A. flavus* 2株，*A. parasiticus* 1株，*A. ochraceus* 3株および *A. versicolor* 20株の計26株を検出した．これらの株は屋外より屋内に多く認められた．

文　献

1) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺　浩：東京衛研年報，24，41，1972
2) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺　浩，倉田　浩，一戸正勝：食衛誌，14，364，1973
3) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺　浩：東京衛研年報，25，17，1974
4) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺　浩：東京衛研年報，26-1，30，1975
5) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，善養寺　浩，辺野喜正夫：東京衛研年報，27-1，36，1976
6) Fraizer, W. C. : *Food Microbiology* 2nd ed. 63, 1967, TataMcGraw-Hill Publishing, New Delhi
7) 高鳥浩介，高橋恵子，宇田川俊一，倉田　浩：マイコトキシン，1，20，1975
8) Tsuruta, O. and M. Manabe : *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 16, 190, 1975
9) 宇田川俊一：マイコトキシン，2，10，1976
10) 真鍋　勝，鶴田　理，田中健治，松浦慎治：マイコトキシン，3/4，31，1976
11) Joffe, A. Z. : *Nature*, 221, 492, 1969
12) 朝田康夫：真菌と真菌症，4，129，1963
13) 松田良夫：関西医大誌，21，401，1969
14) 松田良夫：関西医大誌，21，526，1969
15) 松田良夫：関西医大誌，21，558，1969
16) 中山喜弘：真菌と真菌症，7，156，1966
17) 高橋昭三，谷江澄子：真菌と真菌症，15，3，1974
18) Morrow, M. B., G. H. Meyer, and M. E. Prince : *Allergy*, 22, 575, 1964
19) Sandhu, D. K., D. N. Shivpuri, and R. S. Sandhu : *Ann. Allergy*, 22, 374, 1964
20) Hyde, H. A., M. Richards, and D. A. Williams : *Br. Med. J.*, 1, 886, 1956
21) Flensberg, E. W. and T. Sansome-Jensen : *Acta Allergol.*, 3, 49, 1950
22) Liebeskind, A. : *Ann. Allergy*, 23, 158, 1965
23) Reddy, T. V., L. Viswanathan, and T. A. Venkitasubramanian : *Appl. Microbiol.* 22, 393, 1971
24) Davis, N. D., U. L. Diener, and D. W. Eldridge : *Appl. Microbiol.* 14, 378, 1966
25) Ueno, Y., Y. Ishikawa, K. Saito, and H. Tsunoda : *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 304, 1970
26) Hirsch, S. R. and J. A. Sosman : *Ann. Allergy*, 36, 30, 1976
27) Solomon, W. R. : *J. Allergy Clin. Immunol.* 56, 235, 1975
28) Ogunlana, E. O. : *Appl. Microbiol.*, 29, 458, 1975

29) 小笠原和夫，砂川紘之，赤城幾代，梅村康子：北海道衛研所報，**26**，37，1976
30) 小笠原和夫，砂川紘之，赤城幾代，森　量夫：同上，**27**，43，1977
31) Bennet, G. A., A. J. Peplinski, O. L. Brekke, and L. K. Jackson : *Cereal Chem.*, **53**, 299, 1976
32) Hesseltine, C. W. : *Mycopath. et Mycol. Applic.*, **53**, 141, 1974
33) Eppley, R. M., L. Stoloff, M. W. Trucksess, and C. W. Chung : *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **57**, 632, 1974
34) 鶴田　理，杉本貞三，南沢正敏，真鍋　勝：*Trans. Mycol. Soc. Japan*, **15**, 258, 1974
35) 一戸正勝，高鳥浩介，倉田　浩：*Tottori Mycol. Inst.*, **10**, 627, 1973
36) 諸岡信一，裏辻憲昭，芳沢宅実，山本弘幸：食衛誌，**13**，368，1972
37) Husain, S. S. and M. A. Ahmed : *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, **14**, 137, 1971
38) Mirocha, C. J., C. M. Christensen, and G. H. Nelson : *Appl. Microbiol.*, **15**, 497, 1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 95—100, 1978

東京築地市場に入荷した日本近海産「サクラマス」(*Oncorhynchus masou*)における広節裂頭条虫プレロセルコイドの検索成績

村田以和夫*, 大久保暢夫*, 山田満**, 金井日出夫**
林滋生***

A Survey on the Infection with Plerocercoids of *Diphyllobothrium latum* in *Oncorhynchus masou* obtained from Tsukiji Central Market, Tokyo

IWAO MURATA*, NOBUO OHKUBO*, MITSURU YAMADA**, HIDEO KANAI**
and SHIGEO HAYASHI***

はじめに

わが国における広節裂頭条虫 *Diphyllobothrium latum* に関する研究は，最初，飯島[1] (1889)，江口[2] (1929～1933)らによってなされてきたが，以後およそ30年間，江口[3] (1964)が総説として報じているものの他に文献が見当らない．しかし，最近になって，吉村ら[4-6] (1974～1976) を始めとして数多くの報告[7-20]がなされている．これら報告の中で取り扱われている患者数だけでも秋田5例，新潟74例，長野30例，石川82例，愛媛1例，東京2例，合せて194例をかぞえ，潜在患者数はかなりのものと推定される．また大島ら[21] (1977) は，横浜市場に入荷したサクラマスの Plerocercoid (Plero と略) の寄生状況を調査し，26.6% (マス1尾平均2.67隻) の寄生率を報告している．このことは，現代の鮮魚類の流通状況から，東京においてもあてはまるものと考えられ，また，亀谷ら[22] (1976) は，東京都内の一女学生に，人体寄生例としてはまれな，広節裂頭条虫の多数寄生が認められたことを報告し，感染源としてマスズシを指摘していることなどから，公衆衛生上重大な課題を提供していると思われる．そこで今回，日本近海において漁獲量も多く，広節裂頭条虫の Plero 寄生率が高いといわれるサクラマスについて，Plero の検索を行ない，さらに検出した Plero を用いて感染実験を試み，興味ある成績を得たので報告する．

材料および方法

材料：1978年3月から6月にかけて，北海道，青森，秋田，山形，新潟，富山の6県，8地域におよぶ各水揚げ地より東京築地市場に入荷したサクラマス，*Oncorhynchus masou* の氷詰め鮮魚，計170尾を被検体とした．

方法：氷詰めサクラマスは購入日のうちに，包丁で三枚におろし，尾部より薄切にしながら肉眼により筋肉中の Plero を検索し，ピンセットを用いて注意深く取り出した後，0.4%生理食塩液を入れたシャーレーに移し，実体顕微鏡下で魚体別に観察した．一部を圧扁標本とし，また一部を70%の Hot Ethanol で1次固定，Carnoy 液で2次固定して虫体長と体幅を計測した．感染実験には，イヌ1頭とハムスター4匹を用いて，イヌには非被のう Plero 8隻，ハムスターは2匹ずつ2群に分けて，それぞれ，被のう Plero 4隻，非被のう Plero 4隻ずつ経口投与して，糞便中の排卵を確認した後，投与後23日後と50日後に各群1匹ずつ剖検して，成虫の回収を試みた．また剖検時の腸内容と飼育時の1日排泄便について Eggs par Gram (EPG と略) を Stoll 法により算定し，回収された成虫体については頭部と体部および尾端部の一部を圧扁標本として同定に用いた．Plero の検索は地域別 (Fig. 1) 魚の体長，体重別，および寄生部位 (P-1) 別に寄生数と寄生率および被のうの有無について形態学的検討を加えながら行なった．

* 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
** 東京市場衛生検査所
***国立予防衛生研究所寄生虫部

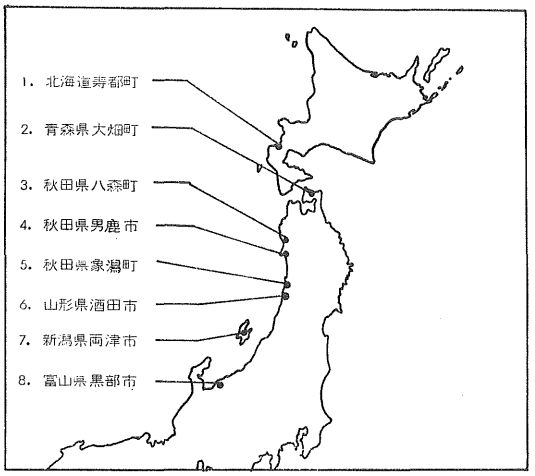
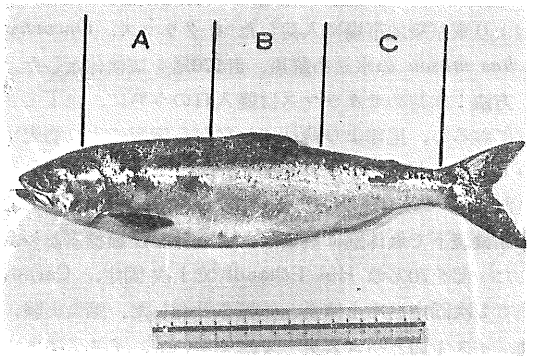


Fig. 1. 東京築地市場に入荷したサクラマスの水揚地域図

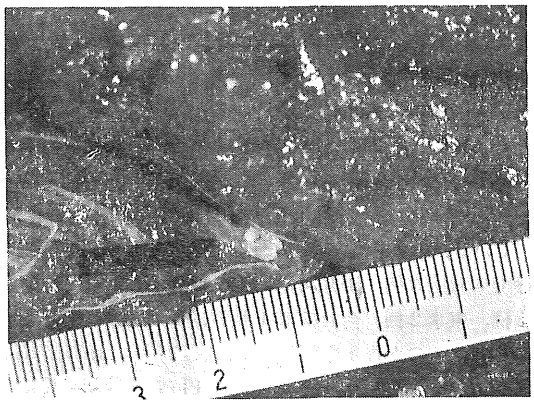


P-1. サクラマス (*Oncorhynchus masou*) の Plerocercoid 寄生部位区分

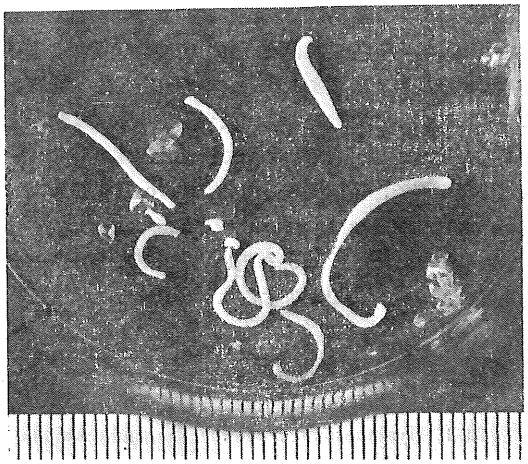
成　　績

広節裂頭条虫 Plerocercoid の検出成績

Table 1 に示されるように，Plero の寄生率は，秋田県象潟町に水揚げされたサクラマスが54.2%と最も高く，24例中13例に，次いで山形県酒田市に水揚げされたものは，ほぼ同率の54.1%，37例中20例から Plero が検出された．また，秋田県男鹿市水揚げのものからは20例中10例に Plero が検出され，寄生率は50%を示し，この3地域の Plero 寄生率は他の地域と比較して特に高率であった．他の5地域から入荷したサクラマスの寄生率は，富山県黒部市のものが14例中5例，35.7%，青森県に近い秋田県八森町のもの20例中6例，30%，青森県大畑町のもの，18例中5例，27.5%，新潟県両津市のもの，9例中2例，22.9%と次第に低下し，最も寄生率の低いものは，北海道寿都町より入荷のサクラマスで28例中5例，17.8%であった．全体の寄生率は，170例中66例から Plero が検出され38.8%を示した．Plero の寄生率には，北海道から富山県にかけて，日本海側各県各地ごとに地域差が認められ，秋田県象潟町を中心に近距離地域の寄生率が著しく高いことが明らかとなった．一方，Plero が検出されたサクラマス1尾当りの寄生数は1隻から最高22隻と幅があり，平均寄生数で比較すると，新潟県両津市より入荷のものが最も多く6.0隻，次いで山形県酒田市のものが4.0隻，秋田県男鹿市のもの3.2隻，北海道寿都町，秋田県八森町，富山県黒部市より入荷のものはともに2.8隻の順であった．青森県大畑町水揚げのものは1.6隻と最も低い平均寄生数を示し，全体の平均寄生数は3.6隻であった．サクラマスの体長，体重と寄生率および寄生数との間には特筆すべき関



P-2. サクラマスの筋肉中の Plerocercoid



P-3. シャーレーに取り出した Plerocercoid

係が認められず，地域差のみが明らかとなった．（検出 Plero を P-2 と P-3 に示す.）

つぎに，Plero の寄生部位を頭部より背びれ前端までをA，背びれ前端より肛門までをB，肛門より尾端までをCとして検討した結果，C部の寄生率が最も高く61.7%，次いでB部30.0%，B部とC部の合計では91.7%を示し，一方，A部の筋肉中から検出された Plero は5.8%にすぎず，残り6隻は，剖検時に包丁の刃に付着して検出されたために寄生部位を確認することができなかった．特に，BとC部では，“背びれ”または“あぶらびれ”直下の筋層に多く Plero が検出されたことと，寄生部位による寄生率の差は，どの水揚げ地域でも同様であったことは特筆される．また，臓器内の検索も同時に行なったが，広節裂頭条虫の Plero は，まったく検出されなかった．その他，人体とかかわりのある寄生虫としては，アニサキスⅠ型幼虫が秋田県象潟町と山形県酒田市より入荷したサクラマスのA部筋肉内からそれぞれ1例ずつ検出された．

被のう Plerocercoid の検出成績 Table 2 に示すように，被のう Plero の検出率は，全体で27.9%を示し，地域別には，秋田県男鹿市より入荷のサクラマスが53.1%と最も高く，次いで，山形県酒田市のもの，37.5%，富山県黒部市のもの35.7%，新潟県両津市のもの25.0%，北海道寿都町のもの21.4%，秋田県八森町，秋田県象潟町のものがそれぞれ11.8%，11.1%の検出率を示した．一方，青森県大畑町より入荷したサクラマスからは全部で8隻の Plero が検出されたが，被のう Plero はまったく検出されなかった．サクラマスの被のう形成率は，やや被のう Plero の検出率と異なり，山形県酒田市から入荷のものが43.2%と最も高く，次いで秋田県男鹿市35.0%，新潟県両津市，富山県黒部市，秋田県象潟町水揚げのものはともに20%台，北海道寿都町，秋田県八森町水揚げのものはともに10%台の被のう形成率を示し，それぞれ地域差が認められた．

ハムスターおよびイヌに対する Plero の感染実験 山形県酒田市で水揚げされたサクラマスから摘出した

Table 1. 築地市場に入荷した日本近海産サクラマスからの広節裂頭条虫プレロセルコイドの検出成績（昭和53年3月～6月）

水揚地（検査月日）	例数	体長 cm（平均値）	体重 g（平均値）	寄生率 %（寄生数）	検出プレロセルコイド数 総数／寄生検体数（平均値）	偏差	部位別寄生数(%) A	B	C	部位不明（その他）
北海道 寿都町（3月8日）	28	20.0—39.5 (32.9)	255—620 (363.1)	17.8 (5／28)	14／5(2.8)	0—7	1／14	4／14	9／14	
青森県 大畑町（5月10日）	18	34.0—38.0 (36.5)	400—565 (483.1)	27.8 (5／18)	8／5(1.6)	0—3	0／8	2／8	6／8	
秋田県 八森町（3月22日）	20	33.0—48.5 (32.6)	360—570 (455.1)	30.0 (6／20)	17／6(2.8)	0—7	2／17	5／17	10／17	
秋田県 男鹿市（3月29日）	20	32.0—39.0 (35.8)	380—640 (467.4)	50.0 (10／20)	32／10(3.2)	0—15	2／32	9／32	21／32	
秋田県 象潟町（3月15日）	24	30.5—36.0 (31.1)	300—465 (349.3)	54.2 (13／24)	63／13(4.9)	0—17	5／63	17／63	35／63	6／63（アニサキスⅠ型-1）
山形県 酒田市（4月12・19日）	18 19*	32.5—40.0 (36.3)	425—600 (507.8)**	54.1 (20／37)	80／20(4.0)	0—22	4／80	30／80	46／80	（アニサキスⅠ型-1）
新潟県 両津市（6月5日）	9*	33.5—40.5 (37.5)	370—620* (503.9)	22.2 (2／9)	12／2(6.0)	0—11	0／12	2／12	10／12	
富山県 黒部市（5月22日）	14	35.0—40.0 (38.1)	440—640 (562.5)	35.7 (5／14)	14／5(2.8)	0—5	0／14	3／14	11／14	
合計	170	29.0—48.5 (35.1)	255—640 (455.5)**	38.8 (66／170)	240／66(3.6)	0—22	14／240 (5.8)	72／240 (30.0)	148／240 (61.7)	6／240 (2.5)

注：* 内臓摘出後入荷例数（平均値には算入しない） ** 全魚体重のみの平均値

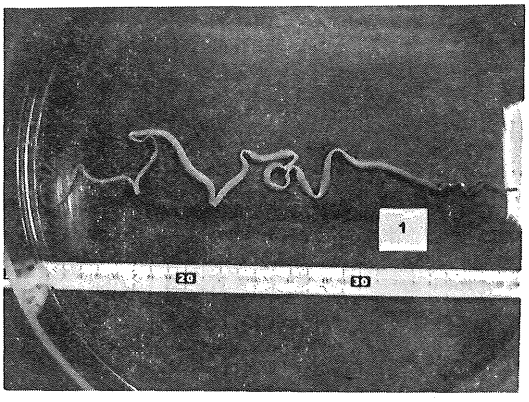
Toble 2. サクラマスからの広節裂頭条虫被のう Plerocercoid の検出成績

水揚地域	検査数	被のう Plero 数／全検出 Plero 数	被のう率	サクラマスの包のう形成率（例数）
北海道寿都町	28	3 ／ 14	21.4%	10.7%（ 3／28）
青森県大畑町	18	0 ／ 8	0.0	0.0 （ 0／18）
秋田県八森町	20	2 ／ 17	11.8	10.0 （ 2／20）
秋田県男鹿市	20	17 ／ 32	53.1	35.0 （ 7／20）
秋田県象潟町	24	7 ／ 63	11.1	20.8 （ 5／24）
山形県酒田市	37	30 ／ 80	37.5	43.2 （16／37）
新潟県両津市	9	3 ／ 12	25.0	22.2 （ 2／ 9）
富山県黒部市	14	5 ／ 14	35.7	21.4 （ 3／14）
	170	67 ／ 240	27.9	22.4 （38／170）

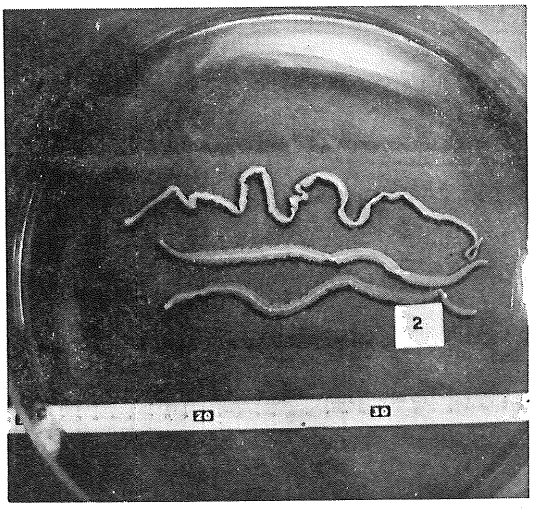
Table 3. 広節裂頭条虫 Plerocercoid のハムスターおよび犬に対する感染実験成績

群	実験動物	例数	感染 Plerocercoid		成虫回収数 （%）		Eggs per Gram	
			被のうの有無	数	感染後23日目・50日目		23日目・40日目	
I	ハムスター	2	有	4	3 (75.0)	0 (0.0)	27,450／g*	11,600 g**
II	ハムスター	2	無	4	1 (25.0)	0 (0.0)	1,250／g	0／g
III	イ ヌ	1	無	8	実施せず		40日目まで検出せず	

注 * 剖検時の腸内容1 g当りの虫卵数
** 剖検前40日目の1日排出便1 g当りの虫卵数



P-4. 非被のう Plerocercoid 感染ハムスターより回収した広節裂頭条虫の成虫



P-5. 被のう Plerocercoid 感染ハムスターより回収した広節裂頭条虫の成虫

被のう Plero と非被のう Plero を2群4匹のハムスターに，それぞれ4隻ずつ経口投与した成績を Table 3 に示す．投与して18日後より排泄便中に広節裂頭条虫が2群ともに認められ，また23日後に各群1匹のハムスターを剖検し，伸長時の体長が約 60cm の小型成虫（P-4 および P-5）を得た．被のう Plero を投与した例からは，3隻の成虫体を回収し，非被のう Plero を投与し

た例からは，1隻の成虫体と約 3cm の幼若虫体1隻を得た．さらに，剖検時の腸内容について EPG を調べた結果，被のう Plero を投与した例では 27,450 個/1g，非被のう Plero を投与した例では1,250個/1g の広節裂頭条虫卵数を算定した．残りの各群1匹ずつのハムスターを50日後まで飼育し，40日後の1日排泄便について EPG を調べた結果，被のう Plero を投与した例では 11,600 個/1g の虫卵を算出したが，非被のう Plero を投与した例では全く虫卵の排出を認めなかった．50日後にこの2匹を剖検して成虫体の回収を試みたが，1隻の虫体も回収することができなかった．

イヌに対する感染実験では，すでに宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii* を感染させ，本虫卵検出済みの成犬1頭に対して，非被のう Plero 8隻を魚肉にはさんで経口投与して，重複感染の可否について検討したが，投与後40日を経過しても，広節裂頭条虫卵を検出し得なかった．

考　察

日本近海産サクラマスからの広節裂頭条虫 Plerocercoid 検出率は，水揚げ地域によりかなりの地域差があることが明らかとなった．今回検索を行なった例はすべて海産のサクラマスで，帰川本能にもとづく特定の河川を推定することはできなかったが，少なくとも漁法がハエナワか一本釣り漁法により捕獲されたものと考えられるので，漁業関係者間で一般的にいわれている「地先の漁」とみなすことができよう．これまで，症例報告やマス類の検索成績は，秋田，新潟，長野，石川県などでなされ，それぞれに興味ある成績を示していることと，今回の成績に表われた地域差は，潜在患者の多少と何らかの関係を意味するものと思われる．広節裂頭条虫症の潜在患者に対する今後の検討は，沂上期のサクラマス（カワマス）またはヤマメ(べ) *Oncorhynchus masou var. ishikawae* を調査対象としてとらえ，特定の河川を定めて地域住民の虫卵検査と第1中間宿主の調査をあわせて行なう必要があろう．東京都内においては，地方出身者も多く，マスズシ(富山)，サシミ(山形)，ルイベ（北海道）のような，生食に近い郷土料理を好む者も少なくない．加えて鮮魚としてのサクラマスの入荷量[24]も多く，Plero の寄生率の高さを考慮すると，亀谷ら[22]の報告以外に多数の潜在患者がいるものと推定される．そこで今後は，学校保健法で定められている学童の寄生虫卵検査のほかに，林[23]が宮崎肺吸虫症の患者の分析結果から指摘しているように高級料理店に出入可能な客層や，食生活の嗜好性に重点をおいて，大人を対象とする潜在患者の調査が必要となろう．

これまで，被のう Plero の検出率については，0％から 85.7％までの様々な報告[1,3,6,20,21]がなされているが，著者らの成績でも，地域によりまったく被のう形成が認められない例から，43.2％の被のう形成を認めた例までかなりのひらきがあった．江口[2]は，被のう形成は主として宿主側の組織反応によると記述しているが，被のう形成と感染能力との間にどのような関係があるかについて言及していない．今回行なった感染実験では，例数も少なく不十分な成績ではあるが，被のう Plero 投与群と，非被のう Plero 投与群に認められた成虫回収率と EPG の極端な差は，被のうの有無が何らかの感染成立要因をなすものと示唆される．しかし，通常は魚肉ごと食されて感染が成立するので，本実験系に認められたような極端な差は認められないのかも知れないが，少なくとも被のうは，吉村[6]らが感染実験に用いたゲラチンカプセルのような，胃液の消化作用に拮抗する効果はあるものと思われる．一方，サクラマスの被のう形成の有無は Plero の種に相違がある場合も想定されるので，今後検討してみたい．

実験動物の適否については，成犬より幼犬の方が良いとする記述[2]もあり，また，千葉ら[20]および著者らの経験から，広節裂頭条虫の感染実験にはハムスターが推奨される．しかしながら，40日以上の飼育期間は自然排虫の危険が伴なうことを留意する必要がある．

Plero の抵抗性については，氷詰めおよび塩詰め－1°C～4°C 保存に対してはかなり強く，感染予防には－10～－20°C以下の冷凍保存が有効であるとの江口の報告[3]がある．しかし，酢酸に対する抵抗性については，まったく記載がなく，マスズシから感染したといわれる例もあるので，今後，検討の余地がある．

人体への感染源としては以上触れたように，氷詰め鮮魚として取り引きされるサクラマスおよびホンマスが主要なものといえよう．しかし，－20°C以下の冷凍マスを除いては，保存条件や加熱条件によっては塩マスも感染源となり得るものと考えられ，寄生虫症が激減したといわれる現在でも，本症の感染機会は予想以上のものといえよう．

ま と め

1978年3月から6月までの間，全国各地から東京築地市場に入荷した日本近海産サクラマスについて，広節裂頭条虫 Plerocercoid の検索を行なった結果，

1. Plero の寄生率は全体で38.8％を示し，地域別では，秋田県象潟町，山形県酒田市および秋田県男鹿市に水揚げされたサクラマスがともに50％台と最も高く，次いで富山県黒部市と秋田県八森町から入荷のものが30％

台，青森県大畑町と新潟県両津市より入荷のものが20%台の順であった．最も寄生率の低いものは，北海道寿都町より入荷のサクラマスで10%台であった．

2. Plero が検出されたサクラマス1尾あたりの平均寄生数は3.6隻を示し，全サクラマス1尾当りの寄生数は1.4隻，最高は1尾当り22隻を示した．

3. 被のう Plero の検出率は，全検出 Plero に対する被のう率で27.9%を示し，今回検索を行なったサクラマスの22.4%に被のう形成が認められた．

4. Plero の寄生率，被のう率およびサクラマスの被のう形成率には，それぞれ地域差が認められ，総じて予想を上まわる値であった．

5. Plero の寄生部位は，肛門から尾端，次いで背びれ前端から肛門までの部位に多く，それぞれ61.7%と30.0%，合計91.7%の Plero がこの部位に集中寄生していた．

検出 Plero の感染実験をハムスター2群4匹，イヌ1匹を用いて行なった結果，ハムスターでは，被のう Plero 4隻を投与した群の1例から23日後の剖検で3隻の成虫を回収し，剖検時の腸内容の EPG は27,400個/1gを算定し，残りの1例は，50日間の飼育期間中，40日後の1日泄排便で，11,600個/1g の EPG を算定したが，50日後の剖検では成虫を回収できなかった．

一方，非被のう Plero 4隻を感染させた群の1例から，投与後23日目の剖検で1隻の成虫を回収し，腸内容の EPG は1,250個/1g であった．残り1例は，50日の飼育期間中，まったく虫卵を検出し得ず，また，成虫も回収することができなかった．これらの成績から，Plero の被のうの有無が，感染成立の何らかの要因をなしているものと考察され，少なくとも，胃液の消化作用に拮抗するカプセルのような効果があるものと考察された．

謝辞 本研究を行なうにあたり，終始，御指導と御協力をいただいた，国立予防衛生研究所寄生虫部の川中正憲技官をはじめ，加藤桂子技官，児玉邦子技官，遠藤卓郎技官，朝日博子技官，熊田三由技官，ならびに斉藤玲子氏に深く感謝します．

（本研究の概要は，第38回日本寄生虫学会東日本大会，1978年10月14日で発表した．）

文　献

1) 飯島　魁：J. Coll. Sei. Tokyo Imp. Univ., 2, 1, 49, 1929
2) 江口季雄：愛知医学雑誌，29，4，367，1922
3) 江口季雄：日本における寄生虫学の研究，4，346，1964，目黒寄生虫館
4) 吉村裕之，石郷岡清基：日本医事新報，2624，12，1974
5) 吉村裕之，近藤力王至，大西義博，森谷修三，上村清：北陸公衛誌，3，8，1976
6) 吉村裕之，近藤力王至，大西義博，森谷修三，上村清：日本医事新報，2693，22，1975
7) 加茂　甫，山根洋右，前島条士，矢崎誠一：寄生虫誌，Supp. 24，96，1975
8) 中里秀男，荒木恒治，岩田繁雄：寄生虫誌，24，2，8，1975
9) 加藤力王至，吉村裕之，大西義博，上村　清：寄生虫誌，Supp. 25，103，1976
10) 大島智夫，内川公人：寄生虫誌，26，1，10，1977
11) 佐藤淳夫，下中村芳江：寄生虫誌，26，1，10，1977
12) 平井和光，塩飽邦憲，酒井雅博，宮本　武：寄生虫誌，26，2，24 1977
13) 岩田正俊，関　直樹：寄生虫誌，26，2，25，1977
14) 近藤力王至，大西義博，西田和美，吉村裕之，上村清：寄生虫誌，26，2，25，1977
15) 近藤力王至，吉村裕之，西田和美，大西義博，上村清：寄生虫誌，26，4，57，1977
16) 千葉賢保，堀田　猛，関川弘雄，長谷川英男，大鶴正満：寄生虫誌，26，5，23，1977
17) 梶　房子，花川　修，斉藤　晃，山像虎興，斉藤輝子：寄生虫誌，26，6，94，1977
18) 大島智夫，内川公人：寄生虫誌，Supp. 25，32，1976
19) 堀田猛雄，千葉賢保，関川弘雄，長谷川英男，大鶴正満：寄生虫誌，Supp. 27，27，1978
20) 千葉賢保，関川弘雄，長谷川英男，堀田猛雄，大鶴正満：第37回日本寄生虫学会東日本大会口演要旨，15，1977
21) 大島智夫，若井良子：第37回日本寄生虫学会東日本大会口演要旨，5，1977
22) 亀谷　了：寄生虫誌，25，1，16，1976
23) 林　滋生：綜合臨床，24，7，2104，1975，永井書店
24) 東京都：東京中央卸売市場年報，水産物編，184—187，282—285，340—341，1977
25) 新日本動物図鑑：下，180，北隆館，1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 101—106, 1978

ASO 価測定法における Micro 溶血法および凝集法の検討

村 田 以和夫*, 大久保 暢 夫*

Evaluation of Our Modified Micro Method (Micro-Drop-ASO) for Serodiagnosis on Streptococcal Infection

IWAO MURATA* and NOBUO OHKUBO*

はじめに

溶血性連鎖球菌感染症の診断および治療の指標として古くから，Rantz-Randall 法（従来法と略）が繁用されているが，術式が複雑でしかも新鮮な血球を必要とすることなどから，近時，簡便化と能率化をはかる目的で種々の試みがなされている．一つの試みは，従来法すなわち，Antistreptolysin-O（ASO と略）の測定を Micro 法を応用した溶血阻止反応で行なう（富山ら[1]，1972. 飯田[2]ら，1975）ものであり，全く別の試みは，Streptolysin-O を吸着させた *Serratia marcescens* を抗原とする間接凝集反応の開発（辻[3]ら，1972）であり，あるいは，Strepto kinase 吸着間接赤血球凝集反応の応用（熊谷[4]ら，1970）である．飯田[2]ら（1975），大鳥居ら[5]（1975），河合[6]（1976）は主として IgG の毒素中和活性を測定するのが従来法であり，また，IgM と IgG の沈降素活性を測定するのが間接凝集反応であるとして，2種の検査法は全く原理的に異質の反応機構であると報告している．ASO 価測定法には，大別して関与する抗体の相違のほか，反応機構や抗原の相違または，Macro 法と Micro 法の術式や判定基準の相違などがあり，それぞれ得られた成績の解釈に混乱をきたしている．さらに，免疫血清学的に有意とされる2倍希釈の2管差と，従来法の Todd 単位で示される2管差の意義については議論の分かれるところであり，このような混乱を解決するに当り問題を一層複雑なものにしているといえる．一方，臨床検査領域における標準法の設定や，免疫血清学的な診断用試薬類の標準化の必要性が叫ばれている[7,8] 現在，これらの問題点を主として技術的な側面から解明することは，時機をとらえて有意義と思われる．

そこで今回，従来法とMicrotiter®(注1)によるASO価測定法(Micro-ASO と略)，および間接凝集反応を応用した市販の試薬 kit,BLUE-ASO®(注2)との比較検討を行ない，加えて，ダイリューターを使用しない，われわれの考案によるドロッパーを用いての滴数血清希釈で Todd 単位に近似の ASO 価を測定する方法（Micro-Drop-ASO と略）を検討した結果，興味ある成績が得られたので，主として技術面から2・3の考察を加えて報告する．

材料および方法

1. **材料** ASO 価測定の目的で当所あて送付された血清11例，当所の血清銀行に凍結保存中の健康人血清289例，および猩紅熱患者血清73例，計367例を用いた．

2. **方法** a) Rantz-Randall 法は半量法で行ない ASO 価を Todd 単位で表示した．b) Micro-ASO と BLUE-ASO はともに富山[1]らの方法に準じて行なったが，Todd 単位に最も近い ASO 価が得られるように3系列法を採用し，1：3，1：4，1：5の2n 希釈で実施した．c) BLUE-ASO はU型プレートを用い，終末濃度で ASO 価を表わすことになっているが，試みに既報[9]のMicro-TPHA で良好な成績が得られた．市販のダイリューター（注1）とV型プレート（注1）を使用して，血清希釈倍数で ASO 価を表示した．d) 猩紅熱患者血清および健康人血清を用いて得られた抗体価は，それぞれ，Todd Unit と，ASO 価および Drop-Unit で表わされ，近似値の一致性と偏差について検討した．e) 今回われわれが考案した Micro-Drop-ASO は，0.025m*l* と0.05m*l* のドロッパーを用いて，Table 1 のプログラムに従って Drop-Unit を測定し，従来法の Todd Unit と比較した．f) 器具機材面からの改良効果を検討する

* 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. Micro-Drop-ASO Program

Mother Dilution in TPHA macro-Tray by using 0.5m*l* Pipette

	Serum 0.05m*l* / ASO-PBS 0.45m*l* → 0.05m*l* / 0.45m*l* → 0.1m*l* / 0.4m*l*									
Serum Dilution	×10		×100				×500			
Cup No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serum Diluted (0.025m*l* Dropper)	3d	1d	4d	3d	2d	1d	4d	3d	2d	1d
ASO-PBS (0.025m*l* Dropper)	1d	3d	—	1d	2d	3d	—	1d	2d	3d
Streptolysin-O (0.05m*l* Dropper)	1d	1d	1d	1d	1d	1d	1d	1d	1d	1d
	Incubation		37°C				30min.			
2% Red Cell (0.05m*l* Dropper)	1d	1d	1d	1d	1d	1d	1d	1d	1d	1d
	Incubation		37°C				45min.			
Drop Unit	13	40	100	133	200	400	500	667	1000	2000
Todd Unit	12	50	100	125	250	333	500	625	1250	2500
				166				833		

Note : Corresponding Todd Units of 166 and 833 were lacking in this dilution d : No. of drop

ため，市販の FAS-teque System(注2)のU型プレートとダイリューターを使用して，2n 希釈1系列法で Micro-ASO 価とBLUE-ASO 価を測定，比較検討した．

(注1) Cook Engineering 社製

(注2) 富士臓器製薬社製

実験成績

1. 健康人血清における従来法と Micro-ASO の比較成績 Fig. 1 は，横軸に Todd Unit を比例間隔でとり，縦軸に Micro 3 系列法，2n の血清希釈で得られる ASO 価を示し，Todd-Unit と近似する値にアンダーラインを施してある．図の中では，一点鎖線によって示す範囲を通常，血清学的に許容される1管差の範囲とし，細い直線で示す範囲を Todd Unit の1管差許容範囲として表わしている．(以下すべての図表に適用)

従来法と Micro-ASO の比較で，Todd Unit と，近似 ASO 価が一致したものは，294例中89例で 30.3%，Todd Unit 1管差許容範囲のものは，294例中196例で，67.1%を示した．また 2n 希釈で1管差許容範囲のものは，294例中227例 (77.2%) あり，従来法と Micro-ASO の一致性は，有意差の基準をどちらに求めるかは別として，まずまずの成績であった．しかし，最大偏差は管数偏差として9管，希釈系列数で3列に偏差が認められ，なお改善の余地があることが明らかとなった．

2. 健康人血清における従来法と BLUE-ASO の比較成績 Fig. 2 に示すように，Todd Unit と BLUE-ASO 価が一致したものは，294例中28例と少なく，一致率は12.9%にすぎない．Todd Unit で1管差許容範囲のものは，294例中75例 (25.5%)，2n 希釈1管差許容範囲のものは 294 例中 126 例 (42.9%) と少なく，BLUE-ASO の一致性は Micro-ASO と比べてそれぞ

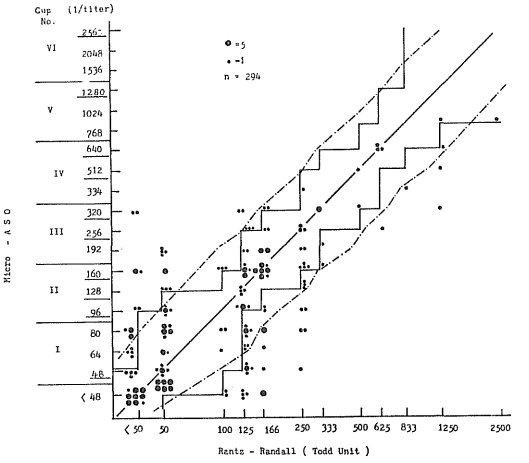


Fig. 1. Comparison of Micro-ASO titer and Todd Unit obtained by Micro-ASO and Rantz-Randall Method

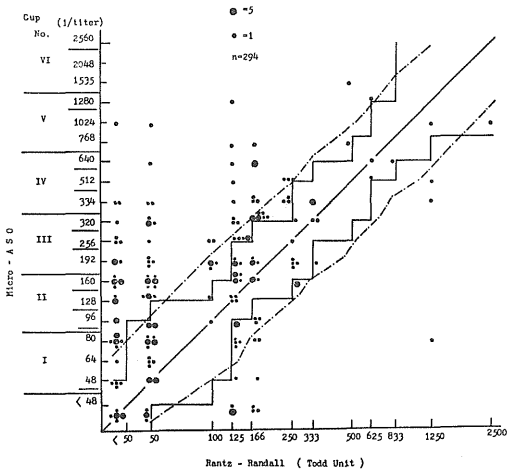


Fig. 2. Comparison of BLUE-ASO titer and Todd Unit obtained by BLUE-ASO and Rantz-Randall Method

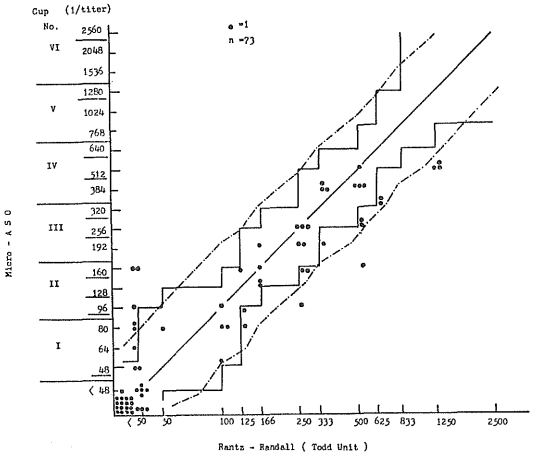


Fig. 3. Comparison of Micro-ASO and Todd Unit obtained by Micro-ASO and Rantz-Randall Method on the Sera from Scarlet Fever Patients

れ 41.6%，34.3%下まわった．さらに，最大偏差も管数偏差として14管，希釈系列数で5列の偏差が認められ，従来法の Todd Unit と BLUE-ASO 価を直接意義づけることができなかった．

3. 猩紅熱患者血清における従来法と Micro-ASO の比較成績 Fig. 3 に示すように，従来法の Todd Unit と Micro-ASO 価の一致数は73例中28例（38.4%）あり，Todd Unit 1管差許容範囲のものは73例中47例（67.1%），2n 希釈1管差許容範囲のものは73例中61例

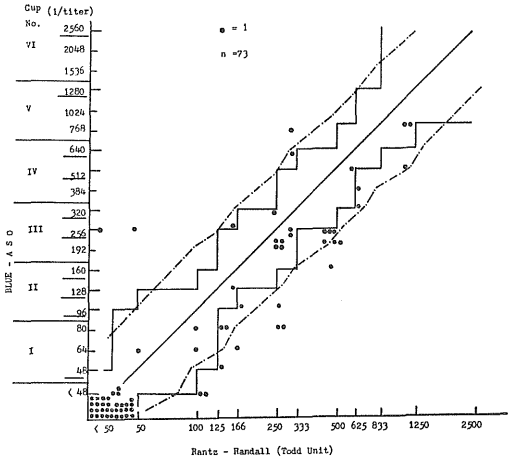


Fig. 4. Comparison of BLUE-ASO titer and Todd Unit obtained by BLUE-ASO and Rantz-Randall Method on the Sera from Scarlet Fever Patients

（83.6%）を示し，患者血清は健康人血清と比較して，それぞれ一致性が高まる傾向が認められた．しかし，偏差においては，6管2列のひらきがあり，Micro-ASO のバラツキについては健康人血清と同様に改善の余地が残されている．

4. 猩紅熱患者血清における従来法と BLUE-ASO の比較成績 Fig. 4 に示すように，Todd Unit と BLUE-ASO 価の一致数は，73例中21例（28.8%）あったが，すべて 50Todd Unit 以下に集中し，中位あるいは高位の Todd Unit の例では一致を見ることができなかった．しかしながら，Todd Unit で1管差許容範囲のものが，73例中35例（47.9%）と増加，2n 希釈管差許容範囲のものは，73例中46例（63.0%）とさらに増加することがわかった．また，偏差についても，例数が少ないこともあるが，健康人血清と比較して，8管3列とバラツキ幅が縮少される傾向が認められた．

5. 市販の器具機材の改良面からの検討 Fig. 1 から4までの成績は，すでに市販されている Microtiter® セットを使用しての成績であるが，国産品でも，さらに改良を加え精度を高めようとの試みがなされているので，改良器具 FAS-teque System® を使用して，効果がみられるかどうかについて 2n 希釈1系列法で比較検討を試みた．

Fig. 5 は，従来法と Micro-ASO の比較成績を示す．健康人血清および患者血清の中から，任意の Todd Unit を示す血清 225 例を選んで行なった成績である．

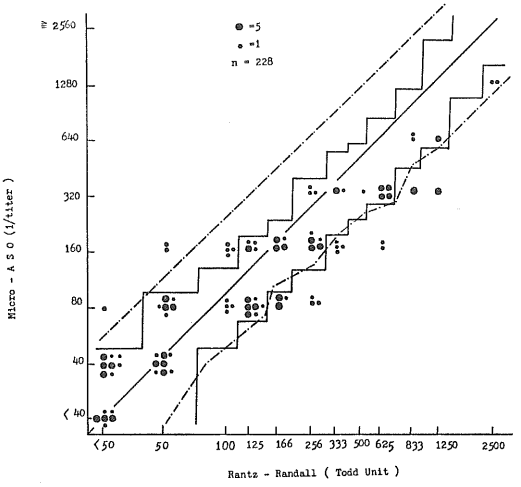


Fig. 5. Comparison of Micro-ASO titer and Todd Unit obtained by Micro-ASO with FAS teque System and Rantz-Randall Method

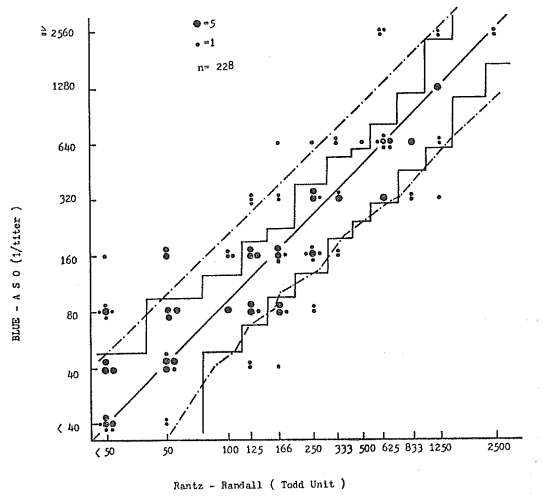


Fig. 6. Comparison of BLUE-ASO titer and Todd Unit obtained by BLUE-ASO with FAS teque System and Rantz-Randall Method

2n 希釈 1 系列法は Todd Unit の近似値が得られにくいので，許容範囲内の一致率で比較すると，Todd 1 管差以内のものは，82.9%(189/228)，2n 希釈 1 管差以内のものは85.5%(195/228)と Microtiter® を用いた 2n希釈 3 系列法より高い一致率を示し，最大偏差も 2 管差にとどまった．しかし，低位の Todd 単位を示す例では，総じて高目の ASO 価を示し，中位から高位の単位を示す例では ASO 価が低目にでる傾向が認められた．

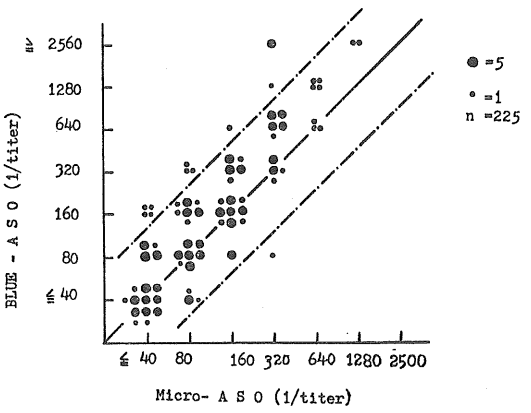


Fig. 7. Comparison of BLUE-ASO and Micro-ASO titer with FAS teque System

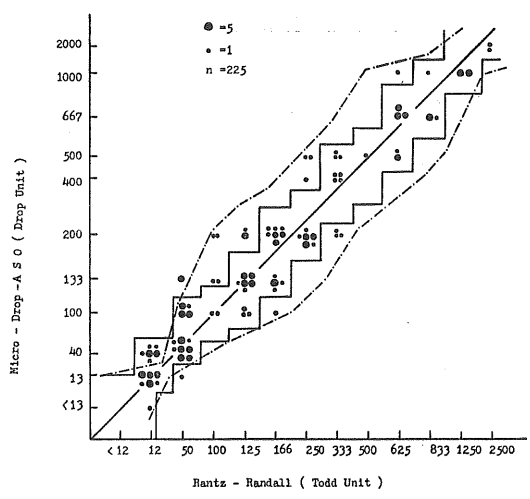


Fig. 8. Comparison of Drop and Todd Units obtained by Micro-Drop-ASO and Rantz-Randall Methods

Fig. 6 は，従来法と BLUE-ASO の比較成績である．ASO 価の分布は，高低両方にバラツキが認められたが，最大偏差が 3 管にとどまり，また，許容範囲内の一致率も，Todd Unit 1 管差で 74.1% (169/228)，2n 希釈 1 管差で78.5% (179/228) と器具の改良効果が認められ Microtiter® を用いた 2n 希釈 3 系列法より向上した．しかし，Micro-ASO の一致率と偏差と比較するとわずかに劣る傾向が認められた．

Fig. 7 は，Todd Unit とは無関係に，Micro-ASO 価と BLUE-ASO 価を比較した成績である．

FAS-teque System®を用いた2法の ASO 価が完全に一致したものは225例中118例（52.4%）あり，2n 希釈で1管差以内にとどまったものは 225 例中 210 例（93.3%）と，一致性については，Micro 同志ということもあり優れた成績を示した．全般的な傾向としては，Micro-ASO と同様に BLUE-ASO 価を血清希釈倍数で表示してもなお，1/2管程度，BLUE-ASO 価が高く示され，中位の ASO 価で3管の偏差が見られたものの，溶血法による Micro-ASO 価と，間接凝集反応による BLUE-ASO 価はよく相関することが判った．しかし，Micro-ASO®では，625Todd Unit 以上の ASO 価を示す41例のうち9例（21.9%）しか，1：640以上の ASO 価を示さなかったのに反し，BLUE-ASO®では41例中37例（92.4%）が1：640以上を示したことは特筆される．

6. 従来法と Micro-Drop-ASO の比較成績 Fig. 8 は，今回，われわれが開発した Micro-Drop-ASO のプログラムに従って血清と PBS を滴下数によって希釈し，抗原抗体と血球比を従来法と一致させて測定した，Drop Unit と Todd Unit を比較した成績である．Drop Unit は，最適な抗原抗体および血球比を一致させるために，Todd Unit の近似値とならざるを得なかった．したがって，Micro-Drop-ASO の一致性の比較は，1管差許容範囲内の一致率で比較しなくてはならないが，Todd Unit 1管差以内の例は，89.3%（201/225），2n 希釈で1管差以内の例は91.1%（205/225）と最も優れた一致率を示し，しかも最大偏差も2管差にとどまり，いずれの許容範囲にも入らないものは225例中6例（2.7%）に過ぎなかった．

考　察

従来法による Todd Unit と新しく開発された Micro-ASO や BLUE-ASO® によって測定された ASO 価について，解釈上様々な議論があり，これまで各種の検査法の組合せによる比較試験の成績が数多く報告[10-17]されている．一方では，反応に関与する抗体側の諸因子について解析[5]を試み，また他方では，抗原側の安定性や判定基準をめぐる要因について，種々の考察が加えられている．ASO 価に関する解釈上の混乱は，本質的な問題と技術的な問題がともすれば交叉する形で論議されていることに一つの原因があると思われるので，これまでの問題点を整理しながら，考察を述べることは意義があろう．

今回行なった一連の比較成績から，ASO 価測定に関する問題点を主として技術的な側面から指摘しつつ，標準化への動きを考慮して，一定の結論が得られたものと思われる．すなわち，

1. 従来法あるいは Micro-ASO と BLUE-ASO® の ASO 価は技術的な種々の試みを行なうことによって，1管差許容範囲内一致率の向上や偏差を狭めることは，ある程度まで可能であったが，原理的にまったく異なる検査法の ASO 価を一致させることはできなかった．したがって，溶連菌感染症の診断あるいは病期の判定，および治療効果をみるためには，単一の検査法を採用するより，関与する抗体の相違や反応機構の違いを考慮して，原理的に異る2種以上の検査法を併用する必要があろう．

2. 従来法と Micro-ASO の比較では，2n 希釈3系列法により，Todd Unit により近い ASO 価を求めようとしたが，ダイリューターの持ち込み誤差と操作回数によって増幅される誤差が Todd Unit の許容範囲を上まわり，かえって許容範囲内一致率の低下や偏差を拡大する結果となった．このことは，すでにわれわれ[9]が，梅毒感作血球凝集反応（TPHA）の自動化による Microtiter 法の検討で指摘しているように，ダイリューター特有の欠点とみなすことができよう．今回，試みた Micro-Drop-ASO の成績が従来法に匹敵することや，儀賀[18]らが Micro 緒方法（カルジオライピンを抗原とする補体結合反応）の検討で，ダイリューターを使用しない滴下法によって良好な成績を得ていることなどから，Micro 法そのものの問題というよりダイリューター希釈特有の欠点といえよう．また，低位の ASO 価血清は高めに，中位から高位の ASO 価血清は低めの Micro ASO 価を示す傾向は，FAS-teque System® および Microtiter ®のダイリューターを使用しても同様に認められた．したがって，今後は，ダイリューター希釈で得られる血清希釈倍数には一定の補正値を検討する必要があろうし，また，ASO 価の終末点を5管以内にとどめるよう，基礎希釈を厳密に行なうことを心がける必要もあろう．

3. BLUE-ASO®では，Micro-ASO で顕著にあらわれたダイリューター特有の欠点が不明確であったが，このことは関与する抗体の相違，あるいは他の要因が複合して，偏差を拡大し，ダイリューターの誤差を見かけ上包み込んだものと思われる．したがって，基本的にはダイリューターの持ち込み誤差と操作回数による誤差の増幅は，BLUE-ASO® にも存在すると考える方が妥当であろう．

4. Micro-ASO と BLUE-ASO 価は，FAS-teque System® を使用し1系列法で測定した場合，きわめてよく相関したが，総じて 1/2 管程度 BLUE-ASO 価が高くなる傾向が認められた．BLUE-ASO kit の使用説明書どおりに ASO 価を表示すると，さらに1管高い ASO

価となる．従来法も，Micro-ASOもともに血清希釈倍数をもってASO価としているので，BLUE-ASO価の表示方法も最終濃度でASO価を表わすことを改め，血清希釈倍数でASO価を表わすよう，統一されるべきであろう．

5. これまで，Micro法によるASO価がTodd Unitを再現しないという臨床医家の指摘を受けて，Micro法の改良など種々の検討を行なってはきたが，Micro-Drop-ASOを除いて，Todd Unitの近似値と信頼性を兼ね備えた方法はない．特に，猩紅熱患者におけるASO価の消長は2n希釈で2管差を越える大幅な抗体価の動きがとらえにくいという事例が，今回の成績の中に多数含まれている．加えて，発症初期の段階で抗生物質の服用があった場合には，溶連菌の検出も困難であり，診断上，従来法のTodd Unitへの依存度は依然として大きなものと想定される．小児血清を取り扱う場合には採血量にも制限があると考えられるので，微量化は必要であろうし，Micro-Drop-ASOは必ずしも簡便性と能率性を満たすものではないが，最少限0.05m*l*の血清があれば測定可能という利点があり，有用と思われる．

6. Todd Unitの2管差を有意とすべきか，2n希釈の管差を有意とすべきかについては，試薬や術式の標準化にむけて，少なくとも成績のバラツキや再現性の問題が解決されるまでは，今の段階で結論づけることは困難であろうし，BLUE-ASO価の動向もIgMの動きとしてとらえることは，単に抗体価の一致性とは別の新たな課題を提供しているものと思われるので，今後さらに検討を加えたい．

まとめ

従来から頻用されているRantz-Randall法の繁雑さを改善するため，簡易にASO価を測定できるMicro-ASOとBLUE-ASO®について，Todd Unitの近似値が得られるよう術式を改良し，手技と器材の両面から改良効果を検討した結果，

1. Micro-ASOは，ダイリューター特有の欠点がめだち，またBLUE-ASO®は，原理的に全く異なる検査法であり，関与する抗体側の要因が強く，Todd Unitに近いASO価を求めることはできなかった．

2. 今回，われわれが開発したMicro-Drop-ASOは一致性および偏差が他の改良法に比べ，最も優れた成績を示し，従来法に匹敵するものと考えられた．しかも，微量測定が可能であることから，採血量が制限される小児血清においては，特に有用である．

（本研究の概要は，第22回日本臨床病理学会総会，1975年11月で発表した．）

文献

1) 富山哲雄：臨床検査，16，2，9，1972
2) 飯田悦夫，土屋雅敏，田村順子，飯田隆康ほか：臨床検査，19，6，70，1975
3) 辻好克，福沢宣之，大鳥居昌美，陳　栄華，小林秀，山田　昇，藤田光一郎，富山哲雄：臨床病理，20，Supp. 10，331，1972
4) 熊谷直秀：日本臨床，28，6，22，1970
5) 大鳥居昌美，辻　好克，山田　昇：臨床病理，23，Supp. 11，192，1975
6) 河合　忠：臨床検査，20，6，45，1976
7) 河合　忠：モダンメディア，23，3，29，1977
8) 巴山顕次：衛生検査，26，Supp. 3，257(70)，1977
9) 村田以和夫，堀　幹郎，宮沢貞雄，加納堯子，大久保暢夫：東京衛研年報，26-1，53，1975
10) 松浦美喜雄，白石　聡：臨床検査，13，1，33，1969
11) 西　照秋，佐藤己一，星野辰雄：衛生検査，19，10，35，1970
12) 水野佐夜子，西山和俊，佐藤由紀子，新谷和夫：臨床病理，19，Supp. 8，475，1971
13) 水口国雄，只野寿太郎，近藤弘司，設楽政次，川畑貞美：臨床病理，20，Supp. 10，328，1972
14) 小崎繁昭，米屋乃夫子，熊坂惣勝，中村正夫，富沢孝之：臨床病理，20，Supp. 10，329，1972
15) 宮村恵宣，加治史子，大田美登利：20，Supp. 10，330，1972
16) 山田俊彦，山岸美和子：臨床病理，23，Supp. 11，190，1975
17) 笠原和恵，森安惟一郎，時沢尚子，奥原雅之ほか：臨床病理，23，Supp. 11，191，1975
18) 儀賀久良，小林佐千枝，藤本修造，林　泰三：臨床病理，24，6，513，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 107—110, 1978

簡易迅速梅毒ＴＰ感作血球凝集反応（TPHA）におけるマイクロタイター法の検討

堀　　幹　郎*, 小　林　文　次*, 平　岡　陸左右*, 宮　沢　貞　雄*
村　田　以和夫*, 大久保　暢　夫*

Evaluation of Simple and Rapid Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema Pallidum* Antibodies

MIKIO HORI*, BUNJI KOBAYASHI*, RIKUZO HIRAOKA*,
SADAO MIYAZAWA*, IWAO MURATA* and NOBUO OHKUBO*

緒　　言

Treponema Pallidum Hemagglutination Test (TPHA) は，日常の梅毒血清診断法として，その特異性が高く再現性が優れているため，国内はもちろん，国際的にも急速に普及するに至った[1]．しかし，Takatsy[2] らにより考案され，その後 Sever[3] により改良されたマイクロタイター法が，わが国の種々の血清学的検査法に導入されて以来，梅毒血清反応における TPHA にも採用の傾向が高まり，自働化を含めたマイクロ TPHA 法の標準化を統一するために，従来法と他の検査法との比較検討が多くの研究者によって報告されている[4-7]．WHO[8] が，強く推奨し普及に努めている Micro-Hemagglutination Assay for *Treponema Pallidum* Antibodies (MHT-TP 法) と従来法との比較をわれわれもすでにU型プレートを使用して検討した[9]．その結果，両方法は，特異性の面では同等の成績を得たが，WHO 法は，従来の TPHA に比べて鋭敏性の点で，やや低下傾向がみられた．そこでわれわれは，これらの結果に基づいて改良法を考案した．すなわち4倍希釈法の採用とV型プレートの使用によって WHO 法より良好な成績が得られ TPHA のマイクロタイター法標準化の一指標としてなんらかの方向づけができたと思われた．

今回，国内でヒツジ赤血球のかわりにニワトリの赤血球を用いたマイクロタイター専用の，簡易でかつ迅速な TPHA 試薬が開発された．この試薬は，鋭敏性，特異性，力価，判定像の読みにおいて従来の TPHA と変りがなく，また2時間で結果が判定でき，検査時間の大幅な短縮が見込める利点をもっている．一方，英国においては七面鳥の赤血球を使った試薬が市販され，検査に利用されている．

そこで今回，われわれは，TPHA-従来法を基準として MHT-TP 法（国産および外国産試薬）における特異性，鋭敏性，抗体価一致性の観点から比較検討し，また，これらの検査用試薬が TPHA-従来法にかわり日常検査法として使用できうるか否か合せて検討したので報告する．

材料および方法

Ⅰ　材料—被検血清は，当所に梅毒血清診断の目的で送付された血清のうちから無作為に TPHA-従来法陽性血清438例，陰性血清151例，計589例を選び供試した．

Ⅱ　試薬—TPHA-従来法のマクロ用抗原（富士臓器製薬株式会社製）Lot No. SZ 21112（以下A-抗原と略），マイクロ用抗原（富士臓器製薬株式会社製）Lot No. CZ 20402（以下B-抗原と略）および *Treponema Pallidum* Hemagglutination kit (Wellcome Reagents Limited 製) Lot No. K4623（以下C-抗原と略）をそれぞれ用いた．

Ⅲ　方法

1.　2倍希釈法

1)　MHT-TP法（B-抗原）の血清希釈方法が2倍希釈法であるため，TPHA-従来法をこれに合せて実施し，MHT-TP 法では抗体価の表示は，終末濃度で，また，TPHA-従来法ではその指示書に準じた．

2)　C-抗原の MHT-TP法は，B-抗原の2倍希釈法に合せて行ない，抗体価は，終末濃度で表示した．また，C-抗原の感作および未感作血球は，精製水 3.0m*l* を加えて（通常は 1.5m*l*）復元し，均等な浮遊液として

* 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

使用に供した．これは，B-抗原の滴下する血球濃度および血球量に合せたためである．

2. 4倍希釈法

1) TPHA-従来法およびC-抗原を用いたMHT-TP法は，4倍希釈法で実施し，従来法に準じた表現方法で抗体価を表わした．

2) B-抗原は，MHT-TP 法の2倍希釈法同様，C-抗原の4倍希釈法に合せて行ない，血清希釈度を抗体価として示した．また，B-抗原の感作血球および未感作血球は，4倍希釈用の濃度にするために，溶解溶液 1.3 m*l* を入れ（通常は 4.0m*l*）均一な浮遊液として，その1滴（0.025m*l*）を各血清希釈液に滴下した．なお，これらの方法は，各々の使用説明書に従って定量法で行なった．マイクロプレートは，全て Cook Engineering Company 製のU型リジットプラスチックプレートを使用した．

成　績

Fig. 1 に，2倍希釈で行なった MHT-TP 法（B-抗原）と TPHA-従来法とを比較した成績を示した．特異性，鋭敏性では両法共に問題はなかった．また，抗体価一致数は，145例中76例（52.4%）が一致し，1管差の許容範囲内のものを含めると一致数は，132例(91.0%）であった．なお，両法共2管差低下したもの13例(9.0%）が認められたが全体的に抗体価をみるとほとんど1管差の誤差範囲内であった．以上のことからMHT-TP 法（B-抗原）は，従来法に比して検査成績に何等遜色のない結果を得た．

Fig. 2 は，4倍希釈で実施したMHT-TP 法（C-抗原）と従来法との比較を示した．従来法での陽性血清のうち，2例（2.3%）は，MHT-TP 法で陰性と判定されたが，特異性および鋭敏性では両反応に差は認められなかった．抗体価一致率は，19.3%と非常に低く，1管差の誤差範囲を含めても67.0%にすぎず，2倍希釈法におけるB- 抗原使用の場合より抗体価一致率は，かなり低かった．

Fig. 3 は，2倍希釈法で実施した MHT-TP 法におけるB-抗原とC-抗原の比較を示したものである．陰性血清25例は，両抗原では全て陰性であったが，従来法で陰性であることを確認した5例の血清は，C- 抗原を用いた反応では陽性を示した．また，陽性血清147例中9例（6.1%）は，C-抗原を使用した場合，陰性と判定され，特異性，鋭敏性の面でもC-抗原は，B-抗原よりやや劣る成績であった．なお，この9例は，従来法でも陽性を示したものである．さらに，抗体価一致数（1管差低下例を含む）は，117例の中80例（54.4%）で，一致

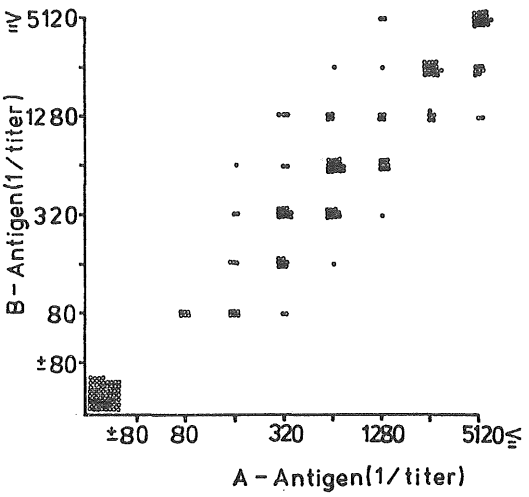


Fig. 1. Comparison of Conventional TPHA Method (A-Antigen) and MHT-TP Method (B-Antigen)
(in 2-fold dilution)
Note ; n=205, positive=145, negative=60
A, B-Antigen : Fuji Zoki Pharmaceutical Co., Ltd

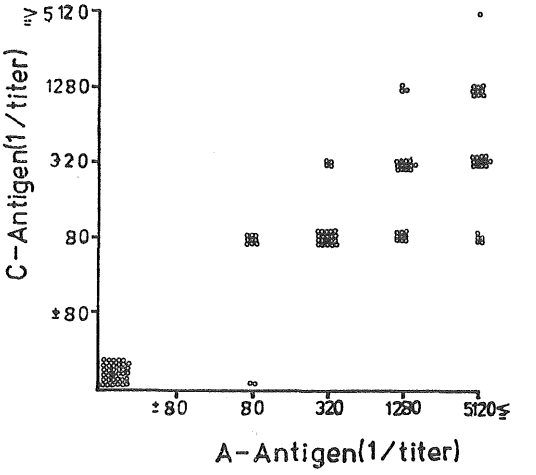


Fig. 2. Comparison of Conventional TPHA Method (A-Antigen) and MHT-TP Method (C-Antigen)
(in 4-fold dilution)
Note ; n=113, positive=88, negative=35
A-Antigen : Fuji Zoki Pharmaceutical Co., Ltd
C-Antigen : Wellcome Reagents Limited

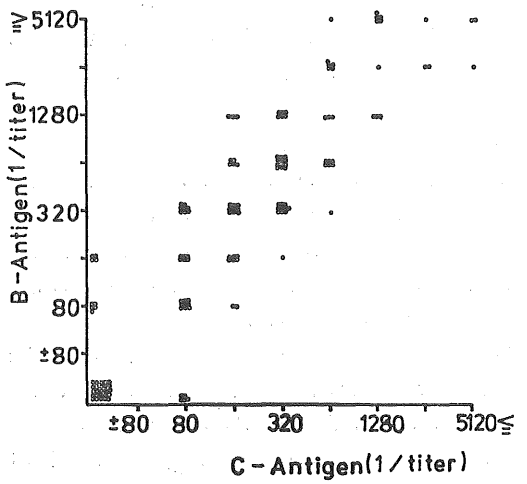


Fig. 3. Comparison of Two Antigens used in MHT-TP Method (in 2-fold dilution)
Note ; n=147, positive=117, negative=30
B-Antigen : Fuji Zoki Pharmaceutical Co., Ltd
C-Antigen : Wellcome Reagents Limited

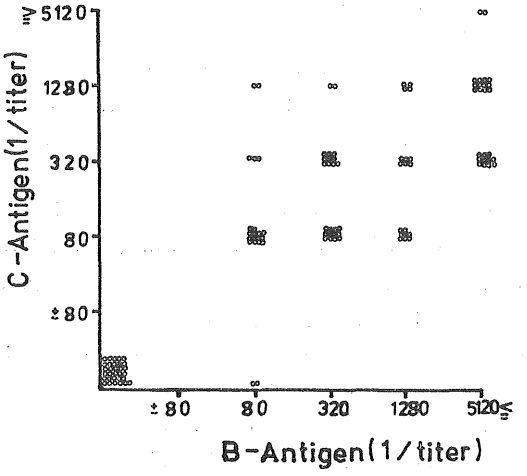


Fig. 4. Comparison of Two Antigens used in MHT-TP Method (in 4-fold dilution)
Note ; n=119, positive=88, negative=31
B-Antigen : Fuji Zoki Pharmaceutical Co., Ltd
C-Antigen : Wellcome Reagents Limited

率の低下が目立った．しかし，C- 抗原では2管差低下例が33例（22.4%）認められたが，抗体価のバラツキは，1～2管差の範囲内であった．

Fig. 4 は，4倍希釈法で行なったC-抗原とB-抗原使用の MHT-TP 法における比較を示した．2倍希釈法で実施したのと同様，陽性血清中2例は，C- 抗原の場合，陰性と判定されたが，特異性および鋭敏性の点では両抗原共に同等の成績であった．しかし，抗体価一致数は，88例中30例(34.1%)，1管差低下を合せると67例（76.1%）の一致率を示し，2倍希釈法よりも21.7%高率であった．

考　察

検討した全ての比較試験にはU型プレートのみを用いたが，これは，抗原の使用説明書に準じて行なったことと階段希釈の回数が多くなれば，希釈のバラツキも多くなることを考慮に入れたためである．また，U，V型プレートには材質，サイズ，規格などの異なる多くの種類があり，用いるプレートでかなり抗体価に差が認められる．

赤尾[10]は，プラスチック特にポリスチレンは疎水性であるためマイクロプレートは，各メーカーとも親水性になるようにコーティングを行なっていると思われるが，抗原や抗体の蛋白質が吸着されやすいので注意が必要であると述べている．このため，国産試薬ではマイクロ専用のプレートが添付され，このプレートを使用すれば凝集像が常に一定になるように考案しており，判定の段階で苦慮することのないようにしてある．しかし，精度管理といった点を考慮に入れるとプレートばかりでなくマイクロ法で用いるダイリューター，ドロッパーなどの器具についても統一したものを使用するのが望ましい．

今回，使用したマイクロ用試薬（国産，外国産）は，従来法と異なりニワトリまたは七面鳥の赤血球を担体としている．そのため，これらの試薬を用いれば1～2時間で判定ができ，特に，検査成績を緊急に知る必要のある場合には非常に有用な検査法であるといえる．しかし，今回の検討では判定の際，外国産試薬の反応パターンは明瞭ではなく，そのために陰性と陽性像の読みに困難な面がみられた．従って，判定する場合，試薬の相違によってその凝集像が異なるので，各試薬に合った判定基準を作成して終末点を求めるべきであると考える．その点，国産試薬では独自の反応パターンを添付し，これを参考に判定するようになっている．また，マイクロ法では赤血球の攪拌が特に重要で，各プレートをミキサーにセットし，弱振しながら，赤血球浮遊液を滴下することが必要で，この操作が最終的に鮮明な反応像を得られ

るか否かの鍵になることが多い．

従来法と MHT-TP 法の比較から従来法と国産試薬を用いた MHT-TP 法の抗体価一致性は，91.0％ときわめて高く，従来法にかわりマイクロ用の国産試薬は，日常検査に十分採用できると思われた．これに反して外国産試薬では多少の問題点があった．特に，希釈操作回数が少ないにもかかわらず抗体価一致率が低いこと，全ての抗体価が1～3管低くやや鋭敏性に欠け，さらに，1：80～1：5120までの全希釈段階において抗体価のバラツキが認められたことである．これは，血清原液から直接プレート上で希釈をするので，希釈誤差が生じやすいことが原因であるとするならば国産試薬使用の場合も同様に認められるべきであろう．しかし，この現象は，外国産試薬の場合に限って認められるところからこの原因は，外国産試薬の希釈液の含有成分中，血球の沈降速度を調節する成分が不足しているのではないかと考えられる．そのため，赤血球がプレートの管底まで早く沈降してしまい，その結果として陰性と判定されることおよび前述のように凝集像が鮮明でないためではないかと考えられる．また，MHT-TP 法における両試薬の比較から2倍希釈法より4倍希釈法の方が抗体価の一致率は，良好な成績を示したが，これは従来法と比較した成績と逆の結果であった．このことは赤血球の大きさ，濃度およびこれらを含む反応系のカップ内で占める容量と荷電の関係や，赤血球が管底まで沈降していく距離の関係などが凝集像に影響を与えるためと思われる．従って簡易性を追求するため随時希釈法を変えて実施することは最終結果に与える影響が大きくマイクロ用試薬の希釈方法で，その指示書に従って行なうのが最も望ましいことを示唆していると思われる．

抗核抗体[11]の検出法として蛍光抗体法が利用されているが，この抗原にはニワトリの赤血球が使用されている．この方法は，赤血球の細胞核と反応させるので赤血球の膜を通過して抗体が入らなければ細胞核と反応しないと考えられている．しかし，今回，開発されたマイクロ用試薬でもニワトリの赤血球を抗原としているので，TPHA に関与する免疫グロブリン主として IgG と反応することも考えられるため，抗核抗体陽性血清4例を MHT-TP 法と従来法について検討したが，両反応共に陰性を示し，TPHA マイクロ用試薬での BFP は一応避けられるものと思われる．しかし，供試例数が少ないので，この点はさらに追求する予定である．

結　論

1. TPHA-従来法を指標として MHT-TP 法（国産および外国産）について検討した．その結果，2倍希釈法で実施した MHT-TP 法（国産）は，特異性，鋭敏性および抗体価一致性の点で TPHA-従来法と同等の成績を示し，TPHA-従来法のかわりとして日常検査法に使用できると思われた．

2. MHT-TP 法における国産試薬と外国産試薬とを比較検討したが，特異性，鋭敏性の面で外国産試薬は，国産よりやや劣る傾向がみられた．また，両試薬の抗体価一致性は，2倍希釈よりも4倍希釈法の方が優れていた．

（本研究は昭和52年度当研究所調査研究課題「梅毒（血清反応）に関する研究」の一部として実施したものである．）

文　献

1) 厚生省監修：梅毒血清反応検査指針，108，1967，日本公衆衛生協会
2) Takatsy, G. *et al.* : *Acta Physiol. Hung.*, **5**, 241, 1954
3) Sever, J. L. : *J. Immun.*, **88**, 320, 1962
4) 岩下健三，相河和夫：臨床検査，**19**，175，1975
5) Johnston, N. A. : *Brit. J. Vener. Dis.*, **48**, 474, 1972
6) Coffey, E. M., L. L. Bradford, L. S. Naritomi, and R. M. Wood : *Appl. Micro.*, **24**, 26, 1972
7) 村田以和夫，堀　幹郎，宮沢貞雄，加納堯子，大久保暢夫：東京衛研年報，**26**-1，53，1975
8) Venereal Disease Research Laboratory, U.S.A. : MHT-TP. Provisional Technique, 1971
9) 村田以和夫，堀　幹郎，宮沢貞雄，加納堯子，大久保暢夫：東京衛研年報，**25**，23，1974
10) 赤尾頼幸：臨床検査，**18**，7，1974
11) 河合　忠：Medicina, **9**, 50, 1972

報　　文 Ⅱ

医薬品等の安全性に関する調査研究

REPORTS II

PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 111—117, 1978

医薬品・化粧品等の微生物汚染について

柏木義勝*, 柴田実*, 徳江シゲ子*, 笠井純子*
大久保暢夫*, 内海正保**, 伊藤寛**, 下村寿一**

Microbiological Contaminations of Drugs and Toiletries, etc

YOSHIKATSU KASHIWAGI*, MINORU SHIBATA*, SHIGEKO TOKUE*,
JUNKO KASAI*, NOBUO OHKUBO*, MASAYASU UTSUMI**,
HIROSHI ITOH** and JUICHI SHIMOMURA**

緒　言

近年になって特に医薬品の製造行程の改善が，世界各国で強調されるようになったのは，病原微生物の汚染を受けた医薬品を介しての感染症が頻発するという不測の事故が，スウェーデンはじめアメリカ，イギリスなどで1963年頃から増加の傾向を示したからである．

1969年に WHO が勧告した“医薬品の製造および品質管理に関する規範(Good Practices in Manufacture and Quality Control of Drugs)”を契機に，諸外国は急に製造行程の衛生問題に関心を高めるようになり，わが国においても先ず1973年5月に日本企業独自の GMP (Good Manufacturing Practices)が成立した．厚生省も薬事法の規制に加え，1974年9月には“医薬品の製造および品質管理に関する基準”および1975年4月には，これを補足する“医薬品の製造および品質管理に関する基準実施細則”を定め，各都道府県の製薬業界に対する行政指導を行い，より高い品質の医薬品が供給されるよう指示した．

東京都においては，且つては医薬品，化粧品等の微生物学的検査は，定期的に行われる血液製剤の検査のほかは，事故品あるいは無承認無許可製品が主な対象物であったが，1971年に実施されたX線造影剤の微生物検査において，42検体中34検体から大量の菌が検出されたことに端を発し，厚生省指示に先んじて，医薬品のみならず，医薬部外品，化粧品に至るまで微生物学的検査を行い，製造行程の改善のための監視および取締りを強力に推し進め今日に至っている．この報告は，1971～'77年度の7年間に微生物検査の目的で，当研究所に搬入された医薬品，医薬部外品，化粧品等の製品別検査成績である．

材料および方法

1971～'77 年度の7年間に，東京都衛生局薬務部薬事衛生課の薬事監視員により収去され，当研究所に搬入されたものは，医薬品610検体，医薬部外品169検体，化粧品77検体，それに行政指導による民間製造業者直接依頼の医薬品53検体，化粧品37検体，さらに準行政的検体である都内の血液銀行依頼の血液製剤505検体，総計1,451検体について，日本薬局方無菌試験法，生物学的製剤基準無菌試験法，昭和46年10月4日付厚生省通知薬監第496号“造影剤（硫酸バリウム製剤）の微生物試験法”，昭和47年12月28日付厚生省通知薬監第339号“化粧品（アイライナー）の微生物試験法”，昭和51年4月1日付厚生省通告薬発第297号“内用液剤およびX線造影剤の菌数の限度および試験法”等に準拠し，個々の検体に適応した試験法を用いて微生物学的検索を行った．

成績と考察

表1に医薬品の検査成績を示したが，11品目中7品目より菌が検出されている．特に1971年度におけるX線造影剤の検査結果は，緒言にも述べたように，42検体中34検体（81.0%）が微生物に汚染されており，そのうち生菌数が 10^5個/ml 以上のものが24検体（70.6%）もあり，且つ大腸菌群，緑膿菌等の好ましからざる細菌が検出され，その微生物汚染の甚だしさは，当時のマスコミの話題となった．

* 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
**東京都衛生局薬務部薬事衛生課

表 1. 医薬品の微生物学的検査成績

製剤	年度	調査対象 検体数	調査対象 メーカー数	無菌試験陽性 検体数	無菌試験陽性 メーカー数	総生菌数／g or ml 1～10	10～10^2	10^2～10^3	10^3～10^4	10^4～10^5	10^5＜	検出菌
X線造影剤	1971	42	9	34	7		5		3	2	24	*Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp., *Gram negative rod*, *Aspergillus niger*
	1972	53	1	0								
	1976	10	6	1	1						1	*Gram negative rod*
注射用剤	1977	59	38	0								
輸液製剤	1972	30	13	0								
	1973	48	7	2	1	1	1					*Bacillus* sp., *Gram positive rod*
	1974	33	6	0								
	1975	38	9	0								
	1976	24	5	0								
	1977	15	3	0								
小児用感冒鎮咳シロップ剤	1972	41	不明	7	不明		2	1	1	3		*Gram positive rod*, *Gram negative rod*, *Bacillus* sp., *Yeast like fungi*
	1974	29	17	3	3	2				1		*Gram negative diplococcus*, *Bacillus subtilis*
	1977	8	5	0								
生薬製剤	1975	47	30	42	29	15	8	11	3	5		*Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Clostridium* sp., *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Gram negative rod*, *Gram positive rod*, *Rhizopus* sp., *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus*, *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., *Pullularia* sp.
ドリンク剤	1976	10	9	0								
	1977	16	11	0								
点眼剤	1972	49	15	0								
	1973	30	16	1	1	1						*Gram positive rod*
	1975	1	1	1	1					1		*Escherichia coli*
	1976	10	9	0								
	1977	14	8	0								
点鼻剤	1973	10	7	4	2				1		3	*Acinetobacter anitratus*
	1975	5	3	0								
浣腸剤	1974	10	5	0								
	1977	5	3	0								
痔疾治療剤	1975	20	13	0								
眼軟膏剤	1977	6	3	4	3		4					*Aerococcus* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Acinetobacter lwoffii*, *Gram positive rod*

表 2. 医薬部外品の微生物学的検査成績

製品	年度	調査対象 検体数	調査対象 メーカー数	無菌試験陽性 検体数	無菌試験陽性 メーカー数	総生菌数／g or ml or piece 0～10	10～10^2	10^2～10^3	10^3～10^4	10^4～10^5	10^5＜	検出菌
救急絆創膏	1971	15	9	3	2	3						*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Gaffkya tetragena*, *Cladosporium* sp., *Peptostreptococcus* sp.
	1973	38	18	4	4	4						*Bacillus subtilis*, *Gram negative rod*
清浄綿	1972	4	2	1	1	1						*Cladosporium* sp.
	1974	2	1	0								
ベビーパウダー	1972	37	13	29	12		12	12	5			*Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Serratia* sp., *fungi*
	1974	29	13	24	12	12	4	8				*Bacillus* sp., *Neisseria* sp., *Micrococcus* sp., *Proteus* sp., *Fusobacterium* sp., *Serratia* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., *Cephalosporium* sp., *Absidia* sp., *Trichosporon* sp., *Chaetomium* sp.
	1977	13	8	7	6	6			1			*Bacillus cereus*, *Corynebacterium* sp., *Gram negative rod*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizoctonia* sp., *Rhizopus* sp., *Curvularia* sp., *Paecilomyces* sp.
バスパウダー	1974	1	1	1	1				1			*Bacillus subtilis*, *Gram negative rod*
コンタクトレンズ用洗浄・保存液	1975	22	10	10	4	1		2	6	1		*Acinetobacter anitratus*, *Moraxella* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* sp., *Acinetobacter lwoffii*
制汗デオドラント	1977	8	7	0								

表 3. 化粧品の微生物学的検査成績

製品	年度	調査対象 検体数	調査対象 メーカー数	無菌試験陽性 検体数	無菌試験陽性 メーカー数	総生菌数/g or ml 0～10	10～10^2	10^2～10^3	10^3～10^4	10^4～10^5	10^5＜	検出菌
アイライナー	1972	7	2	2	2			1	1			Other than *Staphylococcus aureus*, *Coliform group* and *Pseudomonas aeruginosa*
	1973	36	4	2	2	1	1					Other than *Staphylococcus aureus*, *Coliform group* and *Pseudomonas aeruginosa*
	1974	24	10	10	6	10						*Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Micrococcus* sp., *Enterobacter cloacae*
	1975	10	10	0								
	1977	16	8	11	7	11						*Streptococcus salivarius*, *Acinetobacter* sp., *Aerococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp.
マスカラ	1973	17	7	3	2	1			1		1	*Bacillus subtilis*, *Gram negative rod*
	1975	2	1	2	1	2						*Bacillus* sp.
パック	1973	1	1	1	1	1						*Gram negative rod*, *Micrococcus* sp.
スキンクリーム	1974	1	1	1	1	1						*Bacillus subtilis*

内用液剤のうち，ドリンク剤からは菌は検出されなかったが，小児用感冒鎮咳シロップ剤からは1972年度および'74年度に菌が検出された．しかし'77年度では陰性であった．シロップ剤は高張糖液であり且つ酸性であるため，細菌の生育には適当な環境ではなく，むしろ真菌群の汚染が比較的容易ではないかと推測されたが，*Yeast* 以外はすべて細菌群が検出された．

生薬製剤の検査は1975年度に実施され，47検体中42検体（89.4%）から細菌が検出された．生薬は他の薬品と異なり，複雑な成分・組成を含む天然物であるため，微生物汚染・虫害等を受け易く，これらの汚染が全く無いことを望むのは不可能であるといわれているが，今回の成績から菌陰性のものが5検体（10.6%），また生菌数が10^3個/g未満のものが34検体（72.3%）であったことからみても製造行程上の管理が良ければ，さらに良い製品を製造し得るものと考えられた．

生薬製剤については，横山[1]が76点について調査しているが，すべてが微生物の汚染をうけており，そのうち10^5個/g以上の汚染が44.7%の試料に認められたと報告している．また米虫[2]も生薬製剤20品目の汚染度調査で，一般生菌数10^5個/g以上のものが5品目（25%），10^4個/g以上が8品目（40%）存在したといい，そのうち6品目から大腸菌群を検出している．

これらの報告と，われわれが行った検査結果とを比較した場合，菌の検出方法に，大きな差があるとは考えられないので，'75年度の生薬製剤に関しては，既に製造行程の衛生的改善が，ある程度進んでいたものと推察できる．

点眼剤，眼軟膏剤および後述のコンタクトレンズ用洗浄・保存液は，われわれの体の中で最も鋭敏な器官の1つである眼に直接間接作用する製品であるので，注射薬と同様の注意をはらう必要がある．石関ら[3]の報告では，点眼剤138検体のうち7検体（5.1%）が汚染されており，緑膿菌も検出されたという．また Kallings ら[4]はステロイド眼軟膏の緑膿菌の汚染による感染で，2名の失明者が出たという報告を行っている．緑膿菌は傷ついた角膜に感染すると潰瘍を生じさせ，ついには失明に至らしめることがあり，この菌に対しては，眼組織が耐えられる濃度の防腐剤では，ほとんど無効であるという．このような危険を避ける意味においても，眼に関係ある製品は，製造時にはもちろん使用時においても微生物汚染に充分な注意がはらわれなければならない．今回試験した点眼剤からは，'73年度の30検体中1検体から菌が検出された．'76年度および'77年度の検査では，すべての製品が無菌であった．'75年度の1検体は，無許可無認可製品であり，“目薬と称するもの”という検体名で，取締上，当研究所に搬入されたもので，この検体からは，大腸菌が検出され，違反品の危険性の一端を示すものといえよう．

眼軟膏剤は軟膏基材が一様に細菌の汚染を受けているといわれており，これらに対して，今直ちに無菌性を要求するには技術的には難しい問題があり，したがって現在わが国では無菌試験法が適用されていないが，失明などの事故がおきてからでは遅すぎるので，アメリカ，イギリスなどの諸国と同じく，無菌の法制化を早急に行うべきと考える．今回の眼軟膏剤の検査結果は，6検体中4検体が陽性であった．

なお，局所製剤のうち，浣腸剤と痔疾治療剤からは，菌の検出はみられなかった．

表2は医薬部外品6品目の検査成績を示した．

救急絆創膏および清浄綿は，傷口の保護，汚染防止，皮膚消毒の目的で使用されるので，無菌性を要求されるべき製品と考える．救急絆創膏の2カ年についての検査結果をみると，微生物検出率は減少傾向を示しているが，未だ改善されたとは言い難い．また清浄綿については検体数がきわめて少ないので汚染の実態は明らかでない．

ベビーパウダーは，新生児・乳児等の健康皮膚面に撒布するばかりではなく，時には軟膏類塗布後の皮疹面にしばしば使用される．したがって，その無菌性が要求される．原材料の主成分のタルクは，滅菌が困難であるといわれているが，3カ年にわたる検査において，ある一社の製品だけが常に無菌であったので，他社もこれにならい，その無菌製造に努力すべきものと考える．

バスパウダーの1検体は無許可の輸入品であり，これからも菌の検出がみられた．

コンタクトレンズ用洗浄・保存液は，22検体中10検体（45.5%）から菌が検出されたが，組成からみても無菌にできないはずはないと考える．この製品は，点眼剤や眼軟膏剤と同様に防腐剤が含有されてはいるが，眼組織に障害を与えない程度の濃度であるため，緑膿菌の汚染を防止することはできず，先に述べたような危険性は常に存在している．そのような理由で，メーカー側は当然無菌にすべきであるし，また使用者も，その保存には細心の注意をはらわなければならない．

制汗デオドラント8検体からは，微生物の検出はみられなかった．

わが国では，化粧品の製造行程中の汚染に対する法的規制は未だないが，製薬業界において強力に GMP が推進されていることからみて，医薬品に準じて将来は何ら

表 4. 血液製剤の微生物学的検査成績

製剤	年度	調査対象 検体数	調査対象 メーカー数	無菌試験陽性 検体数	無菌試験陽性 メーカー数	検出菌
保存血液	1971	30	6	0		
	1972	30	6	0		
	1973	55	6	0		
	1974	50	5	0		
	1975	50	5	1	1	*Pseudomonas* sp.
	1976	50	5	1	1	*Acinetobacter anitratus*
	1977	50	5	0		
新鮮凍結人血漿	1972	10	1	0		
	1973	10	1	0		
	1974	10	1	0		
	1975	10	1	0		
	1976	10	1	0		
	1977	50	5	0		
人赤血球濃厚液	1973	10	1	0		
	1974	10	1	0		
	1975	10	1	0		
	1976	10	1	0		
	1977	50	5	0		

かの基準が示されるものと考える．現在はメーカー側が独自の自主規制を行って清潔な製品を造るように努力している．例えば，アメリカの CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) では，加入のメーカーに対して

①眼眉用化粧品……一般生菌数 500個/g or m*l* 未満
②ベビー用製品……一般生菌数 500個/g or m*l* 未満
③口唇用化粧品……一般生菌数 1000個/g or m*l* 未満
④その他の製品……一般生菌数 1000個/g or m*l* 未満
⑤以上の製品より病原性菌を検出しない

というガイドライン[5]を示しており，わが国においても，参考にされているものと思われる．

表3は化粧品4品目の検査結果であるが，'72 年度のアイライナーの2検体，マスカラの '73 年度の2検体および '74 年度の大腸菌検出のアイライナー2検体は，この CTFA のガイドラインに不合格であるが，'75年度以降のアイライナーおよびその他の化粧品3品目は合格していることになる．

血液製剤は毎年定期的に年2回ずつ検査が行われているが，今までの検査結果では，表4に示すように，成分製剤の新鮮凍結人血漿および人赤血球濃厚液に関しては，すべて，微生物は検出されなかった．しかし全血製剤の保存血液からは，'75年度および'76年度の検体から，おのおの1件ずつ菌が検出されている．検出菌は *Pseudomonas* 属および *Acinetobacter* 属で病原性の弱い菌群に属するが，日和見感染の原因となる可能性があり，採血時の充分な注意が望まれる．

以上が過去7年間の医薬品等の微生物汚染状況調査成績であるが，前述の如く，これらはすべて日本薬局方無菌試験法等を適用した検査である．しかし，これらの試験法は検体の容量に応じて，採取量，培地量等は規定されているが，微生物学的検索を行う立場でこれらの方法を検討すると，現状においては，やや不備な点を認めざるを得ない．

例えば局方の注射薬無菌試験では，検体容量100m*l* 以上 500m*l* 未満では，細菌試験に採取量 5m*l*，真菌試験に 2m*l* を採取するにすぎない．すなわち検体容量の1/20—1/100を細菌試験に，1/50—1/250を真菌試験に供試しているのにすぎないのである．一方U.S.P.(United States Pharmacopeia) では，検体容量が 100m*l* を超えるものはすべて membrane filter による無菌試験法が準用されている．

また局方の無菌試験法には薬剤の種類による方法の規定がない．鎮痛解熱剤等の無菌試験に，ただ単に局方の

無菌試験法を準用して良いか，はなはだ疑問とせざるを得ない．すなわち不備の方法を以って無菌であるとの成績を得ても，それが真の結果を表わさない場合もあることを考えると，局方等の無菌試験法が，検体容量，薬剤の種類別に改変され，人の生命の安全を守るのにより有効な手段になるよう望んでやまない．

結　論

1971～'77 年度の 7 年間に当研究所に 微生物検査の目的で搬入された医薬品663検体，医薬部外品169検体，化粧品114検体および血液製剤505検体，総計 1,451 検体について調査し，次のような結論を得た．

1) 医薬品11品目中 7 品目より微生物汚染が認められた．そのうち無菌性を要求される品目から菌が検出されたものは，輸液製剤，点眼剤，眼軟膏剤であり，前二者は，その後の検査では菌は検出されず，製造行程の改善が進んだように見受けられた．眼軟膏剤は 6 検体中 4 検体から菌が検出されたが，これは '77 年度のみの結果であるので，今後の改善を期待したい．

無菌性は要求されないが，病原性菌を検出してはならない品目からは，X線造影剤，小児用感冒鎮咳シロップ剤，生薬製剤，点鼻剤から菌が検出されたが，これらはすべて，製造行程の改善傾向がみられた．

2) 医薬部外品 6 品目中制汗デオドラントを除く 5 品目から微生物汚染が認められた．そのうち法的規制はないが，無菌の必要性のある品目，すなわちコンタクトレンズ用洗浄・保存液，救急絆創膏および清浄綿からも菌が検出された．特にコンタクトレンズ用洗浄・保存液からは，22検体中10検体（45.5%）から菌が検出され，そのうち 7 検体が，生菌数 10^3個/ml 以上であった．

全般的にみて医薬部外品は，製造行程の改善が積極的に為されているとは見受けられなかった．

3) 化粧品も医薬部外品と同様に 4 品目すべてから微生物汚染が認められた．全般的には，生菌数10個/g or ml 未満のものが多かったが，年次的にみても製造行程の改善は，ほとんどされていないように見受けられた．

4) 血液製剤 3 品目 505 検体について検査した結果，保存血液 315 検体中 2 検体から菌が検出された．また，人工的操作の加わる製品である新鮮凍結人血漿および人赤血球濃厚液からは，微生物汚染は認められなかった．

文　献

1) 横山　浩：大阪薬品協会々報，325，1，1976
2) 米虫節夫：防菌防黴，3，321，1975
3) 石関忠一，秋山喜彦，岩原繁雄：衛生試報，90，131，1972
4) 倉田　浩，石関忠一，宇田川俊一：医薬品・化粧品の微生物試験法，3，1977，講談社，東京都
5) 池田鉄作：化粧品学，13，123，1978，南山堂，東京都

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 118—120, 1978

起炎性物質に関する衛生化学的研究（第3報）
高速液体クロマトグラフィーによるベルガプテンの定量法

水石和子*, 風間成孔*, 中村義昭*, 原田裕文*

Hygienic Chemical Studies on Irritants (III)
High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Bergapten

KAZUKO MIZUISHI*, MASAYOSHI KAZAMA*, YOSHIAKI NAKAMURA*
and HIROFUMI HARADA*

High-performance liquid chromatographic determination (HPLC) of bergapten, phototoxin, in bergamot oil or in perfumeries has been developed. In this technique a reversed-phase partition chromatographic column, LiChrosorb RP-18, acetonitrile-H_2O solvent system, and 268nm ultraviolet absorbance detector were used. A calibration curve obtained by HPLC showed linearity in the range of 0.01-0.25μg of bergapten.

緒　　言

化粧品原料として広く用いられるベルガモット油 (cold press type) 中に，光感作皮膚炎の原因物質であるベルガプテンが通常0.2—1%含まれている[1,2]．そのため最近では，精製してベルガプテンフリーにしたベルガモット油あるいは調合ベルガモット油を化粧品に使用する傾向にあるが，精製不十分な場合もあり，製品中にベルガプテンが残留する恐れも考えられる．したがって微量ベルガプテンの定量法の開発が望まれる．われわれは先にガスクロマトグラフィーによる定量法について報告したが[3]，今回はさらに感度良く測定するために，逆相分配型クロマトグラフィーおよび紫外部吸収検出器（268 nm）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析法を検討し，良好な結果を得た．

実験の部

試料　ベルガモット油 (cold press type)：A, Fillippo Co. (Italy), B，池田物産，C，長谷川香料，D，大洋香料

試薬　試薬はすべて特級を用いた．

ベルガプテン標準溶液　前報[3]のベルガプテン標準品の調製の項で得られたベルガプテン標準品を少量のアセトンに溶かし，アセトニトリルで適当な濃度系列に希釈して用いた．

装置　高速液体クロマトグラフ：日立635型（波長可変検出器付），自記分光光度計：日立323型

HPLC測定操作，条件　試料を上記標準溶液と同様に希釈して試験溶液とし，その5μlについて以下の条件でHPLCを行なう．

HPLC 測定条件

Column：LiChrosorb RP-18 (10μ) (Merck) 25cm ×26mm I.D.

Solvent system：acetonitrile・H_2O (25：75)

Column temp.：room temp.

Column pressure：210kg/cm^2

Flow rate：1.5ml/min

Detector：268nm (wave length)

実験結果・考察

Shu, C.K.[4]ら，および Porcaro, P. J.[5]らにより分配および吸着型のカラム充填剤を用いた HPLC によるベルガプテン分析の報告があり，HPLC はベルガプテ

* 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

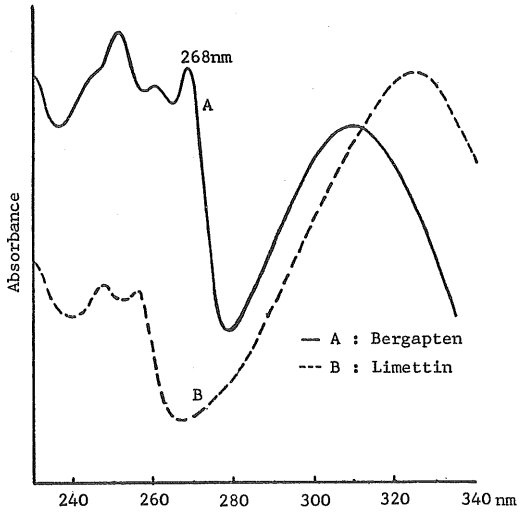


Fig. 1. UV Absorption Spectra of Bergapten and Limettin
A) Bergapten
B) Limettin

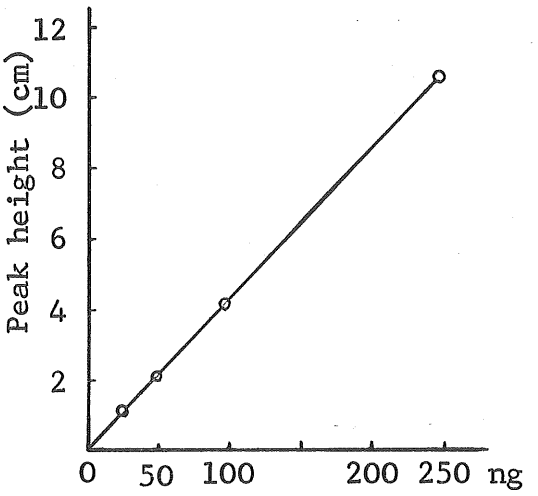


Fig. 2. Calibration Curve of Bergapten by HPLC

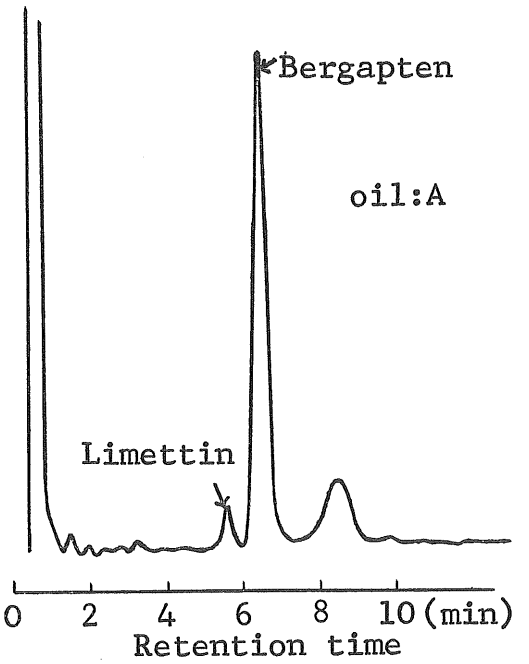


Fig. 3. High Performance Liquid Chromatogram of Bergamot Oil

ンの分析に有力な手段である．そこで今回は，逆相分配型の LiChrosorb RP-18を固定相に，アセトニトリル-水系を移動相に用いて分析条件を検討した．すなわち，移動相組成のアセトニトリルと水との比を100：0→10：90に変化させ，ベルガプテンと保持時間の近接している妨害物質のリメチンとの分離を観察した．移動相のアセトニトリルの含有量を減少させると相互分離が良くなるが，水含有が多くなるためカラムに対する圧力が増大する．そこで分離度およびカラム圧を考慮すると混合組成比としてアセトニトリル：水（25：75）が最も適していることがわかった．

また，ベルガプテンの紫外部吸収は図1に示すように極大波長が 250nm，260nm，268nm および 310nm にある．このうち 268nm は妨害物質リメチンには吸収がみられない．そこでベルガプテンを精度よく測定するため，268nm を測定波長として用いた．

検量線 1m*l*あたりベルガプテン 2，5，10，20，50，100μg を含む濃度系列の標準溶液を調製し，各 5μl について，前記の測定条件に従って操作を行なった．ベルガプテンのピーク高を測定し，検量線を作成したところ，図2に示すようにベルガプテン濃度 2.0—50ppm（0.01—0.25μg）に良好な直線関係が成り立つことが認められた．なお，ベルガプテンの 0.1μg のくり返し測定変動係数は1.4%であった．

ベルガモット油中のベルガプテン 化粧品香料の原料であるベルガモット油4種（試料A～D）について，アセトニトリルで適宜希釈後，前記の条件で直接 HPLC を行なった．そのうち2種（A，B）のベルガモット油は図3に示すように，顕著な妨害物質のピークは現われず，ベルガプテンが検出され，定量できた．その含有量

はAが0.22%，Bが0.25%であった．また，他の2種（C，D）からはいずれもベルガプテンが検出されなかった．これらはベルガプテンフリーあるいは調合されたベルガモット油であると推定される．

添加回収実験 市販の香水，オーデコロンにベルガプテンを，その含有量が0.005%になるように添加し，その試料を適宜希釈し，直接クロマトグラフに注入，測定したところ，いずれも障害なく定量することができ，回収率は90—100%であった．

要　約

ベルガモット油中のベルガプテンの測定法として，高速液体クロマトグラフィーを用いる方法を検討した．逆相分配型カラム充填剤LiChrosorb RP-18，移動相アセトニトリル：水（25：75），検出波長268nmの測定条件下でベルガモット油中のベルガプテンを精度よく定量することができた．

本法は，香水，オーデコロン中のベルガプテン定量に直接法として応用可能であった．

文　献

1) Musajo, L., G. Rodighiero, and G. Caporale : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 1213, 1958
2) Pathak, M. A., L. R. Worden, and K. D. Kaufman : *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 103, 1967
3) 水石和子，風間成孔，中村義昭，観　照雄，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，**26-1**，139，1975
4) Shu, C.K., J.P. Walradt, and W.I. Taylor : *J. Chrom.*, **106**, 271, 1975
5) Porcaro, P. J. and P. Shubiak : *J. AOAC*, **57**, 145, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 121—123, 1978

起炎性物質に関する衛生化学的研究（第4報）
TLCによるホルムアルデヒドの同定

中村義昭*, 風間成孔*, 水石和子*, 原田裕文*

Hygienic Chemical Studies on Irritants (IV)
Identification of Formaldehyde by Thin-Layer Chromatography

YOSHIAKI NAKAMURA*, MASAYOSHI KAZAMA*,
KAZUKO MIZUISHI* and HIROFUMI HARADA*

緒　言

ホルムアルデヒド（以下 HCHO と略す）は接触皮膚炎の代表的な起因物質として知られており，一般に化粧品の安全性を確認する場合，検査項目の一つとして HCHO は常にあげられている．この HCHO の分析法としてクロモトロプ酸法[1]，4-アミノ-3-ヒドラジノ-5-メルカプト-1,2,4-トリアゾール法（AHMT法と略す）[2]およびアセチルアセトン法[1]（AA法と略す）など，比色法による定性・定量が行なわれている．しかしながらクロモトロプ酸法は，硫酸濃度，反応温度，共存物質などの影響から再現性の良い結果が得られにくく，また一方 AHMT 法および AA 法の場合は他の脂肪族，芳香族アルデヒドが HCHO と類似の呈色を示すためこれらの共存は誤差の原因となる．このため AHMT 法や AA 法において陽性となった場合は，さらにそれが HCHO によるものかを同定する確認試験が必要である．そこで著者らは Denti ら[3]が報告したカルボニル化合物と 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（2,4-DNPH と略す）との反応生成物を TLC で分離する方法について検討し，若干の改良を加えたところ十分満足できる結果が得られたので報告する．

実験の部

試薬　特にことわりのないかぎり，和光純薬K.K.の試薬特級を用いた．

1）HCHO 標準原液　ホルマリン 1g に水を加えて 100m*l* とする．この HCHO の含有量を日本薬局方ホルマリンの項の HCHO 定量法によって求める．

2）HCHO 標準溶液　標準原液を計算量とり水で希釈して 1m*l* 中に 10μg の HCHO を含む溶液を調製し，標準溶液とする．（用時調製）

3）アセトアルデヒド，プロピオンアルデヒド，*n*-ブチルアルデヒド，アセトンおよびメチルエチルケトン溶液　各アルデヒド，ケトン 1g に水を加えて 1,000m*l* とする．これをさらに水で10倍希釈したものを用いた．

4）*iso*-ブチルアルデヒド，ベンツアルデヒド，メチルイソブチルケトンおよびアセト酢酸エチル溶液　各アルデヒド，ケトンおよびエステル 1g にエタノールを加えて 1,000m*l* とする．これをさらにエタノールで10倍希釈したものを用いた．

5）2,4-DNPH 溶液　特級 2,4-DNPH 0.5g を塩酸（1+1）85m*l* に加温溶解する．冷後水で全量を 500m*l* とし四塩化炭素（CCl_4 と略す）20m*l* を用いて 1 回洗浄する．

6）薄層板　ワコーゲル B-5FM を用い，常法によって作製した薄層を 100° で30分間乾燥した後，デシケーター中で放冷して保存する．

装置

1）マイクロシリンジ　テルモ MS-50 の針先を鈍角にしたもの

2）紫外線検出器　ミツミ紫外線検出器 TYPE SJ-1031（2536Å）

3）ガスクロマトグラフ質量分析計　島津製 LKB-9,000型

実験操作

TLC による同定

後述の試験溶液および HCHO 標準溶液 10m*l* をそれぞれ容量 100m*l* の分液ロートにとり，塩酸 5m*l* と2,4-DNPH 溶液 10m*l* を加える．これに CCl_4 5m*l* を正確

* 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

に加えて10分間激しく振り混ぜ分離後 CCl_4 層を分取する．この CCl_4 液を薄層板の下端から約 1cm の位置に 1cm の間隔で 10μl 塗布し，展開溶媒を用いて上昇法によって 10cm 展開する．風乾後紫外線照射下でスポットを標準物質のそれと比較して判定する．

結果および考察

マススペクトルによる DNPH 誘導体の確認

CCl_4 抽出物が間違いなく DNPH 誘導体であるかを確かめるために，前項における CCl_4 抽出液をマススペクトルグラフ直接試料導入法により測定したところ，Fig. 1 に示すように m/e 210 〔M^+〕を確認した．またその他のカルボニル化合物の DNPH 誘導体についてもそれぞれマススペクトルにより確認した．

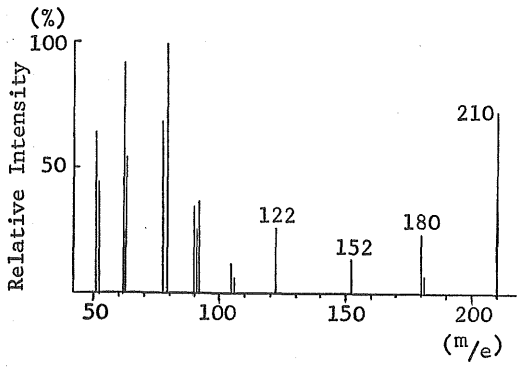


Fig. 1. Mass Spectrum of 2, 4-DNPH derivative of Formaldehyde

展開溶媒の検討

日野ら[4]は展開溶媒として *n*-ヘキサン・ベンゼン・トリエチルアミンの 6：4：0.5 混液によって TLC を行なっている．しかしこの溶媒比率では，全般的に Rf 値が低いためトリエチルアミンの割合を 0.5 から 1, 2, 4, 6 と変化させてみたところ，その増加に従って HCHO・DNPH 誘導体の Rf 値も 0.17から0.30まで上昇し，同時に他のカルボニル化合物の DNPH 誘導体との Rf 値の差も大きくなり，分離もよくなることが認められた．しかしトリエチルアミンの割合を 4 以上にしても Rf 値の差はほとんど変化しなくなることがわかった．このため著者らはトリエチルアミンの割合を 4 と定めることとした．Table 1 に HCHO の Rf 値を 1.0 とした場合の他のカルボニル化合物の Rf (R_{for}) 値を示した．なお本法による TLC 上での HCHO·DNPH 誘導体の検出限界は 0.025μg で，CCl_4 抽出液の塗布量を 10μlとした場合 HCHO 濃度は最低 2.5μg/ml は必要である．

Table 1. R_{for} Value of 2,4-DNPH Derivatives of Carbonyl Compounds

Compounds	R_{for}
Formaldehyde	1
Acetaldehyde	1.22
Propionaldehyde	1.66
n-Butylaldehyde	1.96
iso-Butylaldehyde	2.04
Benzaldehyde	1.63
Acetone	1.74
Methyl Ethyl Ketone	2.04
Methyl Isobutyl Ketone	2.33
Ethyl Acetoacetate	1.70

$$R_{for} = \frac{\text{Rf of the 2, 4-DNPH derv. of the compound}}{\text{Rf of the 2,4-DNPH derv. of formaldehyde}}$$

Developing Solvent : *n*-Hexane · Benzene · Triethylamine (6:4:4)

Plate : Wakogel B-5 FM

化粧品への適用

以上検討した方法を化粧品に適用するため，つぎの実験を行なった．すなわち市販のマニキュア，シャンプー，アイライナー，マスカラおよびクリーム各 1g に HCHO標準溶液をそれぞれ 100μg 添加して試料とした．試験溶液の調製法としては，一般に行なわれているリン酸酸性水蒸気蒸留法を用いず，狩野ら[5]が報告している 40° の硫酸ナトリウム溶液で30分間溶出させる方法を用いた．この理由は化粧品原料のなかには，加熱することによって HCHO を遊離するものがあるとの報告がみられるためである．この試験溶液について前記の方法に従い操作したところ，いずれも障害なく HCHO を同定することができ，化粧品への適用は十分可能であることが認められた．なお今後本法を用いて市販化粧品中の HCHO を調査する予定である．

要　　結

HCHO の 2, 4-DNPH 誘導体を TLC で展開する場合，展開溶媒として *n*-ヘキサン・ベンゼン・トリエチルアミン 6：4：4 を用いることにより，他のカルボニル化合物の誘導体との分離もよく HCHO の同定法として十分活用できることが認められた．なお本法によるTLC上での HCHO・DNPH 誘導体の検出限界は 0.025μg である．

また市販のマニキュア，シャンプー，アイライナー，マスカラおよびクリームに HCHO 標準溶液をそれぞれ

100μg 添加したところ，いずれも障害なく HCHO を同定することができた．

謝辞 本研究に際し，試料の入手について御協力をたまわった東京都衛生局薬務部の方々に対し深甚なる謝意を表します．

文　献

1) 日本薬学会編：衛生試験法注解，223，1973，金原出版
2) 三村春雄，金子幹宏，菅野三郎：衛生化学，22, 39, 1976
3) Denti, E. and M. P. Luboz : *J. Chromatog.*, 18, 325, 1965
4) 日野隆信，海保新太郎：分析化学，26，451，1977
5) 狩野静雄，外村正治：アイライナー製品等のホルムアルデヒドの試験法に関する検討，国立衛生試験所，昭和51年3月30日

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 124—128, 1978

カーボンブラック中の 3,4-ベンズピレンについて

鎌田国広*, 山添律子*, 原田裕文*

Survey of 3, 4-Benzopyrene in Carbon Black

KUNIHIRO KAMATA*, RITSUKO YAMAZOE* and HIROFUMI HARADA*

For the detection of 3, 4-Benzopyrene from carbon black, extraction was made by benzene with a use of Soxhlet apparatus. Extract was passed through an alumina column, and eluted with hexane-ethyl ether (2 : 1), and determined by high speed liquid chromatography with fluorescence detector. When the procedure developed applied on 16 kinds of the field samples, it was found that 8 (50 %) of them contained 0.001-8.333 ppm of 3, 4-Benzopyrene.

緒　　言

カーボンブラックは，主としてゴム工業に使用されるほか，プラスチック，乾電池，あるいは黒色顔料として塗料やインク等にも使用されている．このカーボンブラックは，その原料と製法により数種類に分類されるが，現在まゆずみ，しらが染めなどの化粧品原料として用いられているものは，大部分がチャンネルブラックとファーネスブラックの2種類である．しかし，ファーネスブラックは最近，米国において強い発がん性を有する3,4-ベンズピレンの溶出が認められるとの理由で使用禁止の規制措置がとられている．

元来，カーボンブラックは，炭化水素の不完全燃焼または，熱分解によって得られるため，3,4-ベンズピレンをはじめとして多くの多環芳香族炭化水素（以下PNHと略す）を含有していることが知られていた[1-4]．しかし，その分析法については，現在十分満足できる方法がなく，実用性の高い分析法の確立が望まれている．そこで今回，著者らは，高速液体クロマトグラフィーを用いて，前報[5]に引きつづき，カーボンブラック中の3,4-ベンズピレンの分析法を意図し，種々検討したので報告する．

実験方法

1. 試薬　3,4-ベンズピレン標準溶液　3,4-ベンズピレン（以下 B(a)P と略す，和光純薬K.K.製）10mgを精秤し，ヘキサンに溶かし 100ml とした．標準溶液 1ml=100μg B(a)P．この溶液を目的の濃度に希釈して用いた．

1％含水アルミナ　E. Merck 社製の Aluminumoxid Standardisiert を用い，衛生試験法[6]に従い調製した．すなわち，1N塩酸に浸して洗い，十分水洗したのち，110°で2時間乾燥し，さらに400°の電気炉中で2時間加熱後，デシケータ中に放冷した乾燥アルミナに対し1％(V/W)の水を加え，共せんびんに入れカラム用アルミナとする．

その他の試薬はすべて試薬特級（和光純薬K.K.製）を用いた．

2. 装置　1）高速液体クロマトグラフ（以下HSLCと略す）島津デュポン製830型，2）分光けい光光度計　島津製自記けい光分光光度計 RF-502，3）Kuderna-Danish（以下KDと略す）濃縮器，4）ソックスレー抽出器　抽出管部分約 5×30cm，受器容量 300ml

3. 操作法

3-1. 試験溶液の調製　試料10～30gを二重にかさねた円筒沪紙にとり，ベンゼン250mlで50時間（4 cycles/hr）ソックスレー抽出をおこなう．ベンゼン抽出液はKD濃縮器に移し n-ノナン 0.8ml を加えて約 1ml になるまで濃縮する．つぎに，1％含水アルミナにヘキサン・エーテル（2：1）を含浸させて，内径 1cm のカラム管に高さ 30cm に充てんする．このカラム柱に，先きの濃縮液を加え，さらに濃縮管を少量のヘキサンを用いて洗い，カラム管に加えたのち，ヘキサン・エーテル（2：1）100ml を 2ml/min の流速で流す．この溶出液を

* 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

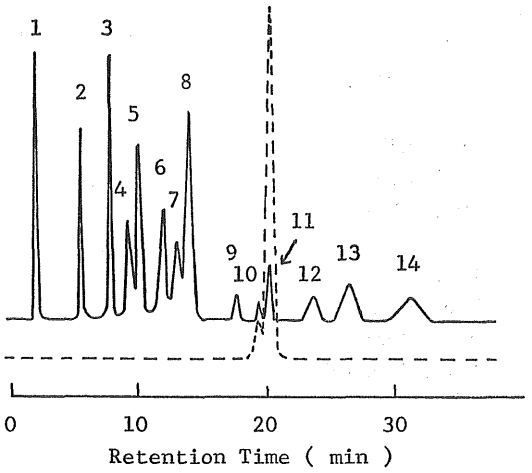


Fig. 1. Separation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by High Speed Liquid Chromatography

1: Benzene, 2: Phenanthrene, 3: Anthracene, 4: Fluoranthene, 5: Pyrene, 6: Triphenylene, 7: Chrysene, 8: Benzo(a)anthracene, 9: Benzo(e)pyrene, 10: Benzo(k)fluoranthene, 11: 3, 4-Benzopyrene, 12: 1, 2, 3, 4-Dibenzo anthracene, 13: Dibenzo(a, h)anthracene, 14: 20- Methylcholanthrene

—— : UV (254 nm)

…… : FP (Ex.λ=384 nm, Em.λ=405 nm)

集め，KD濃縮器を用いて 2ml に濃縮し，これを試験溶液とする．

3-2. HSLCによる定性および定量 1) 定性 B(a)P標準溶液をヘキサンで希釈した溶液について下記の測定条件に従い HSLC をおこない，得られたクロマトグラムから保持時間を，またフローストップにより励起スペクトルおよびけい光スペクトルを求める．試験溶液についても同様に HSLC をおこない得られたピークの保持時間，励起スペクトル，けい光スペクトルを求め，標準溶液のそれと比較して定性をおこなう．なお，Fig. 1にB(a)Pおよびその他の PNH のクロマトグラムを示す．

2) 定量 B(a)Pの標準溶液をヘキサンで適宜希釈し，0.01—0.1ppm の標準溶液系列をつくり，これらの 10μl について下記の測定条件に従い HSLC をおこなう．それぞれのB(a)Pのピーク高と濃度から検量線を作成する．つぎに試験溶液 10μl についても同様に HSLC をおこない，B(a)Pのピーク高を求め，先きに得た検量線から試験溶液中のB(a)Pの濃度を求める．

Table 1. Comparison of Extraction Methods for the Dtermination of 3, 4-Benzopyrene from Carbon Black

Solvent	Extraction method			
	1	2	3	4
Hexane	0.6	0.6	14.3	
Benzene	31.4	24.6	100	
Methylene Chloride	2.3	1.7	38.9	
Tetrahydrofurane	1.1	1.1	1.1	
Toluene	73.1	31.4	102.6	
Methyl Alcohol	0	0	1.7	
2N KOH-Ethyl Alcohol	1.7			
				5.1

1. Reflux, 5 hr.
2. Extraction by ultrasonics, 5 hr.
3. Soxhlet, 30 hr.
4. Vacuum sublimation, 0.1 mm Hg, 30 min.

3) HSLCの測定条件 カラム：μ Bondapak C18, 0.4cm×30cm, 移動相：メタノール・水(4：1), カラム温度：40°, カラム入口圧：300kg/cm², 流速：1ml/min, 検出器：けい光検出器（FPと略す), Ex.λ=384 nm, Em.λ=405nm

実験結果および考察

1. 抽出法の検討 一般に試料からB(a)Pを抽出する方法としてソックスレー抽出[7-10], 真空昇華抽出[11,12], 超音波抽出[13], 溶媒抽出[14]などが広く用いられている．そこで，これらの抽出法の中で，カーボンブラックからB(a)Pを最も効率よく抽出する方法について比較検討した．なお，試料としてB(a)Pの含有が認められたファーネスブラックを用いた．この結果を Table 1 に示す．ただし抽出率は，ソックスレー抽出法においてベンゼンを溶媒として用いた場合の抽出量を 100 とし，その相対抽出量で表わした．松下らによると真空昇華抽出法は大気粉じんやカーボンブラックに吸着した PNH を短時間で効率よく抽出する利点を有すると報告[11]しているが，Table 1 に示すように，カーボンブラックについては真空昇華法よりもむしろベンゼンやトルエンのような有機溶媒を用いた抽出法の方が高い抽出率を示し，とくにソックスレー抽出法がすぐれていた．したがってソックスレー抽出法において有機溶媒を適切に選択すればB(a)Pのに抽出に有効であると考えられる．

2. 抽出溶液の選択 ソックスレー抽出法を用いた場合に最も効率よくB(a)Pを抽出できる溶媒について検討した．溶媒として，白石ら[7]が食品からの抽出に用い

Table 2. Effect of Various Solvents on Extraction of 3, 4-Benzopyrene

Solvent	Ratio of content[1)]	Solvent	Ratio of content[1)]
Acetone	18	Methyl Ethyl Ketone	3
Petroleum Ether	1	Tetrahydrofurane	1
Toluene	101	Acetonitrile	5
Benzene	100	Ethyl Alcohol	3
Ethylene Dichloride	17	n-Butyl Alcohol	21
Methyl Acetate	37	Hexane	16
Carbon Tetrachloride	5	Cyclohexane	4
Ethyl Acetate	30	Chloroform	76
Methyl Alcohol	2	Ethyl Ether	9
Methylene Chloride	44	Carbon Disulfide	83
Ethyl Formate	41	Xylene	30
Methyl Formate	13		

1) Benzene=100

ているメタノール，松下[1)]あるいは Wallcave[4)] がカーボンブラックからの PNH の抽出に用いたベンゼン，Lee[2)] あるいは Avarm[3)] が用いた塩化メチレンなど計23種の溶媒について，いずれも30時間ソックスレー抽出をおこない，B(*a*)P の抽出量について比較した．なお，試料として抽出法の検討の項に用いたファーネスブラックを使用した．この結果を Table 2 に示す．抽出率については Table 1 の場合と同様に相対抽出量として表わした．Table 2 に示すようにベンゼン，トルエンがB(*a*)Pの抽出溶媒として最もすぐれていることが認められた．

3. 抽出時間の検討 ソックスレーによる抽出時間を1時間から50時間（4 cycles/hr）まで変化させたときのB(*a*)Pの抽出率について検討した．この結果をFig. 2に示す．Fig. 2 にみられるように，B(*a*)P の抽出量はベンゼンを用いた場合約40時間，トルエンの場合約20時間でほぼ一定に達することが認められた．今回，濃縮操作などの点を考慮して試料からのB(*a*)Pの抽出には，ベンゼンを溶媒として用い，抽出時間は50時間とした．

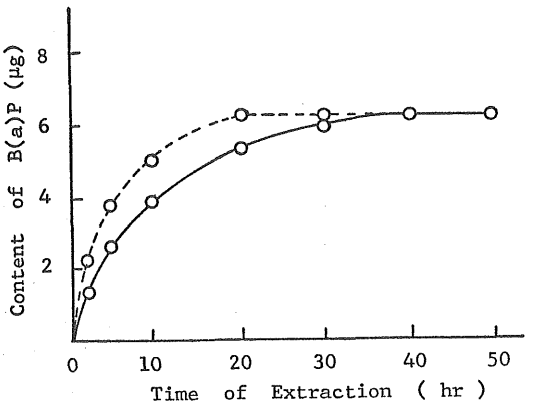


Fig. 2. Relation between Soxhlet Extraction Time and Observed Value of 3, 4-Benzopyrene in Carbon Black
○……○ : Toluene ○——○ : Benzene

4. 市販カーボンブラック中のB(*a*)P含有量 以上

Table 3. Analytical Results of 3, 4-Benzopyrene in Carbon Blacks

Sample	Weight of samples (g)	B(*a*)P(ppm)
Furnace Black		
M—1	25	0.003
—2	15	N.D.
—3	15	8.333
A—1	30	6.167
—2	30	0.402
F—1	15	0.167
—2	25	N.D.
—3	10	N.D.
D—1	25	N.D.
—2	25	N.D.
T—1	20	0.002
Channel Black		
D—3	10	N.D.
—4	15	N.D.
T—2	10	0.001
—3	15	N.D.
—4	30	0.002

N.D. : Not Detected

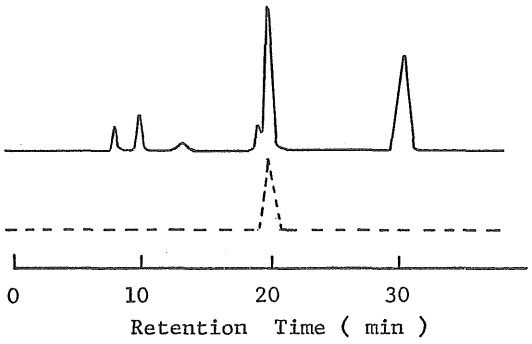


Fig. 3. High Speed Liquid Chromatogram of Carbon Black
—— : Sample (A-1)
····· : Std. 3, 4-benzopyrene
Detector : FP (Ex.λ=384 nm, Slit 7, Em.λ=405 nm, Slit 4)

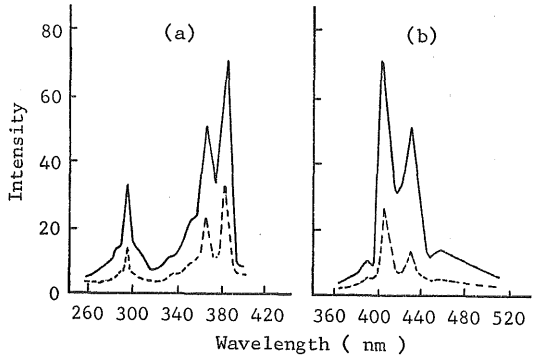


Fig. 4. Fluorescence and Excitation Spectra of 3, 4-Benzopyrene
(a) Excitation Spectra
(b) Fluorescence Spectra
—— : Sample (A-1)
····· : Std. 3, 4-benzopyrene

検討した分析法によって市販のカーボンブラックについてB(a)Pの測定をおこなった．試料としては，化粧品原料用チャンネルブラック5種（D社2種，T社3種），ファーネスブラック11種（M社3種，A社2種，F社3種，D社2種，T社1種）の計16種を用いた．その結果を Table 3 に示す．ただし測定値が検出限界0.001ppm以下は N.D. とした．これらの試料のうちB(a)Pを検出したものは，ファーネスブラック11種中6種，チャンネルブラック5種中2種であった．しかし，B(a)Pの溶出量はチャンネルブラックに比べファーネスブラックの方が高い値を示し，最高8.333ppmであった．なお，Fig. 3 に実験試料（A—1）から得た溶出液のクロマトグラムを示す．このクロマトグラムにはB(a)PのRtと一致するピークがみられ，さらにこのピークについてフローストップにより励起スペクトルとけい光スペクトルを測定し Fig. 4 に示す．またB(a)Pの標準品についても同様な操作により，励起，けい光スペクトルを測定して Fig. 4 に示した．ここでみられるように，試料と標準品の両スペクトルは完全に一致し，試料から得られたピークはB(a)Pであることが確認できた．

Table 4. Recovery of 3, 4- Benzopyrene Added to Carbon Black

Sample	Weight of samples (g)	B(a)P added (μg)	Original (ppm)	Recovery (%)
Furnace Black				
A—1	1	100	6.167	105.8
F—1	1	100	0.167	63.2
M—1	1	100	0.003	24.0
Channel Black				
D—3	1	100	N.D.	0
T—2	1	100	0.001	2.1
T—4	1	100	0.002	4.0

N.D. : Not Detected

前述のようにカーボンブラックは炭化水素の熱処理によって生産されるため，B(a)Pの含有は当然考えられる．しかし，今回の分析結果をみると，チャンネルブラックからはきわめて微量のB(a)Pが検出されたにすぎず，また，米国において使用禁止となったファーネスブラックでも11種中5種からはB(a)Pがほとんど検出されなかった．このことはカーボンブラックが強い吸着性を有するため，抽出効率のよいソックスレー抽出法によってもなお溶出できなかったとも考えられる．そこで各種のカーボンブラックに対しB(a)Pの添加回収実験をおこなってみた．すなわち試料として，今回検討した結果B(a)Pの溶出が認められたファーネスブラック2種（A—1，F—2），B(a)Pの溶出が微量であったファーネスブラック1種（M—1）とチャンネルブラック3種（D—3，T—2，T—4）に対し B(a)P 100μg を添加し，その回収率を求めた．Table 4 に示すように回収率は明らかにカーボンブラックの種類により0—105.8%と非常に大きなバラツキが認められた．ファーネスブラックの方がチャンネルブラックよりも回収率がよく，このことは製法の違いによるカーボンブラック本来の吸着能の差に基づくものと思われる．したがって，溶出量の多

いものは回収率もよく，たとえばファーネスブラックのM—1，F—1，A—1の溶出量は，それぞれ 0.003, 0.167, 6.167ppm であり，その回収率は 24.0, 63.2, 105.8% と溶出量の大きい順に高くなっている．また，チャンネルブラックのD—3, T—2, T—4 は溶出量がN.D-0.002ppm ときわめて少なく，その回収率も4%以下であった．したがってB(a)Pの溶出がみられない場合でも，B(a)Pの含有を否定することはできない．これらの理由から，カーボンブラック中のB(a)Pの測定値を評価するには十分注意する必要があり，今後よりすぐれた抽出法の開発が望まれる．

結　論

化粧品原料としてのカーボンブラック中のB(a)Pの分析を目的として，その抽出法について検討した結果，ベンゼンを用いたソックスレー抽出法がもっとも効率よく抽出できることを認めた．この方法を用いてファーネスブラック11種，チャンネルブラック5種の計16種のカーボンブラックについてB(a)Pの分析をおこなったところ，ファーネスブラック6種，チャンネルブラック2種からB(a)Pの溶出を認め，その値は最高 8.333ppm であった．しかし，カーボンブラックにB(a)P 100μgを添加し，回収率を求めたところ，回収率はカーボンブラックの種類により 0—105.8% と非常に大きなバラツキが認められ，B(a)Pの溶出量が多いものは回収率のよいことがわかった．このことから，今回おこなった分析結果で溶出が認められなかったものも，B(a)Pの含有を否定することは危険であり，今後さらに検討する必要があろう．

文　献

1) 松下秀鶴，嵐谷奎一，小谷野道子：産業医学，16, 380, 1974
2) Lee, M. L. and A. H. Ronald : *Anal. Chem.*, 48, 1890, 1976
3) Avarm, G. : *ibid.*, 47, 1469, 1975
4) Wallcave, L., D.L. Nagel, J. W. Smith, and R. D. Wanisk : *Environ. Sci. Technol.*, 9, 143, 1975
5) 鎌田国広，観　照雄，山添律子，原田裕文：東京衛研年報，28-1, 95, 1977
6) 日本薬学会編：衛生試験法注解，345, 1973, 金原出版
7) 白石慶子，白鳥つや子，高畑英伍：食衛誌，14, 173, 1973
8) 松下秀鶴，江角凱夫：分化，21, 1594, 1972
9) Dong, M. and D.C. Locke : *Anal. Chem.*, 48, 368, 1976
10) Haword, J.W., R.T. Teaque, R. H. White, and B. E. Fry : *J. of the A. O. A. C.*, 49, 595, 1966
11) 松下秀鶴，江角凱夫，山田都夫：分化，19, 951, 1970
12) 白山　肇：日化，1, 18, 1977
13) 松下秀鶴，嵐谷奎一：大気汚染研究，10, 205, 1975
14) 松下秀鶴，江角凱夫，鈴木　彰，半田　隆：分析化学，21, 1471, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 129—131, 1978

ベンガラ中の微量ヒ素の定量法

江波戸 擧 秀*, 伊 藤 弘 一*, 原 田 裕 文*

Determination of Trace Amounts of Arsenic in Red Oxide of Iron

KIYOHIDE EBATO*, KOICHI ITO* and HIROFUMI HARADA*

A simple method by atomic absorption spectrophotometry was developed for the determination of arsenic in red oxide of iron, used as a raw material for cosmetics. The procedure is as follows : The sample was dissolved in conc. HCl and it was diluted by distilled water to make its acidity of 8 N HCl. After that, 2 m*l* of 5 M KI solution, 1 m*l* of 50% NaH_2PO_2 solution and 5 m*l* of $HClO_4$ were added into 20 m*l* of the sample solution. Arsenic-iodide was extracted with 10 m*l* of benzene and reextracted twice with 5 m*l* each of water. The arsenic in water phase was determined as arsenic hydrogen by atomic absorption spectrophotometer system equipped with an argon-hydrogen flame. The average recovery of arsenic added to red oxide of iron was 98%, and the coefficient of variation was 4.4%.

緒　　言

著者らはヒ素の分析法として，アルゴン-水素炎を用いる原子吸光法について検討し，若干の市販食品などの分析例とともに前報[1]で報告した．しかし，この方法を鉄含有量の多い試料，たとえばベンガラ，黄酸化鉄などの化粧品原料に適用した場合には，ヒ化水素発生時の反応が激しすぎて測定不能となることが認められた．そこで鉄の障害を除くため，試料溶液にヨウ化カリウムを加えてヒ素をヨウ化物としたのちベンゼンで抽出し，さらに原子吸光法によって定量する方法を検討したところ，良好な結果が得られたので報告する．

実 験 の 部

試薬　とくにことわらないかぎりすべて特級品を用い，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) ヒ素標準溶液　和光純薬(株)製原子吸光分析用ヒ素標準溶液 ($HAsO_2$: As として 1,000ppm) を希釈して用いた．　2) 5 Mヨウ化カリウム溶液　ヨウ化カリウム83 gに水を加えて溶かし 100m*l* とした．　3) 50%次亜リン酸ナトリウム溶液

装置　1) 原子吸光装置　日本ジャーレルアッシュ社製 AA-8500型　2) ヒ化水素発生装置および捕集器　日本ジャーレルアッシュ社製 ASD-1 型

試験溶液の調製　ベンガラ 0.5 g を石英製丸底フラスコにとり，濃塩酸 15m*l* を用いて加温溶解したのち，25 m*l* メスフラスコに移し 濃塩酸を加えて定容とし試験溶液とする．

操作法　試験溶液 10m*l* を 100m*l* 分液ロートに正確にとり，濃塩酸 4.4m*l* を加えたのち水を 5.6m*l* 加え，全量を 20m*l* とし 8 N塩酸濃度とする．ついで5 Mヨウ化カリウム 2m*l*, 50%次亜リン酸ナトリウム溶液 1m*l*, 過塩素酸 5m*l* を加え15分間放置する．放置後，ベンゼン10m*l* を加え 5 分間振とうし，静置して水層を除去したのち，ベンゼン層に水 5m*l* を加えて 3 分間振とうして逆抽出を行ない，抽出液を試験管にとり，さらにベンゼン層に水 5m*l* を加え同様に操作し，前抽出液と合する．その 5m*l* をヒ素発生ビンに正確にとり，濃塩酸6.3 m*l* および水を加え全量を 20m*l* としたのち，前報[1]に準じて原子吸光法によりヒ素を測定する．その測定条件を Table 1 に示す．

実験結果および考察

ヒ素のヨウ化物生成条件　塩酸濃度とヨウ化カリウム添加量　ヒ素測定のさい，発泡の原因となる鉄を除去する目的で，本法では試験溶液中のヒ素をヨウ化物として抽出しているが，このときの至適塩酸濃度とヨウ化カリウム添加量について検討した．すなわち，0.5μg のヒ素

* 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 Analytical Condition of Arsenic

Wave length	193. 7nm
Lamp current	15 mA
Argon flow rate	7.0 liter/min
Argon gas pressure	1.5 Kg/cm²
Hydrogen flow rate	2.5 liter/min
Hydrogen gas pressure	0.4 Kg/cm²
Argon carrier flow rate	5.0 liter/min
Generation gas pressure	0.5 Kg/cm²

Instrument : Nippon Jarrell-Ash Model AA-8500 atomic absorption spectrophotometer equipped with a generation and collection of arsine.

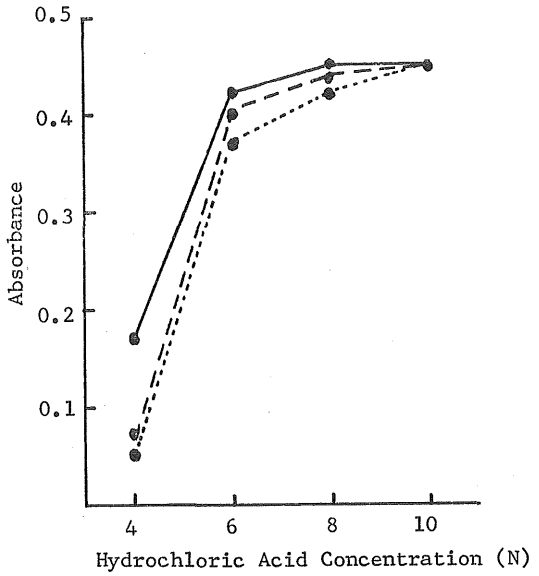


Fig. 1. Effects of Concentration of Hydrochloric Acid and Potassium Iodide on Arsenic Absorbance
Prepared Solution : 0.5 μg of Arsenic
●——● : 5 M KI ●·····● : 3 M KI
●- - -● : 4 M KI

を含有するベンガラ試験溶液の塩酸濃度を 4, 6, 8, 10 Nの4段階に調整し，その 20m*l* に 3, 4, 5Mの3段階に調整したヨウ化カリウム溶液をそれぞれ 2m*l* ずつ添加する．この液について前記の操作法の項にしたがい，ヒ素を定量した結果を Fig. 1 に示す．Fig. 1 に示すようにヒ素のヨウ化物生成は，塩酸およびヨウ化カリウムの濃度によりその生成量がいちじるしく影響されるが，いずれも両者の濃度が高いほどヨウ化物の生成が良く，5 Mヨウ化カリウム溶液を用いた場合は塩酸濃度が 8 N 以上であれば抽出率がほぼ 100% である．そこで本法では塩酸濃度を 8 N とし， 5 M ヨウ化カリウム溶液 2m*l* 添加することにした．

過塩素酸の添加　著者ら[2]がさきに検討し報告したスズのヨウ化物-ベンゼン抽出法では，ヨウ化物生成促進のために過塩素酸を添加し効果のあることを認めている．そこで，ヒ素についてもヨウ化物生成に及ぼす過塩素酸の影響をみるため，試験溶液に過塩素酸 2，5m*l* それぞれ添加して検討したところ，過塩素酸無添加のヒ素の吸光度に対して過塩素酸 2m*l* 添加の場合は約 5 %，5m*l* 添加では約 10% の吸光度の向上がみられた．しかし，5m*l* 以上添加した場合には不溶性物質が大量に生成され，操作がはん雑となるため本法では過塩素酸添加量を 5m*l* とした．

試料溶液の脱色　試験溶液に 5 Mヨウ化カリウム溶液およびベンゼンを加えたとき，両者とも紫紅色を呈し，ベンゼン層と水層との境界面が判別しにくいため，50% 次亜リン酸ナトリウム溶液 0. 5，1. 0m*l* をそれぞれ試験溶液に添加して脱色をおこない，その影響を検討したところ，いずれも吸光度に変化はみられなかった．この場合，次亜リン酸ナトリウム添加量と脱色に要する時間の関係をみると，添加量の多い方が脱色時間は短かくなる．たとえば，50% 次亜リン酸ナトリウム溶液 0. 5m*l* ではその脱色時間は30分，50%次亜リン酸ナトリウム溶液1. 0m*l* では約15分間で脱色が終了することがわかり，本法では 50% 次亜リン酸ナトリウム溶液 1. 0m*l* を添加することとした．

抽出条件　ヒ素-ヨウ化物を塩酸溶液からベンゼン層に振とう抽出する時間について検討したところ，5 分間振とうすれば十分であることが認められた．また，田中[3]は水を用いてベンゼン層からヒ素を逆抽出しているが，その条件について検討したところ，水抽出時間は 3 分間で 2 回以上抽出すれば，バラツキが少なく最も効率よく抽出されることがわかったので，本法では水 5m*l* を用いて 3 分間抽出を 2 回くりかえすことにした．またガラス器具などからのヒ素の溶出も十分考えられることから，前記に述べた操作はできるだけじん速におこなうことが必要である．

添加回収実験　ベンガラについてヒ素の添加回収実験をおこなった．すなわち，前記の試験溶液の調整および操作法の項にしたがい，0. 5μg 添加したヒ素測定溶液をつくり，測定したところその平均回収率は 98% であった．また，本法の測定精度を確認するため前記の方法により調製したヒ素 0. 5μg を含むヒ素測定溶液を10回くり

かえし測定をおこなったところ，標準偏差 4.6，変動係数4.4%であった．また，ベンガラ試料7種についてヒ素の含有量（ppm）を測定した結果はそれぞれ 0.09, 0.04, 0.06, 0.17, 0.04, 0.03 以下，0.03 以下であった．

結　論

原子吸光法によるヒ素の定量法は，簡便かつ精度も高いが一方，多量の鉄を含有する試料についてはその定量が困難であった．しかし，ヒ素をヨウ化物としてベンゼン抽出し，さらにこのベンゼン層のヒ素を水抽出液中に転溶させる方法について検討し，良好な結果を得ることができた．すなわち，試料を塩酸に加温溶解したのち8N塩酸濃度とした試料溶液に5Mヨウ化カリウム溶液2 ml，50%次亜リン酸ナトリウム溶液 1ml，過塩素酸5 ml を加えたのちベンゼン 10ml を用いて抽出し，このベンゼン層から水で2回逆抽出をくりかえしてヒ素を抽出し原子吸光法によって定量する．この方法について添加実験による回収実験をおこなったところ，回収率は98%，また10回くりかえし実験による変動係数は 4.4%であった．

文　献

1) 江波戸攀秀，天川映子，山野辺秀夫，鈴木助治，戸谷哲也：食衛誌，15，469，1974
2) 江波戸攀秀，原田裕文：東京衛研年報，28-1，100，1977
3) 田中　克：分化，10，1087，1961

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 132—136, 1978

家庭用品の衛生化学的研究（第5報） 繊維製品中のクロム含有量について

植田忠彦*, 観照雄*, 森謙一郎*
西田茂一*, 原田裕文*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (V) Chromium Contents in Textile Products

TADAHIKO UETA*, TERUO KAN*, KENICHIRO MORI*,
SHIGEKAZU NISHIDA* and HIROFUMI HARADA*

The amount of total chromium (III and VI) in 55 samples of commercial textile products consisting of 27 wool, 27 mixed wool spun and one nylon fiber was determined by flameless atomic absorption method, after the wet digestion of the samples. Total Cr present in 42 samples (76.4%) was in the range of 10—4,635 μg/g. The samples found to be containing Cr were placed in a synthetic sweat solution and immersed for 1 hour in a 40°C water bath. From the solution, Cr (VI) was extracted with n-butyl acetate containing 0.3% trioctyl amine. Consequently, it was found that Cr (VI) extracted into a synthetic sweat solution was in the range of 0.1—10.6 μg/g, while the total Cr extracted into the same solution was 0.1—46.5 μg/g.

はじめに

繊維製品の着用によって起きる皮膚炎に関しては種々の原因物質が考えられている．その中で羊毛，絹等の染色に用いられているクロムは古くからアレルギー性接触皮膚炎の原因物質として知られており，特に六価クロムは三価クロムに比較して経口毒性および細胞膜透過性が強くクロム過敏症の人に対し強い反応を示すといわれている[1]．今回市販の繊維製品についてクロム含有量を測定し，同時に人工汗によるクロムの溶出量についても調査することを目的として測定法を検討した．その測定法を用いて，染色にクロムを使用することの多い羊毛を主材料とした市販の繊維製品および毛糸のクロム含有量調査を行なった．

実験方法

1. 試料 試料は東京都内で昭和52年12月に購入した市販の繊維製品子供用靴下8，婦人用靴下8，男子用靴下8，子供用手袋2，婦人用手袋2，男子用手袋2，子供用マフラー1，婦人用マフラー2，男子用マフラー2および毛糸20の計55検体である．これらの繊維素材はナイロン100% 1件を除いていずれも毛またはその混紡である．

2. 試薬 (1)三価クロム標準溶液（1,000ppm）：クロム（和光純薬製，99.99%）0.1000g を少量の6N塩酸に溶解し，水を加えて 100m*l* とした．この溶液を適宜希釈して用いた．(2)六価クロム標準溶液（1,000ppm）：和光純薬製原子吸光分析用クロム標準溶液を適宜希釈して用いた．(3)人工汗（JIS L-0848, 1974）：(i)酸性人工汗（以下A汗と略す）—塩化ナトリウム10g，乳酸1gおよびリン酸二ナトリウム 2.5g を水に溶解して 1*l* とした．(ii)塩基性人工汗（以下B汗と略す）—塩化ナトリウム10g，炭酸アンモニウム 4gおよびリン酸二ナトリウム 2.5gを水に溶解して 1*l* とした．(4)0.3% トリオクチルアミン—n-酢酸ブチル（以下 TOA-BuAc と略す）溶液：トリオクチルアミン 3m*l* に酢酸ブチルを加えて 1,000m*l* とした．

3. 装置 原子吸光分析計：日本ジャレルアッシュ社製 AA-8500型に同社製 FAL 100型フレームレスアトマイザーを装着して用いた．光源：浜松テレビ社製ク

* 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

ロム中空陰極ランプおよびバックグラウンド補正用として同社製チタン中空陰極ランプを用いた．グラファイトキュベット：日本ジャレルアッシュ社製 A-31 型グラファイトチューブ，試料分注器：Rainin 社製マイクロピペットを各々用いた．

4. 測定溶液の調整

(1) 灰化による総クロム 色柄による定量値の片寄りを防止するため試料は細切し，十分混和したのちその 0.2g を秤取する．衛生試験法中有害性元素試験法[2]にほぼ準じて硫酸過酸化水素による湿式灰化を行なったのち水を加えて 50m*l* とし，さらに硫酸濃度として 0.5N 以下となるように適宜希釈し，測定溶液とする．

(2) 人工汗浸出による総クロムおよび六価クロム 前項で作製した細切試料 1.0g を共栓付 100m*l* 三角フラスコに秤取し，これにB汗 40m*l* を加えたのち 40°の恒温水槽中で時々振り混ぜながら1時間浸出する．この浸出液をガラスフィルター（G-3）を用いてろ過し，このろ液を水で希釈して汗の含有量が50%以下となるようにして総クロムの測定溶液とする．また六価クロム測定溶液の調整はこのろ液 10.0m*l* を 100m*l* 分液ロートに取り，これに水10m*l*，40%硫酸アンモニウム溶液 3m*l* および2N硫酸3m*l* をそれぞれ加えたのち，さらに TOA-BuAc 溶液 10.0m*l* を加え10分間振り混ぜて抽出を行ない，ここに得た有機層を六価クロムの測定溶液とする．

5. 定量法 Table 1 に示す測定条件により前記試験溶液の調整の項によって得られた各測定溶液をマイクロピペットを用いて注入し得られたピーク高と後述の検量線よりクロムの量を求める．

Table 1. Analytical Conditions of Cr

Operation step	Electric current (A)	Time (sec)
Dry	28	15
Ash	130	25
Atomize	264	15

Wave length : 357.9nm, Lamp current : 10mA
Titan wave length for background correction : 364.3nm Lamp current : 10mA, Argon gas flow rate : 2*l*/min (Auto-1)
Sens : 0-30, Injection : 30 μl

6. 検量線 前項に示した測定条件に従って三価クロム標準溶液の 0.3ng—1.8ng を注入し，得られたピーク高より検量線を作成したところ原点を通る直線となった．また六価クロム標準溶液の 0.1μg—0.6μg を取り前記六価クロム測定溶液の調整の項に従って抽出した溶液の 30μl をそれぞれ注入し，検量線を作成したところ原点を通る直線となった．

結果および考察

1. 測定条件の検討 フレームレス原子吸光分析により金属の定量を行なう場合，共存する塩類，酸，有機物等が測定値に大きな影響を与えることが知られている[3,4]．これらの影響のうち，塩等による正の誤差を除去するためにバックグラウンド補正（以下 B.K.G 補正と略す）が一般に用いられている．そこで B.K.G 補正法について検討を行なった．ホローカソード型 D_2 ランプを用いた場合クロムの分析波長附近における輝度が弱いためノイズが大となり不適当であった．そこで今回チタン（補正波長 364.3nm）を用いたところ安定した測定が可能であった．原子化電流はクロムの沸点が 2,480° であることから 264 アンペアとし，また時間は15秒に設定し，さらに乾燥電流について検討したところ28アンペア，時間15秒で十分であった．一方灰化電流については塩化ナトリウムの沸点が1,440°であることから 130 アンペア，時間25秒とすることにより，人工汗中のクロム測定の際塩化ナトリウムの含有量が多いため B.K.G 補正で完全に除去することのできなかったノイズが消去でき，安定した測定が可能となった．またアルゴンガス流量は感度およびキュベットの消耗等考慮して 2*l*/min とした．

(1) 硫酸濃度の影響 試料は硫酸過酸化水素分解を行なうため硫酸の残留が考えられる．その影響について検討したところ Fig. 1 に示すように 0.5N 以下ではほぼ一定値を示し，それ以上の濃度では吸光度が減少する．

(2) 人工汗濃度の影響 人工汗浸出溶液中の総クロムを直接測定する場合の汗の濃度の吸光度への影響について検討したところ Fig. 2 に示すように50%以下では酸性，塩基性汗共に影響が認められなかった．しかし50%以上

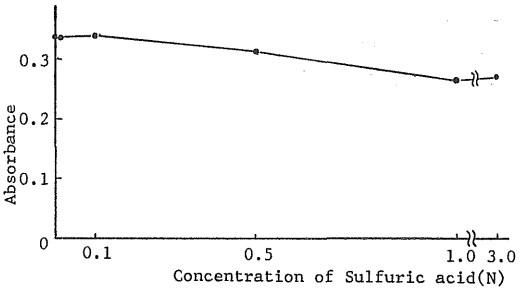


Fig. 1. Effect of Sulfuric Acid Concentration on Cr Absorbance
Cr (III) : 0.04 μg/m*l*

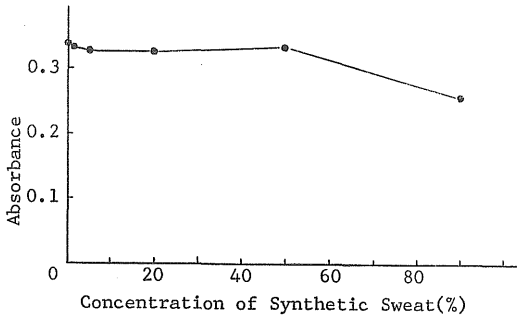


Fig. 2. Effect of Synthetic Sweat on Cr Absorbance
Cr (III) : 0.04 μg/m*l*

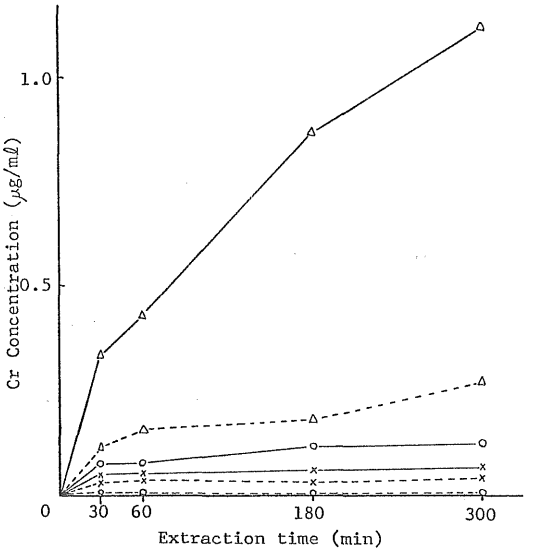


Fig. 3. Relation between Extraction Time and Cr Content Extracted from Cloth
—○— total Cr extracted with acid sweat
…○… Cr (VI) extracted with acid sweat
—△— total Cr extracted with basic sweat
…△… Cr (VI) extracted with basic sweat
—×— total Cr extracted with aqua
…×… Cr (VI) extracted with aqua

では吸光度が漸減すると共に若干バラツキが認められた．(3) 金属イオンの影響 染料の堅牢度を増すために種々の金属が用いられていると考えられるが今回は前報において報告した銅，スズのほか鉄，アルミニウム，コバルトの5種についてクロム定量時における障害の有無を検討した．その結果クロムを 0.04μg/m*l* 含む硫酸溶液および人工汗溶液中にこれらの金属が 1,000 倍存在した場合においてもほとんど影響は認められなかった．また TOA-BuAc 溶液により六価クロムの抽出を行なう場合においてもこれらの金属が 1,000 倍量存在してもほとんど障害は認められなかった．

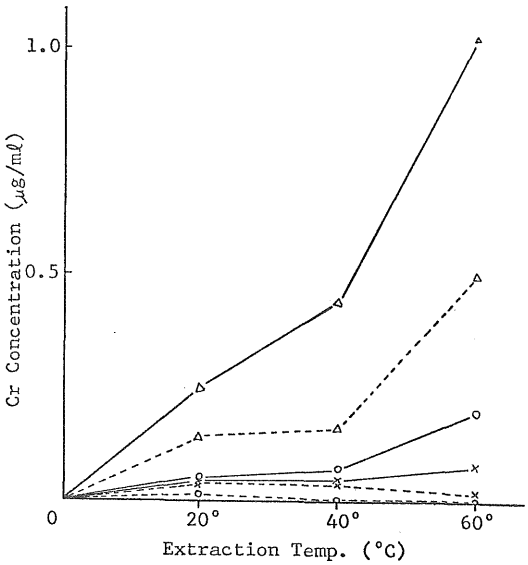


Fig. 4. Relation between Extraction Temp. and Cr Content from Cloth
—○— total Cr extracted with acid sweat
…○… Cr (VI) extracted with acid sweat
—△— total Cr extracted with basic sweat
…△… Cr (VI) extracted with basic sweat
—×— total Cr extracted with aqua
…×… Cr (VI) extracted with aqua

2. 人工汗による溶出条件の検討

(1) 浸出時間と溶出量 対象として試料 No. 36 の男子用マフラーを用い，この細切試料 1 g にA汗，B汗および水をそれぞれ 40m*l* 加えたのち浸出温度 40° とし時々振り混ぜながら溶出を行なう．一定時間ごとに 5m*l* を分取し，ガラスフィルターを用いてろ過したのちその一定量について総クロムおよび六価クロムを定量し Fig. 3 に示した．これによれば溶出量の最も大きいものはB汗であり，1時間浸出時の総クロムは水およびA汗の溶出量の約5倍であるのに対し，水およびA汗の溶出量には大きな差異は認められなかった．また時間による溶出量の変化もB汗では漸増するのに対し，水，A汗はいずれも 0.5～1 時間でほぼ一定となることがわかった．

(2) 浸出温度と溶出量 浸出時間を1時間とし，温度をそれぞれ 20°，40° および 60° とした場合の溶出量について前項と同様にして総クロムおよび六価クロムの定量

Table 2. Chromium Contents in Textile Products

No.	Samples	Materiales	Method-1 Total Cr (ppm)	Method-2 Total Cr (ppm)	Method-2 Cr (VI) (ppm)
1	Socks for children	An, N, W, Un	954	5.5	2.8
2		An, W, N, Un	917	3.6	3.1
3		An, W, N, Un	668	1.9	0.8
4		An, N, W, Un	579	3.4	3.1
5		An, N, W, Un	558	4.2	1.4
6		An, N, W	463	1.6	1.5
7		An, N, W	345	1.9	1.4
8		An, N, W	151	0.7	0.1
9	Stockings for ladies	W, E, N, Un	744	5.6	1.6
10		An, W, N, Un	460	1.3	0.4
11		An, W, N, Un	198	4.2	1.4
12		An, W, N, Un	148	0.6	0.1
13		An, N, W, Un	72	0.4	0.1
14		An, N, W, Un	ND	ND	ND
15		N 100%	ND	ND	ND
16		An, N, W, Un	ND	ND	ND
17	Socks for men	W, N	3069	16.8	2.6
18		W, N	2530	6.4	3.4
19		W, N	1675	17.2	10.6
20		W, N	1644	22.4	10.4
21		W, N	1325	7.6	4.8
22		An, N, W, Un	284	ND	ND
23		An, W, N, Un	37	ND	ND
24		An, W, N, Un	ND	ND	ND
25	Gloves for children	W 100%	ND	ND	ND
26		W 90%, N 10%	ND	ND	ND
27	Gloves for ladies	W 90%, N 10%	20	0.2	ND
28		W 90%, N 10%	16	0.2	ND
29	Gloves for men	W 75%, An 25%	52	0.2	ND
30		W 100%	18	0.1	ND
31	Muffler for children	W 100%	1236	1.9	1.2
32	Muffler for ladies	W 100%	2463	12.3	9.8
33		W 100%	2032	3.7	ND
34	Muffler for men	W 100%	1711	17.6	6.4
35		W 100%	505	2.9	2.1
36	Woollen yarn	W 100%	4635	18.4	5.4
37		W 100%	3675	27.2	10.0
38		W 100%	2450	46.5	8.2
39		W 100%	2450	20.0	3.7
40		W 100%	700	15.2	2.2
41		W 100%	340	4.8	0.3
42		W 100%	123	2.8	0.6
43		W 100%	100	4.0	ND
44		W 100%	92	ND	ND
45		W 100%	88	8.0	ND
46		W 100%	52	0.6	ND
47		W 100%	42	ND	ND
48		W 100%	10	0.6	0.3
49		W 100%	ND	ND	ND
50		W 100%	ND	ND	ND
51		W 100%	ND	ND	ND
52		W 100%	ND	ND	ND
53		W 100%	ND	ND	ND
54		W 100%	ND	ND	ND
55		W 100%	ND	ND	ND

Method-1 : wet digestion

Method-2 : extracted with basic synthetic sweat

An : acryl E : polyester N : nylon Un : polyurethane W : wool

ND : not detected

を行ない Fig. 4 に示した．当然のことながらB汗による溶出量が水およびA汗のそれを大きく上まわっており，特に 60° で急激に増加した．一方六価クロムはB汗を用いた場合総クロムとほぼ同様の傾向を示すのに対し，水による溶出は僅かであり，A汗ではほとんど認められず，温度による影響も少なかった．

(3) 浸出溶液中での六価クロムの安定性　六価クロムは酸性溶液中で還元されて三価となり易いことが知られているので浸出溶液中での安定性について検討した．すなわち六価クロム 0.08μg/ml 濃度のA汗，B汗および水の各溶液を調整し，40° の水浴中での経時変化を観察したところ0分，30分，60分，180分，300分後のいずれの浸出溶液中の六価クロムも減少しなかった．またこれらの操作時に各溶液の pH の変化はほとんど認められなかった．以上検討した結果本試験法においては浸出温度および時間を「有害性物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」の中でホルムアルデヒドの浸出法として採用している 40°，1時間とすることとし，また浸出溶液はクロム溶出量の多い塩基性人工汗を用いることとした．

(4) 六価クロム抽出法　六価クロムの抽出法としては TOA[2,6] または APDC[7] を用い，溶媒抽出する方法が主として行なわれているがいずれも抽出率の安定性，感度等良好であるが pH 調整の煩雑さの少ない TOA 法によった．抽出溶媒としては TOA-MIBK 溶液では抽出時のエマルジョンが比較的強く，またこの溶液を作製し保存した場合黄色の着色が起る．そこで MIBK の代りに酢酸ブチルを用いたところエマルジョンも少なく，かつ溶液も安定であったため抽出溶媒としては0.3%TOA-BuAc 溶液を用いることとした．抽出した六価クロム溶液はやや不安定なため速かに測定する必要がある．

3. 市販繊維製品中のクロム含有量

(1) 灰化による総クロム　Table 2 に示した測定結果より総クロムとして 1,000ppm 以上の高濃度のものは男子用靴下5，マフラー1，婦人用マフラー2，子供用マフラー1および毛糸4の計13検体，また 100ppm 以上 1,000ppm 未満の比較的高濃度のものとしては子供用靴下等18検体，100ppm 未満のもの11検体，定量限界（ND）以下のもの13検体でありクロム検出率は76.4%であった．しかも全体の半数以上が 100ppm 以上の比較的高い値であった．そこでクロム含有量とこれらの検体の色，素材および用途との関連性について見たところ，色との相関は認められず，素材および用途別に見ると羊毛および羊毛混紡である靴下，マフラーからの検出率は約90%であるのに対し，手袋からの検出率は67%で検出量においても数十ppm と低く，また毛糸においては羊毛100%の表示であるにもかかわらず検出率65%，検出量は 10—4,635ppm と大きなバラツキがみられた．これら全体としてのクロム含有量は 10—4,635ppm，ND が13，平均 721ppm であった．この時の総クロムの添加回収率は，アクリル・ナイロン・毛・ポリウレタン混紡のものおよび毛 100% の試料0.2g に対し六価クロム 50μg および 100μg をそれぞれ添加したのち灰化，定量を行なったところ 105.4% であった．

(2) 人工汗浸出クロム　溶出総クロム量は 0.1—46.5 ppm で平均 5.3ppm であった．また皮膚炎等の原因となる六価クロムの最高値は靴下の 10.6ppm であり，クロムを検出した試料中の71%より六価クロムが溶出することが明らかとなった．またクロム含有量と溶出クロム量の相関を求めたところ $\gamma=0.71$（n=38）と処理件数は少ないが相関性が認められた．

まとめ

羊毛および羊毛混紡の市販の繊維製品54，ナイロン100%のもの1，計55検体についてクロムの含有量および溶出量を測定したところつぎの結果を得た．

(1) 全検体の76.4%からクロムを検出した．クロム含有量は 10—4,635ppm，平均 721ppm であった．

(2) クロムを含有する大部分の製品から人工汗によって六価クロムを含むクロムが溶出することがわかった．

このように繊維製品に用いられたクロムが汗により溶出することから，クロムが皮膚炎の一原因物質となっている可能性がある．

謝辞　本調査に御便宜をはかっていただいた東京都衛生局薬務部薬事衛生課家庭用品担当の方々に深謝します．

（本研究は昭和52年度当研究所調査研究課題「消費生活物資の衛生化学的試験法設定に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1) 木村正己，小野　哲，和田　攻訳：環境汚染物質の生体への影響(2)　クロム・バナジウム，42, 1977, 東京化学同人
2) 日本薬学会編：衛生試験法，269，1973，金原出版
3) 下村　滋，林　康久，森田秀芳：衛生化学，21，204，1975
4) 西島帯刀，土器屋由紀子，飯塚秀夫，戸田昭三：分析化学，26，349，1977
5) 観　照雄，植田忠彦，水石和子，西田茂一，原田裕文：東京衛研年報，28-1，79，1977
6) 環境汚染分析法　4　重金属：77，1973，大日本図書
7) 松岡　澄：産業医学，6，522，1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 137—141, 1978

アナログ変換による電子捕獲検出器の直線性の改善

竹 内 正 博*, 原 田 裕 文*

Linearization of Electron Capture Detector Response by Analog Conversion

MASAHIRO TAKEUCHI* and HIROFUMI HARADA*

In order to improve the linearity and the sensitivity of the pulse-sampling electron capture detector (ECD), the ordinary response function (1) was converted into the Wentworth function (2) by an analog converter.

$$I_b - I_e = Kn \qquad (1)$$

$$\frac{I_b - I_e}{I_e} = Kn \qquad (2)$$

where I_b is the detector current in the absense of an electron capturing species, Ie is the detector current in the presence of an electron capturing species, K is the constant, and n is the concentration of the species. The analog converted response in the case of applying a long pulse to the ECD showed a considerably wider linear range and a relatively higher sensitivity than those of the ordinary response. All the linear dynamic ranges of γ-BHC, Aldrin and p, p'-DDE were over 10^3 at 2000 μsec of pulse period. The signal-to-noise ratio of 1 pg of γ-BHC injected was 17 in the analog converted response at 2000 μsec of pulse period and 3.5 in the ordinary response at 100 μsec of pulse period.

緒　　言

電子捕獲検出器（Electron Capture Detector, 以下ECD と略す）はハロゲンや酸素を含む電子親和性の高い分子に対して選択的に高感度を示すので，有機塩素系農薬，ポリ塩化ビフェニール，有機水銀化合物等の環境汚染物質の分析に広く使用されている．

ECD は β 線の電離作用によってセル内に生成した自由電子が電子親和性の高い試料分子に捕捉され，その結果として試料分子の濃度に比例して減少する電離電流をモニターする検出器であり[1,2]，セル内の電極に数ボルトの直流電圧を印加する直流型と，数十ボルトの定周波パルスを印加するパルス型が一般的である．しかし，直流型は線源や電極表面の汚れによる接触電位効果を大きくうけるので，現在は汚れの影響を比較的うけにくいパルス型が普及している．

パルス型 ECD は印加するパルスの周期を長くするほど感度が高くなるが[3,4]，それに対して応答の直線性が悪くなるので，通常の装置の場合は感度を多少犠牲にしてもある程度の直線性が確保できるように，パルス周期を 100μsec 前後に設定している．しかし，この程度までパルス周期を短かくしても，応答の直線性をあらわすパラメーターであるダイナミックレンジの値は高々 10^2 どまりか，むしろそれ以下である場合が多い．したがって実際の分析操作において，試料濃度が少し高くなると応答が飽和してしまうため，必ずしも使い易い検出器といいがたく，直線性の改善が望まれるところである．

最近は，定電流パルス型 ECD という型式でダイナミックレンジを拡大した装置も市販されてはいるが，著者らは自製したアナログ変換器で従来の定周波パルス型 ECD の信号を変換することによって，応答の直線性を改善し，さらにこれまでは直線性が極端に悪くなるという理由で印加することができなかった長い周期のパルスを印加することによって，ECD の感度を向上せしめたので報告する．

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

実　　験

1. 装置

島津 GC-5A 型ガスクロマトグラフに ^{63}Ni (10mCi) を線源とする島津 ED-5 型 ECD (共軸型電極方式) をとりつけ，さらに同ガスクロマトグラフに付属する ECD 用電源のかわりに，DuMont 404 型パルス発生器をとりつけて使用した．また，通常の ECD の信号を変換するためのアナログ変換器を接続した．カラムは 2% Silicon OV-17, Chromosorb W (AW-DMCS) (60～80mesh) を長さ 1m，内径 3mm のガラスカラムに充てんしたものを用いた．温度はカラム，注入口および ECD をそれぞれ180°，200°，250°に設定した．キャリヤーガスは高純度窒素ガス (99.99%) を用い，水および有機物などの不純物を除去するために，Molecular Sieve 13X (30～60mesh) を充てんした長さ40cm，内径 6mm のステンレススチール製カラムを通過させてから，ガスクロマトグラフに導入した．流速は 80m*l*/min とした．

2. アナログ変換器

ECD 内にキャリヤーガス のみが流れているときの電離電流 (バックグランド電流) を I_b, ECD 内に電子親和性を有する試料分子が存在するとき の電離電流を I_e とすると，通常の ECD の場合は応答が(1)式を満たすものとしてエレクトロメーターが設計されており，I_b-I_e に比例する信号をクロマトグラムとして記録する．しかし，(1)式は ECD 内に入る試料分子の濃度が極めて低い場合においてのみ成立するので，試料分子の濃度が高くなると応答に飽和現象があらわれる．

それに対し，Wentworth ら[5,6] が ECD 内の電子捕獲反応を速度論的に考察することによって導いた(2)式によってあらわされる応答は，かなり高濃度まで直線性を示すことが期待できる．

$$I_b - I_e = Kn \qquad (1)$$

$$\frac{I_b - I_e}{I_e} = Kn \qquad (2)$$

ここで，Kは比例定数，n は試料分子の濃度である．

そこで，(1)式であらわされる通常の ECD の応答を(2)式を満たすように信号変換することにした．Fig. 1 に自製したアナログ変換器[7-9]の回路を示す．

I_e はガスクロマトグラフ のエレクトロメーターで電圧に変換されたのち，オペレーショナルアンプ a で増幅される．そして，一方はそのままアナログデバイダー c の入力端子Dに入り，他方は1/10に減衰されてからオペレーショナルアンプ b に入る．キャリヤーガスのみが流れている状態で可変抵抗 VR を調節して $I_b-I_e=0$ になるように I_b を設定すると， c の入力端子に $(I_b-I_e)/10$に相当する信号が入る．c は E=10N/D の演算を行なう素子であるので，$E=(I_b-I_e)/I_e$ に相当する信号が得られる．

3. 試薬

γ-BHC，アルドリンおよび p,p'-DDE (和光純薬製) を n-ヘキサンに溶かし，それぞれ 1mg/m*l* の標準原液を調製した．ついで，その一定量をとり10倍ずつ希釈を

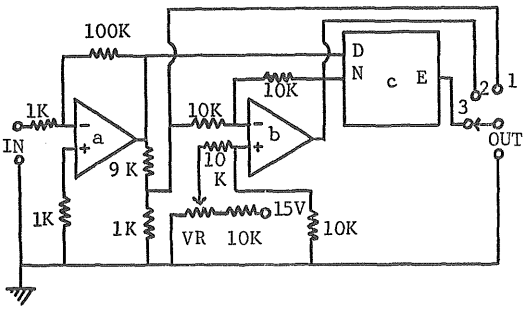


Fig. 1. Schematic Diagram of an Analog Converter
a, b : Operational amplifier (Fairchild μA 740)
c : Analog divider (Burr-Brown 4291 K)
Output——
(1) : I_e, (2) : I_b-I_e, (3) : $(I_b-I_e)/I_e$

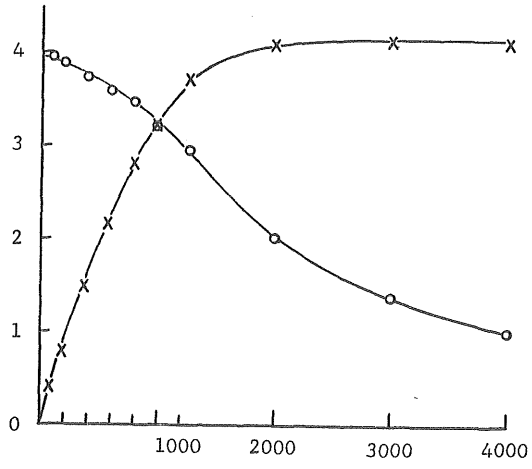


Fig. 2. Effect of Pulse Period on Background Current and Electron Concentration
○——○ : Background current (nA)
×——× : Electron concentration (arbitrary unit)

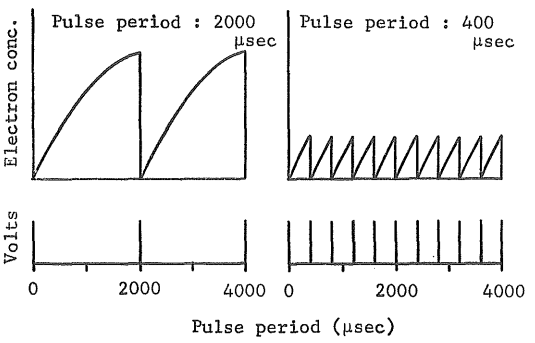


Fig. 3. Schematic Changes in Electron Concentration at Two Different Pulse Periods

くり返すことによって，適宜必要な濃度の標準溶液を調製した．

結果および考察

1. バックグランド電流および自由電子濃度

ECD の応答は印加するパルスの周期 (t_p) の影響を大きくうけるが，これは ECD 内の自由電子濃度 ([e]) が t_p によって著しく変化するためと考えられる．そこで，本実験に使用した ECD について，[e] におよぼす t_p の影響を検討した．

印加するパルスの幅を 2.0μsec，電圧を 30V に固定し，種々の t_p における I_b を測定した．ついで，(3)式の関係から [e] を求めた[5]．

$$[e]=k\ t_p\ I_b \qquad (3)$$

ここで，k は比例定数である．

Fig. 2 より，I_b は t_p が長くなるにつれて減少するが，それに対し [e] は t_p が長くなるにつれて高くなり，$t_p>2,000\mu$sec で飽和して一定となることが認められた．

以上の結果は，Fig. 3 に示した模式図によって説明することができる．I_b は単位時間内に陽極に移動する自由電子の総和に比例するので，単位時間あたりのパルスの印加回数，すなわち周波数 ($1/t_p$) が減少するにつれて低下する．したがって，I_b は t_p が長くなるにつれて低下する．一方，[e] はパルスが印加された直後からつぎのパルスが印加されるまでの間に生成する自由電子数に比例するので，t_p が長くなるにつれて高くなる．しかし $t_p>2,000\mu$sec では，生成した自由電子の再結合が無視できなくなるため，[e] は飽和して一定となる．

2. アナログ変換した応答のガスクロマトグラム

γ-BHC，アルドリンおよび *p*, *p*′-DDE の混合溶液を試料として得られるアナログ変換した応答のガスクロマトグラムを Fig. 4 に示す．

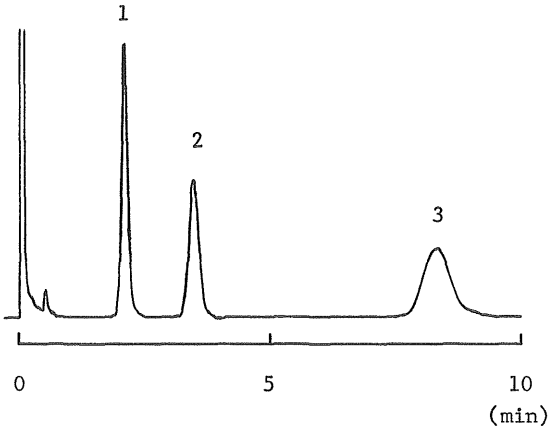


Fig. 4. Gas Chromatogram of Analog Converted Response
1: γ-BHC, 2: Aldrin, 3: *p*, *p*′-DDE

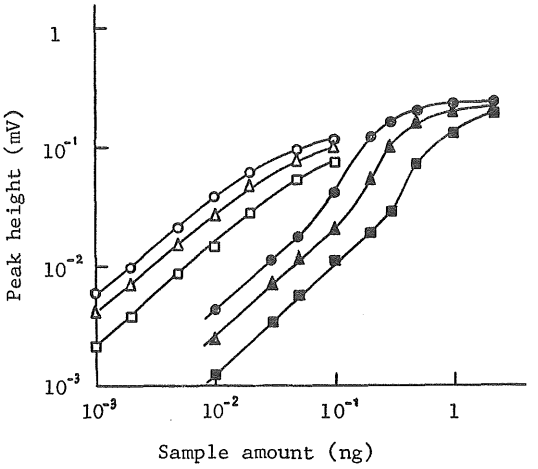


Fig. 5. Concentration Dependence of Ordinary Response

Pulse period : 2000 μsec	Pulse period : 100 μsec
○——○ : γ-BHC	●——● : γ-BHC
△——△ : Aldrin	▲——▲ : Aldrin
□——□ : *p*, *p*′-DDE	■——■ : *p*, *p*′-DDE

これを通常の応答のガスクロマトグラムと比較したところ，感度の相違を別にすればパターンは全く一致しており，ECD の信号をアナログ変換しても，見かけ上は通常の ECD ガスクロマトグラムと全く変らないことが確認された．

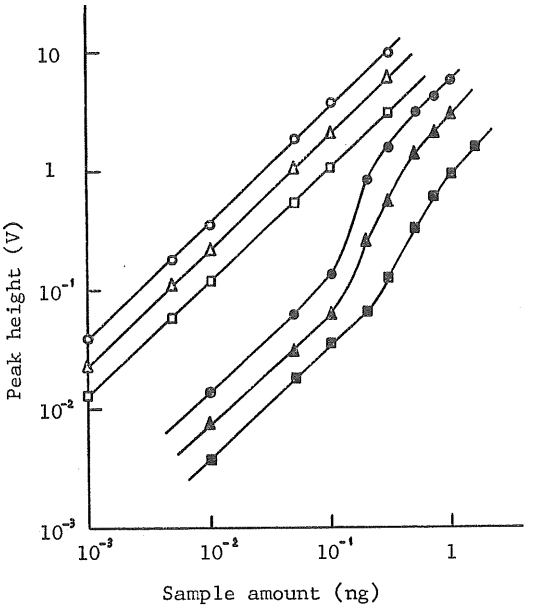


Fig. 6. Concentration Dependence of Analog Converted Response

Pulse period: 2000 μsec　Pulse period: 100 μsec
○——○ : γ-BHC　●——● : γ-BHC
△——△ : Aldrin　▲——▲ : Aldrin
□——□ : *p*, *p*′-DDE　■——■ : *p*, *p*′-DDE

3. 応答の直線性

通常の応答とアナログ変換した応答の直線性を検討するために，比較的短かい周期のパルス（t_p=100μsec）を印加した場合と，ECD 内の自由電子濃度が完全に飽和するようなかなり長い周期のパルス（t_p=2,000μsec）を印加した場合について，γ-BHC，アルドリンおよび *p*, *p*′-DDE のそれぞれの注入量とピーク高の関係（検量線）を求めた．

Fig. 5 に示したように，通常の応答はどの試料についても直線範囲が狭く，比較的広い直線範囲が期待されるはずの t_p=100μsec の場合でさえ，ダイナミックレンジの値は10程度である．同図は，一見かなり広い直線範囲を示しているようにも見えるが，対数-対数プロットであるので，直線範囲は勾配 $\tan\theta=1$ の範囲に限定される．しかるに，t_p=100μsec の場合は，いずれの試料とも注入量が多くなると検量線がS字状を呈し，t_p=2,000μsec の場合は，いずれの試料とも検量線の勾配が $\tan\theta<1$ となっている．

一方，Fig. 6 に示したように，アナログ変換した応答は通常の応答に比べて直線性が良くなっている．ただし t_p=100μsec の場合は，いずれの試料とも注入量が 0.1ng 以上になるとピーク高が急に高くなるため，直線性が失なわれダイナミックレンジの値は10より多少高い程度である．したがって，それ程直線性が改善されたとはいえないが，この場合は応答に飽和現象が見られないため，実用上はこれらの検量線を用いてかなり広い濃度範囲の定量が可能である．t_p=2,000μsec の場合は，いずれの試料とも非常に良好な直線性を示しており，ダイナミックレンジの値は 10^3 以上を示した．t_p=2,000μsec の場合に，このように直線性が著しく改善されたのは，つぎの理由によるものと考えられる．すなわち，Wentworth ら[5,6] は定常状態の理論を用いて ECD 内の電子捕獲反応を速度論的に考察し，(2)式で ECD の応答をあらわすことを提案したが，定常状態の理論を電子捕獲反応に適用するにあたっては，かなり長い周期のパルス（t_p>1,000μsec）を印加することを前提としている．したがって，t_p=100μsec 程度の短かい周期のパルスを印加した場合は(2)式が完全には成立しないため，直線性はそれ程良好とならないが，t_p=2,000μsec のパルスを印加した場合は(2)式が確実に成立するため，直線性が非常に良好となるものと考えられる．

4. 感度

t_p=2,000μsec における γ-BHC，アルドリンおよび *p*, *p*′-DDE の感度は，通常の応答もアナログ変換した

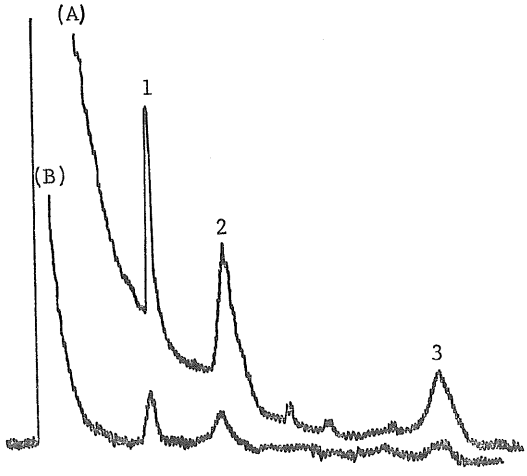


Fig. 7. Noise Levels of Analog Converted Response (A) and Ordinary Response (B)
1: γ-BHC, 2: Aldrin, 3: *p*, *p*′-DDE
Sample amount: 1 pg of each compound

応答も，t_p=100μsec における感度と比較して著しく高くなることが Fig. 5 および6からわかる．このように t_p が長くなるほど感度が高くなるのは，第一に Fig. 2 に示したように，t_p が高くなるほど ECD 内の自由電子濃度が高くなり，t_p>2,000μsec で飽和して一定となるためであり，第二に t_p が長くなるほど ECD 内に存在する自由電子が熱平衡状態に近づき，t_p=2,000μsec の場合は完全に熱平衡状態になっているためである．第一の理由については，自由電子を求核試薬の一種と考えれば，ECD 内の電子捕獲反応は求核付加反応あるいは求核置換反応とみなせるので，反応論的に理解することができる．一方，第二の理由については，つぎのように考えることができる．すなわち，ECD 内の自由電子は生成初期においては数十電子ボルトの運動エネルギーを持った状態で存在するが，その後はキャリヤーガス分子やその他の粒子と非弾性衝突をくり返すことによって，持っていた運動エネルギーを相手に与える[10]．非弾性衝突の機会は印加するパルスの周期が長くなるほど多くなり，一般に t_p>1,000μsec で自由電子は余分の運動エネルギーを放出した状態，すなわち熱平衡状態になる[11]．ところで，ECD 内の試料分子によって最も効率よく捕獲されるのは熱平衡状態にある自由電子であることが認められているので[2]，t_p=100μsec の場合と比べて t_p=2,000μsec の場合は，感度が著しく高くなる．

5. S/N 比

4. で述べたように，t_p が長くなるほど見かけ上の感度は高くなるが，それにともなって ECD 内に存在する自由電子のゆらぎが大きくなるため，ベースラインのノイズレベルも高くなる．そこで，通常の応答とアナログ変換した応答について，γ-BHC 1μg をガスクロマトグラフに注入したときの S/N 比を求めた．ただし，実用上の理由から，通常の応答については t_p=100μsec で，アナログ変換した応答については t_p=2,000μsec で測定したところ，Fig. 7 より前者は 3.5，後者は17であった．したがって，通常の応答に比べてアナログ変換した応答は約5倍 S/N 比が高くなった．

結　語

通常の定周波パルス型 ECD は電子親和性の高い試料分子に対して選択的に高感度を示すが，その反面応答の直線性が非常に悪いので，応答を Wentworth らの理論にしたがってアナログ変換したところ，大幅に直線性を改善することができた．また，通常の応答の場合には直線性が極端に悪くなるという理由で，印加することができなかった長い周期のパルスを印加することによって，ECD の感度を向上せしめた．

文　献

1) Ševčik, J. : *Detectors in Gas Chromatography*, 72, 1976, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam
2) Littlewood, A. B. : *Gas Chromatography*, 2nd Ed., 315, 1970, Academic Press, New York
3) Aue, W. A. and S. Kapila : *J. Chromatogr. Sci.*, **11**, 255, 1970
4) 竹内正博：日化会誌，**1976**，1565
5) Wentworth, W. E., E. Chen, and J. E. Lovelock : *J. Phys. Chem.*, **70**, 445, 1966
6) Wentworth, W. E., R. S. Becker, and R. Tung: *ibid.*, **71**, 1652, 1967
7) Fenimore, D. C., A. Zlatkis, and W. E. Wentworth : *Anal. Chem.*, **40**, 1954, 1968
8) 小島次雄，里内　勝：分析化学，**22**，1428，1973
9) 竹内正博：日化会誌，**1977**，1484
10) 日本アイソトープ協会編：ラジオアイソトープ，改訂3版，40，1975
11) Fenimore, D. C. and C. M. Davis: *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 519, 1970

報　　文　Ⅲ

食品等の安全性に関する調査研究

REPORTS III

PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 143—152, 1978

豆腐のセレウス菌汚染の実態とその汚染経路の追跡

寺山 武*, 五十嵐英夫*, 潮田 弘*, 山田澄夫*
新垣正夫*, 坂井千三*, 池島伸至**, 楠 淳**
新井輝義**, 神 真知子**, 入倉善久**, 友成正臣**
佐野 隆***, 山田武勝***, 安部勇三***, 鈴木廸夫***
斉藤 修***, 能登屋耕二***

Survey for Contamination of *Bacillus cereus* in Soybean Curd (Tofu) and Process Control for the Making

TAKESHI TERAYAMA*, HIDEO IGARASHI*, HIROSHI USHIODA*, SUMIO YAMADA*, MASAO SHINGAKI*, SENZO SAKAI*, NOBUYUKI IKEJIMA**, JUN KUSUNOKI**, TERUYOSHI ARAI**, MACHIKO JIN**, YOSHIHISA IRIKURA**, MASAOMI TOMONARI**, TAKASHI SANO***, TAKEKATSU YAMADA***, YUZO ABE***, TADAO SUZUKI***, OSAMU SAITO*** and KOJI NOTOYA***

元来セレウス菌は土壌細菌の1種で，自然界に広く分布していることから，本菌は食中毒細菌としての観点からあまり重要視されていなかった．西欧諸国[1-6]，特に英国[7-9]において，近年多数のセレウス菌食中毒事例が報告されるようになって以来，食中毒原性細菌としてセレウス菌が世界的に注目されてきている．

わが国では，セレウス菌食中毒は極めてまれなものとされていたが，それでも最近10年間に10数例の本菌食中毒の記録がある[10-15]．東京都においても，1975～1977年の間に発生した5例のセレウス菌によると推定される食中毒事例が坂井ら[16]によって報告された．

われわれは食中毒予防の立場から，市販食品の細菌検査を実施し，行政指導の基礎資料としてきた．わが国においてもセレウス菌食中毒の発生していることが明らかになってきたので，市販食品における本菌汚染の実態調査を行ない，その成績の一部はすでに前報において報告した[17]．市販食品のうちで，わが国特有の食品である豆腐におけるセレウス菌汚染が，極めて高率であることを前報で指摘したが，楠ら[18]も東京都多摩地区での調査で，同様な検査成績を報告している．われわれは豆腐のセレウス菌汚染が，いかなる経路で生じているものかを明らかにし，豆腐のセレウス菌汚染を防止する基礎資料とするために，本菌の豆腐汚染の実態調査と実際の豆腐製造店において各製造工程におけるセレウス菌汚染調査を行なったので報告する．

材料および方法

調査対象

1. 豆腐のセレウス菌汚染の実態調査

豆腐汚染セレウス菌の菌数と一般生菌数および大腸菌群数との関連性を検討するために，1977年6月に東京都内各保健所で食中毒予防夏季対策事業として豆腐製造店より収去された537件の豆腐を対象とした．

2. セレウス菌汚染の季節的影響調査

豆腐汚染細菌の季節的影響を調べるために気温の高い季節として1977年8月に95件，気温の低い季節として，1978年2月に86件をそれぞれ都内の大規模販売店より収

* 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, Hyakuninchо 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
***東京都衛生局環境衛生部食品監視課

去して細菌検査を行なった．

3. 豆腐製造工程のセレウス菌汚染調査

都内の中小規模豆腐製造業3店を対象に，1977年8月と1978年2月に同一店舗の各製造工程の細菌汚染調査を行なった．なお，この3店舗の他に夏季に1店舗，冬季に1店舗それぞれ異なった豆腐製造業の製造工程の調査を行なった．

豆腐はおおむね，原料大豆—水浸漬—磨砕—呉(豆汁)—加熱—ろ過—豆乳—凝固—箱盛り—押し—箱出し—水さらし—切断—完成豆腐の順序の製造工程で作成されるので，その各工程において，検査材料として一部をサンプリングし，試料を無菌的容器に入れ，冷却して検査室に搬入した．

各製造工程において用いられる器具・器材および従業員の手指の検査は，滅菌生理食塩液に浸漬した滅菌ガーゼで拭取り，その拭取りガーゼについて検査を行なった．

一般生菌数および大腸菌群検査

豆腐および製造工程でサンプリングした試料は，その10gを希釈水 90m*l* と共にホモジナイズし，その10倍段階希釈を行なったものについて，一般生菌数は標準寒天，大腸菌群数はデソキシコーレート寒天を用いた混釈培養により検査を行なった．

セレウス菌検査

検査材料の10倍乳剤およびその10倍段階希釈の0.1m*l* を，卵黄・ポリミキシンB加CW寒天平板に滴下してコンラージ棒で培地一面に塗抹し，35℃1夜培養後生じた卵黄反応陽性の大きな集落をセレウス菌として算定し，試料1g当りの菌数を求めた．なお，この方法では試料の0.01g当りの検査しか行なわれていないので，セレウス菌が検出されなかった場合には ＜100/g として表示した．

拭取りの細菌検査は，拭取りガーゼを 20m*l* の希釈水中でよく攪拌し，その振出し液について生菌数，大腸菌群およびセレウス菌の検査を前記の方法によって行なった．

希釈水

試料の希釈による損傷菌の出現をできるだけ少なくするために，希釈には生理食塩液に普通ブイヨンを10%の割合に加えて滅菌したものを用いた．

卵黄・ポリミキシン B 加 CW 寒天

滅菌後55℃に冷却したCW寒天（日水製薬）にニワトリの卵黄を3%，ポリミキシンBを50単位/m*l* の割合に加えて，滅菌ペトリ皿に約 20m*l* あて分注して平板培地としたものである．

表 1. 豆腐汚染セレウス菌数と一般生菌数との関係

セレウス菌数／g	一般生菌数／g 10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	計
＜10^2	3*	21	34	34	16	2	1	1	112
10^2		6	26	54	31		3		120
10^3			16	82	52	12	4		166
10^4				30	41	11	1		83
10^5				3	20	23	2		48
10^6						4	4		8
計	3	27	76	203	160	52	15	1	537

* 数値は検体数を示す

表 2. 豆腐汚染セレウス菌数と大腸菌群数との関係

セレウス菌数／g	大腸菌群数／g 0	＜10	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	計
0～＜10^2	27*	36	24	16	5	2	2	112
10^2	25	38	35	16	5	1		120
10^3	16	52	40	41	13	4		166
10^4	10	30	21	7	11	3	1	83
10^5	3	10	12	10	10	2	1	48
10^6			2	1	1	2	2	8
計	81	166	134	91	45	14	6	537

* 数値は検体数を示す

血清型別

セレウス菌の分離株の血清型別は Taylor と Gilbert[19] の鞭毛抗原の型別によった．Taylor と Gilbert の 1～18型と，われわれがこれに追加した T1～T18 の抗血清を用い，前報[17]の方法により型別を行なった．

成　績

豆腐汚染セレウス菌数と一般生菌数および大腸菌群数との関係

1977年6月に都内豆腐製造店より収去された豆腐 537件について細菌検査を行なった結果を表1および2に示した．537件のうち，セレウス菌が検出されたものは425件（79.1%）で，前年の調査結果以上に本菌汚染が高率であった．汚染セレウス菌数と一般生菌数との関係を検討した結果が表1である．セレウス菌が検出されたもののうち，本菌菌数がg当り10^2のものが120件（28.2%），10^3が166件（39.0%），10^4が83件（19.5%），10^5が48件（11.3%），10^6が8件（1.9%）であり，東京都の食品衛生指導基準の一般生菌数10万/g以上にセレウス菌が汚染しているものが56/537（10.4%）にも認められた．

豆腐汚染セレウス菌数と一般生菌数との間には表1に

表 3. 夏と冬における豆腐汚染セレウス菌数と一般生菌数との関係

豆腐の種類	夏 セレウス菌陽性数/検体数(%)	夏 セレウス菌数/g	夏 一般生菌数/g <10	10¹	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶	10⁷	冬 セレウス菌陽性数/検体数(%)	冬 セレウス菌数/g	冬 一般生菌数/g <10	10¹	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶
包装豆腐（絹ごし）	4/17 (23.5%)	0～<10²	4*	7	1				1		0/15 (0%)	0～<10²	12	2				1	
		10²			2							10²							
		10³				1		1				10³							
簡易包装豆腐（絹ごし）	7/24 (29.2%)	0～<10²		3	3	4	5	1		1	2/22 (9.1%)	0～<10²	7	4	4	3	1		1
		10²			1	2		1				10²			2				
		10³					1					10³							
		10⁴								1		10⁴							
		10⁵							1			10⁵							
簡易包装豆腐（木綿ごし）	18/32 (56.3%)	0～<10²			2	5	2	3	2		1/28 (3.6%)	0～<10²	2	1	8	9	3	4	
		10²			2	1	2		1	3		10²			1				
		10³				1	1	2	1			10³							
		10⁴							1			10⁴							
		10⁵								1		10⁵							
		10⁶							1	1		10⁶							
無包装豆腐（絹ごし）	6/6 (100.0%)	0～<10²									0/5 (0%)	0～<10²			3	1	1		
		10²				1						10²							
		10³					2	1				10³							
		10⁴						2				10⁴							
		10⁵										10⁵							
無包装豆腐（木綿ごし）	10/16 (62.5%)	0～<10²				4	1	1			1/16 (6.3%)	0～<10²			6	3	6		
		10²					1					10²					1		
		10³					3	2	2			10³							
		10⁴						1				10⁴							
		10⁵						1				10⁵							
合計	45/95 (47.4%)		4	10	11	19	18	16	10	7	4/86 (4.7%)		21	7	24	16	12	5	1

* 数値は検体数を示す

表 4. 夏と冬における豆腐汚染セレウス菌数と大腸菌群数との関係

豆腐の種類	夏 セレウス菌陽性数/検体数(%)	夏 セレウス菌数/g	夏 大腸菌群数/g 0	<10	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	冬 セレウス菌陽性数/検体数(%)	冬 セレウス菌数/g	冬 大腸菌群数/g 0	<10	10^1	10^2	10^3	10^4
包装豆腐（絹ごし）	4/17 (23.5%)	0～<10^2	13*								0/15 (0%)	0～<10^2	15					
		10^2	2									10^2						
		10^3	2									10^3						
簡易包装豆腐（絹ごし）	7/24 (29.2%)	0～<10^2	6	4	3	3		1			2/22 (9.1%)	0～<10^2	16	1	1	2		
		10^2	1	1		1	1					10^2	2					
		10^3		1								10^3						
		10^4						1				10^4						
		10^5	1									10^5						
簡易包装豆腐（木綿ごし）	18/32 (56.3%)	0～<10^2	3	2	2	5	2				1/28 (3.6%)	0～<10^2	9	11	1	2	2	2
		10^2	1	1	3	1		1	1	1		10^2	1					
		10^3		1	2		2					10^3						
		10^4				1						10^4						
		10^5						1				10^5						
		10^6							2			10^6						
無包装豆腐（絹ごし）	6/6 (100%)	0～<10^2									0/5 (0%)	0～<10^2	3	2				
		10^2	1									10^2						
		10^3		2			1					10^3						
		10^4	2									10^4						
		10^5										10^5						
無包装豆腐（木綿ごし）	10/16 (62.5%)	0～<10^2	1		1	4					1/16 (6.3%)	0～<10^2	12	2	1			
		10^2		1								10^2		1				
		10^3	1	1	2	2	1					10^3						
		10^4					1					10^4						
		10^5										10^5						
合計	45/95 (47.4%)		34	14	14	17	8	4	3	1	4/86 (4.7%)		58	17	3	4	2	2

* 数値は検体数を示す

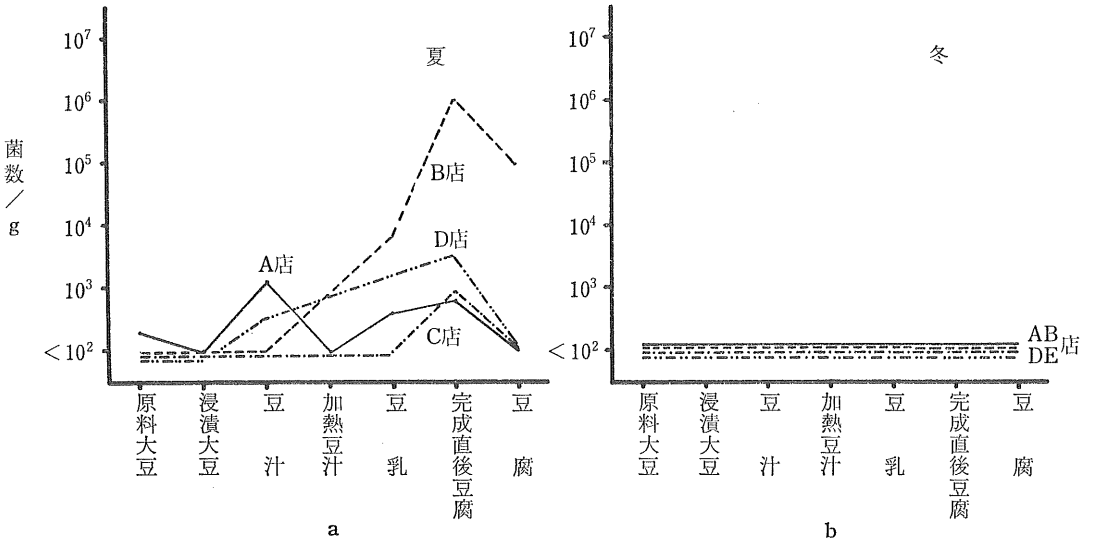


図 1. 夏と冬における豆腐製造工程中のセレウス菌数

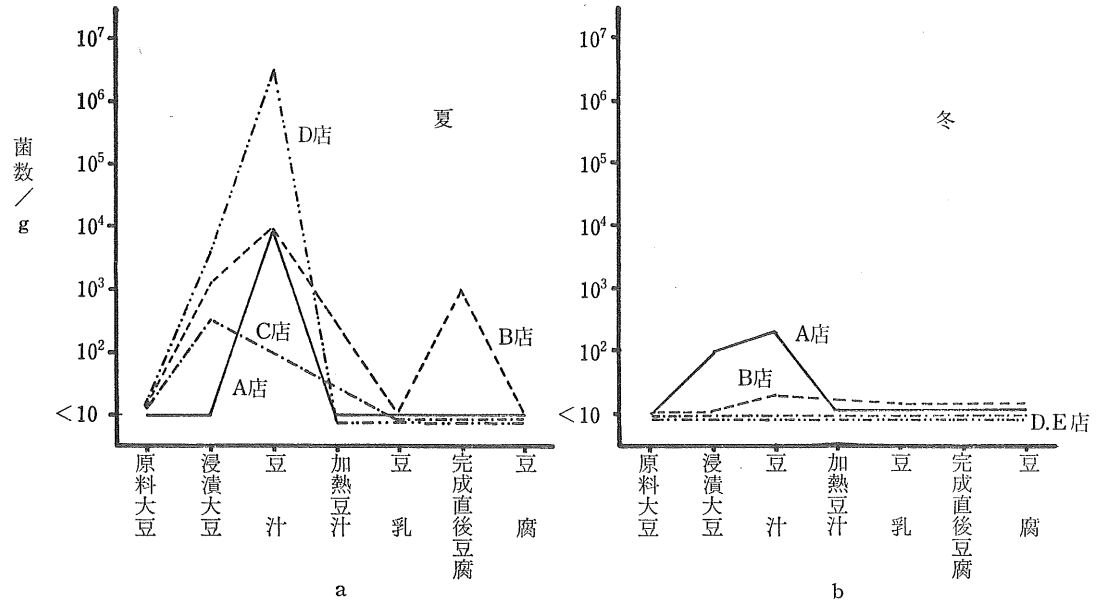


図 2. 夏と冬における豆腐製造工程中の一般生菌数

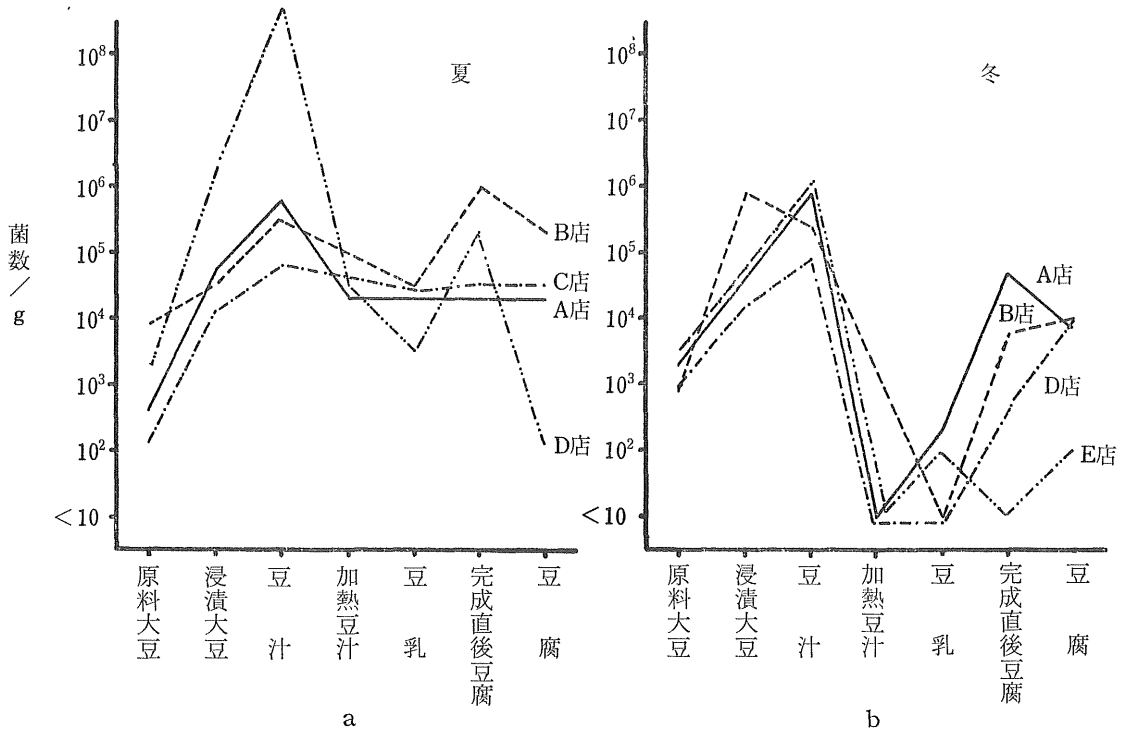


図 3. 夏と冬における豆腐製造工程中の大腸菌群数

みられるごとく，一見してかなりの相関関係が感じられるが，両者の相関係数は 0.555 であり，それほど高い値ではない．これは一般生菌数が多いからといって，必ずしもセレウス菌数が多いとは限らないからで，一般生菌数が 10^5 以上のもので，セレウス菌が検出されなかったものが20/537件認められていることからもそれがうかがわれる．しかし，セレウス菌数の多いものは必ず一般生菌数が多いのはいうまでもない．

一方，セレウス菌数と大腸菌群数との関係は表 2 に示されているごとく，ほとんど相関性は認められない．すなわち，セレウス菌数が多いものでも，大腸菌群数は多いものも少ないものもあり，まちまちであった．

豆腐汚染セレウス菌の季節的変動

豆腐のセレウス菌汚染と一般生菌数および大腸菌群数との関係を季節別に検討した結果を表 3 および 4 に示した．都内の大規模販売店より収去した豆腐を包装豆腐，簡易包装豆腐，無包装豆腐に分けて調査した結果を示したものである．包装豆腐は夏季の調査でも 4/17 (23.5%) からセレウス菌が検出されたにすぎず，冬では15件中検出されたものは 1 例もなかった．これに対して，夏季の簡易包装豆腐では 25/56 (44.6%)，無包装豆腐の 16/22 (72.7%) からセレウス菌が検出されており，冬では簡易包装豆腐の56件中 3 件，無包装豆腐の21件中 1 件から本菌が検出されたにすぎなかった．このように冬季における豆腐のセレウス菌汚染は夏季のそれに比して著るしく低率であると共に，かりにセレウス菌が検出されたものでもその菌数は少なかった．一般生菌数および大腸菌群数の夏季と冬季との差はセレウス菌汚染ほど著るしいものではなかった．

簡易包装豆腐でも絹ごしと木綿ごしとの間にセレウス菌汚染率にかなりの差が認められた．すなわち絹ごしでは7/24 (29.2%) であったのに木綿ごしでは18/32(56.3%) からセレウス菌が検出された．絹ごしと木綿ごしとでは製造方法が多少異なり，木綿ごしの方が製造工程中で汚染され易いためと考えられる．

豆腐製造工程のセレウス菌汚染調査成績

一般の市販豆腐のセレウス菌汚染がきわめて高率であったので，本菌汚染が豆腐製造工程のいかなる段階で生ずるものかを明らかにするために夏季と冬季との 2 回に分けて，汚染実態調査を行なった．各製造工程における

細菌汚染の動態を夏季と冬季を比較して図1・2・3に示した．

まずセレウス菌についてみると，図1aに示されるごとく夏季には原料大豆から本菌が検出されるものもあるが，水浸漬の段階での増殖はみとめられず，磨砕後の豆汁ではかなり多数の菌が認められるようになり，ほぼ100℃ 20分間加熱してろ過した豆乳で，調査した4店舗のすべてのものから10^2～10^3/mlのセレウス菌が検出された．この結果は磨砕器，ろ過布等の製造器具類からの汚染を示すものである．豆乳からセレウス菌が検出されたにもかかわらず完成豆腐からは本菌が検出されたものとされないものとがあり店舗によりばらつきが認められた．しかしこれはかならずしもセレウス菌が存在しなかったことを示すものではなく，汚染菌数が少ないために検出されなかったものである．それは次に示す完成豆腐の保存実験の結果から明らかである．

一方，冬季には図1bにみられるごとく，製造工程の試料からはまったくセレウス菌が検出されなかったし，器具類からもほとんど検出されていない．ただし，この調査では試料の1/100gについての培養によるものであり，まったくセレウス菌が存在しなかったことを示すものではなく，セレウス菌が検出されなかったものでも増菌培養でその存在が証明されたものもあり，汚染菌数がきわめて少数であったことを示すものである．

製造工程における一般生菌数の動態を図2に，大腸菌群数のそれを図3に示した．一般生菌数は原料大豆では夏と冬とで大差ないが，その製造工程で夏季は冬季に比しておおむね100倍ほど汚染菌数が多い．しかし，加熱後の豆汁および豆乳では，冬はきわめて菌数が減少し，その後水さらしを経た試料で急激に増加している．これは凝固，水さらしの過程における再汚染によるものである．大腸菌群数も夏に当然多く検出され，加熱の段階でいったん大腸菌群陰性となるが，製造器具類からの再汚染によって，夏季では完成豆腐から検出されるものが多い．しかし冬季では，加熱後の再汚染は少ない．総体的に一般生菌数および大腸菌群数においては，夏季と冬季での汚染はセレウス菌汚染ほど極端な差は認められない．

豆腐保存にともなう汚染細菌の経時的変化

豆腐製造工程調査でサンプリングした完成豆腐7件について，25℃に保存した場合のセレウス菌，一般生菌数，大腸菌群数の経時的変化を検討した結果を表5に示した．調査開始時にセレウス菌が認められたものは，時間の経過と共に本菌数の増加が認められ，はじめにセレウス菌が検出されなかった5件のうち4件は4～6時間

表5. 豆腐汚染細菌数の経時変化

試料 No.	セレウス菌数/g				生菌数/g				大腸菌群数/g			
	0時間	6時間後	9時間後	24時間後	0時間	6時間後	9時間後	24時間後	0時間	6時間後	9時間後	24時間後
1	<100	2.2×10^3	3.9×10^5 †	2.0×10^7	2.2×10^4	1.4×10^6	3.6×10^6 †	1.4×10^9	<10	1.9×10	5.0×10^3	4.5×10^6
2	1.1×10^5	5.4×10^4 *	2.2×10^6 †	3.0×10^6	2.1×10^5	3.6×10^5 *	1.0×10^6 †	4.0×10^8				
3	<100	1.0×10^2	5.0×10^3	9.0×10^4	8.0×10^2	9.8×10^3	8.0×10^4	2.0×10^8	<10	<10	2.0×10^2	6.4×10^4
4	9.0×10^2	7.0×10^2 **	2.2×10^5	1.7×10^7	3.3×10^3	1.2×10^5 **	5.6×10^5	4.8×10^8	<10	<10 **	<10	1.5×10^4
5	<100	7.6×10^3 **	1.0×10^5	1.6×10^7	2.4×10^5	1.6×10^5 **	3.2×10^6	3.4×10^8	4.8×10^3	1.6×10^2 **	1.2×10^4	3.1×10^5
6	<100	<100	<100	1.0×10^3	4.6×10^2	1.0×10^4	1.4×10^4	3.1×10^8	<10	<10	<10	<10
7	<100	2.0×10^2	3.5×10^3	2.0×10^4	1.1×10^3		1.1×10^6	7.2×10^7	<10		1.4×10^3	2.0×10^5

* は4時間後の数値
** は5時間後の数値
† は8時間後の数値

表 6. 豆腐製造工程汚染セレウス菌の血清型

検査材料	供試菌株数	血清型（菌株数）
原料大豆	2	5(1), 18(1)
水浸漬大豆	2	5(1), ut(1)
浸漬用バケツ	2	T6(1), ut(1)
グラインダーロート	1	8(1)
グラインダー用水入れ	1	T16(1)
グラインダー磨砕部		
豆汁	7	T6(1), ut(6)
消泡剤		
呉（加熱豆汁）	17*	1(3), 5(4), 8(6), 18(2), T11(1), ut(1)
圧搾機ロート	3	T11(1), ut(2)
粗濾過布	1	ut(1)
濾過布		
圧搾機定板		
圧搾機すのこ	1	T11(1)
豆乳	16*	5(3), 8(6), T3(4), T11(2), ut(1)
おから		1(2), 5(1), T6(1), T13(1)
凝固剤		
型入れ直前豆腐	6	5(1), T6(3), ut(2)
型箱		
型箱布		
型箱蓋	18	1(2), 4(1), 5(2), 7(2), 8(3), T6(1), ut(7)
型箱浸出液	5	5(3), ut(2)
水さらし用プールふち	2	ut(2)
包丁		
まな板	10	5(4), T3(2), ut(4)
従業員 A手指	4	5(2), 8(2)
従業員 B手指	10	1(1), 18(1), T3(1), ut(7)
完成豆腐	1	8(1)
25℃ 6時間後の豆腐	8	1(4), 8(2), 18(1), ut(1)
25℃ 9時間後の豆腐	10	1(2), 5(4), 8(3), T11(1)
25℃24時間後の豆腐	8	1(2), 5(1), 7(1), 8(1), ut(3)

* 増菌培養で得られた菌株

後に，他の1件も24時間後に本菌が証明された．豆腐汚染セレウス菌は，豆腐中で容易に増殖することが明らかにされた．一般生菌数および大腸菌群数もセレウス菌数と平行して増加していることが示された．表には示してないが，豆腐製造工程中の豆乳の保存実験においてもセレウス菌が豆乳中で良く増殖することが示された．

豆腐製造工程で検出されたセレウス菌の血清型別

豆腐製造工程調査のうち，夏季に調査したA製造店の製造工程の各工程より得た試料および器具器材から分離されたセレウス菌の血清型別を行なった結果を表6に示した．原料大豆，水浸漬大豆以下の各工程から検出された菌株の血清型はきわめて多彩であり，原料大豆汚染菌と同じ血清型が以後の工程から必ずしも検出されるとは限らず，各工程が複数の血清型のセレウス菌によって汚染されていることが明らかにされた．製造工程の器具器材の本菌汚染は完成豆腐の本菌汚染に反映しており，1つの豆腐から複数の血清型のセレウス菌が分離され，その各血清型の菌は製造工程のいずれかから分離されている．

他の製造店の工程調査において検出されたセレウス菌の型別を行なった結果も，表6に示した結果と同様に，同一菌型だけが継続して出現することはなく，各製造工程において多彩な菌型が認められた．

考察

セレウス菌食中毒の実態が明らかにされるに伴い，本菌食中毒の報告例の多い西欧で，食品のセレウス菌汚染に関する調査成績が数多く報告されている．Nikodemusz[20]は各種の食品について調査し，その6.4%，Akinovら[21]は缶詰の6.7%，ソーセージの7.7%，Ionescuら[22]は牛乳の70%，Kimら[23]は乾燥食品の25.3%，Powersら[20]は香辛料の53%からセレウス菌が検出されたと報告している．さらにGilbertら[9]は英国でしばしば本菌食中毒の原因食となっている焼めしから24%，生米では91%から本菌が検出されたと述べている．

わが国では，セレウス菌が食中毒菌として注目されていなかったために，食品汚染細菌の中でセレウス菌は腐敗菌の1員と見なされていた関係から，本菌に関する系統的調査はほとんど行なわれていなかった．われわれは各種市販食品のセレウス菌汚染調査を行ない，わが国特有の食品である豆腐が高率にセレウス菌に汚染されていることを明らかにした[17,18]．豆腐汚染セレウス菌数と大腸菌群数とはまったく相関性は認められなかったが，一般生菌数との間には一定の相関性が認められ，一般生菌数をもって衛生指導の指標としてもセレウス菌汚染をもカバーできることが示唆された．

これまでにも豆腐の細菌汚染調査はほとんど毎年行なわれていたが，いずれも夏季に行なわれていたので，季節別細菌汚染の実態は明らかではなかった．われわれは豆腐汚染細菌の季節別変動について調査した．セレウス菌汚染は季節別に著るしく異なり，夏季では50～70%にも達するのに冬季では10%以下であった．冬季にはセレ

ウス菌汚染が低下するばかりでなく，汚染しているものでもその菌数は少なかった．一般生菌数，大腸菌群数も夏季には冬季よりも多数認められたが，その差はセレウス菌汚染ほど著明ではなかった．

豆腐の季節別セレウス菌汚染の違いは，豆腐製造工程の本菌汚染と密接な関係があり，本菌の検出率の低下する冬季には製造工程の汚染が低下していた．豆腐製造工程中の豆汁以後の試料はセレウス菌をはじめ一般細菌の増殖に極めて適したメデウムとなることが実験的に証明された．夏季では，器具類に付着した豆汁成分中でセレウス菌が増殖し，次回の製造に際して汚染を生ずるというサイクルを生じているために汚染が高まっているものと推察される．さらにセレウス菌は食品中で極めて芽胞形成が優れているので加熱豆汁程度の温度では死滅しないために，製造工程でいったん汚染されると，それを完全に排除することが困難であろう．一方，冬季では，器具類に付着した豆腐成分があっても気温が低いためにセレウス菌の増殖がおこらないので，汚染が拡大しないものと考えられる．

豆腐の細菌汚染を低下させるためには，原料大豆の洗浄を十分に行ない，土壌由来の付着細菌を除去し，製造工程の器具類の洗浄・消毒を励行し，完成豆腐を10℃以下に保存することであると指摘されている[25-28]．こうした事項が守られれば当然セレウス菌汚染の問題も解決することになる．

これまでに豆腐を原因食とする確かなセレウス菌食中毒の報告はないが，セレウス菌数が 10^6/g 以上に達するものでは食中毒の危険性もあるので，行政指導事項の1つとしてセレウス菌汚染も取上げる必要があろう．

結　論

豆腐のセレウス菌汚染と製造工程での汚染の実態調査を行ない以下の成績を得た．

豆腐のセレウス菌汚染は季節により大きく変動した．夏季では50～70%にも達し，537件のうち56件（10.4%）から 10^5/g 以上もの多数のセレウス菌が検出された．冬季では86件中セレウス菌が検出されたものは4件（4.6%）にすぎず，その菌数も 10^3/g 以上に達するものは認められなかった．

豆腐汚染セレウス菌数と一般生菌数との間には相関関係が認められたが，大腸菌群数との間には認められなかった．

セレウス菌汚染の高い夏季には豆腐製造工程の器具類が高率に汚染されていて，本菌の食品内での芽胞形成の良さと相まって豆腐のセレウス菌汚染を拡大していることが明らかにされた．

製造工程の試料および器具類からは多彩な血清型のセレウス菌が検出され，各工程が相互に本菌汚染を拡大していることが示された．

文　献

1) Hauge, S. : *Nordisk. Hyg. Tidskr.*, **31**, 189, 1950
2) Hauge, S. : *J. Appl. Bacteriol.*, **18**, 591, 1955
3) Christiansen, O., S. O. Kock, and P. Madelung: *Nord. Veterinar Med.*, **3**, 194, 1951
4) Nikodemusz, I., S. Bodner, M, Bojan, M. Kiss, M. Laczko, E. Molner, and D. Papy : *Zentralbl. Bakteriol., i Orig.* **184**, 462, 1962
5) Lefebvre, A., C. A. Gregoire, W. Brabant, and E. Todd : *Epidemiological Bulletin*, Canada, **17**, 108, 1973
6) Raevuori, M., T. Kiutamo, A. Niskanen, and K. Salminen : *J. Hyg.*, Camb., **76**, 319, 1976
7) Mortimer, P. R. and G. McCann : *Lancet*, **1**, 1043, 1974
8) Gilbert, R. J., M. F. Stringer, and T. C. Peace: *J. Hyg.*, Camb., **74**, 433, 1974
9) Gilbert, R.J. and J.M. Parry : *J. Hyg.*, Camb., **78**, 69, 1977
10) 鈴木　昭，河西　勉：食衛誌，**2**, 26, 1961
11) 田村利勝：メデイヤサークル，**11**, 115, 1966
12) 中村竜夫，高取常三郎，栃久保邦夫：第18回日本感染症学会中日本地方会講演会抄録，20, 1975
13) 塩田千恵子，森　容子，吉川秀成，西岡昌子：第34回日本公衆衛生学会総会　講演集，204, 1975
14) 阪口玄二，品川邦汎：大阪府獣医師会　講演集，1977
15) 安川　章，岡田陽一，吉村　陽，福島　猛，種村昌城，山本博昭，川村脩一，伊藤謙朗：日本食品衛生学会第35回学術講演会　講演要旨集，18, 1978
16) 坂井千三，伊藤　武，斉藤香彦，丸山　務，柳川義勢，新垣正夫，寺山　武：日本感染症学雑誌　臨時増刊号，**52**, 39, 1978
17) 寺山　武，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，五十嵐英夫，坂井千三，善養寺　浩：食衛誌，**19**, 98, 1978
18) 楠　淳，池島伸至，新井輝義，神　真知子，入倉善久，友成正臣，伊藤　武，坂井千三：東京衛研年報，**28-1**, 11, 1977
19) Taylor, A. J. and R. J. Gilbert : *J. Med. Microbiol.*, **8**, 543, 1975

20) Nikodemusz, I. : *Zeit. Hyg.*, **145**, 335, 1958
21) Akimov, A. M. : *Gig. Sanit.*, **34**, 109, 1969
22) Ionescu, G., C. Ienistea, and C. Ionescu : *Microbiol. Parazitol. Epidemiol.*, **11**, 423, 1969
23) Kim, H. U. and J. M. Goepfert : *Appl. Microbiol.*, **22**, 581, 1971
24) Powers, E. M., G. L. Thomas, and T. Brow : *J. Milk Food Technol.*, **39**, 668, 1976
25) 永田和矢 : *New Food Industry*, **19**, 6, 1977
26) 神谷 誠, 川島茂樹 : *New Food Industry*, **19**, 12, 1977
27) 吉武繁広 : *New Food Industry*, **19**, 17, 1977
28) 深沢由雄, 村松荘平, 両角富栄, 松原精之, 米山嶢, 谷 憲昭, 小林東市 : 食品衛生研究, **27**, 49, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 153—157, 1978

ウィンナーソーセージ中の *Clostridium perfringens* および *Bacillus cereus* の挙動に関する実験的研究

小久保 彌太郎*, 神 崎 政 子*, 井 草 京 子*, 村 上 一*
木 村 貞 司**, 梅 沢 勝 正**, 斉 藤 義 蔵**

Experimental Studies on the Behavior of *Clostridium perfringens* and of *Bacillus cereus* Incorporated in Vienna Sausage

YATARO KOKUBO*, MASAKO KANZAKI*, KYOKO IGUSA*, HAJIME MURAKAMI*,
TEIJI KIMURA**, KATSUMASA UMEZAWA** and YOSHIZO SAITO**

In order to elucidate the effect of processing on the survival of heat-resistant spores of *Clostridium perfringens* and of *Bacillus cereus*, the spore suspensions of both *C. perfringens* NCTC 8238 and of *B. cereus* ATCC 19637 strains were intentionally incorporated into the mixture of ingredients for pork Vienna sausages in a concentration of 10^4/g level. The mixture with spores was stuffed into casing, dried at 50～55°C for 30 minutes, smoked at 60～65°C for 30 minutes, and then boiled at 73°C for 20 minutes. Drastic decline on the viable cell counts for both *C. perfringens* and *B. cereus* was observed on the finished specimens indicating less than 10/g for *C. perfringens* and 10^2/g for *B. cereus*. At the same time, both total aerobes and anaerobes in the finished products were also declined to the level of 10^2/g from the original level of 10^5/g, and almost of the survived were found to be the ones consisting of *B. cereus*.

With regard to the effect of storage for the proliferation of survived bacteria in the finished products, the above mentioned sausages were divided into two major groups. One group was packed within vacuum packages and the other group was packed within ordinary packages without gas exchange. Both of these two groups were sub-divided into 3 groups, and they were stored at 2, 10, and 25°C for 15, 10, and 5 days respectively. The superior growth of *C. perfringens* was observed on the specimens within vacuum packages stored at 25°C, whereas better growth of *B. cereus* was observed on the ones within ordinary packages stored at 10 and 25°C. No multiplication of *C. perfringens* is observed in the specimens stored at 2 and 10°C, and of *B. cereus* in the specimens stored at 2°C respectively. More rapid proliferation of both aerobes and anaerobes was observed on the specimens in vacuum packages at the storage temperatures of 10 and 25°C.

はじめに

自然環境に遍在する耐熱性芽胞形成菌により汚染された食品原料を加工して作られた食肉製品が，多かれ少なかれ，これらの耐熱性芽胞形成菌を含んでいるであろうことは想像に難くない．事実，食用動物の腸管内常在菌である *Clostridium perfringens* は，ハム・ソーセージなどの原料食肉を汚染しているし[1,2]，土壌中の常在菌である *Bacillus cereus* の芽胞は，原料食肉に添加されるスパイスなどの植物性原料を汚染しており[3]，しばしば加工工程での加熱に耐えて，かなりの量のこれらの菌

* 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
**日本大学農獣医学部食品工学科

が製品中に存在していることがある[1,2,4-6]．ところが一方，耐熱性，非耐熱性を問わず *C. perfringens* が食品とともに多量に摂食された場合，ヒトの腸管内でエンテロトキシンを産生して食中毒を起こすことが知られているし[7]，多量の *B. cereus* が食品中で増殖した場合には食品中でエンテロトキシンを産生して，やはり食中毒の原因となることが知られている[8]．

今回，われわれは，これら2種の菌が食肉製品の製造加工工程で，どのような挙動を示すか，また，これらの製品の包装形態がその保存性にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で，ペースト状に磨砕したウィンナーソーセージ原料に，*C. perfringens* と *B. cereus* の芽胞を一定量実験的に接種して，その挙動を追跡調査したので報告する．

材料および方法

1) 使用菌株 *C. perfringens* NCTC 8238 (Hobbs 2型) および *B. cereus* ATCC 19637 の2株で，ともに芽胞を形成させた後凍結乾燥保存したものである．

2) 使用培地

(1) Handford の変法寒天培地 Handford により開発された食品中の *C. perfringens* 計測培地を神崎ら[2]が改良したもので，その組成は培地 1,000 m*l* 当りトリプトース (Difco) 25g，ソイトン (Difco) 8g，酵母エキス (Difco) 8g，メタ重亜硫酸ナトリウム 1.5g，クエン酸鉄アンモニウム 1.5g，サルファモノメトキシンの N/10 NaOH 10% 溶液 1.5m*l*，寒天 (Difco) 34 gから成るものである．加温溶解後 pH7.6 に調整し，121°で10分間高圧滅菌後 50° に保持し，リン酸オレアンドマイシン 0.8mg，ポリミキシンB 15,000 iu，カナマイシン 80mg を添加して使用した．

(2) NGKG 寒天培地 Kim らにより開発された食品中の *B. cereus* 計測培地を神保ら[6]が改良したもので，蒸留水 900m*l* にペプトン (Difco) 1g，酵母エキス (Difco) 0.5g，塩化ナトリウム 4g，グリシン 3g，フェノールレッド 0.025g，寒天 (Difco) 18gを加え，加温溶解後 pH6.8 に調整した．次いで121°で15分間高圧滅菌後 50° に保持し，ポリミキシンB 10mg，20%卵黄液 100m*l* を加えて平板に固めて使用した．

(3) 標準寒天培地 好気性菌数測定のために用いるもので，栄研化学製粉末培地の規定量を蒸留水に溶解し，121°で15分間高圧滅菌後使用した．

(4) GAM 寒天培地 嫌気性菌数測定のために用いるもので，日水製薬製の粉末培地の規定量を蒸留水に溶解し，115°で15分間高圧滅菌後使用した．

3) 実験用ウィンナーソーセージの作成 実験用ウィンナーソーセージは，豚肉を主原料とした澱粉，植物性蛋白質，食塩，亜硝酸塩などを混合してペースト状にしたものに，*C. perfringens* および *B. cereus* の芽胞を 10^4/g になるように接種して羊腸に充填し，50～55° で30分間乾燥後60～65°で30分間燻煙，さらに73°の温湯中で20分間ボイルし急冷して作成した．

4) 試料原液の調製 試料10gに pH7.2 の滅菌リン酸緩衝生理食塩水 90m*l* を加えて，ストマッカー(Seward 社製) で1分間ストマッキングしたものを試料原液とした．

5) *C. perfringens* 数の測定 試料原液ならびにその10倍段階希釈液を各 10m*l* ずつP．Tパウチ（発売元：酒見医科器械舗）にとり，あらかじめ 50° に保持した Handford の変法培地 15m*l* ずつを加えて混和後，気泡を除去してからパウチの首の部分をポリシーラー（富士医科器械製210形）でシールした．46°で18時間培養後，黒色の定型的集落数を計測して試料 1g 当りの *C. perfringens* 数を算定した．なお出現した集落は釣菌後 LM 培地に接種し，35°で24時間培養し，乳糖醗酵陽性，運動性陰性であることを確認した[2]．

6) *B. cereus* 数の測定 前記の各試料液 0.1m*l* ずつをNGKG寒天平板上にコンラージ棒で塗抹した．30°で24時間培養後，卵黄反応陽性の定型的集落数を計測して試料 1g 当りの *B. cereus* 数を算定した．

7) 好気性菌数の測定 前記の各試料液 1m*l* ずつを厚型滅菌プラスチックシャーレ（栄研器材）にとり，あらかじめ 50° に保持した標準寒天培地 15m*l* ずつを加えて混釈した．25° で48時間培養後，出現した集落数を計測して試料 1g 当りの菌数を算定し好気性菌数とした．

8) 嫌気性菌数の測定 7)項同様，各試料液1m*l* ずつを厚型滅菌プラスチックシャーレにとり，あらかじめ 50° に保持したGAM 寒天培地 15m*l* を加えて混釈した．寒天が凝固した後ガラス製嫌気ジャー（トミー製）を使用して 25° で72時間嫌気培養後，出現した集落数を計測して試料 1g 当りの菌数を算定し嫌気性菌数とした．

実験成績

1) 製造時の菌の挙動 Table 1から明らかなように，菌接種前のペースト状原料中の *C. perfringens* ならびに *B. cereus* 数はともに 10/g 以下であり，同時に測定した好気性ならびに嫌気性菌数はいずれも 10^5/g であった．ペースト状原料中に実験的に接種された 10^4/g レベルの *C. perfringens* ならびに *B. cereus* は，燻煙処理後に両者とも菌数がわずかに減少し，73° で 20分間のボイル処理後には *C. perfringens* は 10/g 以下，

Table 1. Fate of Experimentally Incorporated Spores of *C. perfringens* and of *B. cereus* in Vienna Sausage

Samples tested	Samplings are made	Viable cell count/g			
		C. perfringens	*B. cereus*	aerobic plate count	anaerobic plate count
Raw ingredients	Prior to stuffing	<10	<10	1.5×10^5	2.8×10^5
Raw ingredients with spores of *C. perfringens* and of *B. cereus*	After stuffing in to intestine	6.2×10^4	4.5×10^4	2.4×10^5	4.3×10^5
	After smoking at 60～65°C for 30 min.	3.4×10^4	1.2×10^4	4.1×10^4	1.1×10^5
	After boiling at 73°C for 20 min.	<10	1.2×10^2	1.5×10^2	1.5×10^2

B. cereus は 10^2/g と顕著な減少を示した．

同時に計測した好気性ならびに嫌気性菌数は，燻煙処理後にともにわずかに減少し，ボイル処理後にはいずれも 10^2/g となった．なお，ボイル処理後の試料から得た菌株を同定したところ，好気性，嫌気性培養の別なくいずれもその大部分が *B. cereus* であった．

2) 保存時の菌の挙動 前記条件で製造したウィンナーソーセージ30本を1本ずつナイロンとポリ塩化ビニールのラミネート袋（カウパック社製）に入れ，15本はそのまま，残りの15本は 76cmHg で真空包装した．これら二群のウィンナーソーセージをそれぞれ5本ずつ2°，10°および25°の恒温器に収納し，2°保存のものは3日毎に15日目まで，10° 保存のものは2日毎に10日目まで，25° 保存のものは毎日5日目まで，それぞれ1本ずつ恒温器から取り出して試験に供した．

各保存温度における *C. perfringens* ならびに *B. cereus* の菌数の推移を Fig. 1 に示した．*C. perfringens* は 25° 保存例で菌数増加が認められ，真空包装品では3日目に 10^7/g の最高値に達したのに対して，非真空包装品ではほぼ1日間の誘導期の後急激に菌数が増加し，2日目に 10^5/g に達した．一方，*B. cereus* は 2° 保存例では全く菌の増殖が認められなかったが，10° および25°保存例で菌数の増加が認められた．本菌は *C. perfringens* の場合とは対照的に真空包装品よりも非真空包装品中ですぐれた発育を示し，10° では8日目に 10^7/g，25° では3日目に 10^8/g に達した．

Fig. 2 に各保存条件における好気性ならびに嫌気性菌数の推移を示した．2° 保存例ではいずれの菌数値も15日間全く増加しなかったが，10° および 25° 保存例では包装形態の別なく増加することが認められた．すなわち，好気性菌数は 10° および 25° 保存例ともに非真空包装品の方が真空包装品よりすぐれた増加を示し，10° 保存例では8日，25° 保存例では3日目にともに 10^9/g に達した．一方，嫌気性菌数も概して非真空包装品の方がすぐれた増加を示したが，好気性菌数の場合に認められたような包装形態による差は少なかった．なお，好気

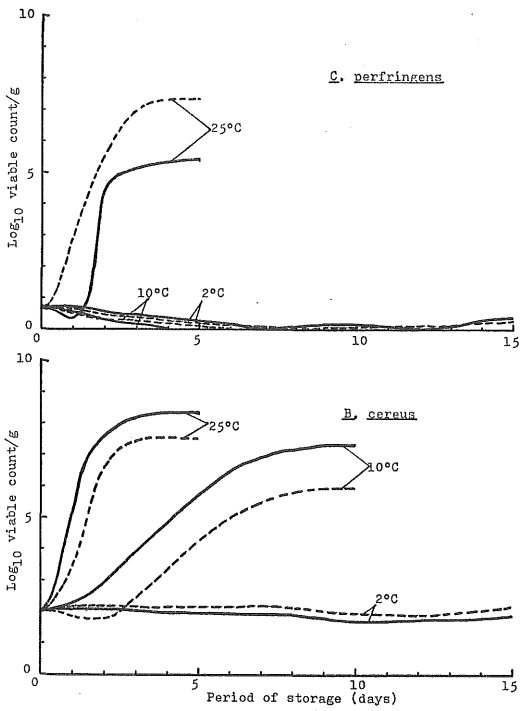


Fig. 1. Effect of Storage on the Growth of *C. perfringens* and of *B. cereus* in Vienna Sausages stored at Various Temperatures ····· vacuum packed and —— ordinarily packed without gas exchange.

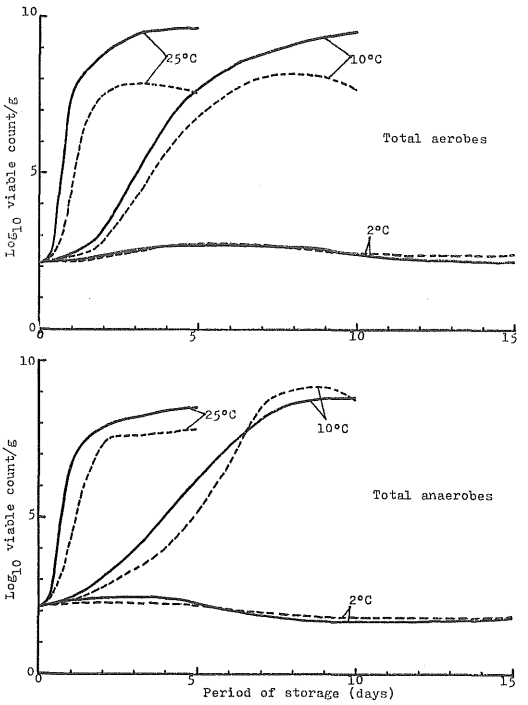


Fig. 2. Effect of Storage on Total Aerobic and Anaerobic Count of Vienna Sausages stored at Various Temperatures
····· vacuum packed and —— ordinarily packed without gas exchange.

性菌は嫌気性菌に比較して包装形態の別なく発育がすぐれており，非真空包装品では最高値も高くなる傾向がみられた．

これら菌数測定後の平板から分離した菌株は，保存条件および保存日数に関係なく，また，好気性，嫌気性培養の別なく，ともに大部分が *B. cereus* を主体とする *Bacillus* 属の菌であった．

保存試験中に実施した製品の官能的変化の調査結果は，2° 保存例の場合は15日間全く変化が認められなかったのに対し，非真空包装品の10°保存例で6日目，25° 保存例で2日目から，また，真空包装品ではそれよりも1～2日遅れて異臭が認められ，異臭発生の程度は非真空包装品の方が顕著であった．

考　察

加工食品の原料中に存在する *C. perfringens* や *B. cereus* のような菌の耐熱性芽胞が食肉製品の加工工程でどのような運命をたどるか，製品中に生残った菌が製品を如何なる保存温度で保存した場合に増殖を示すか，また，製品の包装形態と菌増殖の速度との関係はどうなるかなど，基本的な条件を経時的に明らかにすることは，食中毒防止対策樹立に不可欠な要件であろう．

今回実験に供した *C. perfringens* NCTC 8238 株は，Hobbs ら[9]により食中毒材料から分離された耐熱性芽胞形成菌として良く知られた株で，われわれも実験に先立ち本菌の芽胞をブイヨンに浮遊させたものを，73° で20分間加熱して，検出菌数が減少しないことを確かめている．ところが，本菌の芽胞を 10^4/g になるように接種して作成したウィンナーソーセージの最終製品中の *C. perfringens* 数は，10/g 以下と検出菌数が極度に低下した．これは恐らく，製造工程中の乾燥および燻煙時のヒートショックにより，接種された大部分の芽胞が発芽して，その後のボイル処理の段階で増殖形の *C. perfringens* が死滅したためと推測される．ちなみに，わが国の食肉製品の加工基準によれば，製品の中心部に63° で30分間以上の温度がかかる方法，または，それと同等以上の殺菌効果がある方法で加工されなければならないとされている．ウィンナーソーセージを製造する場合には，この殺菌工程の前に，前記のように乾燥，煙燻の工程が組み込まれている訳であるが，この二つの工程が耐熱性芽胞菌の菌数を減少させるために非常に有効であることが今回の実験で明らかになった．したがって，近年普及しつつある乾燥および燻煙の二工程を省略して，製造工程の簡易化を計ろうとする傾向は，製品中の芽胞菌対策上好ましくない．

食肉製品の包装形態および製造後の保存温度の適否が，保存された製品の細菌学的品質に大きな影響を与えるであろうことは容易に想像されるところである．今回の実験では，2° 保存の製品が，その包装形態の如何にかかわらず，*C. perfringens* および *B. cereus* の増殖は勿論，他の一般の嫌気性菌および好気性菌の増殖をも許さず，製品の品質保持上 2° 保存が適切な方法であることを示した．これに比して，現在わが国で食肉製品の保存温度の上限として定められている10° 保存の場合には，製品中の *C. perfringens* の増殖は抑制できたが，*B. cereus* をはじめ一般の好気性菌および嫌気性菌の増殖を抑制することができず，この法的な基準が食肉製品の保存のために適切な指導の役割りを果していないことを物語っていた．

次に，製品の包装形態と菌増殖の速度の関係であるが，25° 保存の場合，*C. perfringens* は真空包装品中において非真空包装品におけるよりも誘導期が短かく，すぐれた発育を示したのに対し，*B. cereus* のそれは丁度この逆の発育態度を示した．これは前者が偏性嫌気性

菌，後者が通性嫌気性菌であるという性状の差が，発育速度の差となって現われたものであろう．一方，同じ条件で保存された製品中の好気性菌数および嫌気性菌数の経時的推移をみると，いずれの場合にも非真空包装品中のそれらがより短かい誘導期と速い増殖を示し，真空包装品の方が非真空包装品よりも僅かに長い期間の保存に耐えるであろうことを示唆した．また，同程度に菌増殖のみられた真空包装品と非真空包装品の官能的変化の度合いを比較してみると，一般的に前者の方が異臭の発生度合いが弱いことが判った．これは *Bacillus* 属の菌が食品中で嫌気的に増殖した場合には，揮発性塩基性窒素の生成が阻害されるため，腐敗が感知しにくいとされていること[10]に起因するものであろう．

要　約

C. perfringens ならびに *B. cereus* の芽胞が，食肉製品の製造工程でどのような挙動を示すかを明らかにするため，ペースト状のウィンナーソーセージ原料に各菌株の芽胞をそれぞれ 10^4/g ずつ接種して，その消長を追跡した．その結果，燻煙処理後に両菌株とも菌数が僅かに減少し，73° で 20 分間の ボイル処理後には *C. perfringens* は10/g 以下，*B. cereus* は 10^2/g と顕著に減少した．同時に測定した好気性ならびに嫌気性菌数は，当初ともに 10^5/g であったが，ボイル処理後にはいずれも 10^2/g に減少し，その大半が *B. cereus* であった．

次に，上記の製品を真空包装したものとしないものに分けて，それぞれ，2°，10° および 25° に保存した．その結果，*C. perfringens* の発育は 25° 保存の時にのみ認められ，特に真空包装品中ですぐれた増殖を示した．これに対して，*B. cereus* の発育は 10° および 25° 保存例で認められ，非真空包装品中で増殖がすぐれていた．好気性ならびに嫌気性菌数はともに 10° および 25° 保存の非真空包装品中ですぐれた増加を示し，これらの主要菌種は保存条件および保存日数に関係なく *B. cereus* などの *Bacillus* 属により占められていた．なお 2° 保存例では包装形態の別なくいずれの菌の増加も認められなかった．

文　献

1) Kanzaki, M., Y. Kokubo, K. Jinbo, H. Murakami, and M. Haruta : *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, 27-1, 136, 1976
2) Kanzaki, M., Y. Kokubo, K. Jinbo, M. Matsumoto, and H. Murakami : *J. Tokyo Vet. Zootechn. Sci.* 24, 39, 1977
3) Powers, E. M., T. G. Latt, and T. Brown : *J. Milk Food Tech.*, 39 (10), 668, 1976
4) 神崎政子，神保勝彦，村上　一，春田三佐夫：東京衛研年報，26-1, 168, 1975
5) Goepfert, J. M., W. M. Spira, and H. U. Kim: *J. Milk Food Tech.*, 35(4), 213, 1972
6) 神保勝彦，松本昌雄，村上　一：東京衛研年報，29-1, 158, 1978
7) Hauschild, A. H. W. : *J. Milk Food Tech.*, 34 (12), 596, 1971
8) Turnbull, P. C. B. : *J. Clin. Path.*, 29, 941, 1976
9) Hobbs, B. C., M. E. Smith, C. L. Oakley, G. H. Warrack, and J. C. Cruickshank : *J. Hyg., Camb.*, 51, 75, 1953
10) 横関源延：食衛誌，4(4), 177, 1963

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 158—162, 1978

動物性食品中の *B. cereus* に関する検査法とその応用

神保勝彦*, 松本昌雄*, 村上　一*

Development of a Selective Enumeration Medium for *B. cereus* in Food of Animal Origin

KATSUHIKO JINBO*, MASAO MATSUMOTO* and HAJIME MURAKAMI*

NaCl-Glycine-Kim and Goepfert (NGKG) Medium was developed for the enumeration of *Bacillus cereus* in food of animal origin. The medium is composed of lg of pepton, 0.5g of yeast extract, 4g of sodium chloride, 3g of glycine, 25mg of phenol red, 18g of agar, and 900m*l* of distilled water. The pH of medium is adjusted to 6.8, after the medium was heated and dissolved completely. It is then sterilized at 121°C for 15 minutes, and cooled to 50°C. In use, 100m*l* of a 20% egg yolk emulsion and 10mg of polymyxin B sulfate were added into the medium and dispense 15m*l* aliquots petridishes. Through the basic experiment, it was found that the presence of 0.3% of glycine in the medium showed considerable inhibitory effect on *Bacillus subtilis* strains, while the medium had enhanced the growth of all *B. cereus* strains used in the experiment. In addition to these basic experiments, the medium was applied on the detection and enumeration of *B. cereus* in field samples. Of the 434 specimens, consisting of 193 meat products and 241 fish paste products, 69 (15.9%) were found to be contaminated with greater than 10^2/g of the organisms. Of the 69 specimens contaminated with *B. cereus*, 1 (1.7%) of 58 "Hanpen" had harbored 10^5/g of the organisms, and 1 (8.3%) of 12 "Satsumaage" and 1 (2.0%) of 50 "Narutomaki" and others had harbored 10^6/g of the organisms, while 30 (15.5%) of 193 meat products tested contained only 10^2～10^3/g levels of the organisms.

緒　言

Bacillus cereus は自然界に広く分布するグラム陽性有芽胞桿菌で，一般に腐敗細菌として知られているが，近年，食中毒起因菌として注目され，欧米諸国で数多くの研究報告がなされている[1,2]．しかし，わが国においてはこれまで *B. cereus* 食中毒の報告例が少なく，かつ，*B. cereus* を食中毒起因菌の対象とした調査研究報告も乏しかった．ところが，最近，*B. cereus* の食中毒と思われる事故例が相次いで報告されている[3-6]．そこで，*B. cereus* による食中毒予防の見地から，先ず市販食品中の本菌による汚染実態調査を試みると同時に，衛生学的品質管理上，現場で日常検査の一環として実施し得る簡易な *B. cereus* の検査法の開発を試みた．

材料および方法

1) **供試菌株**　*B. cereus* 数測定培地の基礎実験には，*B. cereus* ATCC 19637, *B. subtilis* ATCC 6633 と家畜衛生試験場から分与された *B. cereus* 3株 (NIAH 345, NIAH 317, NIAH 296) および *B. subtilis* 2株 (NIAH 50, NIAH 122) を用いた．

2) **NGKG 培地**　従来 *B. cereus* 選択分離培地として報告されている KG 培地[7] に NaCl および Glycine を加えて改良したものを NGKG 培地として用いた．すなわちペプトン (Difco) 1g，酵母エキス (Difco) 0.5g，食塩 4g，グリシン 3g，フェノールレッド 0.025g および寒天 18g を精製水 900m*l* に溶解し，pH を 6.8 に調製した．これを121°で15分間滅菌後，50° に保持して，

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Recovery of *B. cereus* and *B. subtilis* by Several Plating Media

Strains tested	Plating medium used				
	NA*	KG	NGKG	MYP	PBCW
B. cereus					
ATCC 19637	92×10^6	87×10^6	60×10^6	95×10^6	64×10^6
NIAH 345	57×10^6	28×10^6	40×10^6	49×10^6	63×10^6
NIAH 317	86×10^6	56×10^6	87×10^6	57×10^6	51×10^6
NIAH 296	40×10^6	52×10^6	22×10^6	31×10^6	43×10^6
B. subtilis					
ATCC 6633	35×10^6	24×10^6	20×10^3	17×10^6	27×10^6
NIAH 50	71×10^6	20×10^6	47×10^4	27×10^6	32×10^6
NIAH 122	36×10^6	16×10^6	24×10^4	39×10^6	24×10^6

* NA (Nutrient Agar) is used as a control.

Table 2. Selective Detection of *B. cereus* by Several Plating Media

Prepared Mixture	No. of organisms/m*l* supposed to be placed in the mixture			Recovered No. of *B. cereus*/m*l* by			
	B. cereus ATCC 19637	*B. subtilis* ATCC 6633	*B. subtilis* NIAH 122	KG	NGKG	MYP	PBCW
1	33×10	42×10^5	39×10^5	16×10	30×10	14×10	12×10
2	33×10^2	42×10^5	39×10^5	29×10^2	37×10^2	34×10^2	39×10^2
3	33×10^3	42×10^5	39×10^5	39×10^3	28×10^3	39×10^3	32×10^3
4	33×10^4	42×10^5	39×10^5	31×10^4	29×10^4	34×10^4	31×10^4
5	71×10	27×10^6	56×10^6	22×10	46×10	20×10	22×10
6	71×10^2	27×10^6	56×10^6	36×10^2	53×10^2	40×10^2	44×10^2
7	71×10^3	27×10^6	56×10^6	53×10^3	60×10^3	48×10^3	41×10^3
8	71×10^4	27×10^6	56×10^6	55×10^4	59×10^4	53×10^4	54×10^4

硫酸ポリミキシン B 10mg および20%卵黄液 100m*l* を加えてよく混和してからシャーレに 15m*l* ずつ分注して平板とした.

3) **調査対象** *B. cereus* の汚染調査は1977年4月～7月の間に，都内の小売店より採取したハム・ソーセージおよび魚肉ねり製品434検体を対象として行なった.

4) **検査法**

a) **培地の比較検討** KG 培地[7], MYP 培地[8], PBCW培地[9]および NGKG 培地を対象に，供試菌株の30° 18時間普通ブイヨンで培養した菌液 0.1m*l* ずつを各平板5枚にそれぞれ塗抹し，30° 18時間培養後測定菌数の平均値を比較した.

b) ***B. cereus* の分離同定** 試料 10g に滅菌生理食塩水 90m*l* を加えて，30秒間ストマッカーでストマッキングし，これを試料原液とした．試料原液および希釈試料 0.1m*l* を NGKG 平板へ塗抹し，30° で18時間培養した後，卵黄反応陽性で周縁不規則な集落を推定 *B. cereus* として釣菌し，Wirtz 法で芽胞染色し芽胞型を決定した．一方，クエン酸塩の利用，硝酸塩の還元，でんぷんの分解，VP 反応，ゼラチンの分解，ブドウ糖のはっ酵，マンニット，アラビノース，キシロースの分解，溶血反応などの生化学的性状を調べて *B. cereus* の同定を行なった.

試験成績

1) **NGKG 培地の *B. cereus* 検出能** NGKG 培地，KG 培地，MYP 培地および PBCW 培地による *B. cereus* の測定値は Table 1 に示したようにいずれもほぼ同じであった．これに対し，*B. subtilis* の測定値は，NGKG 培地が KG 培地，MYP 培地，PBCW 培地に比べて2～3桁低かった.

次に，*B. cereus* 10^2～10^3/m*l* と *B. subtilis* 10^6～10^7/m*l* の混合菌液を対象に前記4種類の培地による *B. cereus* の選択分離試験を行なって，その成績を Table 2に示した．それによると，*B. cereus* の菌量が少なく

Table 3. Incidence of *B. cereus* in Meat and Fish Products

Specimens	No. of tested	Degree of contamination by *B. cereus*/g					
		$<10^2$	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
Vienna sausage	72	62	8	2			
Frankfurter	31	26	5				
Other sausage	21	18	1	2			
Loins ham	15	12	3				
Pressed ham	35	31	3	1			
Other ham	19	14	5				
"Tsumire"	81	72	7	2			
"Hanpen"	58	45	8	3	1	1	
"Suji"	21	15	3	2	1		
"Kamaboko"	19	17	2				
"Satsumaage"	12	9	2				1
Miscellaneous	50	44	5				1

Table 4. Frequency of Combination of Biochemical Characteristics Manifested by 216 Isolates of *B. cereus*

Biochemical test	Percent Positive	Combination of biochemical characteristics										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Simmons's Citrate	54.6	+	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+
NO_3 reduction	76.4	+	+	+	−	−	+	−	−	+	+	+
Starch hydrolysis	81.5	+	+	−	+	−	−	+	−	−	+	+
Voges- Proskauer reaction	97.7	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Gelatin hydrolysis	100.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Egg yolk reaction	100.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolysis	100.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose fermentation	100.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from Mannitol	0.0	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Acid from Arabinose	0.0	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Acid from Xylose	0.0	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Number of strain		77	47	18	29	2	18	19	1	1	1	3

B. subtilis の菌量が多い混合試料ほど NGKG 培地の *B. cereus* 測定値が他の培地のそれよりも高くなる傾向を認めた.

2) ***B. cereus* 汚染状況** 市販食肉魚介加工食品中の *B. cereus* 汚染状況は Table 3 に示した. すなわち, 全供試検体434件中69件 (15.9%) から *B. cereus* が検出された. そのうち, ハム・ソーセージ類は193検体中30検体 (15.5%), 魚肉ねり製品は241検体中39検体 (16.2%) からそれぞれ検出され, とくに「はんぺん」, 「すじ」, 「あげもの」が汚染の高い食品で, いずれも約25%前後の汚染率を示した. 汚染菌数はハム・ソーセージ類がいずれも 10^3/g 以下であるのに対して, 魚肉ねり製品の5%が 10^3/g 以上汚染されており, なかには「はんぺん」, 「さつまあげ」, 「なると巻」のように10^5～10^6/g の高い菌数に汚染されているものがあった.

3) **分離菌株の同定** 市販食肉魚介加工食品から分離した推定 *B. cereus* 216 株について生化学的性状を調べて, その結果を Table 4 に示した. 全ての分離菌株は卵黄反応, ゼラチンの分解, 溶血反応, ブドウ糖のはっ酵陽性であり, アラビノース, キシロースおよびマンニ

ット分解は陰性であった．VP 反応およびクリステンゼンのクエン酸塩の利用はそれぞれ3株および5株が陰性であとは全て陽性であった．シモンズのクエン酸塩の利用，硝酸塩の還元およびでんぷんの分解は不定であった．一方，分離菌株全てが菌体中央に長円形の芽胞を形成し，芽胞は菌体幅以上に膨出していなかった．

以上の成績を Bergey[10]，Goepfert ら[1]，東[11,12]および村上[13]などの分類にもとづいて検索したところ，全てが *B. cereus* と同定された．

考　察

従来，食品中の *B. cereus* の選択分離培地として KG 培地，MYP 培地および PBCW 培地などが広く使用されている．しかし，これらの培地では，*B. cereus* 類縁菌が多く存在する食品から，微量の *B. cereus* を選択的に検出することは困難な場合がある．そこで，この点に改良を加えて試作した NGKG 培地は，*B. subtilis* などの類縁菌の発育を抑制すると同時に *B. cereus* をより選択的に分離し，また，本培地上に形成される卵黄反応陽性の周縁不規則な集落は全て *B. cereus* である．このことから，食品衛生検査上 *B. cereus* を検出するには，分離培地として NGKG 培地を使用して，卵黄反応陽性周縁不規則な集落を *B. cereus* とみなしてよいと考える．この方法は，細菌学的には必らずしも満足できるものでないが，食品の品質管理および衛生管理の目的で実施する検査には十分利用できるものと思われる．

本培地を用いて行なった調査成績によると，市販食肉魚介加工食品の *B. cereus* 汚染率は約16%であった．これは，*B. cereus* が広く自然界に分布している細菌であることから当然予想されることであるが，それが加熱処理後の残存芽胞であるのか，加工後の二次汚染によるものかは不明である．この点について，今後実態調査を行なって明らかにするつもりである．

Hobbs と Gilbert[14] の報告によると 10^5/g オーダーの *B. cereus* が食中毒を起した事例がある．今回調査した魚肉ねり製品の中に，官能的に異常が認められないにもかかわらず，*B. cereus* が 10^5～10^6/g 検出された「はんぺん」，「さつまあげ」，「なると巻」などがあった．このことから，これらの食品が直ちに食中毒の原因食となりうるとは言えないが，Hobbs らの報告例から，その危険性を全く否定することはできないであろう．食中毒を起す *B. cereus* の性状やエンテロトキシンについては，今後の研究によって解明されるであろうが，それまでは，とりあえず *B. cereus* についての許容基準を設定して，行政指導を実施してゆく必要があると考える．

要　約

B. cereus をより選択的に検出するための基礎実験を，*B. cereus* 5株と *B. subtilis* 3株を用いて行なった．その結果，KG 培地に食塩0.4%，グリシン0.3%加えた NGKG 培地は，これまで報告されている KG 培地，MYP 培地および PBCW 培地に比べて，*B. subtilis* の抑制力が強く，しかも *B. cereus* の検出率が良かった．

一方，1977年4月～7月に都内の小売店より採取した市販の食肉魚介食品434検体を対象に，NGKG 培地を用いて *B. cereus* の汚染実態を調査した．その結果，69検体（15.9%）が *B. cereus* に汚染されていた．食品別ではハム・ソーセージ類193検体中30検体(15.5%)，魚肉ねり製品241検体中39検体（16.2%）が汚染されており，とくに，「はんぺん」，「すじ」，「あげもの」などが汚染の高い食品であった．汚染菌数はハム・ソーセージ類がいずれも 10^3/g 以下であるのに対して，魚肉ねり製品の5%が 10^3/g 以上の菌に汚染されており，なかには「はんぺん」，「さつまあげ」，「なると巻」のように 10^5～10^6/g と言う濃厚に汚染を示したものがあった．

なお，NGKG 培地で分離した卵黄反応陽性周縁不規則な集落216株について，生化学的性状を調べた結果，すべて，*B. cereus* と同定された．

文　献

1) Goepfert, J. M. and H. Kim : *J. Milk Food Technol.*, **35**, 213, 1972
2) Taylor, A. J. and R. J. Gilbert : *J. Med Microbiol.*, **8**, 543, 1975
3) 塩田千恵子，森　容子，吉川秀成，西岡昌子：第34回日本公衆衛生学会総会　講演集，1975
4) 品川邦汎，岡田信治，小崎俊司，阪口玄二：第30回日本細菌学会関西支部総会　講演要旨，1977
5) 安川　章，岡田陽一，吉村　陽，福島　猛，種村昌城，山本博昭，川村脩一，伊藤謙朗：日本食品衛生学会第35回学術講演会　講演要旨，1978
6) 坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斉藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，甲斐明美，新垣正夫，寺山　武：東京都衛生局学会 No 61 講演要旨，1978
7) Kim, H. U. and J. M. Goepfert : *Appl. Microbiol.*, **22**, 581, 1971
8) Mossel, D. A. A., M. J. Koopman, and E. Jongerius : *Appl. Microbiol.*, **15**, 650, 1967
9) 寺山　武，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，五十嵐英夫，坂井千三，善養寺浩：食衛誌，**19**, 98, 1978
10) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,

8th edition, P. 535, The Williams & Wilkins Co., Baltimore U.S.A.
11) 東　量三：ニューフードインダストリー，4：No. 9, 67, 1962
12) 東　量三：ニューフードインダストリー，4：No. 10, 61, 1962
13) 村上　一：モダンメディア，23, 131, 1977
14) Hobbs, B. C. and J. Gilbert : Proc. IV Int. Congress Food Sci. and Technol., Vol III, 159, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 163—166, 1978

市販食品からの Klebsiella の検出ならびに食品および健康人ふん便由来株の種と生物型の比較

潮田 弘*, 新垣正夫*, 寺山 武*, 五十嵐英夫*, 坂井千三*

Surveys on the Incidence of Klebsiella in Commercial Foods and Healthy Human Feces, and Identification of Species and Biotypes of their Isolates

HIROSHI USHIODA*, MASAO SHINGAKI*, TAKESHI TERAYAMA*, HIDEO IGARASHI* and SENZO SAKAI*

細菌性食中毒を含む食品媒介感染症の対策として，飲食物の腸管系病原菌による汚染防止はもちろん，食品原料の病原菌による汚染度の監視と製品中からそれらを排除することも極めて重要である．従来，飲食物のふん便汚染の指標として大腸菌または大腸菌群を用いることが広く一般に行なわれているが，後者の中には，Escherichia, Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter の菌属が包含されている．

一方，私どもは食品，特に複合食品の検査に当り，多くの検体から Klebsiella に属すると思われる菌をしばしば検出している．そこで今回は，食品の Klebsiella による汚染の実態を明らかにするために，その検出率を検討するとともに，健康人のふん便からの検出率と比較した．一方，食品を汚染している Klebsiella の汚染源追究の一環として食品およびふん便からの分離株の種の同定および生物型分類を行なって，その異同について検討を行なったので報告する．

材料および方法

1. Klebsiella 検出率の検討

1) 調査対象

a）市販食品：1975年4月～12月に東京都内で収去したサラダ，サンドイッチ（調理パンを含む），洋菓子，和菓子，そう菜，豆腐，ゆでめん類および生ジュースなど各300件，計2,400件の各種食品である．

b）健康人ふん便：健康者検便として送付されたふん便1,080件を対象とした．

2) Klebsiella の分離培養法

a）食品：各種市販食品からの Klebsiella の分離培養は Fig. 1 に示すごとく，倍濃度 BGLB 培地に食品の

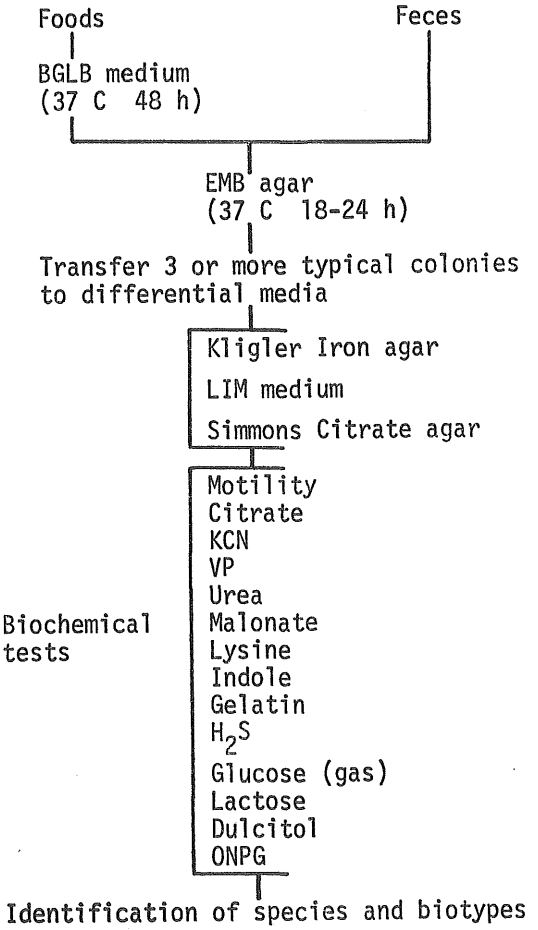


Fig. 1. Procedures for Isolation and Identification of *Klebsiella* from Foods and Feces

* 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

10%乳剤を等量加え，37C 48時間培養後 EMB 平板に分離培養を行なった．発育した集落の形状の異なるごとに，原則として5個の集落を釣菌し，クリグラーカンテン斜面，LIM 培地[1]およびシモンズ・クエン酸塩培地を用い，確認培養を行ない，その結果 Klebsiella と疑われる菌株はさらに後述する生化学的性状検査を行ない同定した．

b）ふん便：健康人のふん便を直接 EMB 平板に分離培養を行ない，前記同様生化学的性状検査を行なった．

2. Klebsiella の種および生物型

1) 生化学的性状試験

a）運動性：半流動カンテン培地を用いた．

b）クエン酸塩利用：シモンズ・クエン酸塩培地を用い，37C 4日間培養し判定した．

c）硫化水素産生：クリグラーカンテン斜面によった．

d）KCN 中での発育：被検菌のブイヨン培養菌の1白金耳を KCN 培地に接種し，48～72時間培養し，菌の発育の有無を判定した．

e）VP 反応：VP 半流動培地を用い，25C 48時間培養後判定した．なお陰性株については再度1週間培養のものについても調べた．

f）リジン脱炭酸：LIM 培地[1]を用いて判定し，反応不明瞭なものについては Falkow の方法の両法の比較により判定した．

g）インドール産生：LIM 培地によって判定した．

h）ウレアーゼ産生：クリステンゼン・尿素培地を用い4日間培養，観察，判定した．

i）マロン酸塩利用：フェニールアラニン・マロン酸塩培地を用い，48時間培養後判定した．

j）ゲラチナーゼ産生：ゲラチン培地に穿刺培養し，25C 2週間まで培養し，随時液化の有無を判定した．

k）ラクトース，ズルシット分解性：各糖を1%に添加したバルジコー培地で1週間培養し判定した．

l）ブドウ糖からのガス産生：1%にブドウ糖を添加したダーラム管入りバルジコー培地を用い，1週間培養し判定した．

m）ONPG 試験：ラクトース分解の不明瞭なもの，あるいは陰性のものについては，ブイヨン培養菌の1白金耳を ONPG ブイヨン[2]に接種し，20時間培養後判定した．

2) 菌種および生物型分類

検出率を検討した対象食品とは別に，各種市販食品331件から検出された Klebsiella 170 株ならびに健康人ふん便1,080件から検出された160株について菌種および生物型分類を試みた．

Cowan[2] および坂崎[3]に準じて分類を行なった．すなわち，菌種は K. pneumoniae, K. ozaenae および K. rhinoscleromatis の3菌種とし，K. pneumoniae の中に，Pneumoniae, Aerogenes, Edwardsii, Atlantae および Oxytoca の5つの生物型をおく分類によった．

Table 1. Isolation Frequency of *Klebsiella* from Commercial Foods

Food	No. of tested	No. of positive	Detection rate
Salad	300	210	70.0%
Sandwich	300	189	63.0
European cake	300	186	62.0
Japanese cake	300	179	59.7
Side dish	300	164	54.7
Bean curd	300	148	49.3
Noodles	300	136	45.3
Fresh juice	300	121	40.3

成　績

1. Klebsiella の検出率

1) 食品からの Klebsiella 検出率：各種市販食品からの Klebsiella 検出率を Table 1 に示した．サラダの70%から Klebsiella が検出され，ついでサンドイッチ63.0%，洋菓子62.0%，和菓子59.7%，そう菜54.7%，豆腐49.3%，ゆでめん類45.3%および生ジュース40.3%という検出率であった．すなわち各種市販食品は Klebsiella に高率に汚染されていることが明らかにされた．

2) 健康人ふん便からの Klebsiella 検出率：健康人のふん便1,080件からの Klebsiella 検出率を Table 2 に示した．食品の場合と異なり，BGLB培地での増菌培養を行なわず，EMB 平板へ直接分離培養を行ない，前記の3種類の確認培地を用いて検討した結果，1,080件中153件（14.2%）から Klebsiella が検出された．

2. 食品の種類と Klebsiella の菌種・生物型との関連性

食品の種類と検出された Klebsiella の菌種・生物型との関連性を Table 2 に示した．洋菓子，和菓子，そう菜，ファーストフードおよび生ジュースの各食品すべてから Aerogenes 生物型が多く検出されているが，特に食品の種類と分離菌の菌種・生物型に片寄りはなく，関連性は認められなかった．

3. 食品およびふん便の同一検体からの分離菌の菌種・生物型

食品1検体およびふん便1件から集落形状の異なるも

Table 2. Isolation Frequency of *Klebsiella* from Commercial Foods and Healthy Human Feces, and Species and Biotypes of the Isolates

Sample	No. of tested	No. of positive (%)	No. of strain	Species and biotypes (No. of strain)
European cake	158	81 (51.3)	39	Aerogenes (67), Edwardsii (7), *K. ozaenae* (6), Atlantae (5), Pneumoniae (4), Oxytoca (4)
Japanese cake	89	37 (41.6)	40	Aerogenes (30), Atlantae (6), Oxytoca (3), *K. rhinoscleromatis* (1)
Side dish	42	22 (52.4)	24	Aerogenes (19), Atlantae (3), Oxytoca (2)
Fast food	24	7 (29.2)	7	Aerogenes (4), Oxytoca (2), *K. ozaenae* (1)
Fresh juice	18	5 (27.8)	6	Aerogenes (5), Oxytoca (1)
Total	331	152 (45.9)	170	
Feces	1,080	153 (14.2)	160	Aerogenes (99), Oxytoca (42), *K. ozaenae* (1), Atlantae (6), Pneumoniae (4)

のを分離し，菌種および生物型が2～3種出現したものを Table 3 に示した．食品152件から Klebsiella が検出され，そのうち15件から2～3種類の菌種および生物型が認められた．2つの菌種・生物型の認められたものが15件中12件，3菌種・生物型の認められたものが15件中3件であった．

健康人のふん便153例から Klebsiella が検出され，そのうち7例から2種類の菌種・生物型が認められた．

4. 食品およびふん便由来株の菌種および生物型比較

市販食品および健康人のふん便由来 Klebsiella の菌種および生物型をまとめて Table 4 に示した．食品由来株は全ての菌種および生物型がみられ，170株中125株（73.5%）が Aerogenes 生物型であり，インドール産生能を有する Oxytoca 生物型としたものが12株（7.0%）であった．K. rhinoscleromatis としたものは1株であった．

つぎにふん便由来株では160株中99株（61.8%）が，Aerogenes 生物型であったが，Oxytoca 生物型が160株中42株（26.3%）認められた．Atlantae 生物型，K. rhinoscleromatis などは1株も認められず，食品由来株と菌種および生物型の出現傾向に差異が認められた．

考　察

Klebsiella は大腸菌群の1員であり，食品衛生の分野では汚染指標菌として重視されている．食品衛生学上の大腸菌群には Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter などが含まれているが，私どもがこれまでに検討してきた結果では，一般食品から高率に検出される大腸菌群は Klebsiella と Enterobacter であった．

細菌学的分類の立場からは，Klebsiella は K. pneumoniae, K. ozaenae および K. rhinoscleromatis の3菌種に分類され，さらに K. pneumoniae は Pneumoniae, Aerogenes, Edwardsii, Atlantae および Oxytoca の5生物型に分類されている[2,3]．

これまでに臨床材料由来 Klebsiella の種および生物型を検討した成績[4-6]は多くみられるが，食品由来Klebsiella について検討した成績はみられない．本報では食品汚染 Klebsiella の汚染源を追求する一環として，ヒトふん便由来 Klebsiella の種および生物型とを比較検討した結果を報告した．

一般食品からの Klebsiella の検出率は45.9%でそのうちの73.5%は K. pneumoniae Aerogenes 生物型であった．一方，健康人ふん便からは14.2%から Klebsiella が分離され，それらの約30%が K. pneumoniae Oxytoca 生物型であり，両者の間には明らかに生物型の違いが認められた．ヒトふん便内に多くみとめられる Oxytoca 生物型が食品由来株の中にほとんど認められないことは，食品汚染 Klebsiella の大部分がヒトふん便に由来するものではないことを示すものであろう．

最も検出率の高い Klebsiella が，ふん便汚染の指標となり得ないとするならば，ほぼ同率で検出される Enterobacter についても，詳細な検討が必要であり，大腸菌群を別の角度から見直し，追究する必要があろう．

結　論

市販食品および健康人ふん便から検出される Klebsiella の検出率，菌種および生物型分類を検討した結果，つぎの成績を得た．

Table 3. Isolation of Different Species or Biotypes of *Klebsiella* in a Single Specimen

Source	Sample No.	Species and Biotypes
Foods		
Japanese cake	No. 17	Aerogenes, Atlantae
	10	Aerogenes, Oxytoca
	51	Aerogenes, Oxytoca
European cake	No. 21	Aerogenes, Edwardsii, Oxytoca
	34	Aerogenes, *K. ozaenae*
	39	Aerogenes, Atlantae, *K. ozaenae*
	45	Aerogenes, Atlantae
	18	Aerogenes, Edwardsii
	7	Aerogenes, Oxytoca
	18	Aerogenes, *K. ozaenae*
	21	Aerogenes, Oxytoca
	62	Aerogenes, Oxytoca
	27	Aerogenes, Edwardsii, *K. ozaenae*
Side dish	No. 25	Aerogenes, Atlantae
	10	Aerogenes, Atlantae
	No. 1	Pneumoniae, Aerogenes
	24	Oxytoca, *K. ozaenae*
	77	Aerogenes, Atlantae
Feces	163	Oxytoca, *K. ozaenae*
	275	Aerogenes, Oxytoca
	300	Oxytoca, *K. ozaenae*
	364	Aerogenes, Oxytoca

1. 市販食品からの Klebsiella 検出率はサラダが最も高く 70%，ついでサンドイッチ 63.0%，洋菓子 62.0%，和菓子59.7%，そう菜54.7%，豆腐49.3%，ゆでめん類45.3%および生ジュース40.3%であった．

健康人のふん便からの Klebsiella 検出率は14.2%であった．

Table 4. Species and Biotypes of *Klebsiella* Isolates from Foods and Healthy Human Feces

Source	No. of Strain	*K. pneumoniae*					*K. ozaenae*	*K. rhinoscleromatis*
		Pneumoniae	Aerogenes	Edwardsii	Atlantae	Oxytoca		
Foods	170 (100)	4	125 (73.5)	7	13	12 (7.0)	8	1
Feces	160 (100)	4	99 (61.8)	0	6	42 (26.3)	9	0

2. 市販食品および健康人ふん便から検出された Klebsiella の菌種および生物型は，食品由来株では Aerogenes 生物型が最も多く，170株中125株（73.5%），ついで Atlantae 生物型13株（7.6%），3番目が Oxytoca 生物型12株（7.0%）の順であった．

健康人ふん便由来株では160株中99株（61.8%）が Aerogenes 生物型であり，第2位に Oxytoca 生物型が42株（26.3%），ついで K. ozaenae 9株（5.6%）であった．

両由来株の違いは Oxytoca 生物型の検出率に大きな差が認められたことである．

文　献

1) 五十嵐英夫，太田建爾，善養寺　浩：日細菌誌，24，338，1969
2) Cowan, S. T. : *Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge, University Press, 1974
3) 坂崎利一：臨床と細菌，2，151，1975
4) 原　耕平，斉藤　厚，那須　勝，猿渡勝彦：医学のあゆみ，87，433，1973
5) 坂崎利一：第48回日本細菌学会総会パネルディスカッション予講集　1975
6) 斉藤　厚，那須　勝：臨床と細菌，2，165，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 167—169, 1978

東京都における水銀汚染の実態について（第5報）　魚介類中の水銀含有量調査

雨宮　敬*, 竹内正博*, 伊藤弘一*
江波戸舉秀*, 原田裕文*

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (V)
Mercury Content of Fish and Shellfish

TAKASHI AMEMIYA*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KOICHI ITO*,
KIYOHIDE EBATO* and HIROFUMI HARADA*

はじめに

著者らは，1973年以降食品汚染調査の一環として，魚介類中の水銀含有量を測定し，各年度ごとに報告してきた[1-4]．1977年度においても前回にひきつづいて調査を行なったので，その結果を報告する．

実験方法

1. **試料**　1977年4月から1978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21種50検体である．

2. **操作および定量**　総水銀，メチル水銀のいずれも前報[1-5]に述べた操作法にしたがって定量を行なった．

結果および考察

調査の結果を Table 1 に示す．結果は前報[1]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．

厚生省通達[6]では魚種を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．それによれば今回調査を行なったものは大型魚2種，中型魚16種および小型魚3種であった．

1. **大型魚**　今回調査に用いた魚種はメカジキとマカジキで，これらは切身として搬入されたため，体長および体重は不明である．まず総水銀についてみるとメカジキ 1.56ppm，マカジキ 0.63ppm と予想どおり高値を示し，またメチル水銀はメカジキ1.32ppm，マカジキ0.58 ppm であった．これらの総水銀量に対するメチル水銀量の比率をみると，マカジキ92.1%，メカジキ84.6%であり前報[3]と同様の結果を示した．

2. **中型魚**　今回の調査において平均値で暫定規制値をこえたものはムツであり，0.56ppm の総水銀を検出し，メチル水銀は 0.48ppm であった．今回調査したムツは15検体で，そのうち総水銀含有量の最も高かったものは 1.09ppm であった．また最も低いものでも 0.27 ppmを示した．15検体中総水銀の暫定規制値である0.40 ppmをこえたものは11検体であり，基準はこえなかったものの 0.30ppm 以上 0.40ppm 以下のものが3検体みられた．ムツは過去の調査においても高値を示し，1973年から順に 0.36ppm[1]，0.49ppm[2]，0.28ppm[3] および 0.46ppm[4] であった．

スズキ，アカアマダイは平均値では暫定規制値をこえなかったが，アカアマダイ7検体の総水銀含有量の平均値は 0.39ppm であった．これらのうち最も高い値は 0.65ppm で，基準をこえたものは7検体中3検体であった．またメチル水銀においては3検体が基準をこえていた．いっぽうスズキ5検体について測定したところ，平均 0.25ppm の総水銀を検出し，そのうち1検体が 0.41ppm を示し，基準をこえていた．

今回の調査に用いたムツ，スズキおよびアカアマダイはいずれも成魚で，かなり魚体が大きく，ムツの平均体長は 58cm，スズキ 57cm およびアカアマダイ 38cm であった．また一般に水銀含有量は魚体の大きさに比例するといわれており，今回の調査も例外ではなかった．ムツ，スズキおよびアカアマダイは水深 200—300m ほどの比較的深海に生息する魚種である．前報においても深海性の魚種は浅所に生息する魚種よりも水銀含有量が高いと述べたが，今回の結果もそれを裏づけている．

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

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	Akaamadai *Branchiostegus*	7	0.16—0.65	0.39	0.13—0.62	0.35	70.0—95.4	84.6
2	Aji (Horse-mackerel) *Trachurus trachurus*	1	0.07		0.05		71.4	
3	Aodai	1	0.08		0.04		50.0	
4	Anago (Conger eel) *Conger myriaster*	2	0.10—0.15	0.13	0.06—0.12	0.09	60.0—80.0	70.0
5	Ankou (Angler) *Lophius litulon*	2	0.08—0.18	0.13	0.06—0.14	0.10	75.0—77.8	76.4
6	Inada	1	0.11		0.08		72.7	
7	Iwashi (Sardine) *Sardinops melanosticta*	1	0.03		0.01		33.3	
8	Kamasu (Barracuda) *Sphyraena japonica*	1	0.08		0.06		75.0	
9	Karei (Flatfish) *Tanakius kitaharae*	2	0.11—0.13	0.12	0.09		75.8	
10	Saba (Mackerel) *Pneumatophorus japonicus*	1	0.16		0.13		81.3	
11	Sayori (Halfbeak) *Hemirhamphus sajori*	1	0.03		0.02		66.7	
12	Shiroamadai	2	0.11—0.13	0.12	0.07—0.10	0.09	63.6—76.9	70.3
13	Suzuki (Perch) *Lateolabrax japonicus*	5	0.10—0.41	0.25	0.08—0.35	0.20	78.1—85.4	81.7
14	Hamadai	1	0.12		0.10		83.3	
15	Houbou (Gurnard) *Chelidonichthys kumu*	1	0.25		0.22		88.0	
16	Bora (Gray mullet) *Mugil cephalus*	1	0.04		0.01		25.0	
17	Makajiki (Spearfish) *Makaira mitsukurii*	1	0.63		0.58		92.1	
18	Mutsu *Scombrop boops*	15	0.27—1.09	0.56	0.23—0.90	0.48	78.5—89.2	83.7
19	Mekajiki (Swordfish) *Xiphias gladius*	1	1.56		1.32		84.6	
20	Medai	2	0.12—0.15	0.14	0.08—0.09	0.09	60.0—66.7	63.4
21	Hokkigai	1	0.01		<0.01			

N : number of samples

その他の中型魚ではとくに高い値を示したものはみられなかったが，やや高いと思われるものとしてホウボウ 0.25ppm，サバ 0.16ppm があった．しかし，年次の推移をみると多少の増減はあるが，顕著な変化はみられなかった．

3. 小型魚　すべて 0.10ppm 以下で，前報と同様であった．

今回調査した魚種を前報と同様総水銀の平均含有量によってつぎのように分類した．すなわち①0—0.10ppm，②0.10—0.20ppm，③0.20—0.30ppm，④0.30—0.40 ppm，⑤0.40ppm 以上である．これによると①に該当するものは7種で全体の33.3%，②は8種38.1%，③は2種9.5%，④は1種4.8%および基準をこえた⑤に該当するものは3種14.3%であった．

ま と め

1. 今回の調査に用いた魚種は21種50検体である．

2. マカジキ，メカジキ，ムツ，そしてアカアマダイおよびスズキの一部から暫定規制値をこすものがみられた．

3. その他の中型魚および小型魚はほとんど0.10ppm前後であった．

4. ムツ，スズキおよびアカアマダイのような比較的深海に生息する魚種は前報と同様に高値であった．

謝辞 本調査に御便宜をはかっていただいた東京都衛生局環境衛生部乳肉衛生課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) 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：東京衛研年報，27-1，122，1976
4) 雨宮　敬，竹内正博，伊藤弘一，江波戸擧秀，原田裕文：東京衛研年報，28-1，104，1977
5) 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
6) 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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 170—175, 1978

東京湾のアサリと底質中の重金属分布

堀井昭三*, 山岸達典*, 村上　一*

Distribution of Trace Amounts of Heavy Metals in Short-Necked Clam and Sludge in Tokyo Bay

SHOZO HORII*, TATSUNORI YAMAGISHI* and HAJIME MURAKAMI*

緒　言

1970年代に自動車排気ガス中の鉛やクロム鉱滓中の六価クロム等が環境汚染物質として社会的問題になったが東京湾の重金属汚染はすでに1920年ごろから始まったといわれている[1]．すなわち臨海地区における産業の高度な発達，都市化の進行などにともない，これらの廃液中の鉛やクロムを初め多くの重金属が最終的に湾内に流入し，海水中の懸濁物への吸着，イオン交換あるいは，不溶性の塩として比較的短期間に海底に堆積され，また，海底に堆積された重金属は水棲生物に摂取されて濃縮されることが予想される．とくに移動の少ない，いわゆる定着性生物のアサリなどは，重金属汚染指標生物として妥当であると考える．従って，東京湾内に生息するアサリの重金属濃度の現状を調査することは，将来の対照資料として，または東京湾内産魚介類の重金属汚染のモニタリング活動の一環として，きわめて有意義であろう．著者らはこのような観点から，東京湾内のアサリと底質の実態調査を行なった．

実験材料および方法

1. 試料の採取　試料は，1977年5月から9月までの期間に，東京湾沿岸の葛西沖三枚洲，大井埠頭（京浜島），千葉市中央港，木更津市人工島および富津市富津公園（以下三枚洲，大井，千葉，木更津，富津と略す．Fig. 1）の計5カ所の地点より，毎月1回の割合でアサリと底質をそれぞれ 0.5～2kg 採取し，アサリ23，底質25計48例を対象とした．しかし，千葉中央港における試料の採取は5～7月の3回であった．

2. 試料の調製　アサリは，採取後水洗し2～3%食塩水中に 4° で2～3日間浸漬後，再び水洗し，むき身（可食部）100～300g を ULTRA TURRAX で均質化し，ペースト状にしたものを分析試料とした．一方，底質は，105～110° のホットプレート上で数時間乾燥し，1mm 網目の篩にかけたものを分析試料とした．

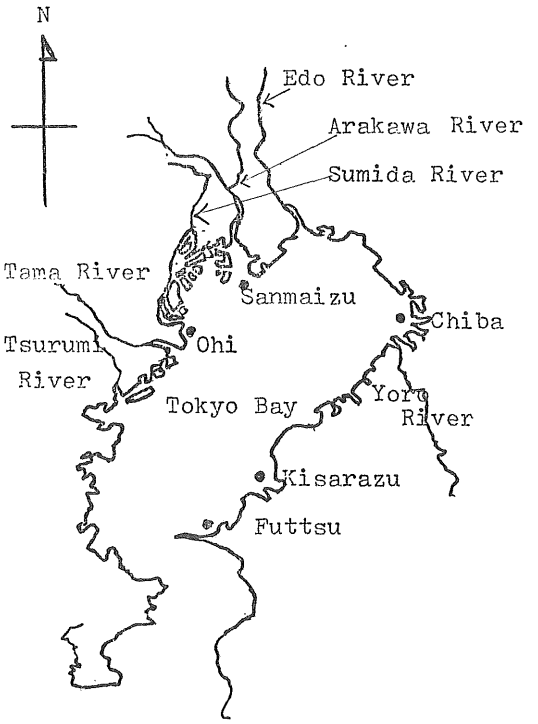


Fig. 1. Sampling Stations in Tokyo Bay

3. 試薬　金属の標準液は，いずれも和光純薬㈱製の原子吸光分析標準液（1mg/m*l*）を所定の濃度に希釈して用いた．また，アンモニア水，硝酸は和光純薬㈱製精密分析用，塩酸，硫酸は関東化学㈱製超特級，オブラー

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Conditions Used for the Measurement of Heavy Metals by Flameless Atomic Absorption Spectroscopy

Element	Wave Length (nm)	Dry (A, sec.)	Ash (A, sec.)	Atomize (A, sec.)	Background
Pb	283.3	20, 20	50, 30	235, 8	D_2 (250 mA)
Cr	357.9	20, 20	80, 30	280, 8	Ti (364.3 nm, 20 mA)
Co	240.7	20, 20	70, 30	310, 10	D_2 (250 mA)
Cd	228.8	18, 20	40, 30	150, 5	D_2 (250 mA)

Argon Flow Rate 2.0 *l*/min.
Lamp Current 10 mA
Damping 2
Sample Injection 10 μl

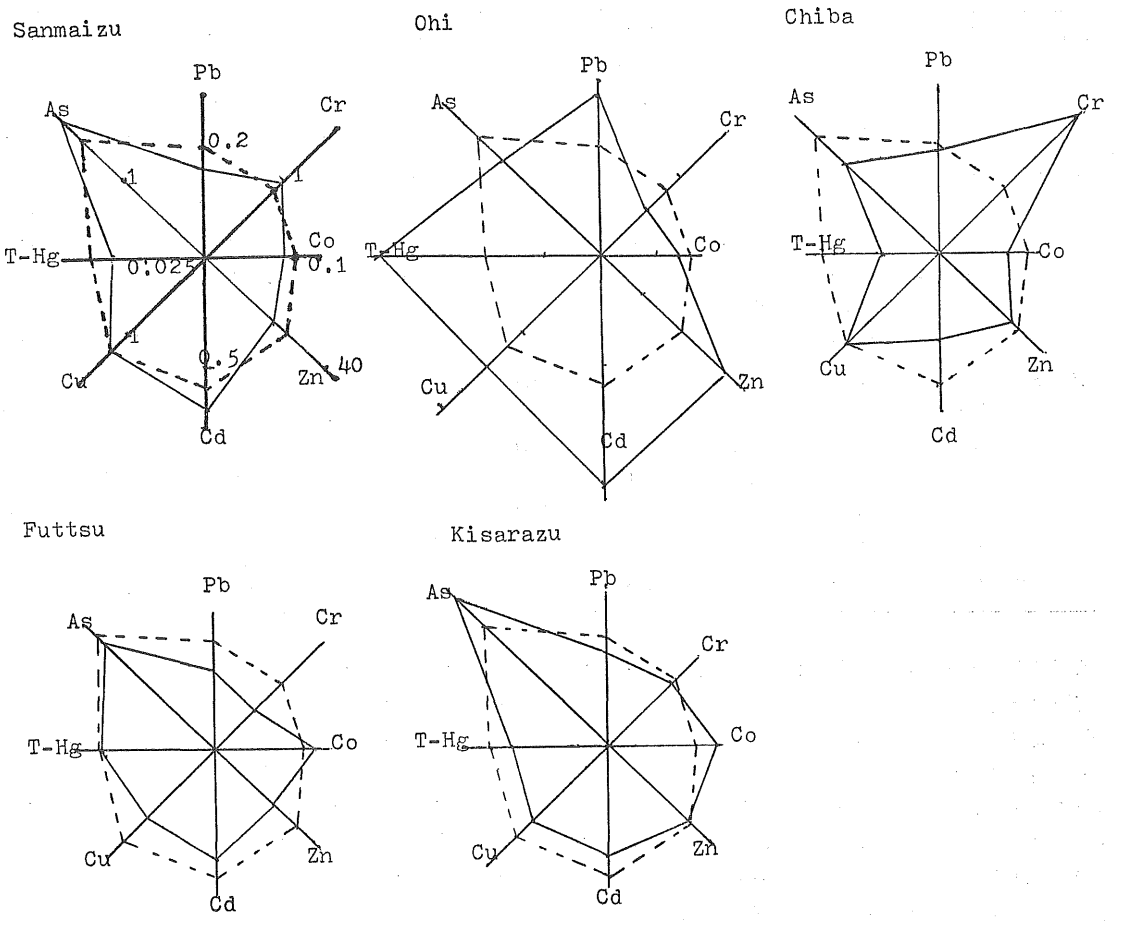


Fig. 2. Distribution Maps of Heavy Metals in Short Necked Clam Obtained at Different Sampling Stations
—— = $\bar{x}$, - - - = Total-$\bar{x}$

Table 2. Concentrations of Heavy Metals in Short-Necked Clam (wet base ppm)

Station	Month	Pb	Cr	Co	Zn	Cd	Cu	T-Hg	As	Moisture (%)
Sanmaizu	May	0.15	0.37	0.06	21.0	0.07	1.4	0.017	1.30	85.79
	June	0.17	0.39	0.04	14.0	0.06	0.9	0.019	1.02	86.99
	July	0.17	1.11	0.08	20.5	0.07	1.4	0.034	2.32	81.66
	August	0.13	2.13	0.09	15.0	0.06	1.3	0.022	2.03	83.06
	Sept.	0.21	0.77	0.07	12.5	0.11	1.2	0.111	2.18	85.14
	$\bar{x}$	0.16	0.95	0.07	16.6	0.07	1.2	0.041	1.77	84.53
Ohi	May	0.22	0.53	0.08	36.8	0.12	1.6	0.004	0.94	82.35
	June	0.21	0.47	0.06	25.6	0.12	0.7	0.022	0.98	83.53
	July	0.23	0.49	0.08	29.0	0.09	1.7	0.020	1.67	82.80
	August	0.50	0.92	0.08	34.3	0.13	2.0	0.420	1.38	81.63
	Sept.	0.35	0.53	0.06	27.0	0.12	1.4	0.027	1.30	82.15
	$\bar{x}$	0.30	0.59	0.07	30.5	0.11	1.5	0.099	1.25	82.49
Chiba	May	0.16	0.51	0.06	20.6	0.02	1.2	0.036	1.38	83.80
	June	0.19	0.63	0.05	15.6	0.03	1.0	0.014	0.87	85.56
	July	0.22	4.20	0.08	20.3	0.08	1.3	0.026	1.30	85.14
	$\bar{x}$	0.19	1.78	0.06	18.8	0.04	1.2	0.025	1.18	84.83
Futtsu	May	0.18	0.68	0.14	17.0	0.04	0.9	0.018	1.30	85.79
	June	0.10	0.16	0.09	9.0	0.08	0.6	0.018	1.30	89.13
	July	0.11	0.53	0.05	13.6	0.03	0.8	0.019	0.87	85.56
	August	0.15	0.47	0.06	14.0	0.04	0.8	0.160	1.27	86.07
	Sept.	0.23	0.68	0.09	17.4	0.06	1.4	0.058	2.32	80.88
	$\bar{x}$	0.15	0.50	0.09	14.2	0.05	0.9	0.054	1.41	85.49
Kisarazu	May	0.11	0.35	0.11	21.0	0.09	0.8	0.008	2.61	86.26
	June	0.15	0.21	0.12	19.0	0.03	0.8	0.032	2.10	85.52
	July	0.24	0.23	0.09	18.0	0.04	1.1	0.018	1.96	83.81
	August	0.16	2.50	0.10	21.0	0.05	1.2	0.027	1.27	78.85
	Sept.	0.21	0.77	0.08	16.9	0.05	2.2	0.135	1.56	81.80
	$\bar{x}$	0.17	0.81	0.10	19.2	0.05	1.2	0.044	1.90	83.24
Total-$\bar{x}$		0.20	0.85	0.08	20.0	0.06	1.2	0.055	1.53	84.05

トは国光オブラート㈱製を用いた．なお，水は蒸留イオン交換水を用いた．

4. 装置 pH メーターは日立堀場 M-7型，原子吸光分析装置は日本ジャーレルアッシュ製8500型にフレームレスアトマイザー FLA 10型を付したもの，日本ジャーレルアッシュ製 AA-1 MARK-II 型に微量ヒ素測定装置 ASD-1A 型を付したもの，パーキンエルマー 403型および島津 UV-200 型をそれぞれ使用した．

5. 定量操作

1) アサリと底質中の鉛 (Pb)，カドミウム (Cd)，コバルト (Co) およびアサリ中のクロム (Cr) 試料 1～5 g をパイレックスビーカーに精秤し，赤外ランプで炭化後，電気炉中で 18～24 時間灰化し，これに 1N 硝酸 10 m*l* を加え 1 時間放置した．その後，水を加えて正確に 50m*l* としたものを原子吸光用検液とし，Table 1 の条件により無炎原子吸光法で定量した．

2) アサリと底質中の亜鉛 (Zn)，銅 (Cu) および底質中のCr 試料 1～5g を乾式灰化後 DDTC-MIBK 抽出し，原子吸光法 (化学炎)[2] で定量した．

3) 総水銀 (T-Hg) 試料 0.1～1g に五酸化バナジウムを加え硫硝酸による湿式灰化後，還元気化法[3] で定量した．

4) ヒ素 (As) 試料 1～5g に硝酸マグネシウムを加え，乾式灰化後，3N塩酸，20%塩化第一スズ塩酸溶液，

Table 3. Concentrations of Heavy Metals in Sludge (dry base ppm)

Station	Month	Pb	Cr	Co	Zn	Cd	Cu	T-Hg*	As	Moisture (%)
Sanmaizu	May	4.15	5.45	3.64	20.0	0.02	5.8	0.010	3.20	21.99
	June	3.90	5.80	8.13	32.0	0.03	6.3	0.008	4.92	23.42
	July	4.50	4.90	6.49	18.0	0.02	6.3	0.015	3.28	20.08
	August	5.90	7.90	6.22	50.0	0.03	7.5	0.015	3.67	20.73
	Sept.	2.30	3.60	5.95	27.0	0.01	5.3	0.010	3.75	20.95
	$\bar{x}$	4.15	5.53	6.09	29.4	0.02	6.2	0.012	3.76	21.43
Ohi	May	12.00	40.00	6.90	140.0	0.34	23.1	0.055	3.83	26.33
	June	4.15	8.65	6.49	45.0	0.06	7.7	0.024	3.36	24.73
	July	6.50	21.00	6.77	55.0	0.16	13.6	0.040	3.36	21.29
	August	4.80	19.00	7.31	50.0	0.23	12.4	0.049	3.36	19.67
	Sept.	4.80	10.00	6.22	32.0	0.16	9.1	0.069	3.20	20.52
	$\bar{x}$	6.45	19.73	6.73	64.4	0.19	13.2	0.047	3.42	22.50
Chiba	May	2.55	2.18	5.27	25.0	0.02	4.0	0.013	5.86	22.59
	June	1.70	2.60	2.69	12.0	0.03	2.0	0.060	4.45	22.40
	July	2.65	3.90	3.64	18.0	0.03	1.8	0.009	3.67	18.74
	August	3.20	3.50	6.36	35.0	0.03	2.4	0.008	5.78	20.51
	Sept.	3.15	4.10	6.77	37.0	0.02	2.6	0.010	2.81	20.55
	$\bar{x}$	2.65	3.26	4.94	25.4	0.03	2.6	0.013	4.51	20.96
Futtsu	May	2.30	2.95	2.90	7.8	0.03	2.1	0.010	3.05	21.84
	June	1.95	2.30	2.55	7.8	0.02	2.2	0.015	3.52	21.64
	July	1.18	2.60	2.96	11.0	0.02	1.9	0.003	4.14	20.83
	August	3.90	2.75	2.96	15.0	0.03	3.2	0.014	3.43	20.13
	Sept.	3.65	2.30	3.23	12.0	0.03	3.0	0.017	3.36	19.50
	$\bar{x}$	2.60	2.58	2.92	10.7	0.02	2.5	0.012	3.50	20.79
Kisarazu	May	2.95	4.65	5.41	35.0	0.05	3.3	0.009	4.38	24.93
	June	2.55	3.50	2.96	37.0	0.07	2.7	0.010	5.94	23.20
	July	3.05	4.75	4.73	32.0	0.12	3.2	0.014	3.05	22.06
	August	4.15	3.20	5.27	32.0	0.06	3.3	0.037	3.28	18.85
	Sept.	4.25	4.75	4.05	27.0	0.06	3.0	0.035	3.59	22.20
	$\bar{x}$	3.39	4.17	4.48	32.6	0.07	3.1	0.021	4.05	22.25
Total-$\bar{x}$		3.85	7.05	5.03	32.5	0.07	5.5	0.021	3.84	21.59

* T-Hg is exceptionally expressed in wet base ppm.

Zn 末を加え，アルシンを発生させ原子吸光法[4] で定量した．

結果および考察

1) アサリ中の重金属濃度

アサリ中の重金属の分析結果は Table 2 に示した．すなわち，アサリ中の重金属濃度の総平均値は，Zn が最も高く 20ppm，次いで As が 1.5ppm，Cu が 1.2 ppm，Cr が 0.9ppm，Pb が 0.2ppm，Co が 0.08ppm および Cd が 0.06ppm の順で T-Hg は最も低く 0.055 ppm であった．

採取月別にアサリ中の含有量をみると，Pb, Co, Zn, Cd, Cu および As ではほとんど変化がなく，Cr と T-Hg においてのみ変化がみられた．すなわち，Cr では，三枚洲が 7, 8 月，千葉が 7 月，木更津が 8 月に，T-Hg では，三枚洲が 9 月，大井が 8 月，富津が 9 月，木更津が 9 月に高い値を示した．

採取地点によるアサリ中の重金属濃度の差について，t-検定を行なったところ，Fig. 2 に総括して示したごと

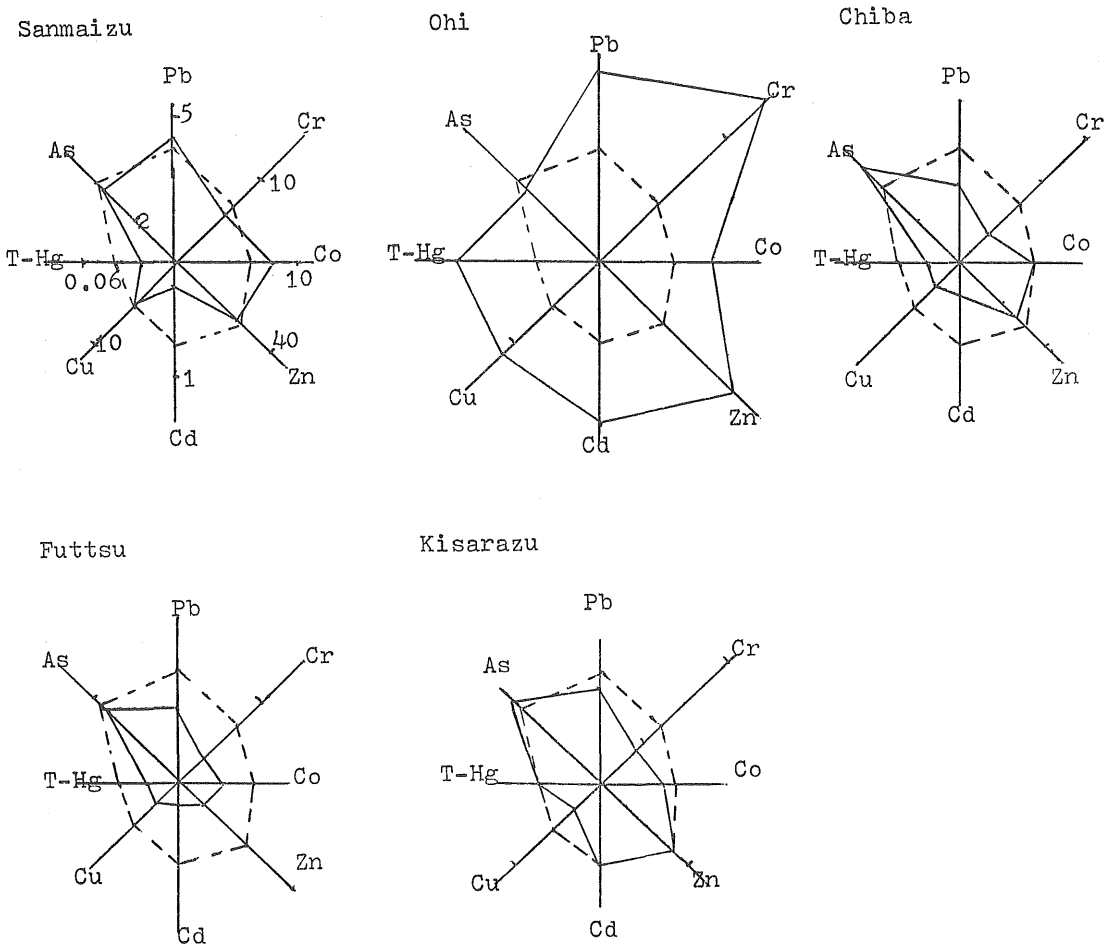


Fig. 3. Distribution Maps of Heavy Metals in Sludge Obtained at Different Sampling Stations
—— = $\bar{x}$, - - - = Total-$\bar{x}$

く，Cr，Cu，As および T-Hg では有意の差を認めなかったが，Pb，Cd，Zn および Co では有意の差を認めた．とりわけ，Pb，Cd および Zn は，大井では他の地点と比べると高い値が観察された（$P<0.05$）．

さらに，アサリ中の重金属濃度の相互間の関係について検討したところ，Pb と Cd（相関係数 $r=0.56$），Pb と Cu（$r=0.61$），Pb と T-Hg（$r=0.70$），Zn と Cd（$r=0.56$）および Zn と Cu（$r=0.53$）との間に，それぞれ正の相関々係（$P<0.05$）がみられた．

以上の調査結果と他の報告例と，一概に比較することはできないが，一応，本結果と池田ら[5]（大阪府），本田ら[6]（千葉県）の報告例と比べてみると，東京湾の沿岸で採取したアサリ中の Pb，Cd，T-Hg，As，Cr および Cu などの値は，ほぼ同じレベルであった．一方，食品衛生上の観点からみても，これらの濃度が，特に問題になる値とは思われなかった．

2) 底質中の重金属濃度

底質中の重金属の分析結果は Table 3 に示した．これらの総平均値は Zn が最も高く 32.5ppm，次いで Cr が 7.1ppm，Cu 5.5ppm，Co 5.0ppm，Pb 3.9ppm，As 3.8ppm および Cd 0.07ppm の順で，T-Hg が最も低く 0.02ppm であった．

重金属濃度に月別の変化はほとんどみられなかったが，採取地点による濃度の差異は観察された．すなわち，採取地点別の濃度差について *t*-検定を行なったところ，Fig. 3 に総括して示したように，As 以外の重金属

はすべての採取地点で有意の差がみられた（$P<0.05$）．すなわち，大井が最も高く，富津が最も低い値を示した．このことは大井の沿岸付近が主に工業地帯であって，それらの産業廃水が多量に湾内に流入するため，大井の底質中の重金属濃度が他の地点よりも高い値を示したものと考える．

3. アサリ中の重金属濃度と底質中のそれとの比較

アサリ中の T-Hg 濃度は底質中の約2.5倍と高い値を示したが，Cd ではアサリ，底質ともほぼ同じレベルであった．一方，Co ではアサリは底質の約1/60，Pb では約1/20，Cr では約1/8，Cu では約1/5，As では約1/2.5さらに Zn では約 1/2 であった．

次にアサリと底質中の各重金属の相関性について検討したところ，アサリ中の Zn と底質中の Zn の間には高い正の相関々係 $r=0.94$（$P<0.02$）を認めたが，その他の元素では相関々係を認めなかった（$P<0.05$）．

前述のように，Zn 以外の元素に相関性を認めなかったことは，主にアサリの食性によるものと思われるが，この点については，今後の調査研究にゆだねなければならない問題であると考える．つまり，底質中の重金属が定着性のある食用貝に与える影響の有無の検討や，底質に堆積した有機物も摂取するバカ貝への影響，さらに，海水中の重金属の調査など総合的に検討しなければならない問題があり，これらの点について実態調査を重ねれば，貝が生息する環境中の重金属と貝のそれとの関連性がより明確に把握できると思われる．なお，本調査をさらに意義深いものにするためには，東京湾の西側に調査地点を追加して，本調査を継続する必要があると考える．

要　約

1977年5月から9月までの期間に，東京湾沿岸の5地点で採取したアサリ23，底質25計48試料を対象にして，これらの試料中の Pb, Cr, Co, Zn, Cd, Cu, T-Hg および As を定量した．

1. アサリ中の重金属濃度（ppm）は Zn 20, As 1.53 Cu 1.2, Cr 0.85, Pb 0.20, Co 0.08, Cd 0.06, T-Hg 0.055 であったが，これらの値は，他の報告例と比較しても，また，食品衛生上の観点からみても，特に問題となる濃度と思われなかった．

2. アサリ中の重金属濃度を採取地点別にみると，大井が最も高く，特に Zn, Pb および Cd が高い値を示した．

3. アサリ中の Pb と Cd, Cu, T-Hg との間に，また Zn と Cd, Cu の間には，それぞれ正の相関々係が認められた．

4. 底質中の重金属濃度は，大井が最も高く，富津が最も低い値を示した．また，T-Hg, Cd を除く重金属濃度はアサリ中のそれより高い値を示した．

5. アサリ中の Zn 濃度と底質中の Zn 濃度との間には正の相関々係が認められた．

謝辞　本調査にあたり試料を採取された食品機動監視班の皆様に深謝致します．

文　献

1) 松本英二，横田節哉：科学，**46**，182，1976
2) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫ら：東京衛研年報，**24**，231，1972
3) 田村行弘，真木俊夫，山田　洋ら：*ibid.*，**25**，227，1974
4) 江波戸擧秀，天川映子，山野辺秀夫ら：食衛誌，**15**，1946，1974
5) 池辺克彦，田中之雄，田中涼一ら：*ibid.*，**18**，86，1977
6) 本田久義，佐伯政信，吉岡　康ら：千衛研報，**24**，36，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 177—181, 1978

魚介類中の微量元素に関する基礎的研究（第4報）　ブリ体内の重金属およびヒ素分布

安田和男*, 勝木康隆*, 上田　工*, 直井家壽太*

Study on Amounts of Trace Elements in Marine Fishes (IV) Distribution of Heavy Metals and Arsenic in Yellowtail Tissue

KAZUO YASUDA*, YASUTAKA KATSUKI*, KOU UEDA* and YASUTA NAOI*

Eight yellowtails with their body length of 82-91 cm caught at an offshore of Japan were investigated for their normal level of heavy metals such as Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Co, Cr, total and methyl mercury, and of arsenic concentrations in their organs. The specimens used for the analysis were muscle, liver, kidney, pyloric caecum, digestive organs, spleen, heart, ovary and gill. Concentrations of heavy metals and arsenic were measured by an atomic absorption spectrophotometry and a gas liquid chromatography. Results obtained are as follows : 1) Total and methyl mercury tended to be accumulated in muscle than in other viscera. Contents of Hg in four yellowtails were over the levels of the guideline (T-Hg 0.4 ppm, Me-Hg 0.3 ppm) which were issued by the Ministry of Health and Welfare, Japan. Concentration of Hg found in caudal muscle was about 30% greater than that of white muscle. 2) The highest concentration of Cd in liver was 1.1 ppm, but almost all of the specimens contained less than 0.1 ppm of Cd. 3) The levels of heavy metals and arsenic (except Cd) in yellowtail caught at high seas are considered to be in a background level.

緒　言

前報[1,2]では人間環境の影響を受けることの少ない外洋性のカツオについて微量元素の含有量を調査し報告した．今回は微量元素の蓄積挙動に魚種差があるかどうか，カツオと同様に外洋性で食性もほぼ同じ大型魚のブリについて部位別に調査し，体内分布を把握した．

実験の部

試料　ブリは1976年2月から3月にかけて鹿児島県および長崎県沖で漁獲した体長82—91cm(平均体長87cm)体重9.0—11.8kg（平均体重10.4kg）のもの8尾（推定魚齢6年）を用い，1尾ずつ背白筋，背血合筋，尾白筋，肝臓，腎臓，幽門垂，消化管（内容物は洗浄除去），脾臓，心臓，卵巣，鰓，血液，胃内容物に分けホモジナイズして実験に供した．

分析法　前報と同様に処理し，総水銀（以下T-Hgと略す）は還元気化後，フレームレス原子吸光法，メチル水銀（以下Me-Hgと略す）はECD-GC法，As, Cd, Pb, Zn, Cu, Mn, Co, Crは原子吸光法により定量を行なった．

結果および考察

分析結果を部位別，元素別にまとめTable 1に示した．また，ブリとカツオの各臓器における元素含有量の比較をFig. 1に図示した．

Hg　T-Hgは背白筋で0.43±0.09 ppm，背血合筋0.40±0.07ppm，Me-Hgは背白筋で0.35±0.09ppm，背血合筋0.35±0.06ppmであり背筋肉部全体でみた場合，分布に差はなかった．しかし，尾白筋では他の筋肉部よりかなり高い値を示し，T-Hg 0.57±0.18ppm，Me-Hg 0.49±0.15ppmで背白筋にくらべ30%ほど高い傾向が見られた．また，体長82—91cmのサイズのもの

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Concentration of Arsenic and Heavy Metals

	n	Me-Hg	T-Hg	As	Cd
White muscle	8	0.35	0.43	0.72	0.01
		(0.22—0.43)	(0.31—0.53)	(0.66—0.85)	(0.01—0.02)
Red muscle	8	0.35	0.40	1.1	<0.01
		(0.26—0.43)	(0.30—0.48)	(0.95—1.3)	(ND—0.01)
Caudal muscle	3	0.49	0.57	0.47	ND
		(0.32—0.63)	(0.36—0.72)	(0.46—0.48)	
Liver	8	0.12	0.15	1.4	1.1
		(0.09—0.12)	(0.10—0.25)	(0.70—2.9)	(0.31—2.0)
Kidney	8	0.12	0.26	0.26	0.20
		(0.06—0.23)	(0.10—0.62)	(0.22—0.32)	(0.07—0.38)
Pyloric caecum	8	0.12	0.13	1.8	0.10
		(0.08—0.18)	(0.09—0.18)	(1.2 —2.3)	(0.07—0.13)
Digestive organs	8	0.09	0.10	0.82	0.05
		(0.06—0.13)	(0.07—0.16)	(0.48—1.1)	(0.03—0.08)
Spleen	8	0.07	0.08	0.09	0.05
		(0.06—0.08)	(0.06—0.11)	(0.08—0.10)	(0.02—0.09)
Heart	8	0.18	0.20	0.33	0.02
		(0.11—0.26)	(0.11—0.31)	(0.24—0.40)	(0.01—0.03)
Ovary	7	0.04	0.05	1.7	0.02
		(0.02—0.07)	(0.03—0.09)	(1.1 —2.2)	(0.01—0.03)
Gill	8	0.04	0.06	0.12	0.02
		(0.03—0.06)	(0.04—0.08)	(0.10—0.14)	(0.01—0.03)
Blood	5	0.04	0.04	0.17	0.01
		(0.03—0.05)	(0.03—0.05)	(0.14—0.20)	(ND—0.01)
Stomach content	4	0.02	0.03	0.89	0.02
		(0.01—0.02)	(0.02—0.03)	(0.09—1.1)	(0.01—0.03)

では筋肉部における Hg 含量に個体差はほとんど見られなかった.

8尾中4尾は魚介類可食部の Hg の暫定的規制値 (T-Hg 0.4ppm, Me-Hg 0.3ppm) を越えるものであった. しかし, ブリは規制値適用除外の魚種とはされていない.

排泄器管の腎臓に T-Hg 平均 0.26ppm であったほかは, いずれの臓器も T-Hg 0.20ppm 以下, Me-Hg 0.18ppm 以下であった. Fig. 1 からカツオと比較すると含有レベルは若干高いが蓄積パターンに大差はなく, これらの値は非人為汚染地域のブリのバックグラウンド値と考えられる. T-Hg 中に占める Me-Hg の割合は背白筋81%, 背血合筋88%でカツオのそれぞれ89%, 92%にくらべるとやや低い値であるが, T-Hg の80%以上は Me-Hg の形で蓄積されている. また, 腎臓では46%で他の臓器の70—90%に比較して著しく低値であり, この結果はカツオの場合と同じ傾向であった.

Cd Cd は肝臓で最高2.0ppm, 平均で1.1±0.75ppm を示し, カツオ肝臓の平均値 13ppm に比較してかなり低い値であるが, 腎臓の 0.20±0.12ppm とともに他の臓器にくらべると10倍ほど高い値である. 魚介類中の内臓に Cd が多く存在することは石崎ら[3,4] の報告にも示されている.

筋肉部における Cd 含有量は非常に低値で部位による差, 個体差は見られなかった. Fig. 1 からわかるように Cd の魚体内蓄積パターンはカツオと相似しているが, 各部位とも含有レベルはカツオにくらべ背白筋で1/4, 内臓で 1/11—1/28 と著しく低いことが観察された.

このように魚種により Cd 蓄積量に差が生ずるのは, 食性はほぼ同じであることから海域差も考えられ魚種特異性があることも示唆している. しかし, この点については今後, 調査を続け結論を出す必要がある.

Pb Pb は Fig. 1 を見るとブリはカツオと大差のな

in Viscera and Muscle of Yellowtail unit : ppm wet base

Pb	Zn	Cu	Mn	Co	Cr
0.21	5.6	0.37	0.13	0.04	0.02
(0.13—0.30)	(5.1—6.0)	(0.33—0.50)	(0.12—0.16)	(0.02—0.05)	(0.01—0.05)
0.21	7.4	5.0	0.32	0.03	0.01
(0.12—0.31)	(6.3 —8.5)	(4.2 —5.3)	(0.29—0.35)	(0.01—0.05)	(0.01—0.02)
0.16	5.3	0.54	0.09	0.03	0.01
(0.14—0.42)	(5.1 —5.5)	(0.50—0.60)	(0.08—0.11)	(0.02—0.04)	(0.01—0.02)
0.08	38	16	0.80	0.09	0.02
(0.04—0.11)	(27 —49)	(14 —21)	(0.41—1.1)	(0.05—0.11)	(ND—0.03)
0.11	38	0.88	0.20	0.03	ND
(0.05—0.16)	(27 —52)	(0.81—0.96)	(0.14—0.25)	(0.20—0.05)	
0.14	28	1.3	0.39	0.06	0.01
(0.09—0.17)	(25 —29)	(1.1 —1.5)	(0.26—0.47)	(0.05—0.07)	(0.01—0.02)
0.31	33	1.2	0.37	0.06	0.02
(0.20—0.42)	(24 —44)	(1.1 —1.2)	(0.22—0.53)	(0.02—0.11)	(ND—0.06)
0.13	20	0.69	0.08	0.03	ND
(0.05—0.35)	(12 —34)	(0.52—0.89)	(0.04—0.11)	(0.01—0.05)	
0.10	20	2.8	0.21	0.05	0.01
(0.07—0.12)	(19 —22)	(2.4 —3.2)	(0.18—0.24)	(0.03—0.08)	(ND—0.01)
0.19	80	2.6	0.79	0.03	0.01
(0.11—0.31)	(67 —98)	(1.2 —6.8)	(0.66—0.98)	(0.02—0.04)	(ND—0.01)
0.23	3.3	0.45	0.42	0.07	0.01
(0.12—0.43)	(1.6 —6.2)	(0.27—0.80)	(0.29—0.54)	(0.04—0.10)	(ND—0.01)
0.07	11	0.49	0.01	0.04	ND
(ND—0.13)	(7.2 —14)	(0.35—0.57)	(ND—0.01)	(0.01—0.06)	
0.09	2.9	0.29	0.33	0.04	ND
(ND—0.26)	(2.6 —3.1)	(0.22—0.32)	(0.29—0.36)	(0.01—0.07)	

い値であった．胃内容物は低い値であるにもかかわらず消化管でややブリに高い値が得られた．筋肉部では背白筋，筋血合筋ともに 0.21±0.06ppm で尾白筋の0.16±0.04ppm にくらべ若干高い値を示したが個体差はどの部位にも見られなかった．臓器は平均で0.15±0.07ppm であった．カツオでは筋肉部平均0.25ppm，臓器平均は 0.16±0.05ppm でブリとほぼ同レベルであった．この結果から非人為汚染地域での今回の 82—91cm のブリではこの程度の値がバックグラウンド値と思われる．

As, Zn, Cu, Mn As は肝臓，幽門垂，卵巣で平均 1.4—1.8ppm の値が得られた．これらの臓器では個体により 2—4 倍の差が見られた．背白筋は 0.72±0.08 ppm，筋血合筋は 1.1±0.14ppm であり個体差は見られなかった．甲殻類など[5,6]では As 含有量が 100ppm を越える値が見られるが，一般に多くの魚類可食部における As は 1ppm 前後である[5-7]．

Zn は他の元素にくらべ組織中に多く分布している．特に卵巣に最高 98ppm，平均で 80±10.6ppm の高い値が得られた．カツオでも卵巣は平均で 111±2.9ppm と高い値であった．ブリの臓器は 20—38ppm の平均した値が見られた．背白筋は5.6±0.30ppm，背血合筋は7.4±0.89ppm で筋肉部は内臓にくらべ比較的低値であり個体差はほとんど見られなかった．

Cu は肝臓に 16±2.8ppm と他の部位にくらべ高い値で強い肝親和性が見られた．ついで背血合筋に 5.0±0.44ppm と背白筋の約 14 倍の高い値が得られた．これは血合筋が生理的には肝臓に似た機能を有する[8]ためと思われる．カツオでも肝臓の 15±6.8ppm，背血合筋の 6.1±0.69ppm はブリの Cu 含有量と大差のない値を示している．また，各部位における著しい個体差は見られなかった．

Mn は肝臓で 0.80±0.26ppm の高い値が得られ Cu と同様，肝親和性を示した．卵巣および鰓もカツオと同じく若干高い値が得られた．筋肉部では Cu の場合と同

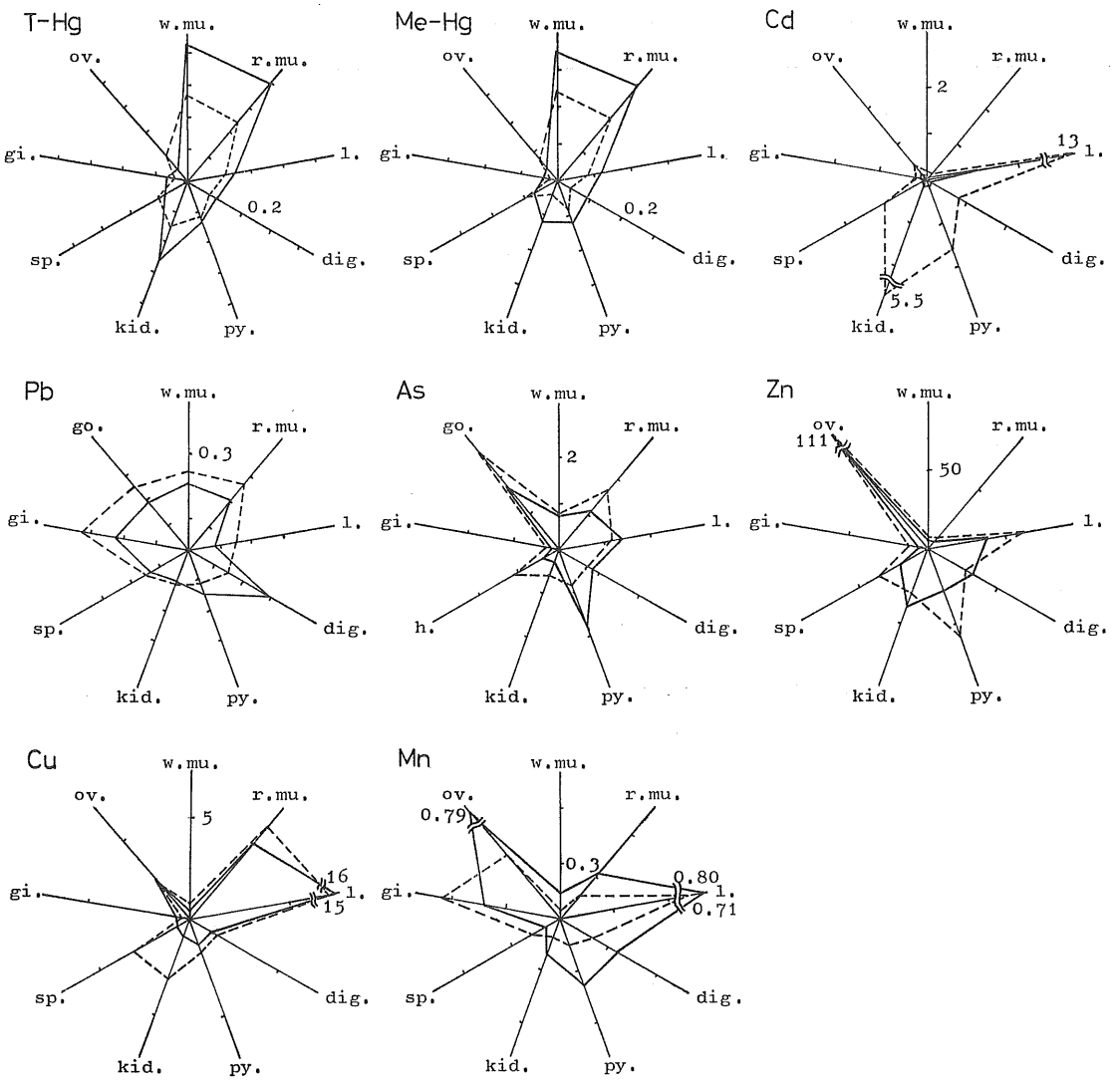


Fig. 1. Comparisons of the Distribution Maps of Metals in Yellowtail and Bonito

—— Yellowtail --- Bonito

w. mu. ; white muscle r. mu. ; red muscle l. ; liver

dig. ; digestive organs py. ; pyloric caecum kid. ; kidney

sp. ; spleen h. ; heart ov. ; ovary go. ; gonad gi. ; gill

様，背血合筋の Mn 含有量は背白筋にくらべ2.5倍高い値を示した．いずれの部位でも個体による差は見られなかった．

一般的に，魚類における As, Zn, Cu, Mn の蓄積は Cross[9]，Tong ら[10]の報告にもあるように Hg などとは違い魚体重相関あるいは魚齢相関はないようであり，著者ら[11]の分析したブリの若年魚であるイナダ，ワラサでも同様の傾向であった．また，今回の 82—91cm のブリでは個体差はあまり見られず，カツオの蓄積パターンとの比較でも著しい差があるとは言えないことから，As, Zn, Cu, Mn のこれらの値は，Hg, Pb などと同様，非人為汚染地域のブリのバックグラウンド値と考えてよい．

Co, Cr ブリ体内での Co, Cr はカツオ体内での結

果同様，含有量の低い元素であった．Co はどの部位においても 0.1ppm を越えるものは見られず，また，Cr 含有量はすべての部位で平均 0.02ppm 以下と非常に低い値が得られた．

ま と め

体長 82—91cm，体重 9.0—11.4kg（6年魚）のブリ8尾について重金属およびヒ素の体内蓄積分布調査を行ない次の結果が得られた．

1) Hg は8尾のうち半数が規制値（T-Hg 0.4ppm, Me-Hg 0.3ppm）を越える値を示した．尾白筋の Hg は背白筋にくらべ30%ほど高い傾向を示した．

2) Cd は最高の含有量を示した肝臓で 1ppm 程度の値が得られたが，カツオにくらべると背白筋で 1/4，内臓で1/11—1/28という著しい低値であった．

3) Pb, As, Zn, Cu, Mn の蓄積パターンおよび含有レベルはカツオとくらべ大差が見られなかった．Co, Cr は体内分布の非常に低い元素であった．

4) Cd 以外の元素は非人為汚染地域のブリのバックグラウンド値と考えてよい．

文 献

1) 勝木康隆，安田和男，上田 工，木村康夫：東京衛研年報，**25**，257，1974
2) 勝木康隆，安田和男，上田 工，木村康夫：*ibid.*，**26**-1，196，1975
3) 石崎有信：公衆衛生，**39**，340，1975
4) 石崎有信，福島匡昭，坂本倫子：日衛誌，**25**，207，1970
5) LeBlanc, P.J. and A.L. Jackson : *Mar. Pollut. Bull.*, **4**, 88, 1973
6) 山田幸彦：食品中の微量元素，第2版，11，日本食品衛生協会，1970
7) 池辺克彦，田中之雄，田中涼一，国田信治：食衛誌，**18**，86，1977
8) 松原喜代松，落合 明，岩井 保：魚類学(上)，第3版，43，1974，恒星社厚生閣
9) Cross, F. A., L. H. Hardy, N. Y. Jones, and R. T. Barber : *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 1287, 1973
10) Tong, S. S. C., W. D. Youngs, W. H. Gutenmann, and D. J. Lisk : *ibid.*, **31**, 238, 1974
11) 未発表資料

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 182—189, 1978

魚介類への微量元素の蓄積挙動の研究（第5報）　甲殻類中の微量元素

嶋村保洋*, 田村行弘*, 真木俊夫*
西垣　進*, 直井家壽太*

Studies on Behaviour of Accumulation of Trace Elements in Fish (V) Trace Elements in Crustacea

YASUHIRO SHIMAMURA*, YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*, SUSUMU NISHIGAKI* and YASUTA NAOI*

緒　言

近年生体における微量元素の相互作用についての研究が進められている．ラットに対して少量投与したのち，同種元素を致死量投与した場合の死亡率の低減[1,2]，あるいは水銀に対するセレンのように他の元素投与による毒性の緩和[3-7]など，元素相互の作用について興味ある知見が報告されている．

実際にわれわれが食物を摂取する場合には，同時に存在する多種類の元素とともに複合的に生体にとり込まれている．そこで食品中の元素含有量を総合的に調べ，これら元素の毒物学的，栄養学的な評価をしていく必要がある．また魚介類における人為的な元素汚染の有無を知るためには，その元素のバックグランドが明らかでないと十分な評価ができない．このような観点にもとづき筆者らは，魚介類中の微量元素の蓄積挙動を調べ，安全性評価に役立てるため調査をおこなってきた．現在までに海産魚や淡水魚についてセレン，水銀をはじめとして数種の元素含有量の調査を実施し報告[8,9]した．今回は甲殻類の Se, Hg, As, Cd, Cu, Zn, Cr, Co, Mn 含有量測定結果について報告する．

材料および分析法

1.　試料

1977年秋から冬にかけて，東京都築地中央卸売市場に入荷したものについて，なるべく別産地で体重差がかなりあるものを選び，魚獲地が明確で加熱処理のしてない生のものを採取した．試料はカニ類5種23検体，エビ類8種50検体について分析をおこなった．

カニ類は筋肉，内臓に分け，さらに筋肉についてはできるだけ身肉と脚肉に分け試料とした．またエビ類は筋肉と内臓に分け，一部小さなものについては殻を除いた可食部を数匹分プールして分析に供した．

2.　分析法[10-12]

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による蛍光光度法で分析した．

総水銀：エタノールを分解促進剤とし，硫硝酸で分解後，還元気化注入法によるフレームレス原子吸光法で分析した．

ひ素：硝酸マグネシウムを加え，乾式灰化後，還元し原子吸光法で分析した．

カドミウム，鉛，銅，亜鉛，クロム，コバルト，マンガン：乾式灰化後 DDTC キレートとし，MIBK 抽出後原子吸光法で測定した．

結果および考察

1.　各元素含有量の検討

エビ類およびカニ類における各元素の濃度をそれぞれ表1，表2に示した．分析値はすべて wet base であらわした．

1)　水銀

今回調査した甲殻類の筋肉中水銀レベルは，Tr—0.2 ppm でほとんどが 0.1ppm 以下と低かった．特に高濃度蓄積があるため魚介類の水銀暫定基準から除外されているベニズワイ（体重約 600 g）にも，暫定基準を越えるものはなかった．

常盤産のズワイは体重 2kg と北陸産，新潟産の 150—800 g にくらべ大きいにもかかわらず，水銀蓄積は1/5と低く，地域差がみられた．同様に磐城産のケガニは，網

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. エ　ビ　の　元　素　濃　度

				体重 (g)	体長 (cm)	Se	Hg	As	Cd	Pb	Cu	Zn	Cr	Co	Mn
アマエビ	北海道	余市	筋肉	22.9*	16.9*	0.06	0.22	10.6	0.27	ND	2.9	9.5	Tr	Tr	0.29
	北海道	留萌	1 筋肉	12.1*	11.5～12	0.12	0.09	5.6	Tr	ND	3.7	10.6	Tr	Tr	0.39
			2 筋肉	10.0*	10～11	0.13	0.07	4.4	Tr	ND	4.0	11.0	Tr	Tr	0.31
			(1～2) 内臓			(1.10)	(0.07)	(16.6)							
	北海道	森	1 筋肉	9.6*	10～12	0.13	0.04	7.8	Tr	Tr	4.6	11.1	Tr	Tr	0.30
			2 筋肉	6.6*		0.11	0.03	2.6	ND	ND	3.6	10.1	Tr	Tr	0.24
			(1～2) 内臓			(1.05)	(0.09)	(7.0)							
	北海道	余市	筋肉	8.3*	10～12	0.10	0.06	3.2	0.18	ND	2.4	8.0	Tr	Tr	0.25
			内臓			(0.93)	(0.08)	(9.0)	(2.68	(Tr)	(29.5)	(12.9)	(1.50)	(Tr)	(0.66)
カワエビ	霞ケ浦		1 可食部	4.3*	6～8	0.41	0.01	0.3	Tr	Tr	7.6	16.9	Tr	Tr	0.81
			2 可食部	2.1*	5～6	0.36	Tr	0.3	ND	ND	6.3	21.8	Tr	ND	0.64
			3 可食部	1.4*	4～5	0.30	Tr	0.3	ND	ND	5.4	16.3	Tr	ND	0.54
シバエビ	熊本		可食部	6.9*	10～12.5	0.10	0.02	1.2	ND	Tr	3.9	12.3	Tr	Tr	0.68
テナガエビ	御前崎		1 筋肉♀	134	20	0.35	0.19	4.5	0.61	Tr	10.7	13.8	Tr	Tr	0.58
			2 筋肉♀	121	20	0.22	0.10	5.3	0.33	Tr	12.0	13.1	Tr	Tr	1.21
			3 筋肉	89	17	0.26	0.07	4.7	0.19	Tr	8.3	13.9	Tr	Tr	0.76
			4 筋肉♀	87	17	0.26	0.10	3.1	0.53	Tr	19.0	14.0	Tr	Tr	1.52
			(1～2) 内臓			(1.83)	(0.05)	(10.2)	(19.6)	(Tr)	(304)	(41.5)	(0.53)	(Tr)	(2.38)
			1 筋肉	76	17	0.22	0.09	2.3	0.20	ND	7.8	12.2	Tr	Tr	1.54
			2 筋肉	64	15	0.27	0.06	2.4	0.31	ND	7.4	17.1	Tr	Tr	1.30
			3 筋肉♀	62	14.5	0.35	0.05	3.5	0.47	ND	24.2	14.5	Tr	Tr	2.34
			4 筋肉	49	13	0.31	0.05	2.8	0.26	Tr	10.4	14.6	Tr	0.15	0.72
			5 筋肉	39	12.5	0.54	0.04								
			6, 7 筋肉	39, 37	12.5, 12	0.45	0.04	4.0	0.15	ND	12.4	12.3	Tr	Tr	0.80
			(1～7) 内臓			(0.67)	(0.05)	(5.2)	(4.77)	(Tr)	(235)	(10.8)	(0.47)	(Tr)	(2.53)
クルマエビ	台湾		1 筋肉	127	27	0.21	0.08	6.5	0.51	ND	10.1	15.1	Tr	Tr	0.14
			2 筋肉	88	24	0.27	0.09	13.3	0.53	Tr	19.0	19.6	Tr	0.43	0.13
			3 筋肉	79	23	0.20	0.06	6.0	0.30	Tr	10.9	18.5	Tr	Tr	0.12

				体重 (g)	体長 (cm)	Se	Hg	As	Cd	Pb	Cu	Zn	Cr	Co	Mn
クルマエビ (つづき)	台湾	4	筋肉	44	19	0.27	0.09	10.7	0.37	Tr	11.0	17.1	Tr	Tr	0.15
		5	筋肉	39	19	0.24	0.13	23.0	0.32	Tr	13.1	16.8	Tr	Tr	0.12
		(1)	内臓			(2.26)	(0.09)	(42.8)	(14.4)	(Tr)	(258)	(30.5)	(0.59)	(0.39)	(1.54)
		(2～5)	内臓			(4.13)	(0.11)	(28.9)	(11.2)	(0.14)	(177)	(79.8)	(0.55)	(1.68)	(1.15)
	オーストラリア	1	筋肉	37	18	0.28	0.01	2.1	1.26	Tr	5.6	26.1	Tr	Tr	0.33
		2	筋肉	32	17.5	0.29	0.02	5.5	0.37	ND	7.7	22.6	Tr	ND	0.06
		(1, 2)	内臓			(1.39)									
	島原	1	筋肉	47.8*	19	0.20	0.03	4.2	ND	ND	6.3	16.6	Tr	Tr	0.26
		2	筋肉	34.5*	17.5	0.34	0.03	3.8	0.03	ND	5.3	16.0	Tr	Tr	0.21
		(1, 2)	内臓			(2.60)	(0.06)	(5.1)	(1.63)	(Tr)	(162)	(43.1)	(2.83)	(0.38)	(8.41)
	沖縄		筋肉	13.8*	13.3*	0.19	0.04	0.2	Tr	Tr	6.0	16.6	Tr	Tr	0.21
	広島		筋肉	13.6*	13.6*	0.25	0.03	0.3	Tr	Tr	8.4	14.7	Tr	Tr	0.21
イセエビ		1	筋肉	223	21	0.12	0.07	18.6	0.11	0.26	16.7	21.0	Tr	Tr	0.46
		2	筋肉	226	21.5	0.12	0.05	17.6	0.05	ND	21.7	19.4	Tr	Tr	0.45
		(1, 2)	内臓			(4.07)	(0.03)	(21.8)	(6.20)	(Tr)	(122)	(19.1)	(1.31)	(0.39)	(1.39)
	香港	1	筋肉♀	258	22	0.15	0.10	24.4	ND	Tr	20.5	25.4	0.26	ND	0.16
		2	筋肉	100	16	0.26	0.03	21.3	ND	Tr	9.2	22.1	Tr	Tr	0.26
		(1, 2)	内臓			(5.45)	(0.04)	(21.6)	(10.9)	(Tr)	(120)	(24.5)	(0.25)	(0.45)	(1.41)
	長崎	1	筋肉	224	20	0.14	0.04	11.6	0.16	Tr	19.2	19.8	Tr	0.20	0.41
		2	筋肉	61	13	0.14	0.05	23.7	0.15	Tr	11.7	15.3	Tr	0.20	0.36
		3	筋肉	48	12	0.17	0.03	9.4	0.12	Tr	17.3	12.8	Tr	0.26	0.46
		4	筋肉	45	12	0.12	0.03		0.14	Tr	11.5	13.2	Tr	0.16	0.37
		(1～4)	内臓			(1.53)	(0.03)	(7.1)	(4.50)	(Tr)	(283)	(16.5)	(0.14)	(0.22)	(0.83)
タイショウエビ	長崎	1	筋肉	144	30	0.32	0.09	4.3	0.26	Tr	9.4	13.7	Tr	Tr	0.26
		2	筋肉	101	26	0.23	0.04	4.3	Tr	Tr	4.7	12.9	Tr	Tr	0.26
		3	筋肉	72	23	0.23	0.09	10.3	ND	ND	4.1	13.7	Tr	Tr	0.13
		4	筋肉	68	23.5	0.48	0.07	4.3	0.17	Tr	6.9	14.1	Tr	Tr	0.26
		(1)	内臓			(2.77)	(0.11)	(9.4)	(5.54)	(0.20)	(66.2)	(24.6)	(0.51)	(Tr)	(2.22)

		（2）内臓			(3.33)	(0.06)	(4.7)	(9.01)	(Tr)	(48.3)	(25.3)	(0.53)	(0.35)	(1.10)
		（3）内臓			(3.36)	(0.09)								
		（4）内臓			(1.69)	(0.06)								
シャコ	神奈川 生麦	1 筋肉	61	17.5	0.15	0.02	4.4	0.14	ND	14.8	24.5	0.23	Tr	1.13
		2 筋肉	35.2*	14	0.21	0.01	4.4	0.22	Tr	9.9	24.5	0.17	Tr	0.61
		3 筋肉	27.8*	13	0.33	0.02	3.5	0.14	ND	11.0	26.3	0.15	Tr	1.66
		4 筋肉	21.8*	12	0.26	0.01	2.4	0.13	ND	9.2	30.3	0.23	Tr	1.21
		5 筋肉	16.3*	11	0.32	0.01	1.9	0.21	Tr	10.2	27.5	0.40	0.34	0.62
		(1～5) 内臓			(0.44)	(0.01)	(2.4)	(0.39)	(Tr)	(14.1)	(16.6)	(0.30)	(0.22)	(1.13)

単位：ppm, wet base, *：平均値, ( )：内臓

表 2. カ ニ の 元 素 濃 度

品名	産地		体重 (g)	背甲幅×甲長 (cm)	Se	Hg	As	Cd	Pb	Cu	Zn	Cr	Co	Mn
ベニズワイ	小名浜	1 脚筋肉	621	13×12	0.36	0.09	13.5	0.18	Tr	5.8	19.5	Tr	0.23	0.19
		2 脚筋肉	600	13×12	0.33	0.14	18.3	0.28	Tr	8.1	22.8	Tr	0.27	0.19
		（1）内 臓			(2.43)	(0.07)	(10.4)	(6.65)	(Tr)	(28.1)	(7.2)	(0.16)	(0.39)	(0.36)
		（2）内 臓			(2.21)	(0.08)	(13.8)	(15.2)	(Tr)	(112)	(13.5)	(0.19)	(0.31)	(0.51)
ズワイ	常磐	1 脚筋肉	2055	19×17	0.30	0.03	6.8	0.19	ND	2.7	23.7	Tr	0.20	0.13
		2 脚筋肉	800	14×12	0.45	0.03	12.1	0.23	ND	8.7	37.8	Tr	0.21	0.18
		（1）内 臓			(1.28)	(0.02)	(5.0)							
		（2）内 臓			(2.00)	(0.04)	(14.4)	(1.48)	(Tr)	(21.4)	(11.9)	(0.06)	(0.26)	(0.63)
	北陸	1 脚筋肉♂	780	13×13	0.37	0.11	13.4	0.56	Tr	4.4	24.6	Tr	0.32	0.28
		2 脚筋肉♂	580	12×12	0.90	0.10	15.1	0.60	ND	5.0	25.6	Tr	0.23	0.11
		3 脚筋肉♂	500	11×11	0.42	0.17	16.2	0.46	ND	5.4	34.3	Tr	0.22	0.35
		（1）内 臓			(1.37)	(0.07)	(1.9)	(11.7)	(Tr)	(6.3)	(11.8)	(0.13)	(0.51)	(0.54)
		（2）内 臓			(1.61)	(0.08)	(2.7)	(8.64)	(Tr)	(7.2)	(12.5)	(0.23)	(0.49)	(0.51)
		（3）内 臓			(1.43)	(0.07)	(2.6)	(16.3)	(Tr)	(15.1)	(15.0)	(Tr)	(0.51)	(0.39)
	新潟	1 脚筋肉♂	638	14×13	0.87	0.09	22.0	0.10	ND	4.2	30.0	Tr	0.25	0.27
		2 脚筋肉♂	194	8×8	0.51	0.06	20.6	0.09	Tr	2.3	19.0	Tr	Tr	0.14
		3 脚筋肉♂	164	8×8	0.73	0.07	20.1	0.12	0.38	1.5	15.6	Tr	0.23	0.22

品名	産地			体重 (g)	背甲幅×甲長 (cm)	Se	Hg	As	Cd	Pb	Cu	Zn	Cr	Co	Mn
ズワイ	新潟	(1)	内臓			(4.83)	(0.19)	(15.2)	(0.93)	(Tr)	(45.9)	(21.9)	(Tr)	(0.35)	(1.88)
(つづき)		(2, 3)	内臓			(4.79)	(0.16)	(28.2)	(0.31)	(0.17)	(62.0)	(9.3)	(0.31)	(0.58)	(0.60)
ケガニ	磐城	1	脚筋肉♂	647	10×11	0.23	0.02	1.6	0.09	Tr	8.0	37.5	0.17	0.18	0.20
		2	脚筋肉♂	351	8×10	0.29	0.02	1.9	0.01	0.31	5.7	35.7	Tr	0.18	0.30
		(1)	内臓			(2.31)	(0.03)	(7.6)	(4.93)	(Tr)	(18.6)	(34.0)	(Tr)	(0.29)	(0.80)
		(2)	内臓			(1.50)	(0.03)	(5.7)	(3.99)	(Tr)	(13.8)	(24.5)	(Tr)	(0.37)	(0.96)
	網走	1	脚筋肉♂	380	9×9	0.28	0.09	15.9	0.09	0.24	6.2	36.9	Tr	0.24	0.38
		2	脚筋肉♂	289	8×9	0.23	0.08	11.7	0.09	0.36	4.9	26.4	Tr	0.18	0.29
		(1)	内臓			(2.39)	(0.08)	(5.5)	(5.35)	(Tr)	(23.6)	(26.2)	(0.26)	(0.38)	(0.70)
		(2)	内臓			(1.57)	(0.06)	(5.9)	(2.82)	(Tr)	(15.5)	(14.3)	(0.11)	(0.36)	(0.81)
ガザミ	香港	1	身筋肉♀	232	17×8	1.05	0.03	4.8	1.71	ND	7.7	43.1	Tr	0.38	1.35
		2	身筋肉♀	126	13×7	1.28	0.04	8.2	1.22	Tr	17.4	37.5	Tr	0.24	0.53
		3	身筋肉♂	83	12×6	1.17	0.05	8.1	0.88	0.32	9.6	28.2	Tr	0.32	1.02
		(1)	内臓			(2.67)	(0.02)	(3.4)	(3.90)	(0.12)	(22.1)	(55.2)	(0.11)	(0.36)	(2.84)
		(2)	内臓			(2.27)	(0.03)	(5.6)	(6.39)	(Tr)	(46.5)	(50.4)	(0.07)	(0.33)	(2.60)
		(3)	内臓				(0.02)								
	千葉	1	身筋肉♀	167	15×8	1.12	0.03	8.6	1.11	Tr	12.1	39.9	Tr	Tr	0.95
	東隅	2	身筋肉♂	162	14×7	0.29	0.08	2.9	0.32	Tr	7.4	30.2	Tr	Tr	0.41
		3	身筋肉♂	151	14×7	0.91	0.08	4.9	0.27	Tr	5.9	35.1	Tr	0.26	0.55
		4	身筋肉♂	130	14×7	0.40	0.07	4.1	0.38	Tr	11.3	38.7	Tr	0.21	0.62
		5	身筋肉♀	117	14×7	1.13	0.05	8.2	0.93	Tr	15.5	32.4	Tr	Tr	0.63
		(1, 5)	内臓♀			(2.29)	(0.05)	(4.5)	(14.6)	(Tr)	(69.5)	(56.3)	(0.11)	(0.49)	(1.22)
		(2~4)	内臓♂			(0.70)	(0.03)	(2.4)	(3.39)	(Tr)	(25.9)	(18.4)	(0.07)	(0.16)	(0.77)
サワガニ			鋏脚筋肉	2.5*	2.1×1.8	0.12	0.18								
			全体		1.8×1.5	0.22	0.08	0.1	0.28	Tr	19.6	16.3	Tr	0.23	3.40
イバラガニモドキ	相模湾		脚筋肉♀	4380	21×21	0.18	0.02	22.9	0.20	Tr	15.1	33.1	0.14	0.19	0.38
			内臓			(1.00)	(0.39)	(5.7)	(1.22)	(Tr)	(25.7)	(12.2)	(0.17)	(Tr)	(1.88)

単位：ppm, wet base, *：平均値, ( )：内臓

走産よりも体重が1—2倍大きいにもかかわらず，水銀濃度は筋肉，内臓ともに磐城産の方が低く約1/4であった．また台湾産クルマエビは長崎，広島，沖縄，オーストラリア四産地のものにくらべ，相対的に水銀蓄積量が多く，さらにひ素，カドミウム，銅にも同様の傾向がみられ，地域差がみとめられた．

大部分のエビ，カニ類では，水銀蓄積と体重の増加とに相関はみられなかった．しかしアマエビの場合は相関が認められるが，例数の少ないことおよび水銀蓄積量が低いため断定はむずかしい．

2) セレン

筋肉中セレン濃度はエビで0.24±0.11ppm，カニで0.63±0.36ppm とカニの方が高かった．またエビ，カニともに数値に幅がみられたが，体重増加にともなう上昇や地域差もみられず，各種類別では表3に示したように定常値を示した．先の調査でマグロ[8]，一般沿岸魚[13]，淡水魚[9]にセレン蓄積の差がみられたが，このように種類によって定常値に差があるのは，セレンは必須元素であるため魚介類の種類によって生理的要求量が異なるためと思われる．

3) ひ素

一般に甲殻類では 10ppm から 170ppm と高いことが知られている[14,15]が，今回の調査では著しく高いものはなく，ほとんどが 10ppm 以下であった．また種類によってかなりの幅があり，淡水産のものはやや低い傾向があり，さらにイセエビでは一部に 20ppm を越えるものもあり，他の甲殻類よりも高い傾向がみられた．

磐城産のケガニは，網走産よりも体重が1—2倍大きいにもかかわらず，筋肉中ひ素濃度は磐城産の方が低く約1/10であった．またクルマエビにも地域差がみられ，台湾産の方が高い傾向がみられた．このようなケガニ，クルマエビの地域差は水銀にもみられ，環境濃度の影響が考えられる．

体重増加にともなうひ素の蓄積はすべてのエビ，カニ類に認められなかった．

4) カドミウム

筋肉ではエビ ND—1.3ppm，カニ Tr—1.7ppm，内臓ではエビ 0.39—19.6ppm，カニ 0.31—16.3ppm とかなり幅がみられた．内臓のカドミウム濃度はかなり高かったが，甲殻類では内臓，特に肝臓で高く，石崎ら[16]はケガニで 13.0ppm を報告している．

なお余市産アマエビのカドミウム量(0.18, 0.27ppm)は石崎ら[16]の報告した富山，石川，福井地方のアマエビのカドミウム量 (0.025—0.045ppm) と比較すると著しく高い値であった．この理由は生息海域の相異が原因とも推定されるが，同じ北海道でも留萌，森産アマエビからはカドミウムがほとんど検出されなかったことも考え合わせ原因の解明について今後検討を進める必要がある．

表 3. エビ，カニ類の種類別セレン濃度の平均値と標準偏差

	平均±標準偏差
イセエビ	0.15±0.05
タイショウエビ	0.31±0.09
クルマエビ	0.24±0.05
アマエビ	0.11±0.03
テナガエビ	0.32±0.10
シャコ	0.25±0.08
ガザミ	0.92±0.37
ケガニ，ズワイ	0.44±0.22

5) 鉛

エビ，カニともに筋肉，内臓を含めて鉛の濃度は ND—0.33ppm と低く，特に地域差，種類による差，大きさとの相関などはみられなかった．

6) 銅

内臓ではかなり高く，イセエビ，クルマエビ，テナガエビの一部には 200ppm を越す銅が検出された．しかし甲殻類では，銅はヘモシアニンとして血液中に存在しており，さらに必須元素であるところから，このレベルは甲殻類の必要量と考えられ定常値とおもわれる．

7) 亜鉛

筋肉中亜鉛濃度はエビで 10ppm，カニで 20ppm 前後と一般沿岸魚[17]や淡水魚[9]よりも高く，エビでマグロ類[17]と同程度であり，カニではさらに高かった．しかし亜鉛は必須元素であることから生理的要求量と判断される．

8) マンガン，コバルト，クロム

筋肉中マンガンは 1ppm を越えたものは少なく，またコバルト，クロムも筋肉，内臓ともに低かった．

2. カニの身肉および脚肉における各元素の比較

ケガニ，ズワイの一部について身肉と脚肉とに分け，各元素の含有量を表4に示した．

カドミウムを除く各元素含有量は身肉と脚肉との間にいちじるしい差はみられなかった．カドミウムの含有量は身肉が脚肉にくらべ数倍高い値を示した．内臓中のカドミウム量は筋肉にくらべ高いが，試料調製の時に内臓の附着を充分注意して操作しているのでこの影響は考えられず，またセレン，銅などにはこのような差がみられないことから，カドミウムでは身肉と脚肉中の含有量に明らかな差があるものと推定される．

表4. カニの部位別元素濃度

品名	産地	体重 (g)	背甲幅×甲長 (cm)	部位	Se	Hg	As	Cd	Pb	Cu	Zn	Cr	Co	Mn
ズワイ	常盤	2055	19×17	身肉	0.26	0.02	4.4	0.53	0.14	4.0	24.6	Tr	0.20	0.01
				左鋏脚前節筋肉	0.20	0.02	4.0	0.10	Tr	3.2	35.1	Tr	0.14	0.13
				右鋏脚前節筋肉	0.31	0.02	5.3	0.08	0.15	3.1	37.2	Tr	0.15	0.13
				左右鋏脚長節筋肉	0.23	0.02	4.5	0.10	0.21	1.8	37.5	Tr	0.17	0.10
				歩脚筋肉	0.30	0.03	6.8	0.19	ND	2.7	23.7	Tr	0.20	0.13
				内臓	1.28	0.02	5.0							
		800	14×12	身肉	0.40	0.04	7.8	0.42	Tr	6.6	32.7	Tr	0.23	0.29
				鋏脚筋肉	0.45	0.03	12.1	0.23	ND	8.7	37.8	Tr	0.21	0.18
				内臓	2.00	0.04	14.4	1.48	Tr	21.4	11.9	0.06	0.26	0.63
ケガニ	網走	380	8.5×8.5	身肉	0.30	0.09	12.8	0.31	Tr	7.9	31.2	Tr	Tr	0.28
				歩脚筋肉	0.28	0.09	15.9	0.09	0.24	6.2	36.9	Tr	0.24	0.38
				内臓	2.39	0.08	5.5	5.35	Tr	23.6	26.2	0.26	0.38	0.70
		289	7.7×8.5	身肉	0.28	0.10	10.5	0.28	Tr	5.3	37.8	Tr	0.23	0.30
				歩脚筋肉	0.23	0.08	11.7	0.09	0.36	4.9	26.4	Tr	0.18	0.29
				内臓	1.57	0.06	5.9	2.82	Tr	15.5	14.3	0.11	0.36	0.81

単位：ppm, wet base

まとめ

1. 筋肉，内臓ともに水銀濃度は低く，ほとんどが0.1ppm 以下であった．

2. 筋肉中セレン濃度はエビ，カニともに幅がみられたが各種類別にみると定常値であった．

3. ズワイの水銀，ケガニの水銀，ひ素，クルマエビの水銀，ひ素，カドミウム，銅にそれぞれ地域差がみられた．

4. すべてのエビ，カニ類で今回調査した元素に体重との相関はみられなかった．

5. 水銀を除く各元素の内臓における蓄積量は筋肉より高い傾向がみられた．

6. カニの身肉と脚肉中のカドミウム含有量をくらべると，身肉に著しく多く特徴的な傾向であった．

文献

1) Yoshikawa, H.: *Ind. Health*, **8**, 184, 1970
2) Yoshikawa, H.: *Ind. Health*, **12**, 175, 1974
3) Ganther, H. E., C. Goudie, M.L. Sunde, *et al.*: *Science*, **175**, 1122, 1972
4) Stillings, B.: *Nutr. Reviews*, **31**, 27, 1973
5) Iwata, H., H. Okamoto, and Y. Ohsawa: *Res. Communi. in Chem. Pathology and Pharmacology*, **5**, 673, 1973
6) Stoewsand, G. S., C. A. Bache, and D.G. Lisk: *Bull. Env. Contami. Toxicol.*, **11**, 152, 1974
7) Potter, S. and G. Matrone: *J. Nutr.*, **104**, 638, 1974
8) 田村行弘，真木俊夫，山田　洋ほか：東京衛研年報，**26**-1，200，1975
9) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫ほか：東京衛研年報，**28**-1，140，1977
10) 田村行弘，真木俊夫ほか：水銀とセレン，64，1977，篠原出版
11) Yamamoto, Y., T. Kumamura, Y. Hayashi, and T. Kodama: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **46**, 2604, 1973
12) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫ほか：東京衛研年報，**24**，231，1972
13) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫ほか：東京衛研年報，**25**，235，1974
14) LeBlanc, P. J. and A. L. Jackson: *Mar. Pollut. Bull.*, **4**, 88, 1973
15) Underwood, E. J.: 微量元素，267，1975，丸善
16) 石崎有信，福島匡昭，坂元倫子：日衛誌，**25**，207，1970
17) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫ほか：東京衛研年報，**25**，241，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 190—192, 1978

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）酸化成績体 3,5-3',5'-tetra-*t*-Butylstilbene-4-4'-Quinone の合成とその突然変異誘起性

堀井昭三*, 山岸達典*, 松本昌雄*, 村上一*

Synthesis of 3,5-3',5'-tetra-*t*-Butylstilbene-4, 4'-Quinone from Butylated Hydroxytoluene (BHT) and its Mutagenicity

SHOZO HORII*, TATSUNORI YAMAGISHI*, MASAO MATSUMOTO* and HAJIME MURAKAMI*

緒　言

3, 5-di-*t*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) は油脂，魚介加工品などの食品や，ポリオレフィン，ゴムなどの工業製品に酸化防止剤として広範囲に利用されている．食品やポリオレフィンに添加されたBHTは酸化されて，いくつかの酸化成績体を生成するが，なかでも，3,5-3',5'-tetra-*t*-butylstilbene-4,4'-quinone（以下 SQ と略す）はその代表的なものである[1,2]．BHT 自身の毒性や分析法などについては，多数報告されているが，その酸化成績体や代謝物[3-5]についての報告例は極めて少ない．しかも，SQ の報告例は製法[6-9]や性質[10]に限られており，SQ の生物への影響や突然変異誘起性などに関する研究報告例はみあたらない．そこで著者らは Cook ら[8]の方法により SQ を合成して，同定，確認した上，Ames ら[11]の方法により，その突然変異誘起性について検討した．

材料および方法

1. **使用菌株** *Salmonella typhimurium* TA-98 および TA-100 の2種類を用いた．なお，これらの菌株のR因子および deep rough の確認は，アンピシリン（武田薬品㈱）抵抗性とクリスタルバイオレットの感受性で観察した．

2. **培地** Bacto-Nutrient Broth は Difco 製のものを使用した．また，最少グルコースアガー培地とソフトアガーは矢作[12]の方法に従って調製した．

3. **S-9 Mix** 局方大豆油に溶解したポリ塩化ビフェニール（PCB KC 500, 鐘ケ淵化学㈱）を SD 系雄性成熟ラット（200～250g）に体重 1kg あたり 500mg の割合で投与した．投与後5日目にこれらのラットを殺し，肝臓を摘出した．次いで，肝臓は 150mM 塩化カリウム（KCl）溶液でかん流，洗浄後約3倍量の KCl 溶液を加え均質化した．これを 9000×*g*, 10分間遠心分離して得られた上清を S-9 分画とし，Ames ら[11]の方法により，S-9 Mix を調製した．

4. **突然変異誘起性試験方法** Ames ら[11]の方法に準拠した．すなわち，被検物質ジメチルスルホキシド（DMSO，和光純薬吸収スペクトル用）溶液 0.1m*l* および S-9 Mix 0.5m*l* と使用菌株の前培養液 0.1m*l* をそれぞれ混合し，37° 20分間培養し，これに 45° に保温したソフトアガー 2m*l* を加えよく混合し，最少グルコースアガー培地に重層し，37° 48時間培養して復帰コロニーを計数した．

結果および考察

1. **SQ の合成** Cook ら[8]の方法に準拠した．すなわち，水酸化カリウム32gとフェリシアン化カリウム 150g を 300m*l* の水にとかしたものと，BHT 20g を 200m*l* のベンゼンにとかしたものとを，それぞれ 1,000m*l* 容の三頸フラスコに入れ，60° 24時間，攪拌しながら SQを合成した（収量 12.2g）．BHT から SQ への反応機構について考察すると，BHT はまずラジカル因子により，ラジカルを生じ，ラジカル間で二量化が行なわれ，さらに酸化されて SQ を生成したものと思われる．合成した SQ はエタノールより再結晶し融点を測定(310°)し，さらに IR, Mass スペクトルを測定した（Fig.1, 2）．すなわち，IR スペクトルは Bohn ら[10]と同一の吸収を示し，Mass スペクトルは構造上から推測されるパ

* 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

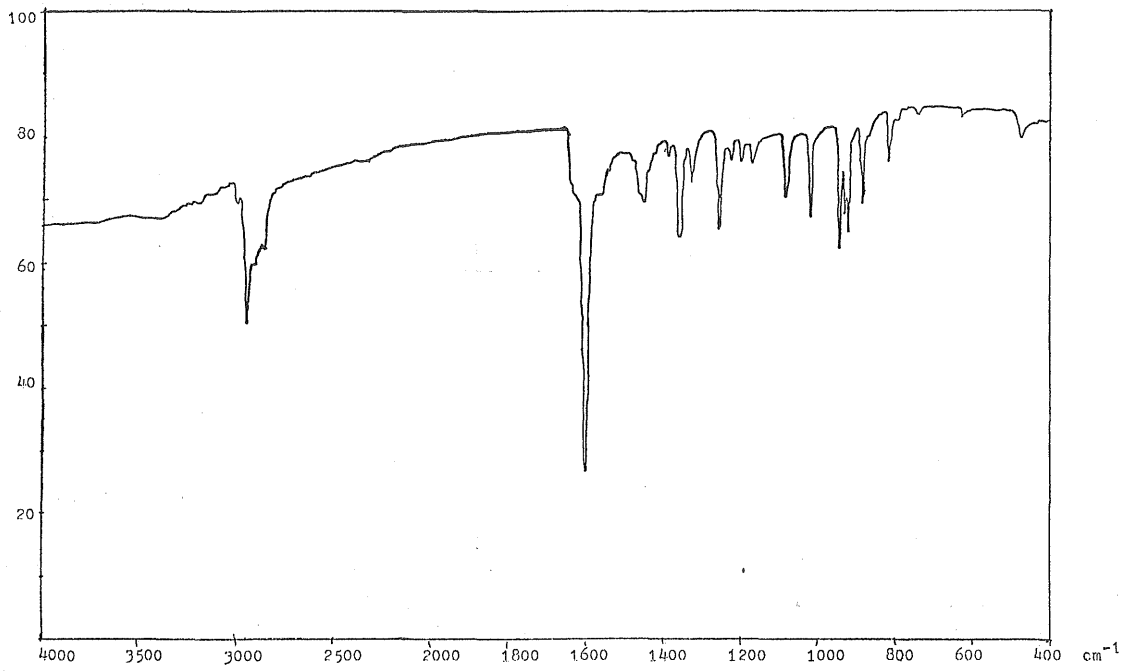


Fig. 1. IR Spectrum of SQ

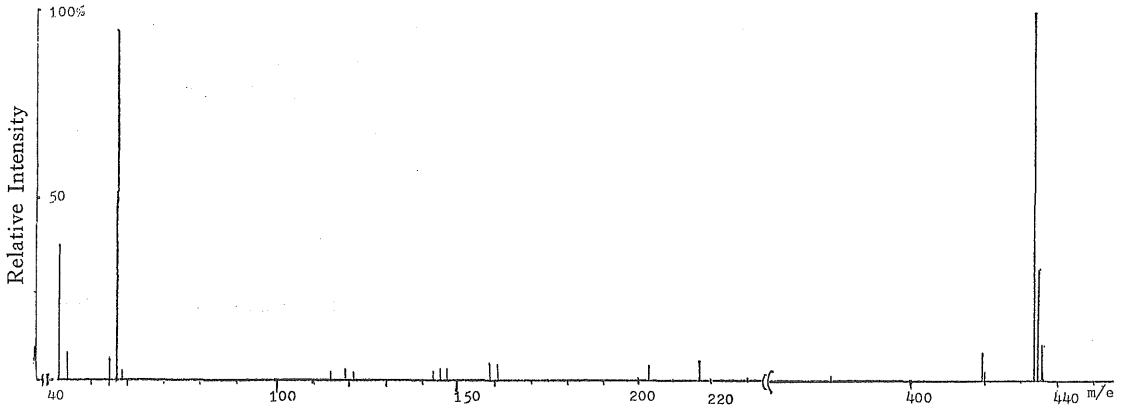


Fig. 2. Mass Spectrum of SQ

パターンを示した．以上の結果より合成品は SQ と同定した．

2. ***Mutagenesis test*** 結果は Table 1 に示した．なお，強力な発がん物質でかつ強い突然変異誘起性を示す benezo(a)pyrene (B(a)P 和光純薬，5μg/plate) に S-9 Mix を加えたものと，加えないものおよび2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリル酸アミド (AF_2 上野製薬，0.05μg/plate) を陽性対照として用いた．

TA-98 および TA-100 を用いた今回の実験では，SQ およびBHTの突然変異誘起性はそれぞれ，250μg/plate, 10μg/plate の濃度において認められなかった．

微生物による突然変異誘起性試験には *S. typhimurium* を使用する Ames らの方法の他に大腸菌，枯草菌などを使用する方法があるが，なかでも Ames らの方法は哺乳類の薬物代謝活性の系が組込まれているため，信頼性が高く，かつ多数の化学物質の突然変異原性を知

Table 1. Mutagenesis Test done by the Use of *S. typhimurium* TA-98 and TA-100 Strains

			SQ					BHT	AF_2	B(a)P
			0μg	0.5μg	5μg	50μg	250μg	10μg	0.05μg	5μg
TA—98	S—9	+	51	56	59	67	77	56	—	660
	S—9	−	37	24	33	26	15	20	289	20
TA—100	S—9	+	293	427	373	267	387	413	—	1493
	S—9	−	347	413	413	347	380	280	1680	400

Note: Figures in the table indicate the average number of the colonies appearing on triplicate plates.
— indicates the test was not done.

るための第一次スクリーニング法として，現在のところ，最も妥当な方法であろう．

SQ は4つの *t*-butyl 基を有しているが，*t*-butyl 基はバルキーなため，隣接の位置が立体障害により不活性となることから，生体内で代謝された場合，*t*-butyl 基が直接，酸化や抱合されるか，SQ が還元されて，1,2-bis-(3, 5-di-*t*-butyl-hydroxyphenyl) ethane に変化することなどが予測されるが，たとえ SQ が変化したとしても，今回の実験濃度から突然変異誘起性は認められなかった．

なお，BHT 以外の酸化防止剤，ブチルヒドロキシアニソール (BHA) やプロトカテキュ酸エチルなどの酸化成績体の存在も知られていることから，今後はそれらの物質の突然変異原性について検討したい．

要　約

BHT の酸化成績体 SQ を Cook らの方法により合成し，確認，同定の後，Ames らの方法で，*S. typhimurium* TA-98, TA-100 による *mutagenesis test* を実施したところ，250μg/plate の濃度において突然変異誘起性を示す成績は得られなかった．

文　献

1) 原納靖子，星野乙松，浮田忠之進：衛生化学，**13**, 197, 1967
2) 楠本一枝，馬場二夫，斉藤　穣：日本薬学会第97年会講演要旨集，p 133
3) 藤田　博，小嶋昭江，平賀興吾：東京衛研年報，**28**-2, 53, 1977
4) Akagi, M. and I. Aoki : *Chem. & Pharm. Bull.*, **10**, 101, 1962
5) Akagi, M. and I. Aoki : *ibid.*, **10**, 200, 1962
6) Yohe, G. R., D. R. Hill, J. E. Dunbar, and F. M. Shedt : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2688, 1953
7) Cosgrove, S. L. and W. A. Waters : *J. Chem. Soc.*, 381, 1951
8) Cook, C. D., N. G. Nash, and H. R. Flanagan: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1783, 1955
9) 藤崎辰次：日化誌，**77**, 727, 1956
10) Bohn, C. R. and T. W. Champbell : *J. Org. Chem.*, **22**, 458, 1957
11) Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamazaki, and F. D. Lee : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **70**, 2281, 1973
12) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**, 1178, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 193—198, 1978

食品中のグリチルリチン酸の分析法

冠　　政　光*, 西　島　基　弘*, 観　　公　子*
中　里　光　男*, 木　村　康　夫*, 直　井　家壽太*

Studies on Analysis of Glycyrrhizinic Acid in Foods

MASAMITSU KANMURI*, MOTOHIRO NISHIJIMA*, KIMIKO KAN*,
MITSUO NAKAZATO*, YASUO KIMURA* and YASUTA NAOI*

An analytical method was developed for the quantitative determination of glycyrrhizinic acid in foods. The procedure mainly consists of 6 steps ; 1) extraction with 3% NH_4OH, 2) clean up by polyamide column chromatography, 3) hydrolysis with 13% H_2SO_4 at temperature of boiling water, 4) extraction with hot chloroform, 5) methylation with diazomethane, and 6) gas chromatographic determination of the resultant glycyrrhetinic acid methyl ester. To determine the recovery rate, a small amount of glycyrrhizinic acid was intentionally incorporated into orange juice, soy sauce, soy bean paste (Miso), and pickles, and detection was made by the procedure. Consequently, it was found that 82-101% of glycyrrhizinic acid added into these foods was recovered by the procedure. When a total of 65 field samples, consisting of 8 orange juice, 8 soy sauce, 8 soy bean paste, and 41 pickles, was tested for the presence of glycyrrhizinic acid in the products, it was found that 24 (37%) of them had been containing 13-172ppm of glycyrrhizinic acid.

まえがき

グリチルリチン酸ナトリウムは，人工甘味料として醤油および味噌に添加が許可されているが，他面グリチルリチン酸は甘草抽出物の主成分であることから，天然添加物として広範囲の食品に使用される可能性がある．とくに近年，サッカリンが毒性的に疑義が持たれるにいたり，グリチルリチン酸の使用頻度がますます高まる可能性があると考えられる．しかし Conn ら[1]はグリチルリチン酸の中毒例としてアルドステロン症候様症状を報告しており，また，カナダ保健福祉省[2]は，初老の人および心臓，血管病または腎臓病患者に副作用を生じさせる可能性があると指摘している．これらのことから，天然抽出物としても無制限に食品に添加することは問題があり，将来，わが国におけるグリチルリチン酸の使用実態調査をおこなう必要性が生ずることも考えられる．すでに食品中に含まれるグリチルリチン酸の分析法は，加水分解生成物のグリチルレチン酸をトリメチルシリル化後，ガスクロマトグラフィーにより定量する方法が報告されているが[3,4]，その適用範囲は炭酸飲料に限られており，他の食品とくに固形食品については回収率が悪く，かつ，妨害物の影響を受けやすい等の難点を有している．

そこで著者らは，使用頻度の高いと思われる醤油，味噌および漬物類を中心にガスクロマトグラフィーによる試験法を検討した結果，グリチルリチン酸を加水分解して得たグリチルレチン酸をジアゾメタン・エーテル溶液でメチル化後，ガスクロマトグラフィーに付す方法により良好な結果を得たので報告する．

実験方法

1. 試料，試薬および装置

1) 試料

試料は，グリチルリチン酸の使用が予想される市販食

* 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

品として，清涼飲料水（8種類），味噌（8種類），醤油（8種類），漬物（41種類）を用いた．

2) 試薬

i）グリチルリチン酸標準溶液　グリチルリチン酸（東京化成社製）を氷酢酸により2回再結晶を繰り返して精製した標準品 100mg を少量のアンモニアおよび蒸留水で溶解して 100m*l* とし，その 20m*l* をとり，蒸留水を加え 100m*l* とした．本液 1m*l* はグリチルリチン酸 0.2mg を含有する．

ii）ジアゾメタン・エーテル溶液　N-メチル-N-ニトロソ-P-トルエンスルフォンアミド（東京化成社製）をエーテルに溶かし，25%水酸化カリウム・メタノール溶液を加え蒸留して調製した．

iii）カラムクロマトグラフィー用ポリアミド　ポリアミド(Woelm, ICN Pharmaceutcals 社製）を水，メタノールおよび1N 水酸化ナトリウムでよく洗浄し，さらに水で洗浄したものを用いた．なお，再生して使用する場合も同様の操作を行ない使用した．

iv）内部標準溶液　デヒドロコール酸(東京化成社製) 100mg をクロロホルムに溶かし，ジアゾメタン・エーテル溶液を加えて室温に30分間放置し，デヒドロコール酸をメチル化した後，溶媒を留去，残留物にクロロホルムを加え 100m*l* とした．

v）ろ紙　東洋濾紙 No 5C

他の試薬は，すべて和光純薬社製特級を用いた．

3) 装置

ガスクロマトグラフィー　島津製作所 GC-5A 型（FID）

ミキサー　Ultra-Turrax TP18-10 (IKA Weark 社製）

2. 試験溶液の調製

1) 液体試料　試料 25g を 200m*l* のビーカーに秤取し，水 75m*l* およびメタノール 30m*l* を加え，よく攪拌した後，希塩酸を用いて pH 2.0 に調製したものをクリーンアップ用試料とした．

2) 固体試料　固形試料および半流動状の試料にあっては，その50gをメスシリンダーに秤取し，3%アンモニア水を加えて全量を 200m*l* とした．その全量をホモジナイズした後，毎分 3,000 回転で10分間遠心分離を行ない，上澄液 100m*l* を正確に分取した．この上澄液にメタノール 30m*l* を加え，希塩酸を用いて pH を 2.0 に調製したものをクリーンアップ用試料とした．なお，pH を 2.0 に調製した際，沈澱や浮遊物が生じた場合は必要に応じて遠心分離し，上澄液をクリーンアップ用試料とした．

3. カラムクロマトグラフィー

あらかじめポリアミド 3g を水に懸濁し，湿式法で充塡した内径 1.5cm，長さ 30cm のカラムに，クリーンアップ用試料を負荷した．このカラムを40%メタノール溶液 50m*l* および水 100m*l* により洗浄した後，1%アンモニア水 70m*l* により溶出させた．

4. 加水分解

カラム溶出液を希硫酸で中和し，25%硫酸 80m*l* を加えた後，還流冷却管を付し，沸騰水浴上で1時間加水分解を行なった．室温まで放冷した後クロロホルム 100m*l* を加え，75° の水浴上で再度15分間還流を行ない，冷後，500m*l* の分液ロートに移して，クロロホルム層を分取し，水層はさらに 50m*l* のクロロホルムで抽出した．この抽出液を合せ，無水硫酸ナトリウムで一昼夜脱水後，ろ紙ろ過を行い，ろ液を約 2m*l* まで減圧濃縮してメチル化用の試料溶液とした．

5. メチル化

メチル化用試料溶液にジアゾメタン・エーテル溶液を加え，室温で15分間放置し，メチル化を行ない，減圧下で溶媒を留去し，残留物に内部標準溶液 1m*l* を加え，よく溶解したものを，ガスクロマトグラフィー用試験溶液とした．

6. ガスクロマトグラフィー

カラムは内径 3mm，長さ 1m のガラスカラムを使用し，充塡剤はガスクロームQ (60～80mesh) に 2%OV-17をコーティングしたものを用いた．測定条件は試料注入口温度および検出器温度310°，カラム温度295°，キャリアガス窒素 80m*l*/min で行ない，試料は 5μ*l* 注入した．

7. 検量線

グリチルリチン酸標準溶液2，4，6および 8m*l* をとり，蒸留水を加え 50m*l* とし，さらに25%硫酸 50m*l* を加えて1時間加水分解を行ない，以後の操作は試料と同様に処理して検量線を作成した．検量線は 0.4mg から 1.6mg の範囲で直線性を示した．

実験結果および考察

グリチルリチン酸はトリテルペノイド骨格を有するグリチルレチン酸と2分子のグルクロン酸よりなる配糖体であり，特異的な甘味を有し，甘味度は庶糖の約200倍と言われている．そこで微かに甘味を感ずる 10ppm から非常に甘いと感ずる 400ppm の範囲で食品に使用されている事を想定し試験法を検討した．

1. 食品中からの抽出

グリチルリチン酸が酸性配糖体であることに着目して，固形食品から抽出する場合1%アンモニア水を用い

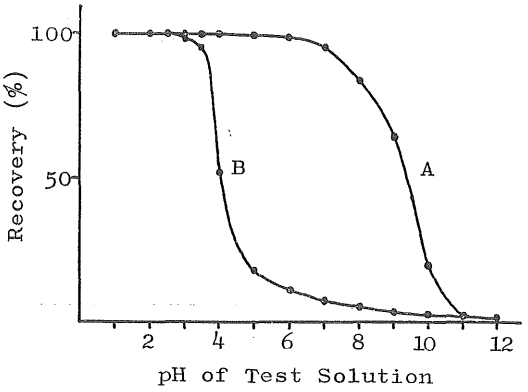


Fig. 1. Effect of pH on Ion Exchange of Glycyrrhizinic Acid by Column Chromatography
A : Glycyrrhizinic Acid
B : Glycyrrhizinic Acid + NaCl (2g)

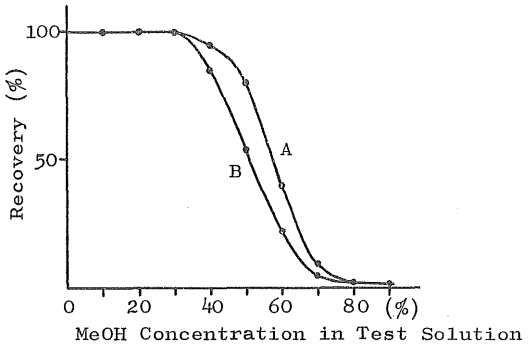


Fig. 2. Effect of MeOH Concentration on Ion Exchange of Glycyrrhizinic Acid by Column Chromatography
A : Glycyrrhizinic Acid
B : Glycyrrhizinic Acid + NaCl (2g)

て抽出した．抽出液はさらに，メタノール 30m*l* を加え pH を酸性にして夾雑物を除去することにより，良好な抽出率が得られると共に以後のカラムクロマトグラフィーの操作を容易にすることが出来た．

2. カラムクロマトグラフィー

イオン交換樹脂であるポリアミドカラムによる試料溶液のクリーンアップについては，試料溶液の pH およびメタノール含量，カラム洗浄溶液のメタノール含量および溶離液である1%アンモニア水の量の最適条件を検討した．

1) 試料抽出液の pH

グリチルリチン酸を pH 1.0 から pH 12.0 に調整した各溶液（塩酸-アンモニア水）に溶かし，ポリアミドカラムに負荷した後，1%アンモニア水により溶出させたときの回収率，すなわち各 pH におけるポリアミドカラムへのイオン交換率を検討した結果は Fig. 1 に示した通りであった．試料溶液にグリチルリチン酸のみを溶解した場合は pH 1.0～6.0 まではほぼ 100%回収されたが，pH 7.0 では96%と回収率が低下し，pH 11.0 以上ではほとんど回収されなかった．また，食品によっては塩化ナトリウムの影響を考慮する必要があるため，塩化ナトリウム 2g を添加した場合の回収率も検討した．pH1.0～2.5 ではほぼ 100%であったが，pH 3.0 では 95%，pH5.0 では18%と回収率が低下した．pH 3.0付近よりイオン交換率が低下しはじめたことにより塩化ナトリウムはグリチルリチン酸のイオン交換に対して大きな影響を与えることが判明した．これらのことから試料抽出液の pH は 2.0 付近と定めた．

2) 試料抽出液のメタノール含量

あらかじめ pH を 2.0 に調整した 0～90%メタノール溶液にグリチルリチン酸を溶解し，カラムクロマトグラフィーを行なった場合の回収率は Fig. 2 に示した通りであった．メタノール含量 0～30%の各濃度では，グリチルリチン酸はいずれもほぼ 100% 回収されたが，40%以上ではメタノール濃度の上昇と共に回収率は低下して，80%では全く回収されなかった．また塩化ナトリウムを添加した場合，メタノール濃度 0～30% ではほぼ 100% 回収され，グリチルリチン酸のポリアミドへの吸着に対し影響を及ぼさなかったが，40%以上においては塩化ナトリウム無添加に比べわずかに低下する傾向を示した．これらのことから試料抽出液のメタノール濃度は夾雑物を除去できる必要量も考慮し，25%付近とした．

3) カラム洗浄液のメタノール含量

グリチルリチン酸をポリアミドカラムに吸着させたのち，メタノール濃度を10%～90%まで変化させた各洗浄溶液 50m*l* をカラムに流したときの回収率は Fig. 3 に示した通りであり，10%～40%メタノール溶液ではグリチルリチン酸がほぼ 100%回収されたが，50%では 90%，60%では83%と低下し，80%になると全く回収されなかった．このことにより，カラム洗浄液は40%メタノール溶液を用いることにした．

4) カラム溶離液量

ポリアミドに吸着させたグリチルリチン酸を1%アンモニア水を用いて溶離したときの溶出率は Fig. 4 に示した通りであり，60m*l* 以上ではほぼ 100%の回収率が

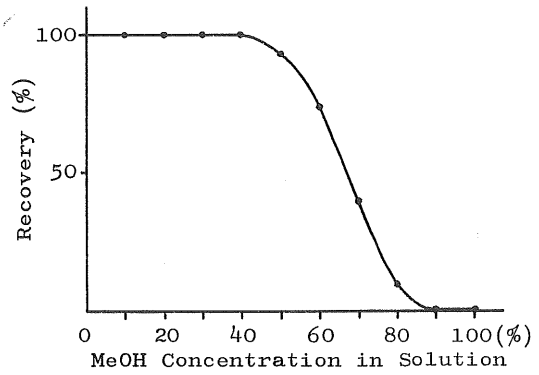


Fig. 3. Effect of MeOH Concentration in Solution on Ion Exchange of Glycyrrhizinic Acid by Column Chromatography

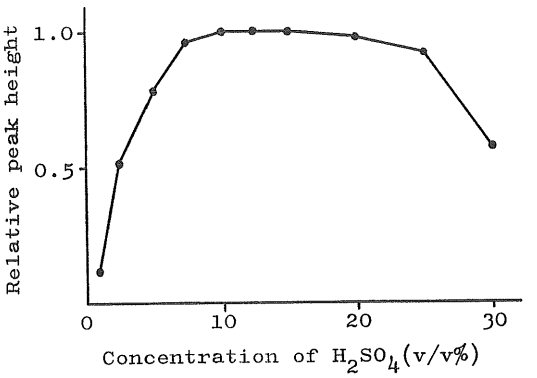


Fig. 5. Effect of H_2SO_4 Concentration of Hydrolysis of Glycyrrhizinic Acid

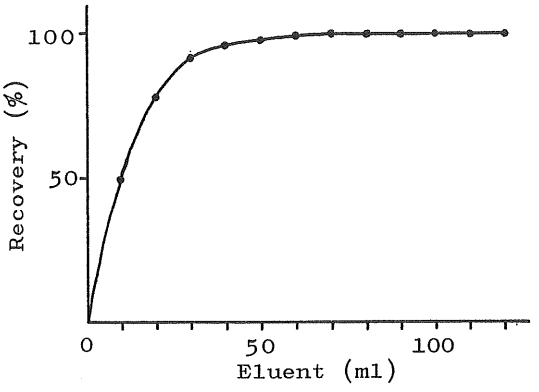


Fig. 4. Elution Curve of Glycyrrhizinic Acid by Use of 1% NH_4OH

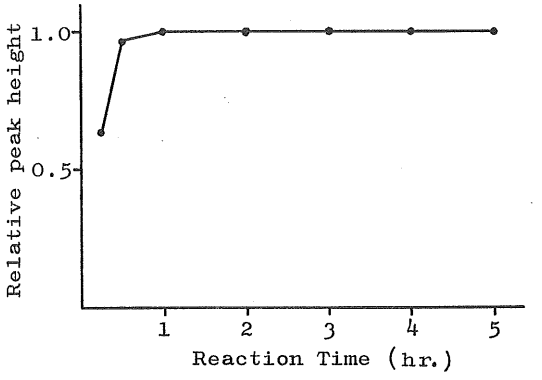


Fig. 6. Effect of Reaction Time on Hydrolysis of Glycyrrhizinic Acid

得られたことから，溶離液の量は70m*l*とした．

3. 加水分解

グリチルリチン酸は硫酸を加え沸騰水浴上で加温することにより加水分解されグリチルレチン酸を生成する．そこでこの硫酸濃度が加水分解率に与える影響について検討したところ Fig. 5 に示した通りであった．硫酸濃度が1%より高濃度になるに従い加水分解率は上昇し，10～15%で最高値に達した．しかし15%以上になると加水分解率は低下する傾向を示し，硫酸濃度20%以上ではガスクロマトグラムにグリチルリチン酸の分解物と思われるピークが認められた．これらのことから以後の実験は，25%硫酸を 80m*l* 加えグリチルリチン酸の加水分解に用いる硫酸濃度が13%付近となるようにした．また加水分解時間については Fig. 6 に示した通り，30分でほぼ加水分解率が最高に達し，5時間処理しても安定であるため加水分解時間は1時間とした．なお加水分解後，抽出残渣を再度加水分解した場合，2回目以後はグリチルレチン酸が検出されないことから一度の操作で加水分解は完了しているものと考える．次に加水分解率に与える妨害物の影響について検討を行なった．その結果グルクロン酸，グルコースおよび塩化ナトリウムは分解率に特に影響を与えなかったが，エタノール，メタノールなどのアルコール類は，グリチルレチン酸の生成率を低下させ，副生成物と思われるピークを多く生じ，分解率に大きな影響を与えることが判明した．そこでポリアミドカラムクロマトグラフィーにおける洗浄操作は十分に行ないアルコール類を除去しておく必要がある．また加水分解により生成したグリチルレチン酸はクロロホルムにより抽出するが，室温で振とう抽出する方法と比較して，70° の水浴上で加熱還流して抽出する方法は10%程

Table 1. Recovery of Glycyrrhizinic Acid from Food

Sample	Weight of Sample (g)	Glycyrrhizinic Acid		
		Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
Orange Juice	25	1	0.91	91
		2	1.83	92
Soy Sauce	25	1	0.93	93
		2	2.02	101
Miso	50	1	0.82	82
		2	1.72	86
Pickles				
Ginger	50	1	0.98	98
Cucumber	50	1	0.91	91
Shibazuke	50	1	0.83	83
Takuanzuke	50	1	0.99	99
Fukujinzuke	50	1	0.86	86

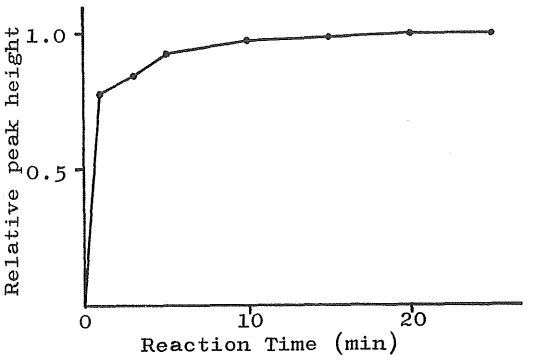


Fig. 7. Effect of Reaction Time on Formation of Glycyrrhizinic Acid Methyl Ester

度の抽出率の上昇が見られ，抽出操作も1回でほぼ全量のグリチルレチン酸を回収することが可能であった．なお検量線用グリチルリチン酸標準液も同様の加水分解操作を行なうことにより，操作中のグリチルレチン酸の損失を相殺することにした．

4. グリチルレチン酸のメチル化

グリチルレチン酸は，エーテルには難溶なため少量のクロロホルムで溶解させた後，ジアゾメタン・エーテル溶液を加えメチル化した．メチル化率は Fig. 7 に示した通りであり，室温で10分間放置することにより，ほぼ完了していることから若干の余裕をとってメチル化時間は15分とした．

5. ガスクロマトグラフィー

カラムの充塡剤としては，2% OV-17，2% OV-1 および2% SE-30 を用い カラム温度 210° の条件でピークの分離度について検討したところ，2% SE-30 は保持時間が長く実用上使用できなかった．また，2% OV-17 および2% OV-1 を比較した場合，いずれも再現性の良い，良好なガスクロマトグラムが得られたが分離の点で2% OV-17 がわずかに優れていることから，以後の実験には2% OV-17 を用いることにした．

6. 添加回収実験

オレンジジュース，醤油，味噌および漬物類にグリチルリチン酸 1mg および 2mg を添加し，試験溶液の調製の項に従い操作し，本法を用いて回収率を求めた．その結果は Table 1 に示した通り，いずれも 82～101% と良好な回収率が得られた．なお，福神漬にグリチルリチン酸 1mg を添加したときのクロマトグラムは Fig. 8 に示した通りであり，妨害ピークがほとんど見られない良好なクロマトグラムが得られた．また他の試料についてもほぼ同様なクロマトグラムが得られた．

7. 市販品の実態調査

本法を用いてグリチルリチン酸の使用が予想される市販品10種，65検体について使用実態調査を行なった．その結果は Table 2 に示した通りであり，ジュース類8検体からはいずれからも検出されず，味噌は8検体中1検体から検出され，漬物は，生姜，キューリ，ラッキョウ，シバ漬，たくあん，福神漬など41検体中21検体から検出された．定量値は最高 172ppm 最低 13ppm であり，検出値に大きな差が見られた．検体の中にほとんど甘味を感じない低濃度のものは甘味の主剤としてだけではなく砂糖やサッカリンの副剤的なかたちで使用されていることも考えられる．

Table 2. Content of Glycyrrhizinic Acid in Food

Sample	No. of Sample	Amount of Glycyrrhizinic Acid (ppm)
Juice	8	ND, ND, ND, ND, ND, ND, ND, ND
Soy Sauce	8	ND, ND, ND, ND, ND, ND, 33, 41
Miso	8	ND, ND, ND, ND, ND, ND, ND, 48
Pickles		
Ginger	5	ND, ND, ND, ND, 48
Cucumber	7	ND, 20, 36, 48, 49, 60, 172
Scallion	3	ND, ND, ND
Shibazuke	2	ND, 31
Takuanzuke	8	ND, ND, 13, 17, 24, 39, 58, 114
Fukujinzuke	5	ND, 29, 33, 115, 148
Other	11	ND, ND, ND, ND, ND, ND, ND, ND, 20, 46, 68

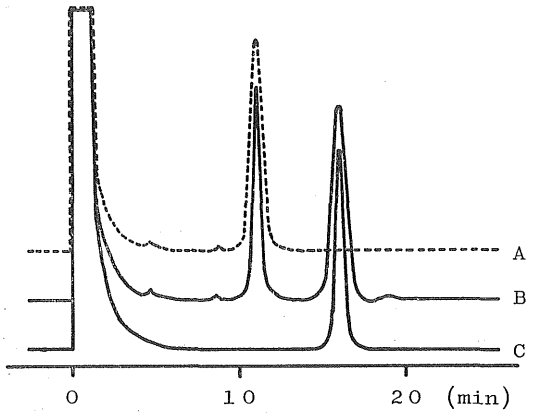


Fig. 8. Gas Chromatogram of Glycyrrhizinic Acid and Sample
A : Sample (Fukujinzuke)
B : Sample + Glycyrrhizinic Acid
C : Glycyrrhizinic Acid

結　論

食品中のグリチルリチン酸の分析法をガスクロマトグラフィーによる方法で検討した．食品中から1%アンモニア水により抽出し，メタノールを加え，pH を酸性にし，ポリアミドカラムに流し込み40%メタノール溶液および水でクリーンアップを行なった．ポリアミドカラムから溶離したグリチルリチン酸は硫酸で加水分解を行ないグリチルレチン酸とした後，ジアゾメタンによりメチル化して，ガスクロマトグラフィーに付し定量を行なった．

本法を用いてグリチルリチン酸を分析することにより妨害物の少ない良好なガスクロマトグラムが得られた．またジュース，醤油，味噌および漬物類の添加回収実験では92～101% の回収率を得た．

以上の結果，本法は食品中のグリチルリチン酸の分析法として十分に適用できると思われる．

（本研究の要旨は日本食品衛生学会第31回学術講演会1976年5月において発表した．）

文　献

1) Conn, J. W. and E. L. Cohen : *J. A. M. A.*, **205**, 498, 1968
2) RX Bulletin, **5** (2), 25, 1974
3) Fazio, T. and J.W. Howard : *J. AOAC*, **53**(4), 701, 1970
4) Larry, D. : *J. AOAC*, **55** (3), 570, 1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 199—202, 1978

食品中のサッカリンの試験法について

中里光男*, 西島基弘*, 冠　政光*, 観　公子*
有賀孝成*, 石川ふさ子*, 藤沼賢司*, 直井家壽太*

Studies on Analysis of Saccharin in Foods

MITSUO NAKAZATO*, MOTOHIRO NISHIJIMA*, MASAMITSU KANMURI*,
KIMIKO KAN*, TAKANARI ARIGA*, FUSAKO ISHIKAWA*,
KENJI FUJINUMA* and YASUTA NAOI*

まえがき

現在，サッカリンの定量法としては衛生試験法[1]ならびに厚生省環境衛生局食品化学課通達による食品中の添加物分析法[2]に採用されている方法，すなわちジアゾメタンによりメチル化後，ガスクロマトグラフィー(GC)で定量する方法が一般的に使用されている．

われわれも本法にしたがって種々の食品を対象に試験を行なっているが，清涼飲料水，ソースおよび醤油等に応用したところ，定性試験ではサッカリンが痕跡程度であると思われる試料でも，定量試験を行なった場合は予想以上に高い定量値を示し，使用基準を上回るという矛盾に遭遇した．そこでこれらについて種々検討したところ，本法によると妨害物質に影響されることが判明したので，その同定ならびに対策について報告する．

実験方法

1. 試薬

1) サッカリン標準溶液　*o*-安息香酸スルフイミド(和光純薬特級)をクロロホルムに溶かし 1mg/m*l* になるように調製した．

2) *p*-オキシ安息香酸エステル（メチル，エチル，プロピル，イソプロピル，ブチル，イソブチル，東京化成）標準溶液　*p*-オキシ安息香酸エステル(PHBA-エステル)の各々をクロロホルムに溶かし 1mg/m*l* になるように調製した．

3) 内部標準溶液　アントラセンをクロロホルムに溶かし 0.1mg/m*l* になるように調製した．

4) ジアゾメタン・エーテル溶液 50m*l* の共栓試験管にニトロソメチル尿素 1g を入れ，エーテルを 20～30m*l* 入れたのち，20%水酸化ナトリウム溶液を少量ずつ加えて，気泡の止むまで反応させ，深黄色のジアゾメタン・エーテル溶液を得た．得られたエーテル溶液は固形水酸化ナトリウムで脱水した．

その他試薬はすべて特級品を用いた．

2. 装置

ガスクロマトグラフ：島津 GC-5A

ガスクロマトグラフ質量分析計：島津 LKB-9000

3. 試験操作

1) **試験溶液の調製**　衛生試験法に準じて行なった．すなわち試料 20g を透析補助液 20m*l* とともに透析チューブにつめ，あらかじめ水200m*l* を入れた内容 300m*l* のメスシリンダーの中につるし，24時間透析を行なった．透析終了後，透析外液の一定量をとり，10%硫酸 5m*l* を加え，塩化ナトリウムで飽和させ，酢酸エチル 50m*l* ずつで3回抽出を行なった．脱水後，溶媒を減圧下で留去した．残留物にジアゾメタン・エーテル溶液を加え，30分間放置したのち，エーテルを減圧下で留去した．残留物に内部標準溶液 5m*l* を加えて GC 用の試験溶液とした．

2) **ガスクロマトグラフィー**

測定条件

① カラム：5% OV-17 (Chromosorb W AW-DMCS 60～80mesh) 2m×3mm, カラム温度：200°, 注入口温度：240°, 検出器温度：240°, キャリアガス：チッ素 60m*l*/min

② カラム：5% SE-30 (Gaschrom Q 60～80mesh) 2m×3mm, カラム温度：180°

* 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

他の条件は①と同じ

③ カラム：5% DEGS (Gaschrom Q 60～80mesh) 1m×3mm, カラム温度：180°

他の条件は①と同じ

3) ガスクロマト-マススペクトル法

測定条件

カラム：5% SE-30 (Gaschrom Q 60～80mesh) 2m×3mm, カラム温度：180°, 注入口温度：200°, セパレーター温度：230°, イオン源温度：290°, イオン化電圧：20eV (TIC) 70eV (MS), トラップ電流：60μA, キャリアガス：ヘリウム 30ml/min

結果および考察

1. 妨害物の同定

定性的に微量のサッカリンを確認したソースについて, OV-17 カラムを用いたGCによって定量試験を行なったところ, 使用基準を上回る定量値が得られた. また清涼飲料水についても, 同様の現象が認められるものがあった. これらの矛盾点を調査するために, SE-30 を用いた GC を行なったところ, 妨害物とサッカリンとの分離が可能であった. そこで SE-30 を用いて GC-MS により, 妨害物質を検討したところ, PHBA-ブチルと同様なマススペクトルが得られた. そこでこれらの矛盾点を生じたソース, 醤油および清涼飲料水について, PHBA-エステルの試験を行なったところ, いずれからもPHBA-ブチルが確認された.

2. PHBA-ブチルの妨害原因

N-メチルサッカリンの妨害ピークはジアゾメタンでメチル化しているにもかかわらず *p* 位の水酸基がメチル化されていない PHBA-ブチルであることから, その残存率を検討した. すなわち PHBA-ブチル標準溶液 0.5 ml を取り, ジアゾメタン・エーテル溶液 5ml を加えて, 30～180分放置したのち, 溶媒を減圧下で留去した. 残留物に内部標準溶液 5ml を加えて溶解したものを GC 用試料とした.

結果は Fig. 1 に示した. 30分では PHBA-ブチルが約60%残存しており, 180分でも約15%がメチル化されないで残存していることが判明した. したがって通常サッカリンをメチル化するに要する反応時間の30分程度では PHBA-ブチルとそのメチル化体であるアニス酸ブチルがほぼ 6：4 の割合で存在することから, メチル化操作を行なっても PHBA-ブチルが妨害ピークとなることが判明した. なおジアゾメタン溶液のジアゾメタン濃度が希薄な場合は PHBA-ブチルのメチル化率が低くなる傾向がみられた.

3. カラム条件による妨害物の検討

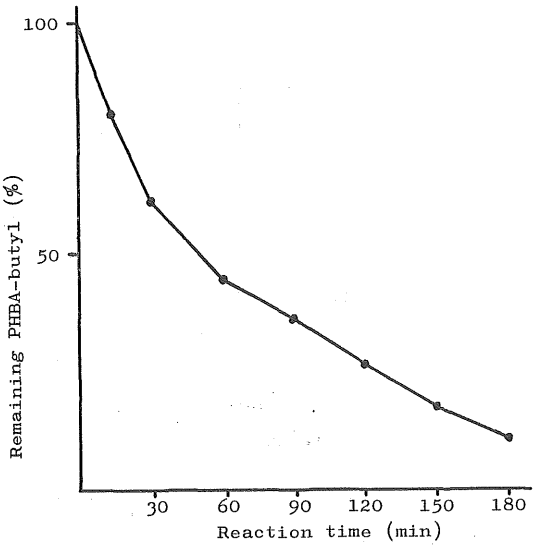


Fig. 1. Relation between Remaining PHBA-butyl and Reaction Time

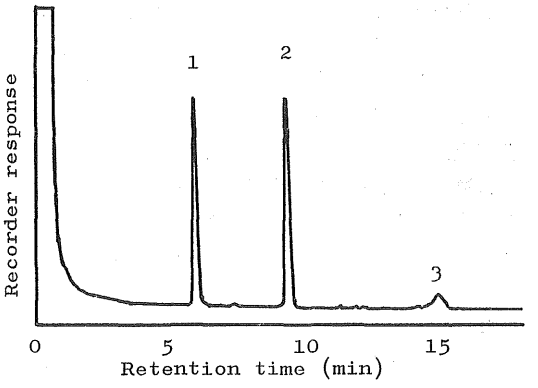


Fig. 2. Gas Chromatogram of Methylsaccharin
1 : N-methylsaccharin
2 : Internal standard
3 : O-methylsaccharin

5% OV-17 カラムを用いた場合, PHBA-ブチルが N-メチルサッカリンの妨害となることが確認されたが (Fig. 2, Fig. 3), 5% OV-17 を含め衛生試験法に収載されている 5% SE-30 および 5% DEGS についても PHBA-エステルおよびそのメチル化体が妨害となることが予想される. そこで3種の充てん剤についてメチルサッカリン, PHBA-エステルおよびそれらのメチル化体について GC を行なった.

それぞれの標準溶液 1ml についてジアゾメタン・エ

Table 1. Relative Retention Time by Gas Chromatography

Material	5% OV-17			5% SE-30			5% DEGS	
	160°	180°	200°	160°	180°	200°	180°	200°
N-methylsaccharin	0.73	0.71	0.69	0.46	0.47	0.49	1.85	1.74
O-methylsaccharin	2.09	1.88	1.72	0.97	0.94	0.92	3.48	3.22
Methyl-*p*-hydroxybenzoate	0.23	0.24	0.25	0.24	0.25	0.26	2.05	1.82
Ethyl-*p*-hydroxybenzoate	0.30	0.31	0.31	0.32	0.32	0.34	2.15	1.90
iso-Propyl-*p*-hydroxybenzoate	0.33	0.33	0.33	0.36	0.36	0.37	1.85	1.65
Propyl-*p*-hydroxybenzoate	0.47	0.46	0.46	0.48	0.47	0.47	2.71	2.34
iso-Butyl-*p*-hydroxybenzoate	0.57	0.56	0.55	0.63	0.60	0.58	2.91	2.48
Butyl-*p*-hydroxybenzoate	0.75	0.71	0.67	0.76	0.71	0.69	3.75	3.09
Methyl-*p*-anisate	0.15	0.16	0.17	0.18	0.20	0.22	0.19	0.21
Ethyl-*p*-anisate	0.20	0.21	0.22	0.24	0.26	0.29	0.20	0.22
iso-Propyl-*p*-anisate	0.21	0.22	0.23	0.28	0.29	0.31	0.18	0.19
Propyl-*p*-anisate	0.30	0.31	0.31	0.37	0.38	0.40	0.26	0.27
iso-Butyl-*p*-anisate	0.38	0.37	0.38	0.48	0.49	0.49	0.27	0.28
Butyl-*p*-anisate	0.48	0.47	0.46	0.58	0.57	0.57	0.34	0.34

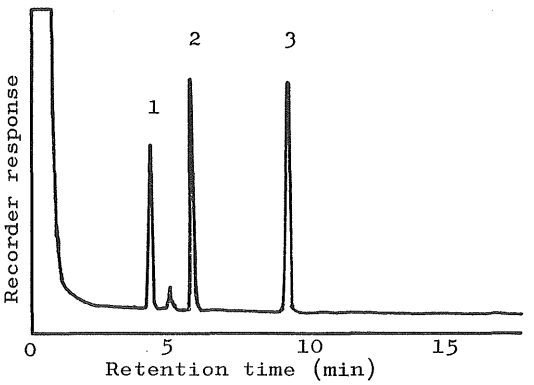


Fig. 3. Gas Chromatogram of PHBA-butyl and Butyl-*p*-anisate
1 : Butyl-*p*-anisate
2 : PHBA-butyl
3 : Internal standard

ーテル溶液 5m*l* を加えて30分メチル化し，減圧下で溶媒を留去し，残留物に内部標準溶液 5m*l* を加えて GC 用試料とした．

結果を Table 1 に示した．表中の数値はアントラセンに対する相対保持時間である．

OV-17 の場合，いずれの温度でも PHBA-ブチルが N-メチルサッカリンに対して妨害となることが判明した．SE-30 の場合では N-メチルサッカリンと PHBA-プロピルおよび PHBA-イソブチルのメチル化体であるアニス酸イソブチルの相対保持時間が接近しており，DEGS の場合は N-メチルサッカリンと PHBA-イソプロピルの値が接近していることが判明した．そこでジアゾメタン法によってメチル化してサッカリンの定量を行なう場合には，PHBA-エステルを含有しているかどうかをあらかじめ確認する必要がある．

4. 溶媒分離による PHBA-エステルの除去

PHBA-エステルの共存する試料については，次の操作により PHBA-エステルを除去する方法が有効であることが判った．すなわち透析液の一定量をとり，10%硫酸 5m*l* を加え，塩化ナトリウムで飽和させ，酢酸エチル 50m*l* ずつで3回抽出を行なった．酢酸エチル層を水洗後，1%炭酸水素ナトリウム溶液 20m*l* ずつで2回抽出したのち，10%硫酸 10m*l* を加えて酸性とし，塩化ナトリウムで飽和させ，酢酸エチル 50m*l* ずつで3回抽出した．脱水後，溶媒を減圧下で留去し，残留物についてメチル化の操作を行ない，GC を行なったところ，PHBA-エステルが完全に除去できた．そこであらかじめサッカリンを含有していないことを確認したソース，醤油および清涼飲料水にサッカリンナトリウムおよび PHBA-ブチルをそれぞれ 100ppm となるように添加し，上記試験法にしたがい回収試験を行なったところ，クロマトグラム上に特に妨害ピークは見られず，回収率は95%以上と良好な結果が得られた．

まとめ

衛生試験法および厚生省環境衛生局食品化学課通達による食品中の添加物試験法に準じてサッカリンの定量試

験を行なう際，カラムに OV-17 を用いた場合，合成保存料である PHBA-ブチルが妨害となることが判明した．SE-30 を用いた場合，PHBA-プロピルおよびアニス酸イソブチルが妨害となること，また DEGS を用いた場合は PHBA-イソプロピルが妨害となることが確認された．そこで PHBA-エステルの添加が予想される場合は少くとも2種の充てん剤を併用するか，あるいは PHBA-エステルの溶媒分離による除去操作を試験法に加えることが必要と思われる．

文　献

1) 日本薬学会：衛生化学，21，119，1975
2) 厚生省環境衛生局食品化学課：食品中の添加物分析法，第1集，昭和51年2月

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 203—205, 1978

食品添加物中の多核芳香族炭化水素（第4報）
活性炭およびカーボンブラック中のベンゾ(a)ピレンの分析

中嶋 巖*, 広門雅子*, 宇佐美博幸*, 溝入 茂*, 遠藤英美*

Polynuclear Aromatic Hydrocarbon in Food Additives (IV)
Analysis of Benzo(a)pyrene in Active Carbon and Carbon Black

IWAO NAKAJIMA*, MASAKO HIROKADO*, HIROYUKI USAMI*,
SHIGERU MIZOIRI* and FUSAYOSHI ENDO*

緒　言

前報ではクエン酸[1]，流動パラフィンおよびクン液[2]，カラメル[3]中のベンゾ(a)ピレン（B*a*P）について報告したが，今回はひき続き活性炭およびカーボンブラック中の B*a*P について検討した．

活性炭は食品工業，化学工業など極めて広汎な分野で脱臭，脱色などの目的でろ過剤，清澄剤として使用されている[4]．また，カーボンブラックはゴム製品，プラスチック，印刷インキ，化粧品などの着色剤として使用されているが，過去にチョコレート，色つけ菓子，ガムドロップなどの着色に使用されていたこともある[5]．

多核芳香族炭化水素は有機物質が高温燃焼または熱分解する際に生成されることが知られている[6,7]．活性炭は炭化水素原料（植物質，石炭質など）を400—700°で炭化し，600—1000°で賦活してつくられる[4]．また，カーボンブラックも炭化水素原料（重油など）を高温燃焼（1000—2000°）してつくられる[5]．したがって，両者ともその製法上 B*a*P が生成されると考えられる．そこで都食品監視課の先行調査との関連で収去された活性炭（食品添加物用）8種および市販カーボンブラック4種中の B*a*P の分析を行なった．

実験の部

試薬　B*a*P 標準溶液：ベンゾ(a)ピレン 10mg を正確に秤り，n-ヘキサンに溶かして 1,000m*l* とした．この溶液を原液として適宜希釈して用いた．

抽出に用いた試薬は特級品を蒸留して用いた．その他の試薬はすべて特級品を用いた．

装置　日立製633型高速液体クロマトグラフィー，日立製 MPF-4 型けい光分光光度計（ミクロフローセル付属装置付）

分析試料　活性炭：都食品監視課より昭和51年11月—52年2月にかけて当所に送付された活性炭3社8製品を用いた．カーボンブラック：チャンネルブラック3種，ファーネスブラック1種．

実験操作

1. **抽出**　試料 25g をとり，ソックスレー抽出器を用いて約30時間抽出した．抽出溶媒は，活性炭については水，メチルアルコール，エチルアルコール，n-ヘキサン，ベンゼン，キシレン，ジクロルメタン，クロロホルムを，また，カーボンブラックについてはメタノール，n-ヘキサン，ベンゼン，ジクロルメタンをそれぞれ 500m*l* 用いた．つぎに，各抽出液をエバポレーターで濃縮乾固し，n-ヘキサンを 1-2m*l* 加えて溶解した．この液について高速液体クロマトグラフィーを行なった．なお，水抽出液は n-ヘキサン 100m*l* を加えて10分間振とうし，これを3回くり返し，n-ヘキサン抽出液を合わせた後同様の操作を行なった．

2. **高速液体クロマトグラフィーによる同定および定量**　高速液体クロマトグラフィーにけい光分光光度計を接続して測定した．測定条件：カラム LichrosorbRP-18 (4mmϕ×15cm)，移動相　アセトニトリル・水（75：25），流速　2ml/min，圧力　110kg/cm^2，励起波長 385nm，けい光波長　406nm．また，同定は B*a*P 標準物質と同じ保持時間に出現するピークについて，そのピークの高さが最高になったときに移動相の流れを止め，この状態でけい光分光光度計を作動させ，けい光および

* 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

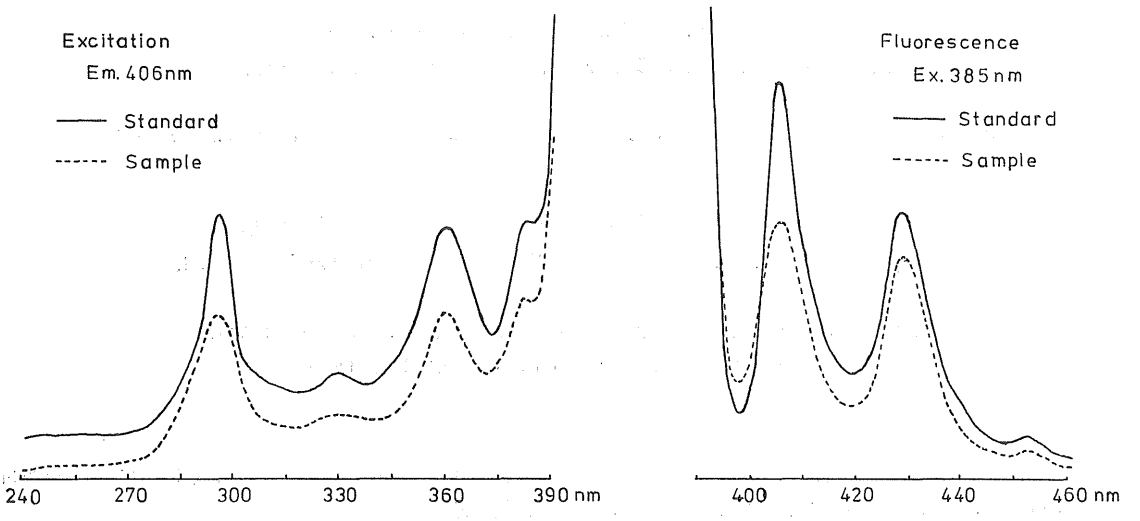


図 1. カーボンブラックの B*a*P ピークと B*a*P 標準物質の励起，けい光スペクトル

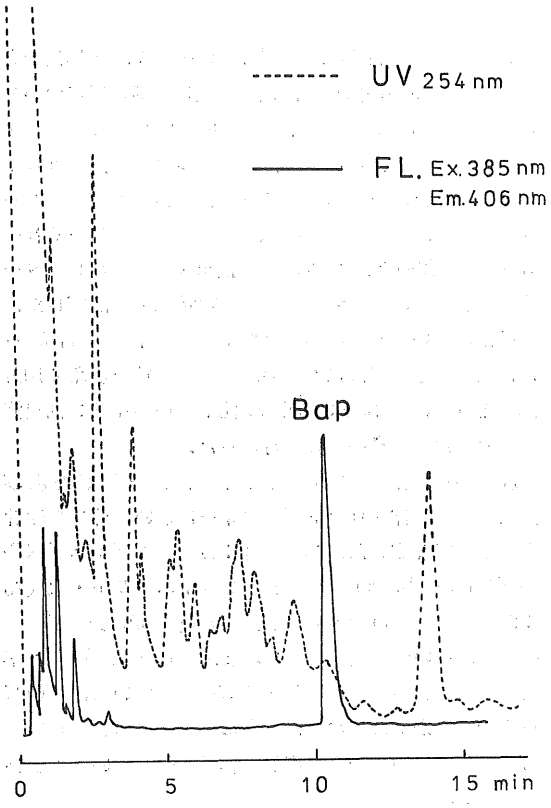


図 2. カーボンブラックのジクロルメタン抽出物の高速液体クロマトグラム

表 1. カーボンブラックのジクロルメタン抽出物中の B*a*P

		B*a*P (ppb)
チャンネルブラック	A	0.85
	B	0.67
	C	0.18
ファーネスブラック		0.15

励起スペクトルを測定し，B*a*P 標準物質のそれと比較して行なった．そのスペクトル図を図1に示した．

結　果

活性炭およびカーボンブラックからの B*a*P の分析の際，前報[3]のカラメルの分析の場合と同様 B*a*P の測定を妨害するけい光物質（408—428nm）が認められたが，高速液体クロマトグラフィーでその物質と B*a*P を分離することができたので，B*a*P の測定には全く影響はなかった．なお，検量線は 0.05—5ng の範囲で直線性を示した．

活性炭8種中からの B*a*P の分析結果は各抽出液とも B*a*P は検出されず，検出限界の 0.1ppb 以下であった．また，活性炭 25g に B*a*P 1,000ng を含む溶液 150m*l* を加え，一夜放置後ろ過し，ろ液にけい光が認められないことを確かめ，活性炭に B*a*P が完全に吸着されたことを確認したのち，各溶液を用いて回収実験を行なったところ，どの溶媒でも B*a*P は全く回収されなかった．一方，カーボンブラック4種中からの B*a*P については，メタノールおよびn-ヘキサンでは B*a*P は検出されなか

ったが，ベンゼンおよびジクロルメタンで B*a*P が検出された．ジクロルメタンで抽出した結果を表1に，その高速液体クロマトグラムを図2に示した．しかし，ジクロルメタンを用いて活性炭と同様に回収実験を行なったところ，B*a*P はほとんど回収されなかった．

考　察

B*a*P 測定法として高速液体クロマトグラフィー-けい光分光光度計を用いると分離，同定および定量操作が同時に行なえる．また，検出感度も 0.1ppb と高いので，B*a*P 分析には極めて有効である．

活性炭およびカーボンブラックは炭化水素原料を高温燃焼してつくられるので，その製法上 B*a*P が生成されると考えられるが，今回われわれが行なった分析結果から，活性炭については，活性炭に B*a*P が含まれていたとしても，通常の使用条件ではその強い吸着性によって B*a*P が溶出することはないと思われる．したがって，活性炭中の B*a*P については食品衛生上全く問題がないと言える．一方，カーボンブラックについては，ジクロルメタン抽出液から B*a*P が 0.15—0.85ppb 検出されたが，添加回収実験ではほとんど B*a*P は回収されなかった．このことから，実際カーボンブラック中の B*a*P 含量は検出された濃度よりも大分高いと考えられる．以上，今回検討した活性炭および カーボンブラック中の B*a*P は溶媒抽出法ではほとんど抽出することができないことが判った．これら吸着性の強い物質中の B*a*P を抽出する方法について今後さらに検討する予定である．

謝辞　試料収集に当り御協力いただいた都食品監視課ならびに食品機動監視班各位に深謝いたします．

（本研究は昭和52年度当研究所調査研究課題「食品添加物中の多核芳香族炭化水素」として実施したものである．）

文　献

1) 遠藤英美，広門雅子，半田八十三：東京衛研年報，25，271，1974
2) 広門雅子，遠藤英美，宇佐美博幸：東京衛研年報，26-1，220，1975
3) 広門雅子，中嶋　巖，遠藤英美：東京衛研年報，28-1，154，1977
4) 柳井　弘：活性炭読本，1976，日刊工業新聞社
5) カーボンブラック協会編：カーボンブラック便覧，第2版，1972，図書出版社
6) Davies, W. and J.R. Wilmshrst : *Brit. J. Cancer*, 14, 295, 1966
7) Masuda, Y., K. Mori, and M. Kuratsune : *Gann*, 58, 69, 1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 206—208, 1978

食品添加物用ポリアルコールの規格　プロピレングリコール，グリセリンの定量について

宇佐美 博 幸*, 広 門 雅 子*, 中 嶋　巖*, 溝 入　茂*, 遠 藤 英 美*

Standards of Polyols for Food Additives
Assay of Propylene Glycol and Glycerin

HIROYUKI USAMI*, MASAKO HIROKADO*, IWAO NAKAJIMA*,
SHIGERU MIZOIRI* and FUSAYOSHI ENDO*

緒　言

プロピレングリコールおよびグリセリンは食品添加物の溶剤その他の目的で広く用いられている．しかしプロピレングリコール（以下ＰＧと略す）は食品添加物公定書中に定量法が設けられておらず，またグリセリンの現行法は過ヨウ素酸酸化滴定法によって行なわれているが放置時間に１時間要するため定量法を簡便化する目的でこれらの分析法について検討を行なった．ＰＧ，グリセリンの定量法には 1)ガスクロ法，2)過ヨウ素酸酸化滴定法，3)赤外吸収スペクトル法，4)屈折率測定等があるが，1)，3)は食品中の分析には適しているが添加物の公定法として適当と思われない．そこで著者らは添加物公定書でポリアルコール類に用いられる過ヨウ素酸酸化滴定法を検討した．FCC 法はＰＧの定量に過ヨウ素酸酸化滴定法を用い，過剰の亜ヒ酸を加えてヨウ素溶液で滴定しているが亜ヒ酸は毒性が強く添加物公定書の規定液としては好ましくないため Patterson らの方法を応用し，チオ硫酸ナトリウムを用いる方法を検討した．さらにＰＧおよびグリセリンについて FCC 法および現行法との比較を行ないあわせて収去品について実態調査を行なったので報告する．

実験の部

試料　プロピレングリコール　都食品監視課収去品20種，標準品として試薬特級品（関東化学製）１種

グリセリン：都監視課収去品５種，標準品として試薬特級品（和光純薬製）１種，標準品に水を加えて約84%に調製したもの１種

試薬　特にことわりのないかぎり試薬特級品，食品添加物公定書および衛生試験法に記載されている試薬，試液，容量分析用標準溶液を用いた．

試験方法

I.　プロピレングリコール　A．設定した試験法　本品 1g を精密に秤り水に溶かして 250m*l* とし，その 10m*l* ずつをヨウ素びんにとり，それぞれに過ヨウ素酸ナトリウム試液 5m*l* を加え，さらに硫酸（1→2）2m*l* を加えてよく振り混ぜ15，20，30，40分間放置する．これにヨウ化カリウム 2.5g を加えてよく振り混ぜた後冷暗所に５分間放置し，遊離したヨウ素を 0.1N チオ硫酸ナトリウムで滴定する．別に同様の方法で空試験を行なう．

0.1Nチオ硫酸ナトリウム溶液 1m*l*＝3.805mg $C_3H_8O_2$

B．FCC 法　本品約 0.3g を精密に秤ってメスフラスコにとり水を加えて 100m*l* とする．その 10m*l* をとり，0.1M 過ヨウ素酸 5m*l* を加えてよく振り混ぜ，15分間放置したのち飽和炭酸ナトリウム 10m*l*，0.1N 亜ヒ酸ナトリウム溶液 15m*l* およびヨウ化カリウム試液（1→20）1m*l* を加えてよく振り混ぜついで炭酸水素ナトリウムを数グラムが溶けずに残るように加える．これを 10m*l* のミクロビュレットを用いて，0.1N ヨウ素溶液で液が淡黄色になるまで滴定する．別に同様の方法で空試験を行なう．

0.1N ヨウ素溶液 1m*l*＝3.805mg $C_3H_8O_2$

II.　グリセリン　C．設定した試験法　本品 1g を精密に秤り水に溶かして 100m*l* とし，その 20m*l* をとり過ヨウ素酸ナトリウム試液 50m*l* を加えてよく振り混ぜた後一定時間*1 放置した．これにプロピレングリコール溶液（1→2）2m*l* を加え10分間放置した後，フェノールレッド試液３滴を指示薬として液が持続する紅色を呈す

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Assay of Standard P.G. at Each Reaction Time

Time (Min)	Determinant of Standard P.G.			x̄ ± δ %	
15	98.8	96.7	99.0	98.2	1.04
20	99.2	98.9	98.4	98.8	0.33
30	99.4	99.3	100.4	99.7	0.497
40	99.5	100.2	100.3	100.0	0.356

るまで0.1N 水酸化ナトリウム溶液で滴定した．別に同様の方法で空試験を行なった．

0.1N水酸化ナトリウム溶液 1m*l*=9.21mg $C_3H_8O_3$

結果および検討

I. プロピレングリコール PG は酸化されてホルムアルデヒドとアセトアルデヒドとなるが，この際生ずるヨウ素酸と過量の過ヨウ素酸にヨウ化カリウムを作用させて遊離するヨウ素をチオ硫酸ナトリウムで滴定し空試験から差し引き含量を求めた．この際*2の放置時間が測定値に大きな影響があると考えられた．放置時間15, 20,

Table 2. Assay of P.G. by Two Methods

	Determinant of Standard P.G.						n	x̄ ± δ %		c.v.%
Test Methd	99.8	100.0	100.3	100.2	99.4	99.5	6	99.9	0.372	0.372
F.C.C. Method	100.2	99.8	99.8	100.2	100.4	100.1	6	100.1	0.219	0.219

P.G. : Standard

Table 3. Assay of Test Sample P.G.

NO.	F.C.C. Method x̄ ± δ %		Test Method x̄ ± δ %	
1	99.6	0.659	99.8	0.05
2	100.3	0.475	97.9	0.55
3	87.8	0.05	87.9	0.05
4	98.6	0.45	99.1	0.235
5	97.5	0.287	97.6	0.377
6	96.7	0.05	96.9	0.309
7	99.4	0.648	99.4	0.216
8	99.7	0.163	98.5	0.047
9	99.1	0.125	99.2	0.25
10	95.6	0.432	97.0	0.374
11	100.0	0.141	100.0	0.525
12	99.7	0.586	99.1	0.05
13	99.9	0.339	99.7	1.21
14	97.2	0.205	97.4	1.4
15	99.9	0.896	97.4	1.03
16	100.0	0.262	100.1	0.262
17	90.4	0.189	90.6	0.283
18	100.3	0.49	100.1	0.665
19	97.5	0.652	94.8	1.685
20	99.1	0.125	96.9	0.216

x̄ : Means of 3-5 Assay

Test Sample : Commercial Sample

$$\begin{array}{l}CH_3\\|\\CHOH+IO_4^-\rightarrow CH_3CHO+HCHO+IO_3^-+H_2O\cdots*2\\|\\CH_2OH\end{array}$$

$$IO_4^-+5I^-+4H_2SO_4\rightarrow 4I_2+4H_2O+4SO_4^{2-}$$

$$IO_3^-+5I^-+3H_2SO_4\rightarrow 3I_2+3H_2O+3SO_4^{2-}$$

30, 40分の結果は Table 1 のとおりであり放置時間は40分で十分であった．以上の結果より放置時間40分で行なった標準品の測定値は Table 2 のとおりであり FCC 法による定量値とあまり差がなかった．収去品についての設定した試験法および FCC 法を用いた実測値は Table 3 のとおりであるが設定した試験法の方がややバラツキがあるように感じられた．FCC 法の含量規定に適合するもの16検体（80%）適合しないもの4検体（20%）であった．

II. グリセリン グリセリンは過ヨウ素酸によって酸化をうけてギ酸を生ずるのでこのギ酸によりグリセリンを測定した．公定書法の放置時間の規定は1時間である

Table 4. Effect of Reaction Time on Assay of Standard Glycerin

Time Min.	JSFA Method x̄ ± δ %		Test Method x̄ ± δ %	
5	97.7	0.637	98.5	0.382
10	98.0	0.585	98.3	0.24
20	98.4	0.39	98.3	0.265
30	98.5	0.389	98.5	0.093
60	98.5	0.188	98.4	0.205

Table 5. Time and Determinant of Glycerin

Time Min.	Determinant of Dilute Standard Glycerin							n	$\bar{x} \pm \delta$ %		Added P.G.
20	83.6	83.5	83.8	83.5	83.7	83.7	83.3	7	83.6	0.155	2 m*l*
30	84.4	84.2	84.7	84.4	84.4	84.6	84.7	7	84.5	0.175	〃
60	84.6	84.7	84.3	84.6	84.5	84.7	84.8	7	84.6	0.151	〃
30	83.9	84.1	84.6	84.1	83.9	84.0	84.1	7	84.1	0.220	4 m*l*
60	84.7	84.3	84.5	84.6	84.7	84.2	84.6	7	84.5	0.181	〃

Glycerin : Added approximate 10% H_2O to Standard Glycerin

Table 6. Assay of Test Sample Glycerin

NO.	Determinant			$\bar{x} \pm \delta$ %	
1	98.6	98.6	98.6	98.7	0.141
2	93.4	93.7	93.5	93.5	0.124
3	98.4	98.5	99.0	98.6	0.262
4	98.6	98.8	98.9	98.8	0.124
5	96.4	96.4	96.4	96.4	0

Test Sample : Commercial Sample

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH + 2IO_4^- \rightarrow 2HCHO + HCOOH + 2IO_3^- + H_2O \\ | \\ CH_2OH \end{array} \quad \cdots *3$$

が，5，10，20，30，60分放置した Table 4 および 5 の結果から*3の反応に要する*1の放置時間は10分前後であることがわかった．なお FCC 法でも放置時間は30分と規定されており1時間の放置時間は30分以上短縮可能であると考えられた．設定した試験法では過ヨウ素酸ナトリウム試液を用いているが，この理由は過ヨウ素酸カリウムの溶解度が飽和で0.42%と低く使用に不便であるためである．また本法では過量の過ヨウ素酸を分解する目的で PG を添加するが，添加量は Table 5 より 2m*l* で十分であった．以上の結果から，放置時間30分添加 PG 2m*l* で設定した方法を用いた収去品の測定結果は Table 6 のとおりであった．

要　約

食品添加物公定書にはＰＧの定量法が設けられていないため試験法を設定し検討を行なった．本法はチオ硫酸ナトリウムを用いるため亜ヒ酸を用いる FCC 法に比べて安全である．本法による測定結果は FCC 法による結果とあまり差がなかった．またグリセリンについては，公定書の定量操作時の放置時間が1時間と規定されており，所要時間が長くかかる欠点があったが，今回の実験結果から30分以上短縮できることが明らかとなった．今後定量法を確立するためにさらに検討を行なう予定である．

文　献

1) 第三版食品添加物公定書注解，221，1974
2) Food Chemicals Codex, **II**, 674, 1972, Nas-NRC
3) Patterson S. J. : Analyst, **89**, 67, 1964
4) Methods of Analysis of the A. O. A. C. **12th**, EC, 328, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 209—212, 1978

縮合メタリン酸塩の反転腸管法による吸収について

山岸達典*, 森本キミ*, 関　博麿**
大西和夫**, 友成正臣**

On the Absorption of the Polymetaphosphate through the Everted Intestine

TATSUNORI YAMAGISHI*, KIMI MORIMOTO*, HIROMARO SEKI**,
KAZUO OHNISHI** and MASAOMI TOMONARI**

食肉，魚肉および乳製品の保水，結着剤として広く使用されている縮合リン酸塩類は，金属イオンに対して封鎖作用があるため，この塩類を使用した食品中のミネラルは可溶性塩類となって存在している[1,2]．また，消化管内においても同様にミネラルをマスクし，あるいはキレートをつくり腸管よりの吸収を阻害すると思われるので，この塩類の多用はミネラルの損失を起すことも考えられる[4,5]．そこで反転腸管法により縮合メタリン酸塩の腸管吸収と Ca, Mg 吸収の様相を観察したので報告する．

実験方法

1) 実験動物

Ca, P および Mg の吸収部位は小腸上部，小腸で行なわれる[13]ことから Wistar 系，Albino-Rat，雌性体重250～300g のもの（日本ラット製）を1週間同一条件で飼育し，24時間絶食させたのち（水は自由給水），エーテル麻酔下で腹部正中線より切開し，十二指腸部から回腸部までを摘出し，附着している腸間膜をできるだけ削除した．次ぎに十二指腸上部から 10cm までの長さに切断し，生理食塩水で腸管腔内を洗い，一端は糸で結さつし，ガラス棒で腸管の粘膜側を反転し，他端から生理食塩水 1m*l* を注射器で注入し，長さを 8cm にして結さつした[6,7]．次ぎにこの反転腸管は，あらかじめ準備した下記の試料調製液，薬物を含む緩衝液 50m*l* を入れた100m*l* 容三角フラスコ中に投入し，O_2-CO_2 95：5 混合ガスを通気し，37° で1時間インキュベーションした．その後，腸管をとりだし，外側の粘膜を生理食塩水20～30m*l* で5回洗浄し，次いで漿膜側の内部溶液を試料として PMP とその分解産物の無機リンを測定した．

2) 試料と緩衝液

縮合メタリン酸塩（PMP）市販ヘキサメタリン酸ナトリウム（関東化学製，Lot. No. 808A3085）を生理食塩水で溶解し所定の濃度（加水分解後の リン量 1mg/1m*l*）に調製した．なお，本薬品は五酸化リン（P_2O_5）としての含量67%であり，そのほかは食品添加物の規格基準に適合するものであった．

カルシウム（Ca）溶液 塩化カルシウム（関東化学製）を生理食塩水で溶解（Ca として 1mg/1m*l*）し使用．

マグネシウム（Mg）溶液 塩化マグネシウム（関東化学製）を生理食塩水で溶解（Mg として 1mg/1m*l*）し使用．

緩衝液：緩衝液は pH 4.0, 6.0 および8.0の3種類を作製した．pH 4.0と6.0は酢酸-酢酸ナトリウム（0.85% NaCl 含有）溶液で，pH 8.0 はベロナールナトリウム-塩酸（0.85% NaCl 含有）溶液[8]を使用．

試薬はいずれも特級を使用．

3) 試料溶液の調製

縮合メタリン酸塩の試料調製液は，PMP（酸化分解後の P 1mg/1m*l*）の 0, 2.5, 5.0, 7.5および 10.0m*l* をそれぞれ 50m*l* 容メスフラスコに入れ，次いでpH 4.0

* 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. The Effect of the PMP on the Ca and Mg Absorption at pH

Added (mg/d*l*)			pH 4		pH 6		pH 8	
Mg	Ca	PMP	PMP	P	PMP	P	PMP	P
—	—	0.0	—	—	—	—	—	—
—	—	2.5	—	—	—	—	—	—
—	—	5.0	11.0±0.22*	0.11±0.09*	1.01±0.39*	0.28±0.09*	1.56±0.36*	0.38±0.20*
—	—	7.5	—	—	—	—	—	—
—	—	10.0	1.96±0.39	0.52±0.42	1.16±0.45	0.21±0.07	1.80±0.45	0.11±0.06
—	—	15.0	2.96±0.59	0.11±0.10	5.58±1.38	0.52±0.17	5.58±1.40	0.66±0.34
—	—	20.0	4.93±0.99	1.09±0.90	4.76±0.92	0.45±0.14	5.42±1.36	0.69±0.35
			PMP	Ca	PMP	Ca	PMP	Ca
—	10.0	0.0	—	7.36±1.47	—	5.64±1.13	—	5.85±1.17
—	10.0	2.5	0.40±0.08	7.81±1.56	0.48±0.10	6.17±1.23	1.24±0.25	4.19±0.84
—	10.0	5.0	0.41±0.08	6.71±1.34	0.61±0.12	4.63±0.93	1.72±0.34	4.54±0.90
—	10.0	7.5	0.30±0.06	8.09±1.62	1.29±0.26	3.88±0.77	1.39±0.28	3.42±0.68
—	10.0	10.0	0.90±0.18	4.29±0.86	1.52±0.30	4.26±0.85	2.02±0.40	3.76±0.75
—	10.0	15.0	0.82±0.16	4.25±0.85	2.18±0.44	3.86±0.77	2.09±0.42	3.77±0.75
—	10.0	20.0	1.42±0.28	3.87±0.77	1.77±0.35	3.81±0.76	2.09±0.42	3.25±0.65
			PMP	Mg	PMP	Mg	PMP	Mg
10.0	—	0.0	—	6.14±1.23	—	7.11±1.42	—	7.47±1.49
10.0	—	2.5	—	6.14±1.23	—	6.99±1.40	—	5.93±1.19
10.0	—	5.0	—	5.72±1.14	—	7.41±1.48	0.06±0.09	5.81±1.16
10.0	—	7.5	—	5.68±1.14	0.62±0.12	6.82±1.36	0.42±0.08	6.83±1.37
10.0	—	10.0	—	6.12±1.22	0.83±0.17	5.51±1.10	0.65±0.13	5.81±1.16
10.0	—	15.0	0.10±0.02	5.34±1.07	0.79±0.16	5.51±1.10	0.99±0.20	5.51±1.01
10.0	—	20.0	0.39±0.08	5.34±1.07	1.07±0.21	6.25±1.25	0.99±0.20	4.69±0.94

* mg/d*l* Mean of 5 rats ± S. E

または6.0, 8.0の緩衝液を 10m*l* ずつ加え，さらに生理食塩水を加えて全量 50m*l* とした．

Ca, Mg の調製液の場合には，上述の PMP 調製液に Ca または Mg (1mg/1m*l*) を 5m*l* ずつ加え全量 50m*l* とした．

4) 測定方法

PMP は過塩素酸で酸化分解し無機リン酸をリン・バナド・モリブデン法[9]で呈色させて光電比色計を用いて測定した．Ca, Mg は原子吸光光度法（日本ジャーレルアッシュ製，A-1 Mark II 型）で測定[10]した．

実験成績

(1) PMP の腸管吸収

本実験では，PMP の腸管吸収量は酸化分解後の全P量（mg/d*l*）で，また分解前に遊離している無機リン酸（P）はP量（mg/d*l*）で表わした．その結果を Table 1 に示す．pH 4.0 で外側液の PMP 濃度を高くすると，腸管内の PMP 吸収量は順次増加し，平均吸収率は 21.5±4.3% であった．またPの吸収量は PMP の吸収量と比較すると低い値を示したが，PMP 吸収量とP吸収量との間には正の相関 (r=0.78) を認めた．

次ぎに pH 6.0 の PMP 吸収量とP吸収量では上述の pH 4.0 の場合と同様な傾向を示したが，外側液の PMP 濃度が 15mg/d*l* 以上であれば，PMP ならびにPの吸収量はほぼ一定となり，それぞれ 4.8～5.6mg/d*l*, 0.4～0.5mg/d*l* の値であった．また，PMPの平均吸収率は 23.2±9.2%で，PMP とPの吸収量との間の相関は r=0.98であった．

pH 8.0 の PMP とPの吸収量ではさきの pH 6.0 の場合と同様な傾向を示したが平均吸収率は上述の pH 4.0, 6.0 のそれと比べると高く 28.4±7.0% で，PMP とPの吸収量との間の相関は r=0.89 であった．

(2) PMP の Ca 腸管吸収の阻害

PMP による Ca の腸管吸収の阻害は Table 1 に示すとおり，pH によって著しく異なることが認められた．

pH 8.0 で腸管外側液の PMP 濃度に一定量の Ca (10mg/dl) を添加した場合，PMP 濃度が 2.5mg/dl 以上であれば Ca の吸収は，約 22～46% が阻害された．一方，PMP の吸収率と外側液の PMP 濃度との間には逆の関係を示し，約50～14%と低下した．次ぎに pH 6.0 で外側の PMP 濃度が 7.5mg/dl 以上では Ca の吸収阻害が認められほぼ一定の約30%を示した．また pH 4.0 で外側の PMP 濃度が 10mg/dl 以上では Ca 吸収阻害がみられ約42%であった．

なお，pH 6.0 と 4.0 における腸管内の Ca 吸収量と PMP 吸収量との間には負の相関を認め，それぞれ r=−0.89，−0.80の値を示した．

(3) PMP の Mg 吸収阻害

PMP による Mg の腸管吸収の阻害は Table 1 に示すごとくほとんど認められなかった．

pH 6.0 と 4.0 における Mg の腸管内の吸収量が外側の PMP 濃度と関係なく，pH 6.0 で 6～7mg/dl，pH 4.0 で 5～6mg/dl の値で一定に推移し，Mg の吸収阻害は認めなかった．しかし，pH 8.0 で外側の PMP 濃度 15mg/dl 以上では Mg の吸収阻害は約26～37%の値を示した．

考　察

PMP の腸管吸収についてみると，PMP は高濃度の粘膜側から漿膜側へ移行する濃度勾配を示し，外側濃度と吸収量との間に正比例の関係で拡散移行している．しかし，Ebel, Gosselin ら，Gotte らによると，生体内における縮合リン酸塩の腸管吸収は，鎖状の長いポリリン酸がほとんど吸収されず，モノマー，ダイマーなどの短鎖状のリン酸が吸収されるという[3]．さらに，Lang ら，Schreier らはラットに Graham's salt, Kurrol's salt を経口投与したところその10～40%が腸管から吸収されて，尿中にモノマーあるいは短鎖状のメタリン酸を検出したという[3]．このような一連の結果から，高分子的にきわめて長い鎖状あるいは環状構造では腸管を透過しにくいという点から，短いダイマー，モノマーなどのメタリン酸が通過するものと考える．

一方，高田ら[11]によるメタリン酸塩の鎖状組成についての報告によると $(NaPO_3)n$ の n 数値は n=3 のものが多く市販されている．このことは，製品上の純度の問題であろうが，現在使用している食品添加物の PMP も含めて縮合メタリン酸はトリマー以下の短鎖状のものが多く存在していることを意味している．このことは本実験における PMP の腸管吸収率が20%以上あったことと密接な関連があると思われる．

なお，腸管内に吸収された無機リン酸（P）についてみると，Pの吸収量と PMP の吸収量との間に高い正の相関を示している点からみて，この吸収されたPの存在は，すでに吸収以前の PMP の溶液中に遊離していたPが腸管を通過した結果観察されたものと推定する．一方，PMP による Ca 吸収阻害についてみた場合 PMP は Ca と結合あるいは吸着して可溶性塩を作り，non-ionic の高分子を形成[12]する点からみて，非解離型の結合物質は腸管を通過しにくいことが考えられる．しかし，PMP には上述のように無機リンが混在する点からみて，単に Ca/P 比によって Ca の吸収阻害という現象が観察されたのかも知れないが，本実験の成績でみる限り腸管内の無機リン量は極めて少ない．しかし，いずれにしても PMP が Ca の吸収を阻害するか否かについては今後さらに検討すべき問題が含まれている．

要　約

縮合メタリン酸塩（PMP）の反転腸管法による PMP の腸管吸収と Ca, Mg の吸収の様相を観察した．

1) PMP の腸管吸収

PMP は濃度勾配の拡散で高濃度の粘膜側から漿膜側へ移行する腸管吸収を示し，その平均値の吸収率は pH 4.0, 6.0および8.0の場合，それぞれ21.5±4.3%，23.2±9.2%，28.4±7.0%であった．

2) PMP による Ca, Mg の腸管吸収の阻害

PMP の Ca 腸管吸収の阻害は段階的に PMP 濃度 (0～20mg/dl) を高くし，これに一定量 (10mg/dl) の Ca を添加した場合 pH 8.0 で PMP 濃度 2.5mg/dl 以上であるとき，Ca の吸収阻害は約 22～46%，pH 4.0 で PMP 濃度 10mg/dl 以上のとき約 42% の値を示し，それぞれの pH によって異なるが PMP の Ca 腸管吸収の阻害が認められた．なお，pH 6.0 と pH 4.0 における腸管内の Ca 吸収量と PMP 吸収量との間には高い負の相関を示した．しかし，Mg の腸管の吸収の阻害はほとんど認められなかった．

文　献

1) 科学技術庁資源調査会編：食品添加物の現状と問題点，**57**，1962，大蔵省印刷局

2) 食品添加物公定書注解編集委員会編：第三版食品添加物公定書注解，**83**，1974，金原出版

3) FAO Nutrition Meetings Report Series No. 48A : *WHO/Food Add.*, **170**, 39, 1970

4) 7th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Add : *WHO Techn. Rep.*

Ser., **281**, 3, 1964
5) Datta, P. K. : *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 556, 1962
6) 伊藤　元：薬局，**26**(13)，315，1975
7) Wilson, T.H. : *J. Physiol.* **123**, 116, 1954
8) 藤田秋治：pH 測定の理論と実際，**23**，1953，南江堂
9) 関根隆光，高木　豊：化学の領域増刊号，**34**，21，1962
10) 武内次夫，鈴木正已：原子吸光分光分析，**107**，1970，南江堂
11) 高田成子，本岡　達，植木美智子，小林正光：工業化学誌，**71**(3)，422，1968
12) 小林正光，平田　行，品川睦明：化学の領域，**12**(4)，48，1954
13) 藤田拓男，尾形悦郎，大野丞二，佐々木　哲：カルシウム，64，1970，医歯薬出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 213—217, 1978

縮合メタリン酸塩のウサギ経口投与時の血清無機質およびたんぱく質の変化

山岸達典*, 森本キミ*, 関　博麿**, 大西和夫**
友成正臣**

The Effect of Polymetaphosphate on the Salts and Protein Value in Serum in Rabbit

TATSUNORI YAMAGISHI*, KIMI MORIMOTO*, HIROMARO SEKI**,
KAZUO OHNISHI** and MASAOMI TOMONARI**

緒　言

縮合メタリン酸塩（以下 PMP と略す）の生体内吸収に関する研究の一環として，すでに，本物質と Ca, Mg に関する腸管吸収，出納試験などについて報告した[1-3]．これら一連の実験結果のなかで注目すべき点は *in vitro* 反転腸管法による PMP の吸収実験で PMP の約22～28％が腸管内に吸収され，また *in vivo* で正リン酸塩を PMP に置き換えた飼料で飼育したラットの Ca, Mg および P 出納試験[3]では PMP が腸管膜を通過し，それが生体内で吸収，排泄されていることなどである．これらの点を重視して今回は，PMP をウサギに経口投与した時の血清無機質および血清たんぱく質の消長について観察したので結果を報告する．

実験材料および方法

1. 供試薬品

縮合メタリン酸塩：PMP は市販のヘキサメタリン酸ナトリウム（関東化学製，Lot No 808A3085）を蒸留水に溶解し所定の濃度に調製して使用した．なお，本薬品は五酸化リンとして67％含有し，ほかは食品添加物規格基準に適合するものであった．

2. 実験動物

1) マウス：DD系，雌性，体重 15g 前後のものを300匹購入（日本クレア）し，当所で 1 週間予備飼育して（飼料はオリエンタル酵母製，NMF）実験に供した．

2) ウサギ：成熟雌性，体重 2kg 前後のもの 40 羽を購入（日本クレア）し，2 週間予備飼育し当所の飼育環境にならせた後実験に供した．なお，水（蒸留水）は自由給水とした．

3. 投与，採血および観察方法

1) **マウスの場合**　ウサギに対する PMP の経口投与量を設定するために，あらかじめマウスを用いて PMP の50％致死量を求めた．すなわち，投与した薬量の範囲は，さきに100％生存量と致死量が体重 kg 当りそれぞれ 800 と 10,000mg に求められたことから，この範囲の薬量を等比級数的に 7 段階に分けて投与し，1 群20匹として 7 日間観察しプロビット法[4]により LD_{50} 値を算出した．

2) **ウサギの場合**　ウサギは 1 群 5 例として PMP 400mg/kg 投与群，200mg/kg 投与群，100mg/kg 投与群および蒸留水投与（対照群）の計 4 群にわけ，実験開始15時間前から終了時まで禁餌し，水は自由給水（蒸留水）とした．被検液はカテーテル（0.4×35cm）を用いて強制的に胃内へ 1 回だけ投与した．また採血は耳殻静脈より 1 回量 2.5m*l* とし，第 1 回目の採血は投与前30分，第 2 回以降は投与後15分，30分，1 時間，2 時間，4 時間，6 時間，8 時間および24時間目の計 9 回とした．なお，採血した血液はすみやかに血清を分離し，下記の測定法にしたがって血清中の Ca, P, Mg, Na, K, Cl およびたんぱく質などを測定した．

これら測定物質量の消長は，実測値の変動を確認するため，投与前の実測値に対する投与後の実測値の割合，すなわち，増減率＝{(投与後の値－投与前の値)／(投与前の値)}×100 の平均値と標準偏差を算出し，次いで平

* 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

均増減率曲線を作製した上で，血清中の無機質およびたんぱく質などの変化を観察して検討した．

血清中の Ca, Mg, Na およびKは原子吸光法[5,6]，P は Taussky 変法[7]，Cl は Schales-Schales 法[7]，たんぱく質は Biuret 法[8]などの方法を用いて測定した．

実験成績

1. マウスの50%致死量

PMP 経口投与後のマウスの症状は，軽症の場合は運動量の減少，呼吸数の増加などの症状を示したが，約1～3時間後にこれらの症状は消失し回復した．また重症の場合では興奮状態を示し，旋回，跛行運動，転倒，痙攣などの症状を示し24時間以内にほとんど死亡した．マウスの50%致死量は 4,105mg/kg であり，その95%信頼限界値は 4,922～3,423mg/kg に求められた．これらの結果からウサギの最高投与量はマウス50%致死量の約1/10量にあたる 400mg/kg に定めて本実験を実施した．

2. ウサギ血清中の無機質およびたんぱく質の消長

1) 血清中の Ca, P および Mg 濃度の変化

対照群：対照群の Ca, P および Mg の平均増減率曲線をみると，Ca の変動の推移はわずかであったが，P投与後15分値より24時間値まで低下が持続した．また Mg では2時間値までの変動はあまり差がなかったが，4時間値から低下しそれ以降は約－10%の範囲で推移した．

400mg/kg 投与群：この群の Ca の変動は，対照群のそれと比較して低下する傾向を呈して舟底型の消長を示した．すなわち，投与後30分値（－5.8%）より逐次低下し，これが6時間値（－17.4%）まで下降したが，8時間値（－13.0%）ではやや回復する傾向を示した．だが，24時間値（－7.2%）では投与前の水準値にもどらなかった．Pの変動では上記の Ca の消長と逆の型で推移した．すなわち，Pの変動は投与後次第に上昇し，15分値（＋13.2%），2時間値（＋20.6%）と高くなり，その後下降に転ずる消長を示した．また Mg の変動は一時増加する一峰性の消長で，投与後30分値（＋9.5%）に上昇して2時間値まで持続したが，4時間値では投与前の水準にもどる傾向を示した．

200mg/kg 投与群：本群の Ca, Mg およびPの変動は上述の400mg/kg 投与群のそれらと酷似した消長を示した．しかし Ca の最低値が4～6時間（－13.6～16.7%）にみられた．またPの増加は1時間以内であった．さらに Mg の消長は 400mg/kg 投与群のそれと比べると経時的なずれを示して2時間値（＋13.0%）から上昇を示した．

100mg/kg 投与群：この群の Ca およびPの変動は対照群のそれらと類似した消長を示し，その変動の幅は対照群の平均値と偏差の範囲内であった．しかし Mg の変動では投与後2時間値より若干増加（約9～13%）する傾向を示した．

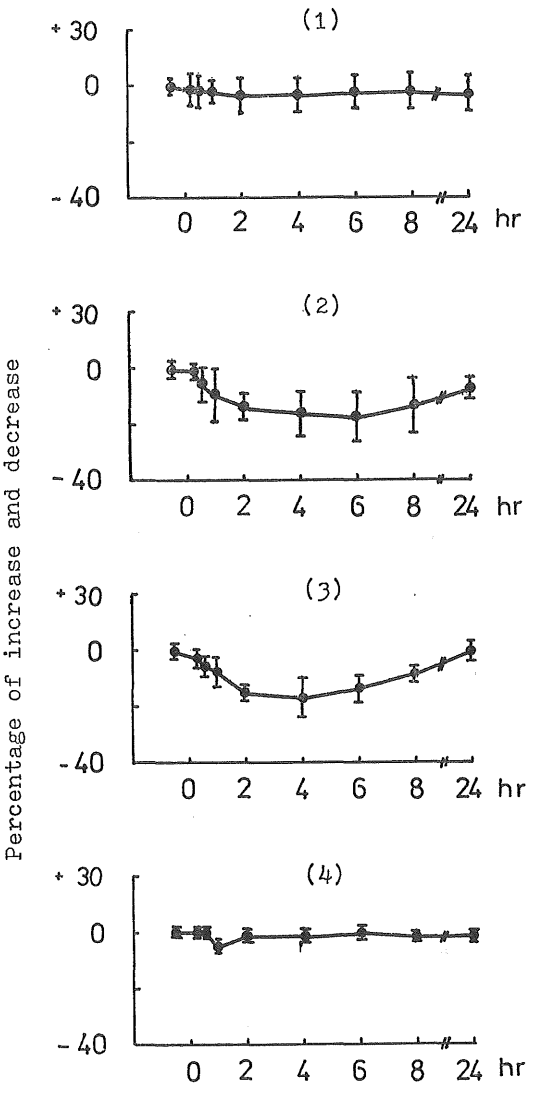


Fig. 1. Calcium Value in Serum
0 time : Administration time
Percentage of increase and decrease
= {(after of administration－before of administration)/before of administration} ×100
1. Control group
2. Administration of PMP 400mg/kg
3. Administration of PMP 200mg/kg
4. Administration of PMP 100mg/kg

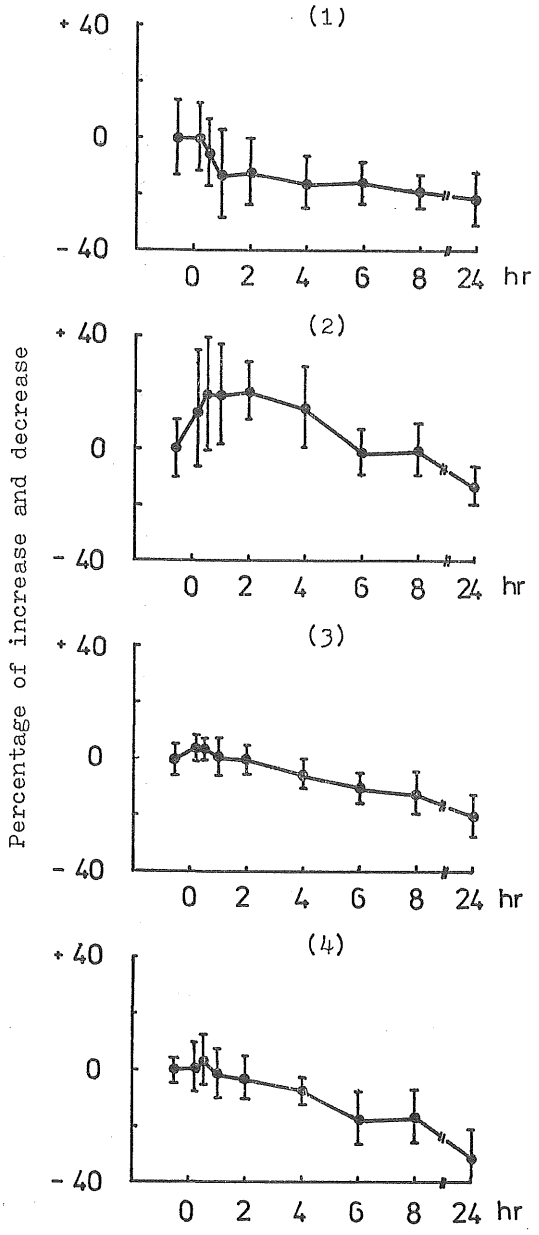


Fig. 2. Phosphorus Value in Serum
0 time : Administration time
Percentage of increase and decrease
= {(after of administration − before of administration)/before of administration} ×100
1. Control group
2. Administrtaion of PMP 400mg/kg
3. Administrtaion of PMP 200mg/kg
4. Administrtaion of PMP 100mg/kg

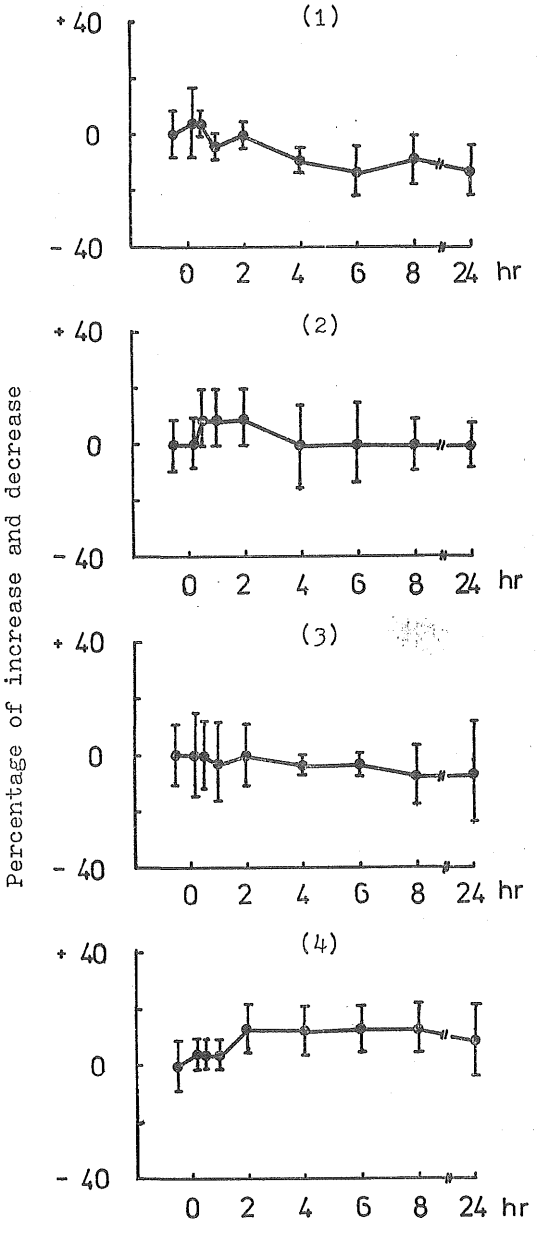


Fig. 3. Magnesium Value in Serum
0 time : Administration time
Percentage of increase and decrease
= {(after of administration − before of administration)/before of administration} ×100
1. Control group
2. Administration of PMP 400mg/kg
3. Administration of PMP 200mg/kg
4. Administration of PMP 100mg/kg

2) **血清中の Na, K および Cl の変化** 対照群：Na および Cl の変動の推移は（±5%以下）とわずかであったが，Kの変動ではその変化の幅が広く，さらに投与後30分値（−7.0%）より低下し8時間値に最低値（−35.1%）を示し，24時間値（−20.6%）でも回復しなかった． 400mg, 200mg および 100mg/kg 投与群：これら投与群の Na, K および Cl の変動は対照群のそれらの場合と同様な消長を示し，薬剤投与群の Na, K および Cl における各時限の平均値ならびに偏差は対照群のそれらと大差ない値を示した．

3) **血清中のたんぱく質の変化** 対照群：血清中のたんぱく質の変動は投与後30分値より徐々に低下し，24時間値で約11%減少した． 400mg, 200mg および 100mg/kg 投与群：これらの各投与群のたんぱく質は対照群のそれと酷似し，これらと対照群の動きとの間には特徴的な差異は認めなかった．

考　　察

本実験の結果を通覧して注目しなければならない点は，縮合メタリン酸塩（PMP）200mg/kg 以上の経口投与で血清 Ca 濃度の減少（平均最低値 −17.4〜−16.7%）および血清 P 濃度の増加（平均最高値 +20.6〜+4.1%）を示すことである．しかも血清 Ca 濃度の減少している持続時間が長い（投与後4〜8時間）という点である．この点について考えてみると，PMP の投与による血清 Ca 濃度の減少，P濃度の増加という現象は，重合度の小さい PMP，つまり，鎖状の短いメタリン酸が腸管から吸収されて，それが血中濃度を高めるため，血清 Ca 濃度が低下するという現象[13]が出現したものと推定される．その第1には，前報[1]の *in vitro* の反転腸管法における実験結果で記述したごとく，PMP は濃度勾配の拡散する機構で腸管膜を通過し，それが約22〜28%腸管内に吸収されること，また *in vivo* の実験における飼料中の正リン酸塩を PMP に置き換えて飼育したラットの Ca, P および Mg 出納試験[3]の結果で報告したように，PMP は腸管から吸収されて，それが体内で正リン酸の場合と同様に代謝されているということである．第2には，過去の実験データからみて，PMP における組成中の重合度（$(NaPO_3)_n$ の n 数は一定していなく，n＝3が多い[9-12]こと，またその組成中の重合度の高い，あるいは鎖状の長いメタリン酸は腸管から吸収されないこと[13]が明らかにされている事実からみて，腸管膜を通過する PMP は重合度の小さいメタリン酸であると考える．

要　　約

縮合メタリン酸塩（PMP）の生体内の吸収に関する研究の一環として，今回は PMP をウサギに経口投与した時の血清無機質および血清たんぱく質の消長について観察した．なお，この際，ウサギに投与する PMP の最高濃度は，あらかじめマウスの50%致死量を求めてから，この値の約1/10量に設定して本実験を実施した．

1. **PMP の経口投与における最高濃度の設定**

PMP のマウス50%致死量値は 4,105mg/kg と求められた．また，その95%信頼限界値は4,922〜3,423mg/kg であった．その結果，本実験でのウサギに投与する最高濃度は50%致死量の約1/10量にあたる PMP 400mg/kg に定めて実施した．

2. **PMP の血清無機質および血清たんぱく質の消長**

1) **血清中の Ca, Mg および P 濃度の変化** 400mg/kg 投与群：本群の血清 Ca 濃度の変化は対照群のそれと比較して低下する傾向で舟底型の消長を示した．また，血清P濃度の変化は，投与後次第に増加して2時間値まで持続したが，それ以降，減少に転ずる消長を示した．さらに，血清 Mg 濃度の変化では投与後一次増加する一峰性の消長を示した． 200mg/kg 投与群：本群の血清 Ca, Mg および P 濃度の変化は上述の 400mg/kg 投与群のそれと類似した消長を示した． 100mg/kg 投与群：本群の血清 Ca, Mg および P 濃度の変化は対照群のそれらと酷似した消長を示し，PMP による特徴的変化は認められなかった．

2) **血清中の Na, K および Cl の変化** 400, 200 および 100mg/kg 投与群：これらの PMP 投与群の Na, K および Cl の変化は対照群のそれらと大差ない変化を示した．

3) **血清中のたんぱく質の変化** 400, 200および 100 mg/kg 投与群：これらの PMP 投与群の血清たんぱく質の変化は対照群のそれと同様な消長を示した．

文　　献

1) 山岸達典，森本キミ，関 博麿，大西和夫，友成正臣：東京衛研年報，29-1，209，1978
2) 山岸達典，森本キミ，堀井昭三，関 博麿，大西和夫：栄養と食糧，31(2)，193，1978
3) 山岸達典，森本キミ，堀井昭三，関 博麿，大西和夫：栄養と食糧，31(5)，465，1978
4) 鳥居敏雄，高橋晄正，土肥一郎：医学，生物学のための推計学，109，1961，東京大学出版会
5) 武内次夫，鈴木正己：原子吸光分光分析，105，1970，南江堂
6) 関口英輔：原子吸光分析による血清 Ca の測定について，20(4)，295，1972
7) 柴田 進，高橋 浩：臨床化学の技術，248，1962，

金原出版
8) 柳沢文正：光電比色計の実際，45，1956，共立出版
9) Van Wzer, J. R. and E. J. Griffith : *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, 6140, 1955
10) 小林正光：*New Food Industry*, 8(6), 1, 1966
11) 小林正光，品川睦明：化学の領域，8(2)，36，1954
12) 高田成子，本岡 達，植木美智子，小林正光：工業化学誌，71(3)，148，1968
13) Nutrition Meetings Report Series No. 48A : WHO/Food Add., 170, 39, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 218—223, 1978

プラスチック製容器・包装の紫外線吸収剤について（第1報） 市販品における使用実態

渡辺悠二*, 佐藤憲一*, 吉田令子*
溝入茂*, 遠藤英美*

Investigation on Ultra-Violet Absorbers in Plastics Food Containers and Packages (I) Survey of the Products on the Market

YUJI WATANABE*, KENICHI SATO*, REIKO YOSHIDA*,
SHIGERU MIZOIRI* and FUSAYOSHI ENDO*

緒言

食品用プラスチック製品には種々の目的で多くの添加剤が使用されており，原料モノマーと共にこれら添加剤の安全性が近年盛んに論議されている．

多くの添加剤のうち，プラスチックの劣化変質の防止には酸化防止剤や紫外線吸収剤等が使用されているが，前者については，昭和51年商品安全対策の一環として，東京都都民生活局の委託により，その使用実態および食品への移行性の調査を行ない，前年度当所年報に報告した[1]．

一方，酸素や紫外線によって起こる油脂の変敗による食中毒の発生を防止するため，昭和52年2月即席めん類の新規格基準が告示された[2]．この規格には即席めんの油脂の酸価は3以下，過酸化物価は30以下と規定され，さらに直射日光を避けて保存しなければならないという保存基準がもうけられている．しかし，プラスチックの多くは紫外線を透過する性質があり[3]，これを防止するために着色または紫外線吸収剤を添加する等の方法が現在行なわれている．

以上のことから，プラスチックの劣化または内容食品の油脂の変敗を防止する目的で，プラスチック製品には紫外線吸収剤が添加されていることが予測されるが，市販品中の紫外線吸収剤の使用実態に関する報告はほとんど見当らない．そこで今回，市販の食品用プラスチック製品（塩素系樹脂を除く）における紫外線吸収剤（光安定剤を含む）の使用実態および内容食品への移行性について調査を行なったのでその結果を報告する．

なお本調査は，東京都都民生活局の委託をうけ，日本食品衛生協会食品衛生研究所並びに東京都薬剤師会衛生試験所と共同で実施したものである．

実験の部

1. 試料

都内デパート，スーパーマーケットおよび小売店等から購入したプラスチック製容器・包装材入り食品34種（1種につき5～10個）および衛生局環境衛生部食品監視課から送付された油性食品類用容器・包装材98種．

2. 試薬・試液

1) クロロホルム，エタノール，*n*-ヘプタン：ガスクロマトグラフィー（以下GCと略す）で妨害ピークのないもの；その他の試薬は特に断わりのない限り特級品を使用した．

2) 塩化第二鉄溶液およびフェリシアン化カリウム溶液：各5％水溶液．

3. 装置

日本分光 IR-G 型赤外分光光度計，柳本 G-80 型ガスクロマトグラフ，日立356型自記分光光度計，日立633型高速液体クロマトグラフ，島津 LKB-9000 型ガスクロマトグラフ-質量分析計．

4. 標準紫外線吸収剤

次の5種を標準品とした．

1) 2-ヒドロキシ-4-*n*-オクトキシベンゾフェノン（以下 Seesorb 102 と略す）：東京化成㈱製．

2) 2(2'-ヒドロキシ-5'-メチルフェニル)ベンゾトリアゾール（以下 Tinuvin P と略す）：日本チバガイギー㈱．

3) 2(2'-ヒドロキシ-3'-t-ブチル-5'-メチルフェニ

* 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

ル）5-クロロベンゾトリアゾール（以下 Tinuvin 326と略す）：日本チバガイギー㈱.

4) 2(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-t-ブチルフェニル）5-クロロベンゾトリアゾール（以下 Tinuvin 327 と略す）：日本チバガイギー㈱.

5) ビス（2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジン）セバケート（以下 Sanol LS-770 と略す）：三共㈱製.

紫外線吸収剤標準溶液は各 1.0% クロロホルム溶液を調製して標準原液とし，以下必要な濃度に適宜稀釈して褐色ビンに貯蔵した.

5. 容器・包装材の樹脂鑑別試験

1) **試料の調製** 内容食品を取り除いたのち検体を十分に洗浄し，風乾後下記の方法により試験片を調製した.

(1) 単層容器 検体を加熱圧延して薄層とし，試験片とする．(2) 多層容器 検体を液体窒素に浸漬して冷却硬化させたのちハンマーで破砕してはく離させて単層とし，各単層を試験片とする．(3) 軟包装材 検体をそのまま試験片として測定したのち，多層と思われる場合さらに検体をクロロホルムに浸漬してはく離させて単層とし，各単層を試験片とする.

2) **樹脂の鑑別法** 試験片について，赤外分光光度計を用いて透過法および多重全反射法により赤外吸収スペクトルを測定し，これを樹脂の標準スペクトルと比較し樹脂の鑑別を行なった.

6. 材質中の紫外線吸収剤の試験

1) **試験溶液の調製** 内容食品を取り除いたのち検体を洗剤液で洗い，ついで十分に水洗し風乾後細切する．その 約4g を 精密に秤り，ソックスレー抽出器に入れ，クロロホルム 120m*l* を用いて水浴中6時間 還流したのち，抽出液は 45° 以下で約 1m*l* になるまで減圧濃縮する．ただし，ポリマーが析出してくる場合は10倍量の石油エーテルまたはメタノールを加えてポリマーを沈殿させたのち，ろ過し，ろ液および洗液を約 1m*l* になるまで減圧濃縮する．冷後クロロホルムを加えて正確に 2m*l* とし，この液を試験溶液とした.

2) **薄層クロマトグラフィー（TLC）による定性**[4]

試験溶液および 0.1% 標準溶液各 40μl を2枚の薄層板（メルク製シリカゲル HF-254）にスポットし，展開溶媒 a．酢酸エチル・石油エーテル（1：9），b．*n*-ヘキサン・ピリジン・酢酸エチル・アンモニア水・メタノール（5：5：5：5：3 の割合の各溶媒を分液ロートにとり振とう後静置し，その上層を使用）を用いておのおの約 15cm 展開する．風乾後，各薄層板について次の方法によりスポットを確認する．a． 254nm の紫外線を照射する，b． ヨウ素蒸気にさらす，c． 5%塩化第二鉄溶液を噴霧し，熱風乾燥後，5%フェリシアン化カリウム溶液を噴霧する．生じたスポットの色調および Rf 値を標準紫外線吸収剤のスポットのそれと比較し判定した．検出限度 5μg/spot.

表 1. 紫外線吸収剤の Rf 値

	Seesorb 102	Tinuvin P	Tinuvin 326	Tinuvin 327	Sanol LS-770
展開溶媒 a	0.48	0.46	0.64	0.68	0
〃 b	0.87	0.79	0.95	0.92	0.41

展開溶媒 a：酢酸エチル・石油エーテル（1：9）
b：*u*-ヘキサン・ピリジン・酢酸エチル・アンモニア水・メタノール（5：5：5：5：3）

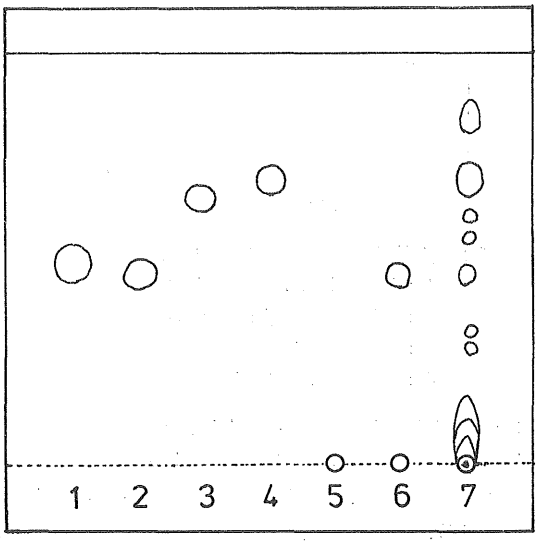


図 1. 紫外線吸収剤の薄層クロマトグラム
1：Seesorb 102, 2：Tinuvin P,
3：Tinuvin 326, 4：Tinuvin 327,
5：Sanol LS-770, 6：検体1（バターケース），
7：検体2（ビールビン用コンテナ）
展開溶媒：酢酸エチル・石油エーテル（1：9）

標準紫外線吸収剤の Rf 値は表1にまた薄層クロマトグラムは図1に示すとおりである.

3) **紫外部吸収（UV）スペクトル法による定性** 試験溶液をクロロホルムまたはメタノール（UV スペクトル用）で適宜稀釈（10ppm 以下）したのち，200～400 nm のUVスペクトルを測定し，得られたスペクトルを標準紫外線吸収剤のスペクトルと比較し判定した．なお各標準紫外線吸収剤の吸収極大波長は，Seesorb 102：

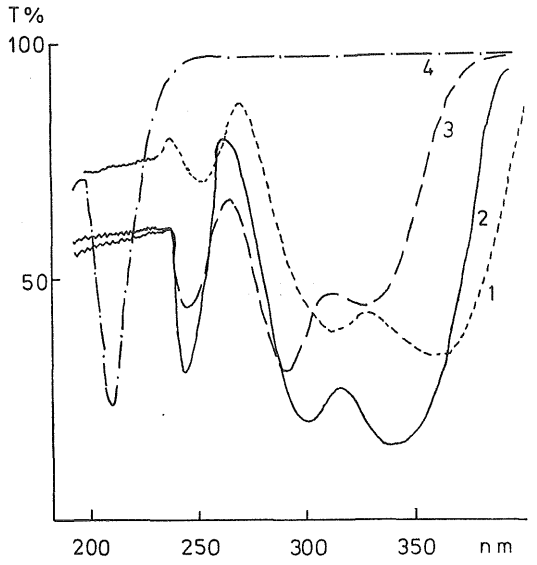


図 2. 紫外線吸収剤の紫外部吸収スペクトル
1 : Tinuvin 326, 327 (in $CHCl_3$)
2 : Tinuvin P (in $CHCl_3$)
3 : Seesorb 102 (in $CHCl_3$)
4 : Sanol LS-770 (in CH_3OH)

289nm, Tinuvin P : 340nm, Tinuvin 326 および 327 : 353nm, Sanol LS-770 : 210nm である.

標準紫外線吸収剤のUVスペクトルは図2に示すとおりである.

4) **高速ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) による定性・定量** 試験溶液について次の条件による GPC を行ない, 同様に操作して得られた標準溶液の示すピークの保持容量から定性を, ピークの高さから検量線を作成し, 定量した.

測定条件 カラム : 8φ×50cm ; ゲル : Shodex A-801; 移動相 : クロロホルム ; カラム入口圧 : 20kg/cm² ; 流速 : 1ml/min ; 検出器 : UV 254nm.

標準紫外線吸収剤のゲルクロマトグラムは図3に示すとおりである.

5) **ガスクロマトグラフ-質量分析 (GC-MS) 法による同定** 前記2), 3), 4)の各方法で紫外線吸収剤が検出された試験溶液について, さらに次の条件による GC-MS を行ない, 得られたマススペクトルを標準紫外線吸収剤のマススペクトルと比較し同定した.

測定条件 カラム : ガラス製 3φ×1m ; 充てん剤 : 3% Silicone E-301/Chromosorb W (AW-DMCS, 60-80 mesh) ; 温度 : 注入口 250°, カラム槽 210°, セパレータ 270°, イオン源 290° ; イオン化電圧 : 70eV ; キャリヤーガス : ヘリウム 25ml/min.

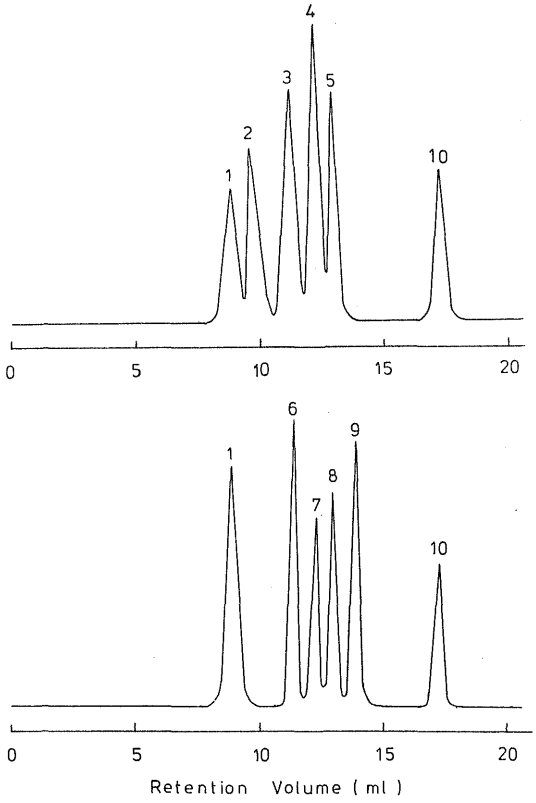


図 3. 紫外線吸収剤および酸化防止剤のゲルクロマトグラム
1 : Irganox 1010, 2 : Irganox 1076,
3 : Topanol CA, 4 : Antage W-300,
5 : BHT (以上酸化防止剤),
6 : Seesorb 102, 7 : Tinuvin 327,
8 : Tinuvin 326, 9 : Tinuvin P (以上紫外線吸収剤), 10 : Benzene

6) **ガスクロマトグラフィー (GC) による定量** 試験溶液について次の2つの条件によるGCをおのおの行ない, 同様に操作して得られた各濃度標準溶液の示すピークの高さから絶対検量線法により検量線を作成し, 定量した.

測定条件 (1) カラム : ステンレス製 3φ×1.75m ; 充てん剤 : 3% Silicone E-301/Chromosorb W (AW-DMCS, 60-80mesh) ; 温度 : 注入口 250°, カラム槽 229° ; キャリヤーガス : 窒素 42ml/min.

(2) カラム : ステレンス製 3φ×1.75m ; 充てん剤 : 5% Dexsil 410GC/Chromosorb W (AW-DMCS, 60-80 mesh) ; 温度 : 注入口285°, カラム槽260° ; キャリヤー

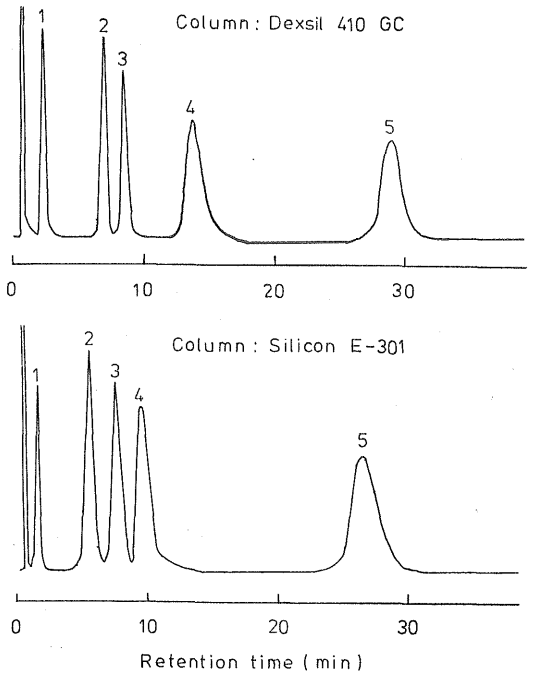


図 4. 紫外線吸収剤のガスクロマトグラム
1 : Tinuvin P, 2 : Tinuvin 326,
3 : Tinuvin 327, 4 : Seesorb 102,
5 : Sanol LS-770

ガス：窒素 38m*l*/min.

標準紫外線吸収剤の(1)および(2)の条件下のガスクロマトグラムは図4に示すとおりである.

7. 材質からの紫外線吸収剤の移行試験

溶出条件は塩化ビニル樹脂製品の規格試験[5]を準用して行なったが，食品類似溶媒としては水，4%酢酸，20%エタノールおよび *n*-ヘプタンを用いた.

1) **試料溶液の調製** (1) 検体に 60° の水，4%酢酸または20%エタノールを満たし（満たせない場合は片面溶出器を用い[6]，2m*l*/cm² の割合の溶媒で浸漬する），60° の恒温槽内で30分間放置して得た液を試料溶液とした.

(2) 検体に *n*-ヘプタンを満たし（満たせない場合は(1)と同様），室温（約25°）で1時間放置して得た液を試料溶液とした.

2) **試験溶液の調製** (1) 水，4%酢酸または20%エタノール各試料溶液 200m*l* を分液ロートにとり，クロロホルム 30m*l* ずつで3回抽出する．抽出液を合わせ，無水硫酸ナトリウムを加え脱水したのちろ過する．ろ液および洗液を合わせ，45° 以下で約 1m*l* になるまで減圧濃縮したのち，冷後クロロホルムを加えて正確に2m*l*

表 2. 試料の内訳およびその材質

容器・軟包装の区別	食品名	材質 内側	材質 中間	材質 外側	検体数
容器	マヨネーズ・サラダ油類	PE	PVA	PE	1
		PE		PVA	1
		PE			1
		PP	PVA	PE	1
		PMA			1
	しょうゆ・ソース類	PE	PVA	PE	2
		PP		PA	2
		PP	PVA	PP	1
		PEs			1
	飲料水	PE			2
	はちみつ	PP			1
	即席めん	PS			10
	電子レンジ用	PMP			1
軟包装	即席めん	PE		PP	17
		PE		C	15
		PE		PEs	2
		PP			1
	ポテトチップ	PP		PP	4
		PP	PE	PP	2
		PP	EVA	PP	2
		PP			1
	せんべい類	PP			16
		PP		PP	8
		PP	PE	PP	4
	かりんとう	PP			13
		PP	PE	PP	3
		PP		C	2
	漬物	PE		PP	3
		PE		PE	1
		EVA		PP	1
	ピーナッツ	PP			3
	揚ボール	PE		PP	1
	その他（赤飯・茶類）	PE		PP	2
		PE		PA	1
		PE	PA	C	1
		PP		C	1
		PP		PA	1
		PP			1
		EVA		C	1

PE：ポリエチレン，PP：ポリプロピレン，PVA：ポリビニルアルコール，PA：ポリアミド，PEs：ポリエステル，PMA：ポリメタアクリル，PMP：ポリメチルペンテン，EVA：エチレン-酢酸ビニル共重合物，C：セロファン

とし，これを試験溶液とした．ただし，材質中標準紫外線吸収剤 Sanol LS-770 を含む検体の4％酢酸試料溶液の場合は，試料溶液を10％ NaOH で pH 6～7 に中和したのちクロロホルムで抽出し，以下同様の操作を行なう．

(2) *n*-ヘプタン試料溶液 200m*l* をとり，45° 以下で約 1m*l* になるまで減圧濃縮したのち，冷後クロロホルムを加えて正確に 2m*l* とし，これを試験溶液とした．

3) **定量** 各試験溶液について，6.6) の材質中の紫外線吸収剤のＧＣによる定量の項に準じて行ない，別に同様に操作して得られた各紫外線吸収剤の検量線を用いて定量した．

4) **回収率** 上記の操作における回収率は 95～105％である．ただし，標準紫外線吸収剤 Sanol LS-770 を含む4％酢酸試料溶液の場合は70％であった．

結果と考察

1. 容器・軟包装材の材質について

樹脂の材質鑑別の試験の結果は表2に示すとおりである．

その結果，容器の場合（25検体），材質が単層のもの17（68％），二層のもの3（12％），三層のもの5（20％）で，即席めんには単層ポリスチレンが，他の食品では食品と接触する内面にポリエチレン（以下ＰＥと略す）またはポリプロピレン（以下ＰＰと略す）が多用されている．次に軟包装材の場合（107検体），材質が単層のもの33（31％），二層のもの62（58％），三層のもの12(11％)で，食品と接触する内面は容器と同様ＰＥ（50％）またはＰＰ（49％）がほとんどで，ポリオレフィン系が多用されている．なお単層のものの材質は全てＰＰで，かりんとう，ピーナッツおよびせんべい類に用いられている．また即席めんにはＰＥとＰＰまたはセロファンとのラミネート製品が，他の食品ではＰＰあるいはＰＰと他のプラスチックとのラミネート製品が用いられていることが判明した．

2. プラスチック製品中の紫外線吸収剤の試験法について

(1) 製品からの抽出方法 ポリエチレン粉末原料に紫外線吸収剤 Tinuvin P を0.07％添加混合したのち加熱圧延してフィルムをつくり，これを試料として各種溶媒による抽出性をみたところ，攪拌しながら室温，1時間浸漬の抽出条件でクロロホルムおよびエチルエーテルの場合ほぼ100％の回収が得られた．従って，クロロホルムで6時間のソックスレー抽出を行なった場合同程度の抽出は十分に得られるものと思われる．

(2) 高速ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）について プラスチック用添加剤には高分子量で難揮発性のものも多く，通常行なわれるＧＣには適さない場合がある．このため添加剤の分離・定量法として近年高速 GPC が行なわれており[7]，今回紫外線吸収剤および酸化防止剤について本法を行なってみた．本法は分子サイズの差を利用した分子ふるいによる分離法であり，有機溶媒用充てん剤として一般にポリスチレンゲルや多孔性ガラスが用いられ，ゲルの細孔の大きさによって対象となる物質の分子量範囲が決まる．そこで今回は添加剤の分子量がほとんど1,000以下であることから，排除限界1,000のゲル（Shodex A-801）を用いて行なった．なお本法の場合移動相および流速にあまり選択性がなく，測定条件が限定される．今回使用したゲルの場合，使用できる移動相はテトラヒドロフラン，クロロホルムおよびトルエン等で，また最も良い分解能が得られる流速は 1.0～1.5m*l*/min となり，図3に示されるように試料注入後約17分間に溶媒に溶解している全物質が溶離してくる．しかも最初の物質（分子量1,000以上のものが1つのピークとして現われる）から最後の物質（分子量が最も小さいもの）が溶離してくる時間はわずか8分である．従って，本法での定性はＵＶモニターによる保持時間（または保持容量）のみで行なった場合判定を誤まる恐れがあり，ＵＶと同時に屈折率を測定してその相対感度比を求めて行なうか，または他の分析法（TLC等）を併用して行なう必要がある．しかし，本法は未知物質の分子量の推定や IR, NMR, MS 等同定のための試料の精製手段として極めて有効であり，プラスチック製品中の添加剤の分析法として十分に活用されてよい．

3. プラスチック製品中の紫外線吸収剤の使用実態および食品移行

今回の調査にあたって事前調査を行なったところ，ポリオレフィン等衛生協議会の自主規制基準[6]収載品目のうち5種（Seesorb 102, Tinuvin P, Tinuvin 326, Tinuvin 327, Sanol LS-770）が繁用されていることが判明したので，今回はこの5種を対象とした使用実態調査を行なった．

その結果，軟包装材（107検体）では紫外線吸収剤が全く検出されず，容器（25検体）でわずか1検体検出された．この1検体はメタアクリル樹脂製のバターケースで Tinuvin P が 230ppm 検出された．しかし，この検出量は業界の自主規制値（添加量 0.2～0.5％ 以下）の1/10～1/20の量であり，またバターケースが冷暗所での使用であることから推察すると，この製品は他の製品用にブレンドした原料を一部流用して製造されたものではないかと思われる．従って食品用プラスチック製品には

紫外線吸収剤はほとんど添加されていないことが判明した．これは食品が流通過程や販売時において直射日光にさらされにくい状態にあること等から，紫外線吸収剤を添加する必要がないことによると思われる．そこでちなみに比較的直射日光にさらされるビールおよびジュースビン用コンテナについて試験したところ，Tinuvin 327が各々 1,030, 2,380ppm 検出された．

以上の結果を昭和51年に行なった酸化防止剤の使用実態調査結果[1]と合わせ考えると，食品用プラスチック製品における品質劣化防止剤としては紫外線吸収剤は使用されず，酸化防止剤のみが使用されていることが明らかとなる．そしてまた現在，業界の自主規制基準（ポジティブリスト）には紫外線吸収剤約10種，酸化防止剤約20種が収載されているが，調査の結果から明らかなように，このうち実際に使用されているものは酸化防止剤約6種にすぎず，業界においても，今後使用されていない添加剤は削除する等ポジティブリストの見直しを行なう必要があろう．従って，内容食品の油脂の変敗の防止のためには，何らかの防護措置がとられる必要がある．

次に材質からの移行試験の結果，Tinuvin P が 230 ppm 検出されたバターケースの場合，食品類似溶媒：水，4％酢酸，20％エタノールによる 60°，30分間放置および *n*-ヘプタンによる 25°，1時間放置の溶出条件下でいずれも溶出は認められなかった（検出限度 0.05 ppm）．またバターケースの使用条件を考慮し，さらに長期保存試験（*n*-ヘプタンによる 4° および 25°，2週間放置）を行なったが，いずれも溶出は認められなかった．

以上の結果，食品用プラスチック製品においては紫外線吸収剤はほとんど添加されず，また移行性もないことから衛生上の問題はないものと考えてよい．

ま と め

都民生活局より，食品用プラスチック製品中の紫外線吸収剤の安全性に関する調査を委託され，昭和52年8月より紫外線吸収剤の使用実態および内容食品への移行性について調査を行なった．その結果，132検体（即席めん，ポテトチップ，せんべい，かりんとう，漬物等用軟包装材およびマヨネーズ，サラダ油，しょうゆ等用容器）中紫外線吸収剤が検出されたものはわずか1検体（バターケース）で，材質中 Tinuvin P が 230ppm 検出された．従って，食品用プラスチック製品には紫外線吸収剤はほとんど添加されていないものと考えられる．しかし，ビールビン用コンテナ等比較的直射日光にさらされる製品には添加されていることがわかった．また移行試験においては水，4％酢酸，20％エタノール（いずれも 60°，30分間放置）および *n*-ヘプタン（25°，1時間放置）にいずれも溶出は認められなかった（検出限度0.05 ppm）．

謝辞 本調査を行なうにあたり，御指導いただいた日本食品衛生協会食品衛生研究所副所長 岡田太郎氏，東京都薬剤師会衛生試験所所長 藤居瑛氏並びに御協力いただいた都民生活局消費生活部商品安全課および衛生局環境衛生部食品監視課の各位に深謝いたします．

文 献

1) 渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，遠藤英美：東京衛研年報，28-1，169，1977
2) 厚生省告示第17号，昭和52年2月18日
3) プラスチックフィルム研究会編：プラスチックフィルム，204，1976，技報堂
4) Woggon, H. and D. Jehle : *Z. Lebensmitt. Untersuch.*, 136, 77, 1968
5) 厚生省環境衛生局監修：食品衛生小六法，640，1977，新日本法規出版
6) ポリオレフィン等衛生協議会編：ポリオレフィン系およびポリスチレン系合成樹脂製食品容器包装等に関する自主規制基準，1974
7) 竹内次夫，森 定雄：ゲルクロマトグラフィー＜応用編＞，186，1972，講談社

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 224—229, 1978

プラスチック製容器・包装の紫外線吸収剤について（第2報）　包装食品の光劣化

溝入　茂*, 渡辺悠二*, 佐藤憲一*
吉田令子*, 遠藤英美*

Investigation on Ultra-Violet Absorbers in Plastics Food Containers and Packages (II) Light-induced Deterioration of Packed Food

SHIGERU MIZOIRI*, YUJI WATANABE*, KENICHI SATO*,
REIKO YOSHIDA* and FUSAYOSHI ENDO*

緒　言

市販プラスチック製食品容器・包装についての実態調査の結果，第一報のように食品包装材には紫外線吸収剤は含まれていないことが明らかになった．しかし，最近の味覚嗜好の変化に伴い，ポテトチップス等の油脂食品が大量に市場に出回っていることを考えるならば，食品包装の光透過性が内容食品の油脂の変敗になんらかの影響を及ぼすものであるか否かを見極める必要がある．

油脂が酸化，変敗して生体に有害作用を及ぼすことは古くから知られている[1]．変敗の度合は過酸化物価（以下POVと略す）あるいはカルボニル価，酸価（以下OVと略す）の定量により追跡されている．追跡挙動は飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸とで若干異なり，不飽和脂肪酸の場合はPOVは初期に急激に上昇し，その後下降する過程をたどる．一方飽和脂肪酸の場合はPOVが蓄積される傾向にある．しかしいずれにしろ，POVの大きい油脂が生体に有害であることは各種動物実験によって明らかにされており，そうした油脂類の摂取を少なくするために流通および小売段階での油脂の変敗防止は極めて重要なことである．

紫外線吸収剤は元来，プラスチックの耐光性の向上のために開発，使用されているものであるが[2]，食品保存の立場からもその紫外線遮断能により内容食品を保護するという働きが期待される[3]．殊にポテトチップス等のスナック食品類の場合，内容食品が見えるように包装，販売されている場合が多いので，ほとんど着色を伴わないで紫外線を遮断できるとすれば，少なくとも紫外線に起因する油脂の変敗は防止できるという意味で極めて有用なわけである．

そこで今回，市販のプラスチック製袋詰油脂食品について，容器包装には紫外線吸収剤が含まれていないという事実を踏まえた上で，屋外暴露された場合，内容食品の油脂の変敗がどのような過程で進行するかを調べてみた．

実　験

試料として用いた油脂食品10種類は表1に示す．包装材の材質の決定は日本分光 IR-G 型赤外分光光度計で透過法および反射法を併用して行なった．紫外部および可視部の透過率は日立356型分光光度計を用いて測定した．

POV, OV の測定は厚生省告示即席めん類の項を準用し，測定試薬の濃度は，POV 測定用チオ硫酸ナトリウム溶液については 0.01N～0.1N，OV 測定用アルコール製水酸化カリウム溶液については 0.025N～0.1N のものを適宜用いた．

検体は3つのグループに分け，1カ月，2カ月，3カ月毎に POV, OV を測定した．

①屋外暴露　好天の日，9時30分より16時30分の間直射日光に検体をさらす．この場合各月の日光照射時間は，100～110時間であった．

②室温暗所放置　箱詰め後室内に放置．

③低温暗所放置　箱詰め後約10℃の部屋に放置

各測定値は3個平均の値を充てた．

結　果

POV, OV の測定値を表2～6，および図1～4に示す．包装材の紫外部透過率は図5に，検体4，5，6，の主な着色部分の可視部透過率は図6に示す．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. 購入した油脂食品

検体番号	名称		製造年月日	包装形態 材質	包装形態 透明部分(*)
1	米菓，歌舞伎揚	A株式会社	52—12—02	pp(**)，多層	65(%)
2	米菓，ぼんち揚	B株式会社	52—11—25	pp，単層	94
3	米菓，ともだち	C株式会社	52—12—03	pp，単層	96
4	サッポロポテト	D株式会社	52—12—01	pp，Urethane	21
5	菓子，のり付き塩味ポテトチップス	E株式会社	52—11—28	pp，多層	10
6	菓子，ポテトチップス	F株式会社	52—11—25	pp，多層	25
7	菓子，おらんだかりんとう	G株式会社	52—11—28	pp，単層	77
8	菓子，新落花生	H支店	—	pp，単層	96
9	バターピーナッツ	I株式会社	52—11—19	pp，多層	83
10	皮フライ	I株式会社	52—11—30	pp，単層	71

(*) 包装面のうち，印刷部分，ステッカー貼付部分を除く残りを透明部分とする
(**) pp＝ポリプロピレン

表 2. 油脂食品の酸価，室温，暗所放置下での経時変化

No.	Time, months 0	1	2	3
1	0.71	0.72	0.92	0.74
2	1.4	1.4	1.4	1.4
3	1.3	1.5	1.7	3.1
4	0.1	0.1	0.1	0.1
5	0.66	0.62	0.66	0.60
6	2.2	2.3	2.2	2.3
7	0.81	0.97	0.88	1.0
9	1.1	0.96	0.91	1.3
10	1.9	1.7	1.8	2.1

表 3. 油脂食品の過酸化物価，室温，暗所放置下での経時変化

No.	Time, months 0	1	2	3
1	2.3	4.2	6.0	7.3
2	5.9	9.3	12	11
3	14.1	58.7	117	258
4	1.3	1.8	5.7	3.9
5	2.5	7.4	7.8	11
6	5.1	6.3	10.0	7.0
7	3.4	4.0	8.5	11
9	35.0	56.0	77	80
10	11.8	15.4	24	31

表 4. 油脂食品の酸価，屋外暴露による経時変化

No.	Time, months 0	1	2	3
1	0.71	0.74	2.6	7.2
2	1.4	2.1	9.1	17.6
3	1.3	4.3	12.7	20.0
4	0.1	0.1	0.1	0.1
5	0.66	0.64	1.0	6.3
6	2.2	2.3	3.0	10.0
7	0.81	0.99	1.0	6.3
8	0.46	0.43	0.67	1.5
9	1.1	1.0	1.2	2.8
10	1.9	2.2	3.1	6.1

表 5. 油脂食品の過酸化物価，屋外暴露による経時変化

No.	Time, months 0	1	2	3
1	2.3	91.4	348	608
2	5.9	339	670	658
3	14.1	546	687	600
4	1.3	19.6	53	125
5	2.5	170	432	477
6	5.1	253	540	763
7	3.4	25.5	73	140
8	23.5	66.5	156	250
9	35.0	93.2	205	309
10	11.8	108	226	399

表 6. 油脂食品の酸価および過酸化物価，低温，暗所放置下での経時変化

	Time, months		Time, months	
	0	2.3	0	2.3
1	0.71	0.89	2.3	4.9
2	1.4	1.3	5.9	7.5
3	1.3	1.3	14.1	25.7
4	0.1	0.1	1.3	2.4
5	0.66	0.61	2.5	4.7
6	2.2	2.2	5.1	5.6
7	0.81	0.92	3.4	4.9
8	0.46	0.45	23.5	57.0
9	1.1	1.2	35.0	61.6
10	1.9	1.9	11.8	18.6

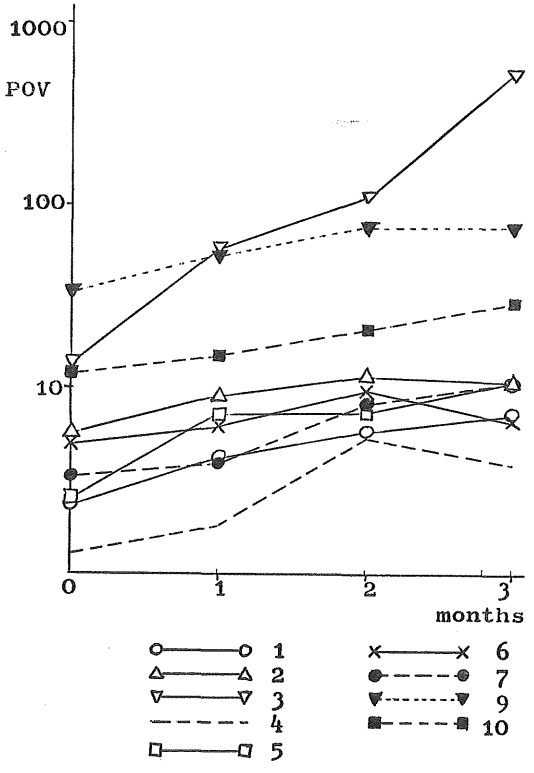


図 1. 油脂食品の過酸化物価，室温暗所放置下での経時変化

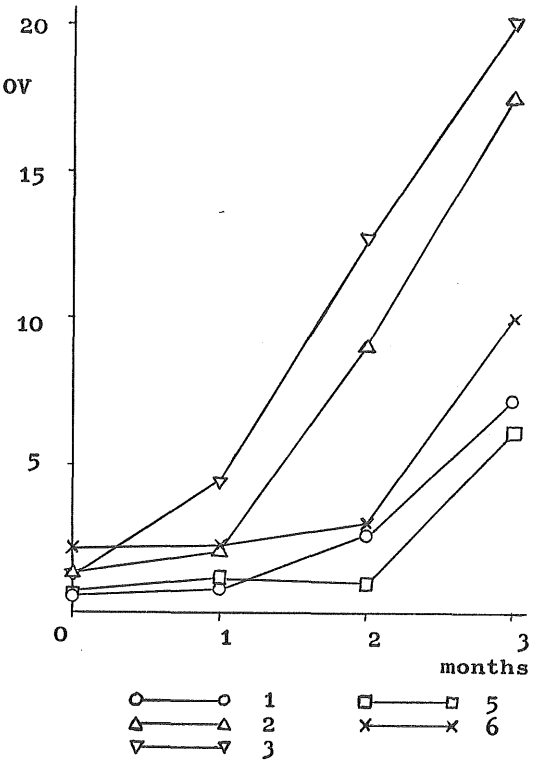


図 2-1. 油脂食品の酸価，屋外暴露による経時変化

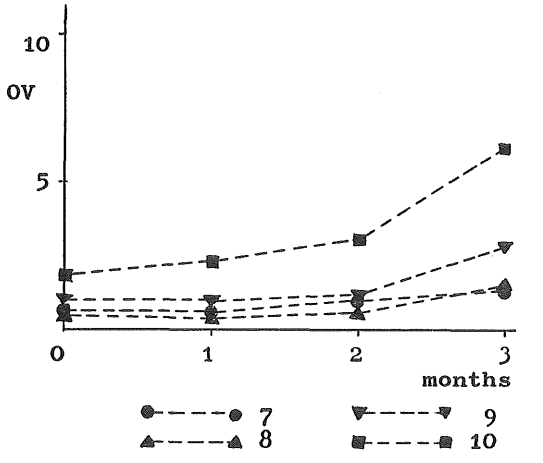


図 2-2. 油脂食品の酸価，屋外暴露による経時変化

考　　察

一般に食用油脂の酸化過程は最初に過酸化物が生じ，反応が進むかたちで酸ができ，結果的に種々の酸敗現象を示す．実際図2，図3を比べればわかるように，OV のたちあがりは POV をうけたかたちでおこっており，したがって油脂の変敗過程を POV との関連で考えてみる．

測定に供した検体をつぎのように3つのグループにわ

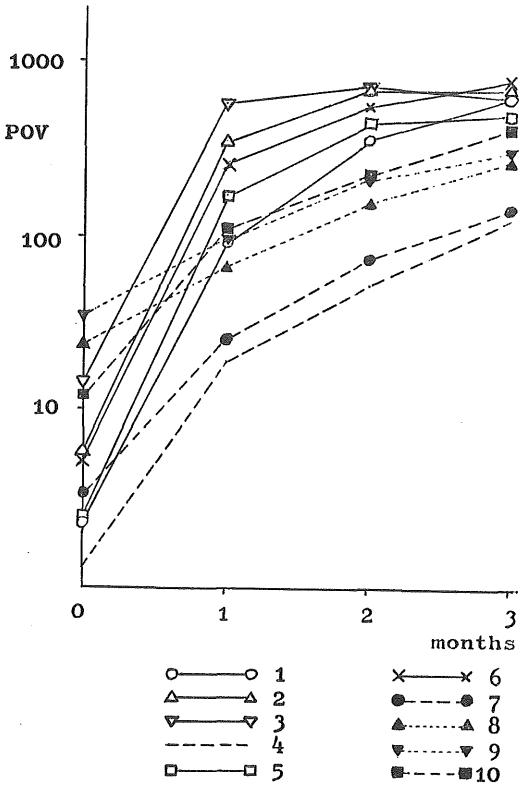


図 3. 油脂食品の過酸化物価，屋外暴露による経時変化

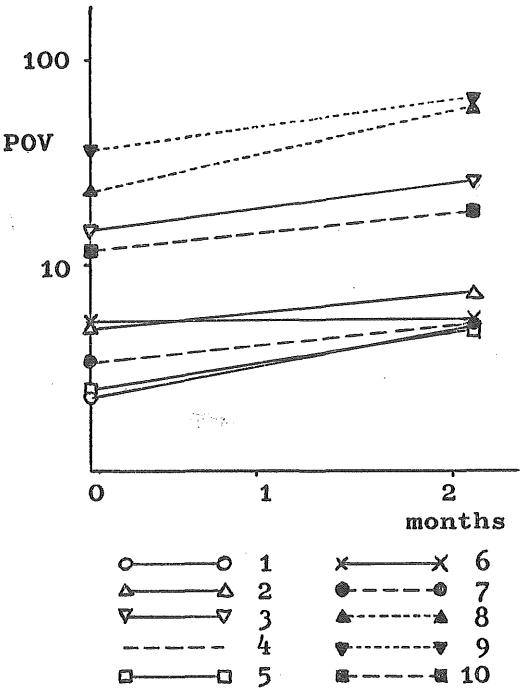


図 4. 油脂食品の過酸化物価，低温暗所放置下での経時変化

ける．

A　1, 2, 3, 5, 6.

B　8, 9.

C　4, 7, 10.

Aは揚げ菓子，Bは油処理をうけていない油脂食品，Cは揚げ菓子ではあるが，Aと若干性状の異なるものである．図3の屋外暴露の結果から明らかなように，Aの5種は最初の POV の違いにかかわらずほぼ同じ変化過程をたどって，3カ月後には600～700の水準で飽和に達している．これらの包装材の性状に着目すれば，検体1は295nm カットオフで短波長域不透明，検体2は短波長域でも比較的透明，また検体5の透明部分10%に対し検体3の透明部分は96%，あるいは検体5，6のように印刷部分が多いものについては，その印刷面の可視域透過波長の相違，さらには，検体2のような単層フィルムに対する検体6のような複合フィルムに起因する各フィルムの気体透過度の違い等，Aグループ5種の包装形態は検体毎に様々に異なるものであるが，内容食品の油脂の変敗はこうしたことに全く無関係に同様に進行しており，結局このことは，少なくとも直射日光下という条件

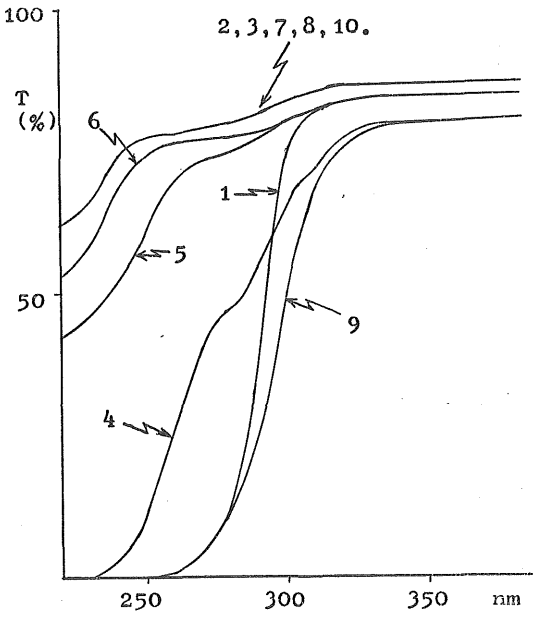


図 5. 油脂食品の包装透明部分の透過率

表 7. 食用油脂の特性値および脂肪酸組成

	落花生油	綿実油	トウモロコシ油	ナタネ油	サフラワー油	大豆油
けん化価	189—196	189—198	187—195	168—181	186—198	189—195
よう素価	80—106	99—119	103—128	94—120	135—150	120—143
脂肪酸組成						
ミリスチン酸	1.0	0.5—2.0	1.0	1.0	1.0	0.5
パルミチン酸	6—14	17—29	8—19	0.5—5.0	2—10	7—12
ステアリン酸	2.0—6.5	1.0—4.0	0.5—4.0	0.5—3.0	1.0—6.0	2.0—5.5
*9-ヘキサデセン酸	1.0	0.5—1.5	1.0	1.0	0.5	0.5
* オレイン酸	40—72	13—44	19—50	9—40	7—42	20—50
*9, 12-オクタデカジエン酸	13—38	33—58	34—62	11—29	55—80	35—65
*9, 12, 15-オクタデカトリエン酸	0.5	0.5	1.0	5—12	3.0	2—13

無印　飽和脂肪酸
　*　不飽和脂肪酸

FAO/WHO 食品規格委員会食用油脂規格（案）より

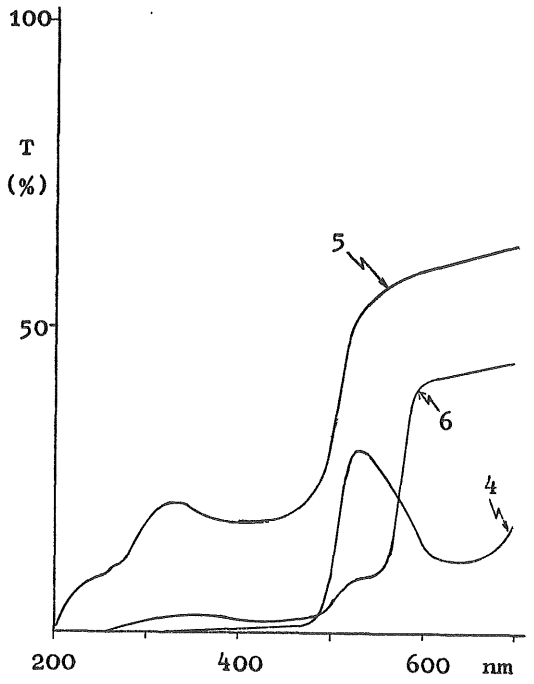


図 6. 油脂食品の包装印刷着色部分の透過率

ではフィルムを主体とする包装による内容食品の油脂の保護は極めて困難なことを示している[4]．

一方，Bの2種は初期値は高いが，その後の増加過程は緩やかである．表1から明らかなように，包装材はAに比して別段の特徴もなく，揚げ油の原料となる主な油と落花生油の間にも大きな違いはない（表7）．図1の熱的酸化過程をみれば，A，B共に同様の過程をたどっていることから，A，B間のこの増加傾向の違いは油脂本来の性質によるものではなく，内容食品の油脂の分布の違いに基づく日光の影響力の差，すなわち，Aは全体が薄くて多孔性であり日光の到達がよいのに対してBはバルキーな形態のため日光の深部への到達が妨げられたという効果がこういう結果として作用したと考えるべきであろう．しかしいずれにしろ包装が油脂の変敗に影響を与えた様子は見られない．

検体7は極めて色が濃く，検体10はそらまめを油で揚げたものゆえ，それぞれA，Bの中間的な挙動を示すと考えられる．検体4は淡い色の揚げ菓子であり，POVの変化はAに近いが，OVはいずれの条件にても0.1以下という結果を与えており，POV，OV共に低い極めて良質の油を原料に使ったことがこういう結果として反映しているのかもしれないが，確証はない．しかし，この3つの場合についても，包装が油脂の変敗になんらかの阻止作用を及ぼした様子はみられない．

それでは，これらの包装に紫外線吸収剤処理を施せば油脂の変敗をいくらかでも遅らせることができるかということであるが，印刷面でおおわれた検体いわば包装表面の紫外線透過能の低い検体が，その印刷面の性状とは無関係に変敗していることを考えれば，否定的な答えをださざるを得ない．

結論として，今回選んだ10種の検体のように，プラスチックフィルム包装の油脂食品について，直射日光暴露下では，包装材の殊に透光性と関連した様々な性状の違いは，油脂の変敗に対して有効な阻止作用を示すほどのものではないといえる．

ところで，油脂分を多く含む菓子についてはその製造，取扱いに関する通達がだされており（昭和52年11月16日，環食第248号）それによると菓子の管理について

は次の（a）および（b）に適合するよう指導されている．

（a）菓子は，その製品中に含まれる油脂の酸価が3を超え，かつ，過酸化物価が30を越えるものであってはならない．

（b）菓子は，その製品中に含まれる油脂の酸価が5を越え，または過酸化物価が50を越えるものであってはならない．

今回の実験結果をこの通達にそって考えるならば，日光暴露の条件では1カ月以内にほとんどの検体が（b）に触れる．一方，暗所放置したものについては，3カ月経過後もほとんどの検体が基準内におさまっている．このことから，現在のようなフィルム包装の油脂食品を取り扱うについては，例えば店頭販売等日光暴露を伴うような管理は絶対に避けるべきであることが要請される．

文　献

1) Tappel, A. L. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**, 266, 1955

2) Evans, B. W. and G. Scott : *Eur. Polym. J.*, **10**, 453, 1974

3) 小笠原啓太郎，波多野汎，小笠原政次，鮎川二郎：日本食品衛生学会第35回学術講演会講演要旨集，p 4

4) 小林　晃：食品工業別冊，125，1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 230—233, 1978

ロングライフミルク容器の衛生化学的考察（第1報） 長期保存による溶出試験

佐藤憲一*, 渡辺悠二*, 吉田令子*, 遠藤英美*

Hygienic Chemical Studies of Long Life Milk Package (I) Migration on Long Term Storage

KENICHI SATO*, YUJI WATANABE*, REIKO YOSHIDA* and FUSAYOSHI ENDO*

はじめに

ロングライフミルク（以下ＬＬ牛乳と略す）は長期保存牛乳と訳され，牛乳を超高温で瞬間殺菌し，無菌的にポリエチレン（以下ＰＥと略す）加工紙製容器に充てんしたものである．ＬＬ牛乳に使用される容器はＰＥ層の間にアルミ箔をサンドウィッチ状にはさんだ5層のＰＥ加工紙製容器で，光・空気等の影響を受けにくい構造になっている．このため今までの牛乳に比べ，冷蔵庫なしでかなり長期間保存できるという利点がある．また牛乳に限らず，その他の液体食品にも様々なＬＬタイプの製品が開発され[1]，生産・流通・消費に大きな変化をもたらす可能性を秘めている．従来ＬＬ牛乳について品質および細菌学的な検討はかなり綿密に行なわれてきている[2-4]が容器についての検討はあまりなされていない．そこでＬＬ牛乳用容器について衛生化学的な面から，長期保存による溶出試験を実施したので報告する．

実験の部

試料 現在ＬＬ牛乳用容器に使用される多層のＰＥ加工紙は，日本においてはテトラパック社のみで製造しており，同社から 1*l* のＬＬ牛乳用成型容器の提供を受け試料とした．

試薬 特に記載するほかは試薬特級を用いた．

装置 日本ジャーレルアッシュ AA-1MK·II 型原子吸光分光分析計，日立356型2波長自記分光光度計，日立 MPF-4 型分光ケイ光光度計，日本分光 IR-G 型回折格子赤外分光光度計，日立163型ガスクロマトグラフ，日立635型高速液体クロマトグラフ

試料溶液の調製 ＬＬ牛乳用容器に浸出溶液として水，4％酢酸，20％エタノール，*n*-ヘプタンをそれぞれ 1*l* 入れ，塵が入らないように開口部を密閉し，室温で2，4，6，12，24週間放置した．

試験法 1. **過マンガン酸カリウム（$KMnO_4$）消費量** 水を用いて調製した試料溶液について，「食品衛生法」の合成樹脂製器具および容器包装の規格試験[5]の項，$KMnO_4$ 消費量の試験法に従って行なった．

2. **蒸発残留物** 水，4％酢酸，20％エタノール，*n*-ヘプタンを用いて調製した試料溶液について，上記1 $KMnO_4$ 消費量と同じく，規格試験の項，蒸発残留物の試験法に従って行なった．

3. **アルミニウム** 上記2蒸発残留物試験において得られた残留物に 1NHCl を 10m*l* 加えて溶かし，この液について原子吸光分析法により亜酸化窒素・アセチレン炎を用いて 2852Å でアルミニウムの測定を行なった．別に原子吸光用アルミニウム標準液（和光製）を用い，同様に操作して得た検量線から定量した．

4. **紫外部吸収（ＵＶ）スペクトル** *n*-ヘプタンを用いて調製した試料溶液を 200m*l* とりロータリーエバポレーターで *n*-ヘプタンを留去し，残留物にドータイトスペクトルゾール用 *n*-ヘキサン 10m*l* を加え試験溶液とし，自記分光光度計により 200～400nm のＵＶスペクトルを測定した．

5. **ケイ光スペクトル** 上記4ＵＶスペクトル試験において調製した試験溶液を用い，ケイ光光度計により 290nm を励起光として 300～500nm のケイ光スペクトルを測定した．

6. **赤外吸収（ＩＲ）スペクトル** *n*-ヘプタンを用いて調製した試料溶液 200m*l* をロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮したのち，真空デシケーター中で

* 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

n-ヘプタンを完全に除去した．ついで極く少量のドータイトスペクトルゾール用クロロホルムに溶かし，これをＩＲ窓板用 KBr の上に薄層ができるように流したのち，風乾後真空デシケーター中でクロロホルムを除去して赤外分光光度計によりＩＲスペクトルを測定した．

7. ガスクロマトグラフィー（ＧＣ） *n*-ヘプタンを用いて調製した試料溶液を 200m*l* とりクデルナダニッシュ濃縮器を用いて *n*-ヘプタンを留去し，残留物に残留農薬用 *n*-ヘキサン（和光製）10m*l* を加えて試験溶液とし，以下の条件でＧＣを行なった．測定条件　充てん剤：3％ SE-52 Chromosorb W·AW-DMCS 60～80 mesh，カラム：ステンレス 3mm×2m，カラム温度：90～290° 10°/min，注入口温度：290°，キャリヤーガス：窒素 30m*l*/min，検出器：FID，感度：10×32，注入量：5μl．別に同様な条件で C_{10}～C_{28} の *n*-パラフィン（東京化成製）を用い，内部標準物質としてピレン（Eastman Kodak 製）25ppm を含む *n*-パラフィン標準液についてＧＣを行ない検量線を作製した．

8. 高速ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC） *n*-ヘプタンを用いて調製した試料溶液を200m*l* とりロータリーエバポレーターで *n*-ヘプタンを留去し，残留物に液体クロマトグラフィー用テトラヒドロフラン（関東化学製）10m*l* を加えて試験溶液とし，以下の条件で GPC を行なった．測定条件　充てん剤：Shodex GPC A-802，カラム：8mm×50cm 2本，移動相：テトラヒドロフラン，流速：1m*l*/min，カラム入口圧：20 kg/cm^2，検出器：ＲＩ，感度：16，チャートスピード：5mm/min．別に同様な条件で C_{30}，C_{35}，C_{40}，C_{44} の *n*-パラフィン（東京化成製）を含む標準液を測定し，分子量分布を求める検量線を作製[6]した．

結果と考察

アルミニウムについては各保存期間とも検出されず，ピンホール等による溶出は認められなかった．

$KMnO_4$ 消費量については保存期間の違いによる差は認められず，いずれも 1ppm 以下で易酸化性物質の溶出はわずかであった．

蒸発残留物の結果を表１に示す．これによると水，４％酢酸，20％エタノールについては保存期間あるいは浸出溶液の種類の違いによる差は認められず，5ppm 以下であった．しかし *n*-ヘプタンを試料溶液とした場合は長期間保存したもの程高い値を示し，6 週間で34.28ppm と 30ppm を超え，12週間で 35.53ppm，24週間で 36.67 ppm と 30～40ppm で平衡に達するように思われる．ここで *n*-ヘプタンによる蒸発残留物について，「単純」に *n*-ヘプタンを脂肪分 100％ と仮定し牛乳中の脂肪４％，

表 1. 蒸発残留物

試料溶液	週 (ppm)				
	2	4	6	12	24
水	4.67	2.95	1.93	2.38	2.17
４％酢酸	5.08	2.23	0.88	1.15	4.58
20％エタノール	1.33	3.20	2.01	1.63	3.75
n-ヘプタン	18.67	24.75	34.28	35.53	36.67

表 2. 脂肪含有率による蒸発残留物の比較

	脂肪分 %	週 (ppm)				
		2	4	6	12	24
n-ヘプタン	100	18.67	24.75	34.28	35.53	36.67
牛　乳	4	0.75	0.99	1.37	1.42	1.47
クリーム	20	3.73	4.95	6.86	7.11	7.33

クリーム中の脂肪 20％ として計算したものが表２である．しかしＰＥに対する *n*-ヘプタンと脂肪の抽出力の違い，水中油型エマルジョンを形成している牛乳中の脂肪と遊離脂肪の違いなどについて考慮すると，実際上では表２の数値をさらに大きく下廻るものと考えられる．

ＵＶスペクトル，ケイ光スペクトル，ＩＲスペクトルについてはいずれも各保存期間の試料溶液ともそれぞれほとんど類似のスペクトルを示した．そこで24週間保存の試験溶液についてのＵＶスペクトルを図１，ケイ光スペクトルを図２，ＩＲスペクトルを図３に示した．ＵＶスペクトルをみると近紫外部に吸収がなく，またケイ光

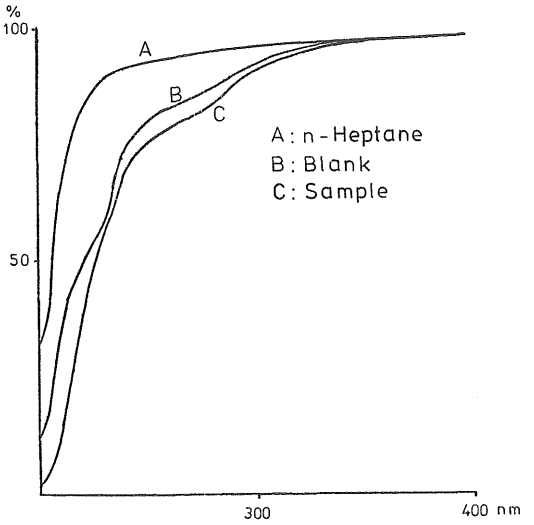


図 1. *n*-ヘプタン24週間保存溶液の紫外部吸収スペクトル

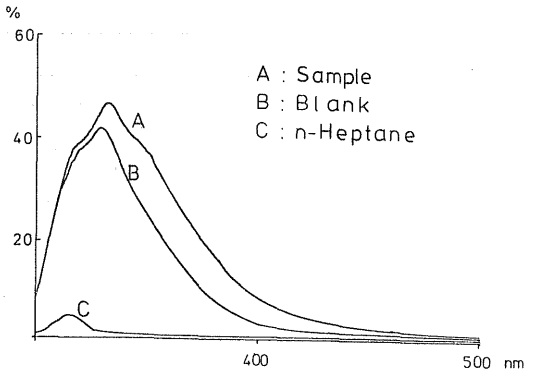


図 2. *n*-ヘプタン24週間保存溶液のケイ光スペクトル

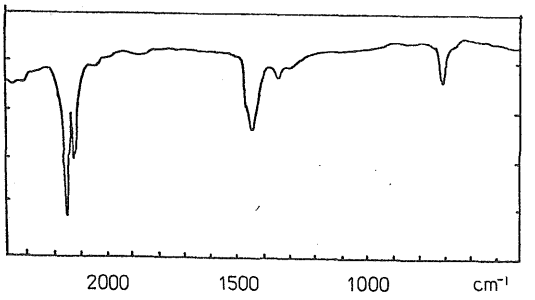


図 3. *n*-ヘプタン24週間保存溶液の赤外吸収スペクトル

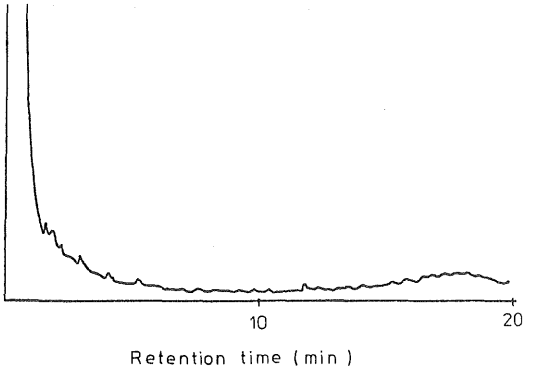


図 4. *n*-ヘプタン24週間保存溶液のガスクロマトグラム

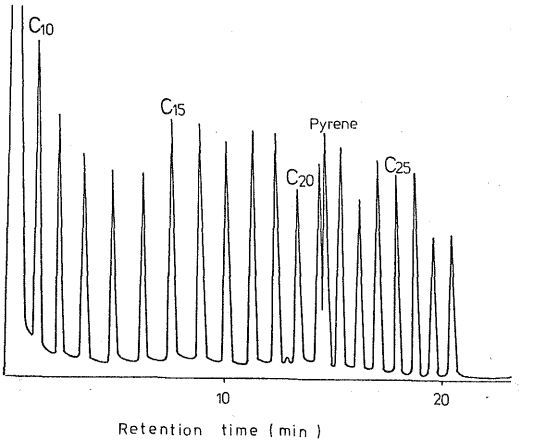


図 5. *n*-パラフィン標準液のガスクロマトグラム

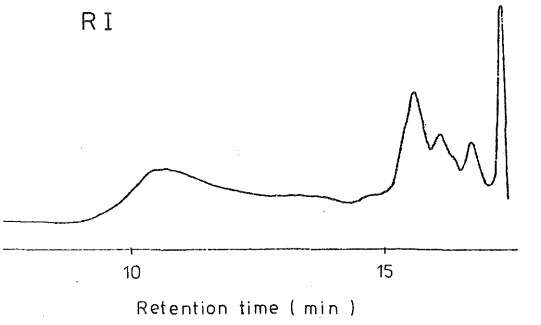


図 6. *n*-ヘプタン24週間保存溶液の液体クロマトグラム

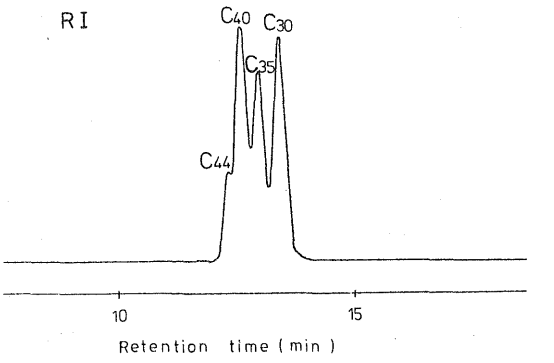


図 7. *n*-パラフィン標準液の液体クロマトグラム

スペクトルにおいてもブランクと同じようなパターンを示しており，不飽和化合物および多環芳香族化合物の存在は認められない．ＩＲスペクトルからはパラフィンの吸収以外，官能基を示す吸収は認められず，*n*-ヘプタンに溶出してくる物質はＰＥローポリマーであると推察される．

ＧＣにより24週間保存の *n*-ヘプタンの試験溶液について分析したチャートが図4である．また C_{10}—C_{28} の *n*-パラフィン 25ppm を含む標準液のチャートを図5に示す．ここで図5における25ppmの *n*-パラフィンのピ

ーク高と試料溶液を20倍に濃縮した図4のチャートを比較してみると，*n*-ヘプタンに溶出してくる物質は *n*-$C_{28}H_{58}$ の分子量約400以下においてはほとんど認められず，より高分子量のパラフィン様物質であることがわかる．

GPCにより24週間保存した *n*-ヘプタンの試験溶液を分析したチャートが図6である．また同じく C_{30}，C_{35}，C_{40}，C_{44} の *n*-パラフィンを含む標準液のチャートを図7に示した．図7から *n*-パラフィンの分子量分布測定のため検量線を作製し，24週間保存の *n*-ヘプタンの試験溶液のチャート（図6）を解析すると，分子量分布は分子量約2,000から始まり，約1,200で最大となり，後は徐々に減少しているということがわかる．

まとめ

ＬＬ牛乳用容器について浸出液として水，4％酢酸，20％エタノール，*n*-ヘプタンを用いて2，4，6，12，24週間という保存期間により溶出試験を行なった結果，次の点が明らかになった．

1. アルミニウムは検出されず，容器に亀裂・ピンホール等による欠陥は認められなかった．

2. $KMnO_4$ 消費量の値は小さく，易酸化性物質の溶出はわずかであった．

3. 蒸発残留物のうち水，4％酢酸，20％エタノールについては期間，浸出液の種類による差は認められず，いずれも 5ppm 以下であった．

4. *n*-ヘプタンによる蒸発残留物は長期になる程増大し 30～40ppm に達するが，実際の食品で考えると極めてわずかな数値になると推論できる．

5. *n*-ヘプタンに溶出してくる物質は各種のスペクトルからパラフィン様物質であり，GC，GPC により分子量約500～2,000で約1,200に最大分子量分布をもつ物質であることがわかった．

以上ＬＬ牛乳用容器について長期保存による溶出試験を行なったが，実際の市販期間は12週間位とされており衛生化学的には問題ないと思われる．

謝辞 本調査にあたり，試料の提供をいただいたテトラパック社，並びに御協力いただいた衛生局環境衛生部食品衛生課，乳肉衛生課，食品監視課の各位に深謝いたします．

文献

1) 朝日新聞：1978年5月4日朝刊
2) 津郷友吉：食品工業，**16**(20)，89，1973
3) 津郷友吉：畜産の研究，**28**(1)，207，1974
4) ベナード・フォン・ボッケンマル：食品工業，**18**(10)，98，1975
5) 官報：昭和41年10月4日厚生省告示第434号
6) 武内次夫，森　定雄：ゲルパーミエーションクロマトグラフィー，**79**，1976，丸善

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 234—237, 1978

東京都におけるＰＣＢ汚染の実態について（第６報）　食品中のＰＣＢ含有量調査

山崎清子*, 山野辺秀夫*, 鈴木助治*, 原田裕文*

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (VI) Polychlorinated Biphenyl Content of Foods

KIYOKO YAMAZAKI*, HIDEO YAMANOBE*, SUKEJI SUZUKI* and HIROFUMI HARADA*

緒　言

1968年，カネミ油症事件が発生し，1972年にはその原因物質であるポリ塩化ビフェニール(以下 PCB と略す)の使用規制措置がとられた．これを契機として，PCB による汚染状況の調査が全国的に行なわれ，われわれも1971年以来東京都における PCB 汚染の実態を把握するため魚介類を中心とした調査を行ない，毎年報告してきた．今回も引き続いて主に食品中の PCB 濃度を測定したのでその結果を報告する．

実験方法

調査試料は1977年４月より1978年３月までに東京都内の市場および小売店から入手した．その内訳は魚介類55種類157検体，食肉６種類15検体，乳製品４種類25検体，鶏卵10検体，包装紙10検体および都内在住の産婦から提供された母乳10検体，計68種類 227 検体である．操作および定量は前報[1-5]と同様に，厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班による統一分析法に基づき，アルカリ分解法による前処理ののち，ECD ガスクロマトグラフィーを用いて PCB を測定した．

結果および考察

魚介類の PCB 濃度測定結果を Table 1 に示す．まず可食部についてみると 156 検体中92検体から PCB が検出され，検出率59%，平均値 0.03ppm であった．ただし，0.005ppm 未満は不検出とした．今回の調査でとくに高い値を示したものはボラおよびスズキで，そのPCB 濃度はボラ 0.55ppm，スズキ 0.28—0.33ppm，平均 0.30ppm であった．しかし，前回ボラ，スズキと共に PCB の濃縮傾向が強い魚種の一つであろうと指摘したコノシロは 0.04—0.06ppm，平均0.05ppm とかなり低い値を示している．われわれが過去に調査したコノシロの PCB 濃度を年度毎に比較すると Table 2 に示すように，1973年から順に 0.44ppm，0.41ppm，0.39ppm，0.08ppm，0.05ppm と，最近の２年間は特に低い値となっている．また，今回調査した可食部全体についてみた場合，前述のとおり PCB の検出率は 59%，平均値 0.03ppm で，前年度の検出率70%，平均値 0.04ppm と比較すると両者とも若干ではあるが減少していることがわかる．さらに，PCB 濃度が 0.05ppm 以下の試料の割合も1973年度から順に60%，74%，80%，85%，88%と明らかに増加しており，このことによっても年度毎に PCB は減少傾向にあることが認められた．

次に内臓についてみると151検体中 123 検体から PCB が検出され，検出率81%，平均 0.17ppm で，このうち 1ppm を越えるものはイバラカニモドキ，サヨリ，スズキであった．また，0.50ppm 以下を示す試料の割合は 95.4%で，前年度の94.5%と比べてわずかではあるが増加しており，可食部と同様減少傾向が認められた．

乳製品４種類25検体について PCB 含有量を測定し，その結果を Table 3 に示した．これによると育児用粉乳からは検出されず，牛乳，バター，チーズからはわずかではあるが検出されている．また，出産後１～２か月の産婦10名から提供された母乳は全検体から PCB が検出され，全乳中では 0.007—0.033ppm，平均 0.018ppm，脂肪中では 0.23—1.09ppm，平均 0.58ppm と前年度とほぼ同じ値を示した．

肉類については Table 4 に示すとおり，豚肉，豚肝，牛肉，牛肝からは検出されず，鶏肉，鶏肝，鶏卵からわずかに検出されたのみであった．

* 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

Table 1. Concentrations of PCB in Fishes

Sample	PCB concentration in fish meat (ppm wet wt.)			PCB concentration in internal organ (ppm wet wt.)		
	N	Range	Mean	N	Range	Mean
Aburasokomutsu (*Lepidocybium flavo-brunneum*)	2		0.00	2	0.00—0.02	0.01
Aji (horse-mackerel, *Trachrus trachrus*)	8	0.00—0.11	0.02	7	0.02—0.38	0.09
Akayagara (*Fistularia petimba*)	2	0.00—0.01	0.01	2		0.00
Anago (conger, *Astroconger myriaster*)	5	0.00—0.14	0.04	5	0.01—0.27	0.07
Anko (angler, *Lophius litulon*)	1		0.01	2	0.01—0.14	0.08
Asari (*Tapes philippinarum*)	1		0.02			
Bora (gray mullet, *Mugil cephalus*)	1		0.55	1		0.32
Butter fish	1		0.10	1		0.06
Buri (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	7	0.00—0.11	0.02	7	0.02—0.27	0.07
Gazami (*Portunus trituberculatus*)	2		0.00	2		0.02
Hatahata (sandfish, *Arctoscopus japonicas*)	3	0.03—0.04	0.03	3	0.02—0.04	0.03
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	1		0.00	1		0.05
Hokki-gai	2		0.00	2		0.02
Houbou (gurnard, *Chelidonichthys kumn*)	1		0.01	1		0.01
Ibarakanimodoki	1		0.01	1		1.80
Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	3	0.01—0.06	0.03	3	0.02—0.18	0.08
Ishimochi (croaker, *Argyrosomus argentatus*)	1		0.00	1		0.00
Itoyori (*Nemipterus virgatus*)	2		0.00	2	0.00—0.01	0.01
Iwashi (sardine, *Sardinos melanosticta*)	4	0.02—0.03	0.02	4	0.02—0.04	0.03
Kaki (*Crassostrea gigas*)	1		0.02			
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	1		0.02	1		0.11
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	4	0.00—0.01	0.00	4	0.00—0.01	0.00
Kegani (*Erimacrus isenbeckii*)	2		0.00	2	0.03—0.04	0.04
Kichiji (*Sebastolobus macrochir*)	1		0.02	1		0.04
Kiwada (tuna, *Neothunnus albacora*)	2		0.00	2		0.00
Koi (carp, *Cyprinus carpio*)	2	0.00—0.01	0.01	2	0.03—0.04	0.04
Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	4	0.04—0.06	0.05	4	0.04—0.11	0.09
Kuruma-ebi (prawn, *Peraeus japonicus*)	1		0.00			
Madai (red sea bream, *Chrysophrys major*)	16	0.00—0.08	0.01	16	0.00—0.30	0.05

Sample	PCB concentration in fish meat (ppm wet wt.)			PCB concentration in internal organ (ppm wet wt.)		
	N	Range	Mean	N	Range	Mean
Madako (*Octopus vulgaris*)	1		0.07	1		0.41
Madara (pacific cod, *Gadus macrocephalus*)	2	0.00—0.01	0.01	2	0.01—0.05	0.03
Mafugu (fugu, *Fugu vermicularis porphyreus*)	2		0.00			
Magarei (flat fish, *Limanda herzensteini*)	7	0.00—0.06	0.01	7	0.00—0.18	0.04
Maguro (tuna, *Thunnus thynnus*)	3	0.03—0.04	0.03	3	0.02—0.10	0.05
Masu (trout, *Oncorhynchus masou*)	3	0.00—0.01	0.01	3	0.00—0.01	0.00
Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)	3	0.01—0.02	0.01	3	0.07—0.17	0.13
Mirukui (*Tresus keenae*)	2		0.01	2	0.02—0.03	0.03
Mutsu (japanese bluefish, *Scombrops boops*)	2	0.02—0.16	0.09	2	0.08—0.40	0.24
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	1		0.03	1		0.01
Saba (mackerel, *Pneumotophorus japonicus*)	7	0.02—0.07	0.04	7	0.00—0.16	0.06
Sake (salmon, *Oncorhynchus kete*)	1		0.00	1		0.00
Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	3	0.00—0.01	0.00	3	0.01—0.02	0.02
Sawara (*Scomberomorus niphonius*)	2		0.00	2		0.00
Sayori (halfbeak, *Hemirhamphus sajori*)	2	0.05—0.08	0.07	2	0.57—1.62	1.10
Shiira (dorado, *Coryphana hippurus*)	3	0.00—0.01	0.01	3	0.01—0.06	0.03
Suketo-dara (walleye pollack, *Theragra chalcogramma*)	5	0.00—0.01	0.01	5	0.03—0.28	0.11
Surume-ika (sagittated calamary, *Todarades pacificus*)	11	0.00—0.02	0.01	11	0.00—0.28	0.21
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)	3	0.28—0.33	0.30	3	3.03—5.37	3.82
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	2	0.00—0.08	0.04	2	0.01—0.19	0.10
Taisho-ebi (prawn, *Penaeus orientalis*)	1		0.00	1		0.08
Takabe (*Labracoglossa argentiventris*)	1		0.01	1		0.05
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	2	0.00—0.01	0.01	2	0.00—0.03	0.02
Unagi (eel, *Anguilla japonica*)	2	0.01—0.02	0.02	2		0.00
Yoroiitachiuo (*Hoplobrotula armata*)	3		0.00	3	0.01—0.07	0.04
Total	156	0.00—0.55	0.03	151	0.00—5.37	0.17

N : number of samples

Table 2. PCB Concentrations by Year (Mean Value, ppm)

Year	1973		1974		1975		1976		1977	
Sample	f.m.	i.o.	f.m.	i.o.	f.m.	i.o.	f.m.	i.o.	f.m.	i.o.
Konoshiro	0.44	0.50	0.41	0.29	0.39	0.27	0.08	0.08	0.05	0.09
Bora	0.40	0.33	0.53	2.23	0.44	0.83	0.30	0.53	0.55	0.32
Suzuki	0.44	0.50	—	—	0.40	8.80	0.20	3.44	0.30	3.82

f.m. : fish meat, i.o. : internal organ

Table 3. PCB Concentrations in Dairy Products

Sample	N	PCB concentration in wet material (ppm)		PCB concentration in extractable fat (ppm)	
		Range	Mean	Range	Mean
Butter	5	0.00 —0.02	0.01		
Process cheese	5	0.00 —0.01	0.01	0.01 —0.05	0.03
Modified milk powder	5		0.00		0.00
Milk	10	0.00 —0.01	0.00	0.00 —0.18	0.06
Human milk	10	0.007—0.033	0.018	0.228—1.092	0.584

N : number of samples

Table 4. PCB Concentrations in Meats

Sample	N	PCB concentration (ppm wet wt.)	
		Range	Mean
Pork	3		0.00
Pig liver	2		0.00
Beef	2		0.00
Cow liver	3		0.00
Chicken	3	0.01—0.02	0.01
Chicken liver	2	0.00—0.01	0.01
Hen's egg	10	0.00—0.01	0.00

N : number of samples

容器包装紙では，紙コップ，紙皿，おにぎり用パック，ストローなど10検体について調査したが，このうちサンドウィッチ用紙ケースから 0.14ppm，紙製のおにぎりパック，ストローからそれぞれ 0.04ppm，紙レースから 0.02ppm とごく微量ではあるが検出された．

結　論

東京都内で入手した魚介類，肉類，乳製品，母乳，包装紙について PCB 濃度を測定したが，暫定規制値を越えるものはなかった．魚介類では前年度に引き続き減少傾向が認められた．肉類，乳製品についてはきわめて低濃度であり，前回不検出であった包装紙にわずかに検出されたものがあったほかは前年度との差は認められなかった．

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いたします．

文　献

1) 原田裕文，観　照雄，植田忠彦，竹内正博，江波戸舉秀，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**，119，1974
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) 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：東京衛研年報，**27**-1，132，1976
5) 山崎清子，山野辺秀夫，鈴木助治，小泉清太郎，原田裕文：東京衛研年報，**28**-1，107，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 238—243, 1978

食品中の石油系炭化水素に関する研究（第3報）
東京湾産貝中のパラフィン系炭化水素，3,4 ベンツピレンおよび硫黄化合物含量

井部明広*, 西島基弘*, 斉藤和夫*, 上村　尚*
落合節子*, 永山敏廣*, 牛山博文*, 直井家壽太*

Studies on Hydrocarbons from Petroleum in Foods (III)
Contents of Hydrocarbons, 3, 4 Benzopyrene and Organic Sulfur Compounds in Shellfishes in Tokyo Bay

AKIHIRO IBE*, MOTOHIRO NISHIJIMA*, KAZUO SAITO*,
HISASHI KAMIMURA*, SETSUKO OCHIAI*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*,
HIROFUMI USHIYAMA* and YASUTA NAOI*

緒　言

種々の海洋汚染のうち，石油による魚介類の汚染実態を知るための指標として，パラフィン類，硫黄化合物，3,4 ベンツピレンおよび窒素化合物等が種々報告されている[1-12]．これらはいずれも石油の成分であることから汚染の指標とすることは妥当と思われるが，魚介類の汚染原因は複雑多岐にわたるため，単一の指標で汚染を推定することは困難と思われる．

われわれは前報[13,14]において市販の魚介類を中心に *n*-パラフィン類含有量と汚染との関係を調査したが，特に明確な関係は見られず，むしろ魚種により *n*-パラフィン含量，または各炭素数の含量パターンに相違があることを推察した．今回われわれは将来東京湾において，重油流出事故等が生じた場合のバックグランドとするために，現在の汚染レベルを把握しておく必要があると考え，東京湾内産の棲息場所に移動のない貝類について，また棲息地の砂について，*n*-パラフィン類の C_{15}～C_{30} のもの，*iso*-パラフィン類のうちで C_{19} のプリスタン，3,4 ベンツピレンおよび硫黄化合物の調査を行なったので報告する．

実験方法

1. 試料　あさり *Tapes* (*Amygdala*) *philippinarum* 17件，むらさきいがい *Mytilus edulis* 2件，ばかがい *Mactra chinensis* 1件および砂22件．

2. 採取場所および年月日　大井埠頭京浜六区地先，葛西沖海上公園三枚洲，千葉市千葉中央港海岸，木更津市人工島海岸および富津市富津公園海岸（以下大井埠頭，三枚洲，千葉中央港，木更津および富津と略す．-図1）の5カ所で1977年5月から9月にわたり採取した．

3. 試薬　i）*n*-パラフィン類標準溶液　前報[13,14]に準じ 1～5ppm に調製した．ii）プリスタン標準溶液 2, 6, 10, 14-Tetramethylpentadecane (Eastman Ko-

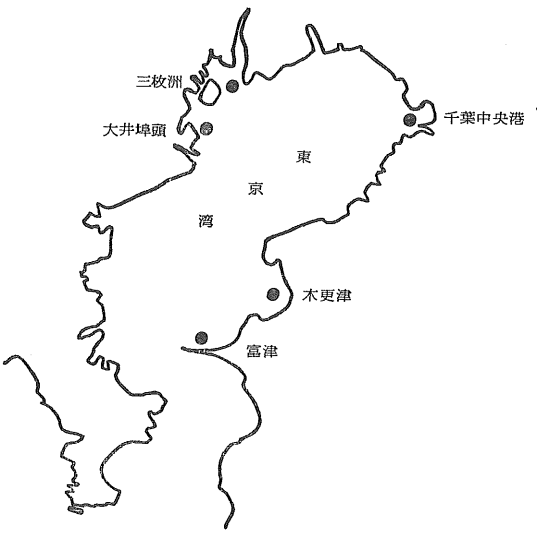


図 1.　採取場所

* 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

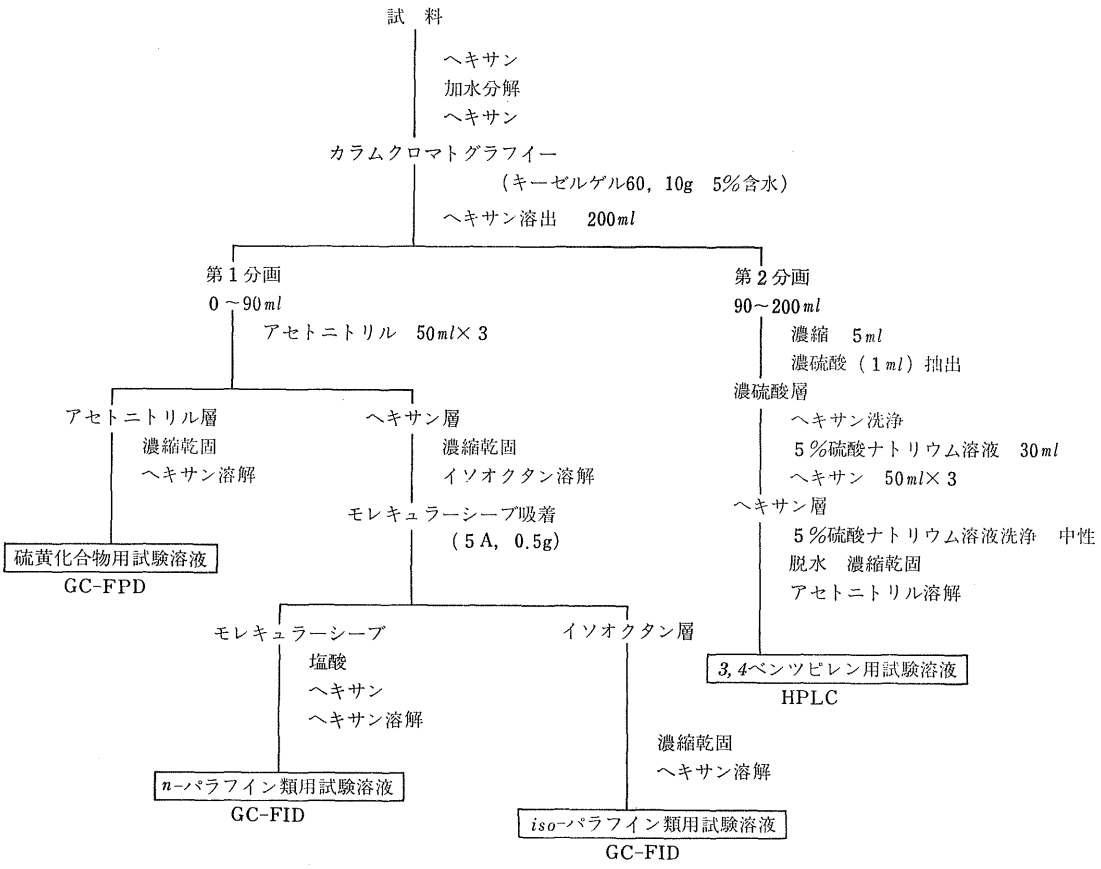


チャート 1. 操作法

dak 社製) をヘキサンに溶解し 1～5ppm に調製した. iii)3,4ベンツピレン標準溶液 3,4ベンツピレン(Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook-Bucks-England) をアセトニトリルに溶解し 10～20ppb に調製した. iv) ジベンゾチオフェン標準溶液 ジベンゾチオフェン (特級和光純薬工業㈱社製) をヘキサンに溶解し200～1,000 ppb に調製した. v) ヘキサンおよびアセトニトリル 和光純薬工業㈱社製残留農薬用を用いた. vi) カラムクロマトグラフィー用シリカゲル キーゼルゲル60 (メルク社製) を130° 18時間活性化後 100g あたり 4m*l* の水を加えた. vii) 他の試薬は前報[13,14]に準じた.

4. 操作法 貝類は可食部を 50g, また砂については 100g (湿重量) を秤取し, 斉藤ら[15]の方法に準じて行なった. なお操作法はチャート1に示した.

5. 測定条件 i) *n*-パラフィン類およびプリスタンのガスクロマトグラフィー分析条件 装置：島津GC-5A型, カラム：3% SE-52chromosorb W (AW·DMCS) 80～100mesh 2m×0.3cm, カラム温度：90～290°, 10°/min 昇温, 注入口温度：300°, キャリアガス：N_2 30m*l*/min, 検出器：FID

ii) 硫黄化合物のガスクロマトグラフィー分析条件 装置：島津 GC-IC 型, カラム：5% OV-17 chromosorb W (HMDS) 60～80mesh 1.5m×0.4cm, カラム温度：180°, 検出器温度：200°, キャリアガス：N_2 30m*l*/min, 検出器：FPD, 394nm フィルター

iii) 3,4 ベンツピレンの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析条件 装置：日立633型, カラム：RP-18 15cm×2.1mm I.D., 移動相：アセトニトリル・水 (7：3), 流量：1m*l*/min, 圧力：85kg/cm², 検出器：日立 MPF-4, 蛍光波長 403nm, 励起波長 383nm

6. 定量法 *n*-パラフィン類およびプリスタンについては, 標準溶液のクロマトグラムを測定し, 内部標準法により, その濃度と内部標準比より検量線を作成した. なお3,4ベンツピレンおよびジベンゾチオフェンについ

表 1. *n*-パラフィン，プリスタン，3,4 ベンツピレンおよびジベンゾチオフェンの調査結果

場所	試料	件数	含量 *n*-パラフィン類 ppm	プリスタン ppm	3,4 ベンツピレン ppb	ジベンゾチオフェン ppb
富津	あさり	5	T ～8.40(0.27)	T ～0.04(0.02)	0.02～0.39(0.15)	0.21～3.27(1.02)
	砂	5	T ～0.23(0.05)	T	0.07～2.43(0.85)	
木更津	あさり	5	T ～0.75(0.25)	T ～0.04(0.02)	0.04～0.45(0.27)	0.50～1.78(0.79)
	砂	5	T ～4.20(1.05)	T ～0.03	T ～1.36(0.65)	
千葉中央港	むらさきいがい	1	T	T	4.58	
	ばかがい	1	T	T	0.92	
	砂	4	T	T	0.76～1.50(1.09)	
三枚洲	あさり	3	T ～0.80(0.27)	T ～0.03(0.01)	0.06～0.15(0.10)	0.43～0.83(0.65)
	むらさきいがい	1	T	T	0.38	6.94
	砂	4	T ～0.28(0.07)	T ～0.02	0.11～2.55(0.75)	
大井埠頭	あさり	4	0.20～0.57(0.34)	T ～0.02(0.01)	0.22～0.70(0.43)	0.82～11.25(4.34)
	砂	4	T ～0.36(0.17)	0.01～0.06(0.03)	1.60～5.01(3.43)	
C重油			19,000 ppm	200 ppm	8.52 ppm	108 ppm

T＝0.20ppm未満　T＝0.01ppm未満　T＝0.01ppb未満

（ ）＝平均

ては，その濃度とピーク高より，検量線を作成した．試験溶液について同様の条件でクロマトグラムを測定し，内部標準比およびピーク高から検量線によって含有量を算出した．

結果と考察

あさりおよび砂の *n*-パラフィン，プリスタン，3,4ベンツピレンおよびジベンゾチオフェンの含量，ならびに丸善石油㈱社製のC重油についての結果を表1に示した．なお貝類については wet ベース，砂については dry ベースで計算した．

1. ***n*-パラフィン類**　あさり，砂およびC重油から得られた *n*-パラフィン類分析用試験溶液のガスクロマトグラムの一例を図2に示した．C重油が C_{20} 付近を頂点としたパターンを示しているのに比較して，あさりは C_{23} 付近が頂点であり，若干異ったパターンを示している．また魚類で見られる[13,14]ようにある特定の炭素数のものの含量が多い等の特異的なパターンは特に認められなかった．砂はあさりと比較して，炭素数の多い方にややシフトしていた．

各採取場所ごとにあさりと砂の *n*-パラフィン含量を比較すると，砂よりあさりに高い値を示す傾向が見られたが，木更津の砂が平均 1.05ppm と高い値にもかかわらず，あさりが 0.25ppm と比較的低い値を示したように，量的な相関関係は特に見られなかった．また採取場所の比較では大井埠頭の平均値があさり 0.34ppm，砂

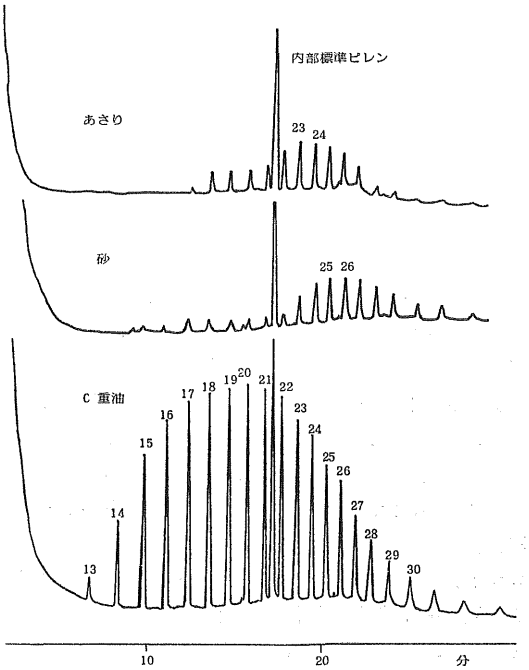


図 2. *n*-パラフィン類のガスクロマトグラム

0.17ppm で他の各地点の平均値あさり 0.25～0.27ppm，砂 0.05～1.05ppm と比較して高い値を示す傾向が見られた．

2. **プリスタン**　あさりおよび砂から得られた *iso*-パ

ラフィン類分析用試験溶液のガスクロマトグラムの一例を図3に示した．図の中矢印で示したように炭素数19のプリスタンと同一位置にピークを確認した．本ピークについては図4で示すように GC-Mass によってプリスタンであることを確認した．

各採取場所ごとに，あさりと砂のプリスタン含量を比較すると，あさりの方に若干高い値を示す傾向が見られたが，採取場所による差は特に認められなかった．

3. 3,4 ベンツピレン　あさりおよび砂から得られた3,4 ベンツピレン分析用試験溶液および3,4ベンツピレン標準品の高速液体クロマトグラムを図5に示した．あさり，砂ともほぼ同様のクロマトグラムが得られ，標準

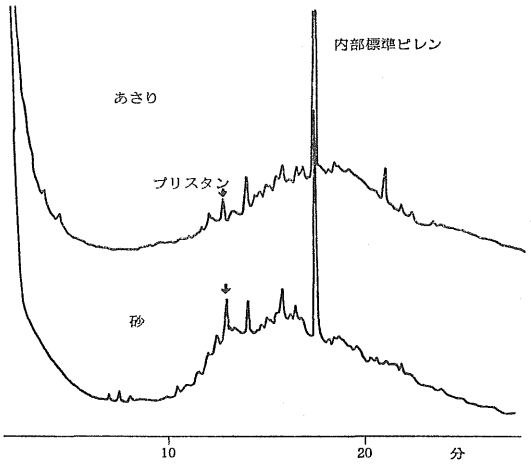


図 3. *iso*-パラフィン類のガスクロマトグラム

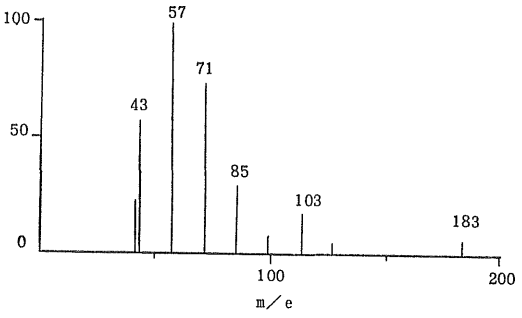


図 4. あさり中のプリスタンのマススペクトル

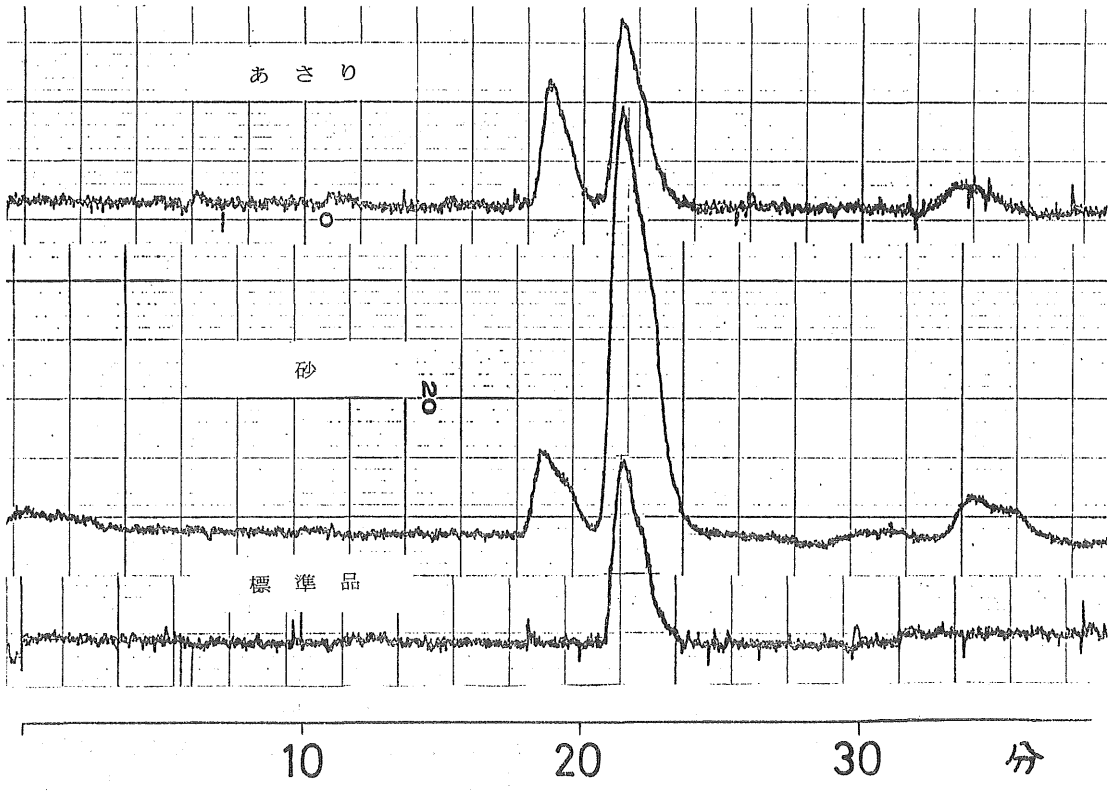


図 5. 3,4 ベンツピレンの高速液体クロマトグラム

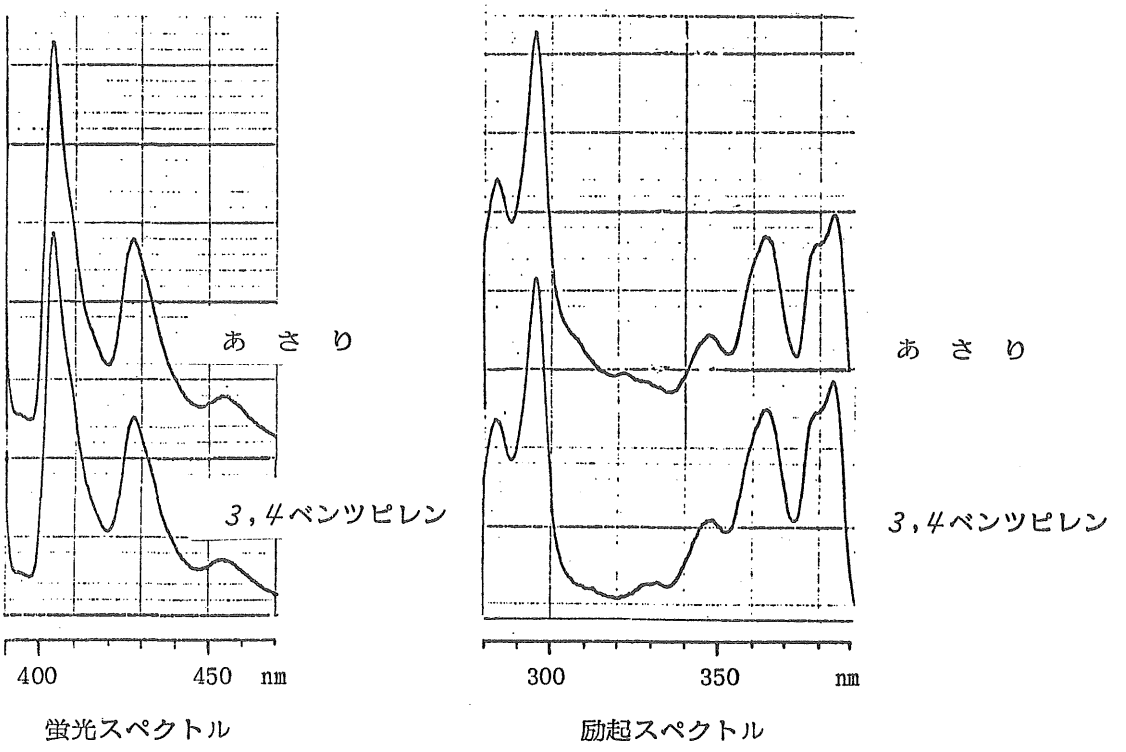


図 6. HPLC により分取した 3,4 ベンツピレンのスペクトル

品と同じ Retention time にピークが認められた．このピークについて3,4ベンツピレンであることを確認するために HPLC による分取を行ない，蛍光分光光度計により確認した．図6にあさりの HPLC により分取した溶液の蛍光および励起スペクトルを示した．なお HPLC により同時に作成した検量線によって定量を行なった．またあさりに 3,4 ベンツピレンを 2ppb 添加し回収実験を行なったところ，回収率は82%であった．

各採取場所ごとに，あさりと砂の 3,4 ベンツピレン含量を比較すると，あさりより砂に高い値を示す傾向が見られた．また採取場所の比較では，大井埠頭の平均値があさり 0.43ppb，砂は最高 5.01ppb，平均値で 3.43ppb であり，他の地点の平均値 あさり 0.10～0.27ppb，砂 0.65～1.09ppb と比較して高い値を示す傾向が見られた．あさり以外の貝では，むらさきいがいが三枚洲で 0.38ppb，千葉中央港で 4.58ppb，ばかがいが千葉中央港で 0.92ppb とあさりに比較して高い値を示したことから，貝の種類によって 3,4 ベンツピレンの取込み量が異ることも考えられる．

4. 硫黄化合物 あさり，砂およびC重油から得られた硫黄化合物分析用試験溶液のガスクロマトグラムを図7に示した．図の中C重油のクロマトグラムに矢印で示したピークがジベンゾチオフェンのピークであり GC-Mass により標準品と比較して確認した．また試料についても矢印で示したように同様のピークが認められた．樫本ら[7]は，ジベンゾチオフェン以外のピークについても，いくつかのピークが硫黄化合物のジベンゾチオフェン類であると報告しているが，ピークパターンも重油のそれと非常に類似していることから，石油汚染との関係に何らかの指標となることが考えられる．

ジベンゾチオフェンの含量について採取場所の比較では，大井埠頭が最高 11.25ppb，平均値 4.34ppb で他の地点の平均値 0.65～1.02ppb と比較して高い値を示した．このことは本地点で採取した砂に油臭いものが多かったことも含めて汚染との関係を示唆していることも考えられる．また三枚洲のむらさきいがいが 6.94ppb と，同地点のあさりの平均値 0.65ppb に比較して非常に高い値を示したことから，貝の種類による取込み量の違い

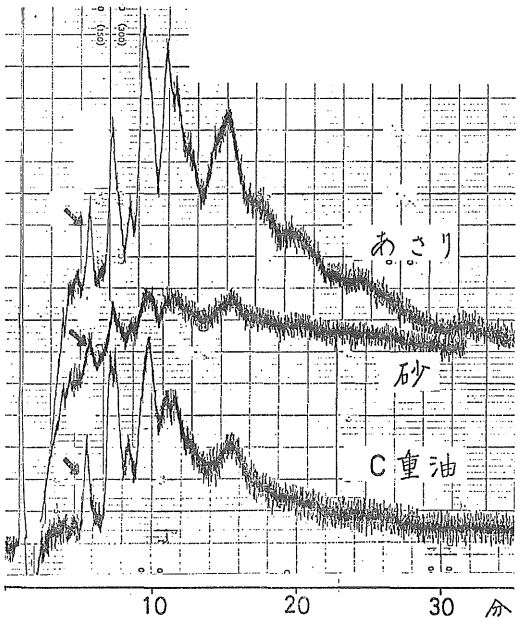


図 7. 硫黄化合物のガスクロマトグラム

が考えられ，むらさきいがい等が石油汚染の指標生物となり得るか否か，今後検討する予定である．

結　論

東京湾産の貝類および砂について石油類による汚染のバックグランドを知る目的で，石油中の成分である *n*-パラフィン類，プリスタン，3,4 ベンツピレンおよび硫黄化合物中のジベンゾチオフェンについて含有量の実態調査を行なった．

1. *n*-パラフィン類およびプリスタンは，あさりと砂を比較した場合，あさりに高い値を示す傾向が見られた．また3,4ベンツピレンはあさりと砂を比較した場合，砂に高い値を示す傾向が見られた．

2. 採取場所ごとに *n*-パラフィン，3,4ベンツピレンおよびジベンゾチオフェンの値を比較すると，あさり，砂とも平均値で大井埠頭が高い値を示したことは，本地点での砂に油臭を有するものが多かったことも含めて，これらの物質が汚染の指標に成り得ると思われる．特に硫黄化合物ではC重油と試料とのガスクロマトグラムが類似していたことから，硫黄化合物が石油汚染の指標と成り得ることも考えられる．

3. むらさきいがい，ばかがいはあさりに比較して，3,4 ベンツピレンおよびジベンゾチオフェンの含量に大きな違いが見られたことは，あさり以外の貝が石油による汚染により多く影響される可能性もあることから，今後これらについても調査を継続していく予定である．

（本研究の概要は日本食品衛生学会第35回学術講演会1978年5月で発表した．）

文　献

1) Cahnmann, H. J. and M. Kuratsune : *Anal. Chem.*, **29**, 1312, 1957
2) Ogata, M., Y. Miyake, and S. Kira : *Water Research*, **7**, 1493, 1973
3) 前田浩一郎，堀伸二郎他：大阪府立公衛研所報，**6**, 77, 1975
4) 石田立夫，松永和義他：岡山県衛研年報，**22**, 25, 1975
5) 石田立夫，今中雅章他：岡山県衛研年報，**23**, 27, 1976
6) Ogata, M., Y. Miyake, and S. Kira : *Water Research*, **11**, 333, 1977
7) 中村彰夫，樫本　隆：食衛誌，**18**, 252, 1977
8) 中村彰夫，樫本　隆：日本食品衛生学会第33回学術講演会，講演要旨集，48, 1977
9) 斉藤行生，武田明治，内山　充：日本薬学会第4回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム，講演要旨集，15, 1977
10) 斉藤行生，武田明治，内山　充：日本食品衛生学会第34回学術講演会，講演要旨集，28, 1977
11) 斉藤行生，武田明治，内山　充：日本食品衛生学会第35回学術講演会，講演要旨集，53, 1978
12) 中村彰夫，樫本　隆：同上，54, 1978
13) 小川仁志，井部明広，風間栄治，斉藤和夫，観　公子，直井家壽太，木村康夫：東京衛研年報，**27-1**, 158, 1976
14) 西島基弘，井部明広，斉藤和夫，高橋尚子，上村尚，落合節子，直井家壽太，木村康夫：東京衛研年報，**28-1**, 116, 1977
15) 斉藤行生，武田明治，内山　充：日本薬学会97年会，講演要旨集，**III**, 138, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 244—249, 1978

食品中のマイコトキシンに関する研究（第10報） Sterigmatocystin 分析法の検討

観 公子*, 西島基弘*, 冠 政光*, 中里光男*
有賀孝成*, 石川ふさ子*, 直井家壽太*

Studies on Mycotxins in Foods (X)
Analytical Procedure and Determination of Sterigmatocystin

KIMIKO KAN*, MOTOHIRO NISHIJIMA*, MASAMITSU KANMURI*,
MITSUO NAKAZATO*, TAKANARI ARIGA*, FUSAKO ISHIKAWA* and YASUTA NAOI*

緒 言

Sterigmatocystin は Aflatoxin B_1 と同等またはそれ以上の毒性および発癌性があるといわれている[1-3]．新たに厚生省癌研究班が Sterigmatocystin は低濃度でも長期間の投与で肝癌を発生させるとの報告[4,5]を発表して注目されている．

この Sterigmatocystin を高率で産生する *Aspergillus versicolor* を食料等から高頻度に検出しながら[6,7] Sterigmatocystin の汚染報告例が少ないことは従来の試験法が煩雑で非常に時間を要するために汚染実態調査があまりなされていないことも原因の一つであると思われる．そこでわれわれは汚染の考えられる穀類を中心に汚染実態調査を行なうに先立ち多数の試料を迅速に処理するための手段を種々検討した結果，Shannon 等の方法[8]が煩雑な溶媒分離操作を行なわず，抽出液を直接カラムクロマトグラフィーにより，クリーンアップを行なっていることに着眼して，改良を加えることを試みた．

すなわち，抽出液をフロリジルおよび Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーにより完全にクリーンアップを行なった後，薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と略す）に付し，デンシトメーターで定量する方法を検討したところ良好な結果を得たので報告する．

実験方法

1. 試薬

1) Sterigmatocystin標準液 Sterigmatocystin(Makor chemicals Ltd.) をクロロホルムに溶かし 5ppm および 1ppm の濃度に調製した．

2) カラムクロマト用 Sephadex LH-20 Pharmacia Fine Chemicals

3) TLC 用プレート DC-Fertig-platten Kiesel gel 60 (Merck 社製，無蛍光) 20cm×20cm

4) その他の試薬は全て市販特級品を用いた．

2. 装置

1) カラムクロマト管：2.2cm×50cm（フロリジル用），0.8cm×50cm（Sephadex LH-20 用）

2) 粉砕器：三菱電機㈱製

3) ホモジナイザー：日本精機㈱製

4) 自記蛍光分光光度計：日立製 MPF-2A 型

3. 操作法

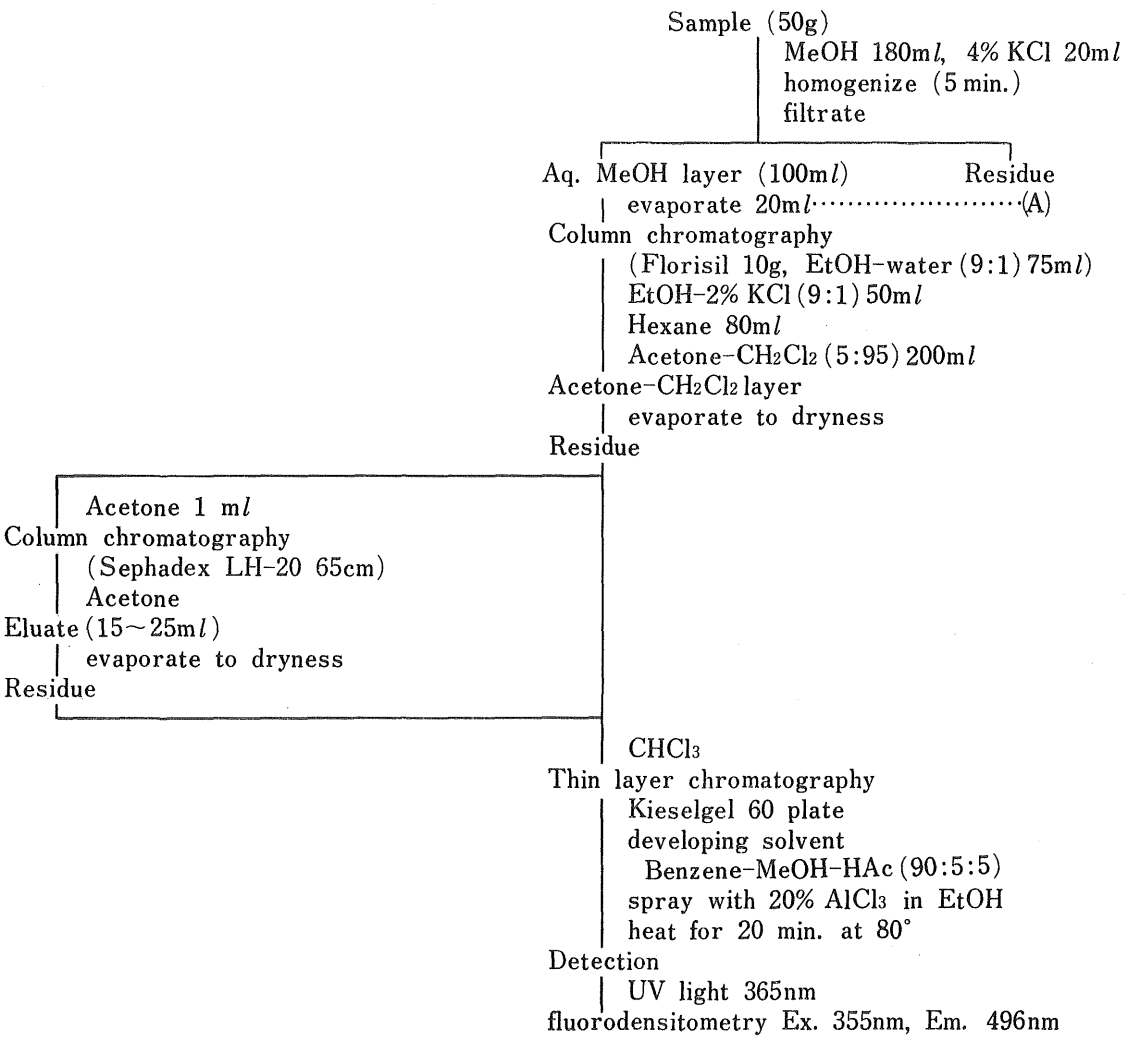
1) 抽出およびカラムクロマト用試験溶液の調製

粉砕した試料 50g をブレンダーカップに秤取し，メタノール 180m*l* および 4%塩化カリウム溶液 20m*l* を加え，5分間ホモジナイズした後ろ過した．ろ液 100m*l* を分取して，約 20m*l* に減圧濃縮し，カラムクロマト用試験溶液とした．

2) クリーンアップ

（1） フロリジルカラムクロマトグラフィー あらかじめフロリジル 10g をエタノール-水 (9：1) の混液 75m*l* を用いて充填したカラムに カラムクロマト用試験溶液を負荷した．さらに 2%塩化カリウム溶液-エタノール (1：9) の混液 50m*l*，次いでヘキサン 80m*l* を用いて洗浄した後，アセトン-塩化メチレン (5：95) 混液 200m*l* で溶離した．カラムクロマトグラフィーの流速はいずれも 5～6m*l*/min で行なった．溶離液は濃縮乾固後，

* 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



Scheme 1. Isolation and Determination of Sterigmatocystin

クロロホルム 1ml に溶かし，TLC 用試験溶液とした．

（2） **Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー**

(1)のクリーンアップ操作で妨害蛍光のみられたものまたは Sterigmatocystin が検出された試験溶液については溶媒を乾固後，真鍋等[9]の方法に準じて処理した．すなわち，残留物を 1ml のアセトンに溶かし，あらかじめアセトンで膨潤した Sephadex LH-20 (45cm 充填) のクロマトカラム上に負荷し，アセトンで溶出した．溶出液の 15ml から 25ml の画分を取り，濃縮乾固後，残留物を 1ml のクロロホルムに溶かして TLC 用試験溶液とした．

3） **TLC による定性，定量**

TLC 用試験溶液を TLC 用シリカゲルプレートに 10μl 塗布して，ベンゼン-メタノール-酢酸 (90：5：5) を展開溶媒として展開した．展開後，20%塩化アルミニウム・エタノール溶液を噴霧し，80° 20分加熱した後，365nm の紫外線照射下で Sterigmatocystin のスタンダードと同一の Rf 付近に黄色蛍光スポットの有無を確認した後，Ex. 355nm, Em. 496nm で蛍光デンシトメトリーにより定量を行なった．検量線は Sterigmatocystin

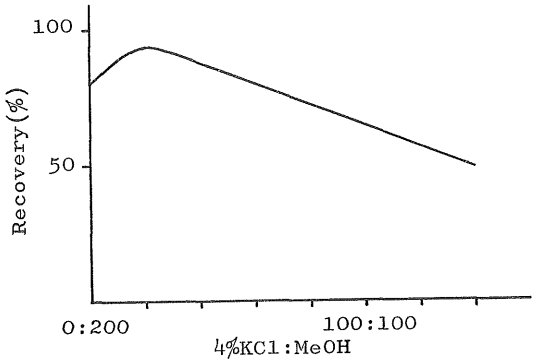


Fig. 1. Recovery of Sterigmatocystin by Ratio of Extractive Solvent

の試料と同一プレート上に 20ng～80ng を塗布して展開後，デンシトメーターにより測定して作成した．

なお試料からの Sterigmatocystin の抽出，分離精製操作を Scheme 1 に示した．

実験結果および考察

1. 抽出溶媒

試料から Sterigmatocystin を抽出する抽出溶媒はメタノール系を用い，塩析，分配およびエマルジョン防止等を考慮して塩化カリウム溶液-メタノールによる抽出を試みた．塩化カリウムの濃度はほぼ4％程度で塩析等の効果が期待できたため，Sterigmatocystin を玄米に添加して，メタノールおよび4％塩化カリウム溶液の混合比を変化させた場合の抽出率および妨害物質の影響について検討した結果は Fig. 1 および Fig. 2 に示した通りであり，メタノールのみで抽出する場合より，10％程度の水分を含有した方が抽出率が良好であった．しかし，それ以上に水分含量が増加するに伴い抽出率が下がる傾向を示した．また水分含量が70％以上になると水溶性物質を多く抽出し，濃縮した時，析出するためにカラムクロマトグラフィーの操作が不能となった．そこで抽出溶媒としては4％塩化カリウム溶液-メタノール（1：9）を用いることとした．

2. カラムクロマトグラフィー

完全なクリーンアップと時間の短縮を目的として最適条件を詳細に検討した．

1) カラム用試験溶液

カラム用試験溶液（Scheme 1 の…(A)）の塩濃度および組成比が回収率および妨害物の除去に大きく影響を与えるため検討を行なった．

（1） **塩濃度** カラムクロマトを行なう場合，試験溶液中の塩濃度がカラムの吸着および分配に影響すること

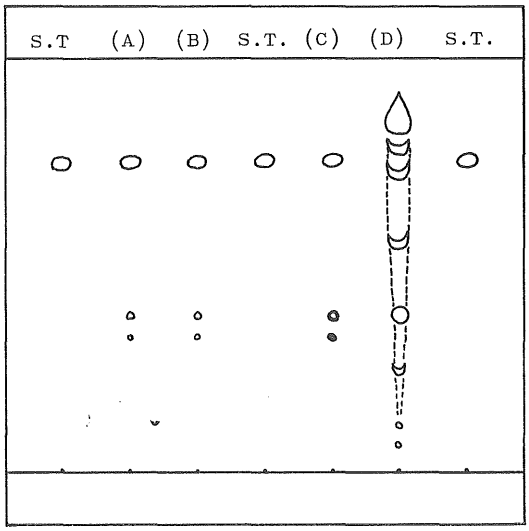


Fig. 2. Thin Layer Chromatogram of Sterigmatocystin in Brown Rice

(A) Isolation with MeOH : 4% KCl (200 : 0)
(B) 〃 (180 : 20)
(C) 〃 (120 : 80)
(D) 〃 (40 : 160)
S. T. Sterigmatocystin
Developer ; Benzene : MeOH : HAc (90 : 5 : 5)

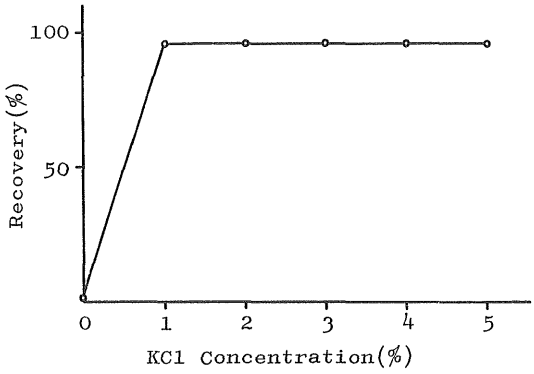


Fig. 3. Recovery of Sterigmatcystin by KCl Concentration of KCl Solution in Extract

が考えられる．そこで試験溶液の塩化カリウム濃度と回収率の関係について検討した結果は Fig. 3 に示した通りであり，塩化カリウム濃度は0％では Sterigmatocystin は吸着されて溶出しなかったが1～5％ではほぼ一定で95％以上の回収率が得られた．

（2） **組成比** 次に試験溶液中の塩化カリウム溶液とメタノールの比がカラムの回収率に与える影響を Fig. 4

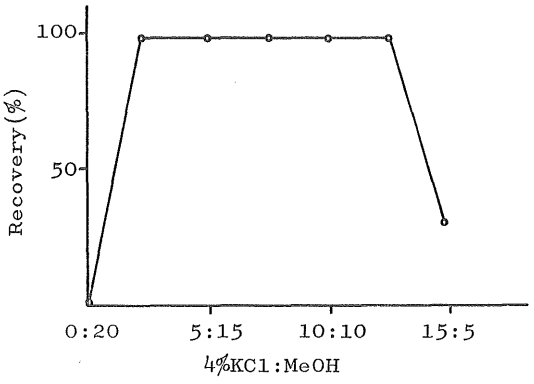


Fig. 4. Recovery of Sterigmatocystin by Volume Ratio of 4%KCl and MeOH in Extract

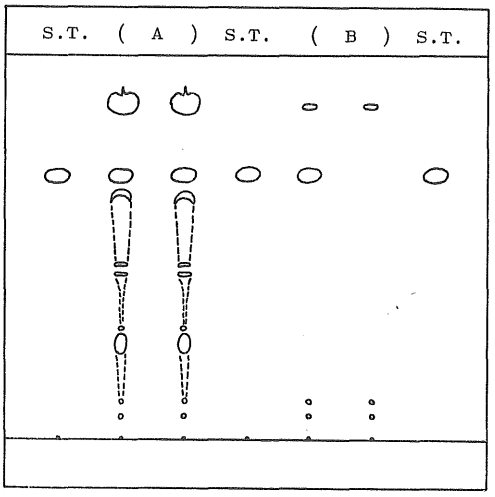


Fig. 5. Thin Layer Chromatogram of Sterigmatocystin in Miso
(A) Washed with Hexane
(B) Washed with EtOH-2%KCl and Hexane
S. T. Sterigmatocystin
Developer ; Benzene : MeOH : HAc (90 : 5 : 5)

に示した．抽出溶媒を減圧下で濃縮した場合，メタノールは共沸を起こさず初めはメタノールのみが留去されることから 75m*l* まで留去すると，塩化カリウム溶液とメタノールの比が 5：15 となり，20m*l* まで留去した場合は10：10となる．そこで 5：15～10：10 ではほぼ同程度の結果が得られることから，試験溶液はカラムに負荷する量を考慮して 20m*l* まで濃縮することとした．

2) 洗浄溶媒の検討

Shannon 等は妨害物除去のため カラム洗浄に ヘキサンを用いて行なっているが，これでは 油状物質 が 除去

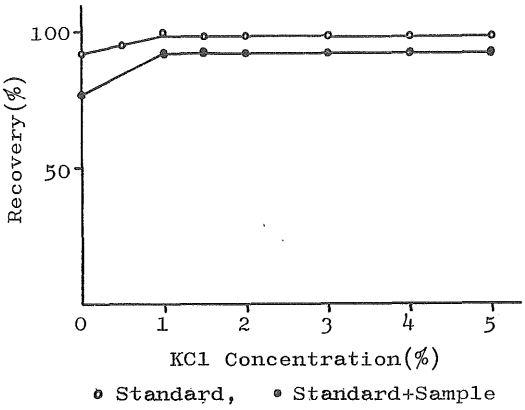


Fig. 6. Recovery of Sterigmatocystin by KCl Concentration of KCl Solution in Cleaning Solvent

されるのみで，Fig. 5 に示したように 妨害物の除去は不完全であった．そこでわれわれは 塩化カリウム溶液-エタノールをカラム洗浄に併用したところ，妨害物の除去に効果があることを見出した．そこでカラム洗浄液として用いる 塩化カリウム-エタノール混液について 塩化カリウムの濃度，塩化カリウム溶液とエタノールの比および洗浄液量について検討し，さらにヘキサンの洗浄液量についても検討を加えた．

(1) 塩化カリウム-エタノール混液

① 塩濃度 塩化カリウム溶液とエタノールの混合割合を 1：9 として塩化カリウムの濃度を変化させた場合の回収率を Fig. 6 に示した．塩化カリウム濃度が1％以上では回収率は95％以上と良好な結果を与えた．しかし混液の調製に際し 3％以上の濃度では塩化カリウムの析出が見られることから塩化カリウム濃度は 2％とした．

② 混合比 2％塩化カリウム溶液を用いて，塩化カリウム溶液：エタノールの混合比と回収率の関係をFig. 7に示した．混合比が 1：9，2：8 の時95％以上と良好な回収率を与えた．しかし塩化カリウム溶液の濃度比が3以上になるに伴い回収率の減少がみられた．そこで塩化カリウム溶液およびエタノールの混合比は 1：9 とした．

③ 洗浄溶媒量 洗浄溶媒量と回収率との関係をFig. 8に示した．溶媒量は 20m*l* 以下では洗浄不充分のため不純物による妨害蛍光がみられ，みかけ上の 回 収 率は 100％を上回った．しかし 30m*l*～70m*l* の範囲では回収率および妨害蛍光除去の点で良好な結果を与えた．そこで洗浄液量は 50m*l* とした．

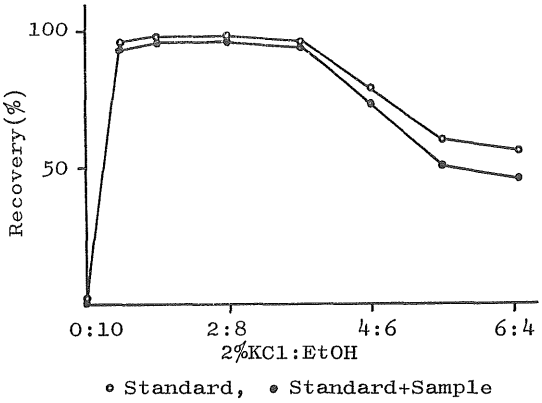


Fig. 7. Recovery of Sterigmatocystin by Ratio of 2%KCl and EtOH in Cleaning Solvent

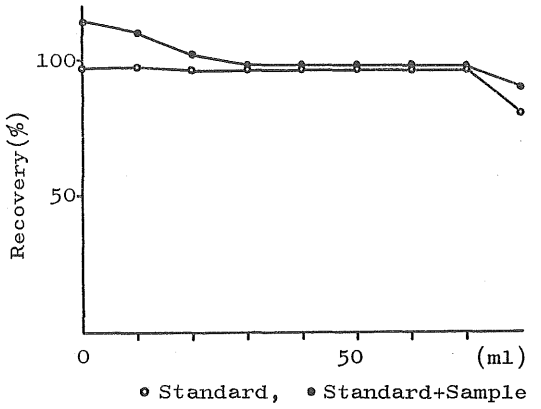


Fig. 8. Recovery of Sterigmatocystin by Volume of Cleaning Solvent

（2） 洗浄用ヘキサン量　洗浄溶媒として用いるヘキサン量と回収率の関係を Fig. 9 に示した．100m*l* までは回収率に影響を与えずそれ以上では回収率が低下する傾向がみられた．そこで洗浄用ヘキサン量は 80m*l* とした．

3） 溶離溶媒の検討

Shannon 等の用いているアセトン-塩化メチレン（5：95）について溶離溶液量を検討した結果は Fig. 10 に示した通りであり，150m*l* 以上で溶離すると回収率はほぼ 100% と良好な結果が得られた．そこで溶離液量は 200 m*l* とした．

4） **Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー**

真鍋等の方法を用い Sterigmatocystin をアセトンで溶出させた場合，真鍋等の結果とほぼ同様に 15～25m*l* の画分に98%以上溶出されかつ妨害蛍光は完全に除去された．そこでフロリジルで妨害物が除去しきれないものについて，本操作を行なうこととした．

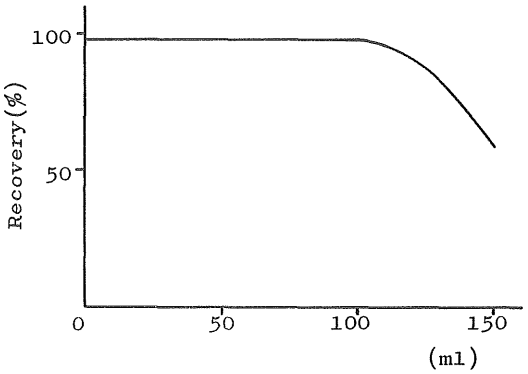


Fig. 9. Recovery of Sterigmatocystin by Volume of Hexane for Cleaning Solvent

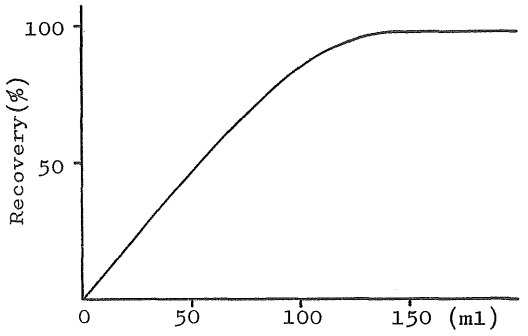


Fig. 10. Recovery of Sterigmatocystin by Volume of Elute

Table 1. Recoveries (%) of Sterigmatocystin Added to Sample

Sample	Sterigmatocystin Added (ppb)	
	40	200
Rice	92	98
Brown rice	97	98
Miso	90	96
Corn	92	92
Wheat	103	91

3. 添加回収実験

本試験法を用い，粉砕した米，玄米，みそ，コーンおよび小麦に Sterigmatocystin を各々 40ppb および 200 ppb になるように添加し，一晩放置後，回収実験を行なった結果は Table 1 に示した通りであり，いずれも 90

%以上の良好な結果が得られた.

結　論

穀類および食品中の Sterigmatocystin を塩化カリウム溶液-メタノール混液でホモジナイズ後, ろ過して得た抽出液をフロリジルおよび Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーでクリーンアップ後, TLC により展開後デンシトメトリーで定量する方法を検討した.

その結果, 従来の溶媒分離操作を行なう試験法に比較して分析時間も非常に短縮でき, また薄層クロマト上に妨害蛍光もみられなかった. 回収率は90%以上であり, また確認限度も 40ppb であることから, 実用上充分使用できるものと考える.

なお本法を用い, 市販品の小麦5件, 米100件, 玄米30件, コーン10件, みそ121件, 雑豆150件の市販品について調査を行なったところ, 現在のところいずれからも Sterigmatocystin は検出されなかった.

文　献

1) Dickens, F., H. E. H. Jones, and H. B. Waynforth : *Brit. J. Cancer.*, **20**, 134, 1966
2) Purchase, I. F. H. and J. J. Van der Watt : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **8**, 289, 1970
3) Purchase, I. F. H. and J. J. Van der Watt : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **26**, 274, 1973
4) 倉田　浩：食品衛生研究, **28**, 3, 190, 1978
5) Terao, K. : Gann, **69**, 237, 1978
6) 高木高明, 山崎幹夫, 堀江義一, 宇田川俊一：食衛誌, **11**, 373, 1970
7) 山崎幹夫, 堀江義一, 藤本治宏：食衛誌, **11**, 381, 1970
8) Shannon Gail, M. and O. L. Shotwell : *J. Assoc. Offici. Agri. Chemist.*, **59**, 5, 1976
9) 真鍋　勝, 南沢正敏, 松浦慎治：農化, **47**, 209, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 250—255, 1978

クロレラ常用者間に発生した光過敏症皮膚炎について

田村行弘*, 西垣　進*, 真木俊夫*
嶋村保洋*, 直井家壽太*

Photosensitive Dermatitis caused by Chlorella Tablets

YUKIHIRO TAMURA*, SUSUMU NISHIGAKI*, TOSHIO MAKI*,
YASUHIRO SHIMAMURA* and YASUTA NAOI*

緒　言

昭和52年4月に，クロレラ常用者の間で，顔や手の甲などに浮腫や紅斑を伴う皮膚炎が発生し，これらの被害者から都衛生局に届出があった．これに基づいて，都内の病院やクロレラ販売員などを通じて調査を行なったところ，ほかにも同じ症状を訴えるものがかなりいることが判明した．この皮膚炎は，露出部に限られていることから光過敏症によるものと推定した．

光過敏症発現物質には，ポルフィリン系化合物が知られており，その一つに chlorophyll 分解物がある．これには動物性の原因食としてアワビのツノマタによる中毒例[1]が，また植物性では牧草などによる家畜類[2]や，高菜漬などによるケッ歯類動物の中毒例[3-7]が報告されている．さらに乾燥クロレラには，約3％の chlorophyll[8]が含まれていることから，この分解物に起因する事故と推定し，原因究明を行なったところ，皮膚炎とクロレラ服用との因果関係が明らかとなったので，その大要について報告する．

症例調査

調査の結果を Table 1 にまとめて示したが，都衛生局で調査した同じ時期に日本皮膚科学会[9]において，類似の皮膚炎患者が16名いることが報告されたので，さらに追跡調査を行なってこの表中にまとめた．被害者の共通点は，「K社製クロレラ錠」（以下Kクロレラと略す）の常用者であり，また皮膚炎発生後，治療のために服用を中止すると，数週間で快方に向うことであった．このことから，皮膚炎の原因食はKクロレラであることが強く指摘された．

被害者は，合計23名発見され，その発生は昭和51年6月から翌年6月までみられ，特に昭和52年春に集中していた．また発症部位は，顔，手の甲，背などの露出部に限られ，その症状は浮腫や網状紅斑または紫斑を呈し，炎症が強いと痛みを伴ない，局所の皮膚の壊死や潰瘍などを起こしているものもいた．この症状については，実川ら[9]の報告とも共通しており，いずれも日光に暴露される皮膚に限り発症していることから，光過敏症によると推定された．

以上の一連の調査から，クロレラ服用と皮膚炎との間に，強い相関があることが明らかになった．

実験方法

1. 試料

1) K社製クロレラ　被害者の服用していた残りの錠剤12検体，市販の錠剤37検体，K社から提出された顆粒（打錠に先立って作られたもの；以下K顆粒と略す）12検体と原末10検体．

2) K社以外のクロレラ　市販の錠剤38検体，提供された原末15検体．

3) クロレラ関連製品　クロレラ抽出物エキス5検体，chlorophyll 製剤3検体．

以上の合計132検体について，次の検査を行なった．

2. 動物試験

動物による光過敏症発現の試験は，橋本ら[1,4]の照射試験法に準じて行なった．

1) 動物と飼育法

動物は4～5週齢の ICR 系雄マウス（体重 25g 前後），1群3匹ずつを用い，実験食には錠剤と顆粒は乳鉢で粉砕し，また原末はそのままマウス用飼料（C－3飼料粉末，日本クレア社製）に 1：1 の重量比で混合し

* 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. 光過敏症の事例とその摂取量

No.	発症または受診年月日	性別	年齢	喫食開始	摂取量 錠／日	症状
1	51. 6, 51. 11	女	67	51. 5	30	顔面，手，背の露出部に浮腫，有痛性紫斑
2	51. 7, 10, 52. 5	女	17	49. 5	20	顔面，手，腕に紫斑，52年5月には浮腫，皮斑，紫斑，圧痛
3	51. 10 52. 2, 3	女	47	48～49	20～50	顔面の発赤，腫脹，疼痛→網状紅斑，紫斑，一部頬部壊死
4	51. 11	男	68	51. 3	15～30	鼻，額に紅斑
5	51. 12	女	44	51. 10	20	顔面の浮腫→鼻，背，両頬部，両手背に網状壊死
6	52. 1	女	不明	50. 12	60～100	顔面の浮腫→顔面に色素沈着，早期ケロイド，手の甲に湿疹→ケロイド症状悪化し疼痛を伴う
7	52. 2	男	71	51. 11	30	顔面，手，背に皮膚炎，耳の変形
8	52. 2	男	26	50. 1	50～100	顔面，耳，手の甲，頸部に腫脹，紅斑，皮下出血
9	52. 2	男	11	52. 2	16	顔面の浮腫→顔面，両耳介，両手，背に網状，分岐状紅斑，圧痛
10	52. 3	女	44	49～50	40～70	前額部から両頬→両耳介に紫紅色皮斑，疼痛
11	52. 3	男	45	51. 11	20～30	顔面，手，背に腫脹→額，耳，手に紫紅斑，水疱，痂皮，圧痛
12	52. 3	女	42	51. 4	20	顔面，手，背に浮腫→手，背に網状紅斑または紫斑
13	52. 3	女	46	52. 2	15	鼻，背部，両頬，手，背に樹枝状紅斑
14	52. 3	男	54	51.	20	顔面，耳の周辺部の皮膚が黒赤色に変色→右手の甲に網状紅斑
15	52. 3	女	48	51.	10～15	口，目の周辺部の皮膚が赤かっ色に変色
16	52. 4	女	57	51. 11	30	指に発疹→顔面，手，背に浮腫→網状浮腫，出血斑，一部皮膚壊死
17	52. 4	男	47	51. 4	30	指に浮腫→顔面，頸部に紫斑～かっ色の網状斑，疼痛
18	52. 4	女	69	50.	30	顔面，手，背に発疹→浮腫，暗紫紅色斑状出血斑，疼痛
19	52. 4	女	66	51. 3	25	手首より先全体はれる→内出血紫色斑
20	52. 4	女	66	51. 9	15～18	両手が紫色を呈し疼痛あり，顔面のはれ→頬，耳たぶにしもやけ状皮膚炎
21	52. 5	女	57	50. 10	20	頬，手，背に腫脹→紅斑
22	52. 5	男	不明	52. 5	不明	顔面，手の甲，二の腕に漆カブレ様の皮膚炎
23	52. 6	女	〃	48.	20	顔面，特に額，あごにあせも様湿疹

Table 2. 動物の光過敏症判定基準

発現度		症状
陰性	−	異状を認めないもの 耳の血管の怒脹，紅斑が観察期間中に消失するもの
陽性	＋	耳の血管の怒脹，紅斑，腫脹を呈するもの
	＋＋	耳の血管の怒脹，紅斑，腫脹および顔面の腫脹，狂奔を呈するもの
	＋＋＋	照射中または数時間後に死亡するもの

て調製した．また動物は，できるかぎり暗くした部屋に置き，連続5日間，実験食を自由に摂取させ飼育した．

2) 光照射と動物の光過敏症判定基準

実験食で5日間飼育した動物に対して，Fig. 1 に示したような装置で，2時間可視光線を照射した（照度3000Lux）．

動物の光過敏症発現度の判定は，光照射中，終了直後，および24時間後の動物の障害状態により，Table 2 のように分けた．光過敏症が強く現われたが死に至らない動物（＋＋）は，照射後3～4日目に耳の壊死，脱落，顔面および背部の脱毛や潰瘍などが観察された．

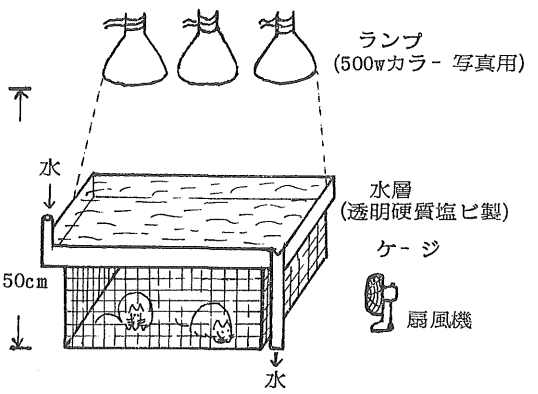


Fig. 1. 光照射試験装置

3. chlorophyll 分解物の定量法と薄層クロマトグラフィー

1) 定量法

橋本[4], Chiba ら[10-12]の方法を準用し，Fig. 2 に示した操作で定量を行なった．chlorophyll 分解物の総量は，標品として㈱ヤクルトから提供された pheophorbide を T. L. C. で精製し用い，667nm の吸光度から算出したため，pheophorbide の換算値として現わした．

2) 薄層クロマトグラフィー

定量試験で得た色素原液と，分解物抽出液について，薄層クロマトグラフィー（以下 T.L.C. と略す）を行なった．薄層板には silica gel (Merck 社製) を用い，展開溶媒に toluene, ethylalcohol, chloroform, water (300：15：3：0.5) を用いた．主な chlorophyll 分解物のスポットは，肉眼と紫外線 (λmax 3650Å) 照射による赤色蛍光により確認した．また各スポットは，エチルエーテルに溶出させ，可視部吸収スペクトルとアルカリによる転溶性などから同定した．

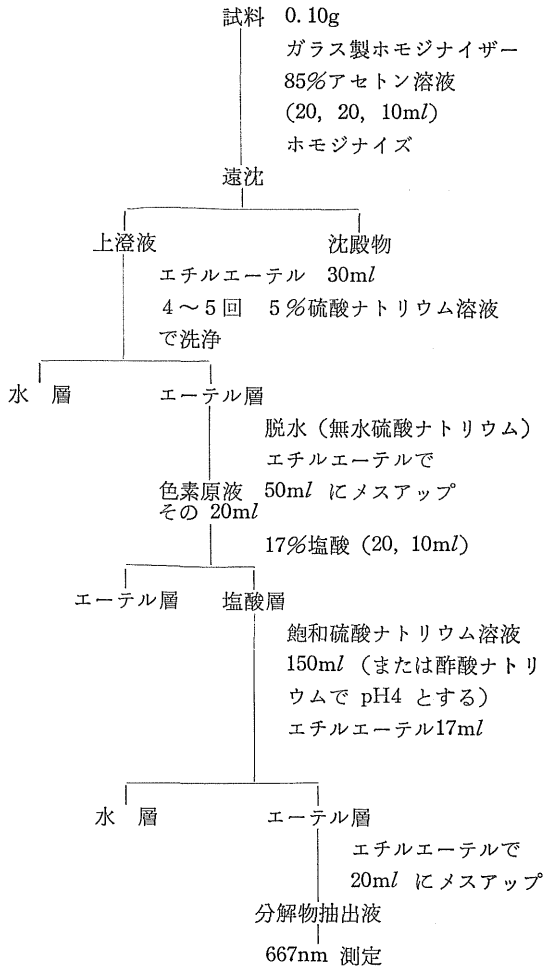


Fig. 2. クロロフィル分解物の分析法

結果と考察

1. 動物試験

各種クロレラの動物試験の結果を Table 3 に示したが，被害者が服用していたKクロレラ12検体全部と，K顆粒12検体中11検体は，いずれも動物試験が陽性であった．しかし，このように陽性を示した群の動物でも，光を照射しない場合には，異常が現われなかった．またこれら動物の光過敏症は，照射中と照射直後に耳の紅斑，瘙痒が起こり，顔面の腫脹，狂奔などを呈し，その中のあるものは数時間後に死に至るものもあるほど症状が強く現われた．Photo 1 に発症動物の例を示した．

一方K社所有のクロレラ原末10検体については，動物試験陽性を呈するものが1検体もなかった．さらに対照に用いた他社製クロレラ錠38検体，他社所有のクロレラ原末15検体についても，すべて動物が光過敏症を起こすものはなかった．

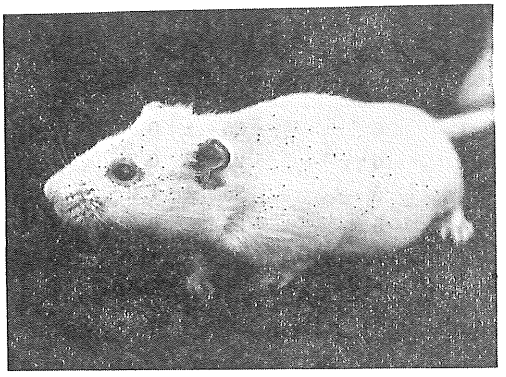
以上のように，K社製クロレラ錠と顆粒にだけ光毒性が確認され，そしてその原末に異常がないことから，K社の錠剤製造工程に，毒化の原因があったものと判断した．

さらに，市販のKクロレラ37検体を調査したところ，24検体に陽性を示すものがみつかった．このものは，昭和51年4月から翌年4月初旬までの間に製造されたものに限られていた．この結果は，Table 1 に示した症例調査の皮膚炎続発時期と一致しており，Kクロレラ服用と皮膚炎発症との因果関係をさらに強く裏付けた．

2. クロレラ中の chlorophyll 分解物の同定

動物試験陽性のKクロレラとK顆粒における T.L.C.

1. 耳，顔面の腫脹（＋）

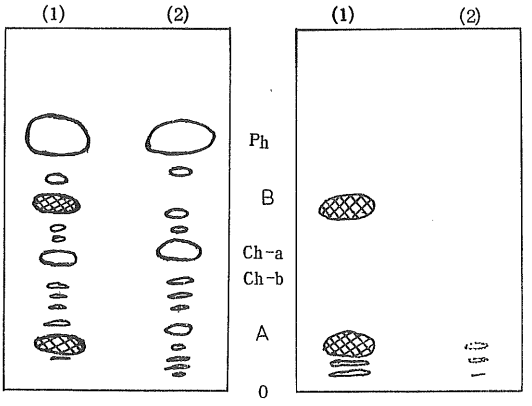


2. 耳の脱落，耳および目周辺部の脱毛（＋）

Photo 1. 動物の光過敏症発現の状態

Table 3. クロレラとその関連製品の動物試験の検査結果

品名		No	光過敏症発現 ＋	―
錠剤	被害者服用残品	12	12	0
	K社製	37	24	13
	他社製	38	0	38
	計	87	36	51
原末	K社所有	10	0	10
	他社所有	15	0	15
	計	25	0	25
K社製顆粒		12	11	1
クロレラ関連製品（シロップなど）		5	0	5
クロロフィルマグネシウム塩		1	0	1
銅クロロフィリン		1	0	1
鉄クロロフィリン		1	0	1



色素原液中の色素　　分解物抽出液中の色素

Fig. 3. クロレラ中のクロロフィル分解物の薄層クロマトグラフィー

(1) 光過敏症を発現するクロレラ
(2) 光過敏症を発現しないクロレラ
Ph…フェオフィチン　Ch-a…クロロフィルa
Ch-b…クロロフィルb
薄層クロマトグラフィー用プレート：
DC-Fertig Platten Kiesel gel (Merck)
展開溶媒：トルエン，エチルアルコール，クロロホルム，水
(300：15：3：0.5)

の結果は，Fig. 3 に示したようにA，B 2個のスポットが多量に検出された．このA，Bはそれぞれ標品の pheophorbide a，および多摩生化学研究所から提供された methylpheophorbide a と Rf 値が一致し，両色素とも黒褐色で，紫外線照射で強い赤色蛍光を発した．これら色素のエーテル溶液は，Fig. 4 にみられるような吸収スペクトル[13,14]を示し，またAはアルカリに転溶し[12]，Bは転溶しなかった．このような物性などから，これら色素は chlorophyll から phytol 基と Mg が離脱した分解物であり，Aは pheophorbide a，またBは pheophorbide a エステル類であると推定した．

pheophorbide a は，動物試験陰性のクロレラ中にも検出されるが，Kクロレラに比べると著しく微少なスポットに過ぎなかった．また pheophorbide a のエステル類は，KクロレラとK顆粒だけから特異的に検出された．このエステル類は，アルコール溶液中で chlorophyllase が chlorophyllに作用すると産生される[5,14-16]．従って，動物試験陽性のKクロレラは，顆粒製造時の工程においてアルコールが使われ，クロレラ中に失効することなく存在していた chlorophyllase が，活性化した

Table 4. クロレラ中の Chlorophyll 分解物含有量と動物の光過敏症発現度との関係

群	マウス			Pheophorbide*	光過敏症	
	No.	体重	クロレラ摂取量	含有量	発症匹数	発現度
1	5	25 ± 0 g	1.5g	110mg%	0/5	−
2	5	25 ± 0.7	1.5	300	5/5	+
3	5	25 ± 1.2	1.5	400	5/5	++
4	5	25 ± 0.8	1.5	600	5/5	+++

* Chlorophyll 分解物の総量を Pheophorbide aに換算した値

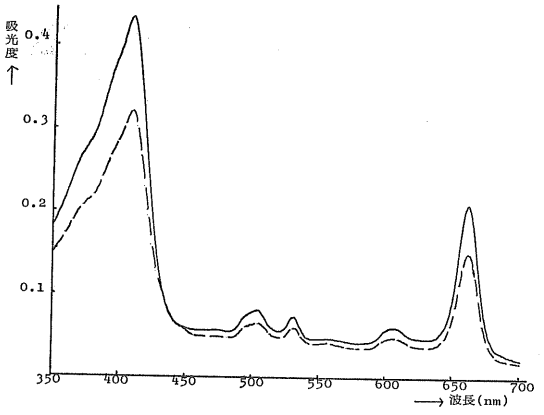


Fig. 4. 緊急光過敏症発現クロレラから抽出したクロロフィル分解物の可視部吸収スペクトル
—— 分解物抽出液
--- フェオフォルバイドa
(エチルエーテル溶液)

ために生成したものと考えられた.

以上のことから，今回起きた皮膚炎の原因物質の主体は,pheophorbide aやそのエステル類などのchlorophyll分解物であることを確認した．またエステル類の成因と考えられた製造工程中におけるエタノールの使用がK社からの答申で明らかにされたため，著者らの指摘は強く裏付けられた.

3. クロレラ中の chlorophyll 分解物の含有量

pheophorbide aに換算した chlorophyll 分解物の総量は，動物試験陽性のKクロレラ16検体で，平均510mg%（最大 815mg%，最低 290mg%）であった．また陰性のクロレラ錠22検体と原末 15 検体は，それぞれ平均 50 mg%（最大 160mg%，最低 10mg%），平均 60mg%（最大 110mg%，最低 10mg%）であった.

このように動物試験陽性のKクロレラは，陰性のものに比べて，平均で約10倍も多い chlorophyll 分解物を含んでいることが判明した.

4. クロレラ中の chlorophyll 分解物含有量と動物の光過敏症発現度との関係

クロレラ中の chlorophyll 分解物の含有量と動物試験との対比実験を行なった.

chlorophyll 分解物含有量の異なるものを 4 種類選び，実験食投与期間を24時間に変更して実験を行なったところ，Table 4 に示したような結果が得られた．分解物含有量の多いクロレラを摂取した動物ほど，光過敏症が強く現われ，特に分解物が最も多いクロレラ投与の第 1 群では，光照射後数時間以内に，すべて死に至ったほど強い光毒性を示した.

このような dose response が得られたことは，今回起きた皮膚炎が，多量の chlorophyll 分解物を含むクロレラ服用により起きたものであるということをさらに裏付けた.

5. 被害者の chlorophyll 分解物摂取量

被害者の服用していたクロレラ中の chlorophyll 分解物含有量と被害者の服用量とから，分解物摂取量の算出を行なった．chlorophyll 分解物の総摂取量を pheophorbide a に換算すると，25～130mg/man/day であると推定された.

また動物試験陰性のもので，例えば 160mg% の分解物を含有するクロレラの場合，1 日70錠服用すると最少発症量の 25mg/man/day に達する．これは，今回の調査からも，1 日 100 錠も服用していた人がいることから，特に問題のない市販クロレラの場合でも，多量服用が光過敏症を起こす可能性のあることを示唆するものであり，従って服用量についての指導も必要であることが指摘された.

総括

昭和52年 4 月に クロレラ 常用者間で 多発した 皮膚炎は，クロレラ中に多量に存在していた pheophorbide a などの chlorophyll 分解物の多量摂取に基づく，光過敏症であることを明らかにした．またこの分解物の成因は，K社所有のクロレラ原末が動物試験の結果陰性であり，陽性のものが顆粒製造の工程を経たKクロレラに限られていたことから，顆粒製造時に使われたエタノールに基因していることが明らかとなった.

また，これらの結果に基づき都衛生局では，K社に対して昭和52年4月9日以前製造のクロレラ錠の回収命令を出し，以降の皮膚炎発症を未然に防止した．

本事故は，ほかのいわゆる健康食品を含めて，規格基準のないまま市販されている食品の衛生学的検討の必要性を指摘する事件であった．

（本研究の概要は日本食品衛生学会第34回学術講演会1977年10月，岐阜で発表した．）

文　献

1) 橋本芳郎，堤　淳三：食衛誌，4，185，1969
2) Clare, N. T. : *Advanc. in Vet. Sci.*, 2, 182, 1955
3) 山田幸二，中村延生蔵：栄養と食糧，25，466, 1972
4) Hashimoto, Y. and J. Tsutsumi : 日水誌，27，859，1961
5) Topper, B. : *J. Sci. Fd. Agric.*, 26, 277, 1975
6) Lohrey, E., B. Tapper, and E. L. Hove : *Br. J. Nutr.*, 31, 159, 1974
7) 礒部明彦，木村修一：栄養と食糧，29，221，1976
8) 武智芳郎：クロレラ―その基礎と応用，901，学習研究社，1971
9) 実川久美子，肥田野　信：日本皮膚科学会東京地方会584会，東京，May 1977；皮膚科の臨床，19，別表―2，1978
10) Chiba, Y., I. Aiga, M. Ikemori, and Y. Satoh: *Plant & Cell Physiol.*, 8, 623, 1967
11) Roberts, D. W. A. : *Biochem. Biophys. Acta*, 58, 486, 1962
12) Goodwin, T. W. : *Chemistry & Biochem. of Plant Pigment*, 2nd Ed., 5, 1976, Academic press, London ; Vernon, L. P. and G. R. Seely : *The Chlorophylls*, 77, 1966, Academic press, New York
13) Holt, A. S. and E. E. Jacobs : *Am. Chem. Scand.*, 41, 710, 1954
14) Hynninen, P.H. : *Acta Chem. Scand.*, 27, 1771, 1973
15) Holden, M.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 25, 1427, 1974
16) Barrett, J. and S. W. Jeffrey : *Plant Physiol.*, 39, 44, 1964

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 256—260, 1978

N-ニトロソ化合物に関する衛生学的研究（第2報）
各種食品中の揮発性 N-ニトロソ化合物の含有量

真木俊夫*, 田村行弘*, 嶋村保洋*, 西垣　進*
直井家壽太*

Hygienic Studies on the N-Nitroso Compounds (II)
Survey of Various Foods for Volatile N-Nitroso Compounds

TOSHIO MAKI*, YUKIHIRO TAMURA*, YASUHIRO SHIMAMURA*,
SUSUMU NISHIGAKI* and YASUTA NAOI*

緒　言

胃がんなどヒトの発がんとニトロソアミン（以下NNAと略す）の因果関係は明確でなく，現在，世界的に食品[1]や広範な環境中[2,3]のNNA，人体中でのNNA生成[4]の有無に関するデーターの集積が急がれている．

われわれは前報[5]において，市販の畜肉，魚肉ハム・ソーセージ類中の低級揮発性NNA含有量の現状把握に関する調査を行なった．これら亜硝酸塩使用食肉加工品等の亜硝酸塩使用量は自粛措置等により懸念されたレベルに達するものはなかった．しかしながら，調査試料数や種類も充分ではなかったので，さらに対象を拡大し市販食品中のNNAレベル把握を続けることとした．

一般に食品中におけるNNAの生成の可能性を考慮する場合 ①高濃度の硝酸塩を天然に含有する野菜と食肉，魚肉との調理品 ②魚介加工品等の加熱調理段階における生成や増量等を取り上げることができる．しかも，これらについてのNNA含有量等に関する報告は少ないので，市販の缶詰食品，魚介加工品等のNNAについてTEA-GCで分析を行ない，また，一部の食品につき亜硝酸根，揮発性塩基窒素およびpHを測定しNNA生成との関連について検討を行なったので合わせて報告する．

実験方法

1. 試料　野菜入り畜肉ハム5，魚肉ソーセージ10，鯨肉ベーコン5，野菜入り畜肉・魚肉缶詰21，野菜入り魚肉ねり製品4，魚介干物8，塩辛5，魚介くん製品11，くん液7，レトルト食品1，鶏肉12，鶏卵2計12種91検体でいずれも市販品である．

2. 試薬　前報[5]に準じた．今回ジメチルニトロソアミン（DMNA），ジエチルニトロソアミン（DENA）以外にあらたに次の4種のNNAを追加した．各NNA標準溶液はジ・ノルマル・プロピルニトロソアミン（D*n*・PNA），ジ・ノルマル・ブチルニトロソアミン（D*n*・BNA）およびジ・イソブチルニトロソアミン（D*iso*・BNA）標準原液（イーストマン社製，95% 以上）をジクロロメタンで希釈して用いた．

3. 定量法　1）前報の定量法 2）に準じたが今回GCカラムの充てん剤は 20%-Versamide 900 60—80メッシュ(Chromosorb W, AW)，ガラスカラム（3m，内径 2.5mm）を使用した．
カラム温度180°，検出器 TEA ディテクター

2）亜硝酸根（以下 NO_2 と略す）の定量は前報に準じた．

3）揮発性塩基窒素（以下 VBN と略す）の定量は食品衛生検査指針に準じた．

4）pH は日立-堀場M-5型ガラス電極イオンメーターを用いて測定した．

4. NNA の分離抽出法　坂田ら[6]の方法に準じて実施した．

細切した試料 50g を 500m*l* のビーカーにとり20%水酸化ナトリウム溶液 50m*l*，ジクロロメタン 150m*l* を加え粉砕抽出する．これを2回くり返し，有機層は分取して合わせ無水硫酸ナトリウムで脱水後，ガラスウールでろ過し，ろ液をクーデルナー・ダーニシュ濃縮器により

* 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. Occurrence of Volatile Nitrosamines, Nitrite, Volatile Basic Nitrogen and pH in Commercial Foods

Samples	No. of samples examined	DMNA	DENA	D*n*PNA (ppb)	D*n*BNA	D*iso*BNA	NO_2 (ppm)	VBN (mg%)	pH
Ham containing vegetable	5	—	—	—	—	28.4	4—11		
						(1)	(5)		
Fish sausage	10	0.7—0.9	—	—	—	—	0.5— 2		
		(3)					(10)		
Whale meat bacon	5	—	—	—	—	—	1—16		
							(5)		
Canned meat & fish meat containing vegetable & retort food	22	0.2—12.2	0.9—10.7	7.1	—	—			4.1—6.4
		(5)	(4)	(1)					(av. 5.3)
Fish, dried	8	0.7—25.5	0.8	—	28.0	10.0		15.2—81.2	
		(6)	(1)		(1)	(1)			
broiled		0.6—49.3	0.9	—	14.0	24.7		31.9—88.5	
		(6)	(1)		(1)	(1)			
Salted viscera (Shiokara)	5	0.9—4.2	—	—	—	3.8		44.2—92.4	
		(5)				(1)			
Fish, smoked	11 flavoring	3.7—14.2	—	—	—	—	0.8—2.5	8.4—42.6	
	5	(5)					(5)		
smoking		0.3—1.2	—	14.3	—	—	0.6	10.6—71.7	
	6	(5)		(1)			(1)		
Smoking flavoring	7	1.1—3.2	1.0—1.3	2.3	10.4	18.7		1—9.5	2.4—5.7
		(4)	(2)	(1)	(1)	(1)			(av. 3.6)
Fish jelly product containing vegetable (Neri-seihin)	4	0.6—1.7	—	—	—	11.3—31.4	0.8—1.0		
		(3)				(2)	(4)		
Chicken	12	0.5	—	—	—	—		8.4—19	6.0
		(1)							
Egg	2	—	—	—	—	—			

— : not detected, limit 0.1ppb (NNA), ( ) the number of samples detected NNA and NO_2

40° の水浴中で 5ml まで濃縮を行ない，これを定量用の試験溶液とする．この試験溶液について TEA-GC を用いて定量分析を行なった．

本定量法の回収率は DMNA で 89%，DENA，D*n*·PNA，D*n*·BNA および D*iso*·BNA でそれぞれほぼ100%であった．

結果と考察

各種食品中の NNA の定量結果と一部 NO_2，VBN および pH の分析結果を Table 1 に示した．

1. 魚肉ソーセージおよび亜硝酸塩添加食品 魚肉ソーセージ，野菜入り畜肉ハムおよび鯨肉ベーコン類計20検体のうち亜硝酸塩添加表示がない魚肉ソーセージ10検体中3検体から1ppb 以下ではあるが微量の DMNA を検出した．しかし，いずれの検体からも DENA は検出されなかった．前報[5]の結果と併せて，魚肉ソーセージ類中の DMNA 含有量は過去の報告[7]に見られたように10ppb オーダーが検出されることはほとんどなく，DMNA についてみれば食品衛生上問題になる量に達することはないと考えられる．一方，亜硝酸塩添加表示のある畜肉ハム，鯨肉ベーコンから DMNA は検出されなかった．

魚肉ソーセージに高濃度の NO_2 塩を添加した場合 DMNA が生成[8]することが知られているが，今回同時に調査した NO_2 残存量は 0.5—16ppm 程度で亜硝酸塩添加量が少ないと見られる点，また，市販の亜硝酸塩添加剤にビタミンC添加をしたものが多く見られることなどの要因により，これらの食品中で NNA の生成は起らないと考えられる．しかし，畜肉ハム1検体から28.4ppb の D*iso*·BNA を検出したが，NO_2 残存量は僅かに4ppm であったことから NNA 含有量との関係はないものと思われる．

2. 畜肉，魚肉野菜入り缶詰およびレトルト食品 缶詰食品21検体およびレトルト食品1検体のうち5検体（スパゲッティミートソース，さんま昆布巻，さけ筍味付，ポーク & ビーンズおよびレトルト親子丼）から DMNA を検出し，最高は輸入品のスパゲッティミートソースの 12.2ppb であった．その他は 1ppb 程度に過ぎなかった．また，4検体（ツナシチュウ，チキンカレー，牛肉すきやきおよびレトルト親子丼）から DENA を検出し，最高はレトルト親子丼の 10.7ppb であった．本調査全試料中の最高であった．さらに牛肉すきやきから D*n*·PNA 7.1ppb を検出した．

野菜には高濃度の硝酸塩を含有していることから缶詰中で硝酸塩が還元されて NNA の生成に関与するのではないかと疑われたが，今回得られた DMNA, DENA, D*n*·PNA は低値であった．この理由については缶詰中の pH が平均5.3で DMNA 生成の最適 pH 3.4[9]より中性に近かったこと，また，野菜中の硝酸塩が還元されにくかった等のことが推定され今後，酸性缶詰食品等についても調査をより綿密に続ける必要がある．

3. 魚介加工品

1) 魚介干物類8検体すべてから DMNA を検出し含有量は 0.7—25.5ppb の範囲であった．今回調査した全ての食品中 DMNA の最高値は干し鱈の 25.5ppb であった．特に，干し鱈，するめ，あじの干物等は焼いたのち喰べることから，焼く前と焼いた段階での NNA 含有量を比較した．その結果，一部に若干の減少をきたすものも見られたが大部分の試料は焼くことにより DMNA が数倍高く生成する傾向を示した．しかし，DENA はほとんど変化が見られなかった．また，あじの干物（生）の1検体から 28.0ppb の D*n*·BNA を検出したが，焼くことにより逆に 14.0ppb に半減し，焼く前に検出されなかった D*iso*·BNA があらたに 24.7ppb 生成した．この D*iso*·BNA の生成は Fazio ら[10]や Pensabene ら[11]がベーコンを高熱で焼くと高濃度のニトロソピロリジンが生成すると報告していることと酷似しており，食品からの NNA 摂取の危険性を考えると加熱調理の段階まで考慮する必要があることを示唆している．さらに同時に VBN を測定したところ，すべての試料の DMNA 含有量の変動に比例していることが明らかとなった．このことは試料を焼くことによりジメチルアミン量が変化し，DMNA の生成に影響したと思われる．

2) いかおよびかつお塩辛5検体すべてから DMNA を検出し，その含有量は 0.9—4.2ppb の範囲で，特に異常値は見られなかった．DENA はいずれの検体からも検出されなかった．しかし，かつおの塩辛1検体から 3.8ppb の D*iso*·BNA が検出された．また同時に VBN を測定したところ，44.2—92.4mg% の値を得たが DMNA 含有量との間に一定の関係は見られなかった．Fong ら[12]は海水産の魚介干物の塩漬に用いたあら塩に含まれる硝酸塩が還元菌によって亜硝酸塩に変りこれが関与して比較的多量の DMNA が生成したと述べており，製造過程で多量のアミンが生成される塩辛類はあら塩を多量に使用し，しかも長期間保存させることから，あら塩が DMNA 生成量を増す因子となり得るのではないかと懸念されたが，するめ等と比べても同じレベルであることから大きな影響はなくわが国で塩辛に用いられる食塩に関しては，特に問題はないと考える．

3) 魚介くん製品11検体中10検体（真いか，紫いか，大判いか，たこ，たこあし，紅鮭，紅鮭ソフト，数の子

にしん，鰊およびアワビ）から0.3—14.2ppbのDMNAを検出し，さらにアワビのくん製品からは14.3ppbのD*n*·PNAを検出した．特に，いか，たこ等のくん製品は5—10ppb程度のDMNAで魚より高い値を示したがDMNAに関して魚種による違いがあるように見うけられる．

今回調査したくん製品を製造法から大別するとくん煙法よりくん液法による製品の方が高い値が得られた．製造過程において添加物として使用されるくん液についても分析を行なったところ，くん原液で3.2ppb，くん液で1ppbのDMNAを検出し，くん結晶からは検出されなかった．くん液中のNNA含有量はこのように微量であることからくん製品のNNA含有量に影響を与えることはないと考えてよく，このことはDMNA含有量がするめ等とほぼ同じ値であることからも裏付けられる．一方，くん煙処理の場合，煙の中に存在する窒素酸化物の影響が考えられたが製品中のDMNAは1ppb程度と低濃度レベルであり，この値は通常魚肉ソーセージに含有されている量とほぼ等しく，くん液法，くん煙法ともNNAの生成を助長することはないと思われる．ただアワビのくん製品から比較的高濃度のD*n*·PNA 14.3ppbを検出したことは，DMNA，DENA以外のNNAを検出したという点からこの種のNNAの生成も考慮する必要がある．いずれにしても，双方とも試料中のDMNA含有量に関与することはなく，むしろ，魚介の種類に依存しているように思われる．

4. 野菜入り魚肉ねり製品，鶏肉，鶏卵 野菜入り魚肉ねり製品4検体のうち3検体（ごぼう巻，しそ揚，テンハオ）から1ppb程度のDMNAを検出した．しかし，いずれの検体からもDENAは検出されなかった．さらに2検体（しそ揚，しその葉入り）から11.3—31.4ppbのD*iso*·BNAを検出した．

最近，動物の飼料中にニトロソアミンが含まれていれば，動物を通して人の食料に移行残留する可能性があり，例えばDMNAが飼料からニワトリ体内へ吸収されると，卵に移行するという報告[13]があるので鶏肉12検体，鶏卵2検体についても分析を行なったところ，鶏肉1検体から0.5ppbという極微量のDMNAを検出した．しかし，その他のNNAはいずれの試料からも検出されなかった．このことから，DMNAが体内から鶏卵に移行するという問題は現時点では考慮する必要はない．しかし，Pensabeneら[14]は鶏卵等中のレシチンとNO_2塩とが反応して高濃度のDMNAが生成したと述べていることから，鶏肉，鶏卵および野菜等の調理加工品の場合のNNA生成については今後調査する必要があると考える．

要　約

1. 市販食品計91検体についてTEA-GC法によりNNAの分析を行なった．一部の試料については同時にNO_2, VBNおよびpHを測定した．その結果，NO_2塩添加食品ならびに魚肉ソーセージ類から微量のDMNAが検出されたものの前年度同様1ppb以下であった．このことから食品衛生上，これらの食品について現状では特に問題にするレベルでないことが明らかとなった．

2. 野菜入り畜肉，魚肉缶詰からは高濃度のNNAは検出されず野菜中の硝酸塩はNNAの生成に関与していない．

3. 魚介加工品のすべてから1—10ppb程度のDMNAを検出した．また，魚介干物そのものと焼いた段階でのNNA含有量の比較を行なったところ，大部分の試料が焼くことにより数倍高い量のDMNAを生成することが判明した．さらに試料によっては加熱処理で全く別のNNAの生成が起り得ることを明らかにした．

魚介くん製品のうち，くん液法の製品に比較的高いDMNAが検出されたがくん液のNNA含有量から，くん液自体がこれらの製品中のNNA量にはほとんど関与していない．また，塩辛すべてからDMNAが検出されたが，約1ppbと低値であった．

4. 一部，魚介干物，塩辛，くん液，野菜入り魚肉ねり製品からDMNA，DENA以外のNNAを比較的高濃度のレベルで検出したことから，今後ともDMNA，DENA以外のNNAについて調査を進める必要がある．

文　献

1) Gough, T. A., K. S. Webb, and R. F. Coleman : *Nature*, **272**, 161, 1978
2) Fine, D. H., D. P. Rounbehler, N. M. Belcher, and S. S. Epstein : *Science*, **192**, 1328, 1976
3) Fan, T. T., U. Goff, L. Song, and D. H. Fine: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **15**, 423, 1977
4) Fine, D. H., R. Ross, D. P. Rounbehler, A. Silvergleid, and L. Song : *Nature*, **265**, 753, 1977
5) 真木俊夫，田村行弘，嶋村保洋ら：東京衛研年報，**28-1**, 145, 1977
6) 坂田　衛，籠谷昭一，松居正巳ら：日本食品衛生学会第33回学術講演要旨集（東京），58, 1977
7) 中村全良，臼杵睦夫：食品衛生学雑誌，**14**, 264, 1973
8) 國崎直道，松浦宏之，林　誠：日本水産学会誌，

43, 1287, 1977

9) Foreman, F. K. and K. Goodhead : *J. Sci. Fd. Agric.*, 26, 1771, 1975

10) Fazio, T., R. H. White, L. R. Dusold, and J. W. Howard : *J. AOAC*, 56, 919, 1973

11) Pensabene, J. W., W. Fiddler, R. A. Gates, J. C. Fagan, and A. E. Wasserman : *J. Fd. Sci.*, 39, 314, 1974

12) Fong, Y. Y. and C. Chan : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 14, 95, 1976

13) 河端俊治：食品衛生研究, 28, 7, 1978

14) Pensabene, J. W., W. Fiddler, R. C. Doerr, L. Lakritz, and A. E. Wasserman : *J. Agric. Fd. Chem.*, 23, 979, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 261—265, 1978

豆類中のシアンの定量法

勝木康隆*, 安田和男*, 上田　工*, 直井家壽太*

Determination of Cyanide in Beans

YASUTAKA KATSUKI*, KAZUO YASUDA*, KOU UEDA*
and YASUTA NAOI*

はじめに

“豆類はシアン化合物の検出されるものであってはならない”とされており[1,2]，これは昭和32年にビルマ産バター豆にシアン化合物の含有が発見されて以来の基本的な考え方である．現在は成分規格，使用基準が定められ，製あんを目的としたものに限り，100gにつき50mgのシアン（CN）含有を限度として輸入が認められている．

豆類の成分規格中，検出法はその精度において前処理および定量法に改善すべき点がいくつか見られるため検討を行なった．豆類のシアンは配糖体として存在し[3-5]，これを定量的に捕捉するためには酵素を十分に働かせることが重要なポイントであり，発生したシアンは正確に測定されなければならない．

著者らは前報[6]において“生あん中のシアンの検査法”として，ピクリン酸紙法および蒸留後ピリジン-ピラゾロン法に付す方法を報告したが，この方法は特別な装置を必要とせず通常の実験器材で分析できる点で好適と考え豆類中のシアンの分析に応用を試みた．

実験方法

1. 試料および試薬

試料　ビルマバター豆，マダガスカルバター豆，サルタピア豆，ベビーライマ豆

ピクリン酸紙　東洋ろ紙 No.50 を1％ピクリン酸水溶液に浸し，室温で乾燥したのち 10×40mm の大きさに切る．しゃ光して保存する．

McIlvaine 緩衝液　0.1M クエン酸 79.1m*l* と 0.2M リン酸 120.9m*l* を混合する（pH 5.8）．

リン酸緩衝液　リン酸一カリウム 3.40g とリン酸二ナリトウム（無水）3.55g を水に溶かして全量を 1000m*l* とする（pH 6.8）．

クロラミンT溶液　クロラミンT 1.25g を水に溶かして 100m*l* とする．用時調製する．

ピリジン-ピラゾロン 試液　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン 0.25g を 75° の温湯 100m*l* に溶かして室温まで冷却し，これにビス（1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン）0.02g をピリジン 20m*l* に溶かした液を加えて混合する．用時調製する．

シアン標準液　シアン化カリウム 2.5g を水に溶かし 1000m*l* とする．0.01N 硝酸銀溶液で滴定し 1m*l* 中のシアン（mg）を算定する．シアンとして 10mg に相当する量をとり水で 100m*l* とする．つぎに，この液 10m*l* を 100m*l* のメスフラスコにとり 0.1N 水酸化ナトリウム溶液 50m*l* および水を加えて 100m*l* とする．

シアン標準溶液 1m*l*=0.01mg CN

2. 定性分析法

粉砕した豆 10g を 200m*l* の三角フラスコにとり McIlvaine 緩衝液（以下 Mc 緩衝液と略す）50m*l* を加えた後アンモニアで pH 7.0—8.5 とする．つぎにピクリン酸をつるしたコルク栓で密栓し，ときどき振り混ぜながら水浴上 50—60° で1時間以上加温する．ピクリン酸紙は用時10％炭酸ナトリウム溶液で下端をうるおす．シアン化合物の量に応じて下端部は橙色—暗赤褐色に変色する（ピクリン酸紙法）．

3. 定量分析法

粉砕した豆 2—10g を 500m*l* の二頸丸底フラスコにとり Mc 緩衝液 200m*l*，消泡用シリコン少量を加え密栓し，ときどき振りまぜながら 37° で5—6時間浸漬する．つぎに蒸留管をすばやくつけて水蒸気蒸留する（図1）．受器は 100m*l* 広口共栓メスシリンダーを用い，あらかじめ1％水酸化カリウム溶液 30m*l* を入れておく．蒸留装置の末端はバブラーを用い水酸化カリウム溶液中に浸しておく．留出速度 3.0m*l*/min. で受器中の液量が 90m*l* になったら蒸留をやめる．留液はフェノールフタレインを指示薬として，10％酢酸を用いて中和し，水で全量を正確に 100m*l* として試験

* 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

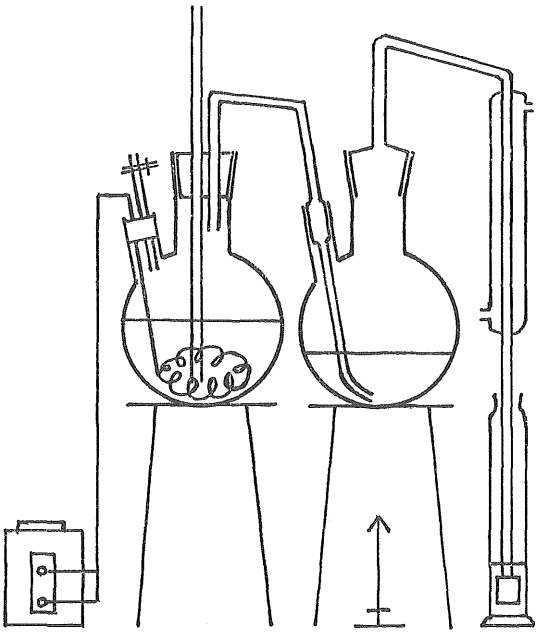


Fig. 1. Apparatus used for the Distillation

溶液とする．

ピクリン酸紙法で得た結果から，試験溶液の 0.5—20 m*l* を 50m*l* の共栓比色管にとる．水で 20m*l* にした後リン酸緩衝液 10m*l*，クロラミンT溶液 0.25m*l* を加え，ただちに密栓して静かに振り混ぜ5分間静置する．ピリジン-ピラゾロン試液 15m*l* を加え水で 50m*l* にメスアップする．生じた青色の吸光度を波長 620nm で測定する．同時にシアン標準液による検量線を作成しシアンの量を求める．本法の検出限度は 2.5μg である．

結果および考察

1. ピクリン酸紙法

1) ピクリン酸紙の感度 ピクリン酸紙を用いた遊離シアン，結合シアンの同時検出法は前報[6]においてその実施条件を検討し，“生あん中のシアンの検出法”として詳細に報告済みである．シアン配糖体の強酸性，強アルカリ性における加水分解ではシアン発生は非常に少なく[3,6,7]豆類中のシアン化合物を正確に把握することはできない．有機結合シアンの検出はアンモニア弱アルカリ性 pH 7.0—8.5 に調整し，発生するシアンを暗赤褐色の isopurpuric acid のアルカリ塩とすることにより正確な検出が期待できる[8]．

本発色法は Beer's law に従う[8]とされており，ここで得た結果から定量値の予測をすることが可能である．シアン標準液を用いた本法の検出限度は 5μg である．

シアン含有量既知のバター豆（465ppm）およびベビーライマ豆（40ppm）を用いて検出限度を検討した．その結果，バター豆の 1g（465μg），ベビーライマ豆の 10g（400μg）はシアン標準液の 50μg と，またベビーライマ豆 1g（40μg）はシアン標準液の 5μg とほぼ同程度の赤褐色を示し，豆類中のシアン化合物の反応は KCN の約 1/10 に相当する．したがってシアン配糖体（CNとして）40μg 程度が最低必要であり，試料採取量を 20g とするとシアンとして 2ppm 以上含有する豆において検出が可能である．

2) 発色の妨害物 isopurpuric acid アルカリ塩の生成を妨害する物質[8]について検討を行なった．三角フラスコに Mc 緩衝液 50m*l*，シアン標準液 50μg をとりA；ホルマリン 0.01—1mg　B；アセトン 100—1000mg　C；次亜硫酸ナトリウム（SO_2 として）200—500mg　D；硫化ナトリウム（H_2S として）1—50mg を添加し，シアン標準液 5—100μg の発色と比較対照した．

シアン標準液（μg）	0	5	25	50	100
発色の程度	(−)	(+)	(++)	(+++)	(+++)
A（ホルマリン）					
0.01mg				(+++)	
0.05〃			(++) ←		
0.1 〃		(+) ←			
1.0 〃	(−) ←				
B（アセトン）					
100mg				(+++)	
1000〃				(+++)	
C（SO_2）					
200mg				(+++)	
500〃				(+++)	
D（H_2S）					
1mg				(+++)	
50〃				(+++)	

従来のクエン酸緩衝液を使用した場合，二酸化イオウ 500mg，硫化水素 5mg 添加で負の妨害が見られるが，本法ではそれぞれ 500mg，50mg 添加で妨害を受けない．ホルマリン 1mg は反応を完全に妨害するが，アセトン 1000mg 添加による障害はまったく見られなかった．

3) ピクリン酸反応陰性の豆類 豆類の定性試験を行なった結果，以下の豆からはシアンの検出は認められなかった．

日本産豆 小豆，手亡，うずら，金時，白はな，えんどう，大豆，くろ豆，とら豆，いんげん，大福いんげん

輸入豆 竹小豆，赤竹小豆，天津小豆，中共小豆，山東小豆，赤小豆，コロンビア小豆，朝鮮小豆，中共うず

ら，アフリカうずら，グリンピース，ロンドピース，ウインターピース，アラスカえんどう，エチオピアそら豆，ミシガンビーン，メキシコキドニー，アメリカキドニー，中共キドニー，インドネシアブラウン，カブラ，ピント豆，ピンクビーン，ブラックビーン，マトペ，グレトノーザン，白大角

豆類中いわゆるシアン豆は2%アンモニア水で臍点の黄変が特徴的であるが，上記いずれの豆も臍点の変色は認められなかった．

2. 定量分析法

1) 試料の調製

(1) 試料の粉砕 浸漬液の粉末豆中への浸透性とシアン化合物の分解の関連性を検討するため，粒度別にシアンを測定した．試料の豆はミキサーで粉砕し局方ふるい番号60 (0.25mm)，32 (0.5mm)，16 (1.0mm)，9 (2.0 mm) に分けて比較したところ，本法の浸漬条件5時間では差異は見られなかった．以下の実験では径 1mm 以下の粉末部分を主として使用した．

(2) シアン含有量の個体差および部分差 ビルマバター豆を用いて大，中，小の大きさ別シアン含有量を測定した．その結果，豆の大小により差がみられ，小さい豆にシアン含量の多い傾向がみられた．また，同一ロットのマダガスカルバター豆 (1.6—1.8g) ではシアン含量は31—44ppm の個体差がみられた．

型	個数	重量(g)	1個平均(g)	CN(ppm)
大	15	9.0	0.6	250
中	35	12.7	0.36	280
小	46	10.0	0.22	330

マダガスカルバター豆を種皮（臍点を含む）と子葉部分に分け，各 1g 中のシアンを測定したところ，種皮 0.6ppm，子葉 78ppm という部分差がみられた．

以上の結果から，平均した実測値を得るためには，できるだけ大量のサンプルを処理し十分な粉砕，混合が大切である．

(3) 粉末バター豆中のシアン量の経時変化 ビルマバター豆（CN として 470ppm 含有，水分13%）を粉砕し室温放置して残存するシアン量の経時変化を観察した．

経過日数（日）		6	23	37	48	75
CN	(ppm)	470	460	475	430	440
水分	(%)	13	—	—	—	13

75日間経過した後なお大部分のシアンは消失せずに残留していることから，シアンは組織中で安定な結合シアンとして存在すると推定される．

(4) サンプルサイズの検討 いわゆるシアン豆は多量のシアン化合物を含有するものがあり，またピリジン-ピラゾロン法は微量定量が可能であることから，小試料による分析を行なえるがバラツキの原因にもなるため，サンプルサイズとその限度について検討を加えた．

試料としてマダガスカルバター豆，ビルマバター豆を用い，その 0.2—25g をとり常法によりシアンを測定した．

マダガスカルバター豆			ビルマバター豆		
試料 (g)	CN (ppm)	回収率 (%)	試料 (g)	CN (ppm)	回収率 (%)
0.2	11	13	0.5	438	80
0.5	30	35	1.0	523	95
1.0	59	69	2.0	547	100
2.0	85	100	4.0	548	100
			10.0	534	97
			25.0	483	88

マダガスカル産とビルマ産バター豆とではシアン含有量に6倍の開きがあるが，いずれも少試料ではバラツキはなく回収率の低下が見られる．したがって定量試験に際してサンプル量を加減するには限度があり，最低 2g の試料を採る必要がある．また 25g では回収率の低下が見られることから，10g 以上の試料採取は適当ではないと考えられる．

2) 浸漬法の検討

(1) 浸漬時間 粉末マダガスカルバター豆 2g に pH 5.8 Mc緩衝液 200ml を加え密栓して 35° で浸漬時間を変えてシアンの発生量を検討した（図2）．

シアン発生量は時間の経過とともに増大し，5時間で最高値に達した．以後は一定でシアンの増減は見られない．したがって酵素の作用によるシアンの遊離を確実に進めるためには5時間以上の浸漬時間が必要である．

(2) 浸漬温度 粉末マダガスカルバター豆 2g に Mc 緩衝液 200ml を加え，温度を変え17時間浸漬後水蒸気蒸留しシアンを測定した．図3に 10—50° のシアン発生量の変化を示した．

最高値を示したのは35—37°である．40°以上ではシアン発生の急減が見られ，熱による酵素の不活性化が考えられる．20°では最高値の95%，15°では85%を得ることができる．数回のくり返しの結果，中温域（20—40°）では比較的温度と発生量の関係は一定しており，回収率の再現性は良好である．

(3) pH の影響 0.1M クエン酸および 0.2 Mリン酸を用いて pH 3—7 の浸漬液を調製し，粉末マダガスカ

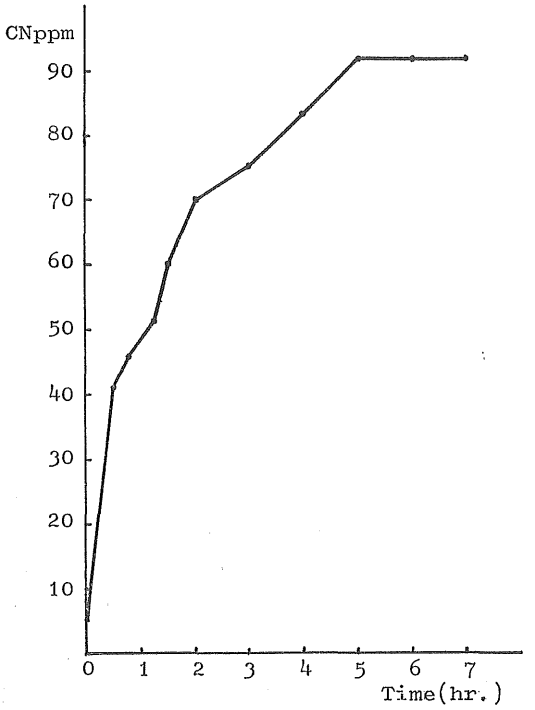


Fig. 2. Effect of Satulation Time on the Isolation of CN

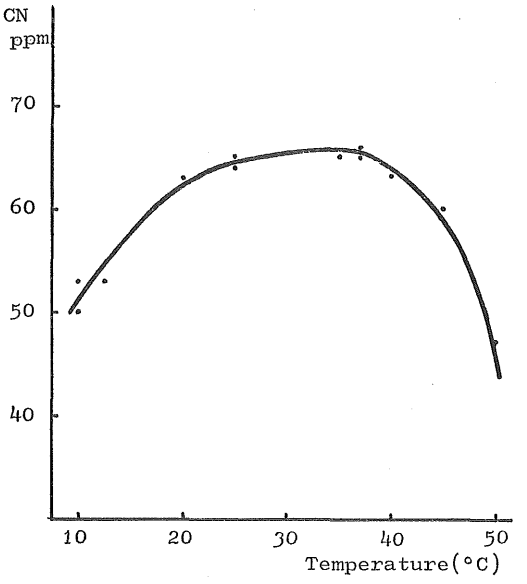


Fig. 3. Effect of Satulation Temperature on the Isolation of CN

ルバター豆 2g を室温で一夜浸漬してシアン発生に及ぼす pHの影響を検討した（図4）.

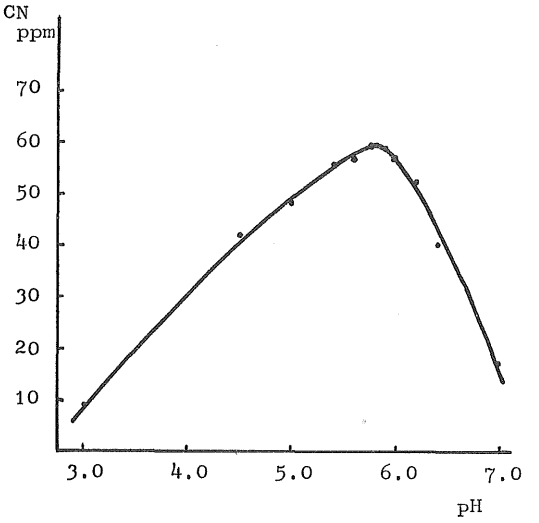


Fig. 4. Effect of pH on the Isolation of CN

最適 pH は 5.7—5.9 であり，6.0以上ではシアン発生は目立って減少する．この結果，従来から言われていた酵素の至適 pH 5.9 を再認することができたが，広いとされた pH 域[9]はきわめて狭いものであることが明らかとなった．Mc 緩衝液はクエン酸緩衝液（豆類の成分規格）に比べ正確な pH 値を容易に調製できる点ですぐれており，広い温度域で使用可能であって，蒸留後の pH 値の変動はプラス0.05—0.1程度である．pH 6.0 以上ではシアン発生量が急に減少することから，常に一定した値を得るためには pH 5.8 で浸漬蒸留するのが最適であると考える．

(4) 溶存酸素の影響 空気，N_2 gas および O_2 gas でガス置換した水で Mc 緩衝液を調製し，ベビーライマ豆 2g を室温で17時間浸漬した後水蒸気蒸留しシアンを測定した(ppm).

No.	空気	N_2 gas	O_2 gas
1	92.2	91.8	83.8
2	92.2	91.3	87.5

酸素飽和の状態では約6％の回収減となるが通常の蒸留水（空気置換）中の溶存酸素はシアンの回収に障害とはならない.

3) ピリジン-ピラゾロン法の安定性 塩化シアンとピリジンとが反応して生成される青色物質の安定性については前報[6]において述べたところであるが，比色操作の簡便化の必要上，発色完了後の水稀釈液の安定性を検討した.

シアン標準液 1m*l* (10μg) をとり常法により発色させて青色の発色液を得る．つぎにこれを水で稀釈して 7.5 μg, 5μg, 2μg, 1μg, 0.5μg 相当濃度とし，吸光度からシアン（μg）を算出する．

稀釈操作による誤差は低濃度で測定するほど大であり，吸光度E0.04で8.0%以上になるが，E0.45—0.7の範囲に稀釈調整する限りでは－2%程度の誤差で測定が可能である．水稀釈の結果，最大吸収位置は 620→612 nm へ移動するが青色物質は安定であり，70分経過後も色調，吸光度に変化は見られなかった．

4) 硝酸銀滴定法の検討 シアンの滴定法として10% KI を指示薬とした Liebig 法（成分規格定量分析法）および改良法である Liebig-Doniges 法 (10%KI+10% NH_4OH 1m*l*) を検討した．

三角フラスコにシアン標準液 50—200μg をとり 0.01 N $AgNO_3$ (f=0.941) で滴定した．（数値は数回の平均）0.01N $AgNO_3$ 1m*l*=0.54mg CN

標準液シアン (μg)	Liebig 法 $AgNO_3$ (m*l*)	Liebig 法 CN (μg)	Liebig-Doniges法 $AgNO_3$ (m*l*)	Liebig-Doniges法 CN (μg)
0 (Blank) →	0.15	—	0.15	—
50 →	0.15	0	0.25	51
100 →	0.30	71	0.35	102
200 →	0.44	143	0.55	204

いずれの方法によっても Blank で $AgNO_3$ 0.15m*l* (76μg) 消費される．Liebig 法は約30%低く定量される．Liebig-Doniges 法は 50μg の滴定が可能であるが 0.15m*l*≒4 滴としても，滴定操作には相当の熟練を要する．

成分規格にしたがってシアン豆を蒸留し，上記Liebig-Doniges 法で滴定した結果を本法（ピリジン-ピラゾロン法）と比較すると，滴定法はシアン含有量の多い豆は低く，含有量の少ない豆は高い値として得られる．

No.	名称	Liebig-Doniges 法 (ppm)	ピリジン-ピラゾロン法 (ppm)
1	ベビーライマ豆	65	55
2	ビルマバター豆	320	445
3	ビルマバター豆	400	465
4	サルタニ豆	430	580
5	ビルマバター豆	250	340
6	マダガスカルバター豆	140	86
7	ベビーライマ豆	60	39
8	ビルマバター豆	500	645
9	マダガスカルバター豆	100	67
10	サルタピア豆	300	380
11	ビルマバター豆	220	258

5) ピリジン-ピラゾロン法によるシアンを検出しない豆の確認 定性分析法 3) ピクリン酸反応陰性の豆類およびイエロービーン，トラッパービーン，ローズベルンホワイトピービーンを各 10g とり常法にしたがってピリジン-ピラゾロン法で定量したとき，いずれも吸光度 E 0.02以下（CNとして0.1ppm 以下）であった．

まとめ

豆類中のシアンの分析法として定性法は McIlvaine 緩衝液を用いたピクリン酸紙法，定量法は水蒸気蒸留後ピリジン-ピラゾロン法に付す方法を検討した．

粉砕した豆のシアン残存量は長期間の経時変化が見られなかったことから，安定な有機結合シアンと推定される．シアンを遊離させるための方法として酵素作用を重視し，前処理条件を検討した結果，pH 5.8, 浸漬温度 37°, 浸漬時間 5 時間以上がシアンの遊離に最適であることが確認された．

その他，分析を実施するにあたって回収率に影響を与えると思われる諸種の要因を検討のうえ定性，定量分析法とした．

文献

1) 小島康平：食品衛生研究, **12**, 17, 1962
2) 厚生省食品衛生課輸出入検査係：*ibid.*, **13**, 61, 1963
3) 川城 巖，川田公平：*ibid.*, **6**, 45, 1958
4) Williams, R. Tecwyn : *Detoxication Mechanisms*, 390, 1959
5) 宮道悦男，嶋野 武：動植物成分，53, 1958, 共立出版
6) 上田 工，勝木康隆，安田和男，*et al.*：東京衛研年報, **24**, 269, 1972
7) Jay. M. Arena : *Amer. Lecture Series*, Pub. No. 756 2nd Ed., 112, 1970, Illinois
8) Snell, Foster, Dee : Colorimetric method of Analysis, Vol I and II 3rd Ed., 864, 1958, D. Van Nostrand Company
9) 川城 巖，川田公平，*et al.*：衛生試験所報告, **76**, 201, 1958

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 266—272, 1978

SEM による種々の花粉の観察

前 木 吾 市*

Morphological Observation of Pollens of Various Species Origin by Scanning Electron Microscopy

GOICHI MAEKI*

Morphological observation of pollen-balls imported from Australia was made by the use of the scanning electron microscope ASID attached to the JEM-100B, in comparison with pollens of known species origin. In the preparation of specimens, 30 minutes Au-Ion-Spattering with IB-1, at the condition of 0.1 Torr, AC 700V, with electrodes gap of 25mm, was found to be a satisfactory method for the observation of a fine structure of pollens. The two pollen balls subjected for the identification of their species origin were found to be the complex of several species of pollens those mainly composed of oranges and of eucalyptus. In addition, the position of aperture in the structure of pollen grains of *Taraxacum officinal Weber* was also clarified.

緒　　言

花は植物の生殖器官であるが，直接生殖に関係するのはめしべとおしべである．花粉はおしべの葯（やく）の中に生産される雄性の生殖細胞で，虫などの媒介によりめしべの柱頭に届けられ，発芽孔から発芽管を出し，これが伸びて子房に達し受精が起きて種子を生ずる．

花粉は大きさが約 10～100μm に分布し，形態も種々であり，これまでに主に光学顕微鏡レベルで分類学的にくわしく調べられてきている[1-8]．近時出現した走査型電子顕微鏡（SEM と略す）は，解像力と像の焦点深度の2点で優れるので，花粉の形態研究も次第に SEM による方法に移行しつつある．SEM による観察は，従来カーボン，Au 2重蒸着により試料表面を導電処理して行なわれてきたが，花粉の外膜の複雑なものではチャージアップ現象を起しトラブルが生じ易い．最近になって，グロー放電から見出されたスパッタリング現象を利用して，薄膜作成を行なう方法[9,10]（スパッタリング法と略す）が実用化され，SEM 試料の導電処理に応用されるようになった．今回 pure な花粉と花粉団子（ミツバチが蜜を使って集める花粉の塊り）および昆虫に付着した花粉観察の3者について，スパッタリング法を用いて検討を加え，興味ある結果を得たので報告する．

実験材料と方法

植物名は便宜上以下，標準和名で記載することとする．

花粉は種類が非常に多いので，選択の基準として，①外膜の構造が複雑でチャージアップを生じ易いもの，②誰からも関心を持たれている花のもの，③構造が特殊でしかも規則性に富むものとし，以下に掲げるものに絞った．

pure な花粉　オニカンアオイ[11]（奄美大島産），オオバカンアオイ（屋久島産），ノコンギク，ハクモクレン

以上4種は前川文夫博士が発芽孔をテーマに選択し提供されたもの，カワラノギク，カタクリ，イヌコリヤナギ，シラカバ，カントウタンポポ，セイヨウタンポポの6種は著者の選択によるもので，日野市内および多摩川河川敷で盛期に採集した．

花粉団子[12]　オレンジ，ユーカリの2種で共にオーストラリヤ産で，一度団子を水に溶解して得た精製花粉と，原料の団子（径 2mm 前後）そのものの両者を試料とする．

昆虫に付着した花粉　昆虫はセイヨウタンポポの頭花中に潜んでいたヒゲナガアブラムシの一種で体長約 1 mm弱．触角などに約30個の花粉の散在を認め，ガラス

* 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

びん中で2日間放置後試料台に移し，マニキュア液で台上に止める．

試料作製法として pure な花粉ではふりかけ法により銅製専用試料台（観察可能範囲は 11×2mm）に分散せしめた．変法として予め台上にマニキュア液を塗布し，乾かぬ中にふりかけ法で固着させる方法も用いた．花粉団子の場合，台上への固着およびチャージアップ対策を兼ねて，マニキュア液，両面テープ，瞬間接着剤，電顕用ネオプレン液等を用い比較を行なった．試料乾燥はすべて air dry とした．

導電処理は全試料共 Au スパッタリング法とし，対照として従来法のカーボン，Au 2重蒸着法を用いた．スパッタリング装置はエイコー製 IB-1 型（放電々圧max. 700V）だけで行ない，1回のスパッタリング条件として真空度 0.1Torr（推定），放電々圧 700V，極板間隔 25mm で，放電時間10分間を基準とした．

SEM は日本電子 KK 製 JEM-100B 付属走査像観察装置 EM-ASID（以下 ASID）で，サイドエントリー方式，試料傾斜は単傾斜±60°のものを，加速電圧20kV，電子電流 20～40μA，撮影倍率はほとんど（×3000）以下で用いた．

観察結果

pure な花粉，花粉団子および昆虫に付着した花粉の観察を通じ，スパッタリング法ではチャージアップが少く，解像のよい SEM 像を得ることができた．カーボン（ただし回数は1回），Au 2重蒸着法は特にチャージアップ発生が著しく結果は不安定であった．チャージアップ現象は，キク科花粉を例にとると，画面に横すじが入るトラブルが最も多く，その他像のふらつき，フォーカスの甘さおよびコントラストの低下等の症状を生ずる．カーボン蒸着は発熱が高過ぎるため電極部分が高温となり，反覆処理に長時間を要することが致命的である．

① pure な花粉の結果（写真1－4）

オニカンアオイ，オオバカンアオイ，ノコンギク，ハクモクレンの4種（写真省略）は，実験初期の試料で，コロジオン支持膜を張ったメッシュ上に各花粉をふりかけ法で載せ，スパッタリングを1回かけて観察した．結果はスパッタリング分量の不足が明らかだったため，チャージアップが頻発した．オニカンアオイではたまたまカーボン蒸着を追加したところ良い結果を得た．ハクモクレンは表面が滑面であり，走査ビームを強く当てるとチャージアップのため花粉が転位したり，飛散するという現象が観察された．発芽孔数はカンアオイで5個，ノコンギク3個，ハクモクレン1個が認められた．コロジオン支持膜メッシュを用いると，解像性のよい画像が得られることが判明した．カンアオイの種類は約40種あるといわれ，前川文夫博士の古赤道理論を立証する花であり，1万年で 1km 位しか生活範囲が拡がらぬという特異性をもっている．

写真1はカワラノギク花粉[13,14]で，スパッタリングは1回である．以下写真掲載試料はすべて Cu 製専用試料台を用いている．この試料ではマニキュア液を用い，試料台上への花粉の固着を図ってある．写真ではキク科特有のいぼ状突起が多数みられ，また楕円体の長軸に沿って両側から抱え込まれた恰好の溝がみられる．これは発芽孔で一個の花粉中に3カ所ある．このような試料ではスパッタリング1回では試料上の薄膜形成が薄すぎて，前述したチャージアップ症状がしばしば観察された．またマニキュア液の成分が，いぼ状突起の周囲にひきつれ像

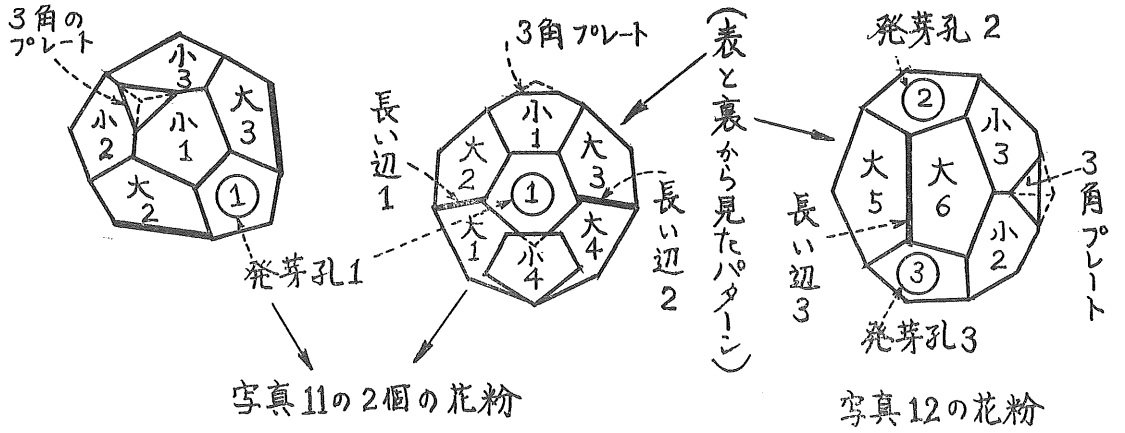


図 1. タンポポ類花粉の構造

を生ずることが認められた．**写真2**は，春，直径5cmに及ぶ淡紫色の花をつけるカタクリの花粉，**写真3**はヤナギ科の落葉低木で春，銀白色に咲くイヌコリヤナギの花粉で，共にスパッタリングを30分間連続して行なったものである．カタクリは豊富な花粉をつけた葯をピンセットでつまみ，軽く台上にはたきつける方法を採り，後者はふりかけ法によった．カタクリは分散がよく，後者は悪く凝集塊を呈した．カタクリ花粉はサイズが特大であり，発芽孔は一つで，表面には美しい網目模様が一様に認められた．一方イヌコリヤナギ花粉はサイズが小であり，発芽孔は3カ所で，表面は大小の網目模様を形成している．**写真4**は春の野のシンボル，カントウタンポポの花粉で，この方はセイヨウタンポポと異り有性生殖するので，花粉量が実に多かった．スパッタリングは30分行なっている．直径は30μで，他の花粉と異り，幾何学的な結晶形の輪廓をしている．写真2，3，4はスパッタリング量が写真1の3倍量となるが，チャージアップに対する安定性が観察，撮影を通じて飛躍的に向上することが判った．

② 花粉団子の結果（写真5—8）

ユーカリ，オレンジ花粉団子そのものの観察では，少量のマニキュア液で団子を軽く試料台に接着し，スパッタリングを30分間行なった試料だけがチャージアップによるトラブルが少く，観察可能となることが判った．像の解像はpureな花粉の場合に比べ，低下が認められた．**写真5**はユーカリ花粉の場合で，スパッタリングは1回であるが，花粉表面が滑面に近いので，3カ所の発芽孔と，混在するセイヨウタンポポ花粉がかなり明瞭に見えている．チャージアップは起きており，像の諧調が失われ，ネガフィルム上にはその証拠となる走査線がうつっている．オレンジ団子の場合（写真省略）は，花粉表面の網目模様を認めることができた．ただしマニキュア液中の溶剤である醋酸アミルが団子に滲透し，網目模様の外膜が溶解，膨潤の影響を受けた跡が一部に認められた．両面テープその他を団子の接着剤として用いた試料では，チャージアップ症状が明瞭に現われ観察が困難となることが判った．

ユーカリ，オレンジ花粉団子からの精製試料では，以後pureな花粉と同様の取扱いで観察したが，スパッタリング2回でやや不足，3回でチャージアップが防止し得るというpureな花粉の場合と同様の成績が得られた．**写真6，7，8**はオレンジ花粉団子から精製した試料の作例である．**写真6**はスパッタリング1回の試料からのもので，総体的にどの花粉もチャージアップ気味であるが，中央2個の花粉は上端部に突出て位置したため薄膜形成で特配をうけ，明るいシャープな像観察が可能となったケースである．下側に他の花粉の混在がみられる．**写真7**はスパッタリング2回（通算20分間）のものであるが，ややスパッタリング量が不足で，チャージアップ症状が明瞭に認められる．**写真8**は前と同一試料についてパスッタリングを追加し3回（通算30分間）とし，画面全体にシャープな像を再現させた比較写真である．画面内にはキク科花粉，小さい4集粒花粉および右上の不明花粉と3種類の混在がみられるが，この外にもユーカリの場合と同様，セイヨウタンポポの混在が認められた．スパッタリング法では，写真7，8のように，薄膜形成の厚みを増加させながら，同一視野を繰返しCRT上に再現させ，像質を高めて記録し得る利点がある．

③ 昆虫に付着した花粉の結果（写真9—12）

セイヨウタンポポは単為生殖が特徴で勢力は強いが，反面頭花内部の花粉数は極めて少く，ふりかけ法による試料作製で僅か2個の花粉を見出したに過ぎない．そこで独自の判断で頭花内部に潜入中の昆虫に着目しルーペで観察中，たまたまヒゲナガアブラムシに付着している花粉を見出した．**写真9**は昆虫の触角などに付着した花粉の所在を示したもので，スパッタリングは2回（20分，10分各1回，通算30分）行なっている．しかしチャージアップは解消せず，像質も悪かったが，試料の損傷を考慮してそのまま以下の撮影を続行した．**写真10**は触角部分にトーテムを形成した花粉6個のパターンである．**写真11，12**は同じく触角上の花粉であり，試料単傾斜装置（single tilt）を応用し，構造解析の結果を端的に示した組写真である．**写真11**では右側の花粉が重要な意味をもち，中央の発芽孔を中心にして6個の面が対称的パターンを形成し合わせて7個の面が数えられる．**写真12**は上下方向に対称的パターンを示す花粉で，上端と下端に発芽孔がみえている．この面は丁度写真11右側の花粉を裏側から時計方向へ90°廻して眺めた場合に相当する．大小6面が数えられ，発芽孔同志を結ぶ稜線が長いという特徴をもっている．要約するとタンポポ類の外膜は3個の発芽孔，扁平な大5角形が6面，小5角形4面の計13面から構成され，その輪廓は正12面体の結晶体に準じた**図1**のような形をとることが推測される．

考　察

pureな花粉，花粉団子および昆虫に付着した花粉というように，広範囲な対象を能率よく観察するため次の諸点に留意した．

1) pureな花粉では，花が新鮮なうちに迅速に試料作製すること．放置すると速かに花にかびが生ずる．

2) スパッタリング法の特色を最大限に活用するこ

と．本実験では反覆処理が有効な点をフルに活用した．

3) SEM 観察の大敵チャージアップを重視し，常に症状の把握，解明および防止に努めた．シャープな像が出ない時は，スパッタリング不足によるチャージアップを疑って点検する必要がある．

花粉観察の収獲としては次の事柄をあげ得る．

1) 花粉試料は air dry でもかなり忠実な観察ができる．

2) 試料台としてコロジオン支持膜を張ったメッシュを採用すると，解像性のよい画像を期待できる．

3) 花粉団子そのものの直接観察を可能とした．マニキュア液の極く少量を接着剤に使用し，スパッタリングを十分かけることにより手掛りを得た．

4) 花に集まる昆虫を利用して特殊な花粉観察法を考案した．これは野外観察の思いがけない収獲である．花粉の分散が極めて良好なので，単傾斜装置を応用しタンポポ花粉の構造解析の途が開けた．

ま と め

JEM-100 B 付属 ASID を用い，IB-1 型イオン，スパッタリング装置で試料表面の導電処理を行ない，pure な花粉10種類およびオーストラリヤ産花粉団子（オレンジ，ユーカリ）2種類について SEM 観察を行なった．また昆虫を利用する花粉観察法を考案し，試料単傾斜装置を用いてタンポポ花粉の構造解析を試みた．得られた結果を次に示す．

1) 花粉試料にはスパッタリング法が有効であり，必要十分なスパッタリングを施すことによりシャープな画像を得た．チャージアップ防止の最適条件は，IB-1 装置で真空度 0.1Torr（推定），放電々圧 AC700V，極板間隔 25mm を固定しておき，放電時間を変えて実験した結果，凹凸ある難しい花粉で30分であった．

2) 試料作製は ふりかけ法と air dry を採用し，外膜構造に特徴をもつ pure な花粉4点を選び写真に掲載した．花粉団子そのものの観察では，マニキュア液の少量を接着剤に用い，スパッタリングを30分行なうことにより実用化の見通しを得た．花粉団子の精製試料から種々の花粉の混在を見出し，発芽孔の観察によりオレンジ花粉が外国産であることの裏付けも行なった．

3) 昆虫（ヒゲナガアブラムシ，体長約 1mm）の触角などに付着したセイヨウタンポポ花粉約30個について，構造解析したところ，その外膜は発芽孔3個，扁平な大5角形6個，小さい正5角形4個合計13個の面から構成され，規則正しい結晶形をしていることが判った．

謝辞 本研究に当り有益な助言を賜った東大名誉教授前川文夫博士ならびに東邦大学薬学部佐橋紀男氏に感謝の意を表します．

（本研究の概要は日本電子顕微鏡学会第34回学術講演会1978年6月で発表した．）

文 献

1) 幾世マサ：日本植物の花粉，1956，広川書店
2) Sahashi, N. and M. Ikuse : *J. J. Bot.* 48 (12), 373—379
3) 佐橋紀男，幾世マサ：植物研究雑誌，49 (2)，54，1974
4) 湯浅 明：植物の精子，1969，東大出版会
5) 岩波洋造：花と花粉の世界，1977，玉川大学出版部
6) 市川三次，冨田 仁：花粉アレルギーと抗原植物，1975，黎明書房
7) 田中 肇：花と昆虫，1974，保育社
8) 中村 純：花粉分析，1977，5版，古今書院
9) 赤堀 宏，福岡孝寿：日本電顕学会第30回学術講演会，予稿集171
10) 金原 粲：薄膜の基本技術，1976，東大出版会
11) 前川文夫：日本の植物図系，1977，玉川大学出版部
12) K. v. フリッシュ著，桑原満寿太郎訳：ミツバチの生活から，1977，第2版，岩波書店
13) 播本正常：日野の植物，1973，日野の自然を守る会
14) 日野の植物ハンドブック，1977，日野市

写真説明
Explanation of Figures

1—4：pure な花粉，pure pollen

5—8：花粉団子，pollen balls

9—12：昆虫に付着した花粉，pollen with an insect，スケールの単位は 10μm.

写真No.

1：カワラノギク花粉（キク科）. *Aster Kantoensis Kitamura*. 発芽孔数3，花季は秋，舌状花は紫色.（×2,250）

2：カタクリ花粉（ユリ科）. *Erythronium japonicum Decne*. 発芽孔数1，花季は3月下旬～4月上旬.（×500）

3：イヌコリヤナギ花粉（ヤナギ科）. *Salix integra Thunb*. 発芽孔数3，花季は春.（×2,250）

4：カントウタンポポ花粉（キク科）. *Taraxacum platycarpum Daplst*. 在来種タンポポで発芽孔数3，有性生殖.（×1,150）

5：ユーカリ花粉団子の表層（テンニンカ科）. pollen balls of *Eucalyptus globulus Lab*. オーストラリヤ産，発芽孔数3，中央は混在したセイヨウタンポポ花粉.（×750）

6：オレンジ花粉団子より精製した花粉. *Citrus Aurantium, L.* オーストラリヤ産，発芽孔数3，ion-spattering 1回.（×750）

7：同上. *Citrus Aurantium, L.* ion-spattering 2回でも不足で，charge up することを示した作例. 他の花粉が3種類混在している.（×630）

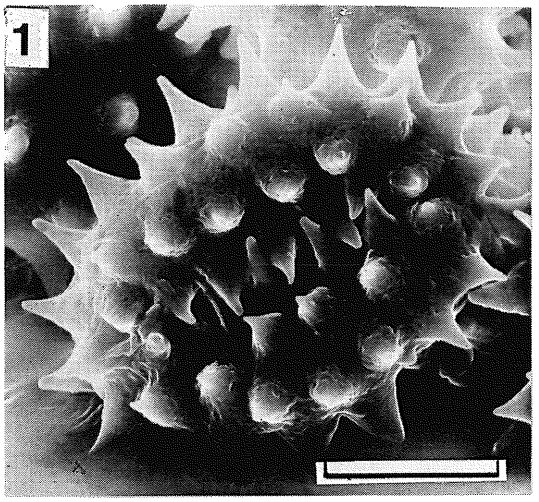
8：同上. *Citrus Aurantium, L.* ion-spattering 3回，ほぼ charge up 解消，No. 7 と同一試料にスパッタリングを追加して作製.（×640）

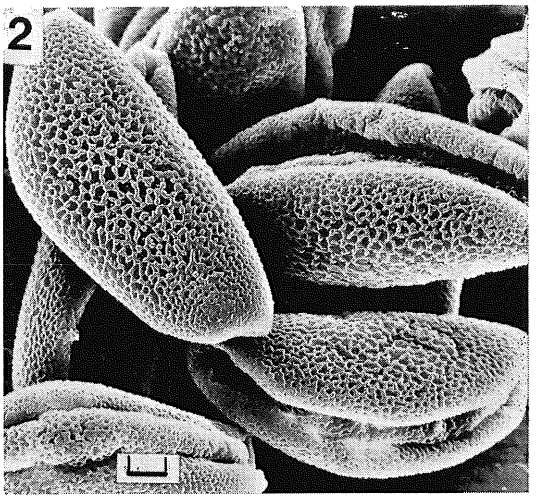
9：ヒゲナガアブラムシ（体長約 1mm）の触角に付着したセイヨウタンポポ花粉（キク科）. *Taraxacum officinale Weber*. ion-spattering 2回，放電時間1回目20分，2回目10分合計30分で依然 charge up し，解像不良. 外来種タンポポで発芽孔数3，単為生殖，花は総苞がそりかえり識別容易.（×120）

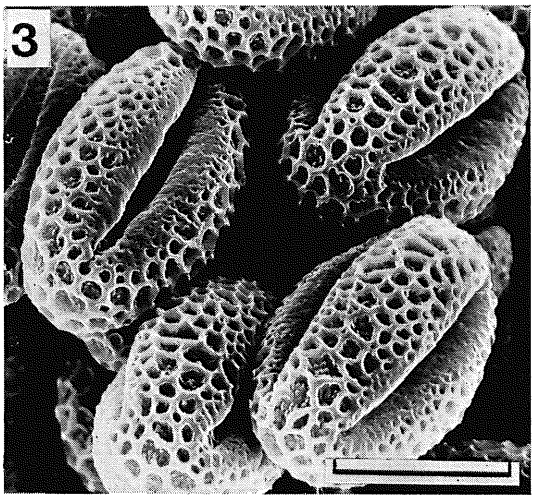
10：試料は同上，やや拡大した花粉. *Taraxacum officinale Weber*.（×750）

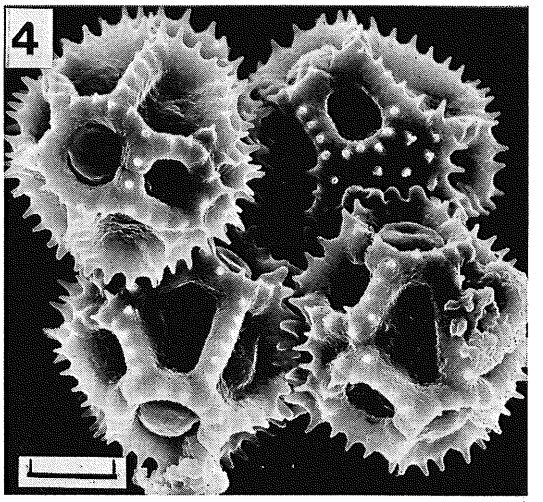
11：同上. *Taraxacum officinale Weber*. これは写真12との組写真である. 下部の触角は charge up のため不明瞭. 写真中の右側の花粉は発芽孔を中心に7面が数えられ，写真12の6面と合せ，タンポポ花粉は13面で構成される. 図1参照.（×1,150）

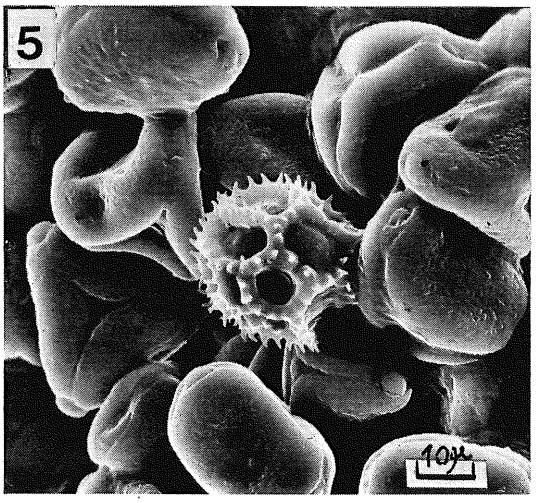
12：同上. *Taraxacum officinale Weber*. これは写真11の右側花粉のものを，裏からみて時計方向へ 90° 回転したパターンに相当する. 上，下端の各面は発芽孔である.（×1,500）

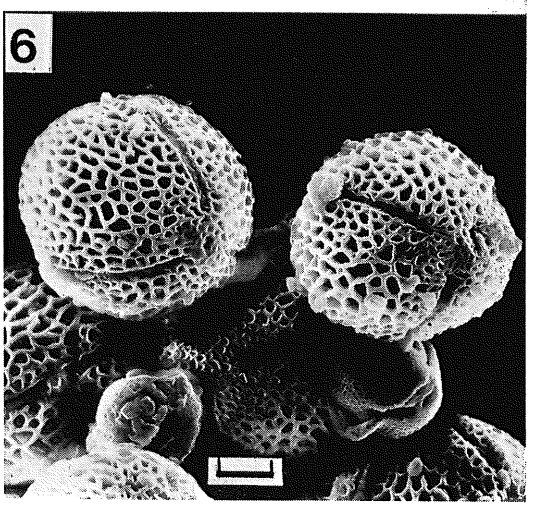

1

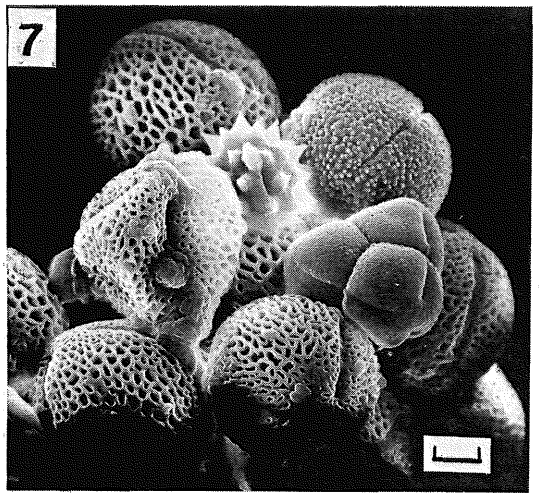

2

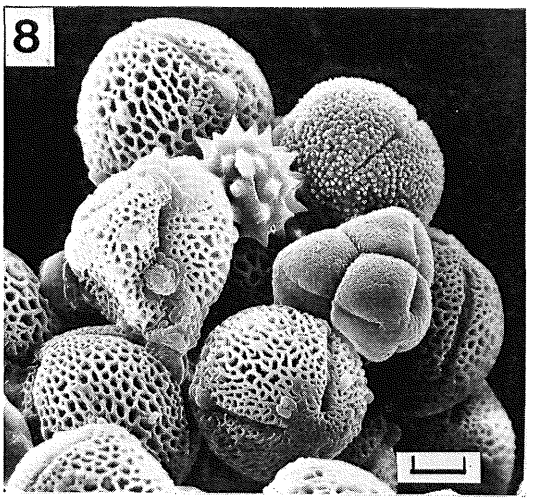

3

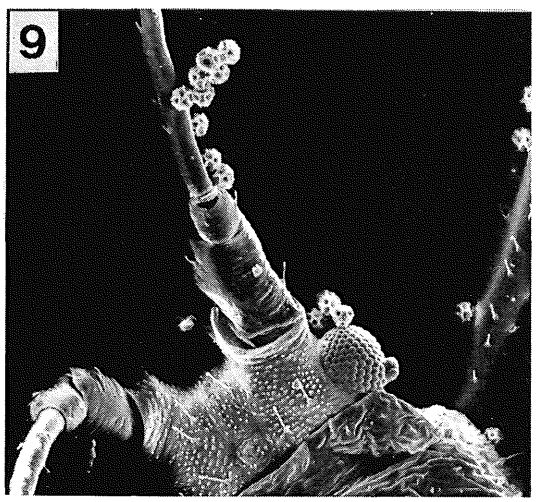

4

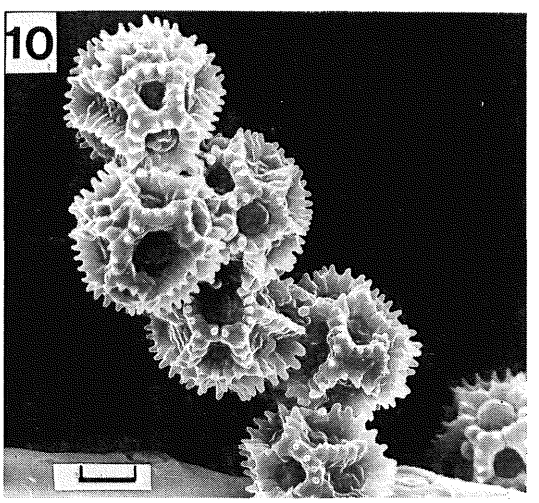

5
10μ

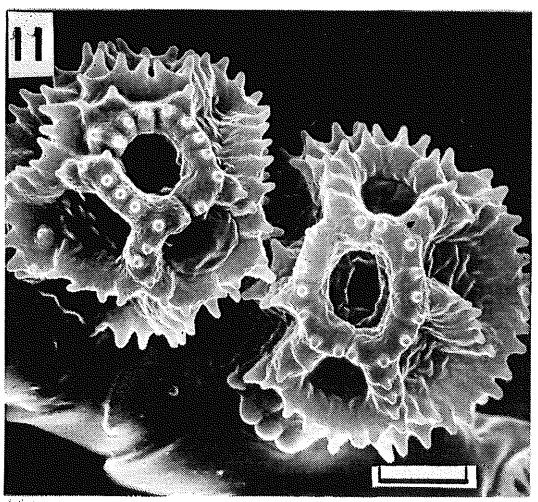

6

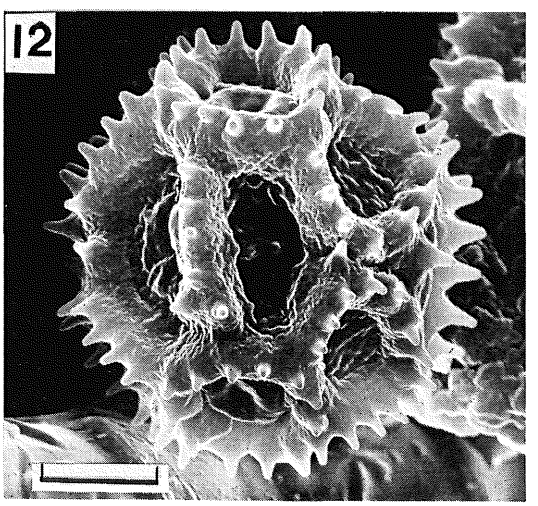

7


8


9


10


11


12

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 273—278, 1978

食品中の無機質に関する研究（第2報）
食品中のカリウム，ナトリウムの分析ならびに食事からの摂取量の評価

友松俊夫*，西田甲子*，道口正雄*

Studies on Minerals in Foods (II) Analysis of Potassium and Sodium Contents in Foods and Estimation of Dietary Intakes

TOSHIO TOMOMATSU*, KOKO NISHIDA* and MASAO DOGUCHI*

緒　言

カリウムおよびナトリウムは，生物界に広く分布している無機質であり，生命を維持する上に必須のものである．人体中のカリウムは，主要な細胞内カチオンであり，細胞内において，浸透圧，水分保留，酸塩基平衡に関与する．またナトリウムは，主要な細胞外カチオンであり，神経，筋または心臓の興奮性を保持するのに必要であると同時に，小腸や腎臓において，甚だしい濃度勾配に逆って，糖やアミノ酸を能動的に輸送するために絶対に必要なイオンである．

これらのイオンが体内で増加または減少し，一定のレベルを越えた場合には種々の機能障害が惹起される．カリウムの場合には増加によって，悪心，嘔吐，知覚異状，筋脱力感などが生じ，最後には心室期外収縮，心室粗細動が起き心拍停止に至る．これに反して血中カリウム量が減少すると，食欲不振，腱反射の低下，消失などが起り，また心臓については，高カリウム血症の場合とほぼ同様な症状を呈すといわれている[1]．一方ナトリウムの場合には，いわゆる低塩症候群として，食欲不振，悪心，唾気，はい弱感，嗜眠性，腹部痙攣などが起る[2]とされている．

一般に人体に対する無機質の供給は食物を介して経口的に行なわれており，健康人の場合には過剰に摂取しても，腎臓から効率良く排泄されるので健康障害を起すほど多量に貯留することはない．しかし腎機能不全や副腎機能不全の者が体内の無機塩平衡を崩した場合には摂取量の調整が必要とされる．また最近では，喘息や皮膚病などアレルギー性疾患に対して，種々の副腎皮質ホルモン含有製剤が使用されており，前記機能不全の者以外の一般の者にも生体内無機質の異状代謝が起る可能性がある．このような病的状態の場合における栄養指導を行なうためには，食事を通じての経口摂取量の正確な把握が必要である．そのためには多くの食品について，これら元素の測定，また食事全体についての評価を行なうことを要するが，それらに関する資料は比較的少ない．

前回筆者等は，食品中のカリウム，ナトリウム含有量を測定する準備として，定量法の検討を行なったが，その分析方法に従い，今回は市販食品中のカリウム，ナトリウムの定量，調理による含有量の変化および一般健康人の食事ならびに市販減塩組合せ食品について，含有量を求め，相互に比較検討した．その結果若干の知見を得たので報告する．

実験の部

分析装置，試薬，灰化方法および検液の調製は前報[3]に記述したとおりである．

試料の調製　個々の食品，健康人の食事および減塩組合せ食品は全て市販品であり，これを適当な大きさに切断し，または必要に応じて調理加工したのちホモジネートとした．そのうち約10gを正確にひょう取し，分析に供した．また調理によるカリウム(以下Kと略す)，ナトリウム（以下 Na と略す）の含有量変化を調べるための水による浸出条件は，室温で蒸留水（以下水と略す）500m*l*を使用し，30分間．茹でる条件は 100° の水 500m*l* を使用した．切断された食品の大きさおよび茹で時間は表に示す通りである．今回分析した一般健康人の食事および市販減塩組合せ食品の献立は次の通りである．

一般健康人用食事献立

1）米飯 480，大根味噌汁70，納豆67，エビ10，豚肉

* 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—1. 食品中のカリウム，ナトリウム含有量および調理条件による溶出率

食品名および産地		カリウム		ナトリウム		切断形，茹で時間	
		含有量(mg%)	溶出率(%)	含有量(mg%)	溶出率(%)	(cm)	(min.)
アスパラガス	生	251		4			
（グリーン）	水浸	187	25	7		3	
北海道	茹で	134	47	5		3	1
アスパラガス	缶詰	90		274			
枝豆	生	433		10			
千葉	茹で	389	10	4	60		6
	茹で	331	24	6	40		4
かぼちゃ	生	243		15			
千葉	水浸	231	5	12	20		
	茹で	217	11	6	60	4×3×0.7	14
	茹で	107	56	3	80	3×2×0.1	2
かぼちゃ	冷凍	300		14			
カリフラワー	生	223		7		2	
長野	茹で	157	30	7		2	5
甘藷	生	534		24			
茨城	水浸	467	13	24		3×1×0.1	
	茹で	304	43	14	42	3×1×0.1	10
キャベツ	生	170		6			
愛知	水浸	157	8	6		3×1	
	茹で	130	24	5	17	3×1	2
きゅうり	生	220		11			
福島	水浸	179	19	9	18	3×1×0.1	
	茹で	71	68	6	45	3×1×0.1	2
ごぼう	生	202		25			
千葉	水浸	164	19	22	12	4×0.5×0.1	
	茹で	19	91	6	76	4×0.5×0.1	7
こんにゃく	生	30		5			
	茹で	9	70	4	20	3×1×0.2	2
さやえんどう	生	161		3			
群馬	茹で	128	20	3			2
じゃがいも	生	323		11			
千葉	水浸	247	24			4×0.7×0.1	
	茹で	107	67	13		4×0.7×0.1	3
セロリー	生	357		34			
茨城	水浸	282	20	23	32	3×1	
	茹で	73	79	15	56	3×1	2

表 1—2. 食品中のカリウム，ナトリウム含有量および調理条件による溶出率

食品名および産地		カリウム		ナトリウム		切断形，茹で時間	
		含有量(mg%)	溶出率(%)	含有量(mg%)	溶出率(%)	(cm)	(min.)
たけのこ	生	348		11			
栃木	茹で	79	77	5	55	3×1×0.1	米糠10gを加える
	茹で	55	84	6	45	3×1×0.1	50
玉ねぎ	生	96		6			
大阪	水浸	80	17	4	33	3×1	
	茹で	43	55	4	33	3×1	2
トマト	生	111		16			
千葉	茹で	43	61	11	25	3×1×0.1	1
なす	生	168		8			
埼玉	水浸	151	10			3×1×0.1	
	茹で	51	70	9		3×1×0.1	2
にんじん	生	120		63			
埼玉	水浸	87	28	48	24	3×1×0.1	
	茹で	18	85	10	84	3×1×0.1	4
ねぎ	生	140		10			
千葉	水浸	116	17	6	40	3×1	
	茹で	42	70	3	70	3×1	3
はくさい	生	146		22			
長野	水浸	133	9	18	18	5×0.5	
	茹で	43	71	12	45	5×0.5	2
パセリ	生	482		58			
	水浸	432	10	37	34		
	茹で	344	29	31	47		1
ピーマン	生	168		11			
茨城	水浸	121	28	11		3×1	
	茹で	47	72	4	64	3×1	2
ほうれん草	生	367		18			
長野	水浸	296	19	14	22	3	
	茹で	195	47	10	44	3	2
もやし（青豆）	生	39		8			
群馬	茹で	16	59	4	50		3
レタス	生	151		26			
長野	水浸	121	20	17	35	3×1	
	茹で	82	46	11	58	3×1	1

表 2. 食品中のカリウム，ナトリウム含有量

食品名	検数	カリウム (mg%)			ナトリウム (mg%)		
		平均値	最小値	最大値	平均値	最小値	最大値
かまぼこ	7	75	62	97	904	710	1120
さつま揚げ	7	90	44	164	779	440	1000
ソーセージ（魚肉）	7	58	26	99	834	680	1010
ソーセージ（ウインナー）	7	89	61	130	881	780	990
ちくわ	7	56	36	95	973	730	1320
ハム（魚肉）	7	58	21	100	944	640	1220
ハム（プレス）	6	112	71	150	1052	770	1360
ハム（ロインロール）	7	202	135	265	1281	1030	1720
はんぺん	7	129	93	164	799	620	1230
ベーコン（スモーク）	7	182	100	248	964	640	1190
減塩醤油	2	237	190	284	3276	3214	3338
減塩味噌	3	626	560	679	3794	3439	4197

入りお好み焼305，たらのフライ115，ポテトサラダ145，みかん100，茶400．

2） 米飯480，じゃが芋味噌汁75，厚焼き卵70，トマトジュース195，サンドウィッチ225，おでん225，春菊のひたし75，ココア164，みかん100，茶400．

3） 米飯240，トースト110，茹で卵50，ミルクスープ115，くじら立田揚げ90，カリフラワーサラダ70，豆腐すまし汁50，おかめそば350，ミックスジュース75，ようかん60，りんご100，茶400．

4） 米飯240，トースト90，エッグサラダ130，ミルクコーヒー208，スパゲッティナポリタン200，とんかつ190，コーンスープ180，りんご100，茶400．

5） 米飯240，ホットドッグ230，ミルク200，えび入オムレツ150，白菜漬物40，もやしのひたし60，紅茶15，ちらしずし347，豆腐味噌汁65，みかん100，茶400．

6） 米飯480，若芽味噌汁70，焼き魚70，里芋煮86，親子丼360，フルーツポンチ190，ミートローフ160，野菜スープ90，クッキー30，茶400．

7） 米飯240，椎茸すまし汁10，焼のり2，板わさ75，天ぷら135，うどん325，煮しめ130，鳥肉唐揚げ115，野菜いため140，春雨酢の物40，バナナ130，茶400．

本献立は日本人の1人1日当りの栄養所要量[4]を基に，熱量2100カロリー，蛋白質約70gとして計画されたものであり，また以上の食品類に汁などの各種水分が加わり，1日当りの総摂餌量は表3に示す通りである．

市販減塩組合せ食品献立

1） ピーマン肉詰60.5，はすのうめびしお和え57.5，魚入りグラタン132.5，重ね煮90，カリフラワー甘酢71.5，ドライ親子161，ほうれん草ごま和え59．

2） 卵焼き59，なが芋とくさ煮63.2，支那風煮117.1，源平なます80.5，りんごコンポート55，かれいの煮つけ57，炊き合わせ110，甘藷の黄金煮76.5．

3） 野菜コロッケ89.1，ドレッシングソース13.5，ひじきの炊め煮28，小あじのマリネ96，市松煮66，豚肉と野菜のクリーム煮139.2，ほうれん草ごま和え59，甘藷きんとん88．

4） かぼちゃクリーム煮104，ほうれん草ごま和え59，揚げシューマイ110，涼拌三糸50，揚げ魚あんかけ107，ぜんまいと油揚げの煮もの72，あさり入酢の物96．

5） 信田煮53.5，いとこ煮100，鶏肉と野菜のクリーム煮122.5，里芋ころ煮88，ちらしずし211，かきたま汁32.5，松前風酢の物35.3．

6） 千種焼き76.5，市松煮66，パピヨット73，フレンチポテトピーナッツ和え96，七味和え69，酢豚風煮136，かぼちゃ含め煮70．

7） 野菜入りオムレツ90.6，カリフラワー甘酢71.3，かれいのマリネ96，大豆と野菜の和え物81.5，ババロア34，鶏肉入りグラタン88.5，大黒煮79，甘藷の黄金煮76.5，

本献立は1日分の熱量700～850カロリー，蛋白質30～33gのものであり，以上の食品原材料について，調理，冷凍されており，分析時の1日当り総摂餌量は表3に示す通りである．なお両献立中の数値の単位は茶がml，それ以外はgである．

結果および考察

食品中のK，Naの含有量および水による浸出や茹でた場合の含有量の変化について検討したところ，表1—1，1—2および表2に示す結果を得た．

今回分析した野菜類は，アスパラガスの缶詰，冷凍カ

表 3. 食事からのカリウム，ナトリウム摂取量

一般健康人用食事

日	食品重量 (g)	カリウム (g/日)	ナトリウム (g/日)	塩化ナトリウム (g/日)
1	1670	1.32	2.68	6.82
2	2400	1.92	5.58	14.19
3	2020	0.81	4.09	10.40
4	1940	1.46	2.67	6.79
5	2100	1.26	5.30	13.48
6	1970	1.40	3.34	8.50
7	1850	1.69	4.13	10.50
(平均)	1993	1.42	3.97	10.10

市販減塩組合せ食品

日	食品重量 (g)	カリウム (g/日)	ナトリウム (g/日)	塩化ナトリウム (g/日)
1	580	1.23	1.17	2.98
2	586	0.97	1.20	3.05
3	499	1.02	1.37	3.48
4	655	0.82	1.87	4.76
5	760	0.88	1.25	3.18
6	535	1.17	1.19	3.03
7	555	0.92	1.01	2.57
(平均)	596	0.99	1.29	3.29

塩化ナトリウムの値はナトリウム ×58.5/23 で計算した.

ボチャおよびコンニャク以外は全て新鮮物であり，そのK含有量は 96—534mg%，Na は3—58mg%の範囲にあった．これら新鮮野菜中の K：Na 比は概ね 10～20：1である．しかしアスパラガスの缶詰では K 90mg% に対して Na 274mg% であった．一方魚肉または畜肉加工品の場合，K含有量は95—256mg%であり，Na は990—1,720mg% の範囲にあり，K：Na 比は概ね 1：10 となる．このように食品の加工時にある程度の味付が行なわれる場合には，食塩の添加が行なわれ，食品中のK：Na比は逆転する．この場合K含有量は新鮮物も加工品もほとんど同じであり，Na の含有量だけが数十ないし百倍程度増加することになる．

食品中のKおよび Na は比較的良く水に溶けるので，調理，加工時に洗液または茹で汁を捨てることによって，K，Na の消失が起ることは容易に考えられる．野菜類についてこのことを調べたところ，水による浸出の場合K含有量の 5～25%，Na では12～40%が溶出した．茹でた場合には多くの野菜類でKは50%以上が溶出したが，枝豆，キャベツ，カリフラワーおよびさやえんどうでは10～30%と比較的低い値が得られた．一方 Na についても概ね50%またはそれ以上が茹で汁中に溶出するが，キャベツ，玉ねぎおよびトマトでは17～33%の溶出率であった．水による浸出および茹でのいずれも K, Na の溶出率は試料の切断状態，すなわち細胞の破壊程度に最も依存していると考えられる．このことは，カボチャの場合に薄く小形に切断されたものが厚く大形のものよりも茹で時間が短いにもかかわらず，Kで約 80%，Na で25%も多く溶出していることからも明らかである．以上のことから，低K，低 Na 治療食の作成には，可及的薄細片化し，水浸することが望ましい．かくすることによって，K，Na の溶出率が増加するのみならず，加熱時間の短縮がみこまれ，他の栄養素の減少を防ぐことが期待されるからである．

次に試験的に作成した一般健康人用7日分の食事ならびに市販減塩組合せ食品について調査し，これら食事から K，Na の一日摂取量を測定した．その結果を表3に示す．一般健康人用食事からの K 摂取量は平均 1.42g/日，範囲は0.81—1.92g/日であり，Naは平均3.97g/日，範囲は 2.67—5.58g/日であった．またこの Na 量から NaCl の1日摂取量を計算したところ，平均 10.1g/日，範囲は 6.79—14.19g/日の値が得られた．一方市販減塩組合せ食品では，K摂取量が平均0.99g/日，範囲は0.82—1.23g/日であり，Na は平均1.29g/日，範囲は1.01—1.87g/日であった．また食塩量は平均3.29g/日，範囲は2.57—4.76g/日であった．減塩組合せ食品の場合には，米飯などを同時に食するのでK摂取量は分析値より増加すると考えられる．今回の健康人の1日当りの米飯摂餌量と同じ 480g と考えると，米飯の水分65%，白米中のKが115mg%として，約 0.2g が増加すると推定される．Frank ら[5]はKについて，成人の場合 0.4mEq/体重 kg が必要であるとしており，体重 60kg に換算すると約 0.9 g/日となる．一方 Na の場合は，食塩の所要量が通常15 g/日とされていることからすれば 5.9g/日となる．しかし食事内容が漸次都市形へと変化することによって，食塩摂取量も減少傾向にあると考えられているし，また生体が生理的機能を維持するのに必要な最低 Na 量は 0.5—1.0g/日[6] であるともいわれている．以上の理由により，栄養所要量的観点から評価すれば，両食事からの K, Na 摂取量は健康を維持するに充分な量であると考えられる．次に健康人の食事と減塩食品の K，Na を比較したところ，K摂取量にはほとんど差異が認められなかったが，Na 摂取量については，後者は前者の約 1/3 であり，市販減塩食品は減食塩食として充分その目的に適合するものと考えられる．

結　論

病態栄養に関する栄養指導の資料を提供する目的で，食品中の K，Na の含有量および摂取量の評価を行なった．

1) 市販新鮮野菜中のKは数十から数百 mg% のオーダーにあり，Na はそれよりも1桁低いオーダーであった．また K：Na 比は 10～20：1 であり，味付けのための食塩添加が考えられる加工食品については，この比が 1：10 と逆転した．この場合いずれの食品中のK量もほぼ同じレベルにあった．

2) 調理，加工によって K，Na 含有量を減少させることができるのは，浸出液または茹で汁を捨てる場合である．特に低K食品を得るには，この操作が必要である．この場合，食品をより細片とすることによって，減少効果を高めることができる．

3) 健康人の食事からの K，Na 摂取量はそれぞれ平均1.42g/日および3.97g/日であった．一方減塩組合せ食品からはそれぞれ0.99g/日および1.29g/日であった．また食塩摂取量は健康人の食事と減塩組合せ食品ではそれぞれ平均10.10g/日および 3.29g/日であり，供試減塩食品は，その目的に適合した製品と認められる．しかしK含有量はさしたる差異はなく，低Kを要する病気の治療食としては適合したものではないと考えられる．

文　献

1) 杉野信博：からだの科学，48，23，1972
2) 吉川春寿訳，Cantarow, A. and M. Trumper：*Clinical Biochemistry*, 252, 1959, 朝倉書店
3) 友松俊夫，道口正雄：東京衛研年報，28-1，186，1977
4) 科学技術庁資源調査会編：日本食品成分表，1975，医歯薬出版
5) Frank, H. A., T. N. Hastings, and T. W. Brophy：*West. J. Surg.*, 60, 25, 1952, 厚生省公衆衛生局栄養課監修：日本人の栄養所要量と解説，1975
6) 河合　忠：からだの科学，46，109，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 279—283, 1978

市販かまぼこの品質検査

西田甲子*, 深野駿一*, 牛尾房雄*, 道口正雄*

Quality of Marketing Kamaboko, a Fish Jelly Product

KOKO NISHIDA*, SHUN-ICHI FUKANO*, FUSAO USHIO* and MASAO DOGUCHI*

緒　　言

魚肉練製品はわが国独得の食品で，中でもかまぼこはその起源が古く，長い歴史をもつといわれる．原料がすり身肉なので成型が自在であり，副材料の種類や製造法如何で，風味の調節が自由にできる，また調理の際手間がはぶけるなどの条件が今日ある理由と思われる．しかし加工品である以上，ここ10数年間に成分内容，特に栄養的価値に変化があるものと思われる．そこで今回，市販の蒸しかまぼこ50検体につき成分分析を行ない，三訂日本食品標準成分表値[1]との差異を比較し，さらに主として日本農林規格試験[2]（以下 JAS とする）に基づいて品質評価も行なった．品質評価には，この他に官能検査もあるが，これは多量の試料と熟練した判定人を要するので，本調査においては除外した．また価格との関連についても考察を加えた．

試料および試験方法

1. 試料

かまぼこ50試料は，昭和52年9月東京都内にて購入したものである．これらを型体別に分類すると，リテーナ成型16，ケーシング詰7（以上のうち JAS マークのついたものは2試料であった），従来の包装23，すまき3，昆布まき1であった．

2. 品質試験

1) 物性試験（弾力性測定） JAS による品質規格の弾力性テスト（ジェリー強度とくぼみの深さおよび折り曲げ試験）を行なった．ジェリー強度，くぼみの深さ試験では直径 2.5cm，高さ 2.5cm の円筒型切片を使用することになっているが，すべての試料をこの型に統一調製することが困難であったため，2.0cm×2.0cm×2.5cm（高さ）の角片について JAS 試験法（レオメーター，NRM-1003 型，不動工業社製）を適用測定した．折り曲げ試験は，JAS 試験に指定されている方法どおりに実施した．

2) 成分分析（栄養価値判定） 水分，灰分，脂質は常法[3]に従い，たん白質はケルダール法により試料約4gを分解し，分解物の一部をミクロケルダール蒸留装置にてアンモニアを水蒸気蒸留し，これを4%ホウ酸水溶液に吸収させ，N/20 硫酸標準液で定量した．エネルギーは以上の数値および糖質量から算出した．でん粉含量は JAS 試験法に従い，ソモギー変法によった．

3) 水分活性および水素イオン濃度

a) 水分活性（以下 Aw とする）は，合成保存料，合成殺菌料の使用が制限されるに伴い，細菌類の繁殖をおさえる目的で注目され，食品衛生法施行規則第5条第1項によれば，一部のかまぼこ製品についてのみ表示義務が課されているにすぎない．しかし本調査においては，Aw を品質判定上の一指標として取り上げ，全試料について測定した．食品衛生法施行規則別記のコンウエイユニットによる測定法は，Aw 0.94 前後の試料に適し，今回は Aw の高いものが多く，測定が困難であったため水分活性測定器（G. Lufft 社製，Model 5803，発売元日本商事株式会社）使用により測定を行なった．

b) 水素イオン濃度（以下 pH とする） かまぼこ製品であって，食品衛生法規則によって pH が規定されているものは，特殊包装されしかも保存基準の適用を除外されているものに限られる．このような製品に対しては，pH が 6.0 以下であることと定められている．pH 測定も Aw についてと同様の目的ですべての試料につ

* 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. かまぼこの品質測定値

No.	エネルギー	水分	たん白質	脂質	でん粉	灰分	価格	Aw	pH	くぼみの深さ	ジェリー強度
	Kcal	g	g	g	g	g	¥/100 g			mm	g
1	86	76.2	9.2	0.4	4.1	2.7	106	0.984	6.60	14.7	866
2	98	72.8	11.7	0.1	2.6	2.9	171	0.978	6.75	11.9	578
3	86	76.2	10.6	0.2	1.7	2.6	84	0.976	6.57	15.2	840
4	97	73.3	13.3	0.3	1.5	2.8	145	0.970	6.75	14.8	1241
5	87	75.6	10.9	0.2	2.6	2.9	63	0.978	6.98	14.8	813
6	89	75.4	12.9	0.2	2.1	2.6	75	0.982	6.73	14.8	984
7	98	72.9	13.6	0.2	2.1	2.8	75	0.986	6.77	16.3	1037
8	92	73.7	8.8	0.1	5.1	3.5	73	0.978	7.15	15.4	999
9	89	75.4	10.7	0.2	1.9	2.6	86	0.981	6.60	15.8	814
10	95	73.6	10.5	0.1	3.6	2.9	88	0.980	6.73	14.0	658
11	82	77.1	9.6	0.1	3.7	2.6	128	0.988	6.87	16.7	1011
12	90	75.2	10.5	0.2	2.2	2.5	94	0.977	6.45	14.7	769
13	81	77.4	7.7	0.2	6.6	2.5	58	0.984	6.76	10.7	625
14	97	72.9	13.0	0.2	2.0	3.0	156	0.963	6.83	16.6	1227
15	83	76.3	14.9	0.1	1.6	3.1	224	0.963	6.76	15.0	1125
16	78	77.5	12.8	0.3	1.6	3.3	224	0.972	6.50	15.0	966
17	92	74.7	11.9	0.2	1.3	2.5	150	0.971	6.88	14.3	730
18	99	72.5	13.1	0.2	2.1	3.1	135	0.977	6.90	15.2	888
19	74	78.4	15.0	0.2	0.4	3.3	265	0.975	6.50	14.8	1054
20	87	75.7	12.2	0.2	2.3	2.7	68	0.970	6.60	16.2	1051
21	99	72.8	11.4	0.6	4.3	3.3	84	0.981	6.40	14.4	967
22	84	76.7	10.5	0.2	2.6	2.6	76	0.978	6.78	13.5	726
23	96	73.2	8.9	0.3	8.7	3.3	63	0.972	6.68	9.7	642
24	91	74.8	13.3	0.2	1.1	2.8	149	0.975	6.62	15.3	1080
25	107	70.5	12.3	0.1	5.2	2.8	149	0.970	6.85	13.6	972
26	83	76.8	9.7	0.1	3.4	2.6	128	0.986	6.90	17.1	1228
27	85	76.2	13.7	0.1	2.6	2.7	71	0.971	6.65	12.5	1161
28	81	77.5	8.8	0.3	3.9	2.7	102	0.984	6.70	15.0	918
29	89	75.4	13.4	0.1	2.0	2.6	77	0.974	6.73	16.8	1287
30	84	76.8	8.8	0.4	5.8	2.7	64	0.980	6.58	13.4	1031
31	106	71.7	10.8	0.4	5.8	3.0	96	0.965	6.30	12.2	719
32	76	78.2	13.5	0.2	0.6	3.0	211	0.975	6.48	15.4	1118
33	95	73.2	10.6	0.1	3.5	3.1	86	0.970	6.77	16.0	838
34	95	73.3	10.8	0.1	2.7	3.2	86	0.940	6.70	15.3	838
35	83	77.0	8.9	0.1	6.2	2.5	79	0.977	6.70	14.0	807
36	99	72.2	8.2	0.2	9.0	3.2	78	0.966	6.85	10.3	859
37	89	75.1	13.3	0.1	0.7	2.8	212	0.969	6.80	15.1	818
38	79	77.9	12.0	0.1	3.7	2.4	100	0.975	6.78	14.4	597
39	102	72.6	8.3	0.3	7.4	2.4	83	0.971	5.17	12.4	959
40	63	81.4	11.3	0.3	1.5	3.2	176	0.980	6.50	14.3	604
41	91	74.5	14.3	0.3	trace	3.2	120	0.964	6.84	15.8	740
42	99	71.8	14.5	0.2	1.5	3.7	178	0.969	6.85	14.6	732
43	73	78.8	14.0	0.3	0.3	3.4	294	0.969	6.43	15.5	1002
44	92	74.0	11.7	0.3	3.5	3.3	91	0.970	6.30	12.1	821

No.	エネルギー	水分	たん白質	脂質	でん粉	灰分	価格	Aw	pH	くぼみの深さ	ジェリー強度
	Kcal	g	g	g	g	g	¥/100g			mm	g
45	84	76.8	9.9	0.3	2.5	2.6	73	0.975	6.82	14.3	631
46	88	75.0	11.3	0.4	3.4	3.4	194	0.964	6.20	13.3	867
47	96	74.3	13.1	1.0	4.0	3.0	131	0.976	6.28	8.9	578
48	85	76.3	11.5	0.4	4.4	3.0	145	0.966	6.37	12.8	747
49	94	73.6	12.8	0.2	0.7	3.1	230	0.969	6.84	17.3	709
50	91	75.1	12.5	0.6	0.5	2.9	298	0.963	7.00	18.0	912
平均値	89.1	75.1	11.5	0.24	3.1	2.9	128	0.974	6.65	14.4	884
標準偏差	8.6	2.2	1.9	0.16	2.1	0.3	63	0.008	0.29	1.9	187

(注) エネルギー～灰分は試料100gに対する値である.

表 2. かまぼこの各測定値間の相関係数表

	エネルギー	水分	たん白質	脂質	でん粉	灰分	価格	Aw	pH	くぼみの深さ	ジェリー強度
エネルギー	1.000	−0.988	−0.029	0.095	0.315	0.089	−0.267	−0.270	−0.029	−0.197	−0.592
水分		1.000	−0.016	−0.028	−0.287	−0.214	0.217	0.322	−0.013	0.172	0.026
たん白質			1.000	0.018	−0.765	0.321	0.586	−0.294	1.108	0.329	0.293
脂質				1.000	0.092	0.193	0.133	−0.012	−0.376	−0.341	−0.215
でん粉					1.000	−0.101	−0.571	−0.115	−0.239	−0.660	−0.208
灰分						1.000	0.404	−0.399	0.050	−0.069	−0.040
価格							1.000	−0.280	0.010	0.313	0.129
Aw								1.000	0.084	0.006	−0.007
pH									1.000	0.369	0.027
くぼみの深さ										1.000	0.480
ジェリー強度											1.000

有意水準値：0.3613 (危険率1%)

いて試験した. 方法は, 堀場ニードル形複合電極を試料に直接つきさして測定した.

結果および考察

1. 物性試験

表1に示されるように, くぼみの深さは平均14.4mm, ±1.9mm (標準偏差), 範囲 18.0mm～8.9mm であり, またジェリー強度は平均 884g, ±187g, 範囲 1287g～578g であった. JAS ではくぼみの深さ 8.0mm 以上, ジェリー強度 400g 以上となっているので, すべてが規格以上であった. ただし, 試料の形状は試験方法で述べたように JAS の規定通りではないので, 直接基準値との比較はできないが数値はほとんど変わらないものと思われる. また折り曲げ試験についても, すべての試料に割れ目を生ぜず規格に適合していた. 試料の No 47 はくぼみの深さ, ジェリー強度ともに最低の数値を示したもので, これはいわしを原料とした製品であった.

表2に示されるように, くぼみの深さはでん粉含量と高い相関を示し (相関係数−0.660), 弾性がなく, アシ (弾力のある歯ごたえ) の弱い試料ほどでん粉含量が多かった. しかしジェリー強度とでん粉含量の相関はないと考えられる (−0.208). たん白質との相関係数はくぼみの深さ0.329, ジェリー強度0.293で相関は認め難い.

2. 栄養成分

1) エネルギーの平均値は 89.1±8.6Kcal, 範囲 107 Kcal～63Kcal である.

2) 水分の平均値は, 75.1±2.2g, 範囲81.4g～70.5g であった.

3) たん白質の平均値は 11.5±1.9g, 範囲 15.0g～7.7gであった. たん白質とでん粉および価格とは高い相関を示し, それぞれ相関係数は −0.765, 0.586 であった. すなわちたん白質含量の多いほどでん粉含量が少なく, 価格の高い程たん白質含量が多い傾向が見られた.

表 3. 三訂成分表値と測定値との比較

	エネルギー	水分	たん白質	脂質	糖質	灰分
	Kcal	g	g	g	g	g
三訂成分表値	84	77.0	13.0	0.8	6.2	3.0
測定値の平均	89	75.1	11.5	0.2	10.3	2.9

（注） 試料100gに対する値である．

また，たん白質と価格をグラフ上にプロットした結果，高価格で低たん白質含量の製品は見られなかった．

価格については，100g 当りの平均値128±63円，範囲298円～58円であった．参考までに，価格と主材料である魚種との関係をみると100円/100g以下の製品にあっては，原料魚にたらが使用されており，100円～200円ではたら，ぐち，にべ，はもなどの混合で，200円以上はすべてえそが主原料であった．つまりえそが用いられた製品は高価格であり，たん白質含量も高かった．また試料中に価格が安く，たん白質含量の比較的高いものが見いだされたが，これは表示によれば主原料のたらに植物たん白が加えられたものである．

4） 脂質の平均値は0.24±0.16g，範囲1.0g～0.1gであった．

5） でん粉含量の平均値は3.1±2.1g，範囲9.0g～痕跡であった．JASによれば『でん粉および植物性たん白の含有率は練りつぶし魚肉の8％以下であること』となっているが，No 23，No 36 では8.7％（表示8.0％），9.0％（表示8.0％）であり，No 35 についても 6.2％（表示5.0％）でいずれも表示量以上であった．

加えられたでん粉の種類により，製品の質やアシの強さが異り，各産地特性の一因をなしているが，近年天然でん粉のほかにかまぼこ用の加工でん粉が開発され広く利用されている．でん粉はたん白質によるアシの形成能が劣っている場合の補強材となり，またでん粉の増量は水分の増加にもつながり，増量材としての意義も大きいといわれ，事実でん粉含量とくぼみの深さとは高い相関が認められた．また価格との相関は −0.571 で，でん粉含量の多い製品は価格の安いものに見られ，でん粉含量が多く高価格の製品は見当らなかった．

6） 灰分の平均値は 2.9±0.3g，範囲 3.7g～2.4g であった．

以上の成分値を三訂日本食品標準成分表値と比較すると，表3の通りである．

三訂成分表が設定された当時と現在では10数年のへだたりがあるため，加工技術の進歩，嗜好の変化に伴い成分内容に変化があるのは致し方ないと思われる．しかし元来動物性たん白質食品として扱われているだけに，このように糖質の増加が目立つのは考えさせられる事実である．

3. Aw および pH

1） Aw の平均値は0.974±0.008，範囲0.988～0.940であった．食品衛生法によれば，pH 6.0 以下であってAw を0.94以下に調製した製品については保存基準の適用を除外されているが，今回は No 34 のみが0.94であった．しかしこの製品は pH 6.7であったので，いずれの試料も10℃以下に保存することが望ましい製品であることになるが，それにもかかわらず保存条件表示のないものが3試料あった．

2） pH の平均値は6.65±0.29，範囲7.15～5.17であった．また pH 6.0 以下の製品は No 39 のみであった．

結　論

1） JAS 試験の結果は，弾力性測定，折り曲げ試験ともに規格外の製品はなかった．またでん粉含量は3試料を除き表示量以下であり，無表示の製品もすべて8％以下であった．

2） Aw, pH の検査結果は，すべての試料が規格通り10℃以下に保存されるべきものであることを示した．

3） 栄養成分の平均値を，三訂日本食品標準成分表値と比較したところ糖質含量の増加がみられた．また価格と成分の関係を検討した結果，たん白質含量の多い製品ほど高値であり，でん粉含量の多いほど安値であった．かまぼこ購入の際の一指標となろう．

今後は，かまぼこをはじめとし加工食品類には，JAS，食品衛生法などの規格基準表示と併せて，栄養成分内容表示をも検討さるべきであろう．

謝辞 本調査を行なうにあたり，試料収集に御協力頂いた食品監視課，ならびに食品機動監視班の方々に感謝の意を表するとともに，物性試験に御協力いただいた農林省規格検査所，藤本雄一課長，花原順技官に感謝致します．

文　献

1） 科学技術庁資源検査会編：三訂日本食品標準成分表，44，1953
2） 日本農林規格協会：JAS，特殊包装かまぼこ類の日本農林規格（昭和49年10月31日農林省告示第108号）
3） 日本薬学会編：衛生試験法注解，53，1965，金原出版株式会社

報　　文　Ⅳ

生活環境保全に関する調査研究

REPORTS IV

PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 283—288, 1978

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5報）
小学生および高校生の δ-アミノレブリン酸尿中排泄の実態

小笠原　公*，武士俣　邦　雄*，霜　田　さと子*

Investigations and Biochemical Studies on the Porphyrin Metabolites (V)
The Actual State of Urinary δ-Aminolevulinic Acid Excretion in School Children and High School Students

KIMI OGASAWARA*, KUNIO BUSHIMATA* and SATOKO SHIMODA*

四アルキル鉛添加ガソリンの使用また，産業排気ガス等による複合大気汚染の健康におよぼす影響を解明する資料とするため，住民による鉛害問題が提起された昭和45年以降，東京都住民についてデルタ・アミノレブリン酸（以下 δ-ALA と略す），コプロポルフィリン等ポルフィリン代謝系成分の尿中排泄実態調査を続け，得られた成果を報告[1-12]してきた．

すなわち，東京都住民の血液中鉛量，尿中鉛量は低値であり，鉛障害認定の指標成分とされる尿中 δ-ALA量，コプロポルフィリン量も低値であった．これらの調査成績をもとに，東京都衛生局による通常の環境で生活する住民に直接鉛障害の疑いはないことの発表[13]がなされたのである．

鉛障害の有無に関する調査は東京都全域の住民を対象に行なわれ，ほぼ調査終了の域にある．すでに加鉛ガソリンの使用は禁止されたのであるが，住民保健上経年観察が必要であるため，昭和50以降は高校生以下の若年代層を対象とする複合大気汚染の健康におよぼす影響調査が行なわれている．

この調査の一環として，小学生・中学生・高校生の δ-ALA 尿中排泄実態把握を担当し，すでに中学生についての調査成績を報告[14]したので，今回は小学生および高校生を対象とした δ-ALA の尿中排泄実態について報告する．

調査方法

1. 調査地域区分と調査対象　東京都の市郡部，区部，島部の小学校ならびに高校を選定し，その小学生と高校生につき δ-ALA の尿中排泄水準の調査を行なった．

調査対象とした小学生は昭和51年11月上旬に杉並区立杉並第二小学校の男子39名・女子36名と墨田区立東吾嬬小学校の男子35名・女子31名のいずれも5～6年生，さらに52年12月上旬に立川市立立川第八小学校の男子47名・女子36名と江東区南陽小学校の男子46名・女子39名の両校2年生についての合計男子167名・女子142名である．

高校生については昭和51年9月下旬に都立東高校（江東区）の男子65名・女子58名と都立三宅高校（三宅島）の男子20名・女子22名について，さらに昭和52年9月中旬に都立国立高校（国立市）の男子79名・女子68名と都立小岩高校（江戸川区）の男子48名・女子51名の1～3年生合計男子212名・女子199名が調査対象である．

2. 検査材料および検査測定種目　学校の協力を得て，あらかじめ配布したポリ瓶に調査対象者の早朝尿を採尿し，東京都衛生局公害保健課により一括搬入された被検尿について，採尿した当日のうちにつぎに記す種目の試験検査を行なった．

尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖定性試験：一般に常用されている試験方法[15]とマルティスティックス（三共社）併用

尿中 δ-ALA 量測定：和田法[16]の改善法[3]

調査成績および考察

1. 小学生の尿中 δ-ALA 正常値について　小学生の尿中 δ-ALA 正常値は表1に示すごとく男子3.23±0.93 mg/*l*（126例）・女子 3.11±0.88mg/*l*（110例）であった．

小学生について尿中 δ-ALA 量を測定した被検者は男

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. 尿定性異常陽性者を除去した学校別小学生の尿中 δ-ALA 平均値

小学校名	性別	測定数	異常値棄却数	平均値 (mg/l)	全例の正常値に対する差の検定
立川市立川第八	男	37	0	3.41±0.92	
	女	30	0	3.32±0.66	
江東区南陽	男	40	0	3.26±1.17	
	女	34	0	3.42±0.92	
杉並区杉並第二	男	28	0	3.25±0.81	
	女	23	0	2.59±0.83	P＜0.02
墨田区東吾嬬	男	23	1	2.96±0.72	
	女	23	0	2.89±0.90	
全例	男	128	2	3.23±0.93	
	女	110	0	3.11±0.88	

表 2. 尿定性異常陽性者を除去した学校別高校生の尿中 δ-ALA 平均値

高校名	性別	測定数	異常値棄却数	平均値 (mg/l)	全例の正常値に対する差の検定
江東区東	男	42	0	2.94±0.99	
	女	42	0	2.76±0.91	
島シヨ三宅	男	15	0	2.79±0.88	
	女	20	0	2.70±0.82	
国立市国立	男	48	0	2.69±0.76	
	女	49	1	2.10±0.66	P＜0.01
江戸川区小岩	男	29	1	3.09±0.93	
	女	35	0	2.59±0.80	
全例	男	134	1	2.86±0.89	
	女	146	1	2.49±0.82	

子167名・女子142名であるが，この被検者には調査対象の項で述べたように男女とも約半数ずつの2年生と5～6年生が含まれている．そこで低学年と高学年の尿中 δ-ALA 平均値についてt検定を行なったところ，両平均値に有意差がなかったので，すべての被検者を尿中 δ-ALA 平均値算定の対象とした．

小学生の個々の尿中 δ-ALA 値について，性別に危険率1%水準における異常値棄却検定[17]を行ない，男子3例・女子1例の統計異常値を削除して得られた尿中 δ-ALA 平均値は表3に示すように男子 3.44±0.97mg/l (164例)・女子3.21±0.91mg/l (141例) であった．この値は尿定性試験によるウロビリノーゲン，タンパク，糖の単種または複種成分の異常陽性者が含まれている値であって，正常値に比べわずかに高値である．それゆえ尿中 δ-ALA 正常値の算定はすべての測定データから，あらかじめ男子39例 (23.4%)・女子32例 (22.5%) の尿定性試験によるウロビリノーゲン，タンパク，糖異常陽性例を除外したのち，男子2例の統計異常値を棄却した99%信頼範囲のもののみを対象とした．

2. 高校生の尿中 δ-ALA 正常値について 高校生の尿中 δ-ALA 正常値は表2に示すごとく男子2.86±0.89 mg/l (133例)・女子 2.49±0.82mg/l (145例) であって，性差があり男子が有意 (P＜0.01) に高値であった．

高校生について尿中 δ-ALA 量を測定した被検者は男子212名・女子199名である．高校生についても小学生と同様に異常値棄却検定を行ない，男子1例・女子4例の統計異常値を削除して得られた尿中 δ-ALA 平均値は表4に示すように男子 3.16±0.96mg/l (211例)・女子 2.68±0.90mg/l (195例) であった．尿定性試験による異常陽性例が含まれるこの値は正常値に比較し有意 (男子P＜0.01・女子P＜0.02) に高値である．高校生の尿中 δ-ALA 正常値の算定も，被検者全例から男子78例 (36.8%)・女子53例 (26.6%) の尿定性異常陽性例を削除し，さらに男女各1例の統計異常値を棄却して算定したものである．

3. 小学生と高校生の δ-ALA 尿中排泄水準の比較 すでに一般住民について，年齢による ALA の尿中排泄

表 3. 尿定性異常陽性者を含む場合の学校別小学生の尿中 δ-ALA 平均値

小学校名	性別	測定数	異常値棄却数	平均値 (mg/l)	全例の正常値に対する差の検定
立川市立川第八	男	47	0	3.59±0.92	P<0.05
	女	36	0	3.44±0.67	P<0.05
江東区南陽	男	46	0	3.41±1.29	
	女	39	1	3.48±0.89	P<0.05
杉並区杉並第二	男	39	0	3.37±0.77	
	女	36	0	2.92±0.95	
墨田区東吾嬬	男	35	0	3.36±1.18	
	女	31	0	3.05±0.94	
全例	男	167	3	3.44±0.97	
	女	142	1	3.21±0.91	

表 4. 尿定性異常陽性者を含む場合の学校別高校生の尿中 δ-ALA 平均値

高校名	性別	測定数	異常値棄却数	平均値 (mg/l)	全例の正常値に対する差の検定
江東区東	男	65	0	3.29±1.05	P<0.01
	女	58	0	2.99±0.96	P<0.001
島シヨ三宅	男	20	0	3.18±1.11	
	女	22	0	2.83±0.90	
国立市国立	男	79	1	2.86±0.74	
	女	68	3	2.33±0.76	
江戸川区小岩	男	48	1	3.44±0.95	P<0.001
	女	51	1	2.70±0.89	
全例	男	212	1	3.16±0.96	
	女	199	4	2.68±0.90	

水準の検討を行ない，男女とも20～30歳代は50～60歳代よりも高値であったことの報告[7]をした．20歳以下の若年代層についても年齢による差異の有無の検討をした．前項で小学生の尿中 δ-ALA 正常値は男子 3.23±0.93 mg/l・女子 3.11±0.88mg/l であり，高校生では男子 2.86±0.89mg/l・女子 2.49±0.82mg/l であることを述べたが，小学生と高校生の尿中 δ-ALA 正常値について性別に t 検定を行なった結果，男女とも小学生が有意（男子 P<0.01・女子 P<0.001）に高値であった．

一般住民の尿中 δ-ALA 正常値は男 2.01±0.77mg/l（775例）・女 1.78±0.74mg/l（1,366例）であることをすでに報告[11]したのであるが，この値と高校生の値についてt検定を行なったところ男女とも高校生が有意（P<0.001）に高値であった．すなわち δ-ALA の尿中排泄水準は年齢による差異があり，若年代層が高値である．

4. 調査区域による小学生および高校生の δ-ALA 尿中排泄水準について 小学生また高校生について δ-ALA の尿中排泄水準を調査校ごとに検討することは，複合大気汚染の健康におよぼす影響調査として重要である．

小学生については市郡部として立川第八小学校（立川市），区部として杉並第二小学校（杉並区），東吾嬬小学校（墨田区），南陽小学校（江東区）を調査対象校として小学校ごとに被検者の尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖の定性試験と尿中 δ-ALA 量を測定した．尿中 δ-ALA 値について小学校ごとに危険率1％水準での異常値棄却検定を行なって，統計異常値の削除をした信頼範囲のデータのみから求めた平均値を表3に示す．

市郡部と区部の小学生の尿中 δ-ALA 平均値に差異があるか否かを表1に示した小学生の尿中 δ-ALA 正常値に対するt検定を行なった結果，立川第八小学校の男女と南陽小学校の女子が有意（P<0.05）に高値であった．いかなる理由によってこれら小学生の尿中 δ-ALA 平均値が比較的高水準を示したかの解明は，南陽小学校のように性によって異なった成績であったことからも，今後経年観察にまたなければならないと考える．

被検集団に尿定性試験による異常陽性者が含まれる場合の尿中 δ-ALA 平均値はやや高値に表現されることを

述べた．そこで小学校ごとに尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖の単種または複種の異常陽性者を除いたのち，統計異常値の削除を行なったものの尿中 δ-ALA 平均値を表1に示した．

小学校ごとにみて尿中 δ-ALA 平均値に差があるか否かを小学生全例を対象として得られた正常値に対する t 検定を行なったところ，尿定性異常陽性者が含まれる場合には立川第八小学校の男女と南陽小学校の女子の尿中 δ-ALA 平均値が高水準を示していたものが，尿定性異常陽性者の除去後では有意差がみられなくなった．このことは δ-ALA の尿中排泄に尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖異常陽性が関与していることである．

つぎに高校生については市郡部として都立国立高校（国立市），区部として都立東高校（江東区）および都立小岩高校（江戸川区），島部として都立三宅高校（三宅島）の4高校を調査対象校として，高校ごとに小学生について行なった検査と同じく尿定性試験と尿中 δ-ALA を測定した．尿中 δ-ALA 値については高校ごとに統計異常値を棄却したのち求めた平均値を表4に示した．

市郡部，区部，島部の高校生の尿中 δ-ALA 平均値に差異があるか否かを高校生全例を対象として得た正常値に対する t 検定の結果，都立東高校の男女と都立小岩高校の男子が有意（$P<0.01\sim0.001$）に高値であった．

尿中 δ-ALA 平均値が比較的高水準であったそれらの高校が所在する地域は，空中降下煤じんや亜硫酸ガス等による大気汚染度が高く，この人体影響として慢性気管支ゼンソク，慢性気管支炎等の有症者が自然発生率の2～3倍も多いことのために，昭和49年公害健康障害補償法制定にもとづく補償認定地域であり，一般住民の調査でもこの地域に居住する被検者の尿中 δ-ALA 平均値が高水準を示した報告[11]と一致する．それゆえ高校生については複合大気汚染等生活環境因子の影響が考えられる．しかし小学生について大気汚染の人体影響を尿中 δ-ALA 水準から推察するに，区部のうちで大気汚染度が高い墨田区や江東区の小学生の尿中 δ-ALA 水準は南陽小学校の女子のみが有意性を示しただけであったことから，それが小学生にまでおよんでいないのではなかろうか．

高校生についても高校ごとに尿定性異常陽性者を除きさらに統計異常値の棄却を行なって得た尿中 δ-ALA 平均値を表2に示した．高校ごとの尿中 δ-ALA 平均値と高校生全例から得られた正常値との差の検定の結果は，尿定性異常陽性者が含まれる場合に都立東高校の男女と都立小岩高校の男子が有意に高水準であったものが，いずれも有意性がみられなくなった．このことは高校生も小学生と同じく尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖異常陽性者が関与していることである．それゆえ δ-ALA の尿中排泄におよぼすウロビリノーゲン，タンパク，糖の尿中異常出現の関連性を吟味する必要がある．

5. ウロビリノーゲンの尿中異常出現と δ-ALA の尿中排泄関係 小学校および高校ごとに尿定性試験によるウロビリノーゲン，タンパク，糖の3成分を合せた異常陽性率とウロビリノーゲンのみの異常陽性率さらに尿ウロビリノーゲンが異常陽性であったものの尿中 δ-ALA 平均値を表5に示した．

小学生について尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖3成分を合計した異常陽性率は男子23.4%・女子22.5%であったが，このうち尿ウロビリノーゲンのみの異常陽性率が男子17.4%・女子18.3%を占め，尿タンパクと尿糖の陽性率は低率であった．

高校生についての尿3成分を合計した異常陽性率は男子36.8%・女子26.6%であるが，このうち尿ウロビリノーゲンのみの異常陽性率は男子31.1%・女子22.6%を占め，高校生も尿タンパクと尿糖の出現率は低率であった．このことを小学校ごとにまた高校ごとにみても，尿ウロビリノーゲンの異常出現が大部分であった．

小学生について尿ウロビリノーゲン，タンパク，糖の単種または複種の異常陽性を示したものの尿中 δ-ALA 平均値は男子 4.06 ± 1.03mg/l・女子 3.69 ± 0.77mg/l であったが，尿ウロビリノーゲンのみ異常陽性であったものの尿中 δ-ALA 平均値は 男子 3.98 ± 0.67mg/l・女子 3.69 ± 0.84mg/l であり，男女とも両平均値に差がなかった．しかし小学生全例から得た正常値に対する t 検定では，尿ウロビリノーゲン異常陽性者の尿中 δ-ALA 平均値が有意（$P<0.01$）に高値であった．

高校生について尿3成分のいずれかが異常陽性であったものの尿中 δ-ALA 平均値は男子 3.67 ± 0.85mg/l・女子 3.36 ± 1.04mg/l であったが，尿ウロビリノーゲン異常陽性者の尿中 δ-ALA 平均値は男子 3.66 ± 0.86mg/l・女子 3.42 ± 1.05mg/l であって男女とも両平均値に差がなかった．しかし高校生全例から得た正常値に対する t 検定で，尿ウロビリノーゲン異常陽性者の尿中 δ-ALA 平均値が有意（$P<0.01$）に高値であった．

表5に示した学校ごとの尿ウロビリノーゲン異常陽性率さらにこれが異常陽性であったものの学校別尿中 δ-ALA 平均値をみると，尿ウロビリノーゲン異常陽性率が高く，しかもこの尿中 δ-ALA 平均値が小学生，高校生それぞれの全例から得た正常値に比し有意に高値であったのは立川第八小学校の男女と東吾嬬小学校の男子，高校では都立東高校の男女と都立小岩高校の男子であっ

表 5. 学校別小学生および高校生の尿定性異常陽性率と尿ウロビリノーゲン異常陽性者の尿中 δ-ALA 平均値

学校区別	学校名	性別	尿成分異常陽性率(%)	尿ウロビリノーゲン異常陽性率(%)	δ-ALA 平均値 (mg/l)	正常値に対する差の検定
小学生	立川市立川第八	男	21.3	14.9	4.14±0.61	P<0.02
		女	16.7	16.7	4.08±0.21	P<0.01
	江東区南陽	男	13.0	8.7	5.25±0.58	P<0.001
		女	12.8	7.7	4.15±0.35	
	杉並区杉並第二	男	28.2	28.2	3.69±0.57	
		女	36.1	30.6	3.58±0.94	
	墨田区東吾嬬	男	34.3	22.9	4.16±1.09	P<0.01
		女	25.8	19.4	3.33±1.03	
	全例	男	23.4	17.4	3.98±0.67	P<0.001
		女	22.5	18.3	3.69±0.84	P<0.01
高校	江東区東	男	35.4	27.7	3.69±0.77	P<0.001
		女	27.6	20.7	3.69±0.89	P<0.05
	島シヨ三宅	男	25.0	20.0	4.34±0.93	P<0.01
		女	9.1	9.1	4.15±0.50	P<0.05
	国立市国立	男	39.2	32.9	3.14±0.65	
		女	27.9	23.5	2.94±0.60	
	江戸川区小岩	男	39.6	37.5	4.02±0.74	P<0.001
		女	31.4	29.4	3.07±1.01	P<0.02
	全例	男	36.8	31.1	3.66±0.86	P<0.001
		女	26.6	22.6	3.42±1.05	P<0.001

た．したがって δ-ALA の尿中排泄水準に地域差がうかがえたのは，ウロビリノーゲンの尿中異常出現と関係が深い．

尿ウロビリノーゲンの検査は肝臓疾患のスクリーニングに常用される．尿ウロビリノーゲンは肝臓疾患のほか疲労等種々の条件で異常出現[15]するので，この異常陽性を直ちに肝疾患とすることはできない．しかし δ-ALA 縮合酵素は肝臓で合成され，ヘム合成酵素と深い調節関係にある報告[18,19]さらに δ-ALA は肝臓疾患に尿中排泄増加がみられる報告[20,21]から考え，複合大気汚染の人体影響調査に肝臓機能検査が必要である．

東京都の小学生，高校生の尿中 δ-ALA 水準は鉛障害認定基準値[22]以下の値であったが，その尿中排泄水準に地域差があり，これが大気汚染の程度と一致する成績が得られたことは，小学生，高校生等若年代層にも大気汚染がある程度望ましくない影響をおよぼしている可能性がうかがえた．

結　論

小学生については昭和51年11月と12月，高校生については昭和51年および52年のいずれも9月に，小学生男子167名・女子142名，高校生男子212名・女子199名を調査対象として尿中 δ-ALA 量を測定し，その正常値を算定しさらに小学生ならびに高校生の居住地域別に δ-ALA の尿中排泄水準の差異について検討した．

1) 小学生の尿中 δ-ALA 正常値は男子 3.23±0.93 mg/l・女子3.11±0.88mg/l である．被検者グループにウロビリノーゲン，タンパク，糖の尿定性異常陽性者が含まれる場合の尿中 δ-ALA 平均値はやや高値に表現され男子 3.44±0.97mg/l・女子 3.21±0.91mg/l であった．

2) 高校生の尿中 δ-ALA 正常値は 男子 2.86±0.89 mg/l・女子2.49±0.82mg/l である．被検者グループに尿定性異常陽性者が含まれる場合の尿中 δ-ALA 平均値は男子3.16±0.96mg/l・女子2.68±0.90mg/l であり，やや高値に表現される．

3) 小学生の尿中 δ-ALA 正常値は高校生のそれより有意に高値であり，高校生の尿中 δ-ALA 正常値は一般住民よりも有意に高値であって若年代層の値が高い．

4) δ-ALA の尿中排泄水準に居住地域差がみられ，小学生では立川市立立川第八小学校の男女と江東区立南陽小学校の女子，高校では江東区の都立東高校の男女と江戸川区の都立小岩高校の男子が有意に高水準であり，大気汚染度が高い地域の高校生にその人体影響がうかがえた．

5) 尿ウロビリノーゲン異常陽性者の尿中 δ-ALA 平均値は正常値に対し有意に高値である.

文　献

1) 野牛　弘，秋山和幸，高橋利恵子，小笠原公ほか：東京衛研年報，**23**，287，1971
2) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，**24**，297，1972
3) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，野牛　弘：東京衛研年報，**24**，303，1972
4) 小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子ほか：東京衛研年報，**24**，311，1972
5) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，**25**，313，1974
6) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，**25**，321，1974
7) 小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，**26**-1，246，1975
8) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，**26**-1，252，1975
9) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，**26**-1，259，1975
10) 小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，**27**-1，211，1976
11) 小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，**27**-1，217，1976
12) 小笠原　公，武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，**28**-1，190，1977
13) 東京都衛生局：公害研究資料，**43**，1970
14) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，**27**-1，221，1976
15) 金井　泉：臨床検査提要，**20**版，1961，金原出版
16) Wada, O. *et al.* : *British J. Ind.*, **26**, 240, 1969
17) 農林省畜産局衛生課：家畜衛生に必要な調査・統計の知識，1970，日本獣医師会
18) 菊地吾郎：蛋白，核酸，酵素，**20**，8，69，1975
19) 病気の生化学編集委員会：病気の生化学，**20**巻C，代謝異常，**III**，1973，中山書店
20) 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
21) 松山史郎：慶応医学，**37**，1195，1966
22) 労働省労働基準局長通達：労働の科学，**28**，54，1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 289—292, 1978

ポルフィリン体の生化学的研究（第9報）　ポルフィリン体に対するヨード酸化の影響について

武士俣　邦雄*, 霜　田　さと子*

Biochemical Studies on the Porphyrins (IX)
The Effects of Oxidation with Iodine on Porphyrins

KUNIO BUSHIMATA* and SATOKO SHIMODA*

Iodine oxidation which converts methylene bridge in coproporphyrinogen into methene bridge has been applied to quantitative analysis of coproporphyrin in urine. This paper describes the effect of iodine oxidation on the estimation of coproporphyrin in urine. By iodine oxidation of urinary coproporphyrin before ether extraction, it showed higher value than that after extraction. However, the concentration of coproporphyrin in the standard solution is decreased by iodine oxidation before ether extraction.
These results suggest that the impurity in urine might exert an important role to prevent over reaction of iodine. Moreover, disappearance of the absorption spectrum of standard coproporphyrin in ethyl acetate was observed by prolonged iodine oxidation. It is also indicative that the breakdown of coproporphyrin is induced by the prolonged reaction.

尿中のコプロポルフィリン（以下 Cp と記す）の定量分析には，通常ヨードを用いた酸化反応が利用されている．これは Cp の前駆体であるコプロポルフィリノーゲンのメチレン結合をメテン結合の構造に変えるためである．しかし，このヨード酸化反応の効果について，Watson *et al.*[1] は希薄ヨード液の有効性を報告しているが，森ら[2] はヨード酸化を行なわずに古い尿を用いて定量分析を行なうことを提唱しており，必ずしも統一的な見解に至っていない．

そこで著者らは，尿中 Cp 定量分析時のヨード酸化処理の効果，さらにはヨード酸化反応が Cp 体におよぼす影響について検討を行なったので報告する．

実験試料および試薬

1) Cp の標準物質として市販されているコプロポルフィリン—Ⅲ—テトラメチルエステル
2) 新鮮一時尿
3) 0.001%ヨード・1%酢酸ナトリウム水溶液
4) 1.5N塩酸水溶液
5) 氷酢酸・飽和酢酸ナトリウム（4：1）混合緩衝液
6) 飽和ヨード水溶液

この他の薬品類はすべて市販の特級品を用いた．

定量分析方法および測定機器について

1) 尿中 Cp 定量分析[3] ……コプロポルフィリノーゲン酸化試薬としてのヨード濃度を 0.001%に改めた著者らの微量けい光法にもとづいて尿中の Cp を抽出し，日立 MPF-2A型けい光分光光度計で測定した．

2) ポルフィリン体に対するヨード酸化の影響は，吸収スペクトルの変化として観察し，日立356型二波長自記分光光度計で記録した．

結果および考察

1. 尿中 Cp 定量分析時のヨード酸化処理の効果について

新鮮な個人尿（n=138)を用いて，尿中 Cp をエチルエーテル（以下エーテルと記す）で抽出する前および抽出後のエーテル洗浄時にヨード酸化処理を行なって得た Cp 測定値の分布状態を表わした相関図を Fig. 1 に示す．各測定値の分布から明らかなように，3例を除いたすべての測定値が $y=x$ の直線の上側に散布され，こ

* 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

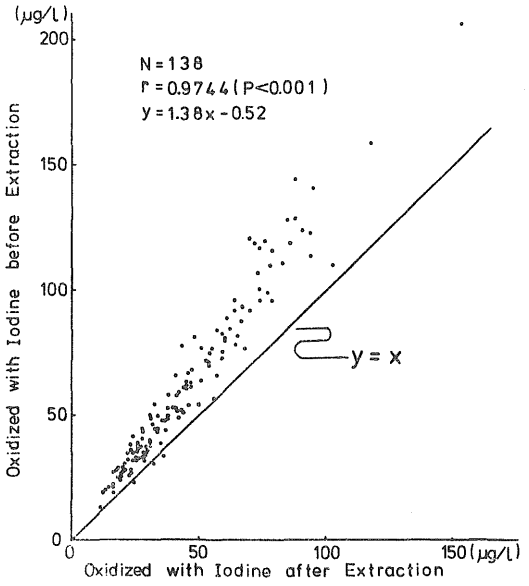


Fig. 1. Correlation between Urinary Coproporphyrin Values obtained by Oxidation with Iodine before and after Extraction

れらの測定値の相関係数 $r=0.9744$ は，危険率 0.1% 以下の水準で有意であった．すなわち，この散布図が示すように，尿中 Cp の定量分析はエーテルで抽出する前に試料を直接にヨード酸化処理した方が，抽出後のエーテル洗浄時にヨード酸化処理を行なうよりも，高い測定値が得られることを如実に表わしているといえる．このことは，尿中 Cp をエーテルで抽出する前にヨード酸化を行なった場合の平均値 62.37μg/l と，抽出後にヨード酸化を行なって得た平均値 45.55μg/l とについて，Welch の差の検定を行なったところ，危険率0.1%以下の水準で有意に前者が高いと判断されたことからも裏付けられる．しかし，この有意差が Cp の前駆体であるコプロポルフィリノーゲンによるものか，あるいはヨード酸化によって Cp 体が発するけい光が増強されたのかなどについては今後くわしく検討する必要がある．

なお，エーテル抽出後のエーテル洗浄時に Cp 体のヨード酸化処理を行なった方が高値であった3例は，複雑な成分が含まれている尿が試料であることを考えると，その試料の濃淡が問題点として考えられる．また，この点については，Watson *et al.* が報告している希薄なヨード溶液の有効性ということときわめて関係が深いのではないかと考える．

2. 標準液を試料とした場合のヨード酸化処理について

Table 1. Effect of Oxidation with Iodine on Standard Coproporphyrin (Equivalent Concentration : 100μg/l)

Oxidized before Extraction		Oxidized after Extraction	
Value (μg/l)	Reappearance	Value (μg/l)	Reappearance
89.0		97.9	
89.7		98.3	
89.2		97.7	
88.9	89.2±0.7 (μg/l)	99.0	97.9±0.6 (μg/l)
87.6		98.3	
88.3		97.9	
89.7	(C.V.=0.0082)	97.2	(C.V.=0.0061)
89.8		97.5	
89.7		96.8	
90.1		98.1	

Cp の標準物質として市販されているコプロポルフィリン—Ⅲ—テトラメチルエステル(以下標準物質と記す)の 100μg/dl 濃度の 0.1N の塩酸溶液を試料とし，前項で記述したと同様に，エーテルで抽出する前および抽出後のエーテル洗浄時にヨード酸化処理を行なって得た測定結果を Table 1 に示す．

この Table で明らかなように，標準物質をエーテルで抽出した後のエーテル洗浄時にヨード酸化を行なった時の測定平均値 97.87±0.60μg/l は，試料として用いた標準物質の相当濃度 (100μg/l) よりもやや低値であった．

しかし，標準物質をエーテルで抽出する前にヨード酸化処理を行なった場合の測定平均値 89.22±0.74μg/l は，前述したエーテル抽出後にヨード酸化処理を行なった場合の平均値よりもさらに約1割も低い値であった．しかし，この両方の各測定値の変動係数はきわめて小さく，かつ比較するほどの差は認められず，安定した測定結果であった．

以上のように分析操作過程におけるヨード酸化処理の順序の違いによって，標準物質溶液を試料として用いた場合の回収測定値に差が生じたのは，エーテルに抽出された標準物質とヨードが接触している時間の長短差などによって起った現象と考える．また，ヨード酸化処理の順序の違いによる測定値の関係は，標準物質溶液を試料にした場合と，前項で述べた尿中 Cp の測定値の結果とはまったく逆であった．このことは，標準物質溶液には標準物質そのものしか含まれていないのに対し，尿には

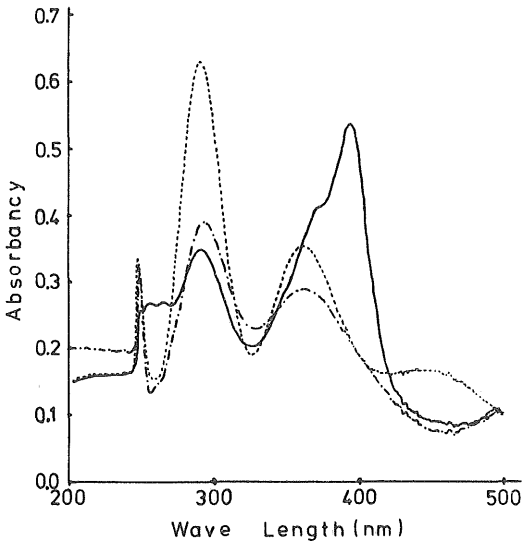


Fig. 2. Effect of Reaction Period with Iodine on Absorption Spectrum of Coproporphyrin-III-Tetramethyl Ester in Ethyl Acetate

———Oxidized by Iodine According to the Regular Procedure.

— - —Oxidized for 60 Minutes.

·····Blank (Ethyl Acetate Containing Iodine)

いろいろの被酸化成分が含まれており，それらの成分とヨードが反応したために遊離のヨードが少なくなり，ポルフィリン体に対するヨード酸化反応が弱められたことなどによるものと思われる．

3. ヨード酸化による標準物質の変化について

標準物質 100μg/dl 濃度の 0.1N 塩酸溶液 10ml に，緩衝液用の氷酢酸・飽和酢酸ナトリウム（4：1）混合液 4ml および飽和ヨード水溶液 2ml を加えて混和し，最後にCp抽出溶媒として使用されている酢酸エチル 5ml を加えてよく振とうし，標準物質とヨードを抽出した．このように処理して抽出した標準物質について，酢酸エチルの中でのヨード酸化の影響をしらべるために，その吸収スペクトルの変化を観察したものを Fig. 2 に示す．

この Fig. の破線は，対照とした酢酸エチル自体のヨード酸化反応による変化を，酢酸エチルを対照として記録したものであり，250，290ならびに 360nm 付近の波長に吸収が認められた．この酢酸エチルの物理化学的な性質[4]としては，温度15°で水に 7.9wt %溶けるとともにエステルでは常温で水を約 3.6wt %溶解し，常温で酢酸とエチルアルコールとなり，水の存在下では徐々にエチレンとアルデヒドになる．また，ハロゲンのなかではヨードと最もすみやかに反応してヨウ化エチルと酢酸に分解される．

以上のような物理化学的性質から，破線で示した吸収波形は，酢酸エチルがヨードや水と複合的に反応したための結果が表わされたものと考える．

つぎに実線は，標準物質に対するヨード酸化の影響を最小限にとどめた状態，すなわち前述した方法にもとづいて酢酸エチルで抽出した直後の吸収波形を示したものである．この実線で示した吸収波形には255，265ならびに 370nm 付近の波長に小さな吸収があり，さらに290および 394nm 付近の波長に明確な吸収が認められた．しかし，290nm 付近の吸収は前述した対照としての酢酸エチルにも観察されており，これは標準物質にかかわる吸収ではないものと考える．

さらに鎖状点線は，酢酸エチルの中で標準物質に対するヨード酸化反応を1時間にわたって行なった場合の吸収波形を示したものである．この吸収波形は，破線で示した酢酸エチルに対するヨード酸化の吸収波形とまったく同じ形を示し，標準物質を酢酸エチルで抽出した直後の吸収波形（実線）に認められた370および 394nm 付近の波長の吸収が認められなくなった．また，この酢酸エチル層にマナスルライトの紫外線（3650Å）を照射しても，標準物質の特異的なけい光は認められなかった．

これらのことは，標準物質が酢酸エチルの中で直接的にヨード酸化反応をうけたか，あるいは酢酸エチルがヨード酸化をうけて生じた成分と反応したために，200～500nm 波長域に吸収を示すことのない物質に変化したものと思われる．

なお，酢酸エチルを用いて尿中のポルフィリン体を抽出し，その後にヨード酸化処理を行なう定量分析方法としては，Schwartz *et al.* 法[5]，西川氏法[6]，Rimington 法[7] ならびに久大公衛改良法[8] などが報告されている．しかし，いずれの方法においても，ヨード酸化の影響について検討してあるものはない．

また，同様の反応を，安定化剤を添加してあるエチルエーテルの中で試みたところ，酢酸エチル中での反応よりも安定ではあったが，徐々には変化してゆくことが認められた．

以上の結果から，尿中 Cp を定量的に分析するときには，その抽出溶媒はエーテルを使用するとともに，ヨードによる酸化処理はエーテルで抽出する前に行ない，そののち可及的すみやかにヨードとの接触を断ち，Cp 体がより安定する塩酸溶液に転溶させることが重要である．

ま と め

尿中 Cp の定量分析には，通常ヨードによる酸化反応が利用されているが，その酸化反応の効果や影響については明らかにされていないので，この点について検討したところ次のような結果が得られた．

1. 138人の新鮮尿中 Cp の定量分析を行なったところ，尿中の Cp をエーテルで抽出する前にヨード酸化処理をした場合の測定平均値 62.37μg/l は，抽出後のエーテル洗浄時にヨード酸化処理を行なって得た測定平均値 45.55μg/l よりも，危険率0.1%以下の水準で有意に高い結果であった．

2. 100μg/l 相当濃度の 0.1N 塩酸溶液の Cp 標準物質を試料として用いた場合，エーテルで抽出したのちのエーテル洗浄時にヨード酸化処理を行なって得た測定平均値 97.87±0.60μg/l は，エーテルで抽出する前にヨード酸化処理を行なったときの測定平均値 89.22±0.74μg/l よりも高い回収結果であった．しかし，この両方の各測定値の変動係数はきわめて小さく，かつ比較するほどの差はなく非常に安定した測定結果であった．

3. 酢酸エチル中で標準物質に対するヨード酸化の影響をしらべたところ，1時間後には酢酸エチル中の標準物質の吸収波長である 394nm 付近に吸収が認められなくなった．また，同様の反応を，安定化剤を添加してあるエーテルの中で試みたところ，標準物質は比較的安定していることが認められた．

以上の結果をまとめると，尿中 Cp の定量分析は，その抽出溶媒としてエーテルを使用するとともに，ヨードによる酸化処理はエーテルで抽出する前に行ない，そののち可及的すみやかに塩酸溶液に転溶させることが重要である．

（本研究の概要は衛生検査学会第26回長崎大会1977年4月で発表した．）

文 献

1) Watson, C. J., R. Pimenta De Mello, S. Schwartz, V. E. Hawkinson, and I. Bossenmaier, : *J. Lab. and Clin. Med.*, **37**, 831, 1951
2) 森 正敬，栗原真純，徳永力雄，佐野晴洋：日衛誌，**24**，137，1969
3) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原 公：東京衛研年報，**24**，297，1973
4) 有機合成化学協会編：溶剤ポケットブック，第1版3刷，403，昭和45年，オーム社，東京
5) Schwartz, S., L. Zieve, and C. J. Watson : *J. Lab. and Clin. Med.*, **37**, 843, 1951
6) 西川嶺九：公衆衛生集団検診法，第1版，214，昭和35年，医歯薬出版，東京
7) Sano, S. and C. Rimington : *Biochem. J.*, **86**, 203, 1963
8) 松本久男：臨床病理，**19**，56，1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 293—297, 1978

小笠原しょ島診療所由来の血清成分値に関する考察

武士俣 邦 雄[*1], 霜 田 さと子[*1], 小笠原 公[*1]
道 口 正 雄[*1], 大久保 暢 夫[*2]

Biochemical Analyses on the Sera of Outpatients of the Clinic in Ogasawara Islands

KUNIO BUSHIMATA[*1], SATOKO SHIMODA[*1], KIMI OGASAWARA[*1],
MASAO DOGUCHI[*1] and NOBUO OHKUBO[*2]

A total of 54 sera collected from the outpatients of a clinic in Ogasawara islands were subjected for the biochemical analyses in order to clarify the environmental factors of the inhabitants of the islands. 1) The total protein in the 45 samples was shown to be distributed in its normal range of 6.5～8.0g/d*l*. 2) The mean statistical level of total cholesterol for male was 199.1±37.1mg/d*l* (n=27) with one exception which was judged to be significantly high by statistical analysis ($P<0.05$), while the mean level for female was shown to be 184.9±36.9mg/d*l* (n=17). 3) The total bilirubin in the 9 (32.1%) of 28 male subjects showed higher concentrations than its normal levels of 0.2～0.8mg/d*l*, while 11 of female showed normal levels. 4) The transaminase activity of the 9 (18.8%) of 48 subjects showed higher activity than the normal ones. 5) The higher levels of iron than its normal range were detected in the 4 of 9 male sera which showed abnormally high levels of bilirubin concentrations. However, 33 (63.5%) of 52 showed lower amounts than the normal levels.

小笠原しょ島は昭和43年6月に施政権がアメリカ軍政下から日本に返還され，その後いろいろの復興事業が順次に執行されている．しかし，白坂が衛生局報第139号で“最大の懸案は村診療所の運営であった”と述べているように，島民の健康を維持管理する医療体系が整っていないのが実状である．なかでも臨床検査部門の設備がいまだ不完全なために，われわれはなんらかの疾病によって診療所を訪れた島民の血液理化学的検査を行なっている．この機会に生活環境が本土の東京都と異なる島民の血清成分の性状を知るために，検査依頼血清材料について可能な限り多くの項目の検査を行ない，それらの成績内容を詳細に検討したところ，特定の項目に正常値を逸脱している共通的な傾向が認められたので報告する．

検査材料および検査方法

1. **供試血清** 小笠原しょ島診療所(父島および母島)を訪れた20歳以上の人びと（以下島民と記す）から採血された分離血清が脱気パック状態のプラスチック容器で，島しょ保健所を経由して送付されてきたものを使用した．

2. **検査期間** 昭和52年1月～昭和53年3月の期間に受け付けた検査材料を定量分析に供した．

3. **定量分析法** 1) 総タンパク質……ビューレット法[1], 2) 総コレステロール……Zurkowski 法[2], 3) 総ビリルビン……Evelyn-Malloy 法[3], 4) トランスアミナーゼ……Reitman-Frankel 法[4] の原理に基づいて調整した試薬を用いて行なった．5) 血清鉄……バソフェナンスロリン法[5]．

このほかの検査項目については，一般的に常用されている臨床検査術式に従って分析検査を行なった．

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 160 東京都新宿区百人町3—24—1
*1 Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
*2同微生物部細菌第二研究科

検査成績および考察

1. **総タンパク質濃度** 島民の総タンパク質濃度の分布状態を性別に表わしたものを Fig. 1 に示す.

島民の総タンパク質濃度は，性別にかかわらず全てのプロットが正常値とされている 6.5～8.0g/dl の範囲内に散布されている．これらの総タンパク質濃度から推察する限り，島民に総タンパク質濃度が変動するような疾病あるいは食事による摂取不足などの栄養上の問題はないと考えられた．しかし，血清中の総タンパク質は，アルブミンの減少をグロブリン分画が補なうような形で増加している場合もあるので，さらに詳細に調べるためにはタンパク分画を行なう必要がある．

なお，これらの総タンパク質濃度を測定した血清について，腎機能にかかわる項目の検査成績をくわしく検討したが，腎機能障害を認めるような被検者は発見されなかった．

2. **総コレステロール濃度** 島民の総コレステロール濃度の分布状態を性別に表わしたものを Fig. 2 に示す.

この総コレステロールのおのおのの分析値の中で，昭和35年度に文部省総合研究動脈硬化研究班会議で集計された日本人の正常域[6] の上限とされた 240mg/dl よりも高値であった被検者は 8/45 例であったが，下限の125

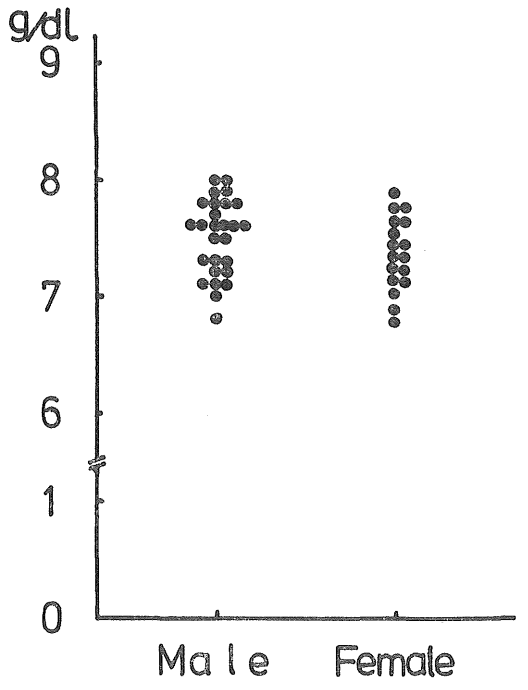


Fig. 1. Serum Levels of Total Protein

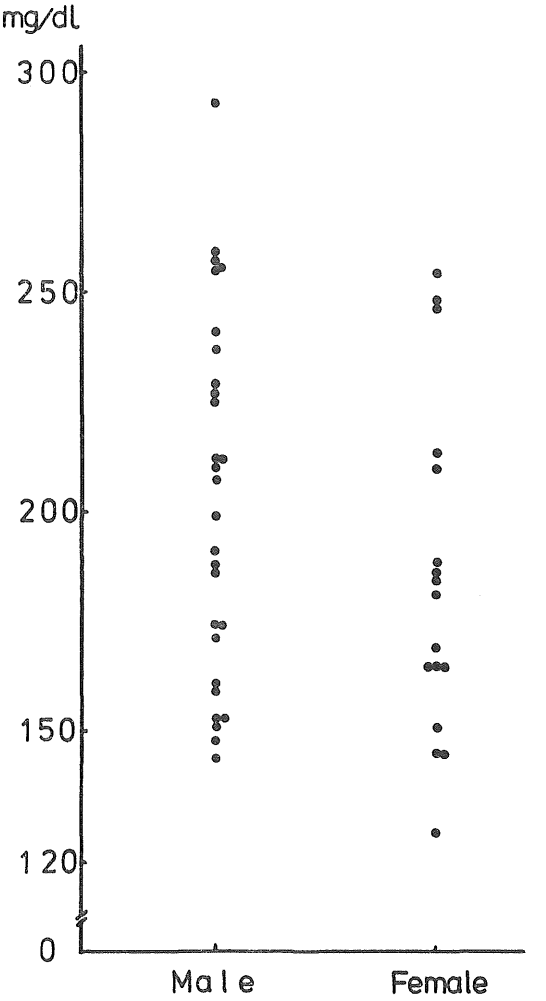


Fig. 2. Serum Levels of Total Cholesterol

mg/dl よりも低値であった被検者は発見されなかった．

しかし，島民の総コレステロール濃度のF分布における棄却限界値を危険率5％水準で求めたところ，男性の 120.0～278.2mg/dl および女性の 102.1～267.7mg/dl が95％信頼範囲内の濃度として算出された．この検定において棄却された測定値は男性の 293.2mg/dl の1例だけであった．さらに，95％信頼範囲内の総コレステロール濃度の平均値を算出した結果，男性の 199.1±37.1 mg/dl (n＝27) および女性の 184.9±36.9mg/dl (n＝17) の数値が求められ，危険率5％の水準において性差が認められた．

この男性の平均値は，甲田[7] や林[8] が報告している東京都の公務員などの平均値に匹敵するとともに，昭和48年度に行なわれた国民栄養調査の際に著者ら[9] が調べ

た，本土に居住する都民の男性348人（18～59歳）の推測統計的平均値 192.3±34.7mg/dl（n=333）との間に有意差は認められなかった．

以上のことは，荻野[6]が血清総コレステロール濃度は日本人でも地域間に差があり，測定法のちがいを考慮しても農村，漁村，山村地区で低く，都会地で高いのは住民の食習慣の差によって影響されているとみるべきであるとした点と相違している．また，石黒ら[10]が，漁村と山村地区住民の血清総コレステロール濃度の平均値は男女ともに漁村の住民が有意に高値であったと報告している平均値は，島民の平均値よりもやや低い水準であった．

さらに著者ら[11]が江東区にある都立東高校（A校）および三宅島の都立三宅高校（M校）の生徒の血清総コレステロール濃度を調べたところ，両校生徒のいずれの測定値もF分布における95%信頼範囲内に分散していた．このA校とM校の生徒の総コレステロール濃度の平均値を性別に算出したところ，男子生徒ではA校の 144.6±24.1mg/dl（n=54）およびM校の 145.5±20.7mg/dl（n=20）という結果が得られ，両校間に有意差は認められなかった．しかし，女子ではA校の167.4±19.4mg/dl（n=46）およびM校の 183.5±26.4mg/dl という数値が得られ，これらの平均値について Welch の差の検定を行なったところ，危険率5%の水準でM校生徒の方が有意に高いという結果であった．

これらのことと，血清中の総コレステロール濃度が疾病の状態や食習慣にもとづく脂肪摂取量と密接に関連するということと合せて考えると，島民に総コレステロールが変動するような疾病は特には認められず，食事による脂肪摂取状態も本土に居住する都民並であろうと推察される．しかし，農漁業を基幹生業にしている生活環境に居住する島民の男性と本土に居住する男性との間に有意差が認められなかったことは，血清総コレステロール濃度がネフローゼ症候群，糖尿病や甲状腺機能低下症あるいは胆道閉塞などに起因する反応として二次的に上昇することもあるので，島民の有病性についてくわしく調査する必要がある．またこの点については三宅高校の女子生徒の場合についても同様に，くわしく調べてみる必要性があると考える．

3. 総ビリルビン濃度およびトランスアミナーゼ活性

島民の総ビリルビン濃度の分布状態を性別に表わしたものを Fig. 3 に示す．

プロットの分布で明らかなように，その正常値とされている 0.2～0.8mg/dl よりも高い異常値の者は男性の方に9/28例認められたが，女性には発見されなかった．

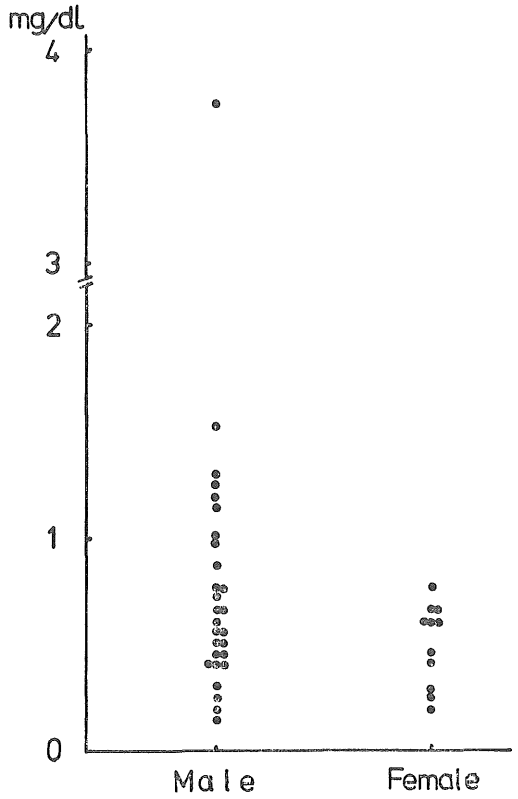


Fig. 3. Serum Levels of Total Bilirubin

また，異常値であったこれらの男性でも，総コレステロール濃度は正常もしくはやや高値を示す程度であり，胆道閉塞を疑わせるほどの関連性は認められなかった．さらに総ビリルビン濃度が異常値であるうえにトランスアミナーゼの活性値も異常であったものは5名だけであり，残りの4名は正常域であった．なお，総ビリルビン濃度が正常値であるのに，トランスアミナーゼ活性値が異常であった者は3名であった．これらトランスアミナーゼ活性異常値の出現率は，全体として9/48例（18.75%）であった．

4. 血清鉄値 島民の血清鉄分析値の分布状態を性別に表わしたものを Fig. 4 に示す．

一般に血清鉄の正常値域は男性の 90～140μg/dl および女性では 80～120μg/dl とされているが，島民でこれらの上限値よりも高い測定値は散布図が示すとおり，男性に4例が認められた．この異常高値を示した男性は，前項で記述した総ビリルビン濃度が異常値であった9例のなかに含まれていた．

なお，血清鉄値が高くなる疾病としては，溶血性貧血，再生不良性貧血，ビタミンB_6反応性貧血，肝実質

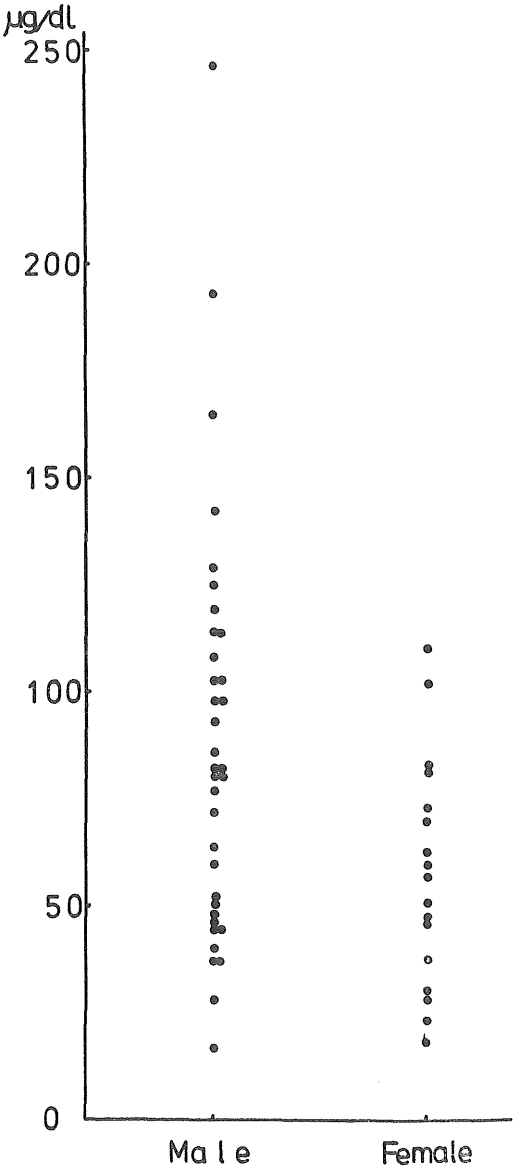


Fig. 4. Serum Levels of Total Iron

障害，ウイルス性肝炎などがあげられるが，鉄値，総ビリルビン濃度およびトランスアミナーゼ活性値（GOT, GPT）との関連性について検討したところ4例中2例がおのおの高値を示し，肝実質障害が疑われた．しかし，これら島民の正規の診断名は不明であり，あくまでも推測にすぎないことであるが，残り2名の高値を示した者のなかには，貧血性素因にもとづいて鉄剤の投与を受けている者もあることが考えられる．

また，男女共通の傾向としては，散布図が示すとおり，逆に正常値域の下限値よりも低値である異常値が多く認められ，その出現率は男性の57.1%，女性ではより高率の76.5%にも達している．このことは，診療所を訪れた島民が対象であったとしても，全体として63.5%にものぼるきわめて異常な現象として観察された．これらの異常低値の出現率は，高尾ら[12]が発表している一平地農村住民の貧血の集団検診で認めた血清鉄の異常値出現率（男性17.3%および女性28.7%）の2倍以上の高率であった．

血清鉄の値は日内および日差変動が著しいといわれているし[13]，低値即貧血と断定することはできないが，島民が貧血になりやすい危険な状態にあることを否定することはできない．また，島民の血清鉄値が低い傾向にあったことは，疾病に基因するのか，あるいは無機栄養素としての鉄分の摂取不足および吸収不良などによるのかの検討を行なう必要がある．

まず，血清鉄値が低下する疾病としては，鉄欠乏性貧血，真性多血症，感染症，ネフローゼ，膠原病，妊娠，下垂体および甲状腺の機能低下さらには肝機能障害などがあげられるが，いずれの疾病も血清の理化学的検査のみでは判定することができない．

また，無機栄養素としての鉄は，タンニン酸やリン酸と結合して水に不溶の化合物を作るために吸収が阻害されるし，脂肪の吸収障害に伴なっても鉄の吸収は阻害される．しかし，新鮮な野菜や果物に多く含まれているアスコルビン酸は，著明に鉄の吸収を増大するといわれている．

鉄欠乏性貧血は，鉄分の摂取不足はもちろんのことであるが，さらに摂取鉄分の吸収を増進させる成分を多く含んでいる新鮮な青果の摂取不足，あるいはタンニン酸やリン酸などの鉄の吸収を阻害する成分の過剰摂取などに起因する．よって島民の血清鉄値が低い傾向にあったことを，栄養面から改善するための調査および指導が必要であると考える．

ま と め

小笠原しょ島診療所を，昭和52年1月から昭和53年3月までの間に訪れた20歳以上の島民から採血分離された血清について，臨床生化学的検査を行ない，つぎのような成績を得た．

1. 血清総タンパク質濃度は，全ての被検者が正常範囲内であった．

2. 血清総コレステロール濃度の推測統計的平均値は，男性は 199.1±37.1mg/dl (n=27) であり，女性は 184.9±36.9 mg/dl (n=17) であった．なお，F分布における棄却検定 ($P<0.05$) に基づいて棄却された高値が，男性にただ1例だけあった．

3. 血清総ビリルビン濃度が異常に高値であった被検者は，男性のみに9例（32.1%）あった．

4. 血清トランスアミナーゼ活性値が異常であったものは8例（18.75%）であった．

5. 血清鉄値が異常に高かった被検者は男性に4例あり，このすべての者が総ビリルビン濃度も異常に高値であった．他方，血清鉄値は男女ともに異常低値を示す傾向があり，その出現率は全体として63.5%にも達するほどの異常な状態であった．

以上のことから，小笠原しょ島に居住する住民を対象として，溶血性素因の究明や貧血にかかわる検診体制の強化ならびに栄養指導などの必要性が考えられた．

（本研究の概要は東京都衛生局学会第60回大会1977年11月で発表した．）

文　献

1) 斉藤正行：光電比色計による臨床化学検査，改訂第3版，130頁，昭和27年，南山堂，東京
2) Zurkowski, P. : *Clin. Chem.*, **10**, 451, 1964
3) Malloy, H. J. and K. A. Evelyn : *J. Biol. Chem.*, **119**, 481, 1937
4) Reitman, S. and S. Frankel : *Amer. J. Clin. Path.*, **28**, 56, 1957
5) Beale, R. N., J. O. Bostrom, and R. F. Taylor : *J. Clin. Path.*, **14**, 488, 1961
6) 荻野耕一：日本臨床，血液・尿化学検査—その数値をどう読むか—，**364**，改訂4版，143頁，1973，日本臨床社，大阪
7) 甲田悌三：日本循環器誌，**23**，1065，1959
8) 林　康之，玄番昭夫，近藤弘司，石井　暢，外山良子，森田信行，木村英和：臨床病理，**10**，574，1962
9) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：未発表データ
10) 石黒弘三，中隈雅敬，牛沢　勇，山司　孝，木村武夫，渡辺　勇：宮城県衛生研究所報告，**45**，70．1966
11) 武士俣邦雄，霜田さと子：未発表データ
12) 高尾真奈，栗原洋子，柳沢文徳，桜井勝男，山崎幸江：日本公衛誌，**20**，204，1973
13) 刈米重夫：日本臨床，血液・尿化学検査—その数値をどう読むか—，**364**，改訂4版，143頁，1973，日本臨床社，大阪

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 298—298, 1978

PCT 汚染経路の解明（第5報）　人血液 PCT 濃度の家族別検討

深野駿一[*1], 道口正雄[*1], 西田甲子[*1], 溝口勲[*2]

Study on the Route of PCT Accumulation in Human Body (V)
Analysis of Variance on PCT Concentrations in Human Blood among Some Families

SHUNICHI FUKANO[*1], MASAO DOGUCHI[*1], KOKO NISHIDA[*1]
and ISAO MIZOGUCHI[*2]

緒　言

PCT (Polychlorinated Terphenyls) は PCB と類似化合物で，PCB と混合または単独で絶縁体，コーティング剤，ホットメルト接着剤等に使用され，その生産量は PCB の 1/20 (2700ton) といわれている．このようにわずかな生産量にかかわらず，都内で収集した人体脂中に PCB と同レベルで PCT が検出され[1]，以来一連の汚染経路の解明を行なってきた．現在までに人血[2,3]，日常食[4]，魚類等[5]を分析したが，PCB の汚染経路といわれている食事中からはほとんど PCT は検出されていない．これらの結果から，PCT による人体汚染の要因が家族環境にあることも考えられる．そこで今回は人血液を指標として家族別 PCT 汚染調査を行ない，分散分析により検討したので報告する．

試料および実験方法

試料　1976～'77年にかけて都近郊の7家族より採血した18検体を供試した．また同時期に生協職員より採血した検体に'73年以来調査し，すでに報告ずみ[2,3]のものを加えた計84検体（男57名，女27名）の分析値を統計処理し家族別蓄積量検討上の一助とした．

実験方法　分析法は先の報文[2]と同様の方法によった．すなわち試料をアルカリ分解し，ヘキサン抽出後，フロリジル-シリカゲルクリーンナップを行ない，ECD-ガスクロマトグラフにて PCT, PCB, DDE を定量した．

PCT の数値化はトータル・ピーク高法を採用し，PCB の数値化は DDE 以降のピークに対しては鵜川らの数値化法[6]を使用し，DDE 前に溶出するピークに対しては人血中の PCB と近似のパターンを示す KC500：KC600（2：1）の混合物を標準として相対比により数値化した．

結果および考察

1973年～'77年に採血した84検体について調査した PCT, PCB, DDE の最高値 (Max)，最低値 (Min)，算術平均 (Mean)，中位数 (Median)，標準偏差(SD)，変動係数（CV）および平均値の差の検定を表1に示した．平均値の差の検定は，F検定の結果分散に差があるため Welch-Aspin 法を採用した．

Table 1. PCT, PCB and DDE Residues in Human Blood (ppb)

	Age	PCT	PCB	DDE
n	84	84	84	84
Max	73	19.7	12.3	56.3
Min	15	0.37	0.42	0.36
Mean	33	4.02	2.87	9.76
Median	29	3.15	2.47	8.02
SD	11	3.29	1.76	7.72
CV	34	81.7	61.4	79.1

Welch-Aspin Test　*：$P<0.01$

PCT		$t_0=2.823$*	$t_0=6.229$*
PCB	$\phi=129$		$t_0=7.929$*
DDE	$\phi=112$	$\phi=91$	

[*1] 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
[*2] 同環境保健部環境衛生研究科

Table 2. Correlation Coefficients among 4 Items

Items	Age	PCT	PCB	DDE
Age		−0.295	0.410	0.382
PCT			−0.153	−0.144
PCB				0.813

Significance Level r=(82 : 0.01)=0.2799

従来の結果は検体数が少なく PCT, PCB 間に平均値の差がみいだされなかったが，今回統計量を増した結果，PCT：4.02ppb，PCB：2.87ppb と危険率1％で両者間に有意差があり，PCT が1.4倍高い値を示した．

なお人体脂中の PCB/PCT 比は都近郊の調査[3]（n=30）では，両者間に差はないが，皆川ら[7]による新潟県の分析例では，PCB の 1/3，西本ら[8]の高知県の調査では，1/10といずれも都内と比べ低い値を報告している．人血中の PCT 濃度のバラツキは PCB と比べ大きく，7ppb 以上は，PCT 15名に対し PCB 2名，1.0ppb 以下は PCT 12名に対し，PCB 1名であった．

性差は PCT, DDE は差がなく，PCB に関しては5％危険率で男性の方が有意であった．

3者間の相関は表2に示したように PCT, PCB 間に全く相関はなく，PCB, DDE 間に強い相関（r=0.813）がみられ，PCB 濃度の高い人ほど DDE 濃度が高い傾向がみられた．なお PCB, DDE については年齢にも相関がみられ，年齢の高い人ほど汚染が進行していた．しかし PCT に関しては相関は低いが（r=−0.295）逆に年齢の低い人ほど濃度が高い傾向がみられた．

このように PCT は，化学構造または用途については PCB と類似性がみられるものの，人体汚染に関しては異なった傾向を示している．また前述のように血中 PCT 濃度は個人差が大きい．これらの事実より各家庭の生活環境中に固有の PCT 汚染源があり，これを介して経口以外の皮膚または呼気を通じてとりこまれることも考えられる．もし固有の汚染源があれば各家族間の PCT 濃度にバラツキがあることが予測される．そこで家族間の PCT 濃度を調査し分散分析を試みた．

この結果，表3に示すとおり不偏分散比（F_0）は3.86で，家族間に危険率5％で差が認められた．なお，最近結婚したと思われる分散の大きいA家族を除くと F_0 は5.78で危険率1％で差が認められることとなる．また家族間の分散を示す主効果の平方和（S_A）は132.85，家族内の分散を示す誤差の平方和（S_E）は 63.05でおのおのの不偏分散（s），自由度（f）は表の通りである．なお

Table 3. Variance Analysis of PCT Levels (ppb) in 7 Families

Family	Age	PCT	Mean	SD
A	27	7.8		
	28	1.8	4.76	4.24
B	27	4.4		
	30	3.0	3.71	0.99
C	35	1.2		
	42	0.8	1.03	0.31
D	17	9.6		
	15	12.4		
	43	4.9	8.93	3.78
E	26	6.5		
	30	1.3		
	63	4.4	4.05	2.60
F	17	1.5		
	42	0.7		
	45	0.4	0.86	0.52
G	17	2.2		
	43	1.2		
	46	2.8	2.06	0.82

n=18 Mean=3.71 SD=3.30

S_A=132.85 f=6 s_A=22.14
S_E= 63.05 f=11 s_E= 5.73
F_0=3.863
$F_1^6(0.05)$=3.09
$F_1^6(0.01)$=5.07

Table 4. F_0 Values on Difference Test of Means among 7 Families

Family	A	B	C	D	E	F	G
A		0.19	2.42	3.74	0.10	3.17	1.53
B	—		1.26	5.82	0.02	1.70	0.57
C	—	—		13.24	1.91	0.01	0.22
D	—	5	1		6.37	17.26	12.56
E	—	—	—	5		2.65	1.03
F	—	—	—	1	—		0.37
G	—	—	—	1	—	—	

—：No Difference
5 and 1：Show more than 5 and 1% Significance Levels of Difference Respectively
$F_1^1(0.05)$=4.84 $F_1^1(0.01)$=9.65

家族全体（n=18）の PCT 濃度の平均値および分散は，前述の予備調査結果（n=84）と比べ，平均値，分散共に有意差がなく，調査対象家族は特殊集団とはいえない．

各家族間の母平均の差の検定を行なうと表4のとおり，D家族はA家族を除くどの家族とも有意差があり，その平均値は 8.93ppb ときわめて高い汚染レベルであった．PCB，DDE についても同様に分散分析を行なったが，不偏分散比はおのおの1.108，2.046で家族間に差は認められなかった．またA家族を除く6家族間で分析した結果についても同様，差は認められなかった．

今回分析した家族数は統計処理するには少なすぎたが，さらに調査件数を増し，濃度のきわめて高いD家族，きわめて低いF家族に相当する家庭を見いだし，高低2群の家族間に認められる差異を検討すれば，より正確な汚染源の究明が可能となろう．

結　論

現在までに分析した人の血液84例について統計処理した結果，PCT 汚染の特徴は，1. PCB と比べ有意で濃度が高い，2. 分散が大きい，3. PCB との相関は全く見られない，以上の3点であった．

この分散の大きい原因が各個人の家庭環境にあると仮定し，7家族18名の血中 PCT 濃度を調査し分散分析した結果5％危険率で家族間に有意差が認められた．なおPCB，DDEについては有意差は認められなかった．

日常食，魚類中に PCT がほとんど検出されていないことを考慮すると，今回得られた家族間分散分析の結果は，PCT 汚染経路が家庭環境中にあることを示唆するものであろう．

謝辞　統計計算およびコンピュータープログラム作成に当り種々御指導して下さった当研究所野牛弘所長，また採血に当り御協力いただいた東京大学医学部法医学教室高津光洋先生，および血液試料を提供して下さった日本生活協同組合連合会の有志の方々に深謝いたします．

（本研究は昭和52年度当研究所調査研究課題「環境汚染物質の点検に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1) Doguchi, M. and S. Fukao : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 157, 1974
2) Doguchi, M. and S. Fukano : *ibid.*, **13**, 57, 1975
3) Fukano, S. and M. Doguchi : *ibid.*, **17**, 613, 1977
4) Ushio, F. and M. Doguchi : *ibid.*, **17**, 707, 1977
5) 深野駿一，牛尾房雄，道口正雄：東京衛研年報，**25**，297，1974
6) 鵜川晶弘，中村彰夫，樫本　隆：食衛誌，**14**，415，1973
7) 皆川興栄，滝沢行雄，酒井　洋，篠川　至：日衛誌，**28**，543，1974
8) 西本孝男，上田雅彦，田植　栄，近沢紘史，西山保：医学のあゆみ，**87**，264，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 301—304, 1978

ガスクロマトグラフィーおよび質量分析計によるポリ塩化ナフタレン（PCN）の分析

森田昌敏*, 高橋保雄*, 三村秀一*

Gaschromatographic and Mass Spectorometric Characterization of Polychlorinated Naphthalene (PCN) Mixtures

MASATOSHI MORITA*, YASUO TAKAHASHI* and SHUICHI MIMURA*

緒　論

ポリ塩化ナフタレン（PCN）は戦前からかなり長期にわたって，木材防腐剤，電気絶縁油，防炎剤等に用いられてきた工業薬品である．その後，より低毒性のPCBが広く用いられるようになったためPCNの使用はすたれてきていた．最近PCBが広範囲な環境汚染物質として注目を集め，その使用が規制されるようになるにつれて，欧州諸国ではPCNの使用が復活しつつあるという[1]．わが国における使用実態はよくわかっていないが，環境分析についての2，3のレポートが報告されている[2-4]．PCNは生物による蓄積性が高く，また生分解性が悪いなど環境汚染物質としての性質はPCBと極めて類似している[3]．

環境残留性が高いということと同時に，PCNのかなり高い毒性にも注目する必要がある．PCNによる職業病としてペルナ病が有名であるし，実験動物に対する致死毒性やacnegenecity等についてもPCNはPCBよりも強い毒性を示す[5]．PCBをはじめとする有機塩素化合物において集積された毒物学の知識からは，平面性の高く且つある特定位置に塩素が結合したものが高い毒性をもつということが言えるが[6]，この点はPCNにもあてはまると考えられる．

PCNの環境毒性を考えるとき，どのようなPCNの異性体がどのようなレベルで存在するかも明らかにする必要がある[7]．しかしながら，この作業は，標準品とすべきPCNの個々の異性体の合成が極めて困難なため，現在の段階で個々の異性体について解析することは不可能である．暫定的なアプローチとしては，ガスクロマトグラフィーによって分離されたピークについて毒物学的，構造化学的，環境分析化学的characterizationを行なっていくことであろう．本研究は市販PCN混合物をガスクロマトグラフィーで分離し，分離されたピーク（単一成分ではないかも知れないが）について含有量を決定し，且つその電子捕獲型検出器（ECD）感度を比較することによりECD-ガスクロマトグラフィーによるPCN分析の基礎を提供しようというものである．

実　験

試薬　PCN混合物 Halowax キット（1000, 1001, 1031, 1099, 1013, 1014, 1057）をアナラボ社より購入した．

ガスクロマトグラフィー　島津 GC4BMPFE 型ガスクロマトグラフィーを用い，OV-1(2%) on Gaschrom Q (100/120) を担体としたガラスカラム (3mm×2m) で分析を行なった．水素炎イオン化検出器は，水素流量 50m*l*/min，空気流量 1.0*l*/min で操作した．EC検出器は^{63}Ni (10mCi) を用いた．

ガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS)　Shimadzu-LKB 9000 型 GC-MS を用いて，OV-1 の同じ充てん剤を用いて同径同長のガラスカラムで分析した．電子衝撃は 70eV で行なった．

結果と考察

市販PCN商品（Halowax シリーズ）をガスクロマトグラフィーにかけると，OV-1，2m のカラムを用いて28個のピークに分離することができる（図1）．カラム充てん剤としては，OV-1 を液相に用いたものがよく，やや極性のある Dexil 300 や OV-17 等はかえって分離が悪い．GC-MS を用いてこれらのピークの分析を行なった結果，塩素置換数が決定できた．ピークの数字名は2ケタの数字からなるが，最初の数字が塩素数を示す．

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

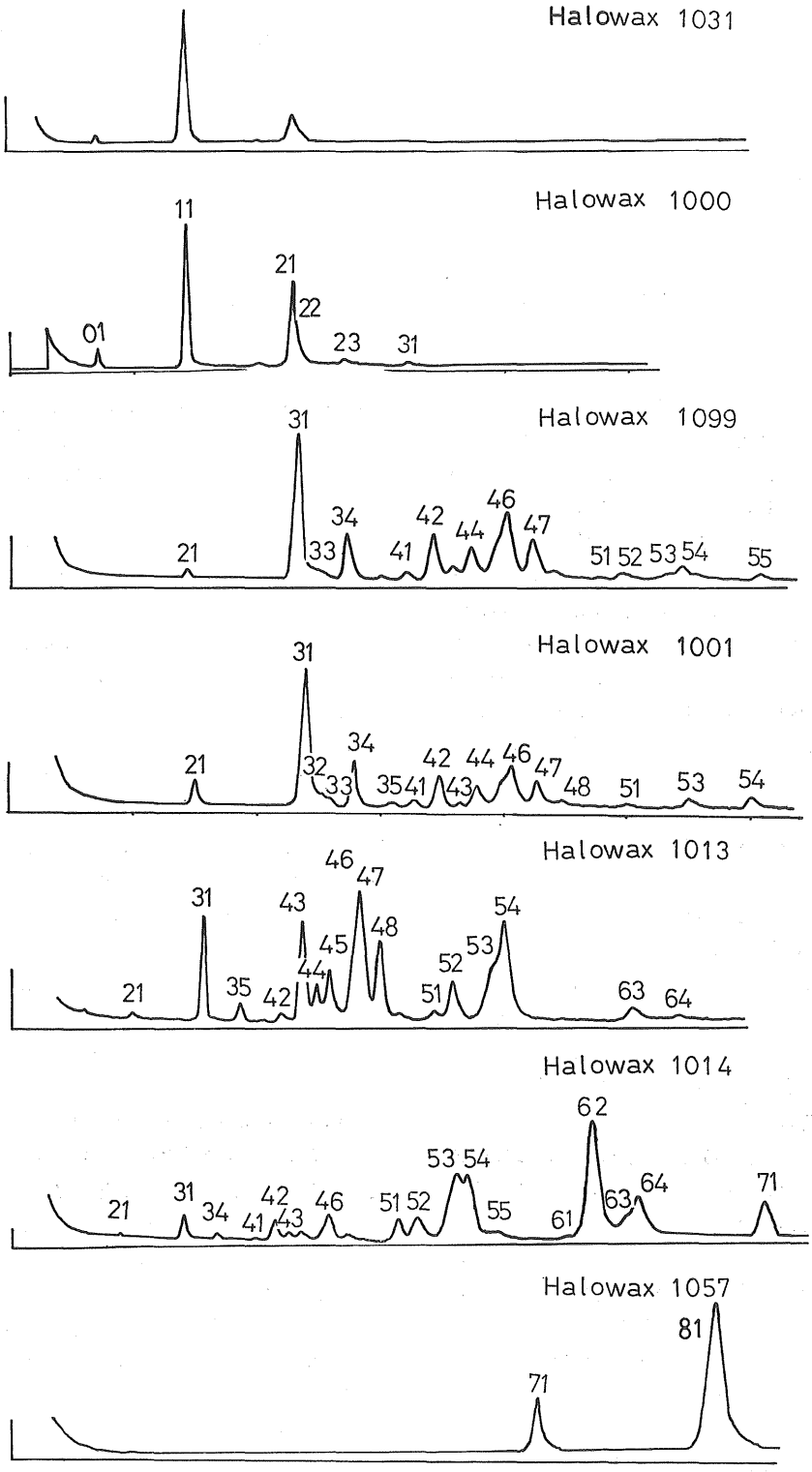


Fig. 1. Gaschromatograms of PCN Preparations (Halowax series) on OV-1 (2%). FID.

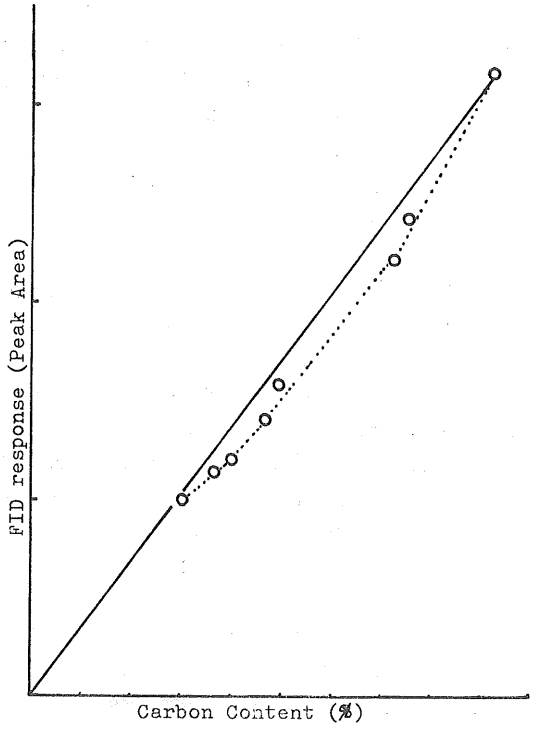


Fig. 2. Relationship between FID Sensitivity and Carbon Content in PCN Mixtures

水素炎イオン化検出器（FID）は同属化合物のあいだでは炭素含有量に比例した感度特性を示すことが知られている．例えば PCB の場合，塩素置換数が大きくなるほど単位重量あたりの炭素量は減少し，従って感度は低下する．このような感度特性が PCN の場合にもあてはまるかどうかをチェックするために，PCN 混合物を FID を用いて分析し，ピーク面積を求め，炭素含有量と共にグラフ上にプロットした(図2)．上記の仮説が PCN にもあてはまるとすれば，これらのプロットは直線を示すはずである．実際には中程度に塩素化された PCN は相対的に感度が低く，やや中だるみを呈するが，直線に近い点列を示している．本図より塩素数の異なる PCN 異性体の FID に対する相対感度を決定することができる．この相対感度を個々のピークにあてはめることにより，個々のピークの相当する含有量を決定することができる．結果を表1に示す．過去に報告されている異性体含有量比は単にガスクロマトグラム上の面積比から計算されており，検出器による異性体ごとの感度補正が行なわれていなかったが，今回の分析は FID 感度補正を加えたためより正確なものとなっているはずである．表2に各塩素数ごとの異性体成分比を Halowax シリーズについて示した．

Table 1. Percent Composition of PCN Isomers in Halowaxes

Peak	Halowax Series						
Number	1031	1000	1001	1099	1013	1014	1057
01	1.0	2.2					
11	87.9	48.7					
12	5.5	2.4					
21	5.3	38.4	1.3	1.4	0.2		
22		8.5					
31			39.6	28.4	10.4	2.4	
32			2.1	3.1	0.7	0.5	
33							
34			10.0	6.8	1.6	0.1	
35			0.7	0.8			
41			0.7				
42			4.7	6.1	0.3	2.2	
43			0.9	1.1	9.7	1.1	
44			2.2	3.7	2.6	1.0	
45			11.9	17.5	3.5	3.4	
46					18.1		
47			5.1	7.0	9.9	1.1	
51			0.4	1.5	1.0	2.9	
52			0.4	1.1	3.0	3.5	
53			1.0	3.6	17.8	26.6	
54							
55							
61						0.5	
62					2.1	23.6	
63						0.8	
64					0.7	9.3	
71						5.5	16.7
81							83.3

Table 2. Percent Composition of PCN Preparation (Halowax)

	1031	1000	1001	1099	1013	1014	1057
Naphthalene	1	1					
Cl-1	94	51					
Cl-2	5	48	4	2		1	
Cl-3			63	48		3	
Cl-4			30	43		10	
Cl-5			2	7		42	
Cl-6						38	
Cl-7						7	17
Cl-8							83
Cl content*							
Cl content**	22	26	50	52		62	70

Table 3. Relative Sensitivity of PCN Isomers on Electron Capture Detector

Peak No.	k	Peak No.	k
11	3	45, 46	187
21	10	47	150
22	12	51	140
31	49	52	217
32, 33	50	53, 54	67
34	195	61	300
35	175	62	135
42	206	63	263
43	136	64	181
44	150	71	254
		81	180

電子捕獲型検出器（ECD）は置換している塩素の数と位置の両方に極めて敏感であることが知られている．同一試料を ECD で測定したときのピーク毎の相対感度を表3に示す．塩素置換数が増加するとともに感度は増加するが，塩素数4位で大体一定の捕獲断面積をもつようである．

ECD を用いて PCN を定量するときは，以下のように計算すればよい．適当な標品（$x$ng）を注入し，各ピークの面積（Si）を求める．標品中の各ピークの含有量（Ci）は表3より求められる．各ピーク相当物質あたりの ECD 感受性 ki は次式のようになる．

$$ki=Si/x\cdot Ci$$

表3にあげてあるのはこのような ki の例である．試料を注入し，クロマトグラム上に描かれたピーク面積を A_1 とすると，PCN の総量 $y$ng は

$$y=\sum A_i/k_i$$

で表わされる．本法は PCB 計算に用いられる Ugawa 等の方法と同じ方法である．

（本研究は昭和52年度当研究所調査研究課題「環境汚染の総点検」として実施したものである．）

文　献

1) Kimbrough, R. D. : Private Communication
2) 皆川興栄，滝沢行雄，戸田芳徳，北嶋哲彦：公害と対策，12 (3)，300 1976および，12 (7)，783, 1976
3) 竹下隆三，高畠英伍，吉田　博：環境汚染とそのトキシコロジーシンポジウム，1977年10月
4) 高橋保雄，森田昌敏，三村秀一：日本公衆衛生学会 1977年10月
5) Hofmann, H. Th. : *Neuere Erfahrungen mit hochtoxischen Chlorkohlenwassenstoffen, Arch. exp. Path. Pharmak*, 232, 228, 1958
6) Poland, A. and R. Glover : *Molecular Pharm.* 13, 924, 1977
7) Beland, F. A. and D. Geer Richard : *J. Chromatogr.*, 84, 59, 1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 305—310, 1978

大気汚染物質の年平均濃度分布のコンピュータ解析

牧 野 国 義*

Computer Analysis for Annual Mean Concentration Distribution in Air Pollutants

KUNIYOSHI MAKINO*

The interpolation of mean concentration of air pollutants was made by the use of a computer on the basis of the concentrations of the pollutants monitored at 49 stations in Tokyo, during the period from 1972 through 1976. In this study, the area of Tokyo was divided into about 2,800 areas of 1×2 km meshes. The pollutants subjected for the interpolation were sulfur dioxide, nitrogen dioxide, oxidant and suspended particulate matter, and computed by a weighted averaging method with factors of distance from monitoring stations and wind direction. When distribution of the interpolated concentrations of the pollutants was displayed, it was found that mean concentration of sulfur dioxide was decreased throughout 5 years period with exception at Tama area, while nitrogen dioxide was increased at neighboring areas of downtown.

In addition, areas where maximum oxidant was displayed were located in western suburbs. Validity of these interpolations was comfirmed by a goodness of fit test and a correlation and a regression analyses. It was indicated that the interpolation on sulfur dioxide was the precisest.

緒　　言

個々の汚染物質の規制や総量規制などの環境行政の施策によって，あるいは不況のため産業活動が不活発化したこともあって一時ほどの大気汚染の深刻さは減少したものの，大気汚染は都市に不可避のものであるとさえ考えられるようになった．その間大気汚染の防止対策が図られ，監視体制が整備されるなどの施策が行なわれるとともに大気汚染の状況，発生機序，予測から影響に至るまでの各種の調査および研究が行なわれてきた．汚染状況把握の基礎資料としては監視地域にめぐらされたいくつかの観測点のポイントサンプル値によりその周辺地域を代表させている．しかしこの値がどれほどの地域を代表し得るかは多くの研究者の疑問視するところで，I. F. Goldstein らはニューヨークについて調査し，注意を促している[1]．ましてわが国は地形や気流の変化の激しい地域が多く，大気汚染物質のように局所性の強い物質の分布をポイントサンプル値で広汎な地域を代表させて表わすことは危険である．この欠点を是正するため対象地域の空間分布を推定する方法が考えられ，その一つとして筆者は一昨年の年報に東京都区内の大気汚染物質分布をコンピュータを利用して推定し図示した[2]．これによってオキシダント高濃度域の時間的変動などを視覚的に把握することができたが，ここで推定方法とした平面方程式は対象地域の場所により誤差の大きくなることがあることや計算時間が比較的長いことなどの欠点があった．現在数種の推定方法が提案され，検討されている．大別すると任意の点と観測点との距離を指数関数で表わしたり距離の逆数を2乗してこれを重み係数とし各観測点からの影響の和をとる荷重平均法[3-6]，最も古くから行なわれている多項式による補間法[7,8]（ただしこの方法では異常な極値を生じることがあると言われ，また計算にかなりの時間を要することが予想されるので批判が多い），また対象地域を覆う弾性板を考え，これに微小変位を与えたときに生じる歪と伸びのエネルギーを最小にするスプライン法がある[9-11]．さらにパフモデルによる拡散方程式を解き，時間経過で重ね合わせて年平均

* 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

濃度分布を計算した報告もある[12]．これらの報告のほとんどが1時間値の分布を示したもので，生体影響と関連が深い汚染物質の累積効果を大気汚染負荷量として考えると長期間の平均濃度を把握することが必要である．また分析精度が高いだけでなく，実用面から簡便で計算時間の短い方法が望まれる．本報ではこれらを考慮して比較的計算時間が短い荷重平均法を用いて，東京における亜硫酸ガス3，二酸化窒素，オキシダント，浮遊微粒子の年平均濃度分布を，そしてさらに数年間の平均濃度分布をもコンピュータを利用して求めた．

方　法

1. 調査項目

ここで分析に供した資料は全部で9種類で，うち亜硫酸ガス3，二酸化窒素，オキシダント 浮遊微粒子各2である．亜硫酸ガスについては昭和51年，昭和49年から51年までの3年，昭和47年から51年までの5年，二酸化窒素については同様に1年と3年，オキシダントと浮遊微粒子については昭和51年と昭和50年から51年までの2年の各々平均濃度を調査した．観測点の数は項目により異なり，亜硫酸ガスでは上記の順で49，49，43，以下同様に二酸化窒素では46，45，オキシダントでは44，28，浮遊微粒子では44，33である．これらの資料は主として公害局発行の大気汚染常時測定室測定結果報告によるが，観測点の数を増やすため市や区独自で行なった観測結果も加える．濃度順位を10段階に分け，その境界となる9点を Table 1 に示す．年平均値に関する毒性学的または疫学的な資料を得ていないので各レベル間隔に明らかな意味はなく，この分類は便宜的過渡的であるが分布の表現に特に支障ないと思われる．

2. 推定方法

1) 地形と観測点との関係

東京都は東西に90キロメートル，南北に44キロメートルの矩形の中にその全体を入れることができ，北西から南東へ延びる細長い形状を示し，北西端は雲取山，小雲取山が位置し，南東端は東京湾に接している．東京を地域の特徴で東西に三分すると，東部は23区の地域で商工業地域，中部は衛星都市が連らなる住宅地域，西部は山間部が主となり林野地域と概記することができる．23区（東部地域）では観測点が密であるが，中部地域ではやや疎になり，西部地域ではかなり疎になる．最西部の観測点は五日市で最西端より約26キロメートルの位置にあり，ここから西側の地域における推定は東側の観測点のみで外挿することになる．また五日市より3キロメートルほど西側の南北線上に高水山，雷電山，勝峰山，根尾山，景信山が不連続に並び，その線より少し西に高尾山があるが，この線が東京都にある山としては最も東になり，以西では山岳地域が多くなる．したがってこの線以西の大気汚染は低いと考えられ，東側の観測点の値から外挿すると実際よりも高濃度になると推察されるので減少係数をかける必要がある．$C_1=C_0\exp(-ad)$ より減少係数を $C_0/C_1=2$ として求めると（ここで C_1 を最西端での濃度，C_0 を前記の線上における濃度とする．その距離 d は22.7である），a は0.0305となった．

2) 計算方法

荷重平均法はある地域内の観測点の実測値に各々重みを加えて和をとる方法で，一般に次式で表わされる．$C(x, y)=\sum W_iC_i(x_i, y_i)$ ここで i は i 番目の観測点，W_i はその重み係数，$C(x, y)$ はその地域をメッシュに分け座標化したとき，任意のある点 (x, y) における濃度を示す．(x_i, y_i) は i 番目の観測点の座標である．重み係数は一般に任意の点と観測点との距離の関数として表わされる．大気拡散は距離により指数関数で表わされるところから Egmond らは重み係数をその観測点からの減衰式 $\exp(-d_i/L)$ と各観測点からの減衰式の総和との比として与えている[4]．また大気拡散において風向風速は重要な要素であるが，長期間平均濃度の空間分布を推定する場合には補正要素として風向頻度を考慮するに留める方が繁雑さを避ける上でも適当であると考えられる．以上より推定方法として次式を仮定した．

$$C=\frac{\sum C_if_i\exp(-d_i/L)}{\sum f_i\exp(-d_i/L)}$$

ここで d_i は任意の点と観測点との距離，Lは減衰係数を示す．f_i は風向頻度を表わし，8方位で同方向と考えられる場合の全体との分率で与える．対象地域として大滝らは50～60キロメートル四方とし，減衰係数を20～25としているが[5]，年平均値を使用する場合に遠距離ではこれよりも寄与度が減少するので，対象地域を半径10キロメートル，ただし観測点の数が最低3入るようにし，減衰係数を5とした．なお1×2キロメッシュで座標化したところ東京は約2,800に分割された．

3. 検証方法

推定方法が妥当であるかを以下のようにして検討する．各観測点についてその値を計算により求め，実測値と推定値を比較対照する．適合度検定および相関，回帰分析をその検証方法とする．ただし実測値の最大最小値を推定により求めることは困難であるので回帰分析では両極値を除外する．

結果および考察

亜硫酸ガス，二酸化窒素，オキシダント，浮遊微粒子について1年および数年の平均濃度分布を求め，コンピ

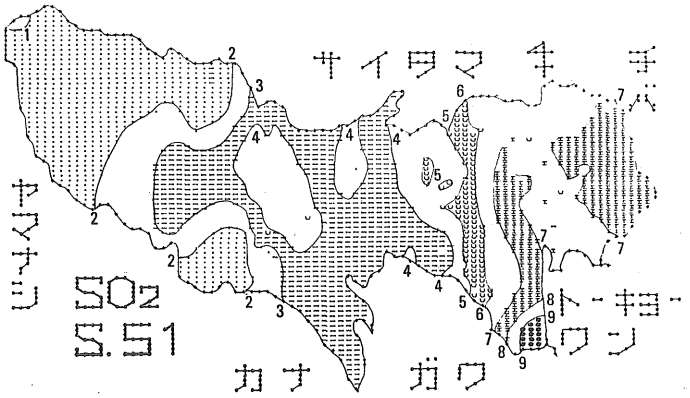


Photo 1. Sulfur Dioxide (1976)

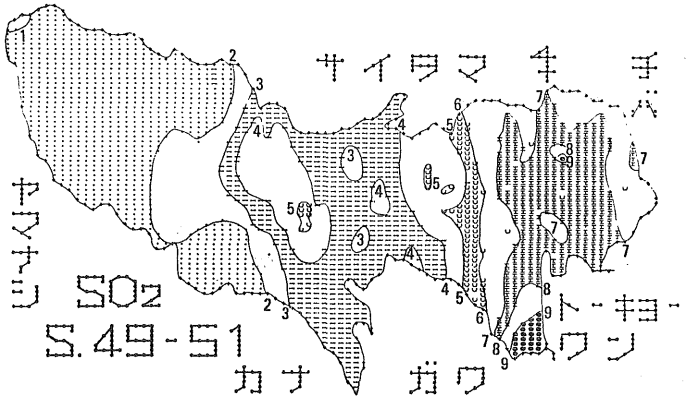


Photo 2. Sulfur Dioxide (1974-1976)

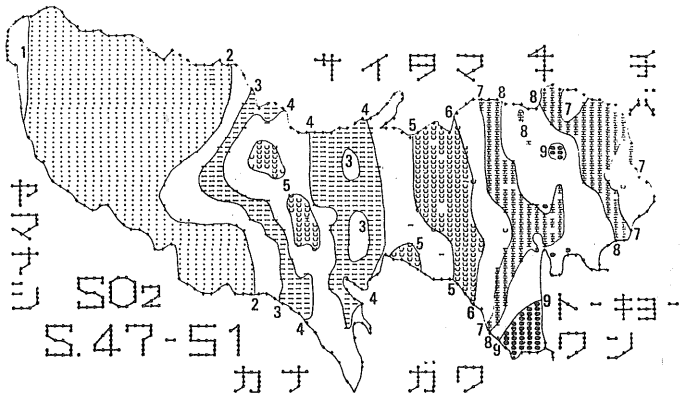


Photo 3. Sulfur Dioxide (1972-1976)

ューターで表示した結果を Photo 1 から 9 に示した．写真中の数字は Table 1 の濃度レベルを示す．亜硫酸ガスでは大田区内で最大となり，都心より都下へ減少の傾向を示したが，立川，日野付近に小さなピークを生じた．また昭和47年から51年にかけて全体に減少傾向であった．昭和48年の環境庁報告では亜硫酸ガス24時間平均4pphm，1時間平均 10pphmの環境基準値以下であれば年平均値は高々1.5pphmであるとしている[13]．昭和51年の結果 (Photo 1) では23区ほぼ全域にわたり1.5pphm以上であった．二酸化窒素，オキシダント，浮遊微粒子はその発生源が亜硫酸ガスと異なり広汎な地域におよぶと考えられるので局所性が高く，推定法が適切であるか問題がある．しかし二酸化窒素では Photo 4，5 で昭和49年から51年の全体傾向を概観すれば都心からやや離れた地域で増大し興味深い結果を示した．オキシダントは都心よりも郊外に最大値を示す地域があり，さらに昭

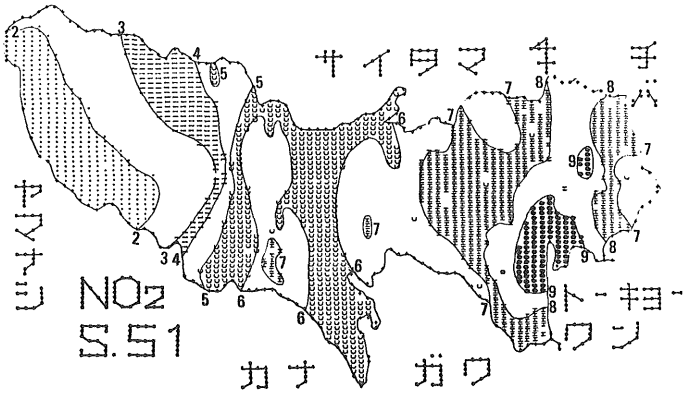


Photo 4. Nitric Dioxide (1976)

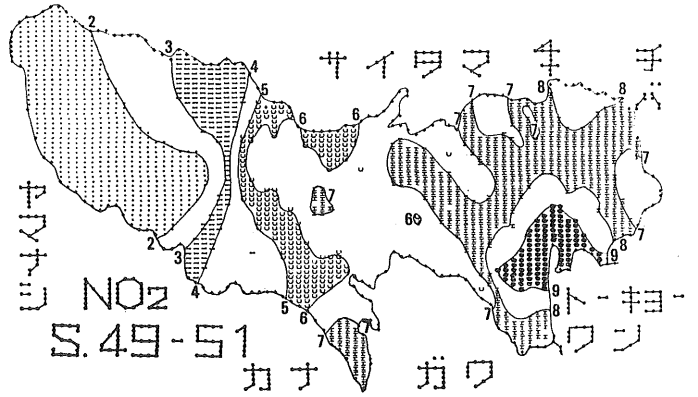


Photo 5. Nitric Dioxide (1974-1976)

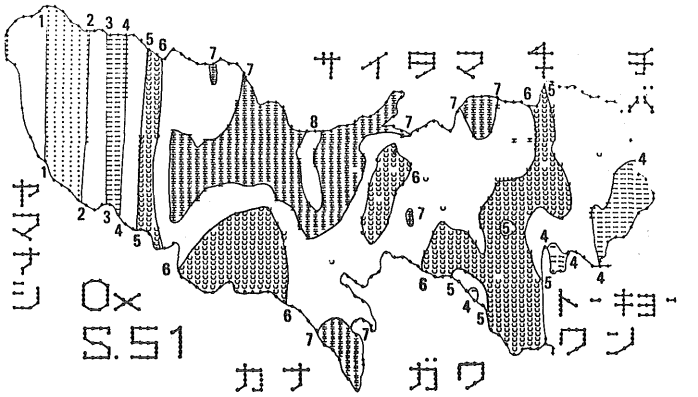


Photo 6. Oxidant (1976)

Table 1. Concentration Levels of Air Pollutants in Photographs

Air Pol.	Concentration Level 1	2	3	4	5	6	7	8	9
SO_2 (pphm)	0.50	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75
NO_2 (pphm)	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00	4.50
Ox (pphm)	3.00	3.20	3.40	3.60	3.80	4.00	4.20	4.40	4.60
SPM($\mu g/m^3$)	40	45	50	55	60	65	70	75	80

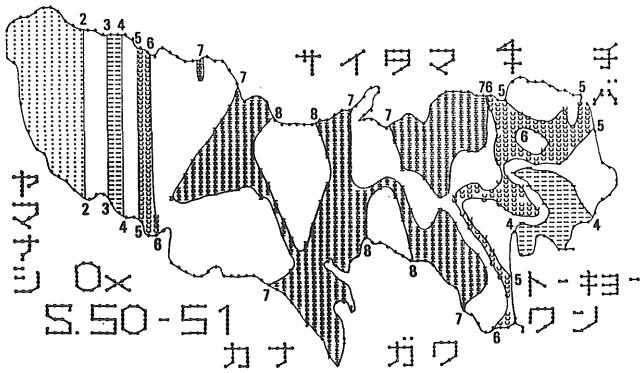


Photo 7. Oxidant (1975-1976)

Photo 8. Suspended Particulate Matter (1976)

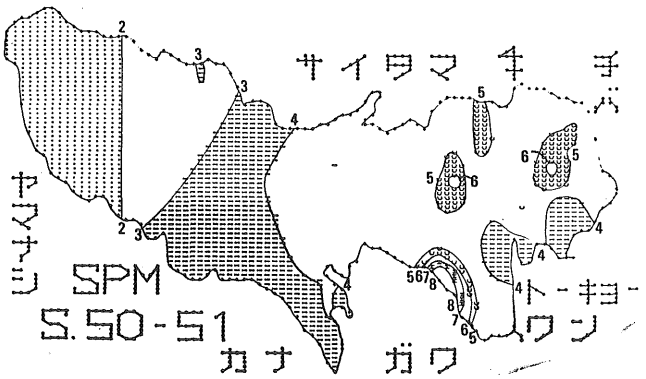


Photo 9. Suspended Particulate Matter (1975-1976)

和51年は前年よりも減少傾向にあり，これは光化学スモッグの発生回数の減少からも確認されている．浮遊微粒子の発塵源は天然（風による砂塵，埃）と人工（煤煙など）の二種類あり，未舗装道路面積や煤煙発生施設数が関連すると思われるが，観測点付近に土砂が放置された場合があれば顕著に影響する．世田谷区に急激なピークが存在するが (Photo 8, 9)，その原因は明らかでなく，その観測点付近に余り拡散しない発塵源があるのかもしれない．以上四種の大気汚染物質について年平均濃度分布の特徴を述べたが，複合汚染指標や，住民影響量[14]や暴露人口に対する汚染負荷[3] などの人体影響を考慮した汚染指標についても今後検討する必要があろう．

次に Photo 1 から 9 で示した結果の妥当性を検証するため，χ^2 値を用いた適合度検定と相関，回帰分析を行ない Table 2 に示した．その下に自由度30，危険率95，99パーセントの χ^2 値を示したが，全てこれより小

Table 2. Correlation Analysis between Observed Value and Calculated One and Test of Goodness of Fit

Pollutant	r	a_1	a_0	χ^2
SO_2 '76	.715***	.782	.431	5.55
'74—'76	.742***	.757	.494	5.32
'72—'76	.758***	.758	.575	5.37
NO_2 '76	.606***	.523	1.87	11.0
'74—'76	.516***	.657	1.34	11.1
Ox '76	.442* *	.365	2.51	1.05
'75—'76	.596* *	.767	.935	0.810
SPM '76	.347 *	.356	4.37	9.78
'75—'76	.343	.589	2.90	4.91

Regression Equation $y=a_1x+a_0$
***：$p<0.001$, * *：$p<0.01$, *：$p<0.05$
$\chi^2(30, 0.95)=18.49$, $\chi^2(30, 0.99)=14.95$

さく，実測値と推定値に差がないことを示した．オキシダントの χ^2 値が他よりも小さいのは実測値の最大と最小の幅が小さい（1.4pphm）ことにもよると思われる．相関分析結果では亜硫酸ガスの相関が最も高い有意性を示した．次いで二酸化窒素，オキシダント，浮遊微粒子の順となった．回帰分析では勾配が最も1に近い値を示したのは亜硫酸ガスであった．オキシダントは上下幅が小さいため相関分析，回帰分析ともに1年平均と2年平均とでかなりの差を生じた．以上より年平均濃度分布を表示することができる最も妥当な大気汚染物質は亜硫酸ガスで，二酸化窒素とオキシダントも精度の低下は考えられるが充分妥当であり，浮遊微粒子はこれに次いだ．しかし著者らが示した降下煤塵の濃度分布[15]とはかなり異なっており，その理由の解釈や粒子径と拡散性との問題など詳細な検討が必要と思われる．

総　括

大気汚染物質の空間分布の推定は近年コンピュータの普及で多くの研究者により研究され，数種の推定方法が提案されるようになった．その多くは時間値の分布を追求するもので，生体影響は長期間の大気汚染物質の累積効果と深い関連を有するので長期間平均濃度分布を把握することが生体影響研究上重要である．著者は実用性を考慮し，風向を加味した荷重平均法によりコンピュータを利用して亜硫酸ガス，二酸化窒素，オキシダント，浮遊微粒子の1年および数年の平均濃度分布を求めた．

亜硫酸ガスでは昭和47年から51年へ全体として減少傾向であることが推察された．二酸化窒素では昭和49年から51年へ都心から少し離れた地域で増大傾向を示した．オキシダントでは郊外に最大値を示す地域があり，浮遊微粒子では一部に急激なピークが存在した．

推定方法が妥当であるかを適合度検定および相関，回帰分析により検証した．適合度検定では全て危険率1パーセント以下の有意性を示した．相関分析では亜硫酸ガスが最も有意性が高く，以下二酸化窒素，オキシダント，浮遊微粒子の順であった．回帰分析で推定値と実測値の近さを示す勾配が最も1に近い値を示したのは亜硫酸ガスであった．これらの結果から本報の推定方法は亜硫酸ガスで最も妥当性が高く，二酸化窒素，オキシダントについても妥当であることが示された．

文　献

1) Goldstein, I. F. and L. Landvitz: *Atmospheric Environment*, 11, 53, 1977
2) 牧野国義：東京衛研年報，27-1，287，1976
3) Horie, Y., A. C. Stern, and N. H. Frank: *EPA Report*, 450-3, 1, 1976
4) Egmond, N. D. and O. Tissing: Proc. of *The 4th Clean Air Congress*, 658, 1977, Tokyo
5) 大滝　厚，塩沢清茂：昭和52年度文部省科学研究報告，1978
6) Iikura, Y., Y. Yasuoka, and M. Naito: *International Federation of Automatic Control*, 389, 1977, Environmental Systems Planning Symposium, Kyoto
7) Gilchrist, B. and G. P. Cressman: *Tellus*, 6, 309, 1954
8) 橋本博明，若狭喜作：第18回大気汚染研究全国協議会講演要旨集，413，1977，福岡
9) 大西行雄：日海誌，31，259，1975
10) 日野幹雄：東京工業大学土木工学科研究報告，1975
11) 松本幸雄，藤原正弘，大森高志，姫野純子：第18回大気汚染研究全国協議会講演要旨集，89，1977，福岡
12) 林　正康，田渕修二：公害，13，118，1978
13) 環境庁大気保全局：環境保健レポート，22，457，1973
14) Finzi, G., G. Frorza, S. Rinaldi, and P. Zannetti: *International Federation of Automatic Control*, 403, 1977, Environmental Systems Planning Symposium, Kyoto
15) 牧野国義，佐藤泰仁，狩野文雄，大沢誠喜，福田雅夫，溝口　勲：大気汚染研究，10，599，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 311—317, 1978

大気汚染物質と急性自覚症状との関連性（第4報）　複合指標と個人特性

牧野国義*, 溝口　勲*, 沖野哲郎**
山本幹夫**, 長崎　護***

Relation between Air Pollutants and Acute Subjective Symptoms (IV) Combined Indices and Personal Properties

KUNIYOSHI MAKINO*, ISAO MIZOGUCHI*, TETSURO OKINO**,
MIKIO YAMAMOTO** and MAMORU NAGASAKI***

During the period from May through July in 1977, daily incidences of 19 symptoms complained by 139 senior high school students in Tokyo were surveyed. Combined air pollution indices and relationship of individual personality by Yatabe-Gilford personal inventory (YG test) with air pollution were analyzed with statistical methods in order to evaluate the acute effect of air pollution on the human health. In this survey, incidences of the symptoms were classified into 10 levels and 9 indices of the air pollution were classified into 5 levels, such as "good", "moderate", "unhealthful", "very unhealthful" and "hazardous". The results obtained through the applied classification procedure were well represented the effect of the air pollution. In addition to these studies, the statistical analyses were made on the 5 classes of personality characterized by the result of YG test. The incidences of symptoms were high in B type students, while it was low in C and E types as a whole. As a result of a correlation analysis between 17 symptoms and 12 factors in YG test, lack of agreeableness which is one of the factors had significant correlation with 7 symptoms. In the distribution of principal components, 2 groups were formed. One was 7 factors in YG test. The other was 4 factors and 17 symptoms.

緒　言

昭和50年度より3年度にわたり，日体荏原高校生徒を対象として主として夏季の光化学スモッグによる人体影響を検討するためのアンケート調査を行なった．過去2年間の研究の結果いくつかの知見が得られたのでこれらについては研究所年報27-1[1,2]，28-1[3]に報告した．第1報では主として大気汚染物質と急性自覚症状の基礎的特性や相互の関連性を検討した．第2報では多変量解析により複雑に絡み合う大気汚染物質と急性自覚症状とを巨視的な視点から検討した．第3報では主として自覚症状に注目してその訴症の特徴や自覚症状の季節性などを検討した．これらにより多くの成果が得られたがなお未解決の問題も少なくない．その理由の一つとして当該調査では種々の制約条件のあることが挙げられる．例えば調査対象数や調査期間の制約，そして昭和51年度調査では大気汚染の程度そのものが低かったことのように不可抗力として調査の精度を低下させる要因が存在することである．また自覚症状調査は調査対象の主観に依存するので心理的影響が強く，これは調査対象の性格とも関連すると思われるが明らかにされていない．さらに未解決の問題の一つとして複合大気汚染の具体的なレベルとその効果の問題がある．今回の調査では以上を考慮して調査対象の性格に関係した自覚症状訴症の特徴を検討するとともに複合大気汚染指標による大気汚染レベルの分類を

* 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
**帝京大学医学部公衆衛生学教室
***東京都衛生局医療福祉部公害保健課

行ない，その効果の吟味を主眼に分析した．

方　法

1. 調査方法

調査期間は昭和52年4月28日より7月11日までの日曜日，祝日を除いた60日間である．ただし調査初期における訴症の増大や学期末試験による影響を考慮し，5月7日より6月30日までの47日間のデータを分析に用いた．調査対象は前調査同様日体荏原高校男子1，2年生139人である．

同一項目を日変化で一定期間アンケート調査を行なう方法として昭和50年度の調査で実施した毎日アンケート用紙を配布し，記入後回収する日めくり法[1]と昭和51年度の調査で実施した一枚のアンケート用紙に数日間分を掲載する日誌法[3]とがある．前者は有訴率が高くなる傾向があるが日変化による変動が小さいので短期間の調査に適し，後者は調査初期および用紙記入初期に有訴率が高く出る傾向があるので適宜データ削除が可能な長期間の調査に適している．なお短期間の調査でも補正することによりこの方法を採ることができる場合がある[3]．60日間の調査では長期間と言えず，昭和52年度調査では日めくり法を採用した．

大気汚染物質と気象要素（以下環境要素と略す）の調査として前調査同様日体荏原高校屋上に設置された測定室の資料を使用した．測定項目はオキシダント，オゾン，亜硫酸ガス，窒素酸化物（一酸化窒素，二酸化窒素），炭化水素，一酸化炭素，浮遊微粒子，風向風速，紫外線量，温度，湿度である．

心理的影響を調査対象の性格の面から把握するため矢田部 -Gilford の性格テスト(以下ＹＧテストと略す)を実施した．ＹＧテストは性格調査の最も一般的な方法で120の設問からなり，はい，いいえ，どちらでもないの三種の答が用意されている．小分類として12の特性（以下ＹＧ特性と記す）に分けられ，抑うつ性，回帰的傾向，劣等感の強さ，神経質さ，主観性，利己的，愛想の悪さ，一般的活動性，呑気さ，支配性，社会的外向の程度が各10問で採点され，その程度により5種のタイプに総合分類される．A型は Average を意味し，平均的タイプである．B型は Black list を意味し，積極性はあるが暴走し易い不安定さを併せ持つ．C型は Calm を意味し，安定さはあるが消極的で，B型と逆のタイプである．D型は Director を意味し，安定性と積極性を兼備したタイプである．E型は Eccentric を意味し，D型とは逆に不安定で消極的なタイプである．ＹＧテストがこの種の調査に利用された例[4,5]も若干見られるようになった．

2. 分析方法

分析手法は主に統計的手法による．大気汚染物質間，自覚症状間そして大気汚染物質と自覚症状との関連性を相関分析により検討する．相関係数を求める場合2変量が概ね正規分布形であることが条件であるが，この資料では対象数が少ないため正規化のため対数をとると低有訴率での変動幅が大きくなり，誤差の割合が大きくなるので，実際には無意味に数値の差を拡げることになるためデータ変換を行なわない．またＹＧテストによるタイプの分類により，各自覚症状平均有訴率が各タイプと全体とで差があるかを平均値の差の検定（t 検定）により検討する．自覚症状のうち眼，呼吸器，全体症状として特徴あるものを各2症状ずつ選び，この2症状間の相関をタイプをパラメータに検討する．またタイプ間に分散の差があるかを二元配置の分散分析により検討する．さらにＹＧテストは12特性からなり，各特性の点が得られるので，これと個人別の自覚症状有訴率との相関分析を行なう．また以上で得られた相関分析結果より主成分分析を行ない，因子全体の関係を検討する．

結果および考察

1. 大気汚染の状況

各物質の最高1時間値はオキシダント 12.6，オゾン 12.4，亜硫酸ガス 3.7，一酸化窒素 12.8，二酸化窒素 10.0（以上単位 pphm），炭化水素 8.0，一酸化炭素 2.9（以上ppm），浮遊微粒子 123（$\mu g/m^3$）で，最大風速は 9.0（m/sec），最高温度28.8(°)であった．ここで最も注目されるのは亜硫酸ガスが24時間平均の環境基準値 4pphm[6] を1時間も越えなかったことで，亜硫酸ガスに関する限り調査期間中はクリーンであったと言えよう．またオキシダントの最高値はこの季節ではそれほど高いといえないが 10pphm を越えた日は11日（期間の 23.4 パーセント）あった．因みに昭和50年度調査期間中には同じく 8 日（期間の27.6パーセント）でほぼ同等であったが，このとき最高値は 24.0pphm に達した．またこの期間では亜硫酸ガスの最高値は 7.6pphm であった．

2. 自覚症状の訴症

自覚症状の原因を大別すると，病気や怪我によるもの，大気汚染によるもの，心理的圧迫など精神過重によるものなどとなる．これらは必ずしも単独でなく重なっている場合も考えられる．病気のうちで最も自覚症状に影響し易いと考えられるのは風邪であるが，全期間平均して約 1/5 が毎日風邪をひいていると答えた．各症状有訴率と調査開始からの日数との相関係数を求め，有意性の高い症状から並べると，①風邪，②咳，③痰，④のどの痛み，⑤くしゃみ，⑥声がかれるが上位で17症状のうち11

症状について危険率5パーセントで有意であった．この上位6症状はいずれも風邪またはその影響の強い症状であり，したがって以下の分析には風邪をひいていない場合のデータのみを使用した．

3. 環境要素，自覚症状の相関分析

環境要素間，環境要素と自覚症状および自覚症状間の相関分析を行なったが，特筆すべき結果が得られなかったので，ここではその特徴を述べるに留める．環境要素間ではオキシダントが当然のごとくオゾンと最も高い相関を示し，その他温度，紫外線量とも高い相関，湿度と高い負相関を示した．オゾンを除きいずれも気象要素で天候の影響が大きいと考えられる．最も多くの因子と高い相関を示したのは湿度でいずれとも負相関を示した．環境要素と自覚症状との相関では湿度が眼の痛みと高い負相関を示した．天候の影響が大きいことから眼の渇きや埃との関係が推察される．しかし眼の痛みはオキシダントとは有意な相関がなく，のどの痛みや息苦しいという光化学スモッグの代表的症状も同様であった．したがってこの期間のオキシダントの濃度レベルでは光化学スモッグによる影響は低いと考えられる．咳は風速と高い相関，湿度と高い負相関を示し，埃や天候の影響を示唆している．全体として大気汚染の影響よりも天候など自然現象による影響を示した結果であった．自覚症状間の相関ではのどの痛みと声がかれるとが最も高い相関を示したが他には特徴的な結果が得られなかった．

4. 複合指標による分類

従来より大気汚染を表わす指標として単一物質よりも複数物質を組み合わせた複合指標が適当であると言われてきた．また第2報では相関分析により複合指標の妥当性を述べた．ここでは第2報で用いられた Pindex のほかオキシダント，亜硫酸ガス，二酸化窒素からその環境基準値各6，4，2pphm との比により組み合わされた8種の複合指標の合計9指標を選択した（二酸化窒素の環境基準値は投稿後7月11日の告示で4～6pphmと大幅に緩和された)[7]．複合指標の組み合わせの方法として回帰分析から得られた偏回帰係数を一次結合させる方法があるが[2]，そのとき行なわれた調査独自のものになり易く，環境基準値を使用した方が普遍性が高いので以下の複合指標とした．$A=Ox/6$, $B=SO_2/4$, $C=NO_2/2$ とおく．①Pindex, ②A＋B, ③A＋B², ④A²＋B, ⑤A²＋2B², ⑥B＋B², ⑦B²＋C, ⑧A＋B＋C, ⑨A＋B²＋C の9指標である．Pindex の計算には欠測の多い炭化水素を割愛した．また一酸化炭素と浮遊微粒子の24時間平均の環境基準値は各 10ppm, 100μg/m³ である．そして各物質の環境基準値をそれぞれ0.5, 1.0, 1.5, 2.0倍して①～⑨の値を求め，上記複合指標による大気汚染の5段階のレベルを定めた．このレベルをTable 1 上段に，下段には今回の調査での平均値と標準偏差を示した．平均値をみると亜硫酸ガスのみで構成された指標はレベル1に，二酸化窒素を含む3指標はレベル3に，他の5指標はレベル2に該当した．Ott らは5種の汚染物質からなる複合指標ＰＳＩにより大気汚染レベルを5段階に分けており，“良好”，“普通”，“やや不良”，“不良”，“非常に不良”のように名付けている[8]．同様に考えると9指標のうち6指標で今回の調査は良好または普通であった．9指標のうち上記②，⑨の2指標について5症状（眼が痛む，のどが痛む，頭痛，だるい，咳）を1パーセント刻みで分けた有訴率分布を Table 2, 3 に示した．その中に分布する数字は註に示した調査期間全体に対する日数比である．比較対照するため昭和50年度調査を上段に示した．この調査では今回の調査に比べて大気汚染のレベルが高く，有訴率も全般に高かった．2指標間には大差ないようであるが，汚染レベルが5に達したのは Table 3 の昭和50年度調査での1回だけでこのときの眼が痛む，のどが痛む，だるい，咳の4症状の有訴率は9.1パーセント以上であった．このうち咳以外は光化学スモ

Table 1. Summary of Air Pollution Level by Combined Air Pollution Index

Air Pollution Level	Combined Air Pollution Index								
	Pindex	A＋B	A＋B²	A²＋B	A²＋2B²	B＋B²	B²＋C	A＋B＋C	A＋B²＋C
1	1.09	1.00	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	1.50	1.25
2	2.17	2.00	2.00	2.00	3.00	2.00	2.00	3.00	3.00
3	3.24	3.00	3.75	3.75	6.75	3.75	3.75	4.50	5.25
4	4.31	4.00	6.00	6.00	10.00	6.00	6.00	6.00	8.00
5									
Mean	1.60	1.56	1.35	1.96	1.93	0.572	2.85	4.23	4.02
S D	0.409	0.530	0.529	1.19	1.26	0.342	1.05	1.20	1.20

Table 2. Frequency of Incidence vs Air Pollution Level by $[(Ox/6)+(SO_2/4)]$

		Eye Irritation					Sore Throat					Headache					Lethargy					Cough				
	Level	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Incidence (%) 1975	9.1—	1		1	3					2		1	3		2		2	5	2	5						1
	8.1—9.0							1					1	1			1	1								
	7.1—8.0		2				1						2				1	1								
	6.1—7.0		2					2		2		1	2		1				1							
	5.1—6.0		2				1	2	1			1	1	2	1			1							1	
	4.1—5.0	1	3	1	1				2			2	1		1							2	2			1
	3.1—4.0	1	2	1	1		1	2	2	1		1					1					1	2			2
	2.1—3.0	2					1	2							1							2	4	1	1	
	1.1—2.0				1		1						1										2	1	1	
	0 —1.0						1																			1
Incidence (%) 1977	9.1—																									
	8.1—9.0		1																							
	7.1—8.0		1	1				1	1				1	1				1							1	
	6.1—7.0		1	1				1					1				1	1								
	5.1—6.0		2	2					1					1				1	1						1	
	4.1—5.0		2					2	1				1	1			1	3	1				2	2		
	3.1—4.0	1	1	1			1		1			1	1	2			2	1	1				1	1		
	2.1—3.0	1	1	1				2	2			1	5	1			1	2	3				3	1		
	1.1—2.0	1	4	1			2	4	1			3	3	2			1	2	2			2	3	2		
	0 —1.0	3	2	1			2	3	1			1	2	1			1	2				3	4			

1：0—5%, 2：6—10, 3：11—15, 4：16—20, 5：21— during Period

ッグの代表的症状であり，その影響を示唆している．

Table 2, 3で表示した方法は大気汚染の程度と訴症状況を視覚的に表示するために良好であると思われ，閾値の検討にも[9] 有用であると思われる．また今回の調査では大気汚染の程度が1．で述べたように決して高いとは言えず，複合指標と自覚症状の相関分析でも良好な結果が得られなかった．因みに比較的大気汚染物質が高濃度であった昭和50年度調査における同様の相関分析結果をTable 4 に示した（未発表）．単一物質の相関分析結果については第1報に示したが，これと比較すると各症状ともかなり有意性の高い結果が得られた．近年窒素酸化物が問題視されているが急性症状に関して直接影響は小さいと考えられる．

5. YG テストと自覚症状

YGテストによる各タイプの特徴を方法1．で簡単に述べたが，A型はさらにA′，A″のA型に準ずるタイプに分類され，B型からE型にも各1つの準型がある．さらにA型と他の型との中間型が4種あり合計15型に分類されるのが通常である．しかし調査対象数が132名で，これを15に分類すると各々が少数となるのでAからEの5系統にまとめた．ここで中間型はその両方（A系統と他系統）に加算した．各系統の人数の内訳はA系統48名，B系統45名，C系統11名，D系統36名，E系統12名である．各系統別の有訴率をみると全体にB系統が高く，C，E系統が低い．そしてこれら系統別の特徴を以下の統計処理により検討した．先ず各系統の平均有訴率が全体のそれと差があるかをt検定で検討した．t値から危険率1パーセントで有意であったのはB系統では痰，めまい，E系統ではだるいであった．同じく5パーセントではB系統で息苦しい，C系統でめまい，E系統で涙であった．しかしこれらの有意な差が生じた原因は明らかでない．次に眼，呼吸器，全体とに分けた場合に特徴的な症状をいくつかピックアップし比較してみよう．眼の症状として眼が痛む，涙が出る，呼吸器の症状として上部気道に関係の深いのどが痛む，声がかれる，全体症状としてだるい，気持ちが悪いが特徴的症状と考えられる．各系統の標準偏差が系統により大きく異なるので誤差を見込まねばならないが，各系統平均有訴率でこの2症状間の相関分析を行なうと，眼の症状で0.589，呼吸器症状で0.812，全体症状で0.945であった．危険率5パーセン

Table 3. Frequency of Incidence vs Air Pollution Level by $[(Ox/6)+(SO_2/4)^2+(NO_2/2)]$

		Eye Irritation					Sore Throat					Headache					Lethargy					Cough				
		Level	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Incidence (%) 1975	9.1—		1	2	2	1				1	1		2	3	1			4	5	5	1					1
	8.1—9.0								1					1	1				2							
	7.1—8.0							1					1	2				1	1							
	6.1—7.0		1	1					2	2				1	2				1							
	5.1—6.0		1	1				2	2					2	1				1				1			
	4.1—5.0		2	3	1				2				1	2	1							1	3			
	3.1—4.0		1	2	2			1	2	2			1	2	1				1			1	2	2		
	2.1—3.0			2				2	2				1									2	5	1		
	1.1—2.0				1				1							1						1	1	2		
	0 —1.0								1					1								1	1	1		
Incidence (%) 1977	9.1—		1																1							
	8.1—9.0																									
	7.1—8.0		1					1		1				1	1				1				1			
	6.1—7.0			1	1				1						1				2							
	5.1—6.0		1	1	1				1					1				1	1				1			
	4.1—5.0		1	3					2	1				2	1			2	2	1		1	1	2		
	3.1—4.0		1		1				1	1			1	2	1			1	2	1		1	1	1		
	2.1—3.0		1	2	1			1	3				3	4				1	3	2		3	1	1		
	1.1—2.0		2	3	2			3	4				2	4	1			1	3	1		1	5	1		
	0 —1.0		1	4	1			3	3	2			1	1	1			1	2			1	5			

Table 4. Correlation Analysis between Symptom and Combined Air Pollution Index during Study Period in 1975

Symptom	Combined Air Pollution Index						
	A+B	A+B²	A²+B	A²+2B²	B²+C	A+B+C	A+B²+C
Diarrhea	−.257	−.275	−.224	−.252	−.373 *	−.334	−.339 *
Headache	.514* *	.543* *	.516* *	.538* *	.329	.386 *	.431 *
Dizziness	.397 *	.422 *	.509* *	.498* *	.201	.273	.314
Eye Irritation	.697***	.757***	.820***	.836***	.478* *	.538* *	.613***
Sore Throat	.670***	.738***	.749***	.788***	.510* *	.524* *	.603***
Sneeze	.353	.419 *	.396 *	.447 *	.352	.285	.347
Nosebleed	−.365	−.379 *	−.290	−.323	−.496* *	−.469* *	−.467 *
Strange Odour	.529* *	.565* *	.605***	.610***	.368 *	.432 *	.479* *
Cough	.445 *	.528* *	.583***	.614***	.342	.321	.405 *
Phlegm	.339	.402 *	.361	.410 *	.276	.233	.299
Shortness of Breath	.555***	.640***	.680***	.715***	.460 *	.448 *	.532* *
Nausea	.358	.399 *	.325	.367 *	.416 *	.380 *	.411 *
Abdominal Pain	−.301	−.265	−.248	−.227	−.261	−.356	−.324
Numbness of Extremities	.171	.157	.194	.184	.162	.183	.173
Lethargy	.287	.246	.309	.276	.199	.289	.262

トの有意水準は0.875で全体症状のみが有意であることを示した．サンプル数が小さいことなどに問題はあるが定性的な推定にはなろう．さらに順位相関分析を行なうと各々順に0.60，0.97，1.0となり，全体症状，呼吸器症状が有意な相関を示した．次に2症状の順位を平均すると，眼の症状ではC系統の平均順位が1.0で最も訴症し易い系統であることを示した．同様に呼吸器症状ではE系統が1.0で最も訴症し易く，全体症状ではB系統が1.0で最も訴症し易く，E系統が5.0で最も訴症しない系統であることを示した．これらの結果より個人特性として性格が特定の症状特に全体症状訴症に寄与することを示唆し興味深い．最後に系統間に分散の差があるかを二元配置の分散分析で検討した．その結果分散比は0.027でF検定による危険率5パーセントの有意水準は2.56であるから系統間に分散の差は見られなかった．

YGテストは12特性からなり，各特性のスコアのパターンによってタイプが決定されるが，そのスコアと自覚症状との間に相関関係が見られるかを検討した．パターンの分類は12特性を6特性ずつに分け，特定範囲のスコアとなる特性数によって決定される．その6特性間の相関ではほとんどの場合高い相関を示し，心理学的に非常に良好な結果であった．YG特性と自覚症状との相関では愛想の悪さが7症状（下痢，腹痛，気持悪い，だるい，痰，吐気，頭痛）と有意な相関を示した．この特性は気が短かく，人の意見を聴かない性質があり，いらいらし易いため，気持ちが悪くなったり，だるくなったり，頭痛を訴え，嵩じて下痢や腹痛や吐気を催すことも

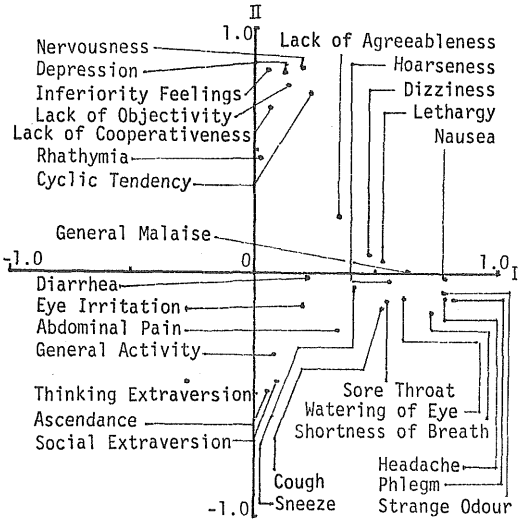


Fig. 1. Loading Distribution of 1st and 2nd Principal Component

考えられる．眼の痛み，のどの痛みなどの急性症状にはほとんど有意な相関は見られなかった．危険率1パーセント以下の高い相関関係は個人をパラメータとしたときの下痢と腹痛で，これらは大気汚染と関係が薄いと考えられ，調査対象の性格の一部が反映したように推察される．

どのようなタイプまたは特性が大気汚染による自覚症状訴症に寄与し易いかは以上の分析で必ずしも充分ではなく，さらに緻密な方法による調査および解析が必要であるが，この訴症とタイプや特性によっては何らかの関係を有すると考えられる．以上で用いた相関係数を基に主成分分析を行ない，第1主成分と第2主成分の負荷量分布を Fig. 1 に示した．累積寄与率は全分散の36.3パーセントで高いとは言えないが，Fig. 1 に示したように自覚症状の因子は第1主成分の軸に，YG特性の因子は第2主成分の軸に沿いほぼ2群に分かれた．自覚症状と同一群には愛想の悪さ，一般的活動性，社会的外向，支配性が含まれるが，特に愛想の悪さが近接している．

結　論

昭和50年度より3年度にわたり，大気汚染物質と急性自覚症状との関連性を検討するため，日体荏原高校男子生徒を対象にアンケート調査を実施した．昭和52年度の調査では複合大気汚染指標による大気汚染レベルの分類や調査対象の性格による自覚症状訴症の特徴の検討を主目的として分析した結果以下の知見を得た．

昭和52年度調査時期の大気汚染状況は昭和50年度の調査と比較すると全体として低く，特に亜硫酸ガスは最高濃度が24時間平均の環境基準値 4pphm にも達しなかった．

自覚症状では風邪は他の症状に与える影響が大きくこれを無視し得ないので，風邪をひいた場合のデータを削除し分析したが，そのため調査数が2，3割減少した．

環境要素と自覚症状との相関分析で今回の調査では天候の影響の大きいことが示唆された．

第2報で複合指標が大気汚染を表わす指標として単一物質による指標よりも適当であることを述べた．本報では普遍性を考慮し，大気汚染物質の環境基準値を利用した9種の複合指標について大気汚染のレベルを5段階に分け，昭和50年度調査と比較しつつ検討した結果，大気汚染レベルと有訴率を各々段階別に分ける表示方法は大気汚染による自覚症状有訴率をコンパクトに表わすことができ，閾値の検討や大気汚染防止対策でも被害表示方法として有用であると思われる．

調査対象をYGテストにより系統にまとめ，各系統の特徴を統計処理して分析した．有訴率ではB系統が高

く，C，E系統が低い傾向を示した．特に全体症状ではB系統の有訴率が高く，E系統が低い傾向を明瞭にした．またYG特性と自覚症状との相関分析では愛想の悪さが7症状と有意な相関を示した．さらに主成分分析では第1，2主成分の負荷量分布で7YG特性と自覚症状および4YG特性の2群に分かれた．

以上の分析の中で各所に調査数の少ないことが欠点となって現われた．風邪の影響の大きさがその原因の一つとなり，さらに調査上の限界などがその原因であったが，今後は可能な限り調査数を多くすることが望まれる．

謝辞 本報の資料収集に尽力して戴いた衛生局医療福祉部公害保健課の諸氏，そして資料整理に御協力戴いた帝京大学医学部公衆衛生学教室寺尾浩明氏，山岡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) 牧野国義，溝口　勲，沖野哲郎，山本幹夫：東京衛研年報，27-1，274，1976
2) 牧野国義，溝口　勲，沖野哲郎，山本幹夫：東京衛研年報，27-1，280，1976
3) 牧野国義，溝口　勲，沖野哲郎，山本幹夫，長崎　護：東京衛研年報，28-1，228，1977
4) 大阪府衛生部：昭和51年度環境庁委託報告書，1977
5) 吉田弘治郁：埼医誌，10，95，1975
6) 環境庁大気保全局：環境保健レポート，22，49，1973
7) 牧野国義，溝口　勲：第18回大気汚染研究全国協議会講演要旨集，246，1977，福岡
8) Ott, W. R. and W. F. Hunt : *JAPCA*, 26, 1050, 1976
9) Makino, K. and I. Mizoguchi : Proc. of *The 4th Clean Air Congress*, 27, 1977, Tokyo

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 318—324, 1978

各種大気汚染物質の家兎角膜表層への影響

大澤誠喜*, 狩野文雄*, 福田雅夫*, 溝口勲*

Effects of Rabbit's Corneal Epithelium by Air Pollutants

MASANOBU OSAWA*, FUMIO KANO*, MASAO FUKUDA*
and ISAO MIZOGUCHI*

The morphological changes on the corneal epithelium of rabbits exposed to air pollutants, such as ozone, acrolein, formaldehyde and sulfuric acid mist, were examined by the optical photoslit microscope and the scanning electron microscope. These pollutants induced the characteristic epithelium changes of the scattered desquamation of one cell or a mass of cells and the destructive exfoliation extending to two or more epithelium layers. The degree of these changes was scored on the basis of the electron and optical microscopic findings. The degree of changes was arranged in order as follows ; acrolein〉 ozone〉 formaldehyde〉 sulfuric acid mist, while their frequencies were as follows ; ozone〉 formaldehyde〉 sulfuric acid mist〉 acrolein. The decreases of pH value of tear and microvilli of epithelium were observed only when the rabbits were exposed to sulfuric acid mist.

緒　言

光化学スモッグによる健康被害のうちでも，眼の刺激は最も鋭敏で，咽喉の痛みや呼吸器障害などよりも早く現われる症状である．被害者の多くは，眼が痛い，涙が出る，チカチカする，異物感がある等の自覚症状を訴え，他覚症状としても，球結膜毛細血管の拡張（特に輪部毛細血管の拡張），角膜全表面にわたる粉末状の表層混濁，涙液リゾチーム，涙液pHの低下などが報告されている[1-6]．

昭和51年にわれわれの行なった都内某高校生を対象とした調査においても，オキシダント濃度 0.17ppm の日は，コントロール日（Ox 0.02ppm）にくらべ約4倍ものフルオレスチン染色陽性像が認められた[7]．これらの諸症状の所見は大気に直接さらされている角膜や結膜と大気汚染物質との間に特異的な刺激性，炎症性作用が起っていることを示唆している．そこで，人にみられるびまん性表層角膜炎や，びらん性混濁などの角膜障害が大気汚染物質により発症しうるものか否かを明らかにするため，家兎を用いて大気汚染物質の単体成分による曝露を行ない，角膜表層の変化を観察し，汚染物質と角膜損傷の程度についての若干の所見を得たので報告する．

方　法

1. 曝露方法

体重 2～2.5kg の日本白色種の雄家兎を木製の固定箱に入れ，内容積 2.66m³ のスモッグチャンバー内で各種汚染物質の1時間曝露を行なった．対照群を2群に分け，負の対照群としては清浄空気中で飼育したもの，正の対照群として開瞼器により強制的に30分間まばたきを禁止させ，角膜に乾性剝離を起させたものを用いた．

各汚染物質の種類，発生方法，濃度については以下の通りである．アクロレインとホルムアルデヒドについては，チャンバー内に計算値から割出した一定量の溶液を滴下し気化させた．アクロレインについては，0.3, 0.5, 1，3，20ppmの5種類の濃度，ホルムアルデヒドは，2，5ppm で曝露を行なった．

オゾンは放電式のオゾン発生器を用い，電圧を変化させることにより濃度を調節した．濃度は，0.2，0.5, 0.8，5，40ppm である．

硫酸ミストは，60%発煙硫酸 10m*l* をインピンジャーに入れ，ミニポンプで空気を吹きつけて発生させ，電導

* 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

度法による測定器を用い，イオウ酸化物濃度として測定した．濃度は，0.2，0.3，0.5ppm である．

2. 涙液 pH の測定

各汚染物質の曝露前後に涙液の性状を把握するため，微小複合ガラス電極によって涙液 pH を測定した．家兎の眼瞼下部に微小電極の先端を10数秒間接触させ，記録計の値が平衡に達する点をその pH 値とした．

3. 細隙灯顕微鏡による観察

曝露前後の角膜表層の変化をみるために，フローレス試験紙による染色を行ない，細隙灯顕微鏡による観察を行なった．すなわち，フローレス試験紙を生理食塩水にて浸潤させ，眼瞼上部内側に点眼した．角膜表層に剝離，または損傷がある場合は鮮緑色の斑点が現われる．肉眼的所見と合せて，より客観性を持たせる意味で，高感度フィルムにより写真撮影を行なった．

4. 走査電子顕微鏡による観察

角膜損傷の微小変化をより正確に把握するため，走査型電顕による観察を行なった．すなわち，曝露後直ちに家兎を空気栓塞法にて死亡させ，眼球を摘出した．角膜採取に際しては，しわなどによる artifact をさけるため，眼球摘出前に注射針を角膜と虹彩との間に両方向から穿刺し，眼房水とグルタール固定液とを灌流交換し，摘出後，眼球ごと2時間固定した．固定液の組成は，5mM-$CaCl_2$ 0.1M-sucrose 0.05M-sodium cacodyrate buffer を含む最終濃度2.5%グルタールアルデヒドである．pH は7.3に調整した．

固定後，安全カミソリで眼球より角膜のみを切除し，グルタールアルデヒドを除いた緩衝液中に24時間浸した．その後，2%オスミウム酸による本固定を行なった．

組成は，0.85%-NaCl，0.05M-sodium barbital，0.2 M-HCl を含む2%-OsO_4 で，pH は7.3である．2時間固定後，エチルアルコール系列により脱水した．すなわち，50%，70%，90%，95%，純エチルアルコールにそれぞれ3回ずつ浸し，最後に純アセトンに浸した．Air-dry 法にて乾燥させ，金蒸着を施し，走査電子顕微鏡の試料とし，顕微鏡の試料ステージに全載し，全表面にわたり走査し，観察した．

結　果

1. 涙液 pH の変化

各汚染物質による涙液 pH の変化を表1に示した．アクロレイン（0.3，0.5，1ppm），ホルムアルデヒド（2，5ppm），オゾン（0.2，0.5，0.8ppm）については曝露前後に有意差はなく，硫酸ミスト（0.2，0.3，0.5 ppm）のみに曝露後に有意の低下がみられた．

Table 1. Changes of Rabbit Tear pH Exposed by Air Pollutants

Air Pollutants	n.	Before Exposure	After Exposure
Acrolein	18	6.92±0.32	6.90±0.35
Sulfuric Acid Mist	18	7.09±0.38	6.78±0.26*
Formaldehyde	12	7.03±0.17	6.93±0.15
Ozone	18	6.94±0.14	6.94±0.17

* $p<0.01$

Table 2. Classification of the Effects and Method of Making Score

A. Findings by a Slit-Microscope	
	Grade
Stained Spots	1～5
B. Findings by a Scanning Electron Microscope	
	Grade
Erosion : Type I	0
Erosion : Type II	1～3
Erosion : Type III	4～7
Score＝A×(B II＋B III)×2	Maximum Score＝100

2. 細隙灯顕微鏡による所見

家兎角膜には，正常な生理的剝離によるフルオレスチン染色像がかなりみられる．そこで曝露前後の染色像を比較して判定する方法を用いた．曝露後に明らかな変化

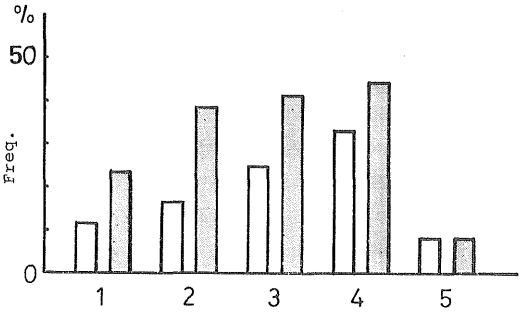


Fig. 1. Frequencies of the Effects by each Pollutant
□ by a Slit-Microscope
■ by a Scanning Electron Microscope
1 Acrolein
2 Sulfuric Acid Mist
3 Formaldehyde
4 Ozone
5 Control

がみられたものを陽性として，表2のごとく分類した．

図1は，各汚染物質による染色像の出現率を示したもので，細隙灯顕微鏡レベルにおける角膜損傷出現率は，アクロレイン（0.3, 0.5, 1ppm）が17眼中2眼，11.8%，硫酸ミスト（0.2, 0.3, 0.5ppm）18眼中3眼，16.7%，ホルムアルデヒド（2, 5ppm）12眼中3眼，25.0%，オゾン（0.2, 0.5, 0.8ppm）18眼中6眼，33.3%，対照が24眼中2眼，8.2%であった．

3. 走査型電子顕微鏡による所見

走査型電子顕微鏡により観察される剝離の状態をI型，II型，III型剝離の三つに分類した．写真1はI型剝離で角膜全体に散在する孤立した一つの細胞脱落である．この剝離は正常な生理的なものと思われる．microvilli の数は新しい細胞では粗であり，周辺の密な細胞の中にモザイク状に散在している．写真2は，周辺部位に多くみられる数個の細胞がつながった剝離脱落である．中央部に比較して周辺部に多い理由は，細胞の代謝回転の差によるものと思われる．このII型の剝離を損傷として判定するか否かはさらに実験を必要とし，目下不明であるが今回は表2の分類のように，ある程度の評価を加えた．

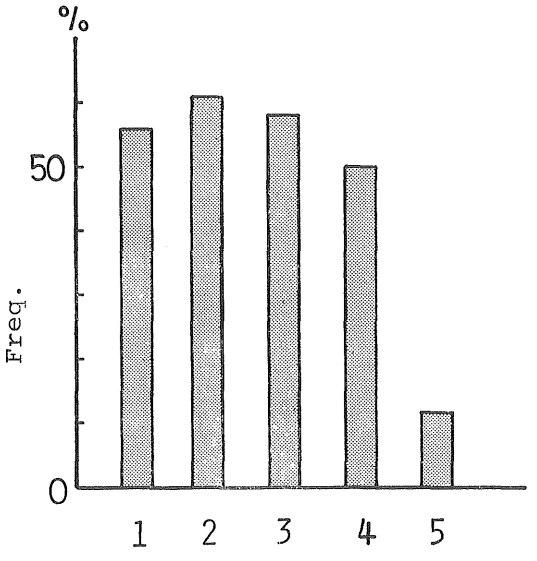


Fig. 2. Frequencies of the Effect over Grade 3 of Type II
1 Acrolein
2 Sulfuric Acid Mist
3 Formaldehyde
4 Ozone
5 Control

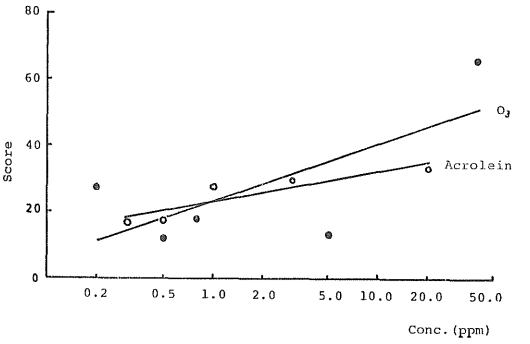


Fig. 3. Relationship between Score and Concentration

写真3はIII型剝離を示しており，中央部位に現われる曝露の影響とみられる数層におよぶ不定形の剝離である．

この剝離の特徴は，細胞の形態をとどめない破壊的脱落であり，下の細胞に microvilli がなく，膜状の残片を多く残している点である．また，汚染物質による損傷の質的相違を示す例として，写真の硫酸ミストがある．

写真のように，細胞上に spot のような破壊がみられ，表層の microvilli が減少し平滑化されているようにみえる．

以上の分類に基づき，それぞれの剝離の出現率と，表2に記載した方法で点数化を行なった．図1は，III型剝離についての出現率を示したものである．アクロレインは17眼中4眼，23.5%，硫酸ミスト18眼中7眼，38.9%，ホルムアルデヒド12眼中5眼，41.6%，オゾン18眼中8眼，44.4%，対照は24眼中2眼，8.2%であった．細隙灯顕微鏡，走査型電子顕微鏡による出現率の順序は同じで，オゾン＞ホルムアルデヒド＞硫酸ミスト＞アクロレインであった．

次にII型剝離の Grade 3 を含めた出現率をみると図2のごとく，各汚染物質間で差はほとんど認められなかった．

各汚染物質ごとの点数は，アクロレインは39.5，硫酸ミスト，27.4，ホルムアルデヒド，31.2，オゾン，34.5，負の対照は10.0，正の対照は80.0であった．点数化の順序は，アクロレイン＞オゾン＞ホルムアルデヒド＞硫酸ミストであった．

アクロレイン，オゾンの濃度-点数関係は図3のごとく回帰直線が描かれ，ほぼ 1ppm で交叉し，1ppm 以下ではアクロレインの方が高い値を示した．

考　察

走査型電子顕微鏡の観察によれば，角膜上皮細胞は平

滑な面ではなく，多数の microvilli の繁茂した波状の面をなしている．その面の上に涙液層があり，microvilli によって流れ落ちることのないように保持され，表面を平滑な光学面にしている．もし，角膜上皮に剝離，または損傷が生じると，その上に涙液層の不均一化を生じ，表層混濁，さらには視力の低下，視機能の阻害につながるものと思われる[8]．

今回の実験で，大気汚染物質の単体物質が角膜上皮に剝離を与えることが示唆されたが，その詳細な機構については不明である．角膜上皮は直接に大気に触れず，涙液層によって保護され，特に涙の最表層には眼瞼の Meibom 氏腺から分泌される脂質の薄層があり，涙の蒸発を防ぐとともに，外からの刺激物質の作用を緩和する作用がある．さらに，涙のもつ緩衝効果は大きく，容易に pH の変動を生じさせない．表1の曝露前後の涙液 pH の変動をみると硫酸ミストのみの低下を示し，角膜上皮細胞にある microvilli は減少し，平滑化をおこしていた（写真4）．

角膜損傷の発現機序を調べる際，涙液の生理的特性も考慮に入れる必要があると思われる．

従来より特異的に角膜上皮に損傷を生じると言われてきたアクロレインは，オゾンと比較すると剝離出現率は低いが，損傷の程度は高い傾向が明らかになった．

図3のように濃度-点数関係が 1ppm で交叉し，低濃度域と高濃度域で剝離の程度が逆転するのは，両者の作用の質的相違によるのではないかと思われる．アクロレインはそれ自体で細胞毒性をもつ物質であるのに対して，オゾンは一次的に細胞成分（脂質）に作用し，二次的に有害物質を形成するためと思われる．人の曝露実験において，オゾンはアクロレインと同程度の濃度では，はるかに痛みの自覚症状が少ないことが知られているが，高濃度では角膜上皮剝離がかなり認められたことは注目すべきである．ホルムアルデヒドと硫酸ミストについては例数が少なく，明確な関係がみられなかったが，作用はアクロレインに近いものと思われる．

Draize 法[9]では，角膜の混濁度と面積とを二つの要素とするものであるが，著者らの方法では細隙灯顕微鏡所見として，フルオレスチン染色像の密度（面積）を一つの要素とし，さらに走査型電子顕微鏡所見による剝離の型とその出現率を第二の要素としたものである．この方法の評価についてはこれからの議論を待たねばならないが，従来の細隙灯顕微鏡のみの所見に比べ，感度と正確性の点で優れているものと思われる．

結　論

アクロレイン，ホルムアルデヒド，オゾン，および硫酸ミストのような大気汚染物質に曝露された家兎の角膜上皮細胞における形態学的変化を細隙灯顕微鏡と走査型電子顕微鏡によって検討した．

これらの汚染物質は，一つ，または集団の上皮細胞の剝離，および二層以上の破壊的な剝離を引き起した．これらの剝離の程度を細隙灯顕微鏡および走査型電子顕微鏡による所見をもとに点数化した．剝離の程度は次のような順序で，アクロレイン＞オゾン＞ホルムアルデヒド＞硫酸ミストであった．また，これらの出現率は，オゾン＞ホルムアルデヒド＞硫酸ミスト＞アクロレインの順であった．

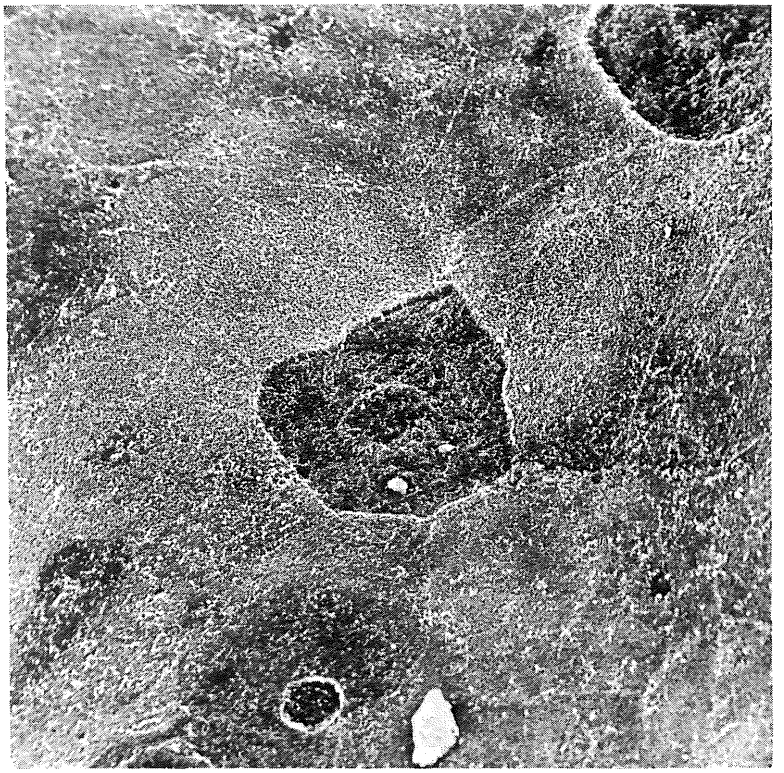
硫酸ミストに曝露された場合のみ，涙液 pH の酸性化，上皮細胞の microvilli の減少が認められた．

謝　辞　電子顕微鏡写真に関して，当研究所中央機器室前木主任研究員の御協力に感謝致します．

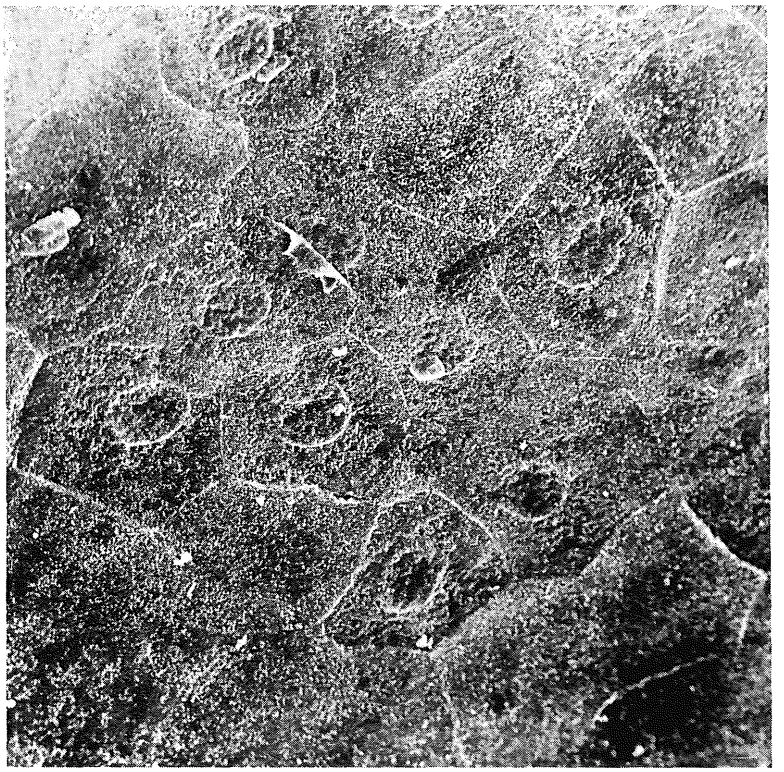
（本研究は，昭和52年度当研究所調査研究課題「オキシダントの人体および生物影響調査研究」の一部として実施した．）

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，岩崎百合子：臨床眼科，26，465，1972
4) 福田雅夫，大澤誠喜，岡和田紀昭，溝口　勲：東京衛研年報，27-1，530，1976
5) Okawada, N. et al. : Proceedings of the 4th international clean air congress, 23, 1977
6) 清水敬一郎，原田万里，石川　哲：臨床眼科，30，407，1976
7) 福田雅夫，大澤誠喜，狩野文雄，溝口　勲，岡和田紀昭：大気汚染研究，11，247，1976
8) 三島済一：化学の領域　増刊104，29，1974
9) 白須泰彦編：新しい毒性試験と安全性の評価，440

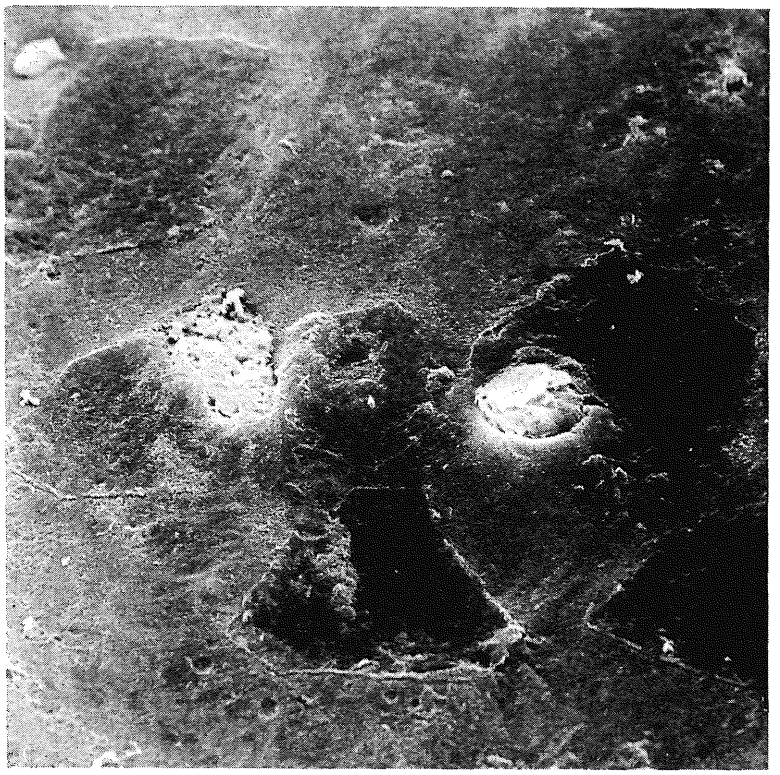


1 型 ×1000



Ⅱ 型 ×800

Ⅲ 型 ×700



硫酸ミスト ×1000

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 325—330, 1978

走行中の自動車内空気汚染について（第1報）

佐藤泰仁*, 多田宇宏*, 青木　実*
溝口　勲*, 野牛　弘*

Indoor Air Pollution in Automobile (I)

YASUHITO SATO*, TAKAHIRO TADA*, MINORU AOKI*,
ISAO MIZOGUCHI* and HIROSHI YAGYU*

From the occupational hygienic point of view, the concentrations of air pollutants in the inside of running automobiles were investigated. Studied pollutants were NOx, CO, hydrocarbons, CO_2 and suspended particles. Average values of NOx, CO and dusts during all running time were 0.31ppm, 13ppm and 0.05mg/m^3 respectively and their maximum values 0.97ppm, 24.5ppm and 0.12mg/m^3. NOx and CO tended to rise with time course and finally appeared to reach to the concentrations on the road. Moreover, NO (Nitric Oxide) was over 90% of NOx. This fact suggested that the exhausted gases from the fore-running cars entered directly into the rooms of the following cars.

はじめに

大気汚染が大きな社会問題となってから10数年を経過し，広域的な大気汚染監視網が整備され常時測定および規制が軌道にのり，その効果があらわれつつある．しかし大気汚染の発生源の1つでもある自動車を対象とし，局所空気汚染としての観点からその実態を調査した報告はない．つまり労働衛生的見地から，発生源でもある自動車に常時乗務している運転手およびオーナードライバーなどを考えた場合，車内がどういう汚染実態であるかを把握することは意義あることと考える．したがって今回われわれは自動車走行時における車内の各種汚染物質の挙動について調査を行なった．

調査内容

調査項目および方法

浮遊粉塵(Dust)……デジタル粉塵計P—5型
一酸化炭素(CO)……エコライザー
炭化水素(H.C.)……ガスクロマトグラフ
窒素酸化物(NO_X)……NO-NO_2-NOx計(ケミルミ法)
炭酸ガス(CO_2)……北川式検知管

調査期間　昭和53年2月21日～2月24日

調査計画

調査にあたって検討する事項として，車内における汚染質の濃度変化の把握，交通量および外気との関係などのため，走行地区を下記のように区分した．

Ⅰ　住宅地区（世田ケ谷，杉並，渋谷，新宿，目黒）
Ⅱ　都心地区（千代田，港，中央）Ⅱ-1. 午前，Ⅱ-2. 午後
Ⅲ　主要幹線道路┬1.　環状七号線
　　└2.　青梅街道
Ⅳ　郊外地区（三多摩および一部甲州街道を含む）

それぞれの地区を，車内での喫煙をしない条件で走行した．汚染質の測定は炭化水素，CO_2については一定間隔をおいたスポットサンプリングであるが，Dust, CO, NOxについては瞬時濃度の連続記録により行なった．なお，炭化水素については芳香族炭化水素であるトルエン，ベンゼン，キシレンを対象とした．

調査に供した車種は日産43年型ステーションワゴンであり，調査車の荷物用スペースに前述の測定器等を装備し，運転手の呼吸位置の空気がサンプリングできるように，NOx, CO, Dustについてはテフロン管で配管し

* 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

た．また，測定器および記録計の消費電力を供給するため，調査車の屋根上に携帯発電機（HONDA. E-1200）を積載した．発電機の電圧安定性については事前および調査中にもチェックを行ない，変化のないことを確認した．なお，外気濃度については，車内外の同時測定が不可能だったので，公害局調査のデータ[1]を参考にすることとした．

調査結果および考察

今回の調査は冬期に行なったこともあり，窓が閉鎖時という条件であったが，車内の衛生状態が悪くなったこともあり，一時開放（運転手席窓上端 5cm 程度）の状態もあった．走行時のそれぞれの汚染質の挙動を示すグラフを Fig. 1 から Fig. 4 に示した．図中，D. O. はドアーの開放を，W.O. は窓の開放を，REST は休憩を意味している．

1） 浮遊粉塵量について

図からも明らかなように，他の測定項目に比べ変動が少なく，しかも濃度も低い結果が得られた．Table 1 として走行地区別の閉鎖時の平均濃度等（count/min 表示）を示したが，前述したように車内での喫煙は行なわない状態での測定であり，測定器の較正値である 1 count $=0.001 mg/m^3$により重量濃度換算を行なうと，0.03～0.06mg/m^3 という値になる．このオーダーについては喫煙なしの事務室レベルと同程度である．一時，車に装備のベンチレーターを動かしてみたが，通常使用していないためか，これより多量の粉塵が直接流入してしまい，それ以後ベンチレーターは使用しなかった．

車内において喫煙（タバコ 1 本）をすると，400～600 count （$=0.4$～$0.6 mg/m^3$）にも達し，最高では 1500 count 近くにもなり相当高濃度になるが，その持続時間としては20分位で，ほぼ通常の車内濃度になることが後日の調査でみられた．さらに走行時における外気の粉塵濃度を先の資料[1]から走行地区にある測定所の平均濃度として求めてみると，三多摩地区が 0.02mg/m^3，その他の地区は 0.03～0.04mg/m^3 のオーダーであり，車内は外気と同等か，やや高い濃度であるという状態であった．

2） 一酸化炭素濃度について

CO についても走行地区別の平均濃度等を Table 2 として示した．CO をはじめ各汚染ガスは外気の気象条件（特に風速）および交通量に左右される．先の資料[1]より走行地区毎の平均風速を求めてみると，Iにおいては 3.9m/s，IIでは 2.1m/s，IIIにおいては午前と午後が相当違うので別々に求めてみると午前中 3.7m/s，午後 8.7m/s で，IVにおいては 2.7m/s であった．また，交通量については調査日の交通量ではないが，警視庁交

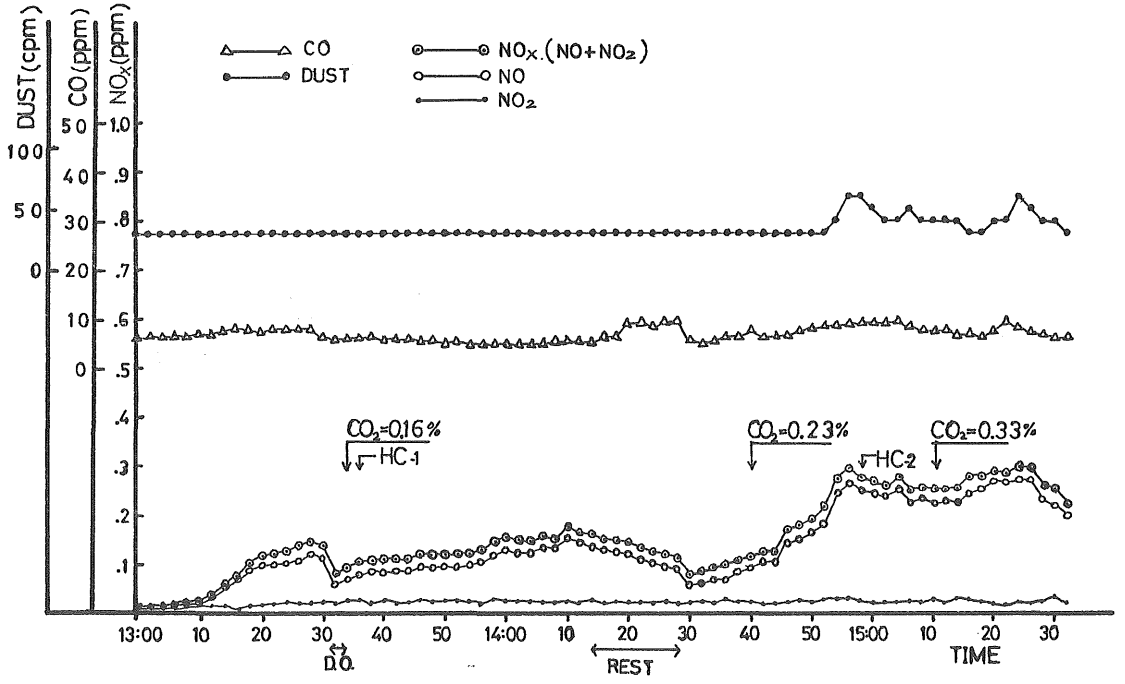


Fig. 1. Concentration Transition of NOx ($NO+NO_2$), CO, DUST at driving Resident Area (I)

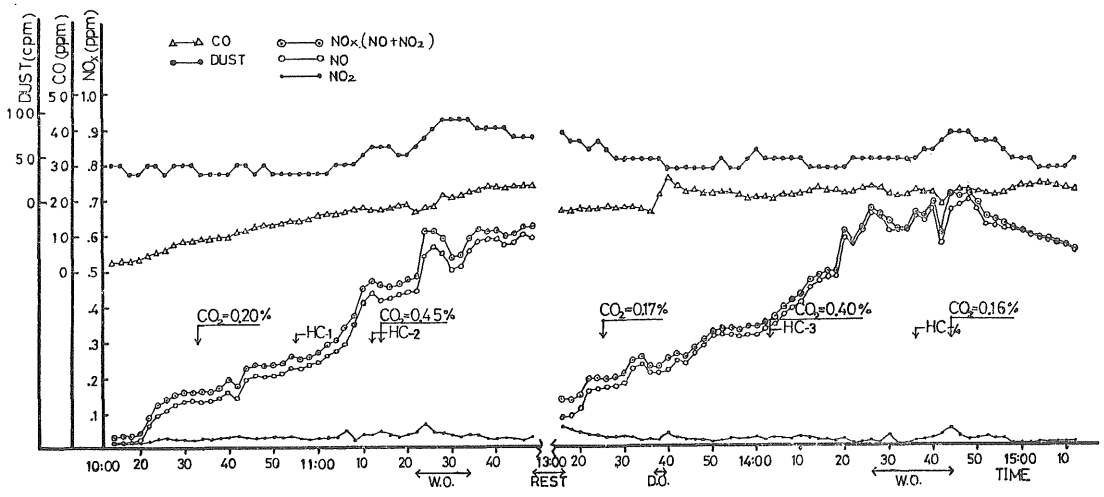


Fig. 2. Concentration Transition of $NOx(NO+NO_2)$, CO, DUST at driving Center of the Metropolis Area (II-1, 2)

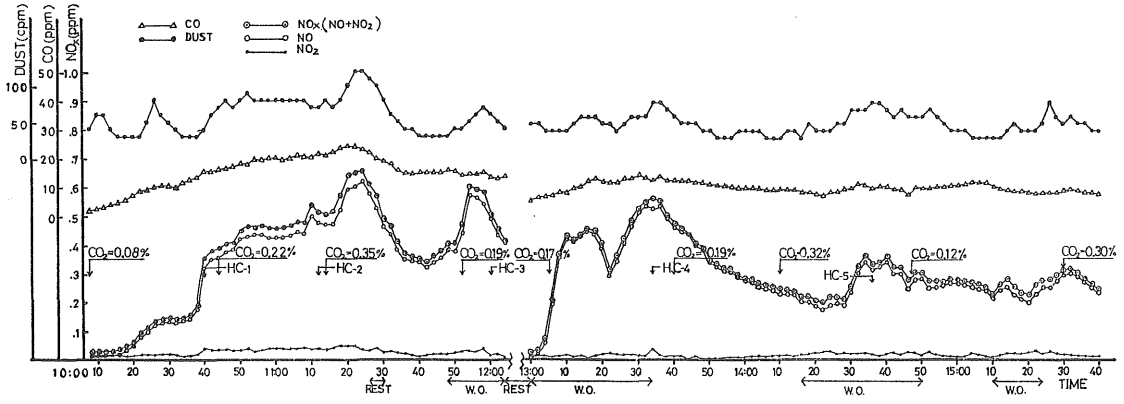


Fig. 3. Concentration Transition of $NOx(NO+NO_2)$, CO, DUST at driving an Arterial Road (III-1, 2)

通部が出している交通量統計表[2]により走行地区および幹線道路の交通量を計算してみると，日中12時間の量として住宅地区が1万5千台，都心地区4万台，環状七号線5万台，青梅，甲州街道が3万5千台であるが，三多摩については調査されていないので不明である．Fig. 1においては強い風（前述の平均風速 3.9m/s）のため，汚染ガスが相当程度に拡散されているためか，車内においての CO の平均は 6.8ppm と 10ppm 以内であったが，風速の少ない他の地区においての車内は 10ppm を越えている．そして，車内 CO の平均濃度でみる限り，先に計算した交通量の大小と対応していることがみられた．また，車内は走行して20分前後で 10ppm を越える状態であり，それ以後は漸増傾向であり，長時間の乗務については，休息などの配慮が当然必要であろう．1964年，アメリカの Warren[3]らがアメリカ製自動車内 CO は1日の労働時間の平均で 17ppm であったと報告しているがわれわれの今回の値も似たようなところであった．走行時の外気の CO 濃度は0.5～2ppm 程度であり，車内は外気の5～10倍であることが言える．

今回測定した最高濃度はIIの都心地区で 24.5ppm を記録し，変動も少なく平均 20ppm 前後であったことは，予想以上の濃度であった．そして，これに喫煙がと

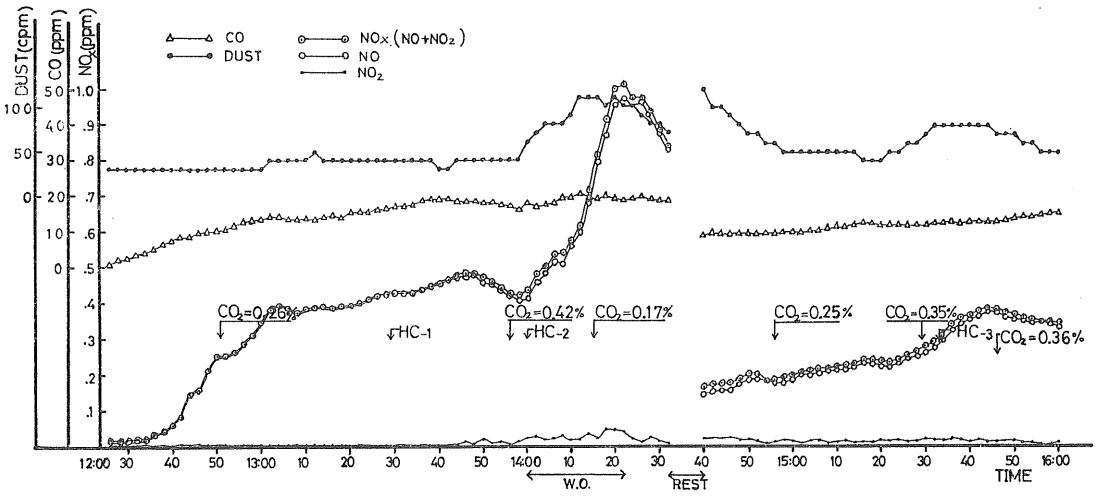


Fig. 4. Concentration Transition of NOx($NO+NO_2$), CO, DUST at driving Suburbs Area (IV)

Table 1. Average Concentration, Standard Deviation, Coefficient of Variation, MAX, MIN and Range of DUST Concentration in Each Area

UNIT : count/min

	I	II		III		IV
		1	2	1	2	
$\bar{x}$	33.8	44.6	41.6	60.4	45.4	51.2
s	7.6	16.5	11.8	24.4	13.9	20.4
c	0.23	0.37	0.28	0.40	0.31	0.40
max	60	80	70	120	80	120
min	30	30	30	30	30	30
range	30	50	40	90	50	90
n	68	41	51	47	37	93

Table 2. Average Concentration, Standard Diviation, Coefficient of Variation, MAX, MIN and Range of CO Concentration in Each Area

UNIT : ppm

	I	II		III		IV
		1	2	1	2	
$\bar{x}$	6.8	13.5	20.1	15.0	10.5	12.8
s	1.3	6.3	2.4	6.1	1.5	4.1
c	0.19	0.47	0.12	0.46	0.14	0.32
max	9.5	23.5	24.5	24.0	14.0	19.5
min	5.0	2.5	15.0	2.0	8.0	1.0
range	4.5	21.0	9.5	22.0	6.0	18.5
n	68	41	51	47	37	93

もなえば相当上昇すると思われたので，後日，粉塵と一緒に測定した結果によれば，1本の喫煙で 20～30ppm 増加することが認められた．したがって閉鎖時の車内は 50ppm にも達することも考えられ，窓の開放など換気の配慮をしなければならない環境状態である．

3) 炭化水素濃度について

分析方法 走行車内空気約 1 *l* を真空ビンに捕集し，実験室にもちかえり，空気濃縮装置を用いて液体酸素によりＧＣ管に濃縮する．さらにそのＧＣ管をガスクロマトグラフに接続し，加熱して試料を注入した．

測定条件

機種：島津 GC-5A，島津 Digital Integrator ITG-2A

カラム：ガラスカラム 2m，検出器：FID

充填剤：25% TCP，クロモゾルブ W-AW (DMCS)

カラム温度：100°C 恒温，流量：N_2，40m*l*/min

感度：$10^3 \times 16$

今回は主に芳香族炭化水素（ベンゼン，トルエン，キシレン異性体（メタ，パラ，オルト））についての挙動を調査した．他の汚染ガスのように連続測定ができないので，間隔をおいたスポットサンプリングを行なったが，その結果を Table 3 に示した．通常，炭化水素については外気においても変動がはげしいが，今回の車内についてもその傾向がみられるとともに，サンプル数も少ないため経時的な濃度の推移については明らかではな

Table 3. Concentration of BENZENE, TOLUENE, XYLENE in the Inside of driving Automobiles

UNIT : ppb

	I		II				III					IV		
	1	2	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3
BENZENE	6	19	1871	2085	27	51	—	72	39	24	19	120	55	—
TOLUENE	73	122	2582	1126	138	121	—	263	176	114	107	286	219	—
$^{m}_{p}$-XYLENE	23	18	1859	339	156	51	—	82	42	39	51	14	34	—
o-XYLENE	9	31	2387	425	170	26	—	29	20	16	13	25	61	—

いが，相当程度に変化していることだけが認められた．

外気については先の資料[1]ではTHC (Total H. C.)として測定されているので比較するのが難かしいので，以前にわれわれが大気中の炭化水素を測定した結果[4]と比べてみると，ベンゼンについては前回測定していないので何とも言えないが，トルエンおよびキシレン濃度は，大気中濃度と同等であることがわかった．しかし，今回IIの-1および-2においては原因不明ではあるが高濃度が記録され，状況によってはこの程度まで高濃度になり得るものと判断した．

4) 窒素酸化物濃度について

窒素酸化物 (NOx) については，ケミカル，ルミネッセンス方式の NOx-NO-NO_2 連続測定器を使用したことにより，これらの走行による変化がはっきりと測定された．そして，それぞれの閉鎖時の車内平均濃度等をTable 4, 5, 6 に示した．汚染ガスの中では一番変化を顕著にみせており，一時的ではあるが窓をあけることにより上昇している動きがいくつかみられており，また，窓の開放状態でない時の顕著な増加は，車の速度アップの時である．表および図からもわかるように，NOx はその90%以上が NO であること，したがって NOx の変動はNOの変動に左右されており，NO_2 は変化は少なく常に 0.02ppm 程度が存在している状態であった．

Table 4. Average Concentration, Standard Deviation, Coefficient of Variation, MAX, MIN and Range of NOx Concentration in Each Area

UNIT : ppm

	I	II		III		IV
		1	2	1	2	
$\bar{x}$	0.162	0.302	0.414	0.336	0.315	0.325
s	0.080	0.185	0.179	0.187	0.079	0.189
c	0.493	0.611	0.432	0.557	0.249	0.580
max	0.300	0.620	0.704	0.656	0.556	0.970
min	0.030	0.031	0.128	0.029	0.238	0.010
range	0.270	0.589	0.576	0.627	0.318	0.960
n	68	41	51	47	37	93

Table 5. Average Concentration, Standard Deviation, Coefficient of Variation, MAX, MIN and Range of NO Concentration in Each Area

UNIT : ppm

	I	II		III		IV
		1	2	1	2	
$\bar{x}$	0.138	0.274	0.390	0.309	0.303	0.317
s	0.078	0.182	0.184	0.178	0.080	0.188
c	0.564	0.665	0.470	0.577	0.265	0.593
max	0.274	0.600	0.688	0.620	0.540	0.960
min	0.120	0.015	0.078	0.010	0.227	0.008
range	0.262	0.585	0.610	0.610	0.313	0.952
n	68	41	51	47	37	93

Table 6. Average Concentration, Standard Diviation, Coefficient of Variation, MAX, MIN and Range of NO_2 Concentration in Each Area

UNIT : ppm

	I	II		III		IV
		1	2	1	2	
$\bar{x}$	0.024	0.028	0.018	0.028	0.012	0.008
s	0.004	0.007	0.010	0.011	0.006	0.007
c	0.184	0.250	0.551	0.397	0.507	0.846
max	0.034	0.048	0.052	0.050	0.030	0.024
min	0.010	0.016	0.002	0.012	0.000	0.000
range	0.024	0.032	0.050	0.038	0.030	0.024
n	68	41	51	47	37	93

NOの濃度は平均(各走行地区の平均値の平均)0.29ppmであり NO_2 の濃度の10倍強ということになる．また，NOは最高 0.97ppm を記録したが，これは大型トラックの後方を走行した時ではあるが，朝夕の交通渋滞および大型車の後方走行においてはこの程度まで，もしくはもっと高濃度までになり得，相当汚染されるものと推定された．先に述べた NOx におけるNOの比率について，測定日の外気濃度について求めてみると，都心地区で50%，住宅地区で35%，郊外では20%，幹線道路沿いで65%であった．通常走行時の排気ガス中のNO率は，斉藤[5]，吉田[6]らの報告でも95%程度とあることから判断して，走行中の車内には，前を走っている車および周辺の排気ガスが直接流入していることを推定させた．また，NOの比率が高いことには，今回の調査が冬期であり，夏期に比して気温も低く，紫外線も弱いことから，自動車より排出された排気ガス中のNOの NO_2 への酸化速度が比較的遅くNOの形で長く存在していることも一因であろうと思われた．外気の NOx 濃度を先の資料[1]より求めてみると，地域および時間により異なるが，走行時間帯においては 0.08ppm（都心地区）～0.03 ppm（郊外地区）の範囲内であったが，沿道近くにある排気ガス測定所の濃度では 0.12～0.16ppm と当然高い．しかし車内における平均濃度は沿道の濃度より高く，約2倍の濃度を示していることは問題である．

5) 炭酸ガス濃度について

CO_2 については北川式検知管により適宜チェックを行なった．CO_2 については外気に左右されたり，また走行地区に左右されることはないが，常時2人乗車の場合，窓等の閉鎖時では走行して15分程度で0.2%に達してしまい，それ以後，漸次増加傾向にあった．最高は0.45%を記録したが，これは1時間以上も閉鎖中の結果であるが，運転手にとって車内を居室としてみた場合，管理基準値0.1%を2～4倍も越えることであり，環境状態としては不良であり，換気の悪い車内は窓の開放による空気の入れ換え頻度を多くとる必要があると思われた．

6) 分散分析結果について

走行地区による濃度に違いがあるのか，否かについて各走行地区における汚染質濃度の平均値，標準偏差による分散分析（有意差検定）を行なってみた．その結果有意差ありと計算されたものを列記してみると，①住宅地区とその他の地区において NOx, CO, Dust とも1%の有意差でその他の地区の方が高い，②都心地区と環状七号線では，NOx は5%の有意差で，COは1%の有意差で都心地区が高く，Dust については1%の有意差で環状七号線の方が高い，③環状七号線と青梅街道では，NO_2, CO, Dust において1%の有意差で環状七号線の方が高い，④ 青梅街道と甲州街道（三多摩含む）では，COにおいて1%の有意差で甲州街道の方が高い，以上の4点が見い出された．しかしこれらは気象条件，交通量および車の流れ方に相当左右されるため，それぞれの有意性が認められた走行地区毎の暴露濃度と解釈するには無理があると思うが，各走行地区を総括的にみて，走行時の汚染質の車内濃度は先に示したように相当高い（特に NOx および CO）レベルであると認められる．

結　語

(1) 自動車の窓の閉鎖時において，走行車中の車内の空気は相当汚染され，特に NOx, COは高濃度であり，走行によって漸増傾向がみられ，外の路上濃度に達すると思われた．

(2) NOx, CO, Dust についての車内濃度は0.31ppm, 13ppm, 0.05mg/m³ であったが，それぞれの最高濃度は 0.97ppm, 24.5ppm, 0.12mg/m³ を記録した．

(3) NOx においてはその90%以上がNOであり，前車の排気ガスがそのまま流入してしまうことが推定された．

(4) CO は走行して20分位で 10ppm に達し，以後増加する．CO_2 についても同じ位の時間で0.2%を越えるので車内換気には相当留意する必要がある．

(5) 走行地区による顕著な差については，気象条件等により明確な判断はつけにくいが，住宅地区とその他の地区においては，車内濃度に違いがあると思われた．

謝辞　今回の実態調査に際し，NOx 計を貸与していただいた新宿区役所公害課に謝意を表します．

（本研究の概要は，日本公衆衛生学会37回大会1978年10月で発表した．）

参考文献

1) 東京都公害局監視部：大気汚染常時測定室測定結果報告，昭和53年2月
2) 警視庁交通部：交通量統計表，昭和50，51，52年版
3) Warren, L.and A. Cook : *Industr. Med. Surg*, **33** (3), 118, 1964
4) 佐藤泰仁，溝口　勲，牧野国義，野牛　弘：東京衛研年報，**25**，371，1974
5) 斉藤　猛ほか：自動車技術会学術講演会前刷集，No. 731，51，1973
6) 吉田耕一ほか：交通安全公害研究所研究発表会講演概要，51，1973. 11

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 331—335, 1978

発癌性粉塵についての研究　ブレーキドラム内粉塵中のアスベスト

佐藤泰仁*, 溝口　勲*

Studies on Carcinogenic Substances in Suspended Particulate Matters Asbestos Fibers in Brake Drum Dust

YASUHITO SATO* and ISAO MIZOGUCHI*

Dust in brake drums of automobiles were analysed using an optical microscope, an electron microscope and a fluorescene X-ray diffractionmeter with respect to asbestos fibers. The dusts in these drums contained 0.3% of asbestos (chrysotile) fibers. The crystalline structure of asbestos fibers in brake lining were changed to be dust by repeated friction heating and fell in drums. However, it is noticeable that small portion of the asbestos fibers remained as unchanged form in the dusts occurred from the brake linings.

はじめに

大気中にはいろいろな発生源よりの粉塵が浮遊しており，それらは総称して S.P.M. (Suspended Particulate Matters) と呼ばれている．そのなかには発癌性物質として問題にされるアスベスト（石綿）が含まれていることは今までのいくつかの報告[1-3]で明らかである．アスベストは耐熱性，耐酸性，耐圧性などに優れているために，保温耐熱材料や耐酸性材料として古くから利用されてきたが，最近では天井，屋根，床，壁などの建築材料や自動車，電車のブレーキライニング，クラッチ盤など多方面に使用されている．このようなアスベストの長所とは逆に，その粉塵を吸入することにより，石綿肺，肺癌，中皮腫などの障害が引き起こされることが知られているが，労働環境の気中のみではなく，大気中でのアスベストの発生源，動態，濃度などはまだ明らかになっているとは言えない現状である．このような背景において，われわれは自動車のブレーキドラム内にある粉塵について注目をした．現在の自動車用ブレーキは，従来のドラム式より，速度制御の点で優れているディスク式が多く利用されているが，これは開放形なため摩耗したライニング等がそのまま外に放出されるため，大気中に浮遊する源の1つになっていると考えられたからである．これら粉塵についてエネルギー分散形X線分析装置(EDX)，X線回折装置および電子顕微鏡 (E.M.) により，その化学的組成および形態，さらに鉱物組成について分析を行ない，若干の知見を得たので報告する．

測定方法

1) 試料の採取および作成方法

分析用試料は東京都財務局自動車工場の ①日産セドリック43年型（走行距離 56140km） ②日産グロリヤ45年型（走行距離 36880km）からそれぞれ採取した 4.04g, 3.58g のドラム内粉塵を用いた．

この試料約 0.2g を容積 3l のポリエチレン製袋に入れ，十分に拡散し，その直後コロジオン膜がコーティングされたカバーグラスを装着した労研式塵あい計で50cc吸引して粉じんを捕集し，EDX 用の試料とした．また，同じ粉じんについてメタノールで洗浄，親水性にし，さらに水中懸濁を行ない，この一滴をメッシュ上にのせ風乾させ，EMの透過像観察および電子線回折試料とした．さらに残りの粉じん約 2g を Al 製試料ホルダーにつめX線回折用試料とした．

2) 分析方法

組成および形態分析については，既報[4,5]と同じEDX，分析手法であるのでここでは省略する．EMの観察

* 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. Analytical Conditions

X-ray tube	Co enclosing target
Voltage and current	40kv, 40mA
Monochrometer	Graphite
Counter	Scintillation counter
Slit system	DS 1°, RS 0.3mm
Full scale range	1000cps
Time constant	1sec
Scanning speed	2°/min
Chart speed	2 cm/min

においては従来の透過型の手法であり倍率1～2万倍で行なった．電子線回折分析は，数10 nm 程度の微結晶からでも単結晶図形や繊維図形が得られる制限視野回折法を用いた．またX線回折分析については㈱理学電機製X線回折分析装置にグラファイト製モノクロメーターを付けて行ない，分析条件は Table 1 に示す通りである．

分析結果および考察

アスベストは総称であって，分類をすると蛇紋石系のクリソタイル（$3MgO \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$）と角閃石系のアモサイト（$1.5MgO \cdot 5.5FeO \cdot 8SiO_2 \cdot H_2O$），クロシドライト（$Na_2O \cdot 3FeO \cdot Fe_2O_3 \cdot 8SiO_2 \cdot H_2O$）等があり，硅酸とマグネシウム，鉄，ナトリウム，カルシウムなどの酸化物が結晶水を含んで繊維状の結晶構造をもった物質であり，アスベストの90%以上はクリソタイルである．

現在，日本および世界においてアスベストを使用している労働環境におけるアスベストの分析は光学顕微鏡（位相差）による観察およびX線回折分析によって行なわれており，顕微鏡での計数にあたっては線維の長さ5μ以上で長さと幅の比が3：1以上のものと定義されている[6]．

アスベストを直接加工していない労働環境や，大気中では必ずしもこの分析方法によってアスベストの検出同定や，濃度決定は不可能である．しかしわれわれが今回行なった分析は対象がブレーキドラム内粉じんであるので，線維状のものはアスベストと考えても全くかまわない．

1) EDX 分析について

はじめ，われわれはブレーキドラム内の堆積塵を労研式塵埃計でカバーグラス上にとり，光学顕微鏡を用いて観察（×400）を行なった．不定形の大小様々な粒子が数多く認められたが，約百視野近い観察でも線維状の粒子を見い出すことができなかった．さらにEMにより透過走査像（STEM）の観察（×300～×10000）を行なったが，これでも不定形粒子の観察にのみ終ってしまった．

前述のアスベスト線維の判断基準である長さ 5μ 以上を採用すれば，400倍では 2mm となり光顕でも検出できるはずであり，STEM の倍率ではより小さな線維でも見い出せるはずであるが，観察視野数の不足から，アスベスト線維の検出はできなかった．もちろん，大きな不定形粒子の陰にかくれている可能性も否定できないが，ブレーキライニング中のアスベストの含有量に比べて極めて少量になっていることが推察された．そこで数多くみられた不定形粒子について EDX による組成分析を行ない，その一例を Fig. 1 に示した．組成分析の結果，クリソタイルの組成である Mg, Si およびブレーキドラムの摩耗によると思われる Fe などのスペクトルが得られた．現状では EDX 分析は定性分析の域を脱しえないが，各スペクトルの強度の積分値により相対的な組成比を計算してみると，①の粒子では，Na—7.3%，Al—33.3%，Si—59.4%であり，②の粒子については Mg—25.1%，Si—45.1%，Fe—29.8%であり，③の粒子は Mg—34.8%，Si—41.8%，Fe—23.4%で，②および③の粒子は大きさは違うが，組成比は同じようであることがわかる．また，①，②，③の粒子に対しては分析条件（分析時間＝100秒，感度（VS）＝250）を同一にしているので，相互の粒子の比較をすることができ，①の粒子には Si が相当程度多いことが言える．Haringtonの資料によればクリソタイルの場合 SiO_2 として39.15%，MgO として40.32%，H_2O として13.09%が主な組成であるが，夾雑物としても Al_2O_3 が2.15%，Na_2O が0.09%あることから，①の粒子中にはクリソタイルの摩耗状のものおよび熱変成した生成物が含まれていると推定された．さらに②および③の粒子についても，主成分の他に Fe がみられることは，ブレーキドラムの素材そのものが摩耗により存在していること，また，クリソタイルの夾雑物としても Fe_2O_3, FeO が1%前後あることより，これらの組成自体が検出されたものと思われる．ブレーキライニング製造時に使用されるフェノール樹脂そのものにはこれら組成は含まれておらず，不定形粒子中からクリソタイルの構成元素のスペクトルが得られたことは，これらの粒子中にアスベストの成分が含まれていると考えられた．

2) X線回折分析について

X線回折分析法ではアスベストの各種類による定性，定量分析が比較的容易にできる．われわれは，当初 Table 1 の条件でなく，Cu 管球でモノクロメータを使用しないで分析を行なった．標準試料（クリソタイルおよびアモサイト）に対しては，十分な回折ピークが得られ，クリソタイルは回転角（2θ, CuKα）が12° および

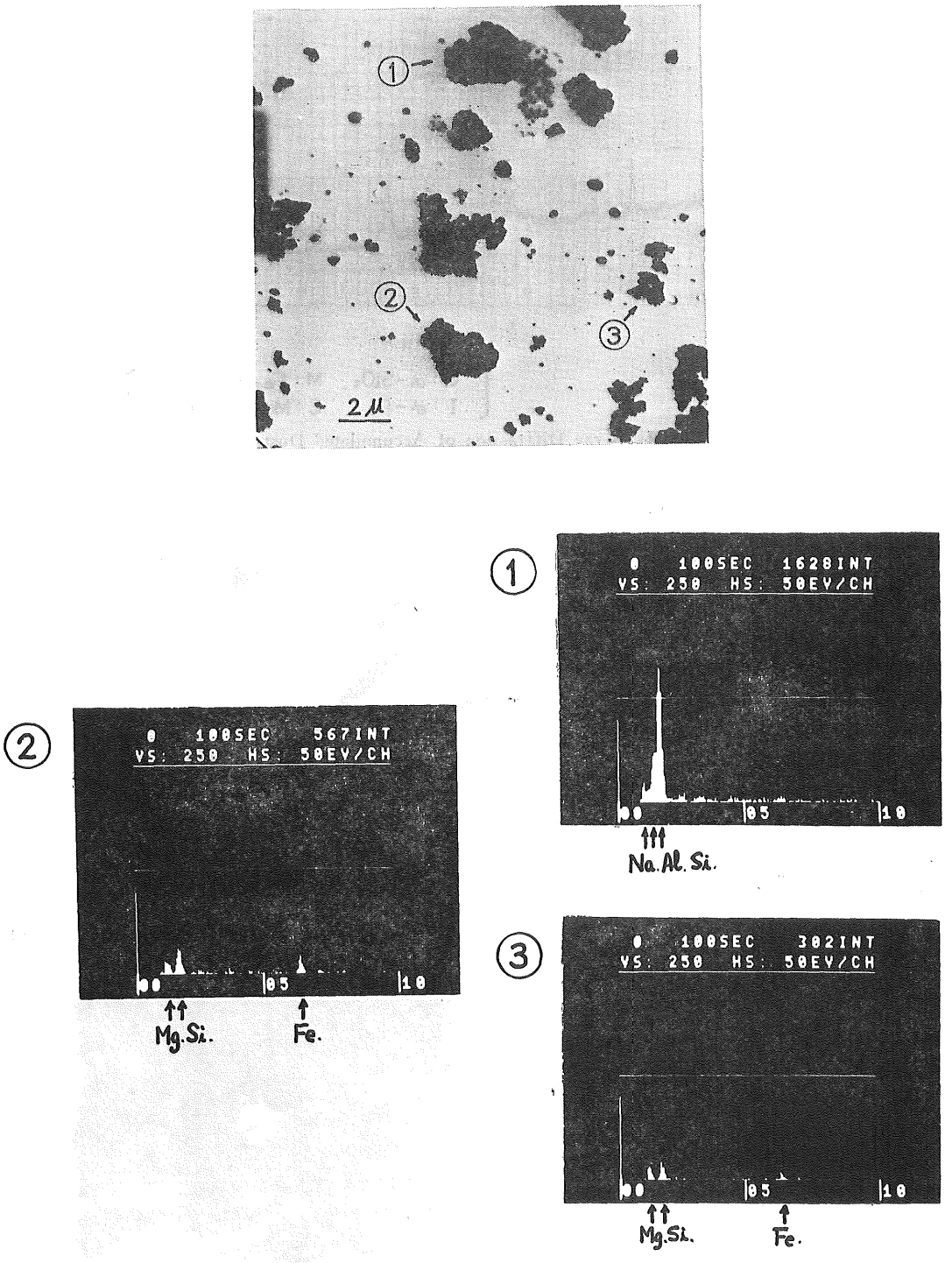
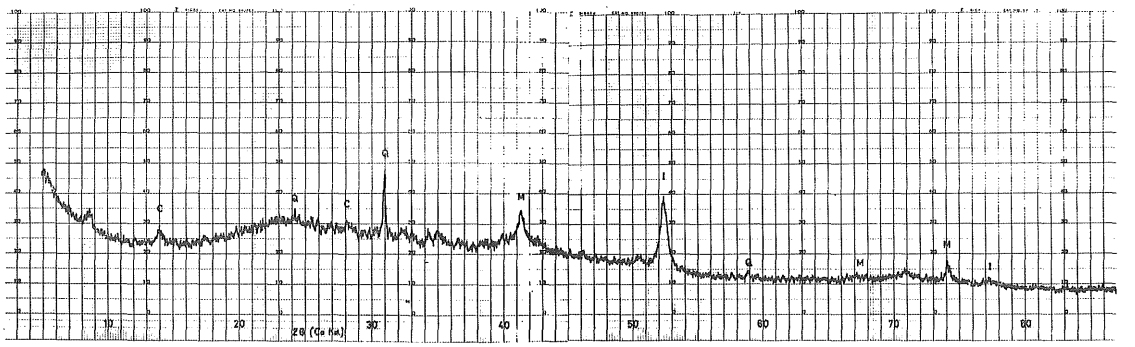


Fig. 1. Brake Drum Dust
Spectrum of EDX→Analyzed Particle

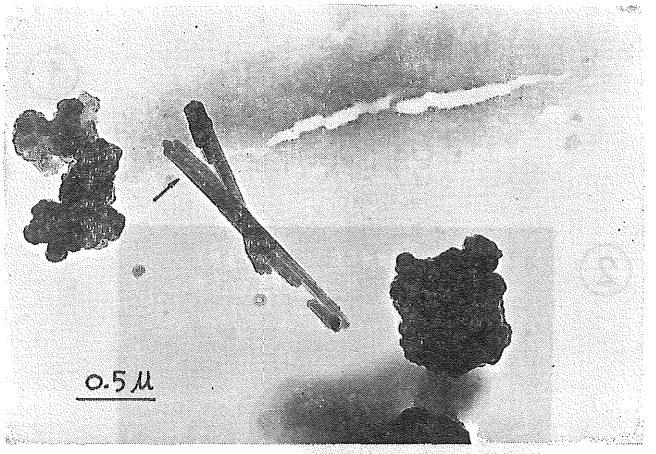


[Q : α-SiO_2, M : Fe_3O_4
I : α-Fe, C : $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$]

Fig. 2. X-ray Diffraction of Accumulated Dusts

24.3° のピークを，アモサイトについては10.6° および29.0° の各ピークを確認すればよいことがわかった．しかし，当初の条件では実サンプル中からアスベストの回折ピークは得られなかった．この原因としてはサンプル中のアスベストが相当程度に微量のため，バックグランドにかくれてしまい回折ピークとして検出されにくいのではないか，また，ブレーキドラム内の摩擦熱によりアスベスト中の H_2O つまり結晶水がぬけて非晶質な状態に結晶構造が変わってしまい回折ピークがとれないのではないか等が考えられた．そこで回折の S/N 比をよくし検出感度をあげるため，試料等からの２次X線がカットされるモノクロメーター（グラファイト製）を使用することにより，堆積塵中から回折ピークが得られ，解析の結果，クリソタイルと同定した．その結果を Fig. 2 に示したが，その他に α-SiO_2, α-Fe, Fe_3O_4 が検出された．その定量については，神山[8] の方法を用いタルク中に標準クリソタイルを０～５％水中懸濁混合により検量線を作成し，回折強度（cps）よりクリソタイル重量(％)を求めてみると，今回の試料については0.4，0.3％程度と極めて少量であった．

通常ブレーキライニングはフェノール系樹脂とアスベスト（主にクリソタイル）に若干の金属を混合して作られていると言われ，アスベストとしては40～50％が含有されている．しかし今回の結果をみると，その百分の一程度に減少していることがわかった．そこでブレーキ作動時の摩擦熱を600°Cと仮定し，標準クリソタイルを加



(Magnification×30000)

Fig. 3. Transmission Image of Brake Drum Dust and Electron-ray Diffraction Pattern (⟶Alanyzed Particle)

熱焼成してみると，明らかに時間と共にクリソタイルの回折ピークが変化していくことが認められた．つまり，焼成30分ではまだクリソタイルのピークが減少しているのが認められている．しかし，1時間焼成後，2時間焼成後についてはクリソタイルのピークが消失し，新たなピークが得られた．このピークについてASTMカードにより検討を行い，フォルステライト（かんらん石）Mg_2SiO_4 と同定した．したがってブレーキライニングについても，ドラム内の摩擦熱により徐々に変成していくものと推定された．

3) 透過電顕観察（TEM）および電子線回折について

前述したようにSTEMによる観察で線維状粒子の確認ができなかったが，X線回折によりアスベストの存在が認められたので，TEM用の試料を作り直して，STEM観察より加速電圧を60kvから100kvにあげ，倍率を20000倍に固定して，多くの視野を観察した結果，Fig.3に示した線維状粒子を見い出した．そしてこの粒子の結晶構造の確認（同定）のため電子線回折を試みた．その解析にあたっては，前もって同じ条件で電子線回折写真をとっておいた標準クリソタイル，アモサイト，クロシドライトと比較することにした．その結果，この線維状粒子についてはクリソタイルと似た回折パターンであったのでクリソタイルであると認めた．写真からみて長さは1.5μ程度，幅は0.02μ位であり，相当程度に短く切れていることを推定させる．TEMによる観察でアスベストの存在を見い出したことは，ブレーキドラムの堆積塵中には線維状の形で残っている状態もあることを裏付けた．

結　　語

1) 電子顕微鏡観察およびX線回折分析において，ブレーキドラム内の堆積塵中にアスベスト（クリソタイル）の存在をみとめ，ブレーキドラム内の堆積塵が大気中アスベストの発生源の1つでもあることを裏付けた．

2) X線回折分析による定量の結果，堆積塵中のクリソタイルは0.3%程度とわずかであった．

3) クリソタイルの加熱焼成実験により，クリソタイル自身が変成し，非晶質化したフォルステライトが生成されることがわかった．

4) EDX分析より，堆積塵中にMg, Si, Na, Al, Feのスペクトルが得られ，MgおよびSiはどの不定形粒子からもみられた．このことはクリソタイルおよびその熱変成をうけたフォルステライトが，その中に存在していると推定された．

謝辞 電子顕微鏡観察において，適切な助言をいただいた当所中央機器室前木吾市主任研究員に深謝します．

（本研究は昭和52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，概要は大気汚染学会第19回大会1978年9月で発表した．）

文　　献

1) Thomson, J. G. : Annals of the New York Academy of Sciences, 132(1), 196, 1965
2) 溝口　勲：日本公衆衛生雑誌，16(3)，428，1969
3) 木村菊二：産業医学，16(5)，228，1974
4) 佐藤泰仁，溝口　勲：東京衛研年報，26-1，272，1975
5) 佐藤泰仁，溝口　勲：東京衛研年報，27-1，229，1976
6) 日本産業衛生学会：産業医学，18，342，1976
7) Harington, J. S. : Annals of the New York Academy of Sciences, 132(1), 42, 1965
8) 神山宣彦：環境保全研究成果集(II)，86-1，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 336—338, 1978

東京都民の食品からのクロム一日摂取量

多田宇宏*, 溝口 勲*, 二島太一郎*, 秋山和幸*
野牛 弘*, 長崎 護**

Daily Chromium Intake from Diet in Tokyo

TAKAHIRO TADA*, ISAO MIZOGUCHI*, TAICHIRO NISHIMA*, KAZUYUKI AKIYAMA*, HIROSHI YAGYU* and MAMORU NAGASAKI**

In order to assess the daily dietary intake of chromium, the concentration of chromium in 18 representative menus for adult inhabitants in Tokyo and in 47 individual food specimens was analysed by the use of a flameless atomic absorption spectrophotometry technique. The average daily dietary intake of chromium for general public was estimated as 31.40±18.73μg. The daily absorption estimated through the above mentioned value and the absorption rate via intestinal tract (3%) was similar to that of daily excretion of chromium into urine. The average concentration of chromium in 47 foods was 23.25±80.41 ng/g, however, in processed foods it was higher than in other crude foods.

緒　言

昭和50年，クロム鉱滓投棄による環境汚染が大きな社会問題になった．クロム酸製造工場労働者の肺癌によるいく人かの死亡例も時を同じくして伝えられたことと相まって，住民の間だけでなく，行政当局，学界なども含めて，この問題には大きな関心がよせられた．東京都衛生局は，区，区医師会との協力のもとに，住民の健康診断や自覚症状の調査，尿中クロム量の測定などを大規模に行なった．尿中クロム量は一時，鉱滓投棄地域がコントロール地域に比べて多少高かったが，昭和51年には，ほとんど差がない[1]という結果であった．肺中に正常人の数十，数百倍のクロム濃度を示す離職後4～5年のクロム労働者の尿中クロム量が，正常人とほとんど差がない[2]ことからも，尿中クロム量は，近い過去，あるいは現在のクロム暴露増加の指標になると考えられた．鉱滓からは，ダストの形で飛散し，経気道的に体内に入るが，クロムによる身体負荷を評価するためには，さらに経口的な1日クロム摂取量を知ることが必要である．そのためにわれわれは，都民成人18名の1日の喫食物および18種47件の単一食品について昭和52年5月に分析を行ない，日本での従来の報告[3]と大きく異なった結果を得たので報告する．

分　析　法

24時間以内に喫食したものすべてを，陰膳方式で集め，全量をホモジナイズし，その一部（20～30 g）を，ケルダールフラスコ（300ml）にとり，硫酸 2ml，硝酸 60～90ml，過塩素酸 2ml を加え，灰化し，灰化液を50 ml にメスアップして測定液とした．測定液 20μl を，フレームレス原子吸光法により測定し，得られたピーク値を，標準液で得た検量線により，濃度に換算した．単一食品についても同様な方法で分析を行なった．

通常ホモジナイズには，ステンレス製カップ，刃およびふたが用いられるが，ステンレスがクロム合金であるために，試料が汚染されるので，カップはパイレックス製ガラスカップ，刃は真鍮製，ふたの部分についてはテフロンコーティングしたものを使用した．

装置　原子吸光分析装置：日本ジャーレルアッシュ AA-8500 型2チャンネル原子吸光炎光共用分光分析装置フレームレスアトマイザー FLA-10付，ホモジナイザー：日本精機製作所製ユニバーサルホモジナイザーHD

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**東京都衛生局公害保健課

型.

測定条件 クロム分析線：357.9nm，バックグランド補正用チタン分析線：364.3nm，DRY：20A，25sec，ASH：90A，60sec，ATOMIZE：280A，8sec，Gas flow：アルゴンガス，3l/min，Sample size：20μl.

結果および考察

喫食物からの1日クロム摂取量を，表1に，単一食品中のクロム含有量を，表2に示す.

喫食物からの1日クロム摂取量は，平均値で，31.40±18.73μg，最高値は，68.98μg，最低値は，5.82μg であった．最高値と最低値とは，約12倍の違いがあり，個人の食事内容によってクロム摂取量に大きな差があることがわかった．また1日の喫食量と1日の食事からのクロム摂取量との間には，相関がみられなかった．このことは，単一食品中のクロム含有量に大きなバラツキがあるためと考えられる.

単一食品中のクロム含有量は，湿重量あたりの平均値で，23.25±80.41ng/g，最高値は，ちくわAの，550.93 ng/g，最低値は，牛乳Aの 0.17ng/g であった．単一食品中のクロム含有量は，極めて大きなバラツキを示し，ちくわ，かまぼこなどの練製品が他の食品と比べて極めて高い値となり，パンにおいても加工パンのほうが食パンより高い値となっている．これは，練製品など加工したものに，加工の際に使用される器具，容器などからのクロムが移行するためであると考えられる．ステンレス製の鍋やクロムメッキされた食器などを用いて食品を調理した場合に，原食品（コントロール）よりもクロム濃

表 1. 都民一日のクロム摂取量

	喫食量	摂取量
A	1875	17.94
B	1848	69.98
C	1836	24.40
D	1316	5.82
E	2211	22.23
F	2558	14.40
G	1708	11.93
H	865	21.86
I	1780	12.75
J	1548	58.00
K	1880	31.98
L	2320	33.83
M	1902	12.31
N	2010	66.93
O	1700	35.67
P	1784	33.47
Q	1850	49.20
R	2002	43.55
	g/day	μg/day

表 2. 食品中のクロム含有量

食品名	含有量
グレープフルーツ	0.92
甘夏カン	1.05
トウフ A	2.00
〃 B	4.22
〃 C	3.04
加工パン A	15.35
〃 B	14.08
〃 C	20.26
食パン A	10.75
〃 B	11.19
〃 C	11.57
フランスパン	9.37
米 A	0.60
〃 B	3.89
〃 C	0.55
ジャガイモ A	0.64
〃 B	0.93
〃 C	1.88
〃 D	2.39
〃 E	2.98
ニンジン A	6.85
〃 B	3.43
ホウレン草 A	31.36
〃 B	18.66
ダイコン A	13.84
〃 B	6.63
〃 C	4.02
白菜 A	8.50
〃 B	5.88
リンゴ A	13.67
〃 B	4.27
あじ	1.66
いわし A	0.43
〃 B	6.17
かき	50.15
ちくわ A	550.93
〃 B	57.00
〃 C	80.21
かまぼこ A	29.90
〃 B	30.13
〃 C	43.95
豚肉 A	2.43
〃 B	3.73
卵 A	0.31
〃 B	0.45
牛乳 A	0.17
〃 B	0.34
	ng/g

度が，プラス10%～700%も増大することがわれわれの実験によって確かめられた．

食事からのクロム摂取量について，シュレーダー，レーヴィン，ティプトン，マーツらの報告[4-7]でも 5μg～数百 μg までの範囲におよんでいる．日本においては，村上，山県らは，都市成人の食事からの1日クロム摂取量を，平均値で 723μg であるとしている[3]．これとわれわれとの結果を比較すると，約20分の1という極めて低い値になる．

体内に吸収されたクロムは，主に尿中に排泄されるので，尿中クロム量についてみてみると，著者らが昭和52年3月に分析を行なった都民69名の尿中クロム量は，平均値で，1.0±0.8μg/l であり，クロムの腸管吸収[8]が3価で3%弱，6価で30%強であることから，計算上クロムの腸管吸収を3%とし，浮遊粉じん中のクロム濃度を，0.03μg/m^3，成人1日の空気呼吸量を20m^3，肺からのクロム吸収率を50%として試算式をつくると，1日のクロム体内吸収量＝1日の食事からのクロム摂取量(31.40μg)×クロムの腸管吸収率(0.03)＋浮遊粉じん中のクロム濃度(0.03μg/m^3)×呼吸量(20m^3)×肺からのクロム吸収率(0.5)＝1.242μg と計算され，体内に吸収されたクロムの約80%が尿中へ排泄されるとすれば，クロムの尿中排泄量＝1.242μg×0.8＝0.9936μg と計算される．1日のクロム尿中排泄量を，尿中クロム濃度の面から，成人1日の尿量[9]を1.1l として計算すると，尿中クロム濃度 (1.0μg/l)×尿量(1.1l)＝1.1μg となり，1日のクロム体内吸収量から計算した場合より，いくらか高めだが，尿中クロム濃度値の標準偏差内である．このことから食品からのクロム1日摂取量は，おおよそ妥当な値と考えられる．

単一食品中のクロム含有量についても，村上，山県らの報告[3]と比べ，極めて低い値を示した．もちろん土壌中のクロム濃度[10]も大きなバラツキがあり，当然，野菜，果物，穀類なども産地によって相当なクロム濃度の違いを生じるが，この極端な値の相違は，主として分析法の違いによるものと考えられる．

今回の分析でのクロム添加回収率は，89%であり，尿中クロム濃度からみても，われわれの値の妥当性には十分な根拠があるものと思われる．

経口的なクロム摂取量が，このように低い値であるので，前述の試算式からもわかるように経気道的なクロム体内摂取量は，かなりのパーセンテージを示すことになり，大気汚染物質としてのクロムが軽視しえないことも示された．

謝辞 フレームレス原子吸光法を用いてのクロム分析の初期検討段階における日本ジャーレルアッシュ株式会社技術部第一課課長補佐松原道夫氏の御協力に感謝致します．

文　献

1) 東京都公害局：6価クロム鉱さいによる土壌汚染対策報告書，1977
2) 溝口　勲：未発表資料
3) Murakami, Y., Y. Suzuki, T. Yamagata, and N. Yamagata : *Journal of Radiation Research*, **6**, 105, 1965
4) Schroeder, H. A., A. P. Nason, and I. H. Tipton : *Journal of Chronic Diseases*, **23**, 123, 1970
5) Levine, R. A., D. P. H. Streeten, and R. J. Doisy : *Metabolism* **17**, 114,1968
6) Tipton, I. H., P. L. Stewart, and P. G. Martin : *Health Physics*, **12**, 1683, 1966
7) Mertz, W. : *Physiological Reviews*, **49**, 118, 1969
8) 中川敦子，長井二三子，原しげ子，金西信次，道源正子，中尾順子：東京衛研年報，**28-2**，118，1977
9) 蓑島　高：日本人体正常数値表，第二版，1967，技報堂，東京
10) 東野徳夫：鉱山地質，**5**，19，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 339—342, 1978

毛髪および血液中の水銀量とセレン量について（一般人と魚介類多食者の比較）

二島太一郎*, 池田真悟*, 多田宇宏*
野牛弘*, 溝口勲*

Concentration of Mercury and Selenium in Hair and Blood (Control Human and Fish-eaters)

TAICHIRO NISHIMA*, SHINGO IKEDA*, TAKAHIRO TADA*,
HIROSHI YAGYU* and ISAO MIZOGUCHI*

Total mercury(T) as well as methyl mercury(M) levels of hair and blood derived from human which had many chances to eat fishes were significantly higher than those of control human, but both selenium (Se) levels of hair and blood were not significantly different. The average levels of Se in the hair (mean±SD, ppm) and blood (mean±SD, μg/100g) were 1.08±0.53, 12.48±5.35 in control men (AG), 0.64±0.25, 13.88±4.01 in control women (BG), 0.94±0.53, 9.65±4.72 in fish-eater men (CG) respectively. The correlation between levels of mercury and Se in hair and blood was not found.

はじめに

現在わが国の食生活の特殊性として，動物性蛋白源を魚介類に多く求めている．その影響の結果として，わが国国民の体内水銀蓄積量は世界のトップレベルにあることは周知のとおりである．

魚介類は水銀を高濃度に含有していると同時に，ある種の大型魚類はセレンも高濃度に含まれていることが知られている[1-3]．したがって，魚介類を多食している人々の体内には水銀と同時にセレンも多量蓄積されていると考えられ，セレンの生活環境における動態が注目されてきている．

水銀汚染の指標としては，人の血液および毛髪が材料として繁用されている．セレンも同様に動物実験の結果から，血液および体毛中のセレン濃度はセレン摂取量に比例しており，これらを分析することにより汚染の程度を知ることができる[4,5]．過去の日本人の毛髪中セレン濃度についての調査は若干あり[6-9]，また一般人とマグロ多食者の毛髪を調べて両者の毛髪中セレン濃度に差がないことを報告しているものもある[10,11]．しかし，セレンが体内に摂り込まれた際の最も正確な指標となりうる血液中セレン濃度と毛髪中セレン濃度との関連性をみた調査はいまだ実施されていない．著者らはこの点をふまえて一般人とマグロ多食者の毛髪および血液を分析して，これらにおけるセレン蓄積量の実態を把握し，セレン蓄積量とマグロ喫食頻度の関連を水銀の摂り込みと並行して明らかにしようとした．

実験方法

1. 被検者　都内在住成人で一般的な食生活をしている男女計52名（男性27名，女性25名），都内在住のマグロ多食者（面接調査の結果，1日当り約100gのマグロ類を喫食している成人男性）31名について，毛髪および血液を採取した．以後これらの被検者集団を次のように略称する．一般成人男性……AG，女性……BG，マグロ多食者……CG

2. 調査期間　昭和50年7—8月

3. 試料の調製　1) 毛髪は前報記載[12]のとおり処理した．2) 血液は採血後ヘパリン添加した試験管に取り，よく攪拌して測定に供した．放射化分析に際してはこの一部を凍結乾燥後ポリエチレン袋に封入して測定に供した．

4. 測定方法　総水銀（以下Tと略記）およびメチル水銀（以下MMと略記）は前報[13]の方法に準拠し

* 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. T, M and Se Levels in Hair and Blood in Control and Fish-eaters

		T			Se			M		
		AG	BG	CG	AG	BG	CG	AG	BG	CG
Hair (ppm)	n	27	13	31	27	13	31	26	13	21
	Max	10.2	4.6	32.5	2.8	1.3	2.3	11.3	3.7	32.4
	Min	2.6	1.2	6.0	0.3	0.4	0.4	1.6	0.8	4.4
	R	7.6	3.4	26.5	2.5	0.9	1.9	9.7	2.9	28.0
	Mean	5.58	2.97	15.27	1.08	0.64	0.94	4.82	2.38	12.36
	SD	1.98	0.95	6.89	0.53	0.25	0.53	2.27	0.78	6.19
	CV	0.35	0.32	0.45	0.49	0.39	0.56	0.47	0.33	0.50
(Blood) (μg/100g)	n	21	25	31	21	25	31			
	Max	6.6	5.2	11.7	25.6	24.9	21.4			
	Min	1.6	0.9	2.9	4.9	6.4	2.0			
	R	5.0	4.3	8.8	20.7	18.5	19.4			
	Mean	3.24	2.60	6.57	12.48	13.88	9.65			
	SD	1.33	0.87	2.37	5.35	4.01	4.72			
	CV	0.41	0.33	0.36	0.43	0.29	0.49			

た．セレン（以下 Se と略記）は立教大学原子力研究所 TRIGA II型原子炉（熱中性子束 1.7×10^{12}n/cm^3/sec）で約30時間断続中性子を照射して放射化し，適時冷却後 Ge (Li) 検出と4000チャンネル波高分析器で測定した．

結　果

対照群AG27，BG25名およびCG31名についての算術平均値，最大最小値，範囲および変動係数を表1に示した．なお毛髪と血液が組になったものは，AG21組，BG13組およびCG31組で，メチル水銀については毛髪のみについて実施した．

1. 毛髪について　毛髪中TおよびMMは魚介類を多食する集団CGが対照群AG，BGに比較して有意の差を示した．またAGとBG間に性差を認めた($p<0.01$)．

Se はAGとCG，BGとCG間に有意の差を認めなかったが，AGとBG間に性差を認めた（$p<0.01$）．

2. 血液について　血液中Tは毛髪同様CGが有意に高くAGとBG間に性差をを認めた（$p<0.01$）．

Se はAGとCG，AGとBG間には有意の差を認めなかったがBGとCG間には有意の差を認めた（$p<0.01$）．

3. 毛髪と血液の関連について　毛髪および血液中の水銀と Se の相互関係を知るためにそれぞれの相関係数を求めて表2に示した．各グループとも毛髪中 Se はTおよびMMと，血液中 Se はTとそれぞれ有意の関係が認められなかった（$p<0.01$）．

Table 2. Correlation Coefficient between Mercury and Se in Hair and Blood

		AG	BG	CG
n		27	13	31
Hair	T-Se	0.162	−0.467	0.268
	M-Se	0.023	−0.379	0.342
Blood	T-Se	0.028	−0.377	0.307

$r=(26:0.01)=0.478$
$r=(12:0.01)=0.661$
$r=(30:0.01)=0.449$

考　察

最近，セレン元素の生理学的役割が注目されるようになってきた．そのきっかけは，マグロにふくまれるメチル水銀の毒性が共存する Se によって緩和されるという Ganther ら[2] の研究であった．また以前においては Se 自身水俣病発症の要因ではないかと疑われたこともあった．現在 Se はガラス，ゴム，電子工業等に需用が増大し，わが国の Se 生産量はこれに伴って世界第1位となり，1973年における金属 Se の生産量は343トンと見積られている．今後生活環境における人への影響が注目される元素である．

Se がGanther ら[2] の指摘しているようにメチル水銀の毒性発現緩和に役立つとすれば，魚介類にどの程度存在しているかが知りたいところであった．西垣ら[3] がマグロ，カジキ類について調査した結果は，魚体の大小，

種類にかかわらず0.6～1.1ppm の範囲にあり，かつ水銀量を越えていた．したがって，マグロを多食することによって当然体内 Se 摂り込み量が増え，毛髪，血液および諸臓器中の蓄積量も高まるであろうと推定できる．この点について，魚介類喫食頻度と Se の関連をみたわが国の調査は，山中ら[10]によれば，マグロを多食するマグロ漁船員の毛髪中のTは一般人に比較して高濃度に存在しているが，Se は 0.82～1.2ppm で，一般人の0.39～0.71ppm に比較して有意の差はなかった．また賀来ら[11]も同様に離島にあって魚食の機会の多い漁師の毛髪中 Se を調べたが，漁師 0.024ppm，同島在住一般人 0.027ppm と差を認めていない．著者らも同様に一般人男性 1.08±0.53，女性0.64±0.25，多食者 0.94±0.53 ppm であって，毛髪中 Se と魚食との関連性を見いだせなかった．

現在までのわが国一般人の毛髪中 Se 濃度に関する調査の結果は，高野[6] 1.2ppm，鈴木ら[7]男性0.86±0.03，女性0.79±0.04，白井ら[8] 0.57±0.13，大森ら[9] 0.5±0.5ppm で 0.5～1.2ppm の範囲に平均値があった．先に示した賀来ら[11]の平均値は，同じ試料処理法，同じ Watkinson のけい光分析法に準じて測定した鈴木ら[7]の平均値と比較してみても，ケタはずれに低値であり疑問の残る値であった．

血液中 Se 濃度は表1に示したとおり，一般人男性 12.48±5.35，女性13.88±4.01，多食者 9.65±4.72μg/100g でマグロ喫食によって血液中 Se レベルは増加していないことが認められた．むしろ一般女性が多食者よりも有意に高い結果を得た．わが国における一般人の血液中 Se 濃度に関する報告は少なく，三村[14]はけい光測定法によって分析した平均値は 9.8μg/100m*l* で，年齢と共に増加の傾向があったと報告している．著者らの結果は若干高い値であったが，おおむね日本人の血液中 Se 濃度を代表する値であろう．一方食生活，生活地域の異なる外国人の値は日本人に比較してかなり高値で，イギリス人 32μg/100m*l*[15]，アメリカの19の都市の住民の平均値の範囲 15.7～25.6μg/100m*l* である[16]．尿も同様で，アメリカ人42μg/*l* イギリス人34μg/*l* に対して日本人小学生の平均値 0.86μg/*l* とかなり低い値であった[17]．

Se の食物を介しての摂り込みが毛髪および血液に反映することは，動物実験の結果から明らかである．しかし著者らの結果を含めて一般人とマグロ多食者間には，毛髪および血液中の Se 濃度に差異を認めていない．この原因を解明するためには一般人の食生活を考慮しなければならないであろう．一般的な食生活者は魚介類多食者よりもむしろ動物性蛋白源を肉，乳製品，卵等に求めている．したがって，これらの食品中からの Se 摂り込み量が多くて，一般人と多食者の間の毛髪および血液中濃度に差が認められなかったのであろうか．残念ながらわが国の一般食品中の Se 量を調査した報告がないので，外国の調査結果からこの疑問についての推論を試みた．

アメリカおよびドイツの食物および水の Se 量（fresh basis）は詳細に調べられており，動物性食品においては肉類 0.22～0.5μg/g，チーズ 0.09～0.10μg/g，卵 0.10μg/g，牛乳0.012μg/g，米0.32μg/g，コムギ0.37～1.30μg/g 等である．これらの結果より，おおよそ1日 25～200μg の Se を摂り込んでいると推定している[18]．一方 Schroeder ら[19]は1日の病院食を調査し，62.3μg の Se が摂り込まれていると報告している．著者らの調べたマグロ多食者は，1日平均 100g のマグロを喫食していたので，マグロの Se 濃度を平均 0.7ppm として，1日当り 70μg の Se を摂取していることになる．一方一般食生活者については外国人の場合先に述べたように，1日 25～200μg 摂り込んでいるから，中間をとれば 100μg，日本人はもう少し肉類の喫食を少ないと見てその半分 50μg とすれば，マグロ多食者と比較してほぼ同程度の Se 量を1日に摂り込んでいると考えられる．したがって両群間の毛髪および血液中の Se 濃度は当然差がないことになる．

しかしここで考慮しなければならないことは，物質の摂取量（口から入った量，in take）よりもむしろ吸収量（腸管吸収後の量，up take）である．Se の食品中における存在形態，その際の共存元素および物質によって腸管吸収率の変動が当然起る．この点を詳細に検討しなければ，Se は水銀とは体内分布が異なり，毛髪および血液は Se 摂取量の指標となりうるかどうかの点に言及することはできない．

まとめ

一般的な食生活をしている成人男女52名（男性27名，女性25名），マグロ多食者31名（男性）について，各人の毛髪と血液中のT，M（毛髪のみ）および Se を測定し次の結果を得た．

1. 毛髪および血液中のTおよびMは一般人に比較してマグロ多食者に有意に高く，従来の報告を確認するものであった．

2. 毛髪中 Se 濃度は一般人男性1.08±0.53（平均値±標準偏差，ppm），女性 0.64±0.25，多食者 0.94±0.53で，一般人男女と多食者間には有意の差を認めなかったが，一般人男女間に性差を認めた（$p<0.01$）．

3. 血液中 Se 濃度は一般人男性 12.48±5.35（平均値±標準偏差，μg/100g），女性13.88±4.01，多食者9.65±4.72で一般女性と多食者間に有意の差を認めた（$p<0.01$）．

4. 一般食生活者とマグロ多食者の毛髪および血液中の Se 濃度は，水銀と異なり大きな差を示さなかった．この原因は，マグロ多食者と同様に一般食生活者は，食事内容からみてかなりの Se を肉類および乳加工品から摂り込んでいるためと推論した．

5. 毛髪中 Se はTおよびMと，血液中 Se はTとの有意の相互関係は認められなかった．

謝辞 本研究の放射化分析に御教授いただいた，立教大学原子力研究所戸村健児教授に深謝いたします．

（本研究の要旨は，第46回日本衛生学会1976年において発表した．）

文　献

1) Kifer, R. R., W. L. Payne, and M. E. Ambrose : *Feedstuffs*, **41**, 24, 1969
2) Ganther, H. E. and C. A. Baumann : *Science*, **175**, 1122, 1972
3) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫，山田　洋，嶋村保洋，落合節子，木村康夫：東京衛研年報，**25**，235，1974
4) 長谷川明，鈴木康雄，浦久保五郎：衛生化学，**20**，67，1974
5) 長谷川明，鈴木康雄，浦久保五郎：衛生化学，**20**，273，1974
6) 高野雄二：四国医学誌，**15**，1861，1959
7) 鈴木助治，原田裕文，小泉清太郎，戸谷哲也：衛生化学，**19**，82，1973
8) 白井文雄，坂井正昭，田村良三，斉藤真一，佐藤　繁，大山征也：日本公衛誌，**23**，599，1976
9) 大森佐与子，三浦武夫，日下　譲，辻　治雄，佐川直史，古谷史郎，王利祐三：第48回日本産業衛生学会講演集，400，1975
10) 山中すみへ，河合正計，上田喜一：第48回日本産業衛生学会講演集，420，1975
11) 賀来俊輔，山口誠哉，倉田昭一，下条信弘，広田良夫，桑原芳郎，石田乃也：産業医学，**17**，40，1975
12) 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
13) 二島太一郎，池田真悟，多田宇宏，野牛　弘，溝口勲：東京衛研年報，**27-1**，258，1976
14) 三村春雄：日本公衛誌，**22**，526，1975
15) Bowen H. J. and P. A. Cawse : *Analyst*, **88**, 721, 1963
16) Allaway, W. H., J. Kubota, F. Losee, and M. Roth : *Arch. Environ. Health*, **16**, 342, 1968
17) Klayman, D. L. and Wolfgang H. H. Günther : *Organic Selenium Compounds*, 699, 1973, John Wiley, Toronto
18) ibid, 652-655
19) Schroeder, H. A., D. V. Frost, and J. J. Balassa : *J. Chronic Dis.*, **23**, 227, 1970

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 343—348, 1978

塩化メチル水銀の *IN VITRO* 抗体産生に及ぼす影響（第2報）
LIPOPOLYSACCHARIDE, CYCLIC AMP との相互作用

瀬戸　博*, 秋山和幸*

Effect of Methylmercury Chloride on Humoral Immune Responses *in Vitro* (II)
Interaction of Methylmercury Chroride with Lipopolysaccharide or Cyclic AMP

HIROSHI SETO* and KAZUYUKI AKIYAMA*

The interaction of methylmercury chloride (MMC) with lipopolysaccharide from *E. coli* (LPS) or dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (DBc-AMP) on the immune responses to sheep erythrocyte *in vitro* was investigated. LPS failed to function as an adjuvant on the responses of both primary and secondary reaction, when MMC was present in the culture. The numbers of nucleated cells in the secondary immune response were increased by addition of LPS. This tendency was not altered even if MMC coexisted. The adjuvant ability of LPS was not changed whether it was treated or not with MMC at 37°C for 48 hrs. This result suggests that none of the complexes is induced from them and they act to cells independently. Although the function of immunological memory was obstructed by MMC *in vivo*, high adjuvant effect of LPS was observed on these spleen cells *in vitro* secondary response. DBc-AMP increased the number of antibody forming cells. However the failure to enhance the immune response was observed when MMC coexisted with DBc-AMP. In this culture system, the response was more suppressed than that of the culture with only MMC. These results are discussed in view of the possibility in cellular injury, especially in T cells, by action of MMC.

緒　言

前報[1]では，塩化メチル水銀（以下 MMC と略記する）が，*in vivo* のみならず *in vitro* においてもマウスの脾細胞による抗体産生を阻害することを報告した．この事実は，ホルモン等を介在せずとも MMC が直接的に免疫担当細胞に作用し，抗体産生を阻害しうることを示唆している．

リンパ球 population としては，B cell, T cell(helper および suppressor）があるが，これらは抗体産生の際，異なった役割を担っている．B cell は抗体産生細胞の前駆細胞であり，T cell, A cell (adherent cell, マクロファージと考えてよい）との直接または間接的な相互作用の後，プラズマ細胞へと分化し抗体産生を行なう重要な細胞である．そこで B cell 機能に対する MMC の影響を調べるために lipopolysaccharide（以下 LPS と略記する）との相互作用を検討した．LPS はグラム陰性菌から得られたもので，B cell に対して細胞分裂作用がある[2,3]．しかも強力な抗体産生アジュバント効果を有している[4,5]．構造的には，LPS はO側鎖，R鎖，リピドAの3つの部分からなっており，リピドA部分に細胞分裂作用とアジュバント作用がある[6,7]．

また抗体産生を阻害する程度の極低濃度レベルでの MMC の細胞影響の1つとして膜 adenylate cyclase への酵素阻害作用が知られている[8]．さらにマウスに adenylate cyclase の activator であるコレラトキシンを前投与すると，その後の MMC の毒性を減弱し，抗

* 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

体産生能を回復する作用がある[9]という．*c*-AMP が免疫反応に重要な役割を果すことから，MMC の抗体産生能阻害作用と *c*-AMP 濃度とを関連づけることも重要であろう．

本報の目的は，MMC と LPS または *c*-AMP を組み合わせることによって，MMC の抗体産生系細胞への影響を多角的に考察することである．

材料および方法

動物，MMC 前報[1]と同様である．

抗原 ヒツジ赤血球（以下 SRBC と略す）．Alsever 液で処理したヒツジ保存血液（Japan blood 製）を生理食塩水で2回洗浄後10%および1%とした．

LPS lipopolysaccharide W, *Escherichia coli* 0111 : B4 (DIFCO) を生理食塩水に溶解させ 1mg/m*l* とした．

***c*-AMP** N_6, O'_2-dibutyryl adenosine 3′, 5′ cyclic monophosphoric acid sodium salts（以下 DBc-AMP と略記する）SIGMA D0627 Grade II を生理食塩水に溶解させて使用した．

LPS の MMC 処理と反応生成物の精製 1mgのLPS 0.2m*l* と 10^{-5}M の MMC 1m*l* を滅菌した 10m*l* のふた付試験管内に入れ37°C で48時間反応させた．対照として 10^{-5}M の MMC の替わりに生理食塩水 1m*l* を加えた．次に内容物を滅菌した Marbrook bottle の内側チェンバーに移し，4°C にて10日間透析し，未反応の MMC を除いた．透析用生理食塩水は約 500m*l* ずつ毎日全交換した．こうして得た生成物はミリポアフィルタ（0.45μ）でろ過し，滅菌したふた付試験管内にて貯蔵した．以後，MMC で処理した LPS を LPS-M，生理食塩水のみで同様の処理をした LPS を LPS-O と略記する．

超遠心法による分析 装置は日立282型分析用超遠心機でシュリーレン光学系を使用した．セルはダブルセクターセル（032—0319，12mm）を使用した．測定条件は回転数：10,000rpm および 60,000rpm，温度：20°C にて行なった．

MMC の経口投与 MMC 30mg を 20m*l* のサラダ油に溶解し（1.5mg/m*l*），その 0.2m*l* を経口投与した．対照群にはサラダ油のみを同量経口投与した．

免疫，脾細胞浮遊液の調整，細胞培養，抗体産生細胞の測定法 前報[1]と同様に行なった．

結　果

***in vitro* における抗 SRBC 抗体産生に及ぼす LPS の影響** 免疫していないマウスの脾をとり 1×10^7cells/m*l* の細胞浮遊液とし SRBC とともに5日間細胞培養した（1次免疫反応）．実験群には LPS 30μg を添加した．結果を Table 1 に示した．LPS を添加すると著明な PFC 数の増加が認められ既報の結果[10]と一致した．また有核細胞数の増加，生存率の低下が認められた．

***in vitro* における抗 SRBC 抗体産生に及ぼす MMC と LPS の相互作用** **A.** 免疫していないマウスの脾細胞を MMC (5×10^{-7}M)，LPS (10μg) および SRBC とともに5日間細胞培養した．結果を Table 2-A に示した．実験Aは1次免疫反応である．**B.** 1次免疫したマウスの脾細胞（この実験にかぎり植え込み量は0.64×

Table 1. Effect of LPS on the Immune Response *in Vitro*

	n	viability (%)	nucleated cells ($\times10^6$)	viable cells ($\times10^6$)	PFC/culture
control	3	96	5.00	4.81	150
LPS (30μg)	3	86	6.77	5.82	3250

Table 2-A. Interaction of MMC with LPS on the Primary Immune Response *in Vitro*

	n	viability (%)	nucleated cells ($\times10^6$)	viable cells ($\times10^6$)	PFC/culture
control	6	67± 9	2.26±0.71	1.54±0.61	1150± 390
MMC	6	73±10	1.54±0.43	1.15±0.44	725± 209
MMC+LPS	5	48±14	1.98±0.33	0.97±0.43	585± 176
LPS	6	50± 6	2.87±0.59	1.44±0.39	4767±1555

MMC : 5×10^{-7}M, LPS : 10μg/culture

Table 2-B. Interaction of MMC with LPS on the Secondary Immune Response *in Vitro*

	n	viability (%)	nucleated cells ($\times 10^6$)	viable cells ($\times 10^6$)	PFC/culture
control	3	91±2	1.28±0.28	1.16±0.28	592±101
MMC	3	90±1	1.70±0.43	1.54±0.49	542±260
MMC+LPS	4	74±3	3.12±0.72	2.32±0.60	469±140
LPS	4	74±5	4.73±0.96	3.52±0.84	1169±645
LPS (noSRBC)	3	64±1	2.58±0.48	1.66±0.32	150± 66

MMC : 3×10^{-7}M, LPS : 30μg/culture

Table 2-C. Interaction of MMC with LPS on the Secondary Immune Response *in Vitro*

	n	viability (%)	nucleated cells ($\times 10^6$)	viable cells ($\times 10^6$)	PFC/culture
control	4	94±1	4.21±0.17	3.97±0.17	1250± 868
MMC+LPS (10μg)	4	81±3	5.02±0.27	4.06±0.30	312± 142
MMC+LPS (30μg)	3	79±2	5.42±0.04	4.27±0.11	308± 58
LPS (10μg)	4	86±3	5.66±0.66	4.86±0.68	2525±1327
LPS (30μg)	3	81±4	4.47±0.84	3.61±0.65	2908± 625

MMC : 3×10^{-7}M

$\times10^7$ cells) を MMC (3×10^{-7}M), LPS (30μg) およびSRBCとともに5日間細胞培養した. 結果をTable 2-Bに示した. **C.** 1次免疫したマウスの脾細胞 (1×10^7 cells) をMMC (3×10^{-7}M), LPS (10μg, 30μg) および SRBC とともに5日間細胞培養した. 結果を Table 2-Cに示した. B, C両実験は2次免疫反応である. 1次および2次免疫反応とも LPS の抗体産生能増強作用がみられるが, MMC が共存するとこの作用は完全に消失しむしろ抗体産生を抑制する(P<0.01). MMC による抗体産生阻害は LPS では回復できない. 2次反応で有核細胞数は LPS の添加により増加する (P<0.01) が, この傾向は MMC が共存しても同様に認められた (P<0.01). 以上の傾向は LPS 量を 10μg から 30μg の間で変化させても変わらなかった.

***in vitro* における抗 SRBC 抗体産生に及ぼす LPS-M の影響** **A. 1次免疫反応** 免疫していないマウスの脾細胞 (1×10^7 cells) を LPS-M, LPS-O 各 10μl および SRBC とともに5日間細胞培養した. 結果を Table 3-A に示した. **B. 2次免疫反応** 1次免疫したマウスの脾細胞 (1×10^7 cells) をLPS-M, LPS-O 各 10μl および SRBC とともに4日間細胞培養した. 結果を Table 3-B に示した. 両免疫反応とも, 各 LPS 群は対照に比べて PFC 数増加 (P<0.05), 有核細胞数増加 (P<0.01) が認められ, MMC 処理による影響はなかった. しかし処理前の LPS の方が活性が強く (P<0.01) 透析, フィルター処理による影響がみられた.

LPS-M の超遠心分析 シュリーレン光学系を用いて市販の LPS および LPS-M のみかけの沈降係数を沈降速度法により求めたところ, 両者とも 3S および 110S の2つの主分画を有していた. また両者の沈降パターンに差はみいだされなかった.

MMC の免疫記憶機能に対する攻撃と LPS による回復 1次免疫したマウスに, 1週後 1.5mg/ml の MMC サラダ油溶液 0.2ml を経口投与した. さらに2週後に殺し, 脾細胞 (1×10^7 cells) を LPS (10μg), SRBC とともに5日間細胞培養した. 結果を, Table 4-A, 4-B に示した. MMC 群では胸腺重量が約2割少ないが, 少数例のため有意とは認められない. 脾重量には差がない. また PFC 数は対照の1/2以下であり免疫記憶をになう細胞への障害がみられた. しかし, LPS を添加すると PFC 数は顕著に増加し (P<0.01), LPS 非添加の対照を上まわり (P<0.01), *in vivo* で MMC によって攻撃されても十分な LPS 感受性があることがわかった.

***in vitro* における抗 SRBC 抗体産生に及ぼす MMC と DBc-AMP の相互作用** 1次免疫したマウスの脾細胞 (1×10^7 cells) を MMC (5×10^{-7} M), DBc-AMP (1×10^{-4} M) および SRBC とともに4日間細胞培養

Table 3-A. Effect of LPS Treated by MMC on the Primary Immune Response *in Vitro*

	n	viability (%)	nucleated cells ($\times 10^6$)	viable cells ($\times 10^6$)	PFC/culture
control	7	78±11	2.18±0.50	1.74±0.63	386± 77
LPS-M (10μl)	7	74± 8	3.76±0.69	2.83±0.71	564±194
LPS-O (10μl)	6	81± 4	4.19±0.90	3.42±0.90	508±103

LPS-M, LPS-O : prepared by incubation with (M) or without (O) MMC at 37°C for 48 hrs., then purified by dialysis technique.

Table 3-B. Effect of LPS Treated by MMC on the Secondary Immune Response *in Vitro*

	n	viability (%)	nucleated cells ($\times 10^6$)	viable cells ($\times 10^6$)	PFC/culture
control	4	81	4.62	3.74	2819± 116
LPS-M (10μl)	5	83	6.54	5.43	4285±1009
LPS-O (10μl)	4	85	6.24	5.30	4725± 306
LPS (10μl)	2	75	8.64	6.48	6150± 424

LPS-M, LPS-O : prepared by incubation with (M) or without (O) MMC at 37°C for 48 hrs., then purified by dialysis technique.

Table 4-A. Effect of MMC in Mice

	n	body wt. (g)	spleen wt. (mg)	thymus wt. (mg)
control	2	24.3±0.1	85±21	49±11
MMC	3	22.8±2.1	86±11	39±13

MMC : 0.30mg/mouse

Table 4-B. Effect of MMC on Immunological Memory and Activation by LPS *in Vitro*

	n	viability (%)	nucleated cells ($\times 10^6$)	viable cells ($\times 10^6$)	PFC/culture
control	8	88	2.01	1.77	644±150
MMC *in vivo*	8	92	2.22	2.05	284±241
MMC *in vivo* LPS *in vitro*	3	—	—	—	1423±230

MMC *in vivo* : 0.30 mg/mouse, LPS *in vitro* : 10μg/culture

Table 5. Interaction of MMC with DBc-AMP on the Immune Response *in Vitro*

	n	viability (%)	nucleated cells ($\times 10^6$)	viable cells ($\times 10^6$)	PFC/culture
control	5	85±4	5.29±0.76	4.49±0.76	1560± 298
MMC	5	88±3	4.25±0.72	3.79±0.80	825± 255
MMC+DBc-AMP	4	92±1	4.62±0.38	4.26±0.40	231± 125
DBc-AMP	2	81±6	3.66±0.42	2.98±0.55	3850±1202

MMC : 5×10^{-7}M, DBc-AMP : 1×10^{-4}M

した．結果を Table 5 に示した．DBc-AMP はPFC数を著るしく増加させ（$P<0.05$）既報の結果[11]と一致した．しかし MMC が存在すると MMC 単独による阻害よりもはるかに強く抗体産生を阻害した（<0.01）．DBc-AMP 単独群の有核細胞数，生有核細胞数が少ない（各々$P<0.05$）ほかは各群の間に大きな差はなかった．

考　察

以上のように，*in vitro* における MMC による抗体産生能阻害は LPS では回復できない．また LPS のアジュバント作用は MMC によって完全にブロックされることを示した．この事実は，B cell のみを LPS で非特異的に刺激しても MMC の抗体産生能阻害作用に拮抗しないことを示している．しかし，Table 2-A を除いて LPS と MMC が共存しても有核細胞数は増加しているので MMC が共存しても B cell に対する LPS の細胞分裂作用は失活していない可能性があり，^{3}H-thymidine の取り込みの測定をし DNA 合成の確認をする必要があろう．また LPS を MMC で37°C48時間処理しても，その作用はほとんど変化しない．このことから両者が共存しても独立に各々の作用が発現されるものと期待される．

LPS のアジュバント作用の標的細胞が何であるかはまだ確立されていない．Kagnoff ら[12]によれば，LPSによってひきおこされる細胞分裂には，T cell と macrophage の両方が必要で，LPS のアジュバント作用は，おそらく T cell-macrophage 相互作用の活性化による特異的 T cell 活性の上昇の結果であろうと考えられている．しかし，さらに最近の研究で Skidmore ら[13]はこの2つの性質の間には正の相関があることを示した．すなわち，LPS の細胞分裂作用に反応しない特殊な系(C3H/HeJ) のマウスでは，アジュバント作用も見られない．さらにアルカリ処理した LPS では，他の系でも細胞分裂作用およびアジュバント作用がみられなかった．このことから LPS のアジュバント作用は T cell や macrophage の関与なしに抗原特異的なB cell 機能に限定されるとしている．しかし，いずれの説でもSRBCのような T cell 依存性抗原の場合には，T cell, B cell のうち一方でも障害を受ければ抗体産生能が低下することは明らかである．

MMC は抗体産生能を低下させるばかりでなく，免疫反応の後期に作用すると，*in vivo*[14] および *in vitro*[15] で促進的に働くが，これは B cell が PFC に分化していく過程では suppressor T cell 機能を抑制し PFC を増加させるものと考えられる．

そこで，MMC は B cell よりも T cell を強く攻撃すると仮定して，Skidmore らの説に基づき本実験結果を説明すれば次のようになる．すなわち，LPS を加えて B cell を非特異的に刺激しても MMC による helper T cell の機能抑制のため細胞間協同作用がうまく行なわれず抗体産生が低下したと考えられる．また Table 4-B の結果は，まず免疫記憶期に MMC が投与されたため Memory cell (B cell も T cell も memory 機能があると考えられている[16]) が障害され，したがって *in vitro* で抗原の2次刺激が与えられても，1次免疫反応的になり2次免疫反応の特徴である抗体産生の増強がみられなくなった．しかし B cell は Damage を受けていないので LPS によく反応しアジュバント効果が十分に発揮されたと考えられる．さらに，*in vivo* の実験[17]で PFC ピークの発現が時間的に遅れ，かつ低下する現象も T cell への影響と考えれば説明ができる．

しかしながら，B cell, A cell への影響が無いとは断言できない．MMC が高濃度になると生細胞数は変わらずに死細胞が増加し，生存率が低下する[1]．これは食作用の低下のため死細胞の除去率が下がったためとも考えられ，A cell すなわち macrophage の機能への影響も示唆される．本実験程度の濃度では，T cell への影響が強く表われるものと思われるが，細胞の種類によって MMC 感受性が異なるか否かは今後明確にすべき問題であろう．

また，外部から *c*-AMP 濃度を高めても MMC の作用とは拮抗せず，MMC の作用を強める方向に働く．*c*-AMP の作用面をみると，条件によっては免疫反応を増強したり抑制したりする2面性を持っていることがわかる．MMC が存在することによって，*c*-AMP の作用発現が異なるということに注意する必要がある．この事実から，Adenylate cyclase 以外に MMC の重要な標的があることが示唆される．

今後の詳細な検討が必要であろう．

文　献

1) 瀬戸　博，秋山和幸，溝口　勲：東京衛研年報，28-1, 212, 1977
2) Andersson, J., G. Möller, and O. Sjöberg : *Cell. Immunology*, 4, 381, 1972
3) Gery, I., K. Krüger, and S. Z. Spiesel : *J. Immunology*, 108, 1088, 1972
4) Franzl, R. E. and P. D. McMaster : *J. Exp. Med.*, 127, 1087, 1968
5) Nakano, M., T. Shimamura, and K. Saito : *Japan J. Microbiol.*, 15, 194, 1971

6) Andersson, J., F. Melchers, C. Galans, and O. Lüderitz : *J. Exp. Med.*, **137**, 943, 1973
7) Peavy, D. L., J. W. Shands, Jr., W. H. Adler, and R. T. Smith : *J. Immunology*, **111**, 352, 1973
8) Storm, D. R. and R. P. Gunsalus : *Nature*, **250**, 778, 1974
9) 藤田紘一郎，月舘説子，菊地正一：医学のあゆみ，**94**，108，1975
10) Kishimoto, S., T. Takahama, and H. Mizumachi : *J. Immunology*, **116**, 294, 1976
11) Ishizuka, M., W. Braun, and T. Matsumoto : *J. Immunology*, **107**, 1027, 1971
12) Kagnoff, M. F., P. Billings, and M. Cohn : *J. Exp. Med.*, **139**, 407, 1974
13) Skidmore, B. J., J. M. Chiller, D. C. Morrison, and W. O. Weigle : *J. Immunology*, **114**, 770, 1975
14) 藤田紘一郎，月舘説子，菊地正一，二島太一郎，野牛　弘：日衛誌，**31**，353，1976
15) 瀬戸　博：未発表
16) Miller, J. F. A. P., A. Basten, J. Sprent, and C. Cheers : *Cell. Immunology*, **2**, 469, 1971
17) Ohi, G., M. Fukuda, H. Seto, and H. Yagyu : *Bull. Environ. Contam. Tox.*, **15**, 175, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 349—352, 1978

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 (第2報) 総水銀，メチル水銀，セレンの臓器内分布

蓑輪佳子*，関　比呂伸*，今野ヒロ子**，大井　玄***

Evaluation of Selenite as a Therapeutic Agent for Methylmercury Poisoning Rats (II) Distribution of Total Mercury, Methylmercury and Selenium in Organs

KEIKO MINOWA*, HIRONOBU SEKI*, HIROKO KONNO** and GEN OHI***

緒　言

特異的な神経症状を呈するメチル水銀中毒症の効果的な治療方法はいまだ見い出されていない．現在では，水銀に結合して体外排泄を促進する各種キレート剤の投与が行なわれている．しかし，一旦損傷を受けた神経組織の回復は困難である．有機・無機水銀毒性の緩和作用[1-4]をもつ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，前報[5]で，キレート剤の一種である 2-mercaptopropionyl glycine (商品名，チオラ) とその効力を神経症状発現直後のラットを用いて比較した．その結果，セレンを投与したグループでは体重の増加が認められ，かつ神経症状の発現の抑制・改善の傾向がみられた．セレンとチオラの効果の差違をさらに詳しく調べるために，メチル水銀投与中止後，10，30，50日目に摘出した臓器を用い，各臓器内におけるメチル水銀，総水銀，セレンの分析を行ない，その分布状態を観察した．

実験方法

Wistar 系雄ラット5週齢を5群に分け，20ppm 塩化メチル水銀含有飼料を与えた．各群30匹で神経症状 (後肢の交差・麻痺) の発現時点でメチル水銀投与を中止し，basal diet (低セレン，20%蛋白質含有飼料) に切り換え，下記に示す処置を30日間続けた．

A．生理食塩水 (S. C.)……Control
B．Se 0.25mg/kg/day (S. C.)
C．Se 20ppm (Tap Water)
D．チオラ 25mg/kg/day (S. C.)
E．Se 0.25mg/kg/day (S. C.) ＋チオラ 25mg/kg/day (S. C.)

メチル水銀投与中止後，10, 30, 50日目に各群5匹 (ただし，50日目は各群3匹) をエーテル麻酔後，解剖し脳，脊髄，肝臓，腎臓を摘出，−20° で冷凍保存した．適時，臓器を凍結乾燥後，ホモジナイズして，分析時まで密閉容器中に保存した．

分析法[6] メチル水銀　塩酸濃度と溶媒比を変えて抽出する Westöö 法の改良法で分析．総水銀　エタノールを分解促進剤として加え硫硝酸分解．分解液を還元気化させ水銀蒸気を吸収セル内へ導入し，その原子吸光を測定 (Deitz らの改良法)．セレン　硝酸，過塩素酸で湿式分解後，2, 3-diaminonaphthalene と反応させる．生成したピアセレノールを蛍光分光光度計で測定．本報の分析値はすべて Dry Weight で示した．

結　果

メチル水銀　脳，脊髄の中枢神経系における10，30，50日目のメチル水銀濃度は control に比べて，セレン投与により蓄積増加，チオラにより排泄増加を示している．肝臓・腎臓ではセレン投与による蓄積の増加は，脳，脊髄に比べほとんどみられない．各臓器とも，チオラにより治療を行なっている30日間ではほとんどのメチル水銀が排泄され，投与終了後では著しい変化はないが，メチル水銀の排泄効果は5群中最大である．セレン経皮・経口投与による差は，腎臓ではほとんどないが，

* 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
** 港区保健衛生部
***東京大学医学部衛生学教室

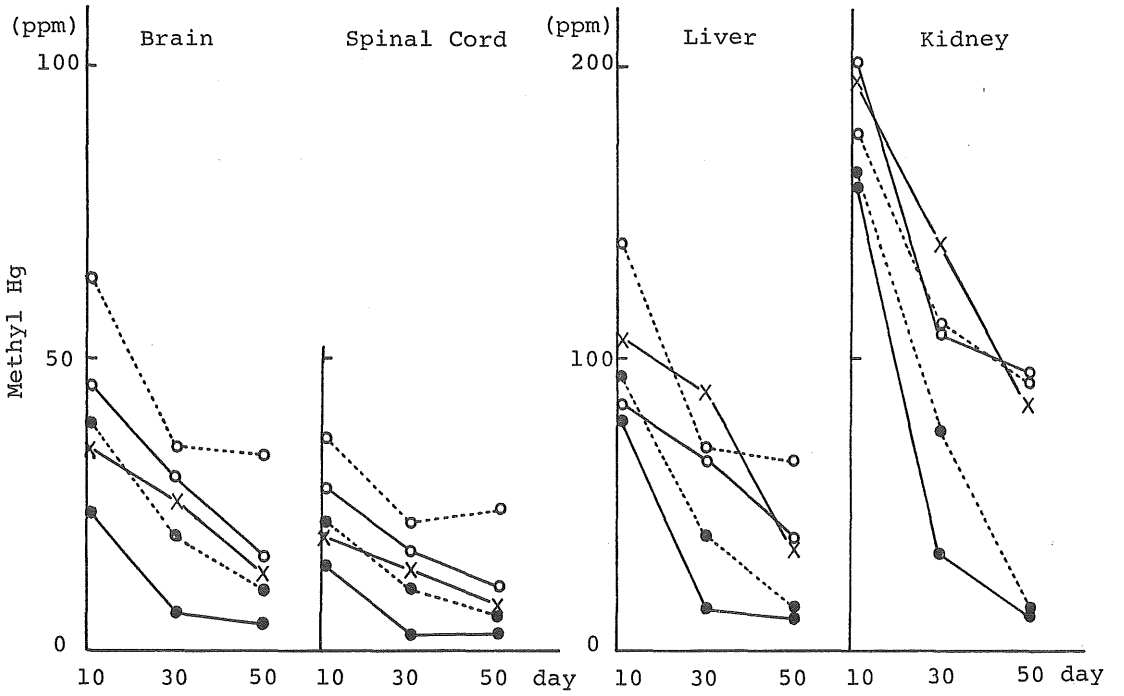


Fig. 1. Change in Methyl Hg Level of each Organ

A：×——×　B：○——○　C：○……○　D：●——●　E：●……●

その他の臓器では経口投与を行なった群でメチル水銀濃度が高くなっている．セレンとチオラの同時投与群は各臓器ともに，各単独投与群の濃度のほぼ中間を示している(Fig. 1)．

総水銀　総水銀の蓄積パターンは，メチル水銀のそれと同じであり，メチル水銀の無機化の度合いも，チオラの単独あるいはセレンとの同時投与群の腎臓を除いてほぼ等しい．チオラ単独あるいは同時投与群の腎臓では，セレン投与群に比べ，無機化が50日目で2～3倍高くなっている(Fig. 2)．

セレン　セレンの濃度は各臓器とも，セレン経口投与群が最も高く，それに続きセレン皮下投与，セレンとチオラ同時投与群で，チオラ単独投与群は control とほぼ同濃度であった．セレン単独あるいはチオラとの同時投与群では投与終了後もなお，脳，脊髄，腎臓の濃度が50日目まで増加したが，肝臓ではセレンの投与終了とともに，減少した(Fig. 3)．

考　察

チオラとセレンによる治療としての効果は，指標として選んだ神経症状の改善においては，B群のセレン皮下投与，チオラ単独投与の順で続いてセレン経口投与とセレンとチオラ同時投与群がほぼ等しい効果を示し，さらに治療開始30日目の体重増加度では，セレン皮下投与群が最も著しく，セレン経口投与，チオラ，セレンとチオラ同時投与群は等しいことを前報で報告した．

セレンを皮下，経口と投与方法を変えた場合，治療効果においては皮下の方が経口より効果が認められた．その際，脳内セレン濃度は10・30・50日目ともにセレン経皮投与群が経口投与を行なった群より低く，それに対応してメチル水銀濃度も経皮投与群が低かった．メチル水銀とセレンを同時に投与した場合のセレンの皮下，経口による吸収率の差は明らかにされておらず，厳密な比較はできないが，ここでは経口より経皮投与の方が有効と思われる．

セレンとチオラを同時に投与した場合のメチル水銀濃度は，肝臓，腎臓ではチオラ投与の排泄パターンとほぼ等しい傾向を示し，脳，脊髄ではセレン経皮投与とチオラ投与の中間値を示したが，これは，脳，脊髄ではメチル水銀がチオラにより速やかに排泄を受ける一方，セレンと結合し臓器内に蓄積したために，このような結果を呈したと考えられる．

メチル水銀の critical organ である脳でのメチル水

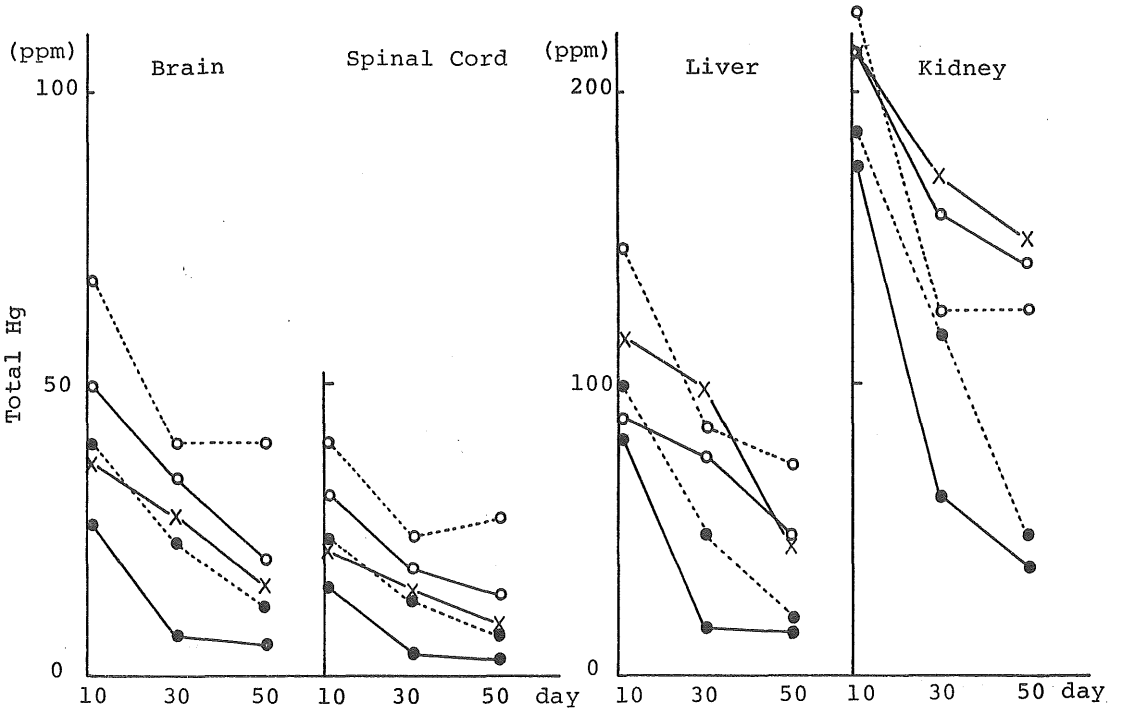


Fig. 2. Change in Total Hg Level of each Organ

A : ×——× B : ○——○ C : ○……○ D : ●——● E : ●……●

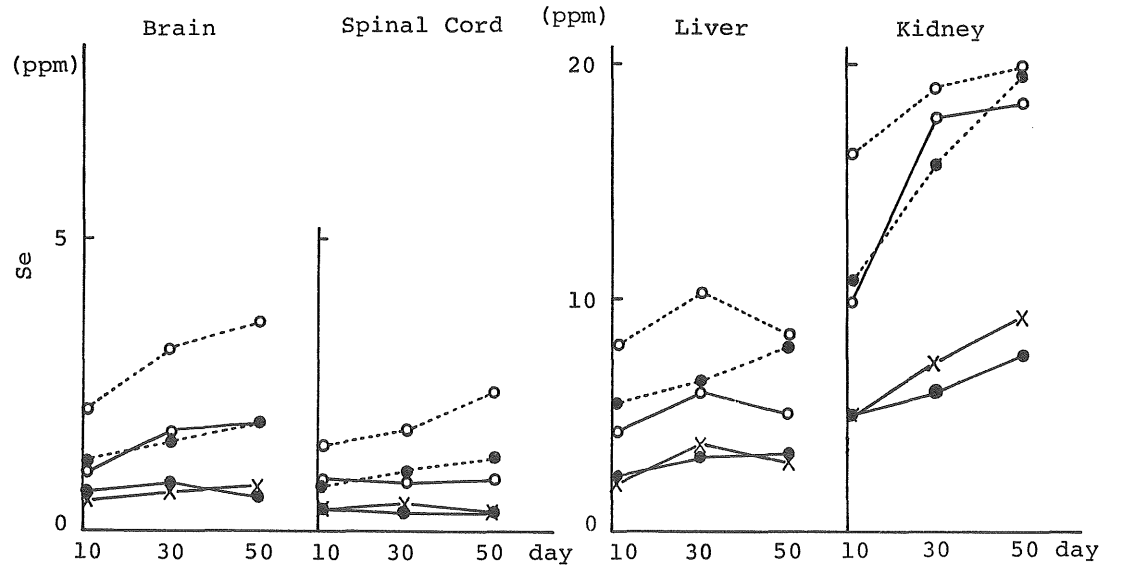


Fig. 3. Change in Se Level of each Organ

A : ×——× B : ○——○ C : ○……○ D : ●——● E : ●……●

銀濃度を control と比べると，キレート剤として選んだチオラは排泄能力が非常にすぐれ，逆にセレンは脳中へ水銀を動員していると思われる．チオラによる著しい臓器内水銀濃度の低下は，チオラとメチル水銀結合体が，active に transport されることなく，腸間での吸収・脳への取り込みが押えられ，その結果，尿中に誘導されるためであると報告[7]されている．このように高い排泄能力を持つチオラは，食品中から微量の水銀を摂取している場合に，排泄を促進させることにより症状の発現を防ぐという予防的な意味での使用には適しているであろう．セレンは逆に取り込みを促進するような動向を示すが，critical organ 中では水銀と結合することにより，何らかの形で水銀を不活性化するために，症状が回復したものと推測できよう．

要　約

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（チオラ）とセレンによる症状の回復の度合いと，臓器内メチル水銀，総水銀，セレン濃度との関連を調べた．チオラはセレンより各臓器で水銀を排泄する働きが，すぐれていたが症状の回復の度合いはセレンより劣っていた．一方セレンは脳におけるメチル水銀の蓄積が control より高く，水銀の蓄積を促進するかのようにみえるにもかかわらず，症状を軽減するのは，水銀がセレンとの共存により，毒性の低い何らかの形に変えられるためと推測される．

（本研究は昭和52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) Ganther, H. E., C. Gouide, and W. G. Hoekstra : *Science*, 175, 1122, 1967
2) Parizek, J. and I. Ostadalova : *Science*, 15, 142, 1966
3) Ohi, G., S. Nishigaki, and H. Yagyu *et al.* : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 527, 1975
4) Stillings, B. R., H. Lagally, and J. Soares : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 30, 243, 1973
5) 今野ヒロ子，関　比呂伸，蓑輪佳子他：東京衛研年報，27-1，297，1976
6) 編集／鈴木継美，大井　玄，井村伸正：水銀とセレン，64，1977，篠原出版
7) 高橋　等，平山紀美子，福島良子：基礎と臨床，9 (7)，245，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 353—355, 1978

飲料水の安全性に関する研究（第5報）　水道水中の酸性物質

高橋保雄*, 森田昌敏*, 三村秀一*

Studies on the Safety of Drinking Water (V)
Acidic Organic Compounds in Supplied Water

YASUO TAKAHASHI*, MASATOSHI MORITA* and SHUICHI MIMURA*

緒　言

近年，河川等の水質汚濁によって，水道水自身の有機物による汚染は急速に増加して来ているものと考えられる．このことは実際に，有機物の汚染度を示す塩素要求量，過マンガン酸カリウム消費量などのパラメーターが上昇して来ていることから推定される．しかし，これらのパラメーターは gross pollution を現わしているのにすぎないので，毒性，有害性のある有機物を微量に含んだ水道水の安全性の評価に対して，ほとんど役立たない．故に，飲料水の安全性を評価し，また，適切な水処理を行なうためには，極微量有機物の検索を行なうことが極めて重要である．

水中の有機物は種々の物質を極微量含有しているので，分析するに当って，高能率の分離同定手段と適当な濃縮手段が問題点となる．前者の問題点に対して，最近，packed column 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）から高分解能の capillary column GC-MS を用いて分離同定する方法が一般化され，中性有機物[1]に対して多数報告されて来ている．しかし，水中の酸性物質[2]，塩基性物質に対しては，ほとんど報告がない．飲料水の安全性に関する研究の一つとして，今回，水道水中の酸性物質を活性炭-クロロホルム抽出法（CCE 法）を用いて，濃縮し，GC-MS を用いて同定を行なったので報告する．

試薬と機器

I 試薬　活性炭：オルガノ株式会社から販売されている粒状40～60メッシュ使用，クロロホルム：和光純薬特級を蒸留して使用，エーテル：関東化学の水道水ブンセキ用，メタノール：和光純薬残留農薬試験用，塩酸：和光純薬精密分析用と特級，硫酸：和光純薬特級，炭酸カリウム：和光純薬特級，水：蒸留水

II 質量分析器　GC-MS 島津 LKB9000 を使用し，その使用条件は次の通り．カラム：2% OV-1 on Gas chrom Q (80/100mesh) 2m×3mmφ，カラム温度：80→200° (5°/min)，セパレーター温度：260°，サンプル温度：225°，イオン源温度：290°，検出器：TIC，キャリャーガス：He (31ml/min)，イオン化電圧：70eV，1次スリット：0.1mm，2次スリット：0.1mm

実験方法

活性炭 500g を直径 8cm，高さ 20.5cm のカラムに充填する．この活性炭カラムに水道水を約 5l/hour の速度で約 3000l を通す．カラムより活性炭を取り出し，乾燥器に入れ，約24時間，50～60° で乾燥させる．この

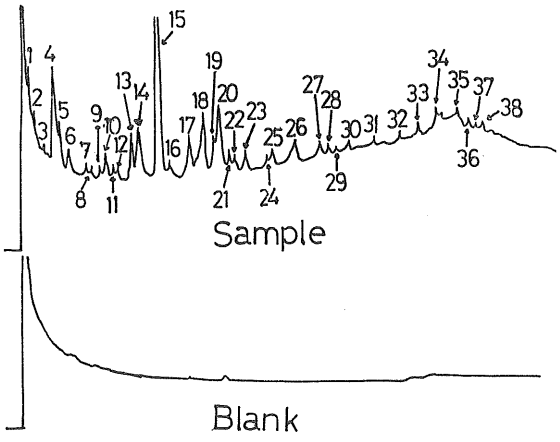


Fig. 1. Gas Chromatograms of Activated Carbon (BLANK) and BLANK+ Supplied Water (SAMPLE)

* 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

乾燥済の活性炭をソックスレー抽出器に入れ，500m*l* のクロロホルムを用いて，24時間抽出を行なう．このクロロホルムを10%炭酸カリウム溶液 20m*l* で1分間振とうの抽出を2回行なう．この炭酸カリウム溶液 40m*l* に徐々に塩酸精密分析用 40m*l* を加え，エーテル 20m*l* で2回抽出を行なう．このエーテル 40m*l* にメタノールを加えて，KD 濃縮器を用いて，メタノールに転溶させる．この転溶液を約 5m*l* まで濃縮させ，塩化水素ガスを吹き込み，酸性物質のメチル化を行なう．このメタノール溶液を窒素ガス吹きかけで，1m*l* に濃縮し，40%炭酸カリウム溶液2m*l* を加えて中和する．この中和溶液にエーテル1m*l* を加えて抽出し，これをサンプルとし，エーテルを GC-MS に注入する．

ただし，活性炭から由来する酸性物質と水道水から由来する酸性物質を区別するために，活性炭をソックスレー抽出以降，サンプルと同様の操作を行ない，これをブランクとした．

結　　果

Fig. 1 より明らかなように，ブランク，すなわち，活性炭由来のピークは確認されない．したがって，サンプルの38個のピークは水道水中のメチル化した酸性物質と認められる．38個のピークの内，フラグメントパターンより推定できたものは，Fig. 2 に表示してある No. 8 のペラルゴン酸メチル，No. 16 のカプリン酸メチル，No. 20 のミリスチン酸メチル，No. 13 のナフチル酸メチル，No. 29のテレフタル酸ジメチルである．ただし，

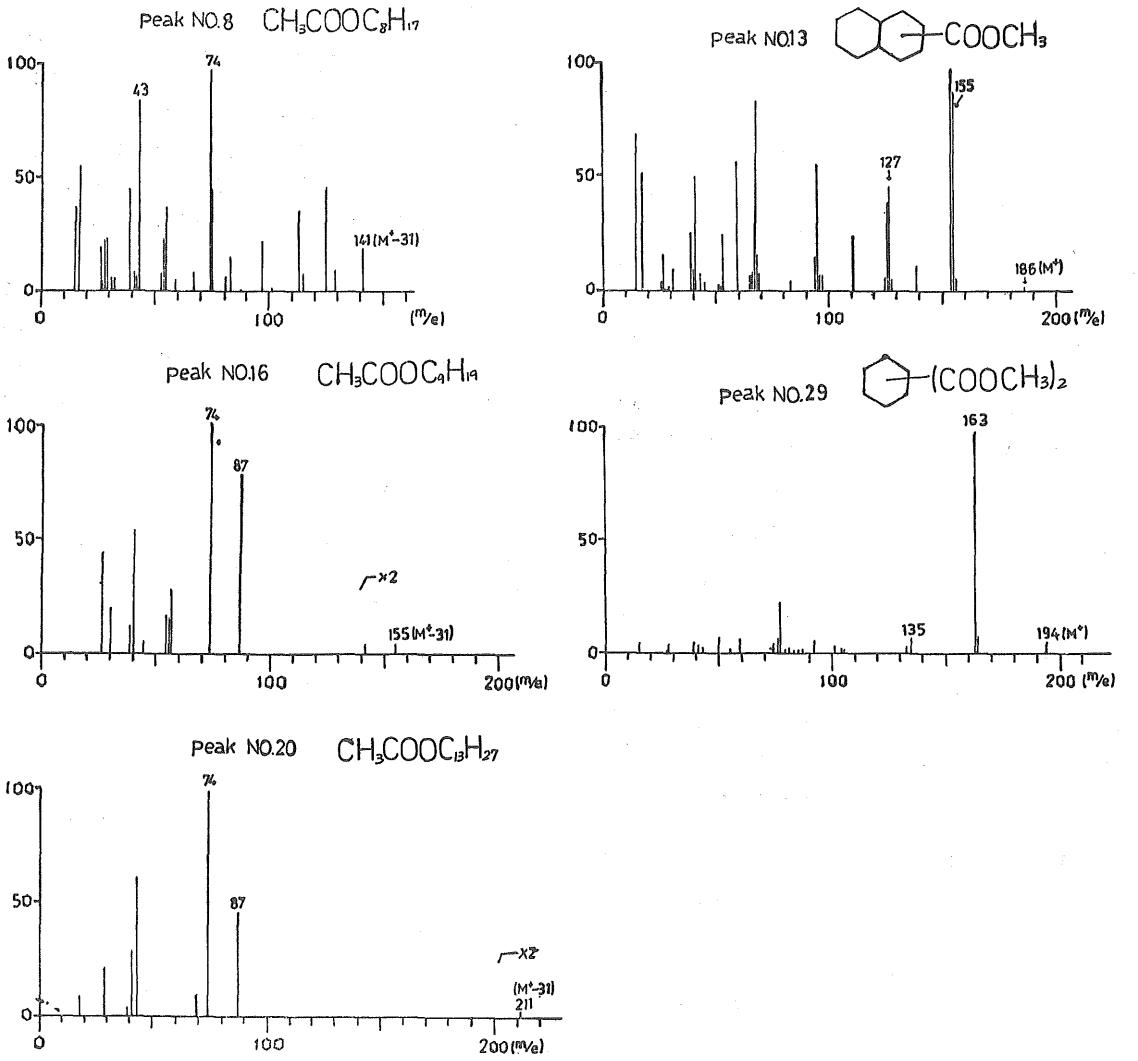


Fig. 2. Mass Spectrum

No. 1, 2, 4, 6, 7, 15, 17は枝分れ脂肪酸のメチルエステルであると推定できる．残りのピークの大部分は分離不十分なために，帰属できなかった．

考　察

水道水中の酸性物質の内，フラグメントパターンより推定できたペラルゴン酸メチル，カプリン酸メチル，ミリスチン酸メチルの元の高級飽和脂肪酸，また，枝分れの脂肪酸メチルエステルの元の脂肪酸は天然，すなわち，動物や植物の代謝物に由来するものであろう．半谷等[2]はこれら高級飽和脂肪酸を，東京都の上水道源であった多摩川の水から検出されたと報告している．他の水道原水にも高級飽和脂肪酸は含まれていると考えられるから，この微量脂肪酸は浄水過程で除去しきれないと考えられる．

テレフタル酸ジメチルの元の芳香族カルボン酸（テレフタル酸）は，テトロン，可塑剤の原料として年間約56万トン[3]も使用されている．

ナフチル酸メチルの元の芳香族カルボン酸（ナフチル酸）は天然に由来するのか，工業原料に由来するのかはっきりしない．

濃縮の手段として吸着剤を使用した時，問題になることは，吸着剤由来のブランク（有機物）を含まないのか，広範囲の有機物を完全に吸着するのか，有機物を完全に脱着するのか，以上三点である．前報[4]で活性炭を用いた場合，それに由来する中性有機物は沢山あると報告した．しかし，今回，活性炭を用いた場合，それに由来する酸性物質は確認されなかった．残る二点についての検討も重要である．吸着に用いる活性炭の種類，粒度，流速，脱着前の乾燥処理の方法，脱着の仕方，その時の溶媒の種類，溶媒の温度等により大きく変動する．Chriswell 等[5]は 100ppb 濃度の脂肪酸，芳香族カルボン酸 9 種類の物質について活性炭カラム法での吸着率，各種溶媒（エーテル，クロロホルム，アセトン）を用いての脱着率を測定している．その吸着率は50～100%，脱着率は 0～10%であると報告している．未知の物質を検索するに際しては吸着率，脱着率は全く不明であることから，本質的に極めて困難な問題が多い．今回用いた CCE 法は比較的広い範囲の物質に適用しうるものと考えられるが，今後，新しい吸着剤材質とともに，試験法の開発研究が必要と思われる．

（本研究は昭和52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，その概要は日本化学会第37春季年会1978年 4 月で発表した．）

文　献

1) Grob, K. and G. Grob : *J. Chromatogr.*, **62**, 1, 1971
Grob, K. : *J. Chromatogr.*, **84**, 255, 1973
Grob, K. and G. Grob : *J. Chromatogr.*, **90**, 303, 1974
Webb, R. G. : *J. Chromatogr.*, **150**, 381, 1978
Giger, W. and C. Schaffer : *Anal. Chem.*, **50**, 243, 1978
2) 半谷高久，石渡良志，松本源喜：昭和49年度，全国水道研究発表会講演集（1974）
3) 「5073の化学商品」，1973，化学工業社
4) 高橋保雄，森田昌敏，三村秀一：東京衛研年報，28-1, 241, 1977
5) Chriswell, C. D., R. L. Ericson, and G. A. Junk : *JAWWA.*, 669, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 357—361, 1978

水中の塩素化生成物に関する調査研究　プール水と塩素添加家庭排水の分析

大橋則雄*, 矢口久美子*, 門馬康彦*
藤沢正吉*, 友成正臣*, 森田昌敏**

Studies on Formation of Organochlorine Compounds through Chlorination in Water
Analysis of Swimming Pool Water and Chlorinated Domestic Wastewater

NORIO OHASHI*, KUMIKO YAGUCHI*, YASUHIKO MONMA*,
MASAYOSHI FUJISAWA*, MASAOMI TOMONARI* and MASATOSHI MORITA**

緒　言

塩素殺菌は浄水過程では欠くことのできない方法である．反面，事故によって流出した化学物質と反応して異臭，着色の原因物質を生成する[1]．Jolleyは[2]下水の2次処理水への塩素の添加で魚のふ化に悪影響を及ぼす物質を同定している．また，塩素処理は塩素化合物を生成するだけでなく，水中の臭素イオンを酸化し臭素化合物を生成することが確認されている[3,4]．臭素化合物は相当する塩素化合物より刺激性，毒性ともに大きい[5]ことが知られ，塩素化生成物の調査は意味をもっていると思われる．これまでのところ塩素化生成物の報告は下水への過剰な量の塩素添加によるものである[6]．筆者らは，塩素処理による水質の変化を調査する目的でいくつかの実験を行なった．プール水は低濃度(遊離残留塩素で0.4ppm以上）の塩素殺菌を持続して行なっており，塩素化生成物の確認には良い材料と考えられ，溶媒抽出法により分析を行なった．また，家庭排水を主として処理している下水処理場の流入水に塩素を添加したものを活性炭吸着法で濃縮しジクロルメタンでソックスレー抽出を行ない，GC-MSで検索を行なったので結果を報告する．

実　験

試薬　ジクロルメタン：和光純薬特級を1回蒸留して使用，炭酸カリウム：和光純薬特級，塩酸：和光純薬精密分析用，無水硫酸ナトリウム：和光純薬残留農薬試験用，エーテル：関東化学水道水分析用，ヘキサン・アセトン・メタノール：Mallinckrodt社 nanograde，フロリジル：Floridin社60—100メッシュを4時間加熱後シリカゲルデシケーターで放冷後使用，次亜塩素酸ナトリウム溶液：和光純薬，活性炭：オルガノ株式会社40—60メッシュ

装置　i) ガスクロマトグラフ（GC)：島津製作所製GC-5A型（ECD, ^{63}Ni), ii) ガスクロマトグラフ-質量分析計：島津 LKB 9000型（GC-MS)

プール水の分析　都内のある室内温水プール水40lを検水とした．検水1lにつきジクロルメタン50mlの割合で抽出し，1lにまでKuderna-Danish濃縮器で濃縮した．(以下濃縮はこの濃縮器によって行なった．）次に，10%炭酸カリウム溶液，1%塩酸水溶液の各々100mlで順次洗い，無水硫酸ナトリウムで脱水後500μlにまで濃縮した．10mlのn-ヘキサンに2回転溶した後再び500μlに濃縮し，フロリジルカラム（直径1cm，高さ30cm，上端部分1cmは無水硫酸ナトリウム）にかけ分画を行なった．溶出液は，フラクション1から3がn-ヘキサン，フラクション4・5は5%エーテル・ヘキサン，フラクション6・7は20%エーテル・ヘキサン，フラクション8はアセトンの各々50mlずつとした．溶出液のそれぞれを500μlに濃縮し，GC-MSで測定した．測定条件は次のとおりである．

カラム：3% OV-225 Chromosorb WAW DMCS 2m，カラム温度：100—220°毎分5°昇温，キャリャーガスと流量：ヘリウム毎分30ml，イオン化電圧：70eV，インジェクション温度：210°，セパレーター温度：240°，

* 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

イオン化温度：270°，マスの測定は m/e60から m/e300まで6秒毎とした．

流入下水への塩素添加実験　家庭排水を主として処理している下水処理場の流入水 10*l* を検水とした．それに残留塩素濃度が 40ppm となるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し24時間放置した．pH は HCl で調整して中性付近（6.8）とした．その後チオ硫酸ナトリウムで塩素を消費させ，活性炭 14g を直径 2cm のカラム管につめたものに通水した．流入下水も同様に通水し対照とした．吸着終了後シリカゲルデシケーター中で活性炭がさらさらになるまで乾燥させた．それをジクロルメタン 400m*l* でソックスレー抽出を72時間行なった．抽出液を0.1規定の水酸化ナトリウム水溶液，0.1規定の塩酸水溶液のそれぞれ 50m*l* で2回洗った後 1m*l* に濃縮した．プール水と同様に，n-ヘキサンに転溶後フロリジルカラム（直径 1cm，高さ 25cm）にかけ分画を行なった．溶出液は，n-ヘキサン，5％エーテル・ヘキサン，20％エーテル・ヘキサン，エーテル，メタノールの順に各々 100m*l* ずつ溶出させた．それぞれを 1m*l* に濃縮し，GC-MS で測定した．また塩素を 400ppm 添加した流入下水の分析も行なった．プール水と同様にジクロルメタン抽出し，フラクションは n-ヘキサン，20％エーテル・ヘキサン，アセトン，メタノールの各々 100m*l*

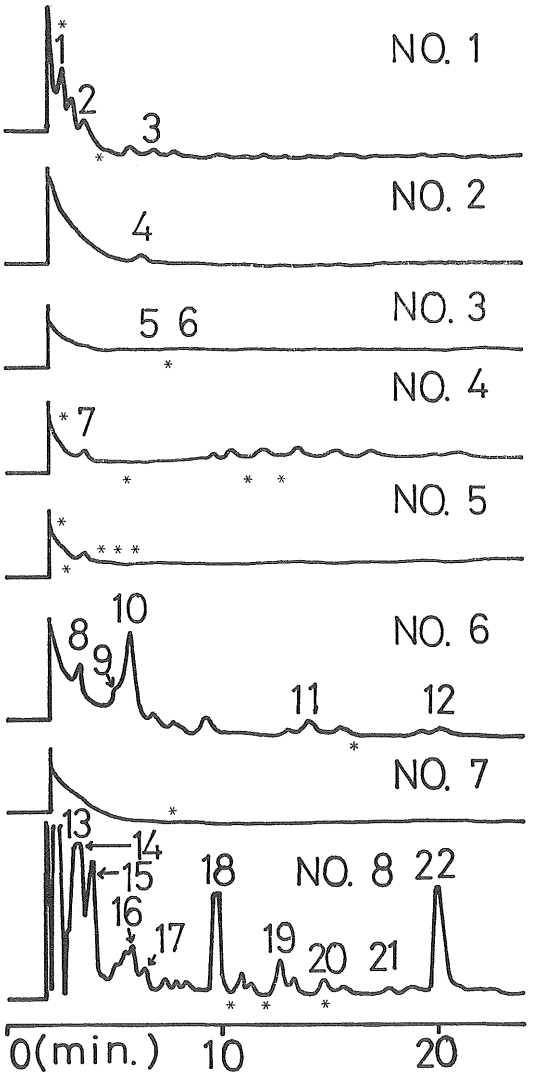


Fig. 1. Gas Chromatograms of Swimming Pool Water

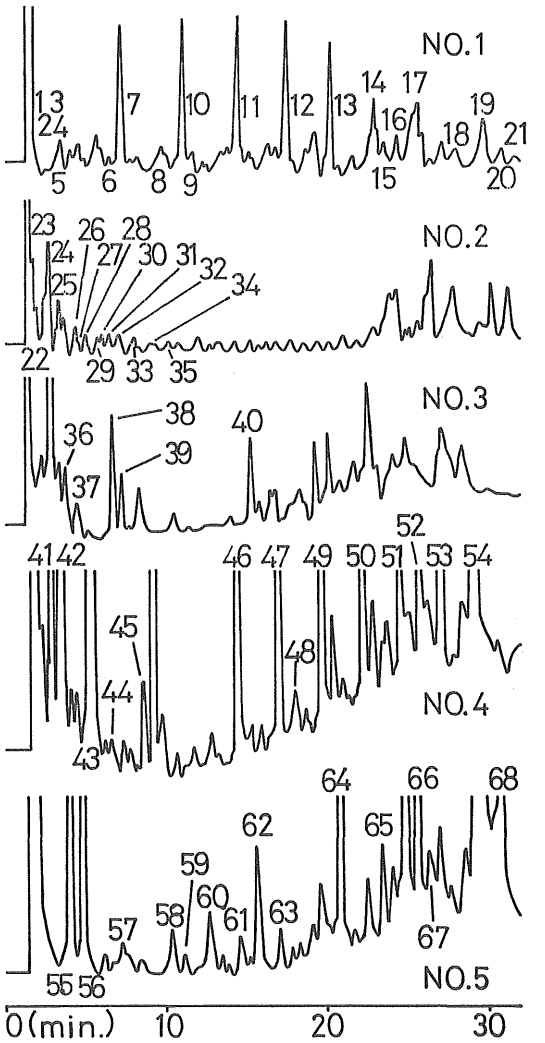


Fig. 2. Gas Chromatograms of Chlorine-contacted Domestic Wastewater

Table 1. List of Substances identified or supposed

No.	Substance	No.	Substance
1	Dichlorobenzene	13	blank
2	Dimethyldihydroindene	14	blank
3. 4. 5	Naphthalene	15	blank
6	Diphenyl	16	Cl compound
7	Styrene	17	molecular weight 138
8	Benzaldehyde	18	Indol
9	Acetophenone	19	Cl+Br compound
10	Isopropenylbenzene	20	Cl compound
11	Cl compound	21	Dimethyl phthalate+Br compound
12	Benzophenone	22	Diethyl phthalate

Numbers correspond to peaks in Fig. 1.

で順次溶出し 1m*l* に濃縮後 GC-MS で測定した．測定条件は次のとおりである．

カラム：2% OV-1 Chromosorb WAW DMCS 80/100 2m，カラム温度：70—230° 毎分5° 昇温，キャリャーガスと流量：ヘリウム毎分30m*l*，イオン化電圧 70eV，インジェクション温度：230°，セパレーター温度：270°，イオン化温度：310°

クロロホルム類の分析[7] プール水と塩素添加前後の流入下水の 10μl を ECD 検出器を有すGCに直接注入した．測定条件は次のとおりである．

カラム：Tenax GC 60/80 2m，カラム温度：140°，インジェクション温度：160°，検出器温度：250°，キャリャーガスと流量：窒素 毎分 50m*l*

結果と考察

プール水の分析 フラクション1から8のガスクロマトグラムと得られたマススペクトルから推定された物質を Fig. 1, Table 1 に示す．13, 14, 15 のピークはブランクに由来する．主なピークは，ジクロルベンゼン，インドール系物質，フタル酸エステル類であった．ジクロルベンゼン[8]，フタル酸エステル類[9]は，森田によりその汚染状況が明らかにされているように，原水由来と思われる．インドールは悪臭物質の1つであり，遊泳者からの汚染によると思われ，プールの衛生管理の見地から興味深い．

Fig. 1 に示した＊印は，マススペクトル中に塩素または臭素を含むイオンに特有の同位体パターンが観察された部位であるが，ジクロルベンゼンを除いて同定はできなかった．三多摩地区のプール水中のクロロホルム類を分析したところ，$CHCl_3$, $CHBrCl_2$, $CHBr_2Cl$ が観察された．この地区の原水からはこれらの物質は検出されず，塩素殺菌による生成が確認された．

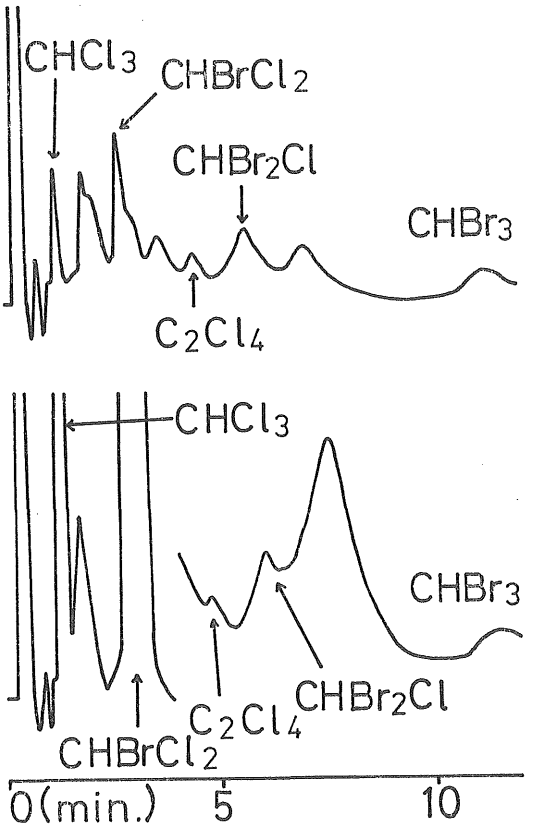


Fig. 3. Analysis of Haloforms in Domestic Wastewater
Top : Before Chlorination
Bottom : After 40mg/L Chlorine Dose

流入下水への塩素添加 塩素を 40ppm 添加した場合のガスクロマトグラムと同定または推定された物質を

Table 2. List of Substances identified or supposed

No.	Substance	No.	Substance
1	Toluene	35	C_6H_5-C_4-
2	Tetrachloroethylene	36	n-paraffin
3	Chlorobenzene	37	Cresol
4	Bromoform	38	molecular weight 138
5	Decane+Dichlorobenzene	39	molecular weight 136
6	Undecene	40	molecular weight 151(Cl compound)
7	Undecane	41	Br compound
8	Trichlorobenzene (blank)	42	Benzaldehyde
9	Dodecene	43	C_6H_5-CH_2-
10	Dodecane	44	Cl compound
11	Tridecane	45	Cl compound
12	Tetradecane	46	Lauryl alcohol
13	Pentadecane	47	Diethyl phthalate
14	Hexadecane	48	Tridecyl alcohol
15	C_6H_5-C_{11}	49	Tetradecyl alcohol
16	C_6H_5-C_{11}	50	Pentadecyl alcohol
17	Heptadecane	51	Cetyl alcohol
18	2-Phenyldodecane	52	Dibutyl phthalate
19	Octadecane	53	Heptadecyl alcohol
20	C_6H_5-C_{13}	54	Stearyl alcohol
21	C_6H_5-C_{13}	55	Dichlorobenzene
22	C_6H_5-C_2	56	molecular weight 138
23	C_6H_5-C_3	57	Cl compound
24	C_6H_5-C_3	58	Methyl caprate
25	C_6H_5-C_4	59	Cl compound
26	C_6H_5-C_4	60	Methyl undecanoate
27	C_6H_5-C_4	61	Dimethyl phthalate
28	C_6H_5-C_5	62	Methyl laurate
29	C_6H_5-C_5	63	Diethyl phthalate
30	C_6H_5-C_5	64	Methyl tridecanoate
31	C_6H_5-C_5	65	Methyl pentadecanoate
32	Naphthalene	66	Methyl palmitate
33	C_6H_5-C_4-	67	Methyl heptadecanoate
34	C_6H_5-C_4-	68	Methyl stearate

Numbers correspond to peaks in Fig. 1.

Fig. 2 に示す．フラクション1のアルキルベンゼン類，フラクション4の高級アルコール類は洗剤によるものと思われ[10]，家庭排水の性質をあらわしている．カラム温度が150°以上になるとバックグラウンドが高くなり，マススペクトルの解読が困難であった．塩素や臭素特有の同位体パターンが観察されたが，テトラクロルエチレン，ブロモホルム，ジクロルベンゼンは流入下水中に存在していたもので塩素化によって生成したものではない．塩素化により生成したと思われる物質の同定は，ジクロルクレゾールを除いては困難であった．

プール水と同様に塩素添加前後の検水中のクロロホルム類の分析で得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示す．塩素添加後 $CHCl_3$, $CHBrCl_2$ の生成が確認された．

塩素を 400ppm 添加した実験では，ピークの消失が多かった．新しいピークもいくつか出現したが分離が良好でなくクロルトルエンの生成が確認されただけであった．

20m の OV-101 のキャピラリーカラムを用いて分析

した場合，ガスクロマトグラムは通常使用しているガラスカラムの場合より分離は向上している．マススペクトルも150°までのカラム温度では，バックグラウンドも低く，今後この種のカラムの利用が有効と思われる．

活性炭自身から，モノ，ジ，トリのクロルベンゼンとブロモベンゼンが確認され，第1フラクションから高橋の報告[11]のように脂肪族炭化水素が観察された．

まとめ

クロロホルム類は，プール水の塩素殺菌でも容易に生成することが確認された．これらの物質の前駆体として水中の着色物質が以前から知られているが，最近，沢村らは[12]フェノール類への塩素添加によるクロロホルムの生成を確認している．Sievers らは[13] 2次処理した家庭排水をオゾン処理してもクロロホルム，テトラクロルエチレンは分解されないことを指摘している．水質汚濁の進行に伴ない，これらの物質は水処理において今後も問題を残すものと思われる．

選択的で感度の良いクロロホルム類を除いて生成を確認した塩素化生成物はジクロルクレゾールだけである．塩素や臭素特有の同位体パターンをもつマススペクトルがいくつか観察されるが，分離が不完全でバックグラウンドが高く解読の妨げとなりほとんどが未同定である．キャピラリーカラムを用いた場合ガスクロマトグラムの分離はかなり向上した．今後この種のカラムの利用が有効と思われる．

（本研究の一部は日本公衆衛生学会第35回1976年10月，第36回1977年10月で発表した．）

文　献

1) Burtschell, R. M., A. A. Rosen, F. M. Middleton, and M. B. Ettinger : *J. A. W. W. A.*, **66**, 703, 1974
2) Jolley, R. L. : *J. W. P. C. F.*, **47**, 601, 1975
3) Rook, J. J. : *J. Wtr. Trtmt. Exam.*, **23**, 234, 1974
4) Eklund, G., B. Josefsson, and A. Bjorseth : *J. Chromatogr.*, **150**, 161, 1978
5) 堀口　博著：公害と毒・危険物，有機編，507, 1971，三共出版
6) Glaze, W. H. and J. E. Henderson : *J. W. P. C. F.*, **47**, 2511, 1975
7) 森田昌敏，中村　弘，三村秀一：東京衛研年報，**25**, 399, 1974
8) 森田昌敏，西沢恒幸，三村秀一：東京衛研年報，**26**-1, 329, 1975
9) 森田昌敏，中村　弘，三村秀一：東京衛研年報，**24**, 351, 1972
10) 今木　喬，大木幸介，富山新一：洗剤の科学，ドメス出版
11) 高橋保雄，森田昌敏，三村秀一：東京衛研年報，**28**-1, 241, 1977
12) 木下美枝子，沢村良二：日本薬学会第98年会講演要旨集
13) Sievers, R. E., R. M. Barkley, and G. A. Eiceman : *J. Chromatogr.*, **142**, 745, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 362—366, 1978

水中における DDVP の残留と分解に関する研究

押田裕子*, 栃本博*, 菊地洋子*, 笹野英雄**
中村弘*, 池島伸至*, 友成正臣*

Residual Quantity and Degradation of DDVP in Water

HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO*, YOKO KIKUCHI*,
HIDEO SASANO**, HIROSHI NAKAMURA*, NOBUYUKI IKEJIMA*
and MASAOMI TOMONARI*

緒　言

近年，水の需要の増大に対処するために水源の開発が進められているが，これに伴なって水源地附近の農作物に使用されている農薬による水質汚染が心配される．最近，東京都のある町が山間部の渓流に新たな取水口の設置を計画したが，その上流約 2km 附近にワサビ田が存在し，比較的頻繁に有機リン系農薬 DDVP (O, O-Dimethyl 2, 2-dichlorovinyl phosphate) を散布していることが判明した．DDVP は揮散性が高く，また加水分解や酸化作用などによって速かに分解されるため，通常の使用法では環境汚染の危険性はないといわれているが，著者らは安心して飲める飲料水を確保するために，実験的にワサビ田に DDVP 乳剤を散布し，取水予定地点における DDVP 残留量の測定を行なった．さらにこの水を浄水場に取り入れた場合を想定し，浄水場における浄化処理による DDVP の分解，除去についても検討を行ない，若干の知見を得たので報告する．

実験方法

試薬　残留農薬試験用 DDVP 標準品（和光純薬），武田 DDVP 乳剤（武田薬品），残留農薬試験用ベンゼン（和光純薬），その他の試薬はすべて試薬特級品を用いた．

装置　ガスクロマトグラフ（島津製作所製 GC-5A 型 FPD 付），流速計（東邦電探製 CM-IB 型電気流速計），エアポンプ (NIPPON JISEI SANGYO NS-I 型, 2.9W)

定量方法　試料 5*l* を2分し，それぞれについてチャート1に示した方法に従って抽出し，抽出液を合せて濃縮したのち，下記に示す GC の条件で DDVP の定量を行なった．本法によって各濃度段階の DDVP 溶液を用いて作成した検量線を Fig. 1 に示す．0—2.0μg/m*l* の範囲で良好な直線性が得られた．

GC 測定条件　2% PEG 20M（クロモソルブW80—100 メッシュ），ガラスカラム：3mm×200mm，温度：

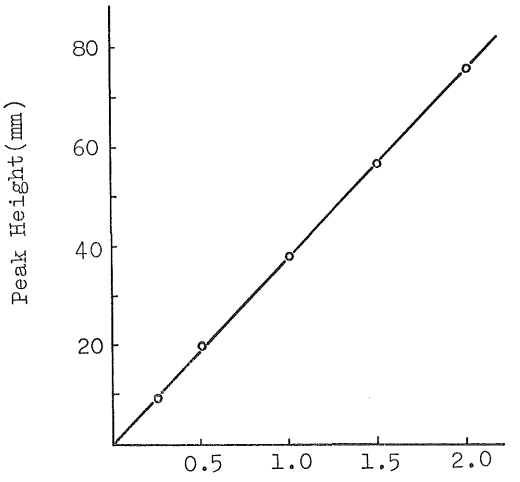


Fig. 1. Calibration Curve for DDVP

* 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

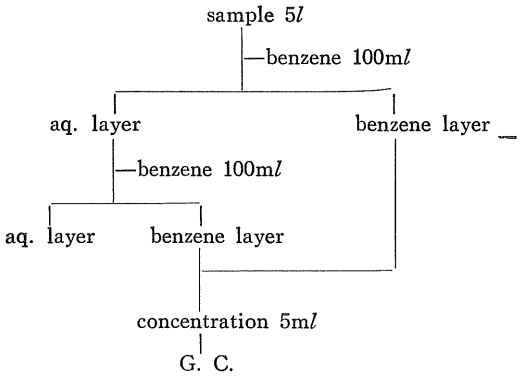


Chart 1. Analytical Scheme of DDVP in Water

試料注入部 275°，カラム恒温槽 140°，検出器 (FPD) 275°，ガス流量：水素 60ml/min，空気 60ml/min，キャリヤーガス：窒素 60ml/min，試料注入量 2—5μl

結果と考察

1. 渓流中における DDVP の残留量 採水地点より約 2km 上流のワサビ田 (4×50m) に 50% DDVP 乳剤を散布し，渓流の流速から予測される薬剤到達時間（約1時間）を算出し，その20分前から5分間隔で採水を行なった．これらの試料 5l ずつについて前記抽出法に従い現場で DDVP 抽出を行ない，抽出液を実験室に持ち帰り，KD濃縮器で 5ml に濃縮し，GC用試験溶液とした．実験は同じワサビ田を使い，隔月で2回行な

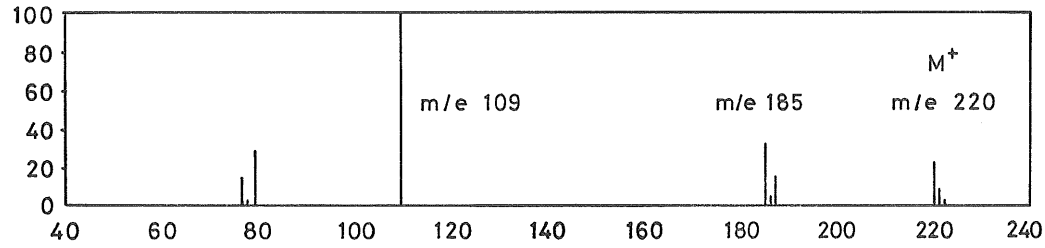


Fig. 2. GC-MS Spectrum of DDVP

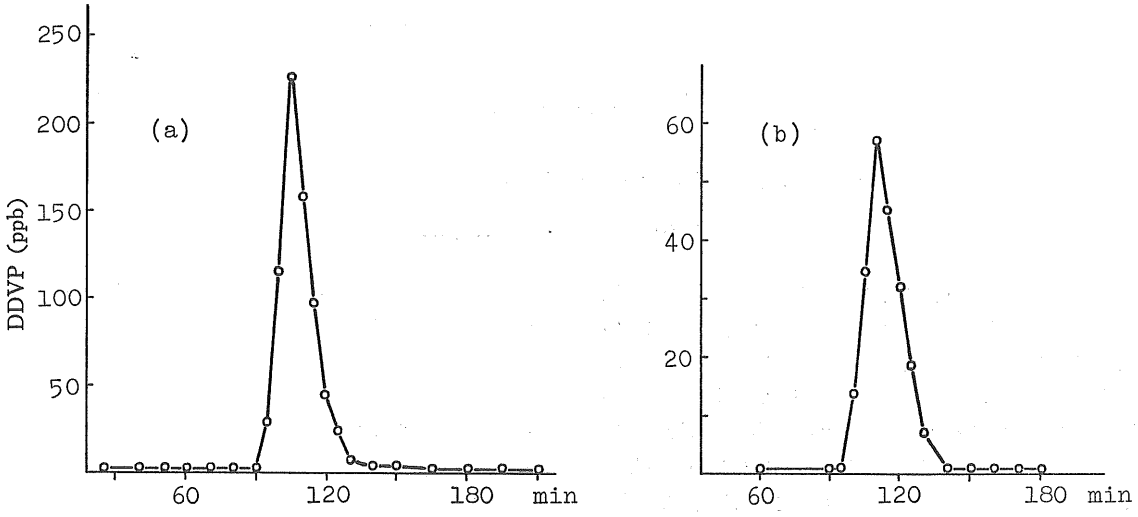


Fig. 3. The Amount of Residual DDVP in the Stream

(a)	Added(g)	565
	Yield (g)	153
		27(%)
	Flow(m/sec)	0.75
	(m^3/h)	1695
	pH	7.5
	Water Temp.	15.0

(b)	Added(g)	141
	Yield (g)	28
		20(%)
	Flow(m/sec)	0.48
	(m^3/h)	1116
	pH	7.5
	Water Temp.	12.0

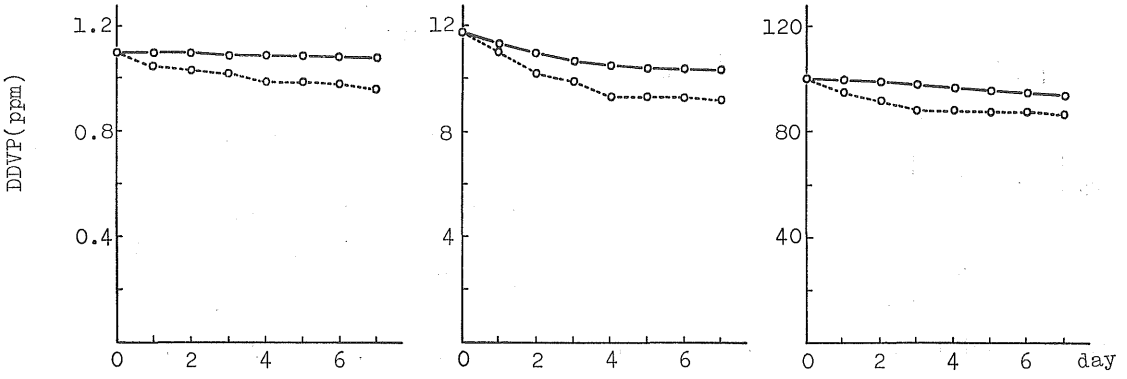


Fig. 4. Degradation of DDVP in Water with and without Aeration

----o---- with Aeration —o— without Aeration

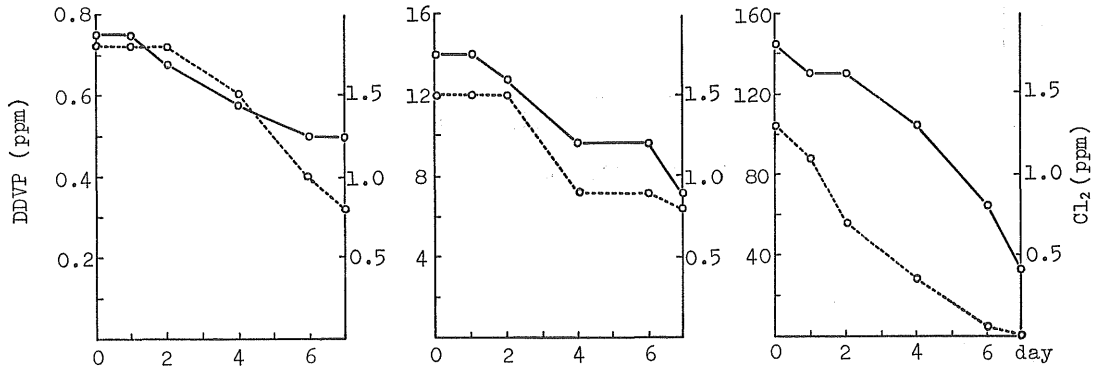


Fig. 5. Degradation of DDVP in Water with Chlorination

—o— DDVP ·····o····· Cl_2

った．DDVP 乳剤散布量は DDVP 量に換算して1回目は 565g，2回目は 141g である．なお抽出液について GC-MS を測定したところ Fig. 2 に示すスペクトルが得られ DDVP であることを確認した．Fig. 3 は DDVP 乳剤散布後の採水地点における DDVP の検出濃度である．DDVP は揮散し易く，分解され易いといわれているが，今回行なった2回の実験結果では平均24%の DDVP が採水地点から検出された．この結果から DDVP を含有する源水を取水するおそれのあることが考えられる．

2. 分解に関する検討 一般に浄水場では曝気，砂ろ過，塩素消毒などの処理を行なうが，DDVP を含んだ源水を取り入れたとしても，これらの浄化処理操作により DDVP が分解，除去されるならば，飲料水として使用が可能になると思われる．そこで，浄水場での処理操作に準じて次の実験を行なった．

2.1 曝気による揮散 DDVP 乳剤を河川水で希釈し，DDVP 濃度がそれぞれ 1，10，100mg/l になるような溶液を調製する．これらの液 2l ずつを 3l のビーカーにとり，それぞれにボールフィルター付エアポンプで連続7日間曝気を行ない，その間24時間ごとに DDVP の濃度を測定し，その経時変化を観察した．また，上記の DDVP 溶液について曝気を行なわず静置し，これについても24時間ごとに DDVP の濃度を測定し対照とした．その結果を Fig. 4 に示す．いずれの濃度も同じような減少傾向で，7日間の平均減少率は曝気したものが16%，対照は6%であり，7日間の曝気を続けてもなお85%の DDVP が残留していた．実験室における曝気，

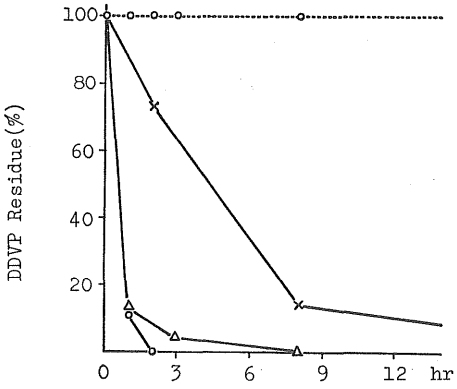


Fig. 6. Degradation of DDVP in Sand

—o— 45μg DDVP in sand
—△— 425μg DDVP in sand
—×— 4750μg DDVP in sand
·····o····· 47μg DDVP in autoclaved sand

あるいは静水状態による DDVP の揮散または分解が，予想に反して効果が認められなかった．

2.2 塩素処理による分解 前項と同様に調製した D-DVP 溶液に，残留塩素濃度が 2mg/*l* になるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し，密封ガラスビンに入れ 20° で 7 日間静置し，これらについても24時間ごとに DDVP 濃度と残留塩素濃度を測定し，その経時変化を観察した．その結果を Fig. 5 に示す．DDVP の減少率は 1 mg/*l* で33%，10mg/*l* で47%，100mg/*l* で79%であった．この結果から一般に浄水場で行なわれている塩素処理でも，DDVP の分解にある程度有効であると考えられる．

2.3 砂による分解 Getzin ら[1] は，土壌によって農薬が分解されることを報告している．そこで著者らは，浄水場における砂ろ過によっても DDVP が分解するのではないかと考え，次の実験を行なった．湿潤した浄水場のろ過池の砂 200g ずつをビーカーにとり，それぞれ DDVP を 50, 500, 5,000μg 添加し，20°で静置したのち一定時間ごとに DDVP 量を測定した．その結果を Fig. 6 に示す．DDVP の添加量によって時間的な差はあるが，いずれの場合も分解され，50μg は 2 時間後，500μg は 8 時間後，5,000μg でも18時間後にはほとんど検出されなくなった．さらに Getzin らは，土壌を熱処理することによって農薬の分解能が消失することも報告している．このことから著者らはろ過池の砂をオートクレーブによって 120° 20分間加熱処理し，この砂を用いて上記の実験を行なったところ，いずれの濃度においても DDVP は分解されないことが認められた．次に，DDVP

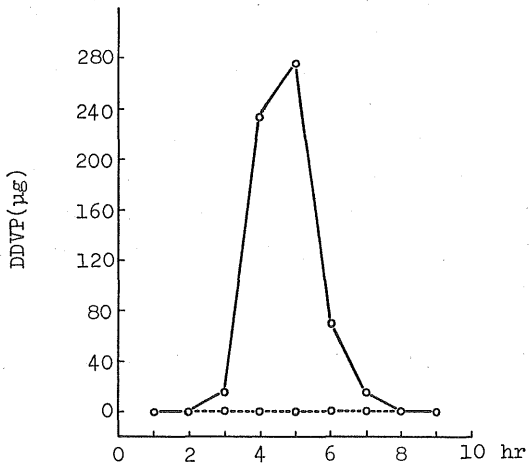


Fig. 7. Elution Pattern of DDVP from the Sand Column

Added(g)	615
Recovery(%)	100
Flow(ml/h)	100

—o— DDVP with autoclaved sand column
·····o····· DDVP with sand column

水溶液を砂ろ過した場合の分解効果について検討した．直径 5cm，長さ 70cm のガラスカラムの一方に121° 20分オートクレーブで処理した砂，他の一方に未処理の砂を 1.5kg ずつ充塡し，それぞれに 2.5mg/*l* の DDVP 溶液 200m*l* を毎時 100m*l* の流速で流し，その流出液を 50m*l* ずつ分取した．この流出液に DDVP が検出されなくなるまで蒸留水を用いて流出を行ない，DDVP の全流出量を測定した．その結果を Fig. 7 に示す．未処理の砂の場合は DDVP の流出が全くみられなかったのに対し，加熱処理した砂ではほぼ 100% の DDVP が流出した．この砂による分解は，土壌中の細菌，微生物によると思われるが，砂に吸着されていることも考えられるので，DDVP の流出のみられなかったカラム中の砂を取り出し，これについてベンゼン抽出を行なったが DDVP は検出されず，砂中には残存していないことが確認された．このようなことから著者らは，砂のもつ DDVP の分解能は大部分が細菌，微生物によるものであると推定している．その他の要因についても今後検討する予定である．

結　論

DDVP は揮散し易く，比較的分解も速いといわれているが，今回実際にワサビ田に DDVP 乳剤を散布し，2km 下流における渓流中の DDVP 量を測定したところ，散布量の約24%が残存していることがわかった．そ

こで，このような DDVP を含有した源水を浄水場に取り入れた場合を想定し，浄水処理による DDVP の分解について実験を行なった．静置および曝気による揮散は6—16%と少なく，有効塩素による分解も塩素濃度を一定以上に維持すれば，ある程度は有効であるが完全ではない．最も効果があったのは細菌，微生物を含んだ浄水場のろ過池の砂による処理で，ほとんどの DDVP が分解された．このことから，たとえ DDVP の残留している水を取り入れても，浄水場における処理でほぼ 100% の DDVP が除去されると思われるが，DDVP を含んだ源水を取り入れない対策をたてることが最良の方法であろう．

謝辞 本研究に御協力いただいた奥多摩町水道課，衛生局水道課の方々に深謝いたします．

（本研究の一部を日本薬学会第98年会昭和53年4月で発表した．）

文　献

1) DDVP 普及会：DDVP の安全性について，35，1972
2) Getzin, L. W. and I. Rosefield : *J. Agr. Food Chem.*, 16, 598, 1963

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 367—373, 1978

三次処理水に関する衛生学的研究（第1報）

中村　弘[*1]，斉藤庄次[*1]，高橋正博[*1]，松本淳彦[*1]
根津尚光[*2]，三村秀一[*1]

Hygienic Studies on Tertiary Treatment Waters (I)

HIROSHI NAKAMURA[*1], SHOJI SAITO[*1], MASAHIRO TAKAHASHI[*1],
ATSUHIKO MATSUMOTO[*1], NAOMITSU NEZU[*2] and SHUICHI MIMURA[*1]

緒　言

都市への人口集中化，工業の発展などに伴い，水需要はますます増大し，特に，大都市圏での水不足が深刻化することは必至である．このため，水資源の確保とその開発が進められる一方，手近かな水資源として都市下水あるいは工場排水の三次処理水の再利用が行なわれつつある[1-4]．国土庁では昭和60年を目標に大都市のビル街などに下水再処理水を用いた「中水道」を設置し，その使用を義務づける方針を固めている[5]．また一方，下排水の処理をより高度化することによって，環境汚染の進行を防止し，汚濁河川，海，湖等の回復が計られている[6,7]．

筆者らは，これら下排水処理の再利用にあたって，衛生学的安全性の確認と環境汚染源としての水質の把握を行なうため，今回は東京都内で実施されている三次処理水の水質分析，消毒実験および微量有機物質の検索を行なったので報告する．

実験方法

1. 三次処理水の水質分析　Table 1 および Table 2 に示す東京都内4施設の二次処理水，三次処理水等について主として衛生学的見地より水質分析を行なった．分析方法は主として上水試験方法[8]によった．

2. 塩素による消毒実験　1) 細菌類　二次処理水および三次処理水中の一般細菌，大腸菌群，腸球菌に，共存するアンモニア性窒素と関連させて塩素水（500mg/l）を Table 3 に示すように段階的に加え，30分間接触させたのち，1N$Na_2S_2O_3$ を加えて残留塩素を除去した．培養は上水試験方法[8]により，残留塩素の測定は電流滴定法により行なった．2) ポリオウイルス　三次処理水（Table 2 の D-2）600ml にポリオウイルス1型（Sabin, LSC, 2ab）株の感染価 10^7 $TCID_{50}$/ml のもの 0.1ml を加え，これに塩素水（500mg/l）を段階的に加え，遊離残留塩素濃度として0.3, 0.5, 0.7, 0.9および1.7mg/lとし，直後（1分以内），15分，30分，60分および120分後にそれぞれ 1N$Na_2S_2O_3$ を加えて残留塩素を除去した．培養は HeLa, Vero #518, CMK 細胞を用いて行なった．各検体ごとに Pc, SM を型のごとく添加し，その 0.2ml ずつを2本の細胞培養試験管に接種し，60分間吸着させたのち，PBS（+）で洗浄し，検体材料を除去後，培地 1ml を加えて37°，7日間 CPE（細胞変性効果）を観察した．

3. 微量有機物質の検索　1) 揮発性有機物質　Fig. 1 に示すセットを組み，二次処理水，三次処理水（それぞれの水質の概略を Table 5 に示す）を各々 10l とり，予め不純物を除去した窒素ガスを通じながら検水を40～50°に加温，含まれる揮発性有機物質を追いだし，これを−70°以下に冷却したGC用トラップに捕集した．このトラップをガスクロマトグラフ一質量分析計（以下，GC-MS）のキャリアーガス流路に接続し，加温気化した物質をカラム内に導入し，得られたピークそれぞれについてマススペクトルを測定した．2) 中，高沸点有機物質　二次処理水および三次処理水（Table 1 の A-1, A-2, B-1, B-2）各々 3l を凍結乾燥し，得られた残留物を約 200ml の精製エチルエーテルで抽出し，この抽出液をKD濃縮装置で約 1ml に濃縮した．さらに，1ml リアクチルバイアル瓶内で 30μl に濃縮し，この 10μl を

[*1] 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
[*2] 同微生物部
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Characteristics of Secondary and Tertiary Treatment Waters (I)

	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2
Date		Dec. 1, 1976		May 18, 1977	
Turbidity (mg/*l*)	3	3	1	0	0
Color (mg/*l*)	28	25	12	15	10
Odor	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
pH	6.9	6.8	7.0	6.8	6.0
NH_3-N (mg/*l*)	2.5	6.3	2.8	4.58	2.26
NO_2-N (mg/*l*)	0.75	0.49	0.09	0.97	0.01
NO_3-N (mg/*l*)	10.0	12.0	2.1	25.0	8.0
Albminoid-N (mg/*l*)	0.73	1.01	0.45	—	—
Cl^-(mg/*l*)	63.9	76.5	68.1	66.0	64.0
$KMnO_4$-consumed (mg/*l*)	9.4	10.0	5.9	17.0	12.0
BOD (mg/*l*)	6.0	1.8	1.8	—	—
Alkalinity (mg/*l*)	38	50	42	34	8
Hardness (mg/*l*)	112	116	98	126	136
MBAS (mg/*l*)	0.10	0.13	0.05	0.08	0.06
PO_4^{3-} (mg/*l*)	3.6	4.1	3.8	4.02	0.04
SiO_2 (mg/*l*)	21.6	22.4	21.3	21.8	20.6
SO_4^{2-} (mg/*l*)	58.5	68.5	64.5	56.7	85.6
Phenols (mg/*l*)	0.005	0.02	0.004	0.000	0.000
CN (mg/*l*)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fe (mg/*l*)	0.11	0.08	0.04	0.09	0.08
Mn (mg/*l*)	0.01	0.01	0.01	0.03	0.06
Zn (mg/*l*)	0.28	0.26	0.26	0.00	0.00
Cu (mg/*l*)	0.03	0.03	0.02	0.00	0.00
Cd (mg/*l*)	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000
Pb (mg/*l*)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ni (mg/*l*)	0.06	0.06	0.05	0.01	0.01
Hg (mg/*l*)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
As (mg/*l*)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total Residue (mg/*l*)	347	339	333	379	388
Ignite Residue (mg/*l*)	276	271	277	259	261
Total Colonies (No./m*l*)	1.2×10^4	4.3×10^2	2.7×10^2	3.6×10^4	4.0×10^2
Coli-Group (No./100m*l*)	7.9×10^4	3.3×10	7.9×10	1.3×10^6	2.4×10^3
Enterococcus (No./100m*l*)	1,700	0	5	79	23

A-1 : Raw water of K-industrial water works (Activated sludge treatment effluent of municipal waste water)

A-2 : K-industrial water (Sand filtration treatment and chlorination effluent of A-1)

A-3 : Activated carbon treatment effluent of A-2

B-1 : Secondary treatment effluent (Activated sludge treatment effluent of M-domestic waste water)

B-2 : Tertiary treatment effluent (Coagulation and sand filtration treatment effluent of B-1)

Table 2. Characteristics of Secondary and Tertiary Treatment waters (II)

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	D-1	D-2
Date	Apr. 30, 1976						Mar. 11, 1976	
Turbidity (mg/l)	4	1	0	0	0	0	0	0
Color (mg/l)	45	25	25	3	2	0	0	0
Odor	(+)	(+)	(+)	(−)	(−)	(−)	(+)	(+)
pH	7.2	6.9	6.9	7.1	6.7	7.0	6.5	6.6
NH_3-N (mg/l)	34.5	34.0	33.4	31.0	23.7	24.0	6.4	2.6
NO_2-N (mg/l)	0.01	0.02	0.09	0.05	0.84	0.13	1.53	1.05
NO_3-N (mg/l)	0.0	0.6	3.5	2.0	18.0	5.0	4.0	2.0
Cl^- (mg/l)	55.6	52.1	53.5	52.1	50.0	51.4	62.5	61.8
$KMnO_4$-consumed (mg/l)	21.8	11.9	8.3	7.8	8.7	5.8	7.7	4.6
Hardness (mg/l)	88	64	64	66	62	60	—	—
MBAS (mg/l)	0.08	0.10	0.11	0.02	0.02	0.02	0.13	0.07
PO_4^{3-} (mg/l)	9.12	0.79	0.38	0.23	0.20	0.20	2.1	2.9
Fe (mg/l)	0.10	0.05	0.05	0.05	0.05	0.00	—	—
Total residue (mg/l)	347	309	295	295	303	291	—	—
Total colonies (No./ml)	—	—	—	—	—	—	2.4×10^4	3.6×10^3
Coli-group (in 50ml)	—	—	—	—	—	—	(+)	(+)

C-1 : Raw water of K-pilot plant (Activated sludge treatment effluent of domestic waste water)
C-2 : Coagulation treatment effluent of C-1
C-3 : Sand filtration treatment effluent of C-2
C-4 : Ozonization effluent of C-3
C-5 : Activated carbon treatment effluent of C-4
C-6 : Chlorination effluent of C-5
D-1 : Secondary treatment effluent (Activated sludge treatment effluent of M-municipal waste water)
D-2 : Tertiary treatment effluent (Sand filtration treatment effluent of D-1)

GC-MS のカラムに導入し，得られたピークそれぞれについてマススペクトルを測定した．

結果と考察

1. 三次処理水の水質 分析結果を Table 1 および Table 2 に示す．今回分析を行なった処理水の水質は，そのほとんどが公表されているが[1-3]，その多くは一般的水質分析項目に限られている．これらの分析結果から，三次処理水の水質的特徴をあげると 1) 色度，臭気などがやや認められる．2) アンモニア性窒素，溶存有機物質（過マンガン酸カリウム消費量）濃度が比較的高い．3) 量的には少ないが，重金属類，陰イオン活性剤などの除去性が悪い．4) 一般細菌，大腸菌群，腸球菌などが認められる．などである．

2. 塩素による消毒実験 1) 細菌類 実験結果を Table 3 に示す．これら二次処理水および三次処理水中にはアンモニア性窒素が含まれているため，塩素注入により不連続点（Cl/NH_3-N 比が約 8 のところ）を生ずる．Table 3 の第 I 欄は塩素添加量の比較的少ない Cl/NH_3-N 比で0.1～1.0の範囲で，第 II 欄は不連続点前の Cl/NH_3-N 比で 3.5～7.4 の範囲で，第 III 欄は不連続点前後の Cl/NH_3-N 比で 5～12の範囲で塩素添加を行なった．これらの実験結果から，腸球菌が塩素に対する抵抗性が最も低く，本条件での塩素添加量ではアンモニア性窒素量の 0.2～0.3 倍量（総残留塩素として 1～3 ppm）で死滅した．同様に，大腸菌群はこれより抵抗性高くアンモニア性窒素量の 0.4～1.0 倍量（総残留塩素として 4～7 ppm）が必要であった．一般細菌はこの三者の中で最も抵抗性高く，不連続点を過ぎた Cl/NH_3-N 比 8 以上の塩素添加が必要であった．アンモニアと塩素によって生成するクロラミンは遊離塩素に比べ殺菌力が劣るため，高濃度のアンモニアを含む処理水を消毒するためには多量の塩素を必要とする．しかし，多量の塩素添加により，水の腐蝕性の増加[9]あるいは有機塩素化合物の生成[10-12]等の弊害が認められる．現在の段階では，一部で極力塩素注入量を抑えているが[9]，このため，消毒が不充分となり，細菌の復活現象[13]あるいは Table 1

Table 3. Reduction of Total Colonies, Coli-form Group and Enterococcus in Secondary and Tertiary Treatment Waters by Chlorination

		Chlorine added (mg/*l*)	Chlorine/NH_3-N (wt./wt.)	Residual Chlorine Free (mg/*l*)	Residual Chlorine Total (mg/*l*)	Total colonies (No./m*l*)	Coli-form group (No./100m*l*)	Entero-coccus (No./100m*l*)
I		0.0	—	0.0	0.0	3.5×10^3	3.3×10^4	1.1×10^3
	Secondary	0.9	0.1	0.0	0.6	1.2×10^3	7.9×10	5
	Treatment	1.8	0.2	0.0	1.4	9.1×10^2	3.3×10	0
	Effluent	3.7	0.4	0.0	2.8	7.9×10^2	5	0
		9.2	1.0	0.0	7.3	1.1×10^3	0	0
		0.0	—	0.0	0.7	9.1×10^2	2	0
	Tertiary	0.9	0.1	0.0	1.7	8.5×10^2	2	0
	Treatment	1.8	0.15	0.0	2.4	6.2×10^2	4	2
	Effluent	2.8	0.25	0.0	3.3	9.6×10^2	2	0
		4.6	0.4	0.3	4.2	9.1×10^2	0	0
II		0	—	0.0	0.0	3.6×10^4	1.3×10^6	7.9×10
	Sec.	25	5.4	0.05	13	2.0×10^2	0	0
	Treat.	28	6.1	0.20	15	1.4×10^2	0	0
	Effluent	30	6.5	0.20	17	1.5×10^2	0	0
		32	7.0	0.50	16	1.8×10^2	0	0
		34	7.4	0.85	12	1.6×10^2	0	0
		0	—	0.0	0.0	4.0×10^2	2.4×10^3	7.9×10
	Ter.	8	3.5	0.05	7.5	1.2×10	0	0
	Treat.	10	4.3	0.20	9	1.2×10	0	0
	Effluent	13	5.7	0.10	10	1.3×10	0	0
		15	6.5	0.15	10	1.8×10	0	0
		17	7.4	1.40	10	1.7×10	0	0
III		0	—	0.0	0.0	1.3×10^4	7.9×10^5	—
	Sec.	40	5	—	22	5.0×10^2	0	—
	Treat.	60	7.5	—	1.5	1.5×10^2	0	—
	Effluent	80	10	—	15	0	0	—
		100	12.5	—	20	0	0	—
		0	—	0.0	1.7	7.0×10	0	—
	Ter.	60	6	—	15	1.5×10	0	—
	Treat.	80	8	6	10	0	0	—
	Effluent	100	10	20	25	0	0	—
		120	12	35	40	0	0	—

の A-3 にみられるように，活性炭による再処理で細菌数が増加する傾向が認められる．2) ポリオウイルス 下水処理場に流入する下水中にはかなりの種類のウイルスが見出され[14]，これらの濃度は約 $10TCID_{50}$/m*l* といわれる[15]．当然，三次処理の処理過程でその一部は除去されるが，最終的には消毒を行なわなければ，ウイルスを死滅させることはできない．ウイルスの除去あるいは不活性化に関する報告は多いが[16]，三次処理水に対する実験例は少ない．今回の実験では，Table 4 に示したように，遊離残留塩素が 0.3mg/*l* 以上あれば，15 分以内にポリオウイルス 1 の不活性化が可能であるという結果が得られた．

3. 微量有機物質の検索 1) 揮発性有機物質 GC-MS による測定の結果，Fig. 2 に示すように，二次処理水，三次処理水とも 8 つのピークが得られた．同定された物質およびそれぞれのピーク高ならびにピーク高比

Table 4. Inactivation of Poliovirus 1 added in Tertiary Treatment Water by Chlorination (pH 6.8, 23°C)

Chlorine added (mg/l)	Chlorine/NH_3-N (wt./wt.)	Residual Chlorine Free (mg/l)	Residual Chlorine Total (mg/l)	Time of contact (min.) 1	15	30	60	120
4.8	1.8	0.3	1.6	(±)	(−)	(−)	(−)	(−)
9.5	3.7	0.5	5.7	(+) mold	(−)	(−)	(−)	(−)
20.4	7.9	0.7	10.7	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
21.9	8.4	0.9	10.8	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
25.7	9.9	1.7	11.2	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)

Table 5. Characteristics of Sample Waters for the Identification of Volatile Organics

	A	B
Date	Apr. 27, 1977	
Turbidity (mg/l)	1	1
Color (mg/l)	25	20
Odor	(+)	(+)
pH	7.0	7.1
NH_3-N (mg/l)	9.4	11.5
NO_3-N (mg/l)	3.0	2.0
Cl^- (mg/l)	51.4	60.5
$KMnO_4$-consumed (mg/l)	16.3	22.9
Hardness (mg/l)	62	64
Total residue (mg/l)	300	349

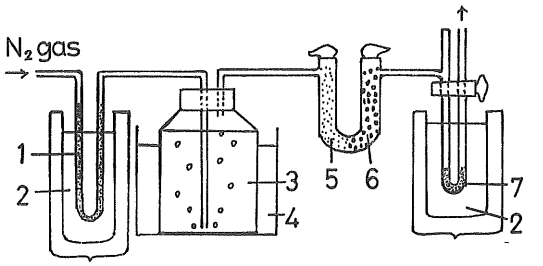


Fig. 1. Trapping Apparatus of Volatile Organics
1 : Activated carbon, 2 : Dryice ethanol,
3 : Sample water, 4 : Water bath (40-50°C),
5 : K_2CO_3 anhydrous, 6 : Soda lime,
7 : C-22, 60-80mesh

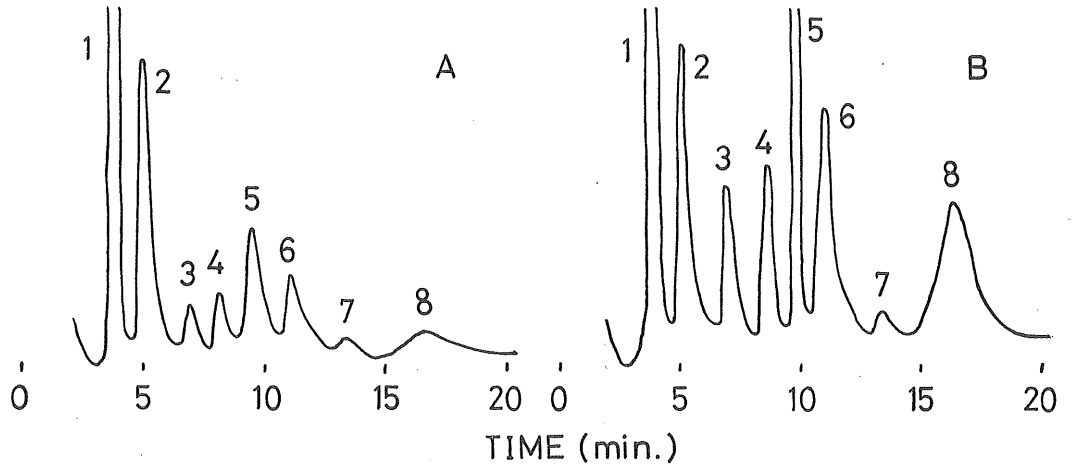


Fig. 2. GC-MS Chromatograms of Volatile Organics in Secondary (A) and Tertiary (B) Treatment Effluents
(Column : Glass 3m×3mmφ, packed with 20% TCP on Chromosorb W, AW, DMCS, 80-100 mesh, Column Temp. : 100°C, Carrier Gas : He 20 ml/min., Detector : TIC)

Table 6. Volatile Organics Identified

Peak No.	Compound	M.W.	Peak height (mm) A	B	B/A
1	Nitrogen	28	—	—	—
2	Ethyl ether	74	118	116	1.0
3	Dichloromethane	84	22	59	2.7
4	1, 1, 1-trichloroethane	132	26	72	2.8
5	Chloroform	117	47	205	4.4
6	Trichloroethylene	130	26	86	3.3
7	1, 2-dichloropropane	112	5	10	2.0
8	Tetrachloroethylene	164	11	56	5.1

を Table 6 に示す．ピーク3からピーク8まではすべて塩素化合物で，いずれも二次処理水中より三次処理水中に多く，1,2-ジクロルプロパンの2倍からテトラクロルエチレンの5.1倍まで，塩素処理によると考えられる増加が認められた．2) 中・高沸点有機物質　三次処理水 (Table 1 の A-2) から得られたガスクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示す．二次処理水・三次処理水ともにほとんど同じパターンを示し，同定された化合物の主なものは pyridine, methyl pyridine, methyl ethyl pyridine などのピリジン類，ethyl miristate, ethyl palmitate, ethyl oleate などの脂肪酸エステル類，酸化防止剤として使われている 2,6-dibutyl p-cresol (BHT) および dibutyl phthalate, dioctyl phthalate などのフタル酸エステル類ならびに C_9～C_{20} の脂肪族炭化水素であった．

むすび

現在，東京都内で行なわれている三次処理は，処理費軽減のため，比較的簡単な処理によるものが多い．このため，衛生学的安全性は不充分であり，その用途も直接身体に触れないもの，たとえば，工業用水，水洗便所用水などに限られている．これら処理水の水質的特徴としては，アンモニア性窒素および溶存有機物質が比較的多いことである．したがって，塩素による消毒を困難にし，完全な消毒を行なうためには，極度に多量の塩素を必要とする．このような多量の塩素添加は，水の腐蝕性を増大させ，有機塩素化合物の生成をも増加させる．

Reinhardt ら[17]は，下水の再利用に関し，ウイルスによる病気の伝達，重金属の蓄積，安定有機物による慢性

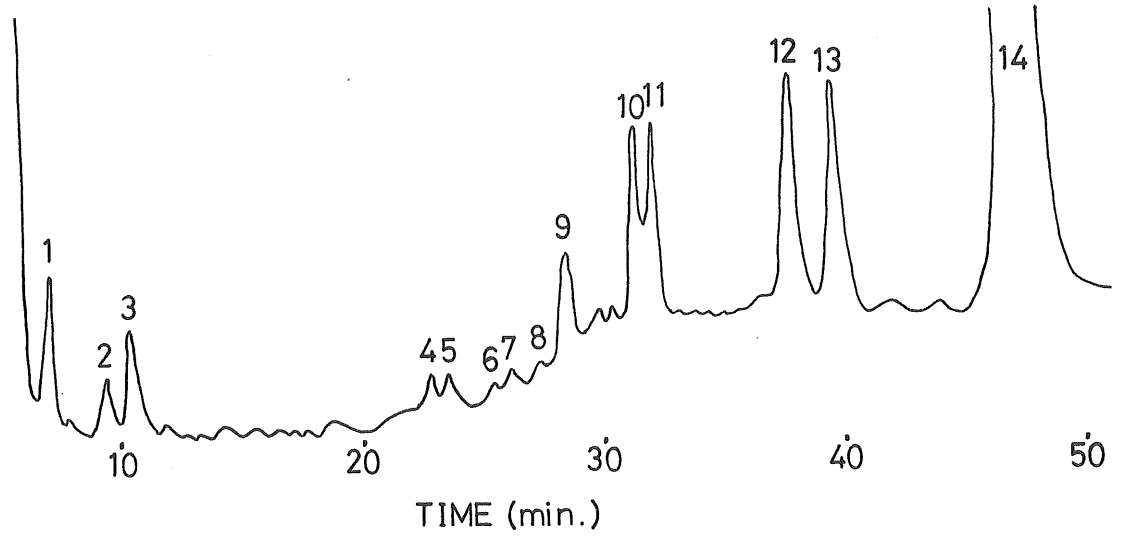


Fig. 3. GC-MS Chromatogram of Organics in Tertiary Treatment Effluent
(Column : Glass 2m×3mmϕ, packed with 20% PEG 20M on Chromosorb W, AW, DMCS, 80-100 mesh, Column Temp. : 100-240°C (5°C/min.), Carrier Gas : He 30 m*l*/min., Detector : TIC)
1 : C_9-hydrocarbon, 2 : C_9-hydrocarbon, 3 : Methyl ethyl pyridine, 4 : Aminoacetophenone, 5 : Unknown, 6 : Unknown, 7 : Ethyl miristate, 8 : 2, 6-dibutyl p-cresol, 9 : Acethyl dimethyl pyrrole, 10 : Ethyl palmitate, 11 : Ethyl palmitate, 12 : Ethyl oleate, 13 : Ethyl oleate ($-H_2$), 14 : Dibutyl phthalate

毒性などの健康上の問題を指摘している．今後，これら三次処理水が広く利用されるためには，誤飲，揮発性有機物の吸入，有害物質の経皮吸収あるいは病原微生物の感染等あらゆる面からの安全性が検討され，また同時に，処理水に含まれる未知物質の確認その毒性および処理法ならびに消毒法の確立などについて今後調査研究が必要であると考える．

謝辞 本研究に当り，試水を心よく提供して下さいました東京都江東工業用水事務所の方々およびその他の処理場の方々に深謝いたします．

（本研究の概要は第36回日本公衆衛生学会総会昭和52年10月に発表した．）

文　献

1) Aya, H. : *Advanced Wastewater Treatment*, 77, 1976, JRGWP SEMINAR, TOKYO
2) 東京都首都整備局：水の循環利用適合性予備調査報告書，1973，東京
3) 日本水道協会：雑用水道（中水道）基準調査中間報告書，水協誌，**507**，70，1976
4) Schmidt, C. T., I. Kugelman, and E.V. Clements : *Jour. WPCF* **47**, 2229, 1975
5) 昭和52年6月20日付読売新聞（朝刊）
6) Kashiwaya, M. : *Advanced Wastewater Treatment*, 175, 1976, JRGWP SEMINAR, TOKYO
7) 東京都首都整備局：水の循環利用適合性予備調査報告書(II)，1974，東京
8) 日本水道協会：上水試験方法，1970，東京
9) 武田福隆：水処理技術，**15**，53，1975
10) Jolley, R. L. : *Jour. WPCF*, **47**, 601, 1975
11) Glaze, W. H. and J. E. Hendarson IV : *Jour. WPCF*, **47**, 2511, 1975
12) Murphy, K. L., R. Zaloum, and D. Fulord : *Water Res.*, **9**, 389, 1975
13) Shuval, H. I., J. Cohen, and R. Kolodney : *Water Res.*, **7**, 537, 1973
14) 藪内　清，矢野一好，柴田タツ美他：東京衛研年報，**28-1**，32，1977
15) Wolf, H. W., R. S. Safferman, A. R. Mixson, and C.E. Stringer : *Jour. AWWA*, **8**, 526, 1974
16) Engelbrecht, R. S. : *Advanced Wastewater Treatment*, 109, 1976, JRGWP SEMINAR, TOKYO
17) Reinhardt, W., D. P. Spath, and W. F. Jopling: *Jour. AWWA*, **46**, 447, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 374—381, 1978

下水道未整備地域の水質汚濁について（第2報）

栃本　博*, 中村　弘*, 押田裕子*, 菊地洋子*
笹野英雄**, 池島伸至*, 友成正臣*

Water Pollution in the Area without Sewage Works (II)

HIROSHI TOCHIMOTO*, HIROSHI NAKAMURA*, HIROKO OSHIDA*,
YOKO KIKUCHI*, HIDEO SASANO**, NOBUYUKI IKEJIMA*
and MASAOMI TOMONARI*

緒　言

下水道未整備地域である東京都西多摩郡日の出町および秋川市を流れ，多摩川に合流する平井川は，全長16.5 km，流域面積約 38km^2，最大川幅が約 30m の小河川である．その流量は少なく，平常流量は最下流で約 0.5 m^3/sec であり，中流から上流にかけては，0.2m^3/sec 以下である．この河川の流域は，最近のベッドタウン化により人口が増加しており（昭和53年4月現在約2.5万人），河川への下排水の流入量も増えつつある．この地域住民の生活排水は，日の出町では河川放流と吸込処理が半々であり[1]，秋川市ではほとんどが吸込処理である．また一部の事業所などでは，浄化槽を設置し，その排水は河川に放流されている．

著者らは，昭和50年2月よりこの平井川の水質汚濁調査を行ない，前報[2]で昭和50年2月より51年1月までの測定データについて，その汚濁状況，原因，対策などを報告した．今回は主として昭和52年4月から53年3月までの測定データ，一部については昭和50年2月からの全測定データを用いて，汚濁状況の把握とその解析を試み，中小河川の汚濁特性について検討した．

調査方法

（1）測定点および測定回数　前報の平井川の測定点に，上流に1点，下流に2点を加え，調査範囲を広げた．今回は昭和52年4月より53年3月までの計12回のデータを主に用いた．調査地点を図1に示した．今回と前回の測定地点の関係を次に示す．（ ）内は前回の測定地点である．st. 1（新設），st. 2（st. 1），st. 3（st. 2，これより 500m 上流に移動），st. 4（st. 3），st. 5（st. 4），st.6（st. 5），st. 7（st. 6），st. 8（新設），st. 9（新設），st. 10（st. 7，本流合流点前に移動），st. 11（st. 8，本流合流点前に移動），st. 12（st. 9）

（2）測定項目および測定方法　前報の測定項目に，水温，濁度（積分球式濁度計），アルカリ度（pH 4.8），総鉄（オルトフェナントロリン法），亜硝酸性窒素（α-ナフチルアミン・スルファニル酸法），蒸発残留物を加え，計19項目とした．52年11月に採水したものについては，地質影響を調べるために，硫酸イオン（クロム酸バリウム法），重炭酸イオン（M-アルカリ度より算出），マンガン（過硫酸アンモニウム法），ナトリウムイオンおよびカリウムイオン（炎光光度法）について測定を行

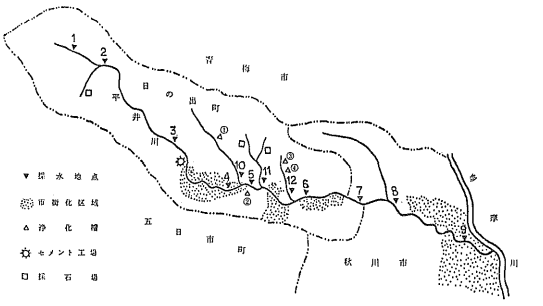


図 1.　採水地点と市街化区域

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

なった.

（3） 流量の測定および水質と流量の相関係数の算出法 測定地点 st. 5, st. 6, st. 7, st. 9 について，毎月水質調査と同時に，流速，水深を測定し，流量を算出した．また昭和53年5月には全地点について測定を行なった．なお流速測定には，電気流速計を用いた．

水質と流量の相関係数算出には，流量，大腸菌群数，一般細菌数については，対数をとり[3]，各測定項目の数値について，5％の危険率におけるトンプソンの棄却検定を行ない，数値を棄却し，相関係数を求めた．

結果と考察

（1） 各測定地点における水質 図2に測定地点における年間測定結果の平均値と標準偏差を示した．また図3に53年5月に測定した流量を示した．この流量は毎月の流量測定値より，ほぼ平常流量と考えてよいと思われる．以下各測定地点における汚濁状況について述べる．

st. 1 付近は森林で川幅わずか2－3mの沢である．図3に示すように流量は少ないが，汚染源は特になく，本調査の非汚染対照点とした．図2に示すように，ここは最も測定値が低く，標準偏差も小さい．細菌学的汚染もほとんど見られず，大腸菌群数は，10/m*l* 以下のことが多く，0/m*l* のこともある．

st. 2 小さな支流と合流し，流量もやや増加する．この地点までの汚染源としては，川に沿った二十数軒の人家と支流の上流にある比較的大きな採石場がある．濁度，過マンガン酸カリウム消費量，アンモニア性窒素，亜硝酸性窒素，硝酸性窒素，MBAS（メチレンブルー活性物質），硬度，導電率，蒸発残留物，鉄，大腸菌群数，一般細菌数が急激に増加し，汚染が認められる．またこれらの標準偏差も大きい．汚染源の一部は家庭排水によるものと思われるが，大部分は採石場排水によるものと考えられる．この点については後述する．

st. 3 st. 2 より山合を流下し，途中所々に人家があるが，排水流入量はあまり多くない．図3に示すように，流量の減少がみられるが，これは河川水の一部が伏流するためと考えられる．st. 2 で認められた汚濁物質は，沈でん，吸着などによりやや減少し，標準偏差も小さくなり水質的に安定する．

st. 4 この地点より 2km 上流では，河川水のほとんどが伏流し，流量の少ない時期にはこの途中で水無川となる．しかしこの地点の少し上流で湧出水がみられ，渇水時にもやや流量がある．この地点は，日の出町の中心的市街地を通過するので，多くの排水路があり，下排水の流入量が多い．図2のように，ほとんどの項目で急激な増加がみられ水質が最も悪く，標準偏差も大きい．主として家庭排水による汚染であるため，BOD，過マンガン酸カリウム消費量，リン酸イオン，MBAS，塩素イオン，硬度，アルカリ度，大腸菌群数，一般細菌数などの急激な増加がみられる．

st. 5 この地点で上流および支流の北大久野川の伏流水が湧出しているため，流量は急激に増加する．一方水質も改善され，各測定項目の標準偏差も小さくなる．また大部分が湧出水であるため，他の地点に比べて水温は夏に低く，冬に高く，水温の標準偏差も小さい．

st. 6 この地点では伏流水の湧出と支流の合流により流量はさらに増加している．図2に示されるように，多くの項目で汚染の増加が認められる．これは市街化区域からの排水が流入するため，再び汚染が進行していることを示している．各測定項目の標準偏差も再び大きくなっている．

st. 7 伏流水の湧出によると思われる流量の増加が認められ，市街化区域からの排水も流入するが，st. 6 と汚染度はそれほど変わらない．

st. 8 河川の傾斜がゆるやかになるため，流速が遅くなり，また伏流するため流量が若干減少する．しかしこの地点では秋川市の排水も流入するので，汚染は再び増加する．濁度，BOD，アンモニア性窒素，亜硝酸性窒素，リン酸イオン，MBAS，塩素イオン，鉄など主として家庭排水の影響がみられる．

st. 9 平井川の最下流地点で，伏流水の湧出などにより，流量は増加する．流域は市街化区域となっているが，家庭排水は主に吸込み処理のため，河川への流入は比較的少ない．また st. 8 から多摩川合流点まで，河川は数回蛇行し，この間に堰も多く，曝気，伏流などを繰り返す．このためリン酸イオン，MBAS，硬度，アルカリ度，大腸菌群数，一般細菌数などが浄化を受け減少したものと考えられる．一方濁度，硝酸性窒素，塩素イオン，蒸発残留物などの増加，pH の低下がみられるが，その原因は明確でない．

st. 10 平井川の中では最も大きな支流である．水質的には st. 5 にかなり近似している．しかし上流に浄化槽放流水，畜舎排水などの流入があるため，st. 5 より濁度，亜硝酸性窒素，リン酸イオン，塩素イオン，蒸発残留物などがやや多く，変動幅も大きい．

st. 11 上流に二ケ所の採石場があり，汚染源となっている．このため濁度，硬度，アルカリ度，導電率，蒸発残留物，pH は非常に高く，その変動幅も大きい．

st. 12 流量の非常に少ない支流であるが，汚染源が比較的多く，浄化槽放流水，畜舎排水の流入がある．このため三支流の中では最もし尿性汚染がはげしく，濁

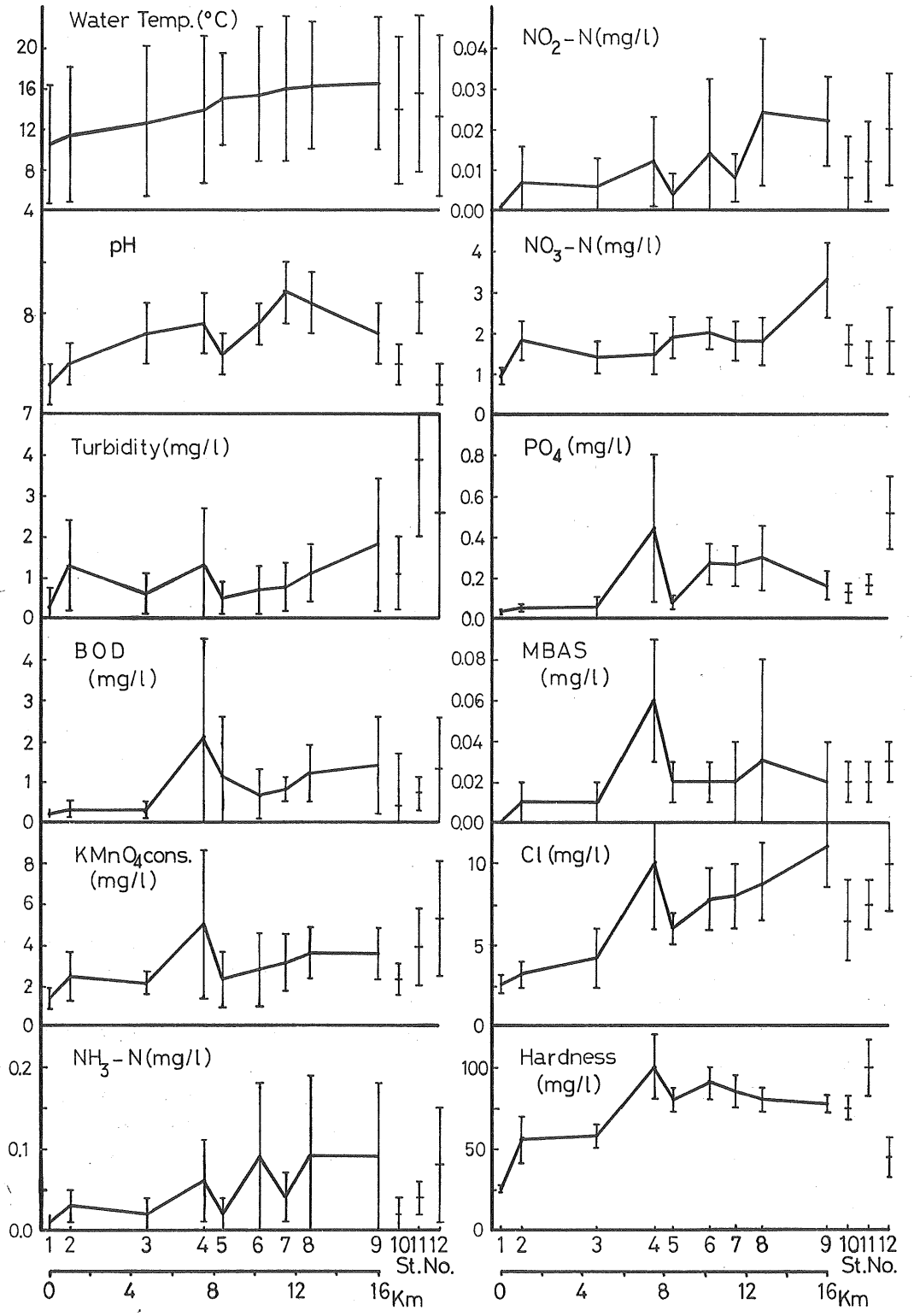


図 2. (1) 各測定地点における水質（平均値と標準偏差）

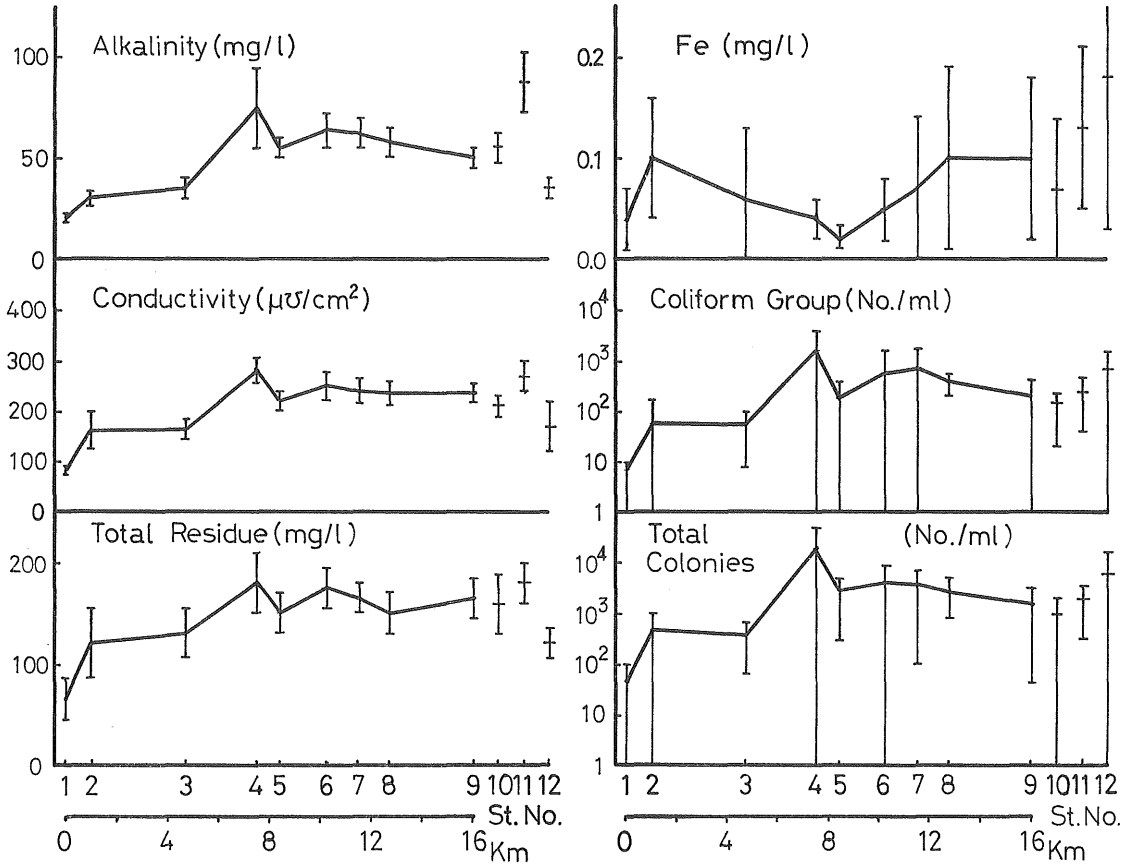


図 2. (2) 各測定地点における水質（平均値と標準偏差）

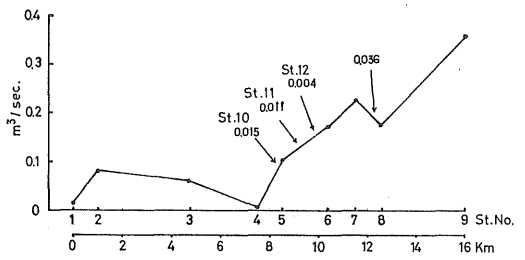


図 3. 各測定地点における平井川の流量
（昭和53年5月4日測定）

度，BOD，過マンガン酸カリウム消費量，アンモニア性窒素，亜硝酸性窒素，リン酸イオン，MBAS，塩素イオン，鉄，大腸菌群数，一般細菌数が高く，またこれらの標準偏差もきわめて大きい．

（2） 水質と流量の相関性 河川水の調査を行なうにあたって，水質と流量との関係を把握することは，当然必要である．一般に汚濁発生源が一定であれば，その汚濁度は，流量と逆相関を示すと考えられる．4測定点における各測定項目と流量の相関係数を表1に示した．これより一応の相関の認められたものに，逆相関では，硬度，塩素イオン，導電率，アルカリ度，BOD があり，正相関では，濁度，大腸菌群数，一般細菌数であった．他の項目では，相関性が全く認められなかったか，あるいはリン酸イオンのように測定点により全く逆の相関を示すものもあった．逆相関を示したものは，流量の変動に関係なく，その供給量がほぼ一定であるためであろう．st. 9 でアルカリ度，濁度の相関がなくなるのは，先に述べたように，特定の汚染源からの排水の流入によると考えられる．正相関を示した濁度については，新田により多摩川（丸子橋）においても同様な関係を示したことが報告されている[4]．大腸菌群数，一般細菌数については，流量増加による河床および地表面からの流出，濁質付着等も考えられるが，図4に示すように流量の多い夏期に多く，流量の少ない冬期に少ないことから，水温も要因になっているように思われる．リン酸イオンは

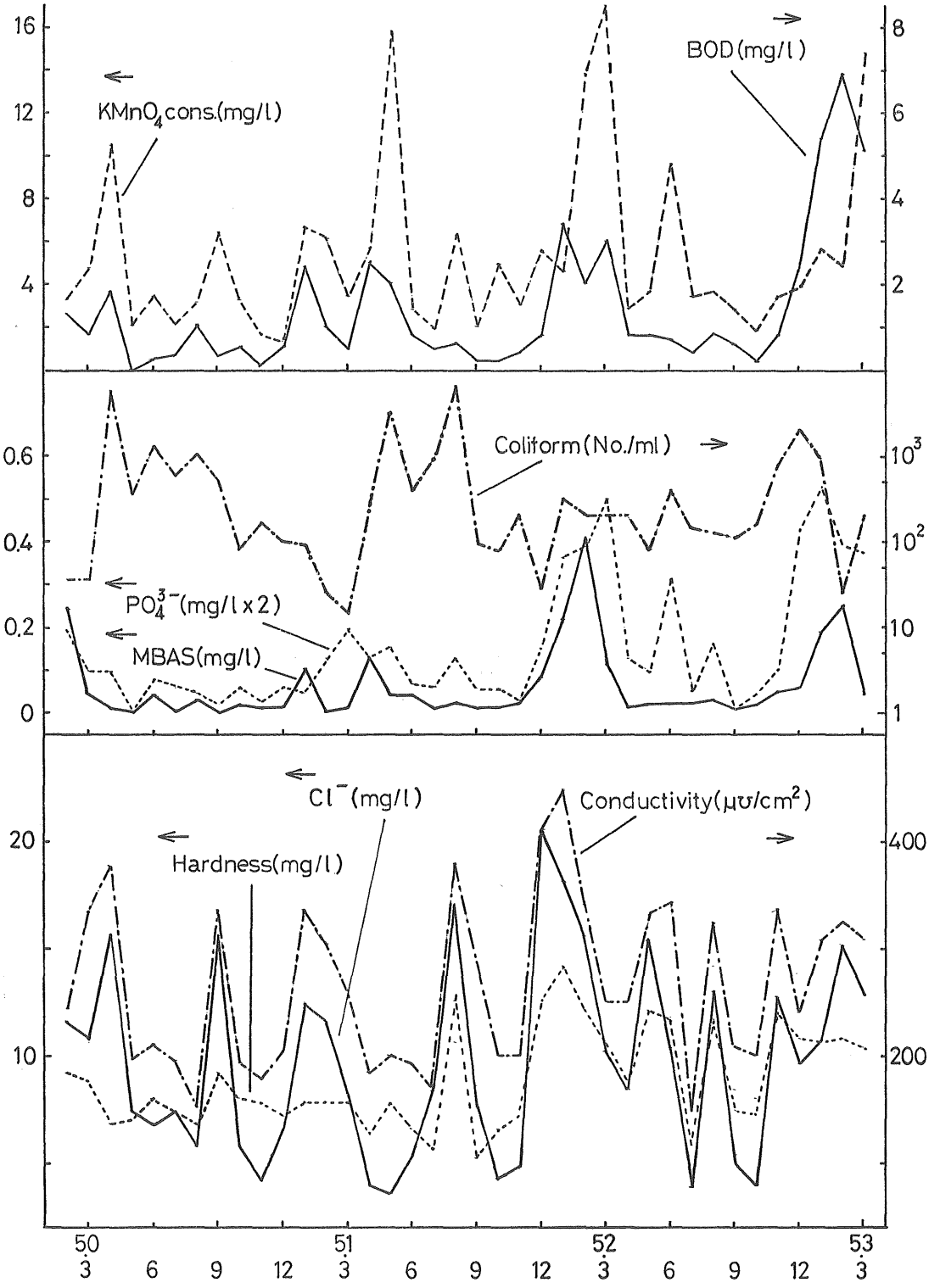


図 4. st. 4 における水質の経年変化

表 1.　水質と流量の相関係数

測定項目＼測定地点	st. 5	st. 6	st. 7	st. 9
pH	−0.15	−0.25	−0.29	+0.45
濁度	+0.69**	+0.52*	+0.50*	+0.11
BOD	−0.54*	−0.04	−0.55*	−0.19
$KMnO_4$ cons.	−0.01	+0.25	+0.24	+0.03
NH_3-N	−0.21	+0.01	−0.44	+0.09
NO_2-N	+0.29	+0.33	−0.49	+0.02
NO_3-N	+0.29	−0.29	−0.003	−0.24
PO_4^{3-}	+0.50*	−0.51*	−0.53*	+0.17
MBAS	+0.02	+0.41	+0.02	+0.06
Cl^-	−0.53*	−0.61**	−0.66**	−0.84***
硬度	−0.76***	−0.90***	−0.78***	−0.79***
アルカリ度	−0.47	−0.78***	−0.74***	+0.02
導電率	−0.46	−0.60**	−0.62**	−0.51*
蒸発残留物	−0.11	−0.05	−0.06	−0.21
鉄	+0.03	−0.10	−0.06	−0.21
大腸菌群数	+0.55*	+0.67**	+0.68**	+0.58**
一般細菌数	+0.33	+0.43	+0.39	+0.68**

*：$p<0.10$,　**：$p<0.05$,　***：$p<0.01$

一般に逆相関を示すことが考えられるが，st. 5 では正相関を示している．これは流量の少ないときはそのほとんどが湧出水であるが，流量の増加にともない上流のリン酸イオン濃度の高い水が伏流せず，直接流入するためと考えられる．濁度に関しても，st. 5 で最も高くなっているが，同様のことがいえると思われる．玉川浄水場原水（多摩川表流水）においては，過マンガン酸カリウム消費量，アンモニア性窒素が逆相関を示すことが報告されているが[5]，平井川においてはこれらの傾向はみられなかった．この原因については，図2にみられるように，断続的な汚染を受け，その変動幅が大きいことなどが考えられる．

（3） 経年変化　図4に st. 4 における50年2月から53年3月までの毎月の水質変化を示した．この地点は水量が少なく，排水の影響を最も敏感に受けるところであるため，その変動幅は大きく，汚染の特徴がよく現われている．BOD，MBAS，リン酸イオンは夏に少なく冬に多い傾向を示している．この地点の毎月の流量は測定されていないが，図5に示された st. 6 の流量から推測すると，夏に多く冬に少ない傾向がある．したがってこの地点では，BOD，MBAS，リン酸イオンは流量と逆相関を示すと思われる．また大腸菌群は先に水温との関係を述べたが，この図からも夏に多く，冬に少ない傾向がみられる．

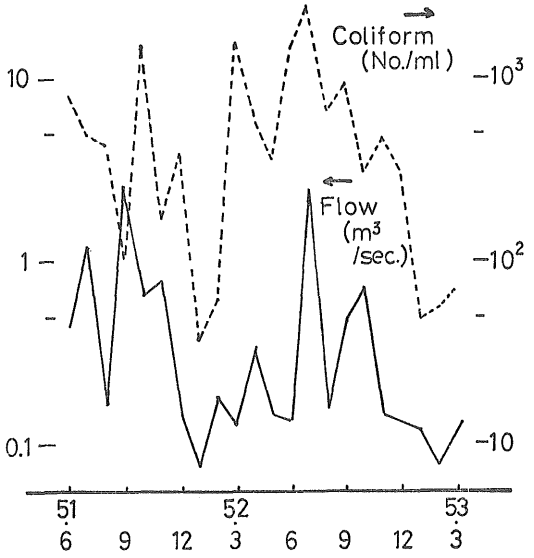


図 5.　st. 6 における流量と大腸菌群数

汚濁の進行については，この st. 4 では，50年2月から51年1月までの平均値（前報）に比較し，52年4月から53年3月までの平均値の方が，BOD，過マンガン酸カリウム消費量，リン酸イオン，MBAS，大腸菌群数，一般細菌数などの増加が認められるが，他の測定点では低下しているところもあり，全体的には特に顕著な汚染の進行は認められるとはいえない．

（4） ヘキサダイヤグラム　水の主成分は陽イオンとしては，Ca^{++}, Mg^{++}, Na^+, K^+ であり，陰イオンとしては，Cl^-, HCO_3^-, SO_4^{--} であるが，これらを図式化することにより，その水質特徴を知ることができる[6]．ヘキサダイヤグラムもその技法の一つで，この図形の大小により，溶存成分の多少を，図形の型により水質型を知ることができる．図6に52年11月における各測定点のヘキサダイヤグラムを示す．この図より各測定点の水質をみると，st. 2 で採石場排水混入の影響，st. 4 では流量減少と下排水流入の影響，st. 5 では伏流水湧出による溶存成分の減少が，また st. 11 でも採石場排水の影響がよく示されている．これらの図形から各測定点の水質型をみると，st. 2 では $CaSO_4$ 型を示すが，他はいずれも $Ca(HCO_3)_2$ 型を示す．この原因は地質的要因によるもので，その要因については，次に述べる．

（5） 塩素イオンに対する Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}, SO_4^{--} の当量比　日本の平均的河川水および平井川各測定点のこれらの当量比を図7に示す．Na/Cl および K/Cl 比は，日本の平均的な河川水に近い値を示すが，Ca/Cl, Mg/Cl, SO_4/Cl 比はいずれも高い値を示す．これ

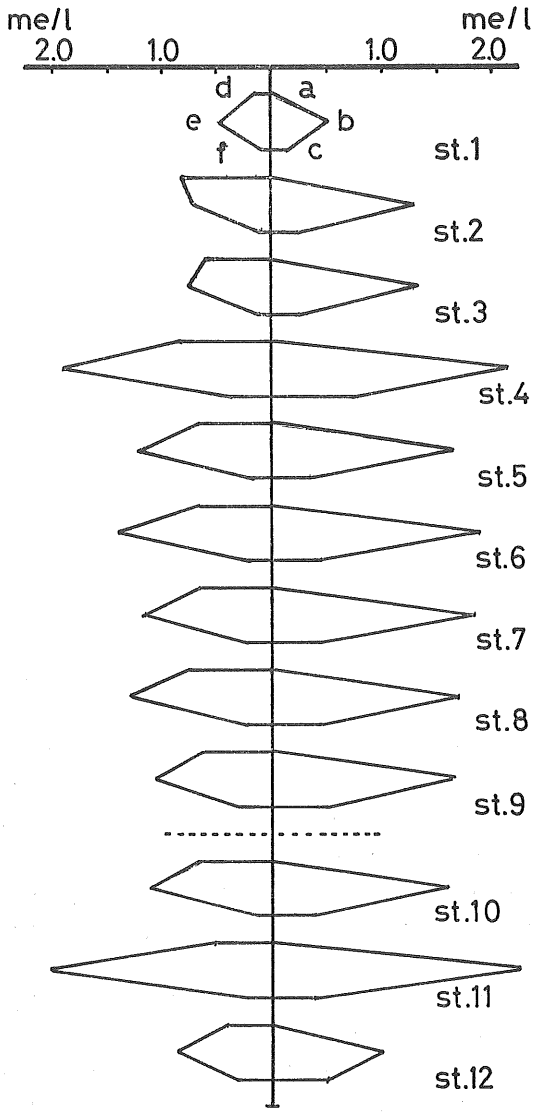


図 6. ヘキサダイヤグラム（平井川）
a: Fe+Mn, b: $Ca^{++}+Mg^{++}$, c: $Na^{+}+K^{+}$,
d: SO_4^{--}, e: HCO_3^{-}, f: Cl^{-}

表 2.

浄化槽 / 測定項目	pH	BOD (mg/l)
①大久野病院 172人槽	7.4±0.2*	17.6±5.8
	7.8**	24
	7.1***	6.9
②日の出ケ丘病院 350人槽	7.1±0.2	23±15.6
	7.4	59
	6.8	0.8
③芳洋会佳伸苑 150人槽	7.5±0.3	17.9±19.3
	7.8	44.8
	6.6	0.8
④泉会日の出舎 85人槽	7.0±0.2	3.7±2.2
	7.1	9.0
	6.6	0.8

* 平均値と標準偏差　** 最大値　*** 最小値

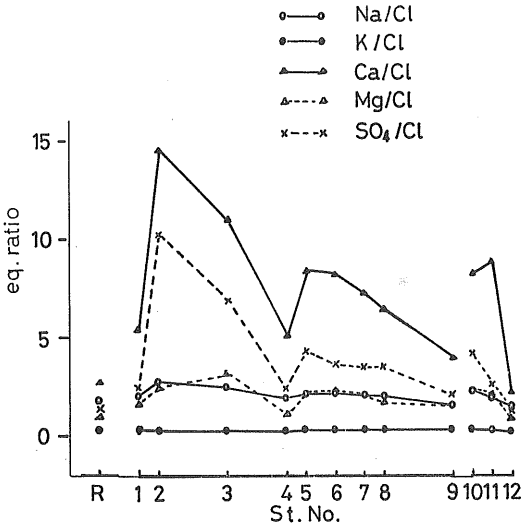


図 7. Cl^{-} に対する Na^{+}, K^{+}, Ca^{++}, Mg^{++}, SO_4^{--} の当量比
R: 日本の河川水の平均

らは地質的影響を示すもので，この流域に石灰岩地帯が存することにより，Ca/Cl, Mg/Cl 比が高く，また石灰岩に含まれる硫黄の影響により，SO_4/Cl 比が高いものと考えられる．また前述のように，平井川の水質型が，$CaSO_4$ 型または $Ca(HCO_3)_2$ 型を示すのも，この石灰岩の影響を強く受けているためと考えられる．

図よりこれら当量比は，st. 1 で平井川本来のものを示すと思われるが，st. 2 で採石場排水の影響，すなわち地質的影響を強くうけ，Ca/Cl, Mg/Cl, SO_4/Cl が極度に増加している．次の st. 3 では曝気による一時硬度の減少と家庭排水混入による塩素イオンの増加により，Ca/Cl, Mg/Cl, SO_4/Cl 比はやや低下している．st. 4 では水量の減少と，下排水の混入により塩素イオンが急増し，Ca/Cl, Mg/Cl, SO_4/Cl 比は著しく低下している．また st. 5 では湧出水のため，これら当量比は一時回復するが，流下にしたがい汚染は進行し，これらの当量比は次第に小さくなる．

（6） **浄化槽放流水**　平井川汚濁調査と平行して4つ

浄化槽放流水の水質

SS (mg/l)	NH_3-N (mg/l)	PO_4^{3-} (mg/l)	導電率 (μ℧/cm)	MBAS (mg/l)	大腸菌群数 (1ml中)	一般細菌数 (1ml中)
32±16	11.6±3.6	5.0±1.6	482±35	0.17±0.12	$3.4\times10^4\pm6.9\times10^4$	$2.1\times10\pm2.7\times10$
49	15.1	7.6	555	0.42	2.4×10^5	8.6×10^5
18	1.6	2.7	436	0.03	3.5×10^2	3.2×10^3
29±13	7.9±7.3	6.4±2.5	500±75	0.15±0.08	$1.2\times10^4\pm2.4\times10^4$	$3.6\times10^4\pm6.6\times10^4$
51	21.2	12.0	620	0.26	8.4×10^4	2.4×10^5
5	0.3	3.1	407	0.03	0	1.6×10^3
15±14	16.5±14.7	6.0±3.9	510±200	0.12±0.17	$5.9\times10^4\pm1.7\times10^5$	$1.0\times10^5\pm1.9\times10^5$
35	34.8	10.6	827	0.62	5.9×10^5	6.4×10^5
0	1.1	0.9	283	0.01	0	35
9±9	2.9±3.1	4.1±2.1	311±74	0.09±0.05	$1.0\times10^3\pm1.5\times10^3$	$9.0\times10^3\pm11\times10^3$
35	8.4	6.1	401	0.25	3.9×10^3	3.0×10^4
2	0.1	0.2	208	0.05	0	5.1×10^2

の浄化槽放流水の水質を毎月調査している．その結果を表2に示す．前報に比較し，④は管理が良く放流水の水質が良化したが，他は特に改善されたとはいえない．浄化槽の機能上，BOD，浮遊物質以外の除去は困難であるので，アンモニア，リン酸イオンなどは，非常に高濃度である．実際には，これらの排水が流量の少ない河川に放流されているので，大きな汚染源になっていると考えなければならない．

結　論

東京都多摩地区西部に位置し，ベッドタウン化しつつある日の出町および，秋川市を貫流する一小河川である平井川の汚濁解析を試みた．

1) この河川の主な汚染源は，家庭排水，浄化槽放流水，畜舎排水，採石場排水であるが，今回の測定結果では，st. 2 と st. 11 で採石場排水の影響を，st. 4, st. 6 で家庭排水，st. 12 で浄化槽放流水の影響を強く受けていた．家庭排水の処理は，上中流では河川放流が，下流の丘陵地帯では吸込み処理が主となっている．下流の秋川市には流域人口の約半数が住んでいるにもかかわらず，上中流に比べ汚染の進行はそれほどみられない．

2) 河川の汚濁形態を解析するために，4地点の各測定項目と流量との相関を求めた．全地点で相関の認められた項目は，硬度，塩素イオン，大腸菌群数で，地点により相関の認められたのは，導電率，アルカリ度，BOD，濁度，一般細菌数であった．これらのうち，大腸菌群数，一般細菌数，濁度は正相関で，他はすべて逆相関である．その他の項目，過マンガン酸カリウム消費量，アンモニア性窒素などにおいては，相関は全く認められなかった．これらの原因については，平井川の平常流量が少ないわりに汚濁原が多く，断続的な排水の流入に加え，河川水の伏流，湧出もあり，汚濁形態を複雑にしているためと思われる．

3) 昭和52年2月の調査開始から，今日までの測定データからは，測定点により汚濁の進行の認められたところもあるが，その逆のところもあり，特に顕著な汚濁の進行は認められなかった．

4) この河川水の主成分は，Ca^{++}, HCO_3^-, SO_4^{--} であり，主として，$Ca(HCO_3)_2$ 型の水質型を示す．これは地質的，特に石灰岩地層の影響を強くうけているためと考えられる．このため採石場排水などの影響で，硬度，アルカリ度，硫酸イオン等の著しい増加がみられる．

謝辞　本調査を実施するに当り，採水を行ない，多数の資料を提供された日の出町衛生課の方々に深謝いたします．

（本研究は昭和51，52年度当研究所研究課題「下水道未整備地域の水質汚濁について」として実施したものである．）

文　献

1) 西多摩郡日の出町：広報日の出第88号（昭和51年11月5日）
2) 栃本　博，笹野英雄，池島伸至他：東京衛研年報，27-1，342，1976
3) 半谷高久：水質調査法，第三版，377，1974，丸善，東京
4) 新田　正：東京工業大学学報，20，1，1961
5) 市川　新，横山道子：水道協会誌，502，25，1976
6) 永井　茂：工業用水，114，66，1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 29-1, 382—388, 1978

皇居内濠群の水質

渡辺 真利代*, 松本 浩一*

Water Qualities of Inner Moats around the Imperial Palace

MARIYO F. WATANABE* and KOICHI MATSUMOTO*

緒　言

都心にありながら隔絶した緑の森に被われている皇居は，通常われわれが接する千鳥ケ淵，日比谷濠，桜田濠などのいわゆる外濠のほかに，内濠と称される一群の濠を有している．これらの濠の水は都民の憩いの場としての望ましい景観が要求されるだけではなく，地震等の緊急時に際して，ある程度の処理を必要としても，飲料に供しうる水質であることが望まれている．

皇居の濠は都市の中央に位置し，また面積は小さく浅いという性質上，富栄養化の進行は速いであろう．事実，外濠のいくつかではすでに毎年水の華の発生がみられ，また内濠においても悪臭の発生が問題となった．外濠の水質については，1930年代のいくつかの報告[1,2]があるほか，'69年度からは当研究所などにおいて調査[3]が継続されている．また浄化対策委員会も作られ，その水質の浄化，保全について種々の検討がなされている．しかし内濠については現在の水質の状況に関するデータが不足している．このため，'77年度に4回行なった調査結果を報告し，現況を知ると同時に今後の水質の推移の資料とする．

調査時期および地点

調査は1977年5月26日，8月24日，11月24日，1978年2月24日に行なった．調査を実施した濠は，吹上大池 (St. 1)，上道灌濠 (St. 2)，中道灌濠 (St. 3)，下道灌濠 (St. 4)，蓮池 (St. 5)，乾濠 (St. 6)，平川濠 (St. 7)，天神濠 (St. 8)，二ノ丸池 (St. 9) であった（図1）．

調査方法

採水は表面水について行ない，実験室にもち帰り以下の項目を定量した．

1. 植物プランクトンの計数　試水 500m*l* にフォルマリン 5m*l* を加えて固定し，沈澱させ濃縮した後計数した．

2. 細菌数の計数　従属栄養細菌は桜井の培地[4]を用い，平板法で 25°，3日後に，大腸菌群はデソキシー

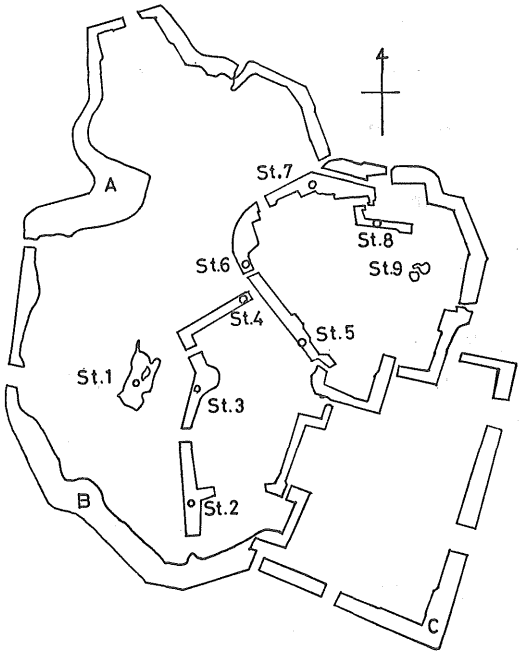


Fig. 1. Sampling Stations on the Inner Moats around the Imperial Palace
St. 1 : Fukiageohike 2 : Kamidokan
3 : Nakadokan 4 : Shimodokan 5 : Hasuike
6 : Inui 7 : Hirakawa 8 : Tenjin
9 : Ninomaru,
Outer moats A : Chidorigafuchi B : Sakurada
C : Hibiya

* 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. Water Temperature, Water Depth, pH and Transparency

Station	Month	Water Temperature	Depth	pH	Transparency
1	May	20.5°C	85cm	7.8	52cm
	Aug.	21.3	95	9.0	40
	Nov.	11.0	85	7.4	78
	Feb.	4.0	85	8.4	—
2	May	20.0	40	7.4	—
	Aug.	20.5	20	6.8	—
	Nov.	8.3	33	7.4	—
	Feb.	2.8	30	9.4	—
3	May	20.3	50	7.5	50
	Aug.	21.0	65	7.0	52
	Nov.	10.3	60	7.8	—
	Feb.	3.5	60	7.6	—
4	May	20.8	15	7.4	—
	Aug.	20.8	25	6.9	—
	Nov.	5.5	20	7.2	—
	Feb.	2.5	10	7.4	—
5	May	20.2	80	8.0	65
	Aug.	21.1	90	8.6	83
	Nov.	11.7	80	8.7	80
	Feb.	3.7	80	8.4	—
6	May	20.6	110	8.0	100
	Aug.	21.5	120	7.0	97
	Nov.	11.9	110	7.3	110
	Feb.	2.5	160	7.6	60
7	May	20.2	105	8.0	45
	Aug.	21.7	160	8.1	85
	Nov.	10.4	95	8.6	70
	Feb.	2.7	120	9.6	65
8	May	21.5	28	8.4	—
	Aug.	22.3	25	9.8	—
	Nov.	11.0	20	9.4	—
	Feb.	4.8	20	9.4	—
9	May	21.0	60	9.2	55
	Aug.	21.5	70	9.2	—
	Nov.	13.1	65	9.0	—
	Feb.	7.0	70	9.4	60

コレイト培地[5]を用い，平板法で37°，24時間後に計数した．

3. **セストン量** 試水をあらかじめ500°で焼いたグラスファイバーろ紙 (Whatman GF/C) でろ過し，その前後の秤量の差より算出した．

4. **クロロフィルa量** 試水をグラスファイバーろ紙でろ別し，Strickland & Parsons の方法[6]により定量した．

5. **有機態炭素量** セストンを定量の際のろ紙上のものを懸濁態有機炭素 (POC)，ろ液中のものを溶存態有機炭素 (DOC) とした．POC は CHN コーダー (柳本 Co.) により，DOC は Menzel & Vaccaro の方法[7]により定量した．

6. **無機態および有機態燐量** PO_4-P は Strickland & Parsons の方法[6]によった．有機態燐は，有機態炭素と同様にして懸濁態 (POP) と溶存態 (DOP) に分け

Table 2. Main Species of Phytoplankton (Cell Number/m*l*)

Month	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	St.6	St.7	St.8	St.9
May	*L. contorta* 66000 *Coelosphaerium sp.* 9600	*S. maximus* 280 *C. comta* 150	*Coelosphaerium sp.* 14000 *L. contorta* 1100	*F. construens* 9500 *M. granulata* 1200	*M. italica* 2200 *F. construens* 380	*M. italica* 1200	*A. spiroides* 17000 *M. aeruginosa* 5100	*S. maximus* 35000 *M. granulata* 5700	*F. construens* 2200
August	*Spirulina sp.* 300000 *A. Rachiborskii* 81000 *M. aeruginosa* 9300	*Spirulina sp.* 130 *F. construens* 80	*Spirulina sp.* 8500 *M. aeruginosa* 4500	*M. aeruginosa* 12000 *M. granulata* 4800 *F. construens* 4300	*M. aeruginosa* 2100 *M. granulata* 2000	*M. italica* 180 *M. granulata* 150 *Mougeotia sp.*	*M. aeruginosa*	*M. granulata* 3200 *M. aeruginosa* 1200 *S. maximus* 1200	*M. aeruginosa* 1900 *A. Rachiborskii* 1300
November	*M. granulata* 4900 *Oscillatoria sp.* 3300	*Cryptomonas sp.* 170000 *F. construens* 46000	*M. aeruginosa* 11000 *M. granulata* 7400	*M. aeruginosa* 5300 *F. construens* 2100 *M. granulata* 1300	*M. granulata* 2000 *C. comta* 600 *F. construens* 590	*C. comta* 1200 *M. granulata* 780	*M. granulata* 1300 *M. aeruginosa* 800	*F. construens* 95000 *M. granulata* 3300	*F. construens* 39000 *S. acus* 100
February	*M. aeruginosa* 840 *C. comta* 750	*C. comta* 120000	*A. gracilima* 650 *M. italica* 270	*F. construens* 910 *M. granulata* 100	*M. italica* 530 *F. construens* 220	*Aphanizomenon sp.* 390 *M. granulata* 160	*C. comta* 160000 *M. aeruginosa* 360	*C. comta* 140000	*C. comta* 160000

Fllagerate
Cryptomonas sp.

Blue-green
Lyngbya contorta *Microcystis aeruginosa*
Coelosphaerium sp. *Oscillatoria sp.*
Spirulina sp. *Aphanizomenon sp.*
Anabaenopsis Rachiborskii *Anabaena spiroides*

Diatom
Melosira granulata *Synedra acus*
Melosira italica
Cyclotella comta
Asterionella gracilima

Green
Scenedesmus maximus
Mougeotia sp.

Menzel & Corwin[8] の方法により定量した.

7. NH_4-N, NO_2-N, NO_3-N 量 NH_4-N はインドフェノール法[5], NO_2-N, NO_3-N は Strickland & Parsons の方法[6]によった.

結　果

1. 濠の一般的性状 各 Station の水温, 水深, pH, 透明度を表1に示した. 年間を通して水深が 80cm 以上ある濠は, St. 1, 5, 6, 7 であり, 逆に浅い濠は St. 2, 4, 8 であった. St. 2, 4, 8 では透明度が水深以上であり測定できなかったが, その他の濠の中で最も高い透明度が測定されたのは St. 6 であった.

2. 植物プランクトンの構成種の特性 各調査時に優占的に存在していた植物プランクトン種と数を表2に示す. 5月では Station によって優占種が異り, St. 1, 3, 7 では藍藻が, St. 4, 5, 6, 9 では珪藻が, St. 2, 8 では緑藻が優占種となっている. また St. 8 では *Scenedesmus maximus* が 10^4 オーダー/ml で優占種となっているが, このほかにも数種の *Scenedesmus* が数多くみられた. 8月にはいずれの濠とも *Microcystis aeruginosa* が出現していたが, St. 2, 6 では少なく優占種とはなっていなかった. またこの時期, St. 1, 2, 3, 4, 5, 8 では *Spirulina* が存在していた. 11月には, *M. aeruginosa* か珪藻の *Melosira granurata*, *Cyclotella comta*, *Fragiraria construens* が優占種となっているなかで, St. 2 は 10^5 オーダーの *Cryptomonas* がみられた. St. 2 では夏にハスが水面全体を被い植物プランクトン量が少なかったが, 11月の調査時ではハスの茎は枯死したあとであった. 2月には, St. 6 で *Aphanizomenon* がみられるほかは珪藻が優占種となっており, 特に *C. comta* が優占種となっている濠が多かった.

次に富栄養化した湖や池に典型的な水の華を形成する *M. aeruginosa* の量を比較した（図2）. 2月でも *M. aeruginosa* が表層水に認められたのは St. 7 のみであるため, 5月, 8月, 11月について表わした. ただし,

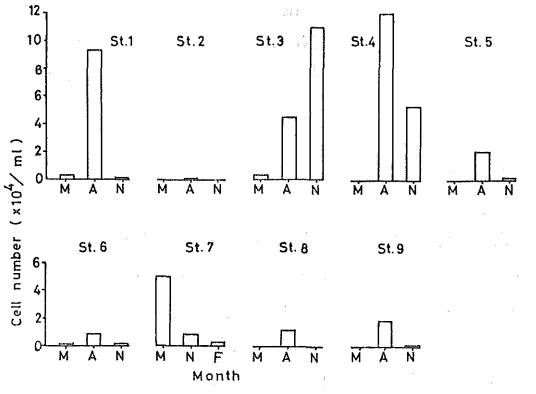


Fig. 2. Cell Number of *Microcystis aeruginosa*

Table 3. Number of Heterotrophic and Coliform Bacteria (Number/m*l*)

Station	Month	Heterotrophic	Coliform
1	May	1,100	10
	Aug.	3,400	61
	Nov.	16,000	44
	Feb.	1,000	0
2	May	6,000	17
	Aug.	48,000	28
	Nov.	15,000	1
	Feb.	2,100	0
3	May	6,200	5
	Aug.	37,000	73
	Nov.	12,000	45
	Feb.	1,100	0
4	May	25,000	14
	Aug.	44,000	58
	Nov.	12,000	45
	Feb.	700	0
5	May	2,400	14
	Aug.	6,500	10
	Nov.	3,000	8
	Feb.	700	0
6	May	9,800	2
	Aug.	16,000	5
	Nov.	20,000	4
	Feb.	780	0
7	May	11,000	4
	Aug.	54,000	17
	Nov.	13,000	0
	Feb.	2,500	0
8	May	54,000	17
	Aug.	5,700	18
	Nov.	21,000	14
	Feb.	130,000	0
9	May	41,000	10
	Aug.	3,500	4
	Nov.	7,700	6
	Feb.	170	0

St. 7 については8月のデータが使えないため2月の量を示してある．*M. aeruginosa* の多い濠としては，St. 1, 3, 4 が挙げられるであろう．外濠で報告されている[9]この種の量と比較すると1桁低いものとなっている．

2. 細菌数 従属栄養細菌は 10^2—10^5/m*l* の値が得られた（表3）．常に細菌数の高かったのが St. 8 であった．この濠では，2月に 130,000/m*l* の細菌数があり，他の濠では2月に最低となっていることと対照的であった．大腸菌群数は 0～61/m*l* で，St. 5, 6, 7, 8, 9 は 20 以下の低い値を示していた．従属栄養細菌数は外濠[3]と同程度であり，大腸菌群は流入下水のある松本城の濠の値[10]と比較するとずっと小さいものであった．

3. クロロフィル a (chl. a)，セストン，有機態炭素量 chl. a は大部分の濠で8月に最高値となっているなかで，St. 2 では11月に 1,080μg/*l* という高い値が測定されている（表4）．これは *Cryptomonas* の高い現存量と一致する．また St. 8 では全般的に高い chl. a 量が測られているが，8月が最低となっていた．chl. a 量で表わされた植物プランクトンの現存量は St. 5 で最も低く，これに St. 6 が続く．逆に多い濠として St. 1, 2, 3, 8 が挙げられるであろう．

セストン値の最高は St. 8 の 67.6mg/*l*（5月），最低は St. 1 の 5.6mg/*l*（2月）であり，chl. a 値に比較して全体としての変動幅は小さいものになっている．4回を通してのセストン値を比較してみると St. 6 で低く St. 2, 8 が高くなっている．

DOC 量は内濠全体として 2.74—9.97mg/*l*，POC は 1.60～14.5mg/*l* の変動幅があり，POC の変動幅に比較して DOC の変動幅は小さい．POC は St. 2, 8 で高く，St. 5, 6 で低かったが，DOC は St. 9 で低かった．また各々の濠で DOC よりも POC のほうが常に高かったのは St. 8 のみであった．

4. 無機態および有機態燐，無機態窒素量 PO_4-P は St. 2 の8月のみ高い値が測定された（表5）．この濠では高い Total-P が8月と11月に測定されているが，その内容は異なっている．8月には POP と PO_4-P が同程度であるが，11月では非常に高い POP 量となっており，この時期の高い植物プランクトンの現存量とも一致する．DOP の値としては St. 7 の8月に得られたものは高いと思われるが，その他の値は霞ケ浦で得られているもの[11]と同程度であった．NH_4-N は大部分低い値であったが，その中で5月の St. 7，8月の St. 2, 4, 7, で高い値が測定された．8月の St. 7 を除いて NH_4-N の高かった場合は，NO_3-N は低いものとなっている．NO_3-N が高いことが多かった濠は St. 3 と 7 であった．

考　察

濠全体としては，ここで測定された chl. a 量は，坂本[12]の分類による富栄養湖のなかに入るものであった．またセストン量，DOC 量，POC 量はいずれも典型的な富栄養湖である諏訪湖[13]や霞ケ浦[11]と同等か，もしくは，それを上まわる値であった．Total-P も日本の富栄養湖の値 0.01—0.09mg/*l*[14]を上まわる値であった．ま

Table 4. Amounts of Chlorophyll a, Seston and Organic Carbons

Station	Month	Chl. a (μg/l)	Seston (mg/l)	D. O. C. (mg/l)	P. O. C. (mg/l)	T. O. C. (mg/l)
1	May	34.7	22.7	6.90	6.24	13.1
	Aug.	157	35.9	6.21	13.4	19.6
	Nov.	17.1	14.8	7.20	13.4	20.6
	Feb.	16.4	5.6	9.97	2.46	12.4
2	May	52.4	28.4	6.88	6.72	13.6
	Aug.	13.6	9.6	6.27	2.58	9.85
	Nov.	1080	58.4	6.18	23.7	29.9
	Feb.	48.1	41.2	5.95	13.5	19.5
3	May	33.8	25.1	8.64	9.68	18.3
	Aug.	127	29.1	4.66	3.03	7.69
	Nov.	65.4	25.3	5.78	8.69	14.4
	Feb.	37.4	8.9	5.65	3.41	9.06
4	May	61.9	24.6	5.48	4.94	10.4
	Aug.	101	43.7	—	9.14	—
	Nov.	7.7	19.6	4.60	5.61	10.2
	Feb.	14.1	7.5	5.34	1.52	6.13
5	May	31.2	24.8	4.97	5.10	10.1
	Aug.	51.7	12.6	4.17	4.21	8.38
	Nov.	17.5	9.2	4.57	2.57	7.14
	Feb.	17.6	6.0	3.73	1.60	5.33
6	May	23.4	6.8	5.64	1.85	7.49
	Aug.	68.3	11.2	3.88	3.80	7.68
	Nov.	23.5	6.9	4.82	—	—
	Feb.	25.2	8.0	5.83	—	—
7	May	35.6	35.0	6.97	10.4	17.4
	Aug.	57.0	15.1	4.57	4.79	9.36
	Nov.	30.7	11.5	4.88	4.79	9.67
	Feb.	43.4	42.2	6.28	12.7	19.0
8	May	227	67.6	6.94	14.5	21.4
	Aug.	74.4	15.9	4.07	10.4	14.5
	Nov.	84.6	46.2	5.70	12.4	18.1
	Feb.	112	19.2	4.86	5.04	9.90
9	May	40.9	17.7	3.35	4.53	7.88
	Aug.	35.9	8.2	2.74	3.95	7.69
	Nov.	29.1	8.8	4.35	2.62	6.97
	Feb.	92.7	20.5	4.16	5.73	9.89

た皇居外濠群[9]と比較すると内濠で得られた chl. a 量は冬期に高く，夏はむしろ内濠のほうが低い傾向がみられた．

いずれの濠とも *M. aeruginosa* の出現がみられたが，その中で植物プランクトン量が多く藍藻の割合が高いかなり富栄養化の進んだ濠は，吹上大池 (St. 1)，中道濠 (St. 3)，平川濠 (St. 7) であった．これらと同程度の chl. a 量が測定されながら，*M. aeruginosa* をはじめとする藍藻の割合が低かったのが天神濠 (St. 8) であった．この濠はまた細菌数の常に高いのが特徴であった．天神濠は水深が 20—28cm と浅く土壌条件の影響は受けやすいと思われる．汚濁の状況からみると他の濠とは異質な原因物質の影響をうけているのではないだろうか．

Table 5. Concentrations of Inorganic and Organic Phosphori, and Inorganic Nitrogens (mg/l)

Station	Month	PO_4-P	D. O. P.	P. O. P.	Total-P	NH_4-N	NO_2-N	NO_3-N
1	May	0.003	0.012	0.101	0.116	0.014	0.001	0.015
	Aug.	0.004	0.018	0.152	0.174	0.014	0.004	0.050
	Nov.	0.010	0	0.058	0.068	0.072	0.008	0.073
	Feb.	0.003	0	0.017	0.020	0.011	0.003	0.023
2	May	0.070	0	0.156	0.226	0.020	0.003	0.008
	Aug.	0.229	0	0.197	0.426	0.881	0.008	0.007
	Nov.	0.024	0.034	0.402	0.460	0.032	0.004	0.004
	Feb.	0.002	0.012	0.181	0.195	0	0.001	0.004
3	May	0.012	0.003	0.152	0.167	0.009	0.008	0.019
	Aug.	0.018	0	0.132	0.140	0.020	0.035	0.559
	Nov.	0.012	0.016	0.104	0.132	0.037	0.015	0.250
	Feb.	0.002	0.012	0.027	0.041	0.011	0.012	0.328
4	May	0.010	0	0.123	0.133	0	0.003	0.014
	Aug.	0.005	0.004	0.253	0.262	0.367	0.090	0.051
	Nov.	0.001	0.019	0.116	0.136	0.026	0.026	0.435
	Feb.	0.011	0	0.015	0.026	0.032	0.025	0.419
5	May	0.007	0	0.011	0.018	0.014	0.009	0.011
	Aug.	0.007	0.005	0.061	0.073	0.017	0.029	0.377
	Nov.	0.001	0.013	0.037	0.051	0.018	0.005	0.033
	Feb.	0	0.013	0.019	0.032	0.014	0.009	0.051
6	May	0.013	0	0.038	0.051	0.005	0.004	0.009
	Aug.	0.014	0	0.087	0.101	0.022	0.029	0.367
	Nov.	0.004	0.020	0.029	0.053	0.032	0.004	0.010
	Feb.	0.002	0.001	0.022	0.025	0.028	0.006	0.015
7	May	0.003	0.021	0.139	0.163	0.170	0.004	0.010
	Aug.	0.003	0.086	0.189	0.278	0.122	0.013	0.210
	Nov.	0.003	0.005	0.046	0.054	0.035	0.013	0.135
	Feb.	0.003	0.011	0.090	0.104	0.008	0.002	0.139
8	May	0.025	0.012	0.341	0.378	0.022	0.003	0.014
	Aug.	0.003	0.009	0.073	0.085	0.027	0.004	0.057
	Nov.	0	0.024	0.120	0.144	0.040	0.002	0.001
	Feb.	0.003	0.011	0.081	0.095	0.015	0.009	0.046
9	May	0.033	0	0.070	0.103	0.017	0.009	0.061
	Aug.	0.003	0.001	0.050	0.054	0.009	0.026	0.373
	Nov.	0.058	0.014	0.076	0.148	0.054	0.017	0.466
	Feb.	0.003	0	0.096	0.099	0.022	0.008	0

比較的きれいな濠は蓮池 (St. 5), 乾濠 (St. 6) であった. chl. a, TOC, TOP, いずれも濠の中では低い値を示していた. 特に St. 6 では, 深度があるうえにある程度の水草が生えており, 水質が良好に保たれている大きな要素となっている. 濠の水質を良好に保持していく手段として, 濠の浚渫[15]と水草の移植およびその管理[16]が有効なものとなるであろう.

謝辞 本研究を実施するにあたり御便宜をはかっていただいた宮内庁管理部庭園課の方々に謝意を表します.

参考文献

1) 倉茂英次郎：気象集誌, 10, 475, 1932
2) 倉茂英次郎：気象集誌, 10, 482, 1932
3) 山崎洋子, 松本浩一：東京衛研年報, 26-1, 336, 1974
4) 手塚泰彦：陸水生物生産研究法, 287, 1968, 講談社
5) 日本水道協会：上水試験法

6) Strickland, J. D. H. and T. R. Parson : *A Practical Handbook of Sea Water Analysis*, 1968 Fish. Res. Bd. Canada
7) Menzel, D. W. and R. F. Vaccaro : *Limnol. & Oceanogr.*, **9**, 138, 1964
8) Menzel, D. W. and N. Corwin : *Limnol. & Oceanogr.*, **10**, 280, 1965
9) 山崎洋子，松本淳彦，松本浩一：東京衛研年報，**28**-1，279，1977
10) 倉沢秀夫，沖野外輝夫，加藤憲二，吉沢清晴：松本城の濠の富栄養化の現状とその対策，信州大学理学部付属諏訪臨湖実験所報告，1978
11) 手塚ら：霞ケ浦生物調査報告書，1974，建設省関東地方建設局霞ケ浦工事事務所
12) Sakamoto, M. : Bot. Mag. Tokyo, **79**, 77, 1966
13) 倉沢ら：諏訪湖生物群集の生産力に関する研究，JIBPPF 報告書，1973
14) Sakamoto, M. : *Arch. Hydrobiol.* **62**, 1, 1966
15) Gerin, C. and W. Ripl : *Arch. Hydrobiol.* **81**, 339, 1978
16) 渡辺真利代，松本浩一：東京衛研年報，**28**-1，285，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 389—391, 1978

藍藻 Microcystis の毒性（予報）

渡 辺 真利代*, 大 石 真 之**, 松 本 浩 一*

Toxicity of Blue-Green Algae *Microcystis* spp.

MARIYO F. WATANABE*, SHINSHI OISHI** and KOICHI MATSUMOTO*

緒　　言

有機汚濁が進行した湖沼や池では，春から夏にかけて，場合によっては秋の終りごろまで，水面が黄緑色に呈色するいわゆる“水の華”と呼ばれる現象にしばしば出会う．この水の華は *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* などの藍藻の大量増殖によって引きおこされるものであるが，これらの藍藻のなかには，家畜や水鳥や魚などの死亡の原因となる毒を有する種類があることは1880年代から数多く報告[1,2]されている．諸外国では上記藍藻が池や水たまりに繁殖しこれを飲んだ家畜が大量に死亡して経済的にも問題となった例が少なくない．わが国では，近年急速な水界の富栄養化に伴い人の飲料となる貯水池や湖沼に水の華が出現している[3-5]．Gorham[6,7]らは *Microcystis* や *Anabaena* の毒性はstrainによって異り，同一の水域から分離したものでも毒性のあるものとないものがあることを報告している．

水の華を形成するものとして各地の水域で最も多くみられる *Microcystis* の毒性を調査した結果と毒物の性質について報告し予報とする．

材料と方法

1. 藻体の採集と処理　野外試料は湖や池などの表層水を直接うすくすくうか，またはプランクトンネットによって採集した．培養したものとしては，*M. flos-aquae*（東大応用微生物研究所より分株）と皇居濠より分離した *M. aeruginosa* を用い，2000lux，連続照射下，CT培地[8]で培養した．いずれの藻体とも凍結乾燥後実験に用いるまで −20° で保存した．

2. 生物試験　藻体 300mg（乾重量）に蒸留水 6m*l* を加え，ホモジナイザー（ポリトロン）で磨砕し一晩 5° においた後遠心分離した．その上澄液を 0.2m*l* ずつマウス（ICR 系，体重約 25g）に腹腔内注射した．

3. 毒物の性質の検討　諏訪湖より採集した *M. aeruginosa* の水抽出液で，毒物の熱に対する安定性と蛋白分解酵素の影響を調べた．熱に対する安定性をみるために，水抽出液を60°，80°，100°の条件で10分間静置した後遠心分離し上澄液を 2 と同様に生物試験した．蛋白分解酵素の作用をみるため，トリプシン 0.2g/m*l*，ペプシン 0.1g/m*l*，プロナーゼ 0.1g/m*l* の割合で水抽出液に添加し 35° で60分置いた．次に，酵素作用をとめるため，これらを 100° に 3 分置いた後遠心分離し，上澄液を生物試験に供した．

結　　果

諏訪湖，皇居濠，碑文谷公園池より採集した *M. aeruginosa* および培養したものの水抽出液をマウスに投与した結果を表 1 に示す．また同じ濃度で調製した *Chlorella* の水抽出液およびコントロールとして蒸留水のみのものも投与した．この結果，諏訪湖から採集した *M. aeruginosa* のみに毒性が認められ，10匹投与したうちの 9 匹が 1 時間以内に死亡した．この水抽出液をさらに翌日 5 匹に注射したところ 5 匹全部が死亡した．次に諏訪湖から採集した *M. aeruginosa* 300mg に 6m*l* の蒸留水を加えて得られた水抽出液の濃度を 1 とし，この 1/2, 1/5, 1/10, 1/100 の濃度のものを注射した（表 2）．これでは 1 の濃度にのみ 100% の死亡が確認された．

熱に対する安定性を調べた結果（表 3）ではいずれの温度でもマウスは死亡した．この実験ではコントロールとして熱処理をしないものをもうけた．このコントロールと同様に，1 時間以内で死亡したものは60°と80°で処理したものであったが，100°で処理したものでは死亡ま

* 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
**同毒性部薬理研究科

Table 1. Toxicity of *Microcystis* Collected or Isolated from the Moats around the Imperial Palace, Lakes and a Pond

Species	Place	Date	Mortality 1	Mortality 2
M. aeruginosa collected from				
	Lake Suwa	July 21, 1977	9/10	5/5
	Moat Ushigafuchi	Aug. 23, 1977	0/10	
	Moat Chidorigafuchi	Aug. 23, 1977	0/10	
	Moat Hibiya	Aug. 23, 1977	0/10	
	Pond in Park Himon-ya	June 9, 1978	0/ 5	
M. aeruginosa isolated from				
	Moat	Aug. 23, 1977	0/ 5	
	Moat	Aug. 23, 1977	0/ 5	
M. flos-aquae isolated from				
	Lake Kasumigaura		0/10	
Chlorella			0/10	
Control			0/10	

Table 2. Effects of Concentrations of Water Extract on the Toxicity of *M. aeruginosa* Collected from the Lake Suwa

Concentration	Mortality
1	5/5
1/ 2	0/5
1/ 5	0/5
1/ 10	0/5
1/100	0/5

Table 3. Effects of Temperature on Toxicity of *M. aeruginosa* Collected from the Lake Suwa

Temperature	Mortality
60°	2/2
80	2/2
100	2/2

でに1時間半かかり，少し失活されたようだった．またはじめの水抽出液はフィコシアニンの色で青く呈色していたが，熱をかけることによってこの色素は変性し沈澱した．

3種の蛋白分解酵素の影響をみたもの（表4）では，トリプシン添加によって5匹全部が，ペプシン添加では5匹のうち3匹が生存しており毒物の失活がみられた．この実験では，水抽出液をそのまま35°で1時間置いた後，100°で3分熱処理したものをコントロールとし，これでは100%の死亡がみられた．

Table 4. Effect of Protease on Toxicity of *M. aeruginosa* Collected from the Lake Suwa

Enzyme	Mortality
Trypsin	0/5
Pepsin	2/5
Pronase	2/2
Control	5/5

考　察

有毒物質をもつ藍藻として知られているなかで，*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* の毒は水溶性で[7,9,10]あり，*Lyngbya* のものは水に不溶[11]であると報告されており，物質的には異質なものが含まれると推測される．このうち *Anabaena flos-aquae* の毒については構造決定がなされている[12]．*Microcystis* の毒に関しては Bishop ら[9]により7種のアミノ酸からなる環状のポリペプチドであり，数種の蛋白分解酵素を作用させても毒の失活がなかったことが報告されている．またその後 Murthy ら[13]により さらに3種の アミノ酸がつけ加えられている．諏訪湖で採集された *M. aeruginosa* の毒物は熱に安定な蛋白質と思われるが，蛋白分解酵素による失活がみられる．

また毒の作用として *Anabaena flos-aquae* のものは神経毒と明らかにされており[14]，*Microcystis* のものも

これに近いもの[15]といわれているが，また下痢を引きおこす毒素もあることが報告[16]されている．

ここでは限られた水域から採集された *M. aeruginosa* のみの生物試験を行なったにすぎないが，今後さらにいろいろな水域でおこっている水の華についても毒性を検討し，また毒物についても明らかにしていく予定である．

参考文献

1) Gorham, P. R. : *Algae and Man*, 307, 1964, Plenum Press, New York
2) Schwimmer, M. and D. Schwimmer : *Algae, Man and the Environments*, 279, 1968, Syracuse, New York
3) 橋本徳蔵：水道協会雑誌，439，10，1971
4) Okino, T. : *Jap. J. Bot.*, 20, 381, 1973
5) 津田松苗，生田美和子：霞ケ浦生物調査報告書，1974，建設省関東地方建設局霞ケ浦工事事務所
6) Gorham, P. R. : *Can. Vet. J.*, 1, 235, 1960
7) Gorham, P. R., J. McLachlan, U. T. Hammer and W. K. Kim : *Verh. Internat. Verein, Limnol.*, 15, 796, 1964
8) 市村輝宣，伊藤忠夫：微生物の保存法，355，1977，東大出版会
9) Bishop, C. T., E. F. L. J. Anet, and P. R. Gorham : *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 453, 1959
10) Sayer, P. J., J. H. Gentile, and J. J. Sanser : *Can. J. Microbiol.*, 14, 1199, 1968
11) Moikeha, S. N., G. W. Chu, and L. R. Berger: *J. Phycol.*, 7, 4, 1971
12) Huber, C. S. : *Acta Cryst.*, 28, 2577, 1972
13) Murthy, J. R. and J. B. Capindale : *Can. J. Biochem.*, 48, 508, 1970
14) Carmichael, W. W., D. F. Biggs, and P. R. Gorham : *Science*, 187, 542, 1975
15) Hughes, E. O., P. R. Gorham, and A. Zehnder: *Can. J. Microbiol.* 4, 225, 1958
16) Aziz, K. M. S. : *Science*, 183, 1206, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 392—399, 1978

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第6報）
三宅島大路池のプランクトンおよび水質の周年変化

松本淳彦*, 土屋悦輝*, 山崎洋子*
大野正彦*, 松本浩一*

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (VI)
Monthly Variations of Plankton and Water Quality of the Lake Tairo on Miyake Island

ATSUHIKO MATSUMOTO*, YOSHITERU TSUCHIYA*, YOKO YAMAZAKI*,
MASAHIKO OHNO* and KOICHI MATSUMOTO*

緒　言

三宅島にある大路池（山澤）は，およそ2,200年前に形成されたといわれる火口湖[1]で，もう一つの新澤とともに，以下に述べることから学術上貴重な存在となっている．

本湖は流入，流出する河川のない無口湖であり，人為的な汚染をほとんど受けていない閉鎖された環境下にある．1932年に吉村，宮地[2]がはじめてこの島の湖沼調査を行なっているが，この約30年後に福島[3]，水野[4]，東京都水産試験場[5]などの調査報告がみられている．また最近では松本[6]，新井[7]らの報文があるが，いずれも生物学的な面に関する詳細な調査報告が少ない．この閉鎖環境下にある本湖を調査し，数多くの富栄養湖と対比する資料を作成することは，陸水学上また環境保護，水資源保護の面からも重要なことである．そこで著者らは，まず大路池のプランクトン相とその変遷，および理化学的特性の周年変化を明らかにしようとしたものである．

調査時期

1973年4月から1974年3月までの1年間にわたる各月末に現地へおもむき，調査を実施した．調査地点は湖心部に一点を設定し，おおむね11時から14時にかけて観測を行なった．

調査項目および方法

水温，電気伝導度は電気水質計（東邦電探EST-3型）を使用して深度1mごとに測定を行なった．湖水はバンドーン採水器（5*l* 容）で深度2mごとに採水した．pHは比色法，溶存酸素はウインクラー変法により現場測定し，その他の分析は実験室に持帰ったのち，おもに上水試験方法に準じて行なった．クロロフィル*a*は，湖水をグラスファイバーフィルター（Whatman GF/C）で汎過したものを凍結して持帰り，Strickland & Parsons[8]の方法により測定した．

植物プランクトンは，ホルマリン固定した湖水をそのまま，あるいは5倍，10倍に濃縮したものを0.1m*l* とり，界線スライドグラス上で検鏡し，湖水1m*l* 中の個体数を算定した．付着藻類は，1974年1月から5月までの4カ月間，5×5cmの白色塩化ビニール板を深度2mごとに吊下げ，これに付着増殖したものを検鏡した．珪藻類は酸処理後永久プレパラートを作成し，1,000倍拡大で検鏡同定した．動物プランクトンは，口径20cm（XX13）のプランクトンネットを底層から3回引綱して採集し，ホルマリン固定したものを定性的に検鏡した．

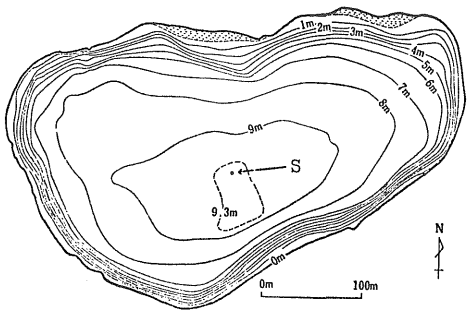
湖盆形態と概況

大路池の測深図と形態を堀江[9]，新井[10]の資料からFig. 1に示した．湖の北岸2カ所にはガマ，アシ等の挺水植物が，また湖岸から数m沖部の水深1mほどの周囲に，ホザキノフサモ，タイロモ等の水草がよく繁茂している．

調査結果

1. 水温，電気伝導度，溶存酸素，pHの周年垂直分布　湖水の表面水温は観測時の気温と大きな差はなく，

* 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



Longitude (E)	137°32′
Latitude (N)	34°03′
Altitude (m)	0
Length (m)	500
Breadth (m)	300
Length of Shore Line(m)	1,300
Area(m²)	98,806
Maximum Depth(m)	9.25
Mean Depth (m)	6.34
Volume (m³)	645,843

Fig. 1. Contour Map and Morphometric Features of the Lake Tairo
S : Sampling station　　Copied from Horie (1956), Arai (1972)

4月と8月を除いておおむね水温は気温より低い．水温の垂直分布と周年変化を Fig. 2 に示した．水温躍層は，4月から9月の間にしだいに顕著に形成されていたが，その深度が徐々に深くなっていくことが分かる．すなわち，表面水温が4，5，6，9，7，8月の順で高くなっていくにしたがい，躍層の形成深度は，2～3 m，4～5 m，6～7 m，7.5～8.5mそして4～5 m，5～6 mの水深にそれぞれ認められた．10月に入ると湖は循環期となり，翌年1月までの4カ月間は全層ほとんど等温となっていた．この時季には，三宅島では強風の吹く日がつづき，水面に波浪も起き，ときには水しぶきが舞上がるほどである．本湖のように浅い湖では，循環期といっても強風による湖水の攪拌がかなり影響しているものと考えられる．表層と底層との水温の差は，7月がもっとも大きく10Cにもなり，12月は最小でわずかに0.2Cであった．

電気伝導度は18C換算値として図示したが，560～770 $\mu\sigma$/cm の範囲にあった．上層部では590～630$\mu\sigma$/cmを示すが，深層ほど高くなり，とくに9月がもっとも高く8，9 m層で 770$\mu\sigma$/cmとなっている．新井（1977）によればこれは地下水による影響であると述べているが，この地下水の電気伝導度は1,380$\mu\sigma$/cm と高く，これが湖水の停滞期と重なって高くなったものと思われる．

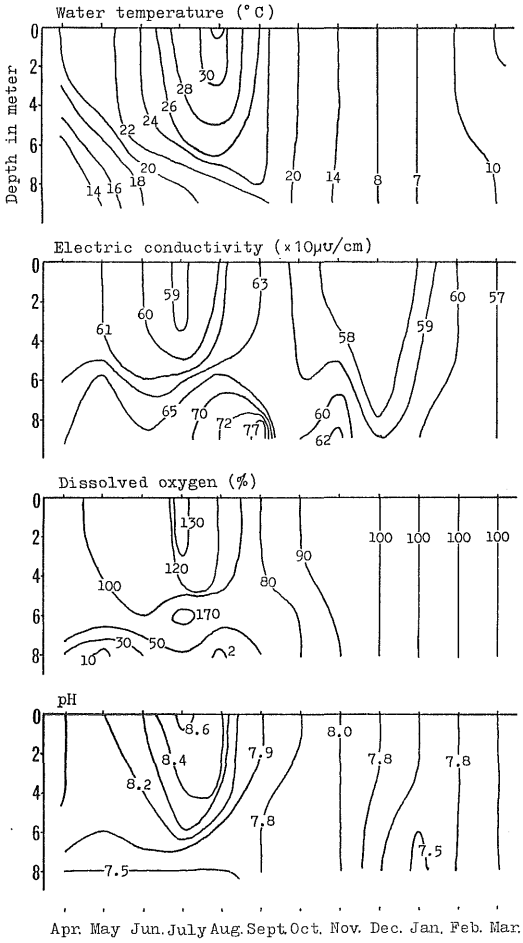


Fig. 2. Monthly and Vertical Distributions of Water Temperature, Electric Conductivity, Dissolved Oxygen Saturation and pH Profiles in the Lake Tairo, April 1973-March 1974

溶存酸素は飽和率で示したが，Fig. 2 のように表層における飽和率は，9月の80%，10月の90%を除くとすべて100%前後を示し，とくに6～8月の間は110～130%の過飽和状態になっていた．また7月の調査時には，表層から4 m 層まで120%強であったものが，6 m層に至って急激に 170%の過飽和極大が観測された．吉村（1938）[11] によると，日本の湖沼の特色として変水層に著しい過飽和極大層がみられるといっており，彼自身も本湖において1932年6月に7 m層で 122%を観測している．また著者らは1972年8月に4 m層で 127%の極大層を認めている．しかし，他の月の成層深度ではこの現象は観測されなかった．4月から9月にかけて8 m層では

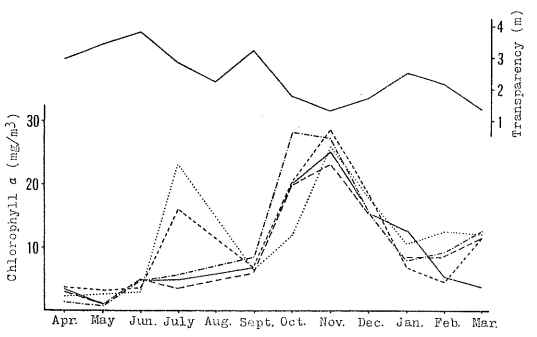


Fig. 3. Monthly Variations of Transparency and Amount of Chlorophyll *a* in the Lake Tairo, April 1973 - March 1974. The Following Lines indicate Each Depth Water Sample.
——Surface, - - -2m, -------4m, ------6m, and ……8m.

50%以下に低下し，ことに8月はわずかに2.3%で無酸素状態に近くなった．10月以降の循環期には90%以上の飽和率となり，表層と深層とに大きな差はみられていなかった．pHは，7月に表層で8.6を記録したのが最高でありその他は7.7～8.4の間を変動していた．成層期の4月から9月の間と，翌年1月の8m深度では7.5と低い値であった．

2. 透明度とクロロフィル*a*量

本湖の水色は周年緑色を呈しているが，とくに10月から11月にかけては植物プランクトンの増殖期となっているため，濃緑色となり，透明度も1.3～1.7mと年間でもっとも低くなっている．透明度の周年変化をFig. 3に示したが，1.3～3.8mの間を変動し，2m以下は10～12月の間と翌年3月であった．6月（3.8m）および9月（3.2m）は3m以上を記録し，これはプランクトンの衰退期にあたっている．約40年前の1932年6月に吉村，宮地が測定した5.5mと比較すると，やや低下している．

クロロフィル*a*量は深度2mごとの測定結果であるが，その平均値をみると，もっとも高かったのは11月の26.0mg/m³であり，最低は5月の0.8mg/m³であった．各月における測定値を深度ごとに図示したが，透明度の変化とよく関連していることがわかる．これはまた湖水中のプランクトン個体数ともかなり一致していた．7月における6，8m層でchl *a*量が急増しているが，プランクトンの垂直分布には大きな差はなく原因がはっきりしない．この6m層で溶存酸素が170%飽和を示していたことと関連があるものと思われる．成層期には中層で藍藻が極大分布する場合があり，しばしばこういう現象が起こるといわれる．本湖の場合は，むしろ珪藻，緑藻類の方が1,000個体ほど多く分布してはいたが，このことについてはサンプリングの深度間隔を浅くし検討する予定である．

3. プランクトン相の周年変化および付着藻類

この調査期間中に見出されたプランクトンは，藍藻類4，黄色鞭毛藻類1，渦鞭毛藻類2，ミドリムシ藻類2，珪藻類8，緑藻類13，根足虫類3，輪虫類7，甲殻類3の計43 taxaであった．これらは次のようなものであった．

Cyanophyceae
- *Anabaena* sp.
- *Anabaenopsis raciborskii*
- *Chroococcus* sp.
- *Oscillatoria* spp.

Chrysophyceae
- *Dinobryon sertularia*

Dinophyceae
- *Ceratium hirundinella*
- *Peridinium* sp.

Euglenophyceae
- *Euglena oxyuris*
- *Euglena* sp.

Bacillarophyceae
- *Cyclotella stelligera*
- *Cymbella microcephala*
- *Fragilaria* sp.
- *Gomphonema constrictum* v. *capitatum*
- *Nitzschia acicularis*
- *Nitzschia* sp.
- *Synedra acus*

Chlorophyceae
- *Ankistrodesmus falcatus*
- *Ankistrodesmus falcatus* v. *spirilliformis*
- *Ankistrodesmus falcatus* v. *mirabilis*
- *Ankistrodesmus* sp.
- *Chlamydomonas* sp.
- *Cosmarium* sp.
- *Hyaloraphidium contortum* v. *tenuissimum*
- *Mougeotia* sp.
- *Scenedesmus quadricauda*
- *Scenedesmus* spp.
- *Selenastrum* sp.
- *Spirogyra* sp.
- *Staurastrum tetracerum*

Tetraedron minimum

Rhizopodea

Arcella vulgaris

Centropyxis acureata

Euglypha sp.

Rotatoria

Asplanchna priodonta

Brachionus angularis

Brachionus angularis v. *bidens*

Filinia longiseta

Keratella cochlearis v. *tecta*

Keratella varga monstrosa

Trichocerca sp.

Crustaceae

Alona sp.

Bosmina longirostris

Copepoda sp.

この taxa 数は，1972年の調査時より 4 taxa 多くなっている．植物プランクトンは深度ごとに計数したが，月別の垂直分布は種によっては多少の違いはあっても総個体数にはほとんど差がみられなかった．ただ，7～9月の停滞期に表層より深層で1/1.5～1/2ほど減少しているにすぎなかった．湖水 1 m*l* 中の平均個体数は2,000/m*l* から12,000/m*l* であり，5月，9月に少なく，12月がもっとも多かった．

これらのプランクトン群集には季節的に大きな変化はみられないが，量的に増殖あるいは衰退が著しい種と，周年大きな消長を示さないものとがみられた．Fig. 4 に優占的に出現した 15 taxa についての周年変化を図示した．季節的な消長がはっきり現われているものは，藍

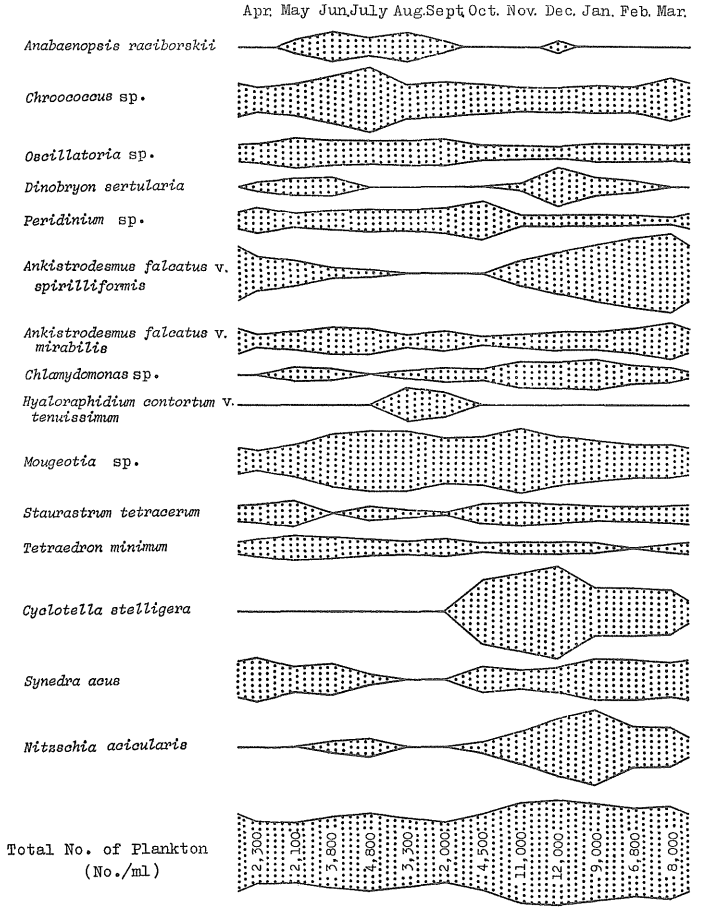


Fig. 4. Diagram showing Monthly Quantitative Changes of Fifteen Dominant Species of Phytoplankton in the Lake Tairo, April 1973 - March 1974

藻の *Anabaenopsis raciborskii* が水温の高い5月から9月にかけて，個体数（20～280/m*l*）は少ないながら出現した．黄色鞭毛藻の *Dinobryon sertularia* は7～10月の間を除いてみとめられ，とくに12月に 560/m*l* と多かった．この消長過程は緑藻の *Ankistrodesmus falcatus* v. *spirilliformis* も同じ傾向であったが，本種は2月から3月が増殖期となっており，3,300，5,000/m*l* と卓越した．本種については，1972年の調査では *A. falcatus* v. *mirabilis* (a) としていたが，Hortobagyi, T. (1973)[12] の記載から変種 *spirilliformis* とした．珪藻の *Cyclotella stelligera* は4～9月の間はみられなかったのが，10月に至って急に出現し 2,700/m*l* を数え，さらに12月には 7,800/m*l* にまで達した．その後は徐々に衰退していった．1972，1973年の2月に 7,000～8,000/m*l* と多く出現していた *Synedra acus* は急減しており，4月の 940/m*l* にとどまっていた．本種は水温の上昇とともに消滅し，8月，9月にはまったくみとめられなくなった．しかし，10月に入るとふたたび漸次増加しはじめ，明らかな周年消長をくり返した．*Nitzschia acicularis* は，6，7月に少数（70/m*l*）が出現したが，8，9月に一旦消滅し，12月になって急増しはじめ，1月には 4,100/m*l* と最大となった．

つぎに，大きな周年変化を示さず，常に少数ながら出現のみとめられるものに藍藻の *Oscillatoria* sp.，渦鞭毛藻の *Peridinium* sp.，緑藻の *Ankistrodesmus falcatus* v. *mirabilis*, *Staurastrum tetracerum*, *Tetraedron minimum* などがみられた．また藍藻の *Chroococcus* sp.，緑藻の *Mougeotia* sp. は個体数の多いまま周年出現しており，とくに後者は 500～3,000/m*l* (11月) の間を増減しており，本湖の代表的プランクトンといえる．この傾向は，1972年の四季変化調査で記したことと同様であった．1966年7月に東京都水産試験場が行なった調査では，植物プランクトンを 7 taxa 認めており，なかでも *Mougeotia* sp. が80～90%を占めていたことが報告されている．本種はこの頃から，すでに本湖の優占プランクトンになっていたことがうかがえる．一方，丸山 (1961)[13]，一戸 (1961)[14]は本湖から藍藻類，緑藻類のかなり多くの種を記載しているが，その調査法，量的な面が記されていないため比較することができなかった．なお，吉村，宮地が1932年に調査を行なった報告では，黄緑色藻の *Botryococcus braunii* が優占種であったことが記されている．

つぎに，付着藻類については，プランクトン中に見られなかったものが多く，藍藻類1，珪藻類20の 21taxa がみとめられた．これらは次のようなものであった．

Cyanophyceae
- *Phormidium* sp.

Bacillariophyceae
- *Achnanthes minutissima* v. *cryptocephala*
- *Achnanthes exigua*
- *Achnanthes lanceolata*
- *Achnanthes pinnata* v. *lancettula*
- *Amphora ovalis* v. *pediculus*
- *Cocconeis placentula*
- *Cyclotella meneghiniana*
- *Cymbella leptoceros*
- *Epithemia sorex*
- *Epithemia zebra* v. *saxonica*
- *Mastogloia smithii* v. *lacustris*
- *Melosira* sp.
- *Navicula minima*
- *Nitzschia sinuata* v. *tabellaria*
- *Rhoicosphenia curvata*
- *Rhopalodia gibba*
- *Rhopalodia gibberula*
- *Synedra ulna*
- *Synedra rumpens* v. *meneghiniana*

藍藻は *Phormidium* sp. のみであり，その他の藍藻，緑藻類はプランクトン性のものが付着したものであった．珪藻類が多く，なかでも *Achnanthes minutissima* v. *cryptocephala*, *Epithemia sorex*, *Gomphonema constrictum* v. *capitatum*, *Mastogloia smithii* v. *lacustris*, *Rhopalodia gibba* などが優占種として出現していた．福島 (1961) は，沿岸藻の優占珪藻としてこれらの他に *Cymbella cistula*, *Fragilaria* sp., *Synedra ulna*, *Rhopalodia gibberula* など8種を記載している．著者らの付着板による短期間の調査では，優占するまでにはいたっていなかった．なお，深度別の出現頻度については，四季変化とともに別に詳細を報告する予定である．

動物プランクトンについては，Table 1 に周年消長を＋印（＋：少ない，＋＋＋＋＋：多い）で示した．渦鞭毛藻類の *Ceratium hirundinella* は9月に多く，ミドリムシ類の *Euglena oxyuris* は7～9月の停滞期に多く出現し，それも上層部にはほとんどみられないが，溶存酸素の少ない6，8m層に多く分布している傾向にあった．輪虫類は7種がみとめられ，*Brachionus angularis* v. *bidens* は2～5月の水温の低い時季に多く出現した．*Filinia longiseta* は3月にのみ多く，しかもそのほとんどが抱卵していたことから，この時季が増殖期と思わ

Table 1. Monthly Changes of Zooplankton in the Lake Tairo

	1973									1974		
	Apr.	May	Jun.	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.
Ceratium hirundinella		+		+	+	+++++	++					
Euglena oxyuris			+	++	+++	++	+					
Euglena sp.				+	++							
Arcella vulgaris										+	+	
Centoropyxis acureata					+						+	
Euglypha sp.										+		
Asplanchna priodonta				+++		+	+					
Brachionus angularis	+											
Brachionus angularis v. *bidens*	+	+++									++	+++
Filinia longiseta											+	+++
Keratella cochlearis v. *tecta*	+	++	++	+	+	++						
Keratella varga monstrosa	+		+	+		+	+++					
Trichocerca sp.					+							
Alona sp.		+		+	+			+	+	+		
Bosmina longirostris	+	+++					++	+++	+++++	+++	+++	++
Copepoda sp.	+	+	+		+			+				

れる．*Keratella* の2種は4月から10月までの間に少数ながら持続して出現していた．甲殻類では *Bosmina longirostris* が代表種であり，6～9月の間を除いて出現しており，とくに12月に多くみられた．これらの消長は1972年の場合と大差はなかったが，ただ，輪虫類の *Pompholyx complanata* が1973年2月に優占していたが，今回の調査ではみとめられなかった．高田(1961)[15]は，同様なネット採取で10種を記載しているが，一時期のそれも沿岸帯の調査であり，比較するのは困難であるが，多少群集に変遷がみられている．

4. 水中細菌の周年変化

細菌試験用サンプルは冷蔵して持帰っているが，培養するまでに3日を経過している．本湖の細菌分布に関しては著者らの他に報告例がない．Table 2 に周年垂直分布を示したが，一般細菌数(上段の数字)は10～10^3/ml，従属栄養細菌数（下段の数字）は10～10^4/ml であった．概して表層と底層で菌数が少なく，中層で多く検出されている傾向がみられた．4月から9月にかけた成層期には，深度によってかなり菌数にひらきがみられる反面，循環期は深度間の差が小さくなっている傾向がみられた．なお，大腸菌群数は5月の2m層で20/ml，4m層で12/ml が検出されたのがもっとも多く，その他は3/ml 以下と少なかった．

5. 栄養塩類

Table 3 に各分析結果の深度平均値および年間の平均値を表示した．10月から3月にわたる循環期は，深度による差はほとんどみられていない．しかし，停滞期では深層（8m）で過マンガン酸カリ消費量，総硬度，珪酸，PO_4^{--}，NH_3-N などが上層より1.5～2倍ほど高くなっており，この傾向は8月にことに著しかった．これは底層で嫌気状態に近かったため，骸泥からの溶出と，地下水の影響と思われる．1932年における表層水の分析値と比較すると，Cl^- では1.7倍に，SiO_2 1.2倍，NH_3-Nは1.5倍と多少増加しているが，過マンガン酸カリウム消費量はほとんど変化していない．PO_4^{--} は 0.009（吉村，1932），0.04（水野，1959）そして1973年には 0.06mg/*l* と徐々に増加の傾向を示している．

考　察

1973年4月から1974年3月にわたり，三宅島大路池の周年湖沼調査を実施した．1972年に四季変化についての調査を行なった折，代表的プランクトンであった *Synedra acus*, *Ankistrodesmus falcatus* v. *spirilliformis* および *Mougeotia* sp. は今回もやはり優占していた．しかし，周年観察を行なった結果，これらの増殖期，衰退期がわかり，またプランクトン群集の消長にも多少の違いがみられた．1972年に認められなかった珪藻類の *Cyclotella stelligera* と *Nitzschia acicularis* が10月，12月から急増したこと，*Synedra acus*, *Mougeotia* sp. が8,000/ml，25,000/mlとそれぞれ多く出現していたものが，今回の調査では最高でも約1/10に減少していたこと，また *A. falcatus* v. *spirilliformis* は1972年5月に2,500/ml であったが，1973年の同月には300/ml にとどまり，翌年3月に最高の 5,000/ml に増殖していたことなどである．本湖における植物プランクトンは，概して水温の高い春から夏期にかけて現存量が少なく，透明度も 3m前後と高い傾向を示していた．

大路池は，理化学的に一般の浅い富栄養湖の特性を示し，プランクトン相は特異な消長を呈している．典型的

Table 2. Monthly Fluctuations in the Number of Bacteria

Depth	1973 Apr.	May	Jun.	July	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	1974 Jan.	Feb.	Mar.
0 m	65	870	23	4	15	1600	100	30	28	27	27	600
	910	1100	1400	960	68	6600	340	160	140	950	240	480
2	580	7400	480	65	110	680	720	640	25	280	2100	55
	1600	17000	2100	1300	210	4100	1300	850	190	1200	1400	190
4	600	5200	170	38	210	1300	100	320	22	100	180	35
	3300	4500	800	1600	540	6100	600	600	140	1200	640	170
6	160	3300	160	300	1700	1300	640	170	26	150	130	32
	500	5000	640	4000	1000	2300	880	480	180	1000	600	180
8	38	140	110	76	450	520	1100	140	15	55	200	35
	1100	210	1100	560	280	2300	2000	220	70	720	1100	150

Upper and Under Numerals show Total Colonies and Heterotrophes, respectively.

Table 3. Chemical Characteristics of the Lake Tairo

		1973							1974			Mean
		May	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	value
Cl^-	(mg/l)	82.6	82.8	83.5	79.9	77.4	76.3	77.1	78.2	81.4	75.2	79.5
$KMnO_4$ cons.	(mg/l)	4.2	16.6	6.6	10.5	5.8	11.5	7.6	6.9	5.1	4.8	8.0
Total hard.	(mg/l)	241	244	241	236	237	234	243	246	240	231	240
SiO_2	(mg/l)	10.9	16.6	19.4	20.2	19.9	22.3	21.6	21.2	23.1	18.8	19.4
PO_4^{--}	(mg/l)	0.146	0.057	0.085	0.044	0.049	0.062	0.055	0.042	0.031	0.024	0.060
NH_3-N	(mg/l)	0	0.08	0.16	0.13	0.02	0.12	0.06	—	0.15	—	0.090
NO_2-N	(mg/l)	0.042	0.002	0	0.003	0.024	0	0.007	0.003	0.134	0.041	0.026
NO_3-N	(mg/l)	0.130	0	0.008	0	0.024	0	0.017	0.001	0.016	0.006	0.020
Alb-N	(mg/l)	—	0.16	0.16	0.11	0.13	0.21	0.20	—	0.19	—	0.17

な富栄養湖である諏訪湖では，家庭排水等の混入した河川水が多く流入するため，極端に富栄養化され，例年夏期から秋期にかけて藍藻の *Microcystis* が大増殖し，透明度が数センチと著しく低くなることが知られている[16]．大路池ではこの *Microcystis* は，1974年3月現在出現するまでに至らず，また，プランクトンや付着藻類中には貧栄養水域に出現するといわれるものもかなりみとめられている．流入河川のない本湖を涵養しているのは，おもに地下水であるといわれ，この量的，質的なもの，あるいは気温，風雨等の気象条件もあって，極度に富栄養化が進んでいないものと推察される．

本湖は島民の飲料水源に使用され，1971年に硬度が高いこととカビ臭発生問題がもち上がった折，この原因究明のために基礎調査を行なったものである．硬度に関しては水質基準以下で特に異常はなかったが，カビ臭発生原因については放線菌が有力視された．水中および底泥中から *Streptomyces* 属の放線菌が10種分離され，これらを培養したところ，水中から検出されたカビ臭物質である 2-methylisoborneol と geosmin を産生することが判明した[17]．

謝辞 この研究を行なうにあたっては，三宅島村役場水道温泉課，山本幸蔵前課長，沖山孝係長，寺沢良夫氏をはじめ同課の方々に大変お世話になった．さらに，東京都水道局 乙幡恵氏，川崎市水道局 橋本徳蔵氏，田中和明氏，岩野淳氏，長井孝夫氏，横浜市水道局 佐々木真一氏，神奈川県企業庁水道局 斉藤昭二氏，横浜市衛生研究所 唐沢栄氏の諸氏の助言，協力を得て行なわれたものである．珪藻類の同定は横浜市立大学 福島博博士，小林艶子博士に御指導を賜わった．ここに深謝の意を表します．

文 献

1) 横山勝三，新井 正：火山，2，21，57，1976
2) Yoshimura, S. and D. Miyaji : *Jap. Jour. Geol. Geog.*, 13, 339, 1936
3) 福島 博：横浜市大論叢，13，1，13，1961
4) 水野寿彦：陸水誌，22，2-3，63，1961
5) 東京都水産試験場：やしお速報，20，1966
6) 松本淳彦：東京衛研年報，25，453，1974
7) 新井 正，森 和紀，高山茂美：陸水誌，38，1，1，1977
8) Strickland, J. D. H. and T. R. Parsons : *A Practical Handbook of Sea Water Analysis*, Fish. Res. Board Can. 1968
9) 堀江正治：陸水誌，18，1，1，1956
10) 新井 正，高山茂美，関根 清，他：地理学評論，45，5，364，1972
11) 吉村信吉：陸水誌，8，1，44，1938
12) Hortobagyi, T. : *The Microflora in the Settling and Subsoil Water Enriching Basins of the Budapest Waterworks*, Akademiai Kiado, Budapest, 1973
13) 丸山 晃：横浜市大学生論集，8，173，1961
14) 一戸正憲：*ibid*, 8，198，1961
15) 高田継男：*ibid*, 8，207，1961
16) 桜井善雄，渡辺善人：信州の陸水，1，1974
17) 松本淳彦，土屋悦輝：水協誌，514，42，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 400—404, 1978

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第7報）
三宅島大路池の植物プランクトンおよびクロロフィル量からみた富栄養化の現状（1975年度）

山崎洋子*, 土屋悦輝*, 松本浩一*

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (VII)
Eutrofication of Lake Tairo on the Miyake Island Evaluated from Species Composition of Phytoplankton and Amount of Chlorophyll-a (1975)

YOKO YAMAZAKI*, YOSHITERU TSUCHIYA* and KOICHI MATSUMOTO*

緒　言

三宅島の大路池は，古くは吉村と宮地（1936)[1]，水野（1961)[2]によって，最近では新井（1977)[3]によって湖盆形態や湖水の理化学的性状の調査が行なわれている．大路池は約2200年前に形成された爆裂火口内にできた最大深度9.4m，周囲約2kmの小さな淡水湖である．湖に流入・流出する河川はなく，その水位は降水および地下水の湖水への流入（3,000～6,000m^3/day)[3]と湖水の地下への浸透・流出で保たれている．吉村らが調査した1932年には5.5mあった透明度が，現在では2.0～3.2mと約40年間に2～3m近く低下しており，湖の富栄養化の進行が著しいことを物語っている．富栄養化の進行には，湖の周囲をおおうシイを主体とする照葉樹林の落葉落枝や挺水・沈水植物群や地下水が湖水の栄養塩の補給に大きな役割を果していると考えられる．大路池は島の水道水源になっているが，湖水の硬度が高くまたカビ臭が発生することから，給水地区の住民の苦情が多く，飲用にはほとんど使用されていない．都衛研では，都衛生局と三宅村役場の依頼をうけて1972年に大路池の水質調査を行ない，1973年には都水道局水質センター・川崎市水道局と共に周年調査を実施した．大路池の植物プランクトンについては福島らの報告（1958)[4]があるが，1年を通してなされたものは上記の調査報告のみである[5,6]．1974年大路池の調査は一時中断されたが，1975年から，異臭発生物質の検出および水域の富栄養化の機構を解明するために再び調査を行なっている．ここには，1975年5月から1976年3月までの植物プランクトンの変化と若干の理化学分析の結果を報告する．

調査時期と方法

1975年5月31日，7月6日，8月26日，12月5日と1976年3月4日に調査を実施した．1972年に設けた湖心の定点で5lのバンドン採水器を用いて2mごとに採水し，溶存酸素（ウィンクラー法)，pH（比色法）を現場で測定した．水温は東邦電探製EST-3型を用いて1mごとに測定した．試水の処理と分析は以下のように行なった．

1. クロロフィルa量（chl. a）の定量　試水をグラスファイバーフィルター（Whatman GF/C）でろ過し，Strickland & Parsons[7]の方法によって行なった．なお，分析するまでフィルターを−20°で保存した．

2. セストン量・懸濁態炭素（POC)・懸濁態窒素（PON)・溶存態炭素（DOC）の定量　あらかじめ500°で焼いて秤量したグラスファイバーフィルター（Whatman GF/C）で試水をろ過し，懸濁態と溶存態に分け，分析するまで−20°で保存した．フィルターをデシケーターで乾燥後秤量した値からろ過前のフィルターの重さを引いたものをセストン量とした．POCとPONの定量は，CHNコーダー（柳本Co.）を用いて行なった．DOCの定量はMenzel & Vaccaro[8]の方法に従い赤外線ガス分析装置を用いて行なった．

3. 植物プランクトンの定量　試水500mlをホルマリン固定後，その一定量について検鏡により細胞数を数え，容積量（algal volume ここでは藻体量とした）を算出した．

結果および考察

大路池は緯度（34°03′）が低いので，夏期の水温は本

* 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, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Water Temperature, Dissolved Oxygen and pH in the Lake Tairo (W. T. °C, DO ppm)

	May 31, 1975			July 6			Aug. 26			Dec. 5			Mar. 4, 1976		
Weather	cloudy			cloudy			fine			rainy			fine		
Atmos. Temp. (°C)	23.0			30.0			25.6			21.0			15.5		
Transparency (m)	3.2			2.5			2.4			2.1			2.0		
Depth (m)	W.T.	DO	pH	W.T.	DO	pH	W.T.	DO	pH	W.T.	DO	pH	W.T.	DO	pH
0	23.2	9.1	8.1	26.0	8.4	8.7	27.1	8.0	8.5	14.0	10.7	7.9	13.5	10.7	8.0
2	23.2	9.2	8.6	25.7	8.5	8.8	27.0	8.0	8.3	13.8	10.0	7.8	12.3	10.8	8.0
4	22.8	9.7	8.6	25.3	5.3	8.9	26.8	7.8	8.0	13.8	9.4	7.8	11.4	10.6	8.0
6	18.4	10.1	8.6	22.2	4.7	8.0	26.0	4.3	7.5	13.7	9.4	7.8	10.2	10.2	7.8
8	15.1	3.0	7.4	16.7	0.7	7.2	24.8	0.6	7.1	13.8	9.3	7.7	9.6	6.8	7.5

Table 2. Dominant Species of Phytoplankton Expressed as Cell Number in the Lake Tairo (cells/m*l*)
The amounts of *Oscillatoria* sp. were expressed as total length of trichoms. (*μ*/m*l*)

Depth (m)	May 31, 1975	July 6	Aug. 26	Dec. 5	Mar. 4, 1976
0	*Oscillatoria* sp. 78000	*A. raciborskii* 9500	*Oscillatoria* sp. 500000	*C. tetrapedia* 74000	*Mougeotia* sp. 4700
	A. falcatus var. *spirilliformis* 2500	*Oscillatoria* sp. 8400	*A. raciborskii* 15000	*C. stelligera* 8700	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 3600
2	*Oscillatoria* sp. 130000	*Oscillatoria* sp. 30000	*Oscillatoria* sp. 330000	*C. tetrapedia* 170000	*Mougeotia* sp. 4700
	A. falcatus var. *spirilliformis* 4800	*A. raciborskii* 11000	*A. raciborskii* 7700	*C. stelligera* 6800	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 4500
4	*Oscillatoria* sp. 53000	*Oscillatoria* sp. 17000	*Oscillatoria* sp. 550000	*C. tetrapedia* 53000	*Mougeotia* sp. 7600
	A. falcatus var. *spirilliformis* 1600	*A. raciborskii* 12000	*A. raciborskii* 14000	*C. stelligera* 7400	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 4300
6	*Oscillatoria* sp. 59000	*Oscillatoria* sp. 9600	*Oscillatoria* sp. 15000	*C. tetrapedia* 62000	*Mougeotia* sp. 6800
	A. falcatus var. *spirilliformis* 4300	*A. raciborskii* 4300	*A. raciborskii* 6400	*C. stelligera* 7400	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 4100
8	*Oscillatoria* sp. 26000	*Oscillatoria* sp. 18000	*Oscillatoria* sp. 13000	*C. tetrapedia* 84000	*Mougeotia* sp. 4600
	A. falcatus var. *spirilliformis* 2500			*Oscillatoria* sp. 45000	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 2000

Blue-green Algae: *Anabaenopsis raciborskii*
Diatoms: *Cyclotella stelligera*
Green Algae: *Ankistrodesmus falcatus* var. *spirilliformis*, *Crucigenia tetrapedia*

Table 3. Dominant Species of Phytoplankton Expressed as Algal Volume in the Lake Tairo($10^5\mu^3$/m*l*)

Depth (m)	May 31, 1975	July 6	Aug. 26	Dec. 5	Mar. 4, 1976
0	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 8.31 *Mougeotia* sp. 6.62	*Mougeotia* sp. 4.19 *A. raciborskii* 3.50	*Mougeotia* sp. 12.70	*C. stelligera* 17.50 *C. tetrapedia* 10.00	*Mougeotia* sp. 32.70
2	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 16.10	*Mougeotia* sp. 12.70	*Mougeotia* sp. 14.30	*C. tetrapedia* 22.70 *C. stelligera* 13.60 *A. falcatus* var. *spirilliformis* 10.50	*Mougeotia* sp. 32.70
4	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 5.49 *Mougeotia* sp. 4.42	*Mougeotia* sp. 13.30	*Mougeotia* sp. 22.40	*C. stelligera* 14.60 *A. falcatus* var. *spirilliformis* 9.85	*Mougeotia* sp. 52.60
6	*A. falcatus* var. *spirilliformis* 14.50	*Mougeotia* sp. 19.20	*Mougeotia* sp. 6.32	*C. stelligera* 14.80 *C. tetrapedia* 8.37 *A. falcatus* var. *spirilliformis* 7.97	*Mougeotia* sp. 46.80
8	*Mougeotia* sp. 8.51	*Mougeotia* sp. 5.92	*Mougeotia* sp. 6.54	*C. stelligera* 21.80 *C. tetrapedia* 11.40	*Mougeotia* sp. 31.90

Table 4. Total Algal Volume and Amounts of Seston and Chlorophyll-*a* in the Lake Tairo (Seston mg/*l*, Chl. *a* μg/*l*, TAV $10^6\mu^3$/m*l*)

Date	May 31, 1975			July 6			Aug. 26			Dec. 5			Mar. 4, 1976		
Depth (m)	seston	chl. *a*	TAV	seston	chl. *a*	TAV	seston	chl. *a*	TAV	seston	chl. *a*	TAV	seston	chl. *a*	TAV
0	1.41	3.5	1.68	1.89	4.3	0.89	2.37	9.0	2.16	7.76	45.7	3.99	4.35	21.5	4.99
2	1.63	2.9	2.21	2.86	10.5	1.75	2.45	10.1	1.96	8.40	44.9	4.93	—	—	5.25
4	2.05	4.2	1.07	2.51	8.9	1.89	2.21	8.4	3.13	7.25	61.3	3.63	5.36	19.2	7.10
6	2.51	4.2	1.86	2.84	19.0	2.13	2.97	10.8	1.02	7.58	48.1	3.45	4.86	17.0	6.23
8	3.04	3.0	1.24	3.15	8.2	0.64	6.18	16.5	0.88	6.83	20.0	4.46	4.65	16.9	3.94

州の湖沼と同程度であるが，他の時期の水温は本州の湖沼と比べてかなり高い（Table 1）．7月，8月における溶存酸素は深度を増すに従って減少している．また pH は8m層で若干低い傾向が認められる．透明度は chl. *a* の少ない5月が最も高く（3.2m），chl. *a* の多い12月と3月がそれぞれ2.1m，2.0mと低下している．これは湖の大きさ（周囲約2km）と深度（7.7m）の類似している松原湖の透明度（1.8m～2.9m）とほぼ等しい[9]．

Table 2 には細胞数からみた優占種を示してある．*Oscillatoria* spp.（幅 0.8 μ）は細胞の長さが不明瞭なためトリコーム（細胞の連なった糸状なもの）の長さの総和をもって細胞数に代えた．いずれの調査時期においても，表層から8m層までの優占種はほとんど変わらない．5月から8月にかけては藍藻の *Anabaenopsis raciborskii* と *Oscillatoria* sp. が優勢となっており，12月から3月には *Crucigenia tetrapedia*, *Mougeotia* sp., *Ankistrodesmus falcatus* var. *spirilliformis* といった緑藻に優占種が移っている．けい藻は *Cyclotella stelligera* が12月に第2優占種となっただけで，他の時期には数は少ない．本調査と松本らの報告[6]の主な違いは，①今回の7月の2m層と4m層で *Microcystis aeruginosa* が認められた（これは注目に値する）②12月に優占種となった *Crucigenia tetrapedia* が1973年には少なかったことであろう．大路池の植物プランクトンの細胞数はトリコームの長さを測定した *Oscillatoria* sp. を除いた場合でも10^3～10^4 cells/m*l* で，この値は中

Table 5. Concentrations of Dissolved Organic Carbon, Particulate Organic Carbon and Particulate Organic Nitrogen in the Lake Tairo (mg/*l*)

Date	May 31, 1975			July 6			Aug. 26			Dec. 5			Mar. 4, 1976		
Depth (m)	DOC	POC	PON	DOC	POC	PON	DOC	POC	PON	DOC	POC	PON	DOC	POC	PON
0	3.3	0.37	0.04	4.5	0.89	0.11	10.7	0.98	0.14	3.1	2.76	0.42	3.4	1.44	0.19
2	2.6	0.70	0.06	3.5	1.20	0.13	10.6	1.01	0.14	2.7	2.86	0.44	5.6	1.84	0.25
4	3.2	—	0.18	7.2	1.11	0.13	5.6	0.98	0.13	5.0	2.38	0.36	5.0	1.79	0.26
6	3.7	—	0.09	9.4	1.12	0.14	5.7	1.27	0.26	3.4	2.39	0.37	4.4	1.55	0.23
8	5.6	—	0.18	9.7	1.69	0.31	12.5	2.85	0.52	4.6	2.23	0.34	6.3	1.46	0.20

栄養湖である湯の湖の春の増殖期の細胞数（8×10^3 number/m*l*）より常に多い[10]．

藻体量からみた優占種を Table 3 に示す．第1優占種は全藻体量の41～93%を占めている．5月から8月までトリコームの長さの総和の大きかった *Oscillatoria* sp. は藻体量に換算すると優占することはない．逆に細胞の大きい *Mougeotia* sp. が12月を除いて常に優勢であった．12月には2m層を除いて *Cyc. stelligera* が第1優占種となっているが，緑藻も *Cru. tetrapedia* と *A. falcatus* var. *spirilliformis* とで全藻体量の44～67%を占めている．藻体量からみると大路池は緑藻の割合の高い湖といえる．

chl. *a* とセストン量の変動には相関が認められる (Table 4)．これはセストン量の大部分が藻類で占められているためと考えられる．全藻体量は chl. *a* の多い12月と3月に高い．7月の6m層で chl. *a* の値が多いのは，細胞の大きい *Euglena oxyuris* (200cells/m*l*) の出現によると思われる．*E. oxyuris* は毎夏6～8m層に多く認められる．また，8月の8m層で chl. *a* の値が大きいのは，この層が無酸素状態に近いことから光合成細菌によるものと予想される．この時期8m層の水に薄桃色の着色が認められたことは，光合成細菌の存在を暗示するものと思われる．chl. *a* は12月初旬に全層で高い値を示した．松本らの行なった周年調査においても，chl. *a* の最高値は11月下旬のけい藻 *Cyc. stelligera* の出現時期に得られた．この時期の水温は13～14°で，通常温帯の湖沼でけい藻の増殖の認められる3月末から4月の水温に相当する．大路池の chl. *a* の値（2.9～61.3mg/m³）は，富栄養湖といわれる松原湖（4.8～11.3 mg/m³），中綱湖（3.0～6.2mg/m³）と比べて高く，皇居外苑濠群の冬期の chl. *a*（6.9～48.1mg/m³）に匹敵する．

Table 5 にDOC, POC, PON の値を示す．12月の2m層を除き DOC は POC より数倍大きい値をとる．8月には深度を増すにつれ DOC/POC が小さくなった．POC（0.37～2.86mg/*l*），PON（0.04～0.52mg/*l*）は富栄養湖の1つである三方湖の値とほぼ等しい．

西條らは「物質生産などの立場から考えてみると，温帯にあるからこそ深い湖は貧栄養であり，浅い湖は富栄養なのであって，熱帯なら大部分の湖が富栄養湖になっていると思われる」と述べている[12]．大路池は，流入・流出する河川をもたず，観光等による人為的な汚染もほとんど認められない自然状態の保たれた湖であるが，最大深度は9.4mと浅く，地理的にも南に位置しているので湖の水温は冬期でも 6～7° と本州の湖沼に比べてかなり高く，西條らの言によると富栄養化をまぬがれることのできない湖といえる．湖の周囲をおおう樹林の落葉落枝や挺水・沈水植物の枯死・分解等による湖水への栄養塩の補給も湖の富栄養化の促進に大きな役割を果しているといえよう．大路池は，植物プランクトンの細胞数や容積量，chl. *a*，POC，PON 等の結果からみて，相当進んだ富栄養型の湖といえるが，まだ水の華の発生をみるにいたっていない．しかし，7月の中層に *Microcystis aeruginosa* が認められたことは，湖の富栄養化の進展にとって注目に値する．

今後は，湖の生産と物質循環を定量的に把握することが，水域の富栄養化の機構を解明するために必至であると考える．

文　献

1) Yoshimura, S. and D. Miyaji : *Jap. Jour. Geol. Geogr.* 13, 1936
2) Mizuno, T. : *Jap. J. Limnol.* 22, 1961
3) 新井　正，森　和紀，高山茂美：*Jap. J. Limnol.* 38, 1, 1977
4) 福島　博：横浜市立大学論叢，13, 1, 7, 1961
5) 松本淳彦：東京衛研年報，25, 453, 1974
6) 松本淳彦：東京衛研年報，29-1, 392, 1978
7) Strickland, J. D. H. and T. R. Parsons : *A*

practical hand book of sea water analysis, Fish. Res. Board Can., 1968

8) Menzel, D. W. and R. F. Vaccaro : *Limnol. Oceanogr.*, **9**, 138, 1964

9) 桜井善雄，渡辺善人：信州の陸水，第1号，1974

10) 国立公園湖沼水質調査報告書，環境庁自然保護局，1972

11) Matsuyama, M. and Y. Saijo : *Jap. J. Limnol.*, **34**, 4, 1973

12) 西條八束，阪口　豊：科学，**48**, 6, 352, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **29**-1, 405—410, 1978

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第8報）
神田川水系善福寺川のユスリカの種類相とその消長

大野正彦*, 松本浩一*

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (VIII)
Composition and Seasonal Distribution of Chironomids in the River Zempukuji

MASAHIKO OHNO* and KOICHI MATSUMOTO*

緒　言

都市河川の水質の回復に伴い，ユスリカの大量発生（不快昆虫）が各地で問題となって久しい．この現象は，東京都においては神田川水系で顕著であり，各区役所で薬剤散布などを行なって防除を試みているのにもかかわらず，芳しい効果をあげていないのが現状である．

問題となるユスリカの中で，蚊柱をつくり店頭や家屋に侵入し，沿岸住民に多大の苦情を生じさせるのは主にセスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui* などのユスリカ亜科 Chironominae に属するものである．これらのユスリカの生息場所，その環境要因，他種との関係，および生活史，生態を知ることは防除対策の基礎資料として重要と思われる．また，ユスリカは水界の二次生産に重要な役割を演じるにもかかわらず，分類が困難なため，わが国においてはユスリカの研究がわずかで，その生態の知られている種は極めて少ない．

本報告は，都内中小河川の中で比較的水質の回復が進み[1]，底生動物群集が回復し多様になりつつある[2]善福寺川のユスリカ類の種の構成とその生息場所についての調査結果を述べるものである．また，各調査地点のユスリカ類の個体数の動態，台風がユスリカに及ぼす影響とその後の回復の様子についても言及した．

調査河川の概況

善福寺川は杉並区善福寺池に源を発し，主に住宅地域を流れ，中野区弥生町で神田川に合流する全長 10km 余りの都市河川である．平常時の水量は少なく，事実上は，上流の原寺分橋付近の湧水などが水源となっている．河床にオオカナダモ *Elodea densa*，ヤナギモ *Potamogeton oxyphyllus*，エビモ *P. crispus* などが多量に繁茂している地点が多い[3]．治水のため流路は護岸工事が施されている．また，一部では河床もコンクリート張りになっている．降雨時には下水道の遮水管から汚水を伴う多量の水が急激に流入し，またユスリカ対策の薬剤散布もしばしば行なわれている．このため，現在の善福寺川は水質が回復の途上にあるとはいえ，そこに生息する生物にとっては必ずしも好ましい環境とはいえない．

調査地点・時期

耕整橋，春日橋，大宮橋，和田広橋の4地点を調査地点として選び（Fig. 1），昭和51年4月から52年2月まで毎月1～2回，計16回の調査を行なった．次に調査地点の特徴をあげておく．

耕整橋：調査地点中最も上流部に位置する．水深は浅く，ほとんど流れておらず，多量のヘドロ状の腐泥（その内部は還元状態）が沈積し，ヤナギモが繁茂している．この100m 下流の原寺分橋には豊富な水量の湧水がある．

春日橋：水深は 50cm 以上もあり，水が停滞，泥が沈積し，オオカナダモが多量に繁茂し，夏期には川面を覆うようになる．

大宮橋：水深は 20cm 程度，流速は 0.3m/sec ぐらいである．オオカナダモ（被度が30～40%）が繁茂している．

和田広橋：神田川本流との合流点直前に位置する．護岸施設がコンクリート張りの二段河床でかなりの流速がある（1.3m/sec）．幅の狭い中央の水路に直径 50cm 深さ15cm 程度の円形の陥入部が 1m 間隔でつくられており，その中に多数の石礫があり，そこから採集した．

耕整橋でやや汚れが目立つ程度で，春日，大宮，和田広橋は BOD が 3ppm 前後で汚濁程度に差がなかった．

* 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

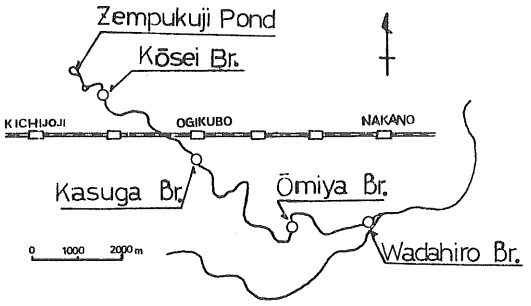


Fig. 1. Sampling Station

調査方法

河床状況により，石礫部（和田広橋），砂礫部（大宮橋），水草群落中の箇所（大宮橋，春日橋はオオカナダモ，耕整橋はヤナギモ）を選定し，サーバーネット〔内法 25cm×25cm の金属方形枠に60メッシュ（孔径250μ）のサラン網を付したもの〕により，各地点で1～2回，枠内の生物を採集し，水草の場合は枠内の水草をすべて切りとり底部の泥も採集した．試料は容器に収め，ホルマリンで固定し，試験室に持ち帰り，JIS 590μ のふるいを用いて水中でふるい，肉眼および双眼実体顕微鏡（×20—60）下で肉眼的底生動物を選び分け，ユスリカ幼虫の同定計数を行なった．水草は付着物をできるだけとりさり，80°で一昼夜乾燥し，重量を測定した．

また，大宮橋付近の川に面している民家にライトトラップ（富士平工業製 FHK スーパーライトトラップ）を設置し，2～3日おきに回収し，ユスリカ成虫を集めた．

結果および考察

1. 種類相　採集したユスリカ類の幼虫の同定には，Thienemann[4], Bryce & Hobart[5], Hirvenoja[6], Martin & Sublette[7], 橋本[8], 北川[9], Ito[10], Oliver[11], 成虫では Tokunaga(徳永)[12], Brundin[13], Hirvenoja[6], Beck & Beck[14], 橋本[8], Oliver[11]などの報告を参考にした．

その結果は Fig. 2 で示すように5亜科，すなわち，ヌマユスリカ亜科 Tanypodinae，ヤマユスリカ亜科 Diamesinae，コナユスリカ亜科 Corynoneurinae，エリユスリカ亜科 Orthocladiinae，ユスリカ亜科 Chironominae などに属する 17 taxa を同定することができた．これらの試料中には，Orthocladiinae と Chironominae の種数，個体数が多かった．出現した種は Mackey[15] の調査したテムズ川の Acorus（ショウブの一種）zone, Nuphar（コウホネ）zone のものとよく似ていた．

ユスリカの種類相は，どの地点でもほぼ同じであったが，上，中流部（耕整橋，春日橋）ではセスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui*（森谷[16] はヨシマツユスリカと呼ぶように提唱している）が，大宮橋ではツヤユスリカ類 *Cricotopus bicinctus*, *Eucricotopus sylvestris* group の個体数が多かった．Thienemann[17] は平地の河川において，泥が沈積し流れがあまりない場所では *Chironomus* が，水草群落中には *Cr. bicinctus* が多

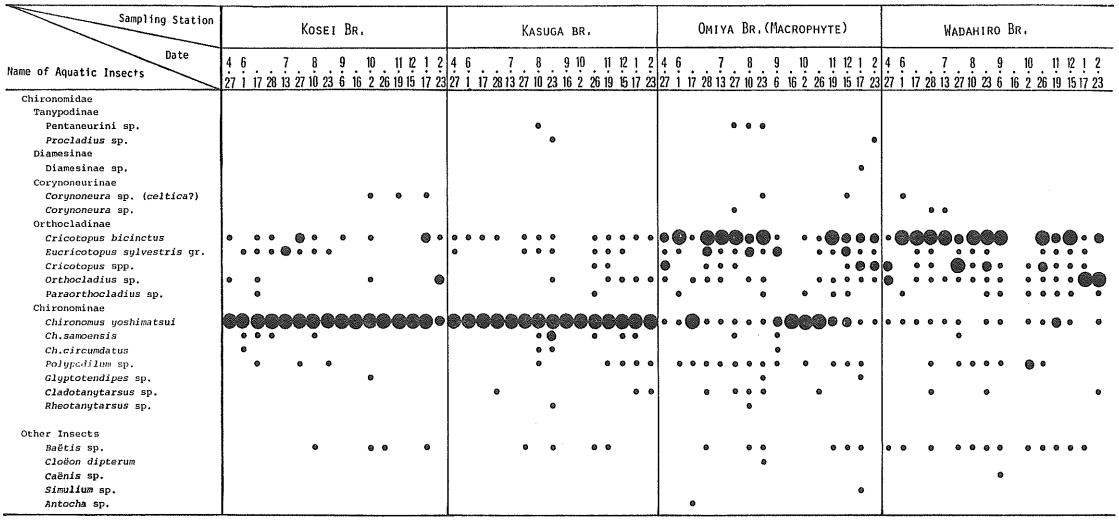


Fig. 2. Seasonal Distribution of Some Chironomids Larvae Population Rate in the River Zempukuji

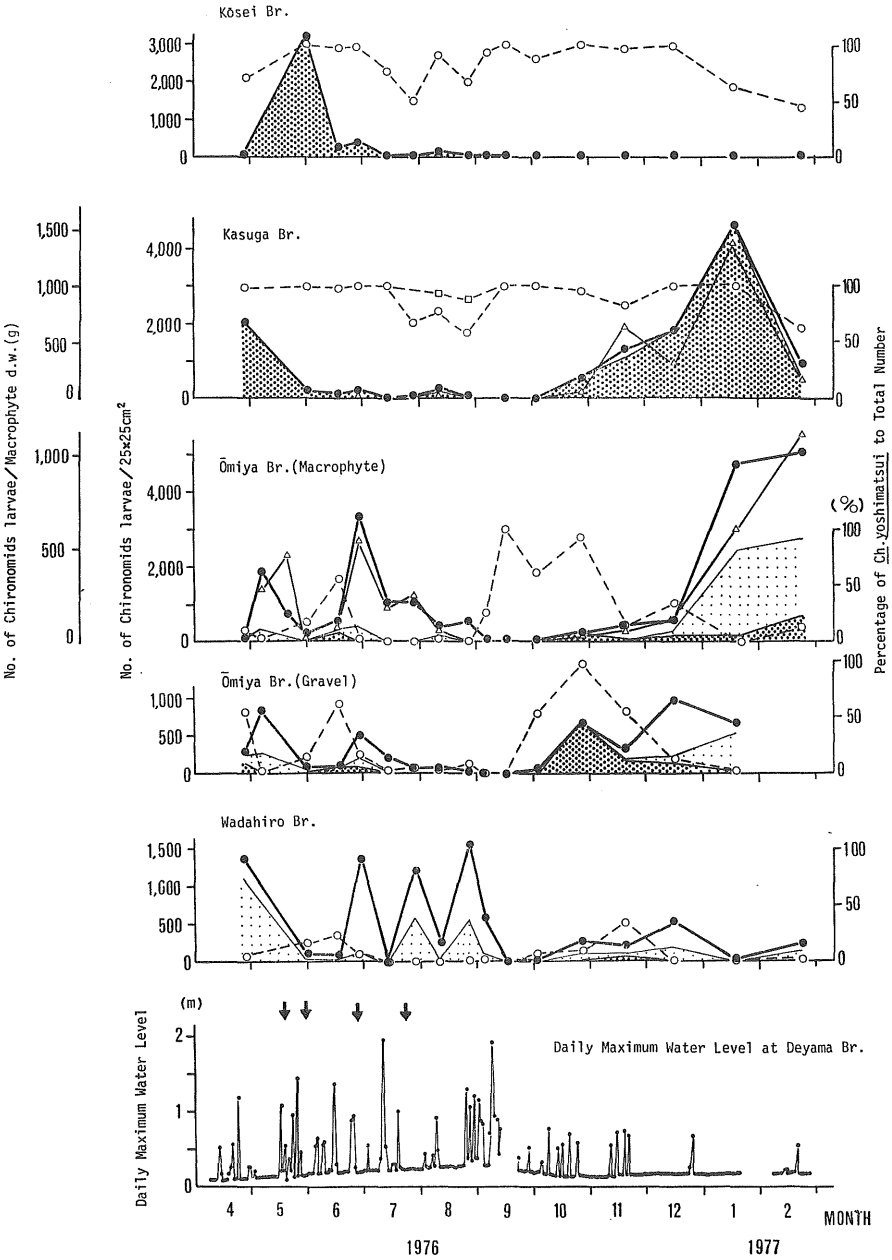


Fig.3. Fluctuations of Chironomids Larvae Population and Daily Maximum Water Level in the River Zempukuji during the period from April 1976 to February 1977.

Number of Chironomids Larvae / 25×25cm² (●)

Number of Chironomids Larvae / Macrophyte d.w.(g) (△)

Percentage of Ch.yoshimatsui to Total Number of Chironomids (○)

Percentage of Ch.yoshimatsui + Ch.samoensis (□)

く，止水や川の流れの緩やかな部分で水草や泥のある所では *E. sylvestris* が生息していると述べている．*Cr. bicinctus* は河川，小川，池，貯水池など様々な所に分布するが，本来は流水に生息するものであり，*E. sylvestris* は Bewuch form（水草などが茂った所に多い型）であると Reiss[18] は述べている．また，Mackey[15] は *Cr. bicinctus* group, *Cr.* (*Eucricotopus*) *sylvestris* group が Acorus zone, Nuphar zone の優占種であると報告している．*Cr. bicinctus* が大宮橋に多いのは比較的流れがあり，水草（オオカナダモ）が繁茂しているためであろう．春日橋に *Chironomus*（善福寺川においてはほとんどが *Ch. yoshimatsui* で，溜り水，池，貯水槽で多く見られるというヒシモンユスリカ *Ch. samoensis* も夏期に多く出現した）が多いのは河床に多量の泥が沈積していることや，水が停滞し，水草の繁茂により大宮橋に比べて夜間に溶存酸素の急激な減少がみられ（Table 1），水草を好み止水にも生息できる *Cr. bicinctus*, *E. sylvestris* にとって好ましい環境でないためと思われる．

和田広橋で *Cr. bicinctus*, *E. sylvestris* group 以外の種（*Cricotopus* spp., *Orthocladius* sp.）の総個体数に占める割合が大きく，Tanipodinae が採集できなかった．これは底質が石礫で流速がかなりあることによるものと思われる．耕整橋においては，*Ch. yoshimatsui* 以外の種を常に若干採集できた．これは近くに湧水があることによると考えられる．水温が低下するにつれ，どの地点でも *Cricotopus* spp., *Orthocladius* sp. の個体数が増加し，52年1月の大宮橋でヤマユスリカの一種 Diamesinae sp. を採集した．

2. 個体数の変動 5月から9月にかけての降雨により頻繁に起こる増水，およびユスリカ駆除のための薬剤散布はユスリカ類の個体数を大きく減少させた．春日橋では *Ch. yoshimatsui* が51年6月から10月にかけて小さな個体数で続き，森谷[19]の砂押川の調査のような明瞭な1カ月おきのピークは見られなかった．耕整橋では6月1日の調査で 25×25cm² 中に3,200個体を採集したが，6月17日の調査以降，少数のユスリカしか採集できなかった．また，和田広橋は河床構造のためか，個体数の変動は他の地点と比べて大きかった（Fig. 3）．この個体数の変化は同時に採集したコカゲロウの一種 *Baëtis* sp. のものと類似しており（Fig. 4），何らかのストレスが和田広橋の底生動物群集にくわわったものと思われる．

Table 1. Daily Changes of Dissolved Oxygen Concentration in the River Zempukuji

time and date	Kasuga Br.	Ōmiya Br.
9：00, 3, Oct. 1977	5.5mg/*l*	7.8mg/*l*
12：00	9.8	13.4
15：00	6.9	12.4
18：00	2.4	8.5
20：00	1.1	—
21：00	—	6.0
22：00	0.3	—
24：00	0.3	3.0
3：00, 4,	0.6	2.6

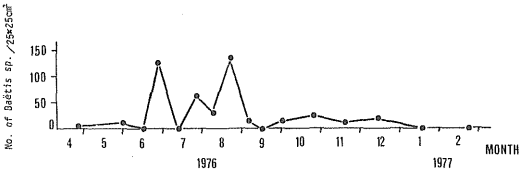


Fig. 4. Population Fluctuation of Baëtis sp. at Wadahiro Br. during the Period from April 1976 to February 1977

上，中流部で下流部に比べ夏期に小さな個体数（密度）になったのは薬剤散布が主に上流部に行なわれたことによると思われる．春日，大宮橋に比べ耕整橋で少数のユスリカしか採集できなかったのは，多量の腐泥が沈積していることやミズムシ *Asellus hilgendorfii* が多数生息していることなどによるのかもしれないが，このユスリカとミズムシとの関係については不明である．

以上述べてきたように，善福寺川に生息するユスリカ幼虫の個体数の動態はユスリカ各種の季節的消長と様々なファクター，例えば降雨時の急激な流量増加，下水のオーバーフロー，薬剤散布などが相互に絡み合い，複雑なものとなっていた．

3. 台風通過後の回復 昭和51年8月末から9月上旬にかけて降雨があり，9月9日に台風17号の影響で短時間にかなりの雨量があり，善福寺川は氾濫した．それ以

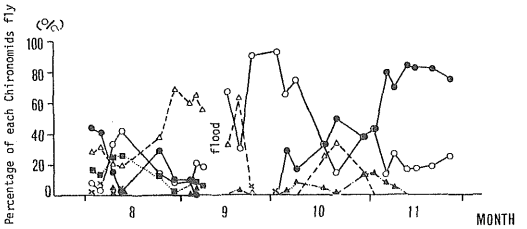


Fig. 5. Percentage Fluctuations of each Chironomids Fly to total Number at Omiya Br. from August to November 1976

Ch. yoshimatsui (○), Chironomini sp. (△), Cr. bicinctus (●), E. sylvestris gr. (■), Cr. trianus (▲), Pentaneurini sp. (×)

降はあまり大規模な流量の増加はなく，特に12月以降は水位が安定していた．

9月16日に耕整橋，春日橋，大宮橋水草群落部，砂礫部，和田広橋で調査採集を行なった．25×25cm² 中のユスリカの個体数はそれぞれ，9，1，17，0，0でほとんどが *Ch. yoshimatsui* であった．その後，春日橋，大宮橋では個体数の急激な増加をみた．しかし，その増加の様子は両地点で異なっていた．春日橋では *Ch. yoshimatsui* のみの増加であった．大宮橋では台風通過後から1カ月間は採集したユスリカ幼虫の総個体数に占める *Ch. yoshimatsui* の割合は高く，個体数の増加が認められた．しかし，11月に *Cr. bicinctus* などが現われ，*Ch. yoshimatsui* は総個体数の20～30%程度になり，1月には10%にも満たなくなる．同様のことが大宮橋近くの民家にとりつけたライトトラップで捕集したユスリカ成虫でもいえた (Fig. 5)．9月中旬～10月初旬では，ほとんどが *Ch. yoshimatsui* であり，10月初旬から *Cr. bicinctus* などが現われる．*Cr. bicinctus* が一世代を要するのにほぼ一カ月といわれている[20]ことを考えると，11月に多数見られた幼虫は10月に出現した成虫の産んだ世代，すなわち台風後から2世代目であると推定できる．

和田広橋では河床構造のためか，大宮橋のような *Ch. yoshimatsui* の急激な増加は認められなかった．

4. *Ch. yoshimatsui* の大量発生の防除について

現在神田川水系で問題になっているのはほとんどが *Ch. yoshimatsui* である．善福寺川大宮橋附近で小型の比較的飛翔力の弱いユスリカが蚊柱をたてているのをよく見かけたが，住民に苦情がでている様子はなかった．また *Ch. yoshimatsui* 以外のものは今まであまり問題にならなかったことからみて，神田川水系のユスリカ対策で対象となるのは主に *Ch. yoshimatsui* であると思われる．

「ユスリカの大量発生の基本的な対策の一つは水質の回復に基づくバランスのとれた生態系の確立である．つまり天敵である魚類をはじめ，ミジンコ類や肉食性のイシビル，ヒドラ，ウズムシなどの生息が可能な水質（β-中腐水性，BOD 5ppm～貧腐水性 BOD 2.5ppm 以下）にして生物相を豊富にしてゆくことが望まれる」とユスリカの発生要因報告書[21]に書かれている．しかし，今回の調査で春日橋においてシマイシビル *Erpobdella lineata* の個体数や現存量が大きいにもかかわらず，*Ch. yoshimatsui* の急激な増加が認められたこと，大宮橋でエリユスリカ類 Orthocladiinae が *Ch. yoshimatsui* の殖を抑えるように思われたことなどから，天敵よりも *Ch. yoshimatsui* 以外の比較的問題とならないユスリカ類の増殖を可能にすることが *Ch. yoshimatsui* の大量発生防除に役立つものと思われる．それには水質の良化はいうまでもなく，水を停滞させず，繁茂した水草の呼吸などから生じる夜間の溶存酸素濃度の減少をなくすることであろう．

Cr. bicinctus, *E. sylvestris* group の生息地に比べて汚濁の進んでいる所にも *Chironomus* は出現するとRoback は述べている[22]．また本調査から，*Ch. yoshimatsui* は他のユスリカ類に比べ増水などの物理的なストレスや低溶存酸素濃度に耐えられることがわかった．もし，*Ch. yoshimatsui* が *Cr. bicinctus*, *E. sylvestris* group などより薬剤に対して耐性があると考えられるのなら，台風通過直後の調査の時と同じように，薬剤散布後に残るものは，ほとんどが *Ch. yoshimatsui* で，その後，*Ch. yoshimatsui* の増加がおこると思われる．*Ch. yoshimatsui* がかなりの数で生息している時に再び散布を行なうと，11月の大宮橋でみたような *Ch. yoshimatsui* 以外の種の増加がおこらなくなる．薬剤散布を頻繁に行なうことは確かにユスリカの個体数を減少させはするが，ユスリカに薬剤抵抗性をつけさせ[23]，散布をやめると，台風通過後まもなく *Ch. yoshimatsui* の個体数の増加が観察されたように，すぐ元の状態に回復し，競争相手のいないことから，大量発生が起こりやすくなるため，セスジユスリカの防除対策として好ましいと思えない．

神田川水系では毎年3～4月頃より *Ch. yoshimatsui* の発生が認められ，6月中，下旬あたりから大量発生がおこることが報告されている[24]．大量発生を防ぐには春日橋で示されたように，1月に比べ幼虫の個体数が少なく，羽化がまだ始まっていない2月頃の幼虫を削除するのも一つの方法であろう．

摘　要

1. 都市河川の一つである神田川水系善福寺川のユスリカ類について，昭和51年4月から52年2月まで毎月調査を行なった．

2. 5亜科に属する 17 taxa のユスリカを同定できた．

3. 上，中流部の水の停滞している耕整橋，春日橋ではセスジユスリカ *Ch. yoshimatsui*，下流部の流れのある大宮橋，和田広橋ではエリユスリカ類 Orthoclodiinae，特に *Cr. bicinctus* が多かった．

4. ユスリカ各種の季節的消長と降雨による増水，薬剤散布などが絡み合って個体数の動態は複雑なものになっていた．

5. 台風による増水後残ったものは，ほとんどが *Ch. yoshimatsui* であった．春日橋では *Ch. yoshimatsui* の増加がおこったが，大宮橋ではしだいに *Cr. bicinctus* が多くなった．

6. *Ch. yoshimatsui* の大量発生防除について考察を行なった．

謝辞 調査にいろいろと便宜をはかって下さった杉並区環境保全課坂場猛巳氏，ライトトラップを取りつけていただき，多大な労を厭わず，ユスリカ成虫の採集に協力して下さった粟田安之氏，善福寺川の水質の昼夜観測に御協力いただいた日本大学水産学科藤野尚氏，貴重な文献を見せていただき，有益な助言を賜った国立予防衛生研究所井上義郷技官，以上の方々に謝意を表します．

文　献

1) 東京都下水道局：神田川水系のユスリカ調査報告書，1973
2) 建設省土木研究所：都市河川善福寺川水生生物調査報告書，1978
3) 渡辺真利代，松本浩一：東京衛研年報，28-1，285，1977
4) Thienemann, A. : *Arch. Hydrobiol.*, 39, 550, 1944
5) Bryce, D. and A. Hobert : *Ent. Gazette*, 23, 175, 1972
6) Hirvenoja, M. : *Ann. Zool. Fennici*, 10, 1, 1973
7) Martin, J. and J. E. Sublette : *Stud. Natur. Sci.*, 1, 1, 1972
8) 橋本　碩：遺伝4月号，78，1977
　：*ibid.*，10月号，76，1977
9) 北川礼澄：淡水生物，8，21，1962
　：*ibid.*, 10, 38, 1965
　：奈良陸水，1，54，1968
10) Ito, T. : 陸水雑，36，76，1975
11) Oliver, O. R. : *J. Fish. Res. Board. Can.*, 34, 98, 1977
12) Tokunaga, M. : *Tenthredo*, 1, 9, 1936
　徳永雅明：日本動物分類，昆虫綱，双翅群，揺蚊科Ⅰ，三省堂，1937
13) Brundin, L. : *Rep. Inst. Freshwat. Res. Drottningholm*, 37, 5, 1956
14) Beck, W. M. Jr. and Beck, E. C. : *Bull. Florida State Mus.* 10, 305 1966
15) Mackey, A. P. : *Arch. Hydrobiol.*, 78, 240, 1976
　：*ibid.*, 79, 62, 1977
16) 森谷清樹：ユスリカとその生活，日本環境衛生センター，1977
17) Thienemann, A. : *Chironomus*, Leben, Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung der Chironomiden, Die Binnengewässer Bd. 20, Stuttgart, 1954
18) Reiss, F. : *Arch. Hydrobiol.*, 64, 176, 1968
19) 森谷清樹：衛生動物，28，63，1977
20) Rosenberg, D. M., A. P. Wiens, and O. A. Saether : *J. Fish. Res. Board Can.*, 34, 247, 1977
21) 東京都下水道局：ユスリカの発生要因調査報告書，1975
22) Roback, S. S. : *Pollution Ecology of Freshwater invertebrates*, Academic Press, 1974
23) Muirhead-Thomson, R. C. : *Pesticides and Freshwater Fauna*, Academic Press, 1971
24) 三原　実，井上義郷：衛生動物，28，431，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.* **29**-1, 411—413, 1978

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第9報）
緑藻の一種 *Mougeotia* sp. による臭気物質 *p*-Cresol, Indole, 3-Methylindole の確認

土屋悦輝*, 松本淳彦*

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (IX)
Odorous Compounds from a Green-alga, *Mougeotia* sp., from the Lake Tairo, Miyake Island
Identification of *p*-Cresol, Indole and 3-Methylindole

YOSHITERU TSUCHIYA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

水中の微生物によって生ずる水道水の異臭味発生は水源の湖沼，河川などの富栄養化の進行に伴って増加している．特に放線菌，藍藻類が産生する臭気物質 2-methylisoborneol, geosmin によるかび臭は全国各地で発生し問題となっている．以前から藻類を培養することによってかび臭，メロン臭，魚臭，青ぐさ臭[1]などが発生することが知られているが，その原因物質はほとんど解明されていない．水界の微生物に由来する異臭発生の要因としては，放線菌，藻類などの代謝物質，藻類の腐敗分解物質などが考えられる．著者らは水道水源として利用されている三宅島大路池のかび臭物質の確認[2]，大路池より分離した放線菌のかび臭物質の産生量[3]，池水中のかび臭物質の超微量分析[4]などを行なってきた．本報告は大路池においてプランクトンネットで垂直引網して採集したプランクトンを放置した結果発生した臭気物質の確認を行なった．

実験の部

試薬 *o*-, *m*-, *p*-cresol 和光純薬．indole, 2-methylindole, 3-methylindole 東京化成．

装置および条件 Kuderna Danish（以下KDと略す）濃縮器 濃縮管部を常時40°に加温し，アスピレータで吸引し，減圧状態で使用した．ガスクロマトグラフ（以下GCと略す）装置 島津 5APF 型，GCの条件はカラム 10% SE-30chromosorb W AW HMDS 3 mmϕ×2m, カラム温度100°，検出器 FID，検出器温度250°，キャリヤーガス N_2 40ml/min で使用した．クレゾール異性体の分離にはカラム5% KG-01 chromosorb W AW HMDS 3 mmϕ×1.5m, カラム温度130°，その他は先のGC条件と同様にして使用した．methylindole の分離にはカラム10% Triton X100+10% KOH chromosorb W AW HMDS 3 mmϕ×1.5, カラム温度160°，その他は先のGC条件と同様にして使用した．ガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS），島津 LKB-9000型カラムなどはGCで使用したものと同様で，Inlet 温度170°，セパレータ温度250°，キャリヤーガス He 30ml/min で行なった．MSの条件はイオン源温度290°，イオン化電圧 70eV，イオン加速電圧 3.5KV で行なった．

プランクトンの分解物からの臭気物質の抽出 大路池より採集したプランクトンの優占種は緑藻 *Mougeotia* sp. であった．懸濁状のプランクトン約 250ml をポリ容器に入れ栓をし室温に放置した結果，2日後に異臭が発生した．この試料をフィルターでろ過し，ろ液をジクロルメタン 30ml で3回抽出を行ない，抽出液に無水硫酸マグネシウムを加え脱水し，KD 濃縮器で 1ml に濃縮し試料とした．これをGC, GC-MS に供した．

結果および考察

濃縮した試料は強い下水臭を示した．GCにより主なピークが三種得られた（Fig. 1）．これらのピークについて GC-MS を行ない，そのマススペクトルから構造を推定し，標準品と比較し，さらにGCの保持時間（以下 t_R と略す）を比較して確認を行なった．

Peak A の確認 Peak A のマススペクトルは M^+ m/e108, base peak m/e107 で，その他のフラグメントピークから cresol であることが推定された（Fig. 2-a）．標準品 *o*-, *m*-, *p*-cresol と試料のマススペクトルを比較した結果，*m*- および *p*-cresol のそれと一致し

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

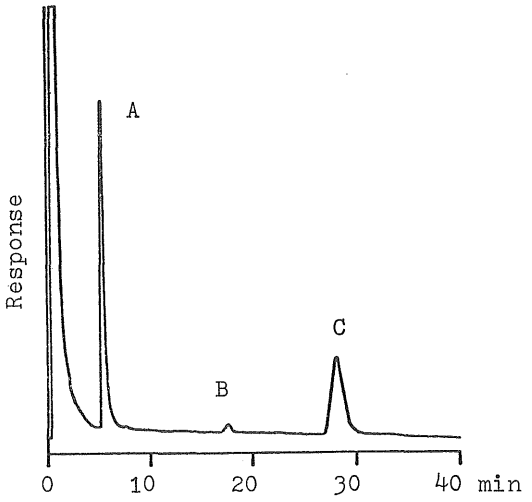


Fig. 1. Gas Chromatogram of Odorous Compounds from *Mougeotia* sp.

た．10% SE-30 のカラムでは両物質のは一致し分離ができないため，5% KG-01 のカラムを使用し異性体の分離を行なった．その結果 *o*- は t_R が13分で，*p*- は17分15秒であり，*m*- は18分30秒であった．Peak A の t_R は17分15秒で *p*-cresol と一致した．この物質の臭気はフェノール臭を呈し，塩素処理を行なうことによって，より強い不快臭を呈することが知られている．

Peak B の確認 Peak B のマススペクトルは M^+, base peak とも m/e117 であり，その他，M-27(-HCN) のm/e 90 などから indole と推定された (Fig. 2-b)．標準品との比較で，マススペクトルおよびGCの t_R が一致し，Peak B は indole と確認された．この物質は下水に似た臭気を呈する．

Peak C の確認 Peak C のマススペクトルは M^+ m/e131, base peak m/e130, その他 M-27(-HCN) の m/e103, m/e77 (-HC≡CH-HCN) などから methylindole と推定された(Fig. 2-c)，Powers[5] の報告などから，PeakC は 2- または 3-methylindole と推定された．使用したカラムでは，2-，3-体ともGCの t_R は一致し，分離ができないため，10% Triton X+10% KOH のカラムを用いて異性体の分離を行なった．その結果 2-の t_R は12分30秒であり，3-の t_R は12分であった．Peak C の t_R は12分で 3-methylindole のそれと一致した．この物質は skatol と呼ばれるもので，糞便臭を呈する．確認された物質の標準品を，GCのピークに近い比率で混合したものの臭気は，試料の臭気と良く類似した．このことから，本試料の臭気は *p*-cresol, indole, 3-methylindole が主な原因物質であることが確認された．また実際に落合下水処理場の下水 2*l* をジクロルメタンで抽出し，先の本試料と同様に処理し，GC, GC-MS を行なったところ，明らかに同じ t_R を示す3つのピークがガスクロマトグラム上に得られ，GC-MS によるマススペクトルからこれらは同一物質であることが確認された．プランクトン分解物から三物質が生成された機序は次のごとく推察される．*p*-cresol はプランクトンの組成アミノ酸 phenylalanine に起因し，これが phenylpyrvic acid となり，*p*-cresol になることが報告されている[6]．Indole, 3-methylindole は同じくアミ

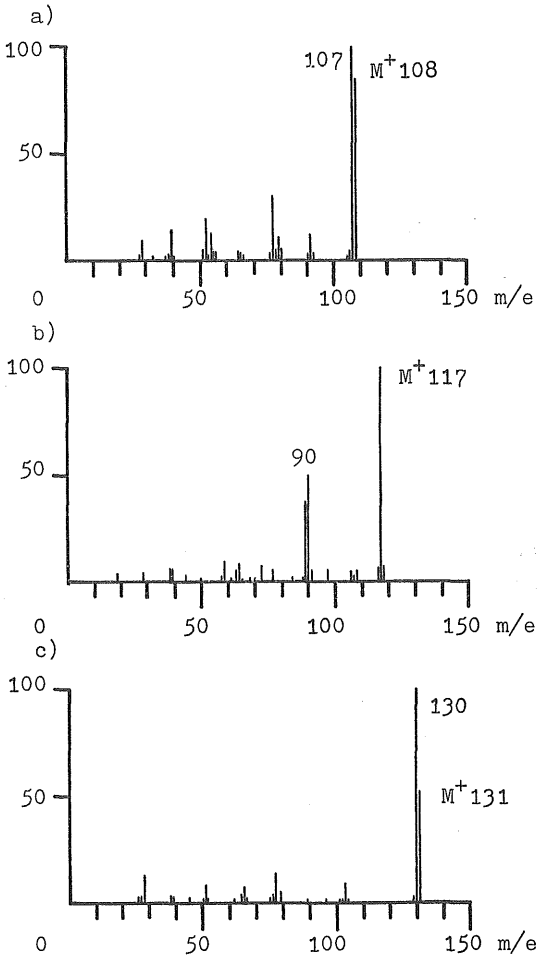


Fig. 2. Mass Spectra of Odorous Compounds from *Mougeotia* sp.

a) Mass Spectrum of Peak A
b) Mass Spectrum of Peak B
c) Mass Spectrum of Peak C

ノ酸 Triptophane がバクテリアの介在によって，それぞれindole, 3-methylindole に変化することが知られている．このことから密封された容器中の *Mougeotia* sp. は放置されることによって嫌気状態になり，バクテリアの介在などによって同様な分解をおこしたものと考えられる．従来，藻類などの腐敗分解によって異臭を発することが知られていたが，その原因物質の確認はなされていなかった．今回実験室中でのプランクトンの腐敗分解によって確認された物質は，自然水界のプランクトンの腐敗分解によっても起こる可能性を示唆しており，実際に湖沼などにおいて“水の華”による大量のプランクトンの腐敗分解によって異臭を発生する例もあり，先の三物質が臭気原因物質と考えられる．今後湖沼などでの異臭の発生した時点で，臭気物質の確認，水への影響について継続して調査を行なう予定である．

謝辞 本報告に当り御指導いただいた東京大学薬学部教授岡本敏彦博士，同助教授首藤紘一博士に，また三宅島大路池調査に際し御協力いただいた三宅村長大沼良三氏，水道温泉課長田中勘一氏他水道課各位に深謝いたします．

（本研究の概要は日本薬学会第97年会1977年4月に発表した．）

文　献

1) 日本水道協会：水道協会雑誌，**414**，119，1969
2) 土屋悦輝：東京衛研年報，**25**，445，1974
3) 松本淳彦，土屋悦輝：水道協会雑誌，**514**，42，1977
土屋悦輝，松本淳彦，岡本敏彦：薬誌，**98**，545，1978
4) 土屋悦輝，岡本敏彦：薬誌，**98**，124，1978
5) Powers, J. C. : *J. Org. Chem.*, **33**, 2044, 1968
6) 片山輝久：*New Food Industry*, **11**, 41, 1969

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1977. 7—1978. 6)

感染症等に関する調査研究

Surveillance on Food-borne Infections and Bacterial Food Poisonings in Tokyo

Senzo Sakai : *Proceedings of the Fifth SEAMIC Seminar on Gastrointestinal Infections in Southeast Asia*, 70, 1978

The number of the reported cases of bacillary dysentery in Tokyo was 5,000-15,000 a year until 1966, but it has decreased rapidly thereafter with only 150 in 1975. The most common serotype of *Shigella* isolated from patients during the past decade was *S. sonnei*, followed by *S. flexneri* 2a, 3a, 2b and 1b, and there were only a few cases of *S. dysenteriae* and *S. boydii*, which were proved to be imported cases.

As to typhoid fever, the number of the reported cases was between 150-350 a year until 1966, but it started to decrease sharply from 1970 with only 44 patients in 1975.

The statistics on food poisoning during the past decade indicate that the annual occurrence of the outbreaks was 159 involving 3,333 cases, in average.

The most prevailing causative organism of bacterial food poisonings was *Vibrio parahaemolyticus*, followed by *Staphylococcus*, *Salmonella*, Pathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*, listed in order.

The most common causal foods in *V. parahaemolyticus* food poisoning were marine fishes and shellfishes and their products. The food poisoning due to these organisms was always concentrated in July, August and September, and none have occurred during the winter. Over 80% of the strains of *V. parahaemolyticus* isolated from the patients gave positive reaction in the Kanagawa phenomenon test.

Staphylococcal food poisoning occurred regardless of season, and in most cases, due to prepared delivery food and to nigiri-meshies (rice balls) or sushies.

Salmonella food poisoning also developed regardless of season, as in the case of Staphylococcal food poisoning, and its vehicles were mostly meats and their products. The prevalent serotypes of *Salmonella* isolated from food poisoning cases were *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. thompson* and *S. infantis*. *Salmonella* isolates obtained from food poisoning patients, sporadic cases and healthy carriers in Tokyo have become extremely diversified in their serotypes recently.

Increasing Importance of Antibiotic-Resistant Bacteria in Food Hygiene

Makoto Ohashi : *Proceedings of the Fifth SEA MIC Seminar on Gastrointestinal Infections in Southeast Asia*, 85, 1978

近年，抗生物質耐性菌の問題は臨床医学領域だけでなく公衆衛生など種々の分野で大きな関心事となってきている．ここでは，サルモネラや赤痢菌の耐性菌の出現状況や耐性菌による伝染病の疫学について言及するとともに，さらに耐性菌の問題は，単に臨床医学だけでなく環境衛生や食品衛生などの面から総合的にとらえていく必要性のあることを強調した．

Drug Sensitivities of *Salmonella typhi* and *Ss. paratyphi A* and *B* Isolated in Western Pacific Area

Takeshi Terayama : *Proceedings of the Fifth SE AMIC Seminar on Gastrointestinal Infections in Southeast Asia*, 121, 1978

1972年にメキシコではじめてＣＰを含む多剤耐性チフス菌が分離されて以来，世界の各地で多剤耐性チフス菌が分離されるようになった．東南アジアおよび日本で分離されたチフス菌の各種抗生剤耐性試験および耐性菌の伝達性 R plasmid について検討した結果について報告した．東南アジア，特にタイ国で分離されたチフス菌の中に，多剤耐性株が多数認められ，しかも多剤耐性菌のほとんどが伝達性 R plasmid 保有株であった．

ブドウ球菌性疾患と毒素および原因菌の菌型

寺山　武，潮田　弘：臨床と細菌，4，93，1977

黄色ブドウ球菌は病原性や毒力にかかわる多種多様な毒素や酵素を産生するが，これらのうち毒素が直接疾患と関係するものはブ菌食中毒の原因毒素であるエンテロトキシンとブドウ球菌性 TEN の原因となる Exfoliative toxin の二つが現在その実態の解明されたものということになろう．本報では感染症における黄色ブ菌の問題を主眼に，原因菌の菌型と疾患との関係，とくに近年注目されてきた S-TEN の表皮剝離という特異な症状を惹起する毒素である Exfoliative toxin の毒素学的

な問題についてはふれなかった．

Correlation between Epithelial Cell Infectivity *In Vitro* and O-Antigen Groups of *Yersinia enterocolitica*

T. Une, H. Zen-Yoji, T. Maruyama and Y. Yanagawa : *Microbiol. Immunol.*, 21(12), 727, 1977

Yersinia enterocolitica has been isolated from patients mainly with intestinal disorders throughout the world, including Japan, and the organisms are assumed to be one of the enteropathogenic bacteria for human beings. In our experiments to clarify this pathogenicity, it was observed that the pathogenic strains of the clinical isolates vigorously penetrated epithelial cells *in vivo* and *in vitro*, and severe enteritis analogous to that in man could be produced in rabbits by intraduodenal inoculation. Based on these results which suggested that the penetration of the bacilli through epithelial linings of the intestinal mucosa was an essential factor for establishment of infection, *Y. enterocolitica* was considered to be an invasion type enteric pathogen such as *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*.

Although *Y. enterocolitica* is at present divided into various O-antigen groups, the question remains as to whether all these strains have pathogenicity for human beings. Thus, we attempted an *in vitro* investigation to clarify the pathogenicity of belonging to *Y. enterocolitica* by penetration into HeLa cells with special reference to their O-groups.

***Yersinia enterocolitica* の病原性**

丸山　務：モダンメディア，24(6)，315，1978

Yersinia enterocolitica は広く自然界に分布しているが，ヒトおよび動物に病原性を発揮し得るものは限られた血清型であるとされている．また，本菌によるヒトの感染症はその感染像が多彩であり，それぞれの病型は特定の血清型と密接な関連のあることを指摘することができる．しかしながら，こうした臨床的，疫学的研究に比較して本菌の病原因子，病像の本態あるいは発症機序といった問題についてはごく最近までに得られた確実な成果は極めて少ないのが実状である．

私どもは，これら本菌の病原性をめぐる諸問題を解決するためにはまず実験的感染の方法論を確立することが先決であると考え，これまでにサル，イヌ，ウサギ，マウスさらには培養細胞を用いて検討を進めてきた．ここでは私どもが各種材料より分離した新鮮株のマウスへの静脈内接種による実験的感染の成績を中心に本菌の病原性について述べ，血清型と病原性との関連，さらに下痢症由来株と敗血症由来株との感染像の特徴についても考察を加えてみた．

サルモネラの生態に関する研究　淡水魚における本菌保菌について

伊藤　武，坂井千三，福山正文，上村知雄：麻獣大研報，2(1)，197，1977

著者らは前報において，愛がん用カメがサルモネラを高率に保菌し，しかも長期間にわたって本菌を排菌することを明らかにした．その際，カメなどと同様な環境に生息している淡水魚もサルモネラを保菌していることが示唆された．

そこで，今回は本菌の生態学的研究の一環として，河川に生息している淡水魚についてサルモネラの検索を行なった結果，淡水魚の腸管内容物から高率にサルモネラが検出されたので，それらの成績について報告した．また，自然環境におけるサルモネラの生態サイクルと淡水魚との関連についても言及した．

Chemical Modification of Staphylococcal Enterotoxin B with Tetranitromethane

Hideo Igarashi and Merlin S. Bergdoll : *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 31 (2), 1978

ブドウ球菌エンテロトキシンB（SEB と略）は分子量が28,366で239のアミノ酸残基からなっており，そのうち，Tyrosine が21残基含まれている．この21残基のうち何残基が“free tyrosine”か，さらにどの配列順位の Tyrosine が“free”であるかを明らかにするため，テトラニトロメタンを用いる緩和な条件でのニトロ化を行ない，何残基の Tyrosine がニトロ化されるかを調べた．SEB の Tyrosine 残基の15モル倍過剰のテトラニトロメタン濃度と SEB を10C，18時間反応を行なった．その反応液から Sephadex G-100 によるゲル沪過で monomer NO_2-SEB を分離した．この monomer NO_2-SEB はアミノ酸分析の結果，21の Tyrosine 残基のうち6残基がニトロ化されていたが，抗血清との反応性はニトロ化しない SEB と同じであった．さらに実験を続けたが，monomer NO_2-SEB は重合しやすく，ニトロ化された Tyrosine 残基の配列順番を明らかにすることはできなかった．

サルモネラ症の治療の適正化に関する研究

斉藤　誠，今川八束，御簾納孝次郎，平石　浩，鵜飼新一郎，松原義雄，菱沼義興，高橋良二，田中　英，山口　剛，清水長世，坂井千三，伊藤　武：臨床研究紀要，51年度，373，1977

前報において，サルモネラ患者および保菌者を対象としてホスホマイシン，フラトリジンによる化学療法を試みると同時に，散発下痢症由来のサルモネラの分布，分離サルモネラの抗生物質耐性，特異な経過を示したサルモネラ症の蒐集に努めた．その結果，ホスホマイシンの対症状効果は期待したほどでなく，フラトリジンはさらに検討を要することが明らかになった．また臨床については，菌型によって症状が著しく異なること，サルモネラ健康保菌者の感染源的な意義は別として，その除菌が意外に困難であることも実証された．

今回については，前回と同様にサルモネラ症の臨床疫学的実態を把握することが，化学療法の適正化に密接な関係にあることを承知し，その面の資料の蒐集に努めるとともに，フラトリジンの投与法を改良し検討した．

Amoxicillin による梅毒の治療とその効果

小野田洋一，津上久弥，善養寺　浩，大久保暢夫，深井孝治：*The Japanese Journal of Antibiotics*, 30 (9), 744, 1977

Amoxicillin を用いて冬期梅毒患者を治療し，抗体価の消長からその効果を検討した．

初期および早期梅毒症例に対しては100%，晩期梅毒症例に対しては66.7%，成人先天梅毒には60.0%の有効性を持つことを明らかにした．

副作用として，GO，GPT の一過性の上昇が認められたほか，86例中3例に発疹が認められた．

Amoxicillin の実験的抗トレポネーマ作用について

大久保暢夫，柴田　実，柏木義勝，善養寺　浩：*The Japanese Journal of Antibiotics*, 30(9), 756, 1977

Amoxicillin (AMPC) の抗トレポネーマ作用を *in vitro* および *in vivo* の両面から検討し，次の結論を得た．

1) T.p. Nichols 株に対する AMPC の MIC は0.5 μg/ml，対照薬剤に用いた Dicloxacillin(MDIPC) のそれは 0.1μg/ml であった．
2) 背皮内感染群では，皮疹の消褪に治療終了後20日を要した．
3) 睾丸内感染群では，AMPC と対照薬剤との間に特に差は認められず，ほぼ同様の修復機転を示すことが病理組織学的に確認された．

Amoxicillin による猩紅熱の治療

飯村　達，清水長世，柳下徳雄，大久保暢夫，柏木義勝，柴田　実，永瀬金一郎：小児科臨床，31, 2, 145, 1978

小児科猩紅熱患者123例に Amoxicillin を，対照として150例に Aminobenzyl Pc を投与し，その効果を比較した．

その結果，下熱，皮疹消褪日数，再排菌例，副作用等両薬剤の猩紅熱に対する治療効果は，ほとんど同等であることが明らかにされた．

Improved Reversed Passive Hemagglutination for Simple and Rapid Detection of Staphylococcal Enterotoxins A-E in Food

Sumio Yamada, Hideo Igarashi and Takeshi Terayama : *Microbiol. Immunol.*, 21 (12), 675, 1977

Detection and identification of staphylococcal enterotoxin in food or culture filtrates were performed using the reversed passive hemagglutination (RPHA) technique, with formalized sheep red blood cells (FSRBC) sensitized with immunoglobulins of anti-A, B, C, D, and E rabbit hyperimmune sera fractionated by affinity chromatography. The FSRBC sensitized with anti-A～E immunoglobulins showed a high level of reactivity and specificity in RPHA, against homologous types of purified enterotoxins and culture filtrates of toxin-producing strains. No non-specific reactions with various ingredients in foods nor cross-reactions among enterotoxin types were observed. The minimum amount of enterotoxins in foods detected by RPHA was calculated to be 0.01 μg/g without concentration, and the recovery rate of experimentally added toxins was calculated to be about 80%.

Under routine laboratory practice, detection and identification of enterotoxins from incriminated foods of five food poisoning outbreaks were performed by RPHA within 3 hr after reception of the specimens. Among them, three were determined to be enterotoxin A food poisoing, one to be toxin C and the rest to be intoxication of A and D. The concentration of the toxins was between 0.014 and 3.65 μg per gram of food.

ブドウ球菌エンテロトキシンに関する研究（第Ⅱ報）精製毒素の物理化学的性状，ならびに食中毒および自然界由来黄色ブドウ球菌の本毒素産生能とその型別

山田澄夫：麻布獣医科大学研究報告，2(1)，31，1977

ブドウ球菌食中毒の予防対策の基礎資料を得るために精製エンテロトキシンA～E，特に本菌食中毒で主役を演じているA型毒素の物理化学的性状を詳細に記述するとともに，毒素を含んだ食品は加熱調理後も食中毒の原因となり得ることから，この食中毒で極めて重要な問題である毒素活性と熱処理の関係を血清学的反応性を指標として検討した．その結果，エンテロトキシンの2つの特性—heterogeneity と加熱に対する特異な熱安定性—を明らかにした．また，汚染源としての自然界に分布する黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生能およびその型別を詳細に検討し，食中毒由来黄色ブドウ球菌のそれと対比することによって，毒素産生黄色ブドウ球菌の分布と本菌食中毒発生との関連性の解析を試みた成績を記載した．

ブドウ球菌エンテロトキシンに関する研究（第Ⅰ報）エンテロトキシン A，B，C_2，D，E の精製および精製毒素の免疫学的特異性

山田澄夫：麻布獣医科大学研究報告，2 (1)，17，1977

ブドウ球菌食中毒の研究に不可欠である精製エンテロトキシンと型特異抗血清を得るために，*Staphylococcus aureus* 13 N-2909 (EntA)，C-243 (Ent B)，493 (Ent C_2)，1151 (Ent D)，FRI 326 (Ent E) を用いて，4％NZ-amine 培養上清を出発材料として毒素の精製を試みた．その結果，エンテロトキシンは Amberlite CG-50，CM-セルロース，DEAE-セルロースクロマトグラフィーと Sephadex のゲル ろ過の組み合わせにより免疫学的および物理化学的に単一な精製標品が得られることを明らかにし，各型の精製法と精製標品の免疫学的特異性を記するとともに，エンテロトキシンを精製する必要性を強調した．

細菌性食中毒の検査　特にふん便培養

坂井千三，伊藤　武：メディヤサークル，23(5)，89，1978

細菌性食中毒の起因菌としては腸炎ビブリオ，サルモネラ，ブドウ球菌，ウエルシュ菌，病原大腸菌，ボツリヌス菌などが知られていたが，近年 *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* などの菌についても食中毒起病性が明らかにされてきた．さらに食中毒起因細菌に関する毒素学的研究の進展により，ウエルシュ菌が産生するエンテロトキシンが明らかにされ，また，病原大腸菌についても，本菌の産生する腸管毒と腸炎起病性との関連についても注目されてきた．

そこで，著者らの経験をまじえて食中毒の細菌学的検査法の概略について解説した．

***Yersinia enterocolitica* の検査法**

丸山　務：メディヤサークル，23(6)，121，1978

Yersinia enterocolitica によるヒトの感染症が注目されはじめてからの歴史はわずか 15，6 年でしかないが，ここ数年の間に集団発生も含めて数多くの症例報告が相次いでなされ，今や本症は世界的規模の広がりを見せている．中でもその発生頻度の高さから，本菌は幼小児における下痢・腸炎の重要な起因菌としての認識が定着しつつある．

Y. enterocolitica 感染症は下痢・腸炎ばかりでなく，敗血症や関節炎等とも深い関連のあることが明らかにされているのでこれら疾患の臨床検査およびそれにともなう疫学調査の中で本菌の検索は今後益々重視されるであろう．

Y. enterocolitica の検査法についてはすでに私たちが報告してきたように，他の腸管系病原菌のそれと二，三の注意点を除いて基本的には何ら異なるところがない．ここでは特にふん便からの本菌の検査法を中心に，検査の要点，コツなどについて最近の知見も加えて私たちの経験から述べてみた．

集団下痢症，食中毒におけるふん便検査の進め方

丸山　務：モダンメディア，23(8)，355，1977

下痢，腹痛，嘔吐などを主徴とする急性胃腸炎患者が集団で発生したとき，その原因追求のための検査材料には主として患者ふん便が用いられる．下痢症候にはさまざまな原因が考えられるが，これまでの統計が示すように，微生物による腸管感染が最も濃厚に疑われるからである．従って，ふん便検査は病原微生物を検出することに主眼を置いていると解釈してよいであろう．

ふん便からの病原微生物の検索は食中毒を含めた集団下痢症例であっても個々の検査手順そのものは，散発例のそれと何ら異なるところがない．ただ当然のことながら，集団例における検査で重要なことは，検査行程のなかで常に集団としてとらえる意識が働かねばならない点である．これは検査室内だけのことではなく，疫学調査から材料の採取までの段階と検査結果の判定の時に特に考慮しなければならない問題である．

ここでは食中毒の細菌検査を実際に担当している経験

をふまえて，集団発生時のふん便検査，特に細菌検査を中心に述べてみたい．ふん便を検査材料とした菌の分離，同定手順にはいくつもの優れた著述があるのでそれらにゆずり，ここでは検査の前後，すなわち，疫学調査，検体採取，多数の材料の取り扱いおよび検査結果の判定とその意味づけにやや力点を置いて解説を試みたつもりである．

コレラ菌の検査法

坂井千三，太田建爾：*Medical Technology*, 5(11), 871, 1977

近年，海外旅行者の増加に伴い，諸種の感染症とくにコレラ侵入の危険性が大きくなっている．事実，1977年和歌山県で海外旅行者が感染源と考えられるコレラの集団発生が，また，東京都においても2名の保菌者が発見された．最近におけるコレラ患者の臨床診断は極めて困難であり，また，保菌者の早期発見はもっぱら細菌学的検査によらなければならない．

本報では，これまでの著者らの経験を基礎にしてコレラ菌の正確かつ迅速な検査法について詳述した．

小笠原しょ島民の血清成分値に関する考察

武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，道口正雄，大久保暢夫：東京都衛生局学会誌，60，34，1977

小笠原しょ島診療所（父島および母島）を訪れた20歳～60歳代の人びとの臨床検査依頼血清を用いて，各種の理化学的分析検査を行ない，それらの検査成績を検討したところ，特定の検査種目に正常値を逸脱している共通的な傾向がうかがわれたので報告する．

1）総タンパク質濃度は，すべての被検者が正常値の範囲内に分布していた．

2）総コレステロール濃度は，男女ともにF分布における95%信頼範囲内に分布しており，それらの検査成績から推測統計的に平均値を求めたところ，男性は，194.0±35.1mg/dl（n=21），女性では185.6±34.7mg/dl（n=14）の数値が得られた．

3）総ビリルビン濃度は，5/33例（15.15%，男性4例および女性1例）が異常高値を示し，そのうちの男性の1例がトランスアミナーゼ活性値も異常高値であった．

4）総血清鉄値が異常高値を示した者は，男性だけに3例が発見された．これらの3被検者のうち，総血清鉄値がきわめて異常高値であった2人は総ビリルビン濃度も異常であり，さらにそのうちの1人はトランスアミナーゼ活性値も異常に高値であった．他方，総血清鉄値は，男女ともに異常低値を示す傾向が確認され，正常値の下限よりも低い異常値の出現率は，全体的にみて66.7%にも達するきわめて異常な状態として観察された．

尿中ALA排泄量とクレアチニンの関係にもとづくスポット尿を用いた鉛暴露者のスクリーニング法

二島太一郎：日本衛生学雑誌，32(2)，398，1977

スポット尿についてALA（デルタアミノレブリン酸）濃度とCreat（クレアチニン）濃度を測定し，Creat濃度に対応するALA濃度が判定図のどの範囲にあるかをみて，鉛暴露者か否かを判定するスクリーニングのための新しい判定図を作成した．

判定図は3つの範囲に分け，Iは ALA 濃度対 Creat 濃度，Pb-B（血液中鉛）濃度の両面からみて非暴露者と判定される範囲，IIは ALA 濃度対 Creat 濃度からみて鉛暴露者とみなしうるが，Pb-B 濃度との関連からみれば非暴露者と認められる中間範囲で，精検の対象とする．IIIは ALA 濃度対 Creat 濃度および Pb-B 濃度からみて，鉛暴露者と判定される範囲である．

医薬品等の安全性に関する調査研究

ウサギの Ca 経口負荷時における縮合メタリン酸塩の Ca 吸収阻害

山岸達典，森本キミ，堀井昭三，関　博麿，大西和夫：栄養と食糧，31(2)，193，1978

縮合メタリン酸塩（PMP）の生体内吸収に関する研究の一環として，今回はウサギに Ca を経口的に負荷し，腸管の Ca 吸収にともなう血清 Ca の増加，P の減少などの変化に対する PMP の抑制作用を観察した．すなわち，本実験では，あらかじめ負荷時における Ca の投与量と血清 Ca，P の増減量との関係を計数化し，次いで PMP を添加投与し，PMP が Ca の腸管吸収を阻止，あるいは阻害するか否かについて検討した．その結果は下記の通りであった．

1）予備実験　蒸留水の強制的経口投与，経時的な採血などの物理的な刺激を禁餌ウサギに与えた場合（対照A群），血清中の Ca 量の経時的変化はわずかながら低下したが，血清P量では投与後ほぼ一定の勾配で漸次低下する傾向を示した．PMP を体重 kg 当たり 200mg 以上の投与群（対照B群）では血清 Ca 量の減少，P量の増加を認めたが，100mg/kg では対照A群と同様な経時変化を示した．塩化カルシウム 250mg/kg の投与（対照C群）では血清 Ca 量が順次増加する一峰性の経時変化で，P量では投与後急速に減少し，その後やや回復する波状性の経過を示した．

2) 本実験　PMP 100mg/kg 塩化カルシウム，250mg/kg 投与群（実験A群）では Ca 負荷時の血清 Ca，P 量の経時変化に対して PMP がそれを抑制する作用を示した．

PMP 50mg/kg 塩化カルシウム 250mg/kg 投与群（実験B群）では，上記の実験A群と同様に PMP は抑制作用を示した．PMP 25mg/kg 塩化カルシウム 250mg/kg 投与群（実験C群）では Ca 負荷時の血清 Ca，P 量の変化に対してほとんど影響を示さなかった．

生体中の N-ニトロソアミンの分析—熱エネルギー分析器—

真木俊夫：ぶんせき(5)，329，1978

食品および生体試料中の N-ニトロソアミン（NNA）の分析の問題点と最近，アメリカで開発され，現在NNAの分析に最も進んでいると考えられている熱エネルギー分析器（TEA）について概要を述べ，さらに，TEA を用いてヒト血液中の NNA の分析例の解説をした．

オレイン酸メチルの通気酸化と酸化防止剤の影響

松本　茂，中山京子，中島和雄：衛生化学，23(4)，206，1977

不飽和脂肪酸の自動酸化と酸化防止剤および synergist（協力剤）の影響について，特にそれらの間の相互作用について研究を行なう目的で，著者らは従来リノール酸メチルを素材に用いて一連の研究を行なって来た．本稿ではオレイン酸メチルを使用して，従来行なったリノール酸メチルと同様の実験条件，すなわち 90°C において，サンプル中に酸素を通じて酸化を行なった実験の結果について報告する．

オレイン酸メチルの過酸化物価（POV）およびカルボニル価（COV または DNPV）等の増加速度はリノール酸メチルに比して約1/10であることがわかった．酸化による TBA テストの結果および赤外スペクトルの変化についてリノール酸メチルの場合と比較を行なった．生成した揮発性カルボニル化合物およびエステルとしてはノナナール，オクタナール，オクタン酸メチル，ヘプタン酸メチル，フォルミルオクタン酸メチルおよびフォルミルヘプタン酸メチルと推定される物質が検出された．

α-トコフェロールとブチルヒドロキシアニソールの酸化防止効果およびアスコルビン酸の協力作用はリノール酸メチル（使用）の場合と同様なことがわかった．

水酸化ジルコニウム共沈法　無炎原子吸光分析法による清涼飲料水中のスズの定量

天川映子，大西和夫，田口信夫，関　博麿：分析化学，27(2)，81，1978

グラファイト管を用いた無炎原子吸光分析法によるスズの定量法を検討した．共存物質による干渉は，水酸化ジルコニウム共沈法と簡易標準添加法により除去できた．試料2～5g を硝酸—過塩素酸を用いて湿式灰化した後，微アルカリ性で，水酸化ジルコニウムとスズを共沈させた．沈殿を東洋ロ紙 No. 5A でロ過し，水洗後，残渣を5%熱塩酸で溶解し，簡易標準添加法により，試料溶液中のスズ濃度を測定した．本法を清涼飲料水に適用した結果，回収率は 100～106%，変動係数は，2.3%であった．

Molecular Structure of 3β-acetoxyatractylon

H. Ogura, K. Furuhata, N. Tanaka, Y. Harada, Y. Iitaka, Y. Nishikawa, Y. Watanabe, T. Seto and I. Yasuda : *Heterocycles*, 6, 1805, 1977

Three-dimentional molecular structure of a new sesquiterpenoid, 3β-acetoxyatractylon obtained from the rhizome of *Atractylodes lancea* De Oandolle (Compositae) was confirmed by means of an X-ray crystal structure analysis.

The crystal was ascertained the orthorhombic system, space group $P\ 2_1\ 2_1\ 2_1$ and the structure was solved by multi-solution method (MULTAN) with the final R-value 0.062.

微量ホルムアルデヒド

吉原武俊：ぶんせき，34(10)，649，1977

今日，工場排水による水質汚染，自動車排出ガス，工場排煙などによる大気汚染，あるいは建材，家具，繊維製品などの家庭用品による皮膚障害は国民の生活環境を脅かしているが，その主要な汚染物質の一つにホルムアルデヒドがあり，その分析法についてはいろいろ研究発表されている．これら測定法はいずれも一長一短があり，適用を誤るとデーターの評価が客観的に困難となる．このような観点から各種測定法特に高感度で大気中のアルデヒド類測定に利用されている，3-メチルベンゾチアゾロンヒドラジン法（MBTH 法），繊維製品の公定法となったアセチルアセトン法，あるいは接触還元による自動車排出ガスのガスクロマトグラフィー法などについて解説した．

食品等の安全性に関する調査研究

市販食品における *Bacillus cereus* の分布とその血清型別

寺山　武，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，五十嵐英夫，坂井千三，善養寺　浩：食衛誌，19，98，1978

1975年7月～1976年10月の間に東京都内の各種市販食品における *B. cereus* の汚染状態を調査するとともに，分離菌株のH血清型別を行ない以下の成績を得た．

市販食品3,551件のうち667件（18.8%）から *B. cereus* が検出され，食品がかなり高率に本菌に汚染されていることが明らかにされた．

食品由来 *B. cereus* を Taylor & Gilbert の18型の抗血清で型別した結果，667株中150株（22.5%）が型別された．Taylor & Gilbert の血清型に該当しないものの中から新たに追加したT 1～T12型の抗血清による型別では，276/667株（41.4%）が型別された．

細菌性食中毒

坂井千三，伊藤　武：検査と技術，6(6)，440，1978

わが国における食中毒の発生状況を厚生省の全国統計でみると，年間の事件数は約800—1,700件，患者数は約2,000—3,700人である．その病因物質は化学的物質や動物性および植物性の自然毒による食中毒は少なく，10%以下で，大部分が細菌性食中毒である．

細菌性食中毒のうち，発生頻度の最も高いのは腸炎ビブリオ食中毒，次いでブドウ球菌，サルモネラ，病原大腸菌，ウェルシュ菌，ボツリヌス菌による食中毒の順となっている．

ここでは，わが国において発生頻度の高い細菌性食中毒について，その発生状況や症状および原因食品などを中心に解説する．

食品と温度のかかわりを探る

坂井千三，伊藤　武：食品衛生，21(7)，18，1977

毎年夏になると食中毒が多発する．その理由は，わが国で発生する食中毒事件数の90%以上が細菌によるもので，6～9月の夏季においては食品が食中毒をおこす細菌の汚染を受けた場合，よく増殖できる温度条件が満たされるからである．すなわち食品中における細菌の増殖には，栄養分，温度，水分，pH，酸素など多くの条件が影響するが，一般の食品での細菌の増殖には温度が最も影響しやすい．

ここでは，おもに食品中における食中毒細菌の増殖と温度との関係を中心に述べた．

市販食品における有毒糸状菌の増殖と毒素産生性について

一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，倉田浩：食衛誌，19(3)，266，1978

市販乾燥食品27品目を対象として，それらの mycotoxin 自然汚染の危険性をは握する目的で各食品に4種の mycotoxin 産生菌を接種し，カビの発育と毒素産生の有無を検討した．その結果，乾燥芋およびサラミソーセージは市販のままの状態においても aflatoxin, ochratoxin A および sterigmatocystin により，干し柿は sterigmatocystin によりそれぞれ汚染されやすい食品であることが分かった．しかし，胡椒，炒りコーヒー豆およびシナモンは過剰な水分を添加した場合にも mycotoxin 汚染を受けにくいことが分かった．その他の食品は水分含量の程度によって，いずれかの mycotoxin による汚染を受ける危険性のあることが示唆された．

いわゆる「紅茶キノコ」の微生物と有機酸

一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三，牛尾房雄，道口正雄，辺野喜正夫：食衛誌，19(3)，273，1978

「紅茶キノコ」と呼ばれる嗜好飲料の安全性の解明を目的として微生物学的ならびに有機酸組成の検討を行なった．「紅茶キノコ」液から検出した微生物は *Acetobacter xylinum*, *Saccharomyces cereviciae*, *S. inconspicus*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii* などであった．これらの菌の凝塊形成至適温度は26—27°Cで，菌の発育により紅茶液の pH は最終的に3.1以下となった．また，本液に各種病原細菌を接種し生存性を検討した結果，いずれも48時間以内に死滅したことから，これらの菌により汚染される危険はほぼないものと考えた．一方，「紅茶キノコ」液中に存在した有機酸の95%以上は酢酸で，他に微量の乳酸およびギ酸が認められた．

The Growing Importance of Food Protection Services Based on the Laboratory Data

Hajime Murakami: *Gastrointestinal Infections in Southeast Asia* (III), *Proceedings of the Fifth SEAMIC Seminar*, 64, 1978

The summarized activities of the food control laboratory in collaboration to the division of Food Protection Services of Tokyo Metropolitan Government is presented. The laboratory services in Tokyo, in the field of food protection have principally consisted of the following three activities: 1) By testing commercial food specimens, whether or not they will meet with "the hygienic bacteriolo-

gical and chemical standards for food", aiming mainly at preventing the sale of unwholesome food to consumers. 2) By the surveillance on specific pathogens in food, such as *V. parahaemolyticus*, *C. perfringens*, or enterotoxigenic *E. coli*, it enables us to find their ecological nature and to establish the most appropriate and practical control measures. 3) By the monitoring of undesirable drug residues or of chemical environmental pollutants, such as agricultural pesticides or herbicides in animals or in their products, it also enables us to provide an early warning that public is potentially at risk.

生カキの大腸菌汚染と分離菌株のエンテロトキシン産生性

小久保弥太郎，松下　秀，甲斐明美，山田　満，小沼博隆：食品衛生学雑誌，19(1)，117，1978

1976年10月から1977年3月の間に，主として東京都中央卸売市場に入荷した生カキ405検体を対象に，それらの大腸菌による汚染状況をＥＣテストにより調査した．その結果，三陸地方，三重および広島県産カキはともに検体の50%以上から大腸菌が検出され，そのうち39検体（9.6%）は230/100g以上の大腸菌による汚染を示し，なかでも広島県産カキの汚染が高かった．また，12月に入荷したカキは他の月のものに比較して高い汚染が認められた．

分離した大腸菌138株のエンテロトキシン産生能を試験したところ，4株に毒素原性が認められた．そのうち1株はＬＴ産生株で広島県産カキから，他の3株はＳＴ産生株で岩手および三重県産のカキから分離されたものであった．これらの血清型は，ＬＴ産生株はＯ型別不能Ｈ2，ＳＴ産生株は1株がＯ25：Ｈ42，他の2株は運動性を欠きＯ20およびＯ型別不能であった．

畜産物中の残留抗菌性物質検査法の実際

松本昌雄：食品衛生研究，28，5，383，1978

昭和50年の飼料添加物の使用規制に続いて厚生省から，それらの畜産物中の残留検査法が提示された．それによると添加物の種類によって微生物学的もしくは化学的試験法を採用している．そこで，微生物学的試験法，主としてスクリーニングテストを解説し，あわせて抗菌性物質の同定並びに定量法について論述した．

牛乳中の残留抗菌性物質並びに Nitroxynil の実態調査

松本昌雄，竹葉和江，村上　一：昭和52年度食品衛生調査報告書，1978

乳牛の疾病の予防または治療薬として応用されている抗菌性物質は，一般にその抗菌スペクトル拡大と薬効増大の効果を期待して，それぞれ抗菌スペクトルの異なるものが数種以上組合せて使用されている．一方，牛乳中の残留抗生物質の検査は，厚生省通達の TTC テストおよび IDF 提案のペーパーディスク法にもとづいて実施され，それらによって主要抗生物質は検出できるが，しかし，サルファ剤は相当量（1,000mcg/m*l*）残留しても検出できない．そこで，サルファ剤の微生物学的試験法を開発する目的で基礎的検討を行なった．その結果，検査法を確立し，それを応用して市販飲用乳中のサルファ剤残留調査を行なった．同時に，抗生物質と同様，乳牛に広く利用されている医薬品，とくに Nitroxynil を対象に，その残留実態調査を行なった．

合成抗菌剤の微生物学的試験法に関する検討

松本昌雄，神崎政子，村上　一：畜産食品中の有害物質に関する調査研究報告書，1978

家畜等の感染症予防並びに生産性の向上を目的として，いろいろな抗菌性物質が飼料に添加使用されてきた．その結果，抗菌性物質の畜産物への移行残留が危惧され，食品衛生上の一大関心事となっている．しかし，これらの残留検査法は確立されておらず，早急にその検討が望まれていた．そこで，飼料添加物のうち合成抗菌剤13種類を対象に微生物学的試験の実用性について基礎的検討を行なった．その結果，抗菌力を示したものは，Ni-Carbazine, Robenidine, ニトロフラン誘導体(Furazolidone, Furamizol, Panazonum), Sulfa-Qinoxaline および Carbadox の7種類で，中でも，ニトロフラン誘導体と Sulfa-Qinoxaline は強い抗菌力を示し，特に前者は B. subtilis ATCC 6633 株に，後者は S. lutea ATCC 9341 株にそれが顕著であった．

農薬汚染その後

山岸達典：臨床栄養，51(1)，33，1977

本報は，食品中に残留する有機塩素系農薬を中心に，汚染の仕組み，汚染の実態および防止対策の現状などの概略について述べ，さらに今後のあり方についても若干の私見を述べたものである．

食品中の化学的汚染物質に関するモニタリングの意義と重要性

山岸達典：臨床栄養，51(1)，39，1977

食品中に混入する化学的汚染物質を防止する上で，モニタリング活動はきわめて重要であることを述べた．つまり，化学的汚染物質に対して，絶え間のないチェックを繰り返し，解析，評価することは，人がこうむる危害を防止するための基準の設定あるいは潜在的な汚染物質を防止することなどに役立つことを論述した．

食品中の許可タール色素の定量法

西島基弘，上村　尚，冠　政光，高橋尚子，中里光男，渡利優子，木村康夫，直井家壽太：食衛誌，18(5)，463，1977

食品中の許可タール色素の抽出およびデンシトメトリーによる定量法を検討した．クリーンナップはイオン交換液を用いて，酸性タール色素を有機溶媒層に抽出し，さらにアンモニア水で逆抽出した後，一定量とし，その一定量を薄層クロマトグラフィーで分離した後，デンシトメトリーに付した．各色素の検量線は各色素とも1スポットあたり 0.05～0.5μg で直線関係が得られた．ジュース，すあま，かまぼこに着色料を添加した回収率は，indigo carmine が80%であったほかはいずれも 93%以上であった．加工食品成分として考えられる天然色素などについて妨害の有無を検討したが，laccaic acid が若干の妨害を示すほかはいずれも影響がみられなかった．

生活環境保全に関する調査研究

大路池のカビ臭と放線菌および臭気物質

松本淳彦，土屋悦輝：水道協会雑誌，514，42，1977

水道水源における異臭とくにカビ臭は，例年春季から秋季にかけて全国的に発生しており，各水道局で苦慮している問題である．カビ臭物質は，おもに放線菌や藍藻類によって産生されるもので，現在，2-methylisoborneol と geosmin が知られている．

三宅島の水道水源である大路池でも1971年頃からこの問題に直面し，島民の苦情が多かった．そこで1972年から '73 年にかけて水源池の調査を行なったところ，水中や底泥中から15株の発臭放線菌（*Streptomyces* 属10種）が分離された．これらを培養した結果，池水のカビ臭と酷似した臭気を発し，この物質が上記の2物質であることが判明した．また，池水中からも微量ながら検出されたため，カビ臭発生の原因が放線菌に依存していることを示唆した．

Phycoerythrin in the Deeper Water Layer of a Stratified Eutrophic Lake : An Application of Bile Pigment in Determining the Standing Crop of Blue-green Algae

Mariyo F. Watanabe : *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, 62(4), 549, 1977

成層する富栄養湖より採集した植物プランクトンの細胞の吸収特性を調べたところ，夏期，深層で 560nm に吸収極大がみられた．この吸収は藍藻のもつ色素フィコエリスリンによることがわかった．560nm と 600nmにおける吸光度の差よりフィコエリスリンの相対値を求め，この変化をみることにより，フィコエリスリンを持つ藍藻の分布の消長をみた．

水道原水の臭気物質のマスフラグメントグラフィーによる超微量分析

土屋悦輝，岡本敏彦：薬誌，98，124，1978

水道水にかび臭を発生させる原因物質は 2-methylisoborneol，geosmin によるものであることが明らかにされている．この物質は極く微量でもかび臭が感じられ，その臭気を感ずる限界は 2-methylisoborneol で 0.1 ppb，geosmin で0.02～0.05ppb であり，従来の機器による分析法では測定できず，水中の臭気物質を量的に表現する方法として人の感覚にたよる臭気濃度（TO）で表わしてきた．著者らは GC-MS のマスフラグメントグラフィー（MF）を利用して，測定する方法を検討した．水中に極く微量存在する臭気物質を濃縮する方法として，吸着剤アンバーライト XAD—2 樹脂に通して吸着させ，エーテルで溶出し，これをKD濃縮器で濃縮し試料とした．HF は GC-MS で MID System を用いて，モニタリングイオンとして共に base peak を使用し，2-methylisoborneol では m/e 95，geosmin で m/e 112 であり，また内部標準物質として，n-tridecane，p-dinitrobenzene を使用した．この結果，試料水10*l* を使用すれば人の感じる限界以下の0.01ppb 以上の臭気物質を定量分析することができた．

三宅島大路池より分離した放線菌の産生代謝物

土屋悦輝，松本淳彦，岡本敏彦：薬誌，98，545，1978

三宅島大路池の底泥，池水，水草の附着物から分離したかび臭を発生する放線菌 Streptomyces 属15株について，大量培養を行ない得られた産生代謝物の同定を行なった．

放線菌を Yeast-malt·extract 培地，Oatmeal 培地に移植し，28°，14日間培養を行なった．これを水蒸気蒸留して試料とした．この試料を GC-MS にかけ，マスス

ルクトルから構造を推定し，標準品と比較し同定を行なった．放線菌15株のうちほとんどが2-methylisoborneol, geosmin を産生した．他の産生代謝物として，芳香臭のする 2-phenylethanol が *Streptomyces·phaeofaciens*, *S. lavendulae*, *S. versipellis*, *S. neyagawaensis* から検出された．また酸味のある芳香臭を呈する Salicylaldehyde が *S. lavendulae* から，phenol が *S. phaeofaciens*, 3-octanone が *S. chibaensis* からそれぞれ検出された．

Polychlorinated Terphenyls as an Environmental Pollutant in Japan

M. Doguchi : *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, 239, 1977

This paper summarizes the results of the studies made by our group and other investigators in Japan on the residue levels of PCTs in a variety of items in the environment including the human body.
In contrast to widespread distribution of PCBs in the environment, PCT residues were seldom found in samples from aquatic environments such as water, sludge, waterfowl and fish, and if found, the levels of PCTs were so low as to be practically negligible. Similarly, no significant levels of PCTs were detectable in foodstuffs such as edible oils, vegetables, dairy products and meat and in prepared diets. These findings may be explained by the fact that PCTs are much less volatile and soluble than PCBs and the total industrial output of PCTs was as small as 2700 tons which is 1/20 of PCBs produced in Japan. However, the levels of PCTs in human fat and blood were shown to be almost equivalent to PCBs, despite a negligible amount of PCTs being found in food. No clear explanation of human contamination by PCTs has been proposed so far.

Dietary Intakes of Some Chlorinated Hydrocarbons and Heavy Metals Estimated on the Experimentally Prepared Diets

F. Ushio and M. Doguchi : *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 17, 707, 1977

It is established that the residues of persistent environmental pollutants of one kind or another are detectable in almost all of the foodstuffs we consume. The national studies have to be made on the average diet of the general population to assess whether or not the residue levels of these pollutants in the meal can pose any real hazard to human health. Since such national survey has not yet been carried out in Japan, we have made some attempt to estimate the dietary intakes of the residues of pesticides, PCBs, PCTs, HCB, total mercury, methylmercury, lead and cadmium on the diets for 10 day period experimentally prepared.

地盤凝固剤による地下水の汚染調査

樋口育子，会田朋子，中川順一，三村秀一：総務局誌，昭和51年度プロジェクト研究中間報告，66，1977

近年種々の土木工事の際に本工法の他に補助工法として薬液注入工法が採用されている．昭和49年に九州福岡で起ったアクリルアミド系薬液による事故により社会的関心が高まった．国および都はそれに対し「薬液注入工法暫定取扱指針」を定め調査の結果が判明するまでフッ素およびその他の劇毒物を含まない水ガラス系薬液のみの使用を条件つきで認めた．そこで筆者らはプロジェクトに参加し，昭和49年より本調査を行なっている．昭和51年度の地下水調査は下水道管埋設工事の行なわれた練馬区石神井台七，八丁目付近枝線工事と称せられる現場周辺とした．本工事は水ガラス系薬液（LW-1）を使用して地盤改良を行ない，推進工法で地下に直径1500mmの管渠を埋設する工事である．第1立坑および第2立坑至近距離に設けられた観測井4本と既設井戸11本を利用し，昭和51年7月から同年12月20日まで毎週2回試料を得て水ガラス系薬液が地下水に与える影響を調査し，工事終了後「薬液注入工法暫定取扱指針」にそって1カ月，3カ月，6カ月目と地下水の分析を行なった．調査項目は外観，pH，RpH，塩素イオン，過マンガン酸カリウム消費量，総硬度，ナトリウム，二酸化けい素の9項目とした．これらの項目は水ガラス系凝固剤の影響，屎尿，下水その他の原因による水質の変動に対応し得るよう選定したものである．調査の結果は既設井戸においては各成分が一部わずかに変動を示したが，水ガラス系凝固剤由来と思われる水質変化ではなく，観測井は4本共pH，ナトリウム，二酸化けい素の挙動から薬液由来と推定し得る水質の変動が認められたが，工事終了1カ月後の試料はいずれも平常値に回復した．

水およびスラッジ中の微量アクリルアミドの定量法

中村　弘：水道協会雑誌，514，37，1977

アクリルアミド系高分子凝集剤は工場廃水処理あるいは浄水場のスラッジ処理などに広く使われているが，これら凝集剤の中には水に易溶性で毒性の高いアクリルアミドモノマーが含まれている．このため，これらアクリルアミドモノマーは環境中に流出するおそれが多分にあり，水道の原水の監視および廃水ならびにスラッジ処理の管理上，ppb オーダーのアクリルアミドの測定法が要求されている．従来の微量アクリルアミドの測定法には共存物質の影響があり，また，回収率，精度などにも問題があった．筆者はこれら試験法を検討し，前記の点でほぼ満足のできる試験法を確立した．その概要は，検水（濁りのある場合はろ液または遠沈上澄液，スラッジの場合は水による抽出後，ろ液または遠沈上澄液）100 ml に 6N・H_2SO_4 を加えてpH 1.0 とし，KBr 30g，0.1M・$KBrO_3$ 10ml を加え，恒温暗所内に30分放置する．この操作によって得られたアクリルアミドの臭素化物（2,3-dibromopropionamide）を酢酸エチルで抽出し，この抽出液を適宜濃縮または希釈し，これを ECD 付ガスクロマトグラフ（15% EGS on Chromosorb W, AW, DMCS を充填した長さ 1m のガラスカラムを装着）を用いて定量するものである．また，フロリジルカラムクリンアップ法により，従来の妨害物質が多く測定が困難であった試料あるいはアクリルアミド濃度が1 μg/l 以下の試料の測定も可能となった．本法により，アクリルアミドを添加した水道水（0.5，5，50μg/l），人工海水（0.5，5，50μg/l），および浄水場スラッジ（5，50μg/l）を用いた回収実験では，いずれも80%以上の回収率が得られ，これらの相対標準偏差は2%以内であった．なお，定量下限値は水で0.1μg/l，スラッジで1μg/lであった．

実験動物の鼻孔閉鎖にともなう空気嚥下について

中島克行，大井　玄：実験動物，26(2)，149，1977

実験動物（マウス，ラット，モルモット，ハムスター，家兎）の鼻孔閉鎖を行なうことにより，容易に胃腸管内に過剰な空気も貯溜させることができた．貯溜したガスについては，その分析結果から，腸管内で発生したガスではなく，嚥下されたものである可能性が示唆された．なお，小腸（空，回腸）粘膜上皮の上部，内部に多数の気泡が認められた．鼻閉後の病理変化については，腸管に最も著明な変化が認められ，死亡しつつあるマウスにおいて，空腸，回腸部に出血，壊死が認められた．鼻閉マウスが乳児の壊死性腸炎のモデルになる可能性が考えられた．

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1977. 7—1978. 6)

五十嵐英夫，M. S. Bergdoll：ブドウ球菌エンテロトキシンBのチロシン残基のテトラニトロメタンによる化学修飾について
第24回毒素シンポジウム（1977. 7）

潮田　弘，小川正俊，辻　明良，五島瑳智子，坂井千三，寺山　武：臨床材料および健康人由来 ***Staphylococcus epidermidis*** と類似菌の生物学的性状
昭和52年度ブドウ球菌研究会（1977. 9）

天野祐次，小野川　尊，市瀬正之，善養寺　浩，寺山武：保菌者由来サルモネラの年次別耐性の推移
第26回日本感染症学会東日本地方会（1977. 10）

潮田　弘，辻　明良，小川正俊，五島瑳智子，坂井千三，寺山　武：***Staphylococcus epidermidis*** の臨床材料由来株および健康人由来株における生物学的性状と薬剤感受性の比較
第24回日本化学療法学会東日本支部総会（1977. 10）

五十嵐英夫，森田隆司，岩永貞昭：ブドウ球菌コアグラーゼの精製へのアフィニティークロマトグラフィーの応用
第51回日本細菌学会総会（1978. 4）

寺山　武，山田澄夫，稲葉美佐子，甲斐明美，五十嵐英夫，坂井千三：ブドウ球菌食中毒推定原因食品，患者吐物およびふん便からのエンテロトキシンの検出
第51回日本細菌学会総会（1978. 4）

五十嵐英夫，潮田　弘，山田澄夫，新垣正夫，寺山武，坂井千三，池島伸至，楠　淳，新井輝義，神　真知子，入倉善久，友成正臣，佐藤　隆，山田武勝，安部勇三，鈴木廸夫，斉藤　修，能登屋耕二：豆腐のセレウス菌汚染の実態とその汚染経路の追跡
第61回東京都衛生局学会（1978. 5）

五十嵐英夫，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，寺山武，坂井千三：黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン（A～E）産生におよぼす水分活性の影響
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

五十嵐英夫，山田澄夫，寺山　武：食品中のブドウ球菌エンテロトキシンの簡易迅速検出法
第39回日本細菌学会関東支部総会（1978. 6）

潮田　弘，寺山　武，坂井千三：ブドウ球菌性 **TEN** に関する研究　**Exfoliative toxin** の作用機序の解析
第39回日本細菌学会関東支部総会（1978. 6）

Kouji Fukai and Tsutomu Maruyama : **Histopathological studies on experimental *Yersinia enterocolitica* infection in animals**
3rd International Symposium on *Yersinia* (1977. 9, Montreal, CANADA)

Tsutomu Maruyama, Kouji Fukai and Hiroshi Zen-Yoji : **Observations on the correlation between pathogenicity and serotypes of *Yersinia enterocolitica* by the assay applying cell culture system and experimental mouse infection**
3rd International Symposium on *Yersinia* (1977. 9, Montreal, CANADA)

伊藤　武，斉藤香彦，稲葉美佐子，坂井千三：東京都内に発生した21事例のウェルシュ菌食中毒と分離菌株のエンテロトキシン産生性
第8回嫌気性菌感染症研究会（1978. 2）

坂井千三，伊藤　武，斉藤香彦，稲葉美佐子：東京都内における市販食品および土壌からのボツリヌス菌検出状況
ボツリヌス中毒予防対策研究会（1978. 3）

伊藤　武，斉藤香彦，坂井千三：**Duguid** らの生物型分類による各種由来 **Salmonella typhimurium** の検討
第85回日本獣医学会（1978. 4）

坂井千三，伊藤　武，斉藤香彦，丸山　務，柳川義勢，寺山　武，新垣正夫：***Bacillus cereus*** によると推定された5事例の食中毒について
第52回日本感染症学会総会（1978. 4）

伊藤　武，斉藤香彦，坂井千三，高橋政寿，稲葉美佐子，山本一郎：腸炎起病性ウエルシュ菌の実験的感染特に腸管内での芽胞形成とエンテロトキシン産生
第52回日本感染症学会総会（1978. 4）

丸山　務：***Yersinia enterocolitica*** の病原性について
第85回日本獣医学会（1978. 4）

丸山　務，甲斐明美，柳川義勢，坂井千三：***Yersinia enterocolitica*** O群8のマウスへの実験的感染
第51回日本細菌学会（1978. 4）

坂井千三：感染性腸炎起因菌とその薬剤感受性（昭和52年度の成績）
第52回日本細菌学会総会（1978. 4）

坂崎利一，田村和満，島田俊雄，坂井千三，滝沢金次郎，中村武雄，浅川　豊，吉崎悦郎，小林一寛，寺本忠司：腸炎由来 ***Escherichia coli*** の毒素原性および血清型について
第51回日本細菌学会総会（1978. 4）

坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斉藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，甲斐明美，新垣正夫，寺山　武：東京都内に発生した ***Bacillus cereus*** によると推定される5事例の食中毒について
第61回東京都衛生局学会（1978. 5）

Makoto Ohashi, Kenji Ohta, Masaaki Tsuno and Hiroshi Zen-Yoji : **Development of a Sensitive Serological Assay, Reversed Passive Hemagglutination Test, for Detection of Enteropathogenic Toxin (Kanagawa Hemolysin) of *Vibrio parahaemolyticus*, and Re-evaluation of the Toxin Producibility of the Isolates from Various Sources**
Thirteenth Joint Conference, the United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1977. 9, Georgia, U. S. A.)

Makoto Ohashi : **Increasing Importance of Antibiotic-Resistant Bacteria in Food Hygiene**
The 5th SEAMIC Seminar on Food Hygiene in the Problem of Gastrointestinal Infections (1978. 2, 東京)

太田建爾，工藤泰雄，津野正朗，大橋　誠，善養寺浩：腸炎ビブリオ腸管病原毒素に関する研究——逆受身赤血球凝集反応による本毒素の検出法，並びに本法による各種分離株の毒素産生性の再検討
第51回日本細菌学会総会（1978. 4，鳥取）

工藤泰雄，山田澄夫，松下　秀，大橋　誠，大友信也，村岡東洋治：大腸菌エンテロトキシンに関する研究（4） RPHA 法によるコレラ毒素と大腸菌易熱性毒素の免疫学的関係の検討
第51回日本細菌学会総会（1978. 4，鳥取）

工藤泰雄，松下　秀，山田澄夫，大橋　誠：大腸菌エンテロトキシンに関する研究（5） 抗コレラ毒素を用いた RPHA 法による各種由来大腸菌の易熱性毒素の検出
第51回日本細菌学会総会（1978. 4，鳥取）

坂井千三，工藤泰雄，太田建爾，津野正朗，松下秀：東京都における最近10年間の輸入感染性腸炎の細菌学的検討
第52回日本感染症学会総会（1978. 4，大阪）

一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三：東京における空気中の毒性カビ分布について
第6回マイコトキシン研究会（1977. 9）

諸角　聖，一言　広，和宇慶朝昭，坂井千三：毒性カビの毒素産生用基質としての各種食品・生薬について
第6回マイコトキシン研究会（1977. 9）

柏木義勝，大久保暢夫，柴田　実，徳江シゲ子，永瀬金一郎，飯村　達：1950年代に分離されたA群溶血連鎖球菌の薬剤感受性について
第26回日本感染症学会東日本地方会（1977. 10）

村田以和夫，川中正憲，鈴木了司：水田皮膚炎の免疫血清学的診断法の検討　1. 実験感染系における Cercaria 間接蛍光抗体法（Cercaria IFA）の検討
第37回日本寄生虫学会東日本大会（1977. 10）

加納堯子，村田以和夫，飯村　達：しょう紅熱患者の免疫グロブリン IgA, IgM, IgG, IgE 値ならびに ASO 抗体価の消長
第24回日本臨床病理学会総会（1977. 10）

大久保暢夫，柏木義勝，柴田　実，徳江シゲ子，永瀬金一郎：1977年度分離A群溶連菌の薬剤感受性と菌型について
第52回日本感染症学会総会（1978. 4）

川中正憲，鈴木了司，村田以和夫：水田皮膚炎の免疫血清学的診断法の検討　2. セルカリア間接蛍光抗体法の患者血清への応用

第47回日本寄生虫学会大会（1978. 4）

加納堯子，横田　健：ナイジェリアで得た多剤耐性エルトール型コレラ菌の R-plasmid
第52回日本感染症学会総会（1978. 4）

渡辺悌吉，浦野純子，河野弘子，石原　祐，岩崎謙二，藪内　清，矢野一好：急性気道感染症に関する2，3の調査成績
第8回小児ウイルス病研究会（1977. 9）

岩崎謙二，武内安恵：最近のA型およびB型インフルエンザウイルス分離株の免疫学的群別
第25回日本ウイルス学会総会（1977. 10）

矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二：東京都における小児の急性気道感染症と下水からのエンテロウイルス分離状況（1977年）
第52回日本感染症学会総会（1978. 4）

坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：最近における東京都民のインフルエンザA型ウイルスHI抗体保有状況
第52回日本感染症学会総会（1978. 4）

坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：東京都における1977年4月以降のインフルエンザ様集団かぜの検索成績
第52回日本感染症学会総会（1978. 4）

Hajime Murakami, Kuniko Niwayama, Sumio Yamada, Takeshi Terayama and Misao Haruta: **Durability of Enterotoxin B in Liquid Whole Milk Against Ultra-high Temperature Pasteurization**
7th Symposium of WAVFH (Sep. 1977, West Germany)

小久保弥太郎，松下　秀，甲斐明美，山田　満，小沼博隆：生カキの大腸菌汚染と分離菌株のエンテロトキシン産生性
第34回日本食品衛生学会（1977. 10）

神保勝彦，井草京子，小久保弥太郎，松本昌雄，村上一：動物食品中の *B. cereus* に関する検査法とその応用
第34回日本食品衛生学会（1977. 10）

Hajime Murakami: **The Growing Importance of Food Protection Services Based on the Laboratory Data**
Fifth SEAMIC Seminar for Gastrointestinal Infections in Southeast Asia (Feb. 1978, Tokyo)

山岸達典，秋山和幸，森田昌敏，高橋利恵子，村上一：**1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene** (CNP) の分離同定
第3回日本農薬学会（1978. 3）

山岸達典，秋山和幸，森田昌敏，高橋利恵子，村上一：**1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene** (CNP) の東京湾産のアサリおよび底土中の残留濃度の季節的な変化
第3回日本農薬学会（1978. 3）

山岸達典，秋山和幸，森田昌敏，高橋利恵子，村上一：**1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene** (CNP) の東京湾の魚介類への汚染
第3回日本農薬学会（1978. 3）

三浦まち子，黒崎峯生，可児利朗，松本昌雄，藤川房代，春田三佐夫：レサズリン還元試験法の簡易化
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

木村久一郎，菊地俊六，村田光明，高島利幸，梅木富士郎，金子誠二，村上　一：東京都において捕獲，抑留された犬からのイヌブルセラ菌の分離
第61回東京都衛生局学会（1978. 5）

鶴見　誠，平山談二，村田光明，高島利幸，梅木富士郎，影井　昇，木畑美知江，浅野和仁：東京都におけるネコのトキソプラズマ抗体調査およびオーシストの検索
第61回東京都衛生局学会（1978. 5）

伊藤厚子，村田光明，高島利幸，平山談二，鶴見誠，梅木富士郎，影井　昇，木畑美知江，浅野和仁：東京都におけるネコのトキソプラズマ抗体調査およびオーシストの検索
昭和53年度日本獣医公衆衛生学会（関東）（1978. 6）

木村久一郎，菊地俊六，村田光明，高島利幸，梅木

富士郎，金子誠二，村上　一：東京都で捕獲，抑留された犬の過去4年間における抗-Brucella canis 抗体調査および菌分離
昭和53年度日本獣医公衆衛生学会（関東）（1978. 6）

高橋宗和，鈴木雅夫，小川至利，吉村　統，高島利幸，島崎秀雄，早野　剛，村上　一，梅木富士郎：東京都における犬および猫からのトキソプラズマ虫体分離成績
昭和53年度日本獣医公衆衛生学会（関東）（1978. 6）

西島基弘，落合節子，斉藤和夫，高橋尚子，上村尚，井部明広，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-VIII　乳製品中のアフラトキシン試験法
第34回日本食品衛生学会（1977. 10）

斉藤和夫，西島基弘，高橋尚子，上村　尚，井部明広，落合節子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-IX　レバー中のアフラトキシン試験法
第34回日本食品衛生学会（1977. 10）

上村　尚，西川基弘，斉藤和夫，高橋尚子，井部明広，落合節子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-XI　穀類中のトリコテセン系マイコトキシン試験法
第34回日本食品衛生学会（1977. 10）

西島基弘，斉藤和夫，高橋尚子，上村　尚，井部明広，落合節子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-XII　穀類，種実類等のアフラトキシン汚染実態調査
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

斉藤和夫，西島基弘，高橋尚子，上村　尚，井部明広，落合節子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-XIII　チーズ中のアフラトキシン汚染
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

上村　尚，西島基弘，斉藤和夫，高橋尚子，井部明広，落合節子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-XVI　食品加工時におけるトリコテセン系マイコトキシンの消長
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

井部明広，西島基弘，斉藤和夫，高橋尚子，上村尚，落合節子，直井家壽太：東京湾産貝中の3,4-ベンツピレンおよび石油系炭化水素含量
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

西島基弘，宮崎利夫：真菌多糖類の研究（XXVII）レイシの水溶性多糖（その2）
日本薬学会第98年会（1978. 4）

冠　政光，観　公子，中里光男，渡利優子，有賀孝成，石川ふさ子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-XIV　アフラトキシン分析における TLC 条件の検討
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

観　公子，冠　政光，中里光男，渡利優子，有賀孝成，石川ふさ子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-XV　ステリグマトシスチン分析法の検討
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

中里光男，冠　政光，観　公子，渡利優子，有賀孝成，石川ふさ子，直井家壽太：食品中の tert-butyl hydroquinone（TBHQ）の試験法
第35回日本食品衛生学会（1978. 5）

小川仁志，鈴木二郎，西島基弘，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する研究-X　果汁中のペニシリン酸およびパツリン試験法
第34回日本食品衛生学会（1977. 10，岐阜）

小川仁志，西島基弘，斉藤和夫，観　公子，高橋尚子，上村　尚，井部明広，落合節子，直井家壽太：食品中のマイコトキシンに関する 研究-XII　市販ナッツ類からアフラトキシンの検出
第60回東京都衛生局学会（1977. 11）

田村行弘，西垣　進，真木俊夫，嶋村保洋，直井家壽太：クロレラ摂取による光過敏症
日本食品衛生学会第34回学術講演会（1977. 10）

道口正雄，西田甲子，牛尾房雄，深野駿一，溝口勲，阿部　学：PCT による人体汚染の解明（第5報）人血液並びに鳥類体中の PCT 濃度
日本食品衛生学会第35回学術講演会（1977. 5）

武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，道口正雄，大

久保暢夫：小笠原しょ島民の血清成分値に関する考察
第60回東京都衛生局学会（1977. 11）

武士俣邦雄，霜田さと子：尿中のアルデヒド反応成分に関する研究（Ⅰ） ウロビリノーゲンおよび黄色呈色成分について
第27回日本臨床衛生検査学会大会（1978. 4）

佐藤泰仁，溝口 勲：調剤室薬塵の実態調査
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

秋山和幸，高橋利恵子，森田昌敏，中川順一，塩川恵美子：HMPA によるジメチルアミノ化とリン酸エステル誘導体の生成
日本薬学会第21回関東支部大会（1977. 10）

池田真悟，二島太一郎，長嶋親治，藤谷和正，野牛 弘，溝口 勲，長崎 護，中島達也，上條 宏：母親と新生児における水銀の蓄積と相互関係（第2報） 毛髪・血液および胎児組織
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

藤田紘一郎，杉山雅俊，菊池正一，二島太一郎，池田真悟，溝口 勲，野牛 弘：イラク・カタールの原住民の毛髪中・血液中水銀量について（第1報）
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

森本敬三，内出洋道，羽里幸彦，池田真悟，二島太一郎：母体より胎児への水銀移行動態（第3報）
第60回東京都衛生局学会（1977. 11）

二島太一郎，藤谷和正，池田真悟，長嶋親治，溝口 勲，野牛 弘，藤田紘一郎，菊池正一，月館説子：経口投与された塩化メチル水銀の各臓器への経時的分布とその結合蛋白（その3）
第48回日本衛生学会（1978. 5）

森本敬三，羽里幸彦，香山英一，小松崎 尚，川島正道，池田真悟，二島太一郎：母体より胎児への水銀移行動態（第4報）
第61回東京都衛生局学会（1978. 5）

狩野文雄，牧野国義，佐藤泰仁，大沢誠喜，福田雅夫，多田宇宏，溝口 勲，野牛 弘：アルカリろ紙法によるイオウ酸化物濃度の統計的検討
第18回大気汚染研究全国協議会大会（1977. 11，福岡）

牧野国義，溝口 勲：大気汚染による自覚症状の多変量解析
日本公衆衛生学会（1977. 10）

牧野国義，溝口 勲，三上理一郎：健康影響からの複合大気汚染指標の検討
大気汚染研究全国協議会（1977. 11）

溝口 勲，牧野国義：東京都における学童の喘息症状と大気汚染物質の関連性
大気汚染研究全国協議会（1977. 11）

大井 玄，西垣 進，関 比呂伸，田村行弘，今野ヒロ子，真木俊夫，蓑輪佳子，嶋村保洋，溝口 勲，野牛 弘，北川知行：ラットの亜急性メチル水銀中毒におけるメヌケ，鯨肉由来セレンと亜セレン酸との減毒効果の比較
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

中村 弘，高橋正博，三村秀一，斉藤庄次，小輪瀬勉：水道用品に関する衛生学的研究（第2報） 水道用塩化ビニル管中の鉛の溶出
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

中村 弘，斉藤庄次，高橋正博，松本淳彦，根津尚光，小輪瀬 勉，三村秀一：三次処理水に関する衛生学的研究（第1報） 水質と安全性
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

中村 弘，斉藤庄次，高橋正博，小輪瀬 勉，三村秀一：三次処理水に関する衛生学的研究（第2報） 微量有機物質の検索
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

土屋悦輝，松本淳彦，松本浩一，三村秀一，岡本敏彦：水の臭気に関する基礎的研究（Ⅴ） 藍藻，*Oscillatoria splendida* の産生代謝物
日本薬学会第98年会（1978. 4）

松本淳彦，土屋悦輝，松本浩一：藍藻，*Oscillatoria splendida* によるカビ臭物質 geosmin の産生
第14回日本水処理生物学会（1977. 11）

三村秀一，樋口育子，会田朋子：薬液注入工法の安全性に関する調査研究（第1報）（水ガラス系薬液中に含まれる重金属類）
第32回土木学会（1977. 10）

樋口育子，会田朋子，三村秀一：薬液注入工法の安全性に関する調査研究（第2報）（水ガラス系薬液による地下水の汚染調査）
第32回土木学会（1977. 10）

高橋保雄，森田昌敏，三村秀一：ポリ塩化ナフタレン（PCN）による環境汚染
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

高橋保雄，森田昌敏，三村秀一：水道水中の極微量有機物（酸性物質）
日本化学会第37春季年会（1978. 4）

中川順一，森田昌敏，秋山和幸，樋口育子，三村秀一：PCB の加熱による PCDF の生成
第36回日本公衆衛生学会（1977. 10）

押田裕子，栃本　博，菊地洋子，笹野英雄，友成正臣：水中における DDVP の分解に関する研究
日本薬学会第98年会（1978. 4）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

三　村　秀　一（委員長）
高　橋　保　二
坂　井　千　三
原　田　裕　文
村　上　　一
直　井　家壽太
石　川　隆　章
平　賀　興　吾
中　尾　順　子

昭和53年12月5日　発行

規格表　第2類
印刷番号（53）704
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第29-1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㈹

印刷所　合同印刷株式会社
〒130 東京都墨田区業平2—9—13
電　話　624—6111㈹