u 13le-1

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

30–1

1979

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

55. 1. 17
受付

序

東京都の財政危機と，新知事の誕生により都行政の体質変換が行われているなかで，当研究所は，世俗を離れて，日々試験検査，調査研究に明け暮れております．

本日，ここに昭和53年度の研究成果を第30号として刊行することが出来ましたので，御批判御指導をお願いする次第です．

地方衛生研究所は，全国に68ヶ所あり，それぞれの地方において，試験検査・調査研究，技術研修および衛生情報解析に，それぞれの特長を生かして活躍しております．そして，それぞれ研究報告を出版しておりますが，それらの報告には，研究所間の共通な課題が数多く認められます．これらの課題報告を総合的に判断すると，全国的な規模で結論が得られるものと考え，努めて，他研究所の調査研究報告を読ませていただいております．

これからは，地方衛生研究所を結ぶ研究協力により，国レベルの大きな働きが出来るものと考えます．

昭和50年より始まった23区への衛生行政の移管も順調に進行しつつありますが，これにともない簡易な試験検査は23区で行われるようになり，当研究所の試験検査数は減少しております．一方質的に見ると高度の検査は増加の傾向にあります．これは当然のことで，物事がわかってくれば，疑問も生ずるのであって，疑問を解くため衛生研究所に依頼検査となってくるものと思われます．当研究所ではこれらの疑問に即答出来るように，更に研鑽に努めるつもりでおります．今後調査研究成果の提供，技術情報の提供，研修等に力をそそぎたいと存じます．

この研究年報は当研究所研究員の一年間の苦労の結晶でありますので，都区における試験検査にも，また行政指導にも御活用願えれば幸と存じます．

擱筆するにあたり，本書の編集委員ならびに関係諸氏の献身的な御奉仕を深く感謝いたします．

昭和54年12月

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

東京都内の保育園で発生した *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* による集団下痢症
……伊藤　武，斎藤　香彦，柳川　義勢，稲葉美佐子，甲斐　明美，丸山　務，
坂井　千三，大橋　誠，岡　愛子，円城寺政子，菱沼　勉，千種　操子…… 1

ボツリヌス菌の生態学的研究　東京都内の魚市場泥土および市場入荷魚介類における本菌の分布
……斎藤　香彦，伊藤　武，稲葉美佐子，坂井　千三…… 7

アフィニティークロマトグラフィーによるブドウ球菌コアグラーゼの精製の試み
……五十嵐英夫，潮田　弘，高橋　正樹，新垣　正夫，稲葉美佐子，寺山　武，坂井　千三…… 12

腸管病原菌検索を目的としたふん便の保存・輸送培地；変法 Cary-Blair 培地の検討
……甲斐　明美，伊藤　武，坂井　千三，HUAD JUTAJAND…… 17

下水および急性熱性呼吸器疾患患児からのエンテロウイルス分離（1978年）
……藪内　清，矢野　一好，柴田タツ美，林　志直，
岩崎　謙二，浦野　純子，河野　弘子，渡辺　悌吉…… 24

最近における東京都民のポリオウイルス中和抗体保有状況
……藪内　清，矢野　一好，柴田タツ美，林　志直，岩崎　謙二…… 30

塩素添加によるプール水中のポリオウイルスおよびアデノウイルス不活化実験
……藪内　清，矢野　一好，柴田タツ美，林　志直，
土屋　悦輝，岡本　寛，工藤　泰雄，岩崎　謙二…… 35

都内飼育ブタにおけるインフルエンザウイルスＨＩ抗体保有調査（1978年６月～79年３月）
……伊藤　忠彦，山崎　清，岩崎　謙二，坂井冨士子…… 40

1963～78年の都内飼育ブタ間における日脳ウイルス感染の血清疫学
……岩崎　謙二，吉田　靖子，関根　整治…… 43

1978年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…… 47

回帰分析法を応用した東京都民のムンプスＨＩ抗体保有内容の解析
……岩崎　謙二，吉田　靖子，関根　整治…… 52

東京多摩地区で発生した水田皮膚炎（第１報）
府中市で発生した水田皮膚炎の疫学および免疫血清学的研究
……村田以和夫，大久保暢夫，笹野　英雄，山口　昌彦，
中尾　厚義，川中　正憲，斎藤　玲子，鈴木　了司…… 56

プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー分屑と梅毒血清反応
……武士俣邦雄，堀　幹郎，大久保暢夫…… 65

ネガティブ染色による細菌諸器官の観察法……前木　吾市…… 69

小中学生の尿中 γ-GTP 活性値に関する検討
……武士俣邦雄，霜田さと子…… 75

小学生および高校生の尿中馬尿酸について
……武士俣邦雄，霜田さと子…… 79

報文 II　医薬品等の安全性に関する調査研究

市販医療用医薬品の品質について（第7報）　塩酸ヒドララジン
……上原　真一，宮武ノリエ，岡本　朋子，重岡　捨身，下平　彰男，田窪　栄一…… 85

有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究（第4報）　繊維製品中の有機スズの定量
……奥本千代美，長嶋真知子，吉原　武俊，下平　彰男…… 89

生薬の品質評価に関する研究（第5報）　甘草およびそれを含有する漢方処方製剤の品質
……安田　一郎，瀬戸　隆子，奥沢　昌子，下平　彰男，田窪　栄一…… 93

熱エネルギー分析器を用いる化粧品中のN-ニトロソジエタノールアミンの高速液体クロマトグラフィー
……竹内　正博，水石　和子，原田　裕文…… 98

市販磁気治療器の磁束密度について
……西田　茂一，森　謙一郎，原田　裕文……103

化粧品用色素に関する衛生化学的研究（第1報）　赤色219号中の 1-phenylazo-2-naphthol の含有量
……伊藤　弘一，江波戸舉秀，原田　裕文……106

報文 III　食品等の安全性に関する調査研究

黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン（A-E）産生に及ぼす蔗糖の影響
……五十嵐英夫，新垣　正夫，高橋　正樹，潮田　弘，寺山　武，坂井　千三……111

牛乳および母乳中の残留農薬濃度の年別推移（1971～1978）
……山岸　達典，宮崎　奉之，堀井　昭三，金子　誠二……117

1, 3, 5-Trichloro-2-(4-Nitrophenoxy)Benzene（CNP）の東京湾産アサリ，底質，海水中での残留濃度の推移
……山岸　達典，秋山　和幸，金子　誠二，堀井　昭三，宮崎　奉之，森田　昌敏……123

1, 3, 5-Trichloro-2-(4-Nitrophenoxy)Benzene（CNP）による東京湾産魚貝類の汚染
……山岸　達典，秋山　和幸，金子　誠二，堀井　昭三，宮崎　奉之，森田　昌敏……127

東京都における PCB 汚染の実態について（第7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……133

東京都における水銀汚染の実態について（第6報）　魚介類中の水銀含有量調査
……雨宮　敬，竹内正博，原田　裕文……137

食品中の石油系炭化水素に関する研究（第4報）
東京湾産あさりの石油汚染実態調査ならびに飼育実験による汚染物質の取り込みについて
……井部　明広，西島　基弘，牛山　博文，安田　和男，
斉藤　和夫，上村　尚，永山　敏廣，直井家壽太……140

N-ニトロソ化合物に関する衛生学的研究（第3報）
加工食品およびアルコール飲料中の揮発性N-ニトロソ化合物の含有量
……真木　俊夫，田村　行弘，嶋村　保洋，小関　正道，西垣　進，直井家壽太……145

カラメルの品質について　カラメル中の4-メチルイミダゾールの定量法
……広門　雅子，宇佐美博幸，中嶋　巌，溝入　茂，遠藤　英美……149

天然甘味料の実態調査（第1報）
市販天然甘味料製剤中のグリチルリチン酸およびステビオサイドの定量
……中嶋　巌，広門　雅子，宇佐美博幸，溝入　茂，遠藤　英美……153

石綿のろ過助剤としての安全性
……荻野　周三，安野　哲子，小野　綾子，大畠　敏子，遠藤　英美……157

AS，ABS 樹脂製器具および容器におけるアクリロニトリルモノマーの残留実態調査
……吉田　令子，渡辺　悠二，佐藤　憲一，遠藤　英美……163

市販ハンバーグの品質の統計的解析
……深野　駿一，西田　甲子，牛尾　房雄，道口　正雄……167

高速液体クロマトグラフィーによるマーガリン中のビタミンAの定量
……井口　正雄，友松　俊夫，道口　正雄……173

食事ならびに食品中のカリウム含量におよぼす浸漬，煮沸処理の効果
……西田　甲子，道口　正雄……178

報文 IV　生活環境保全に関する調査研究

NO_2 の生体影響における生化学的諸指標の検討
……鈴木　孝人，大沢　誠喜，狩野　文雄，福田　雅夫，笠原　利英，寺田　伸枝，溝口　勲……183

NO_2 暴露によるラットの Reticulocyte 出現率の変動
……福田　雅夫，狩野　文雄，寺田　伸枝，溝口　勲……189

ラット尿中ハイドロキシプロリン排泄に及ぼす NO_2 曝露の影響
……笠原　利英，大沢　誠喜，鈴木　孝人，溝口　勲……195

窒素酸化物の *in vitro* 暴露によるリンパ球内 Cyclic Nucleotides 量の変動
……狩野　文雄，福田　雅夫，溝口　勲，丁　宗鉄，梁　哲宗，英　清道……199

大気汚染物質の雨によるウォッシュアウト効率と溶解度との関係
……多田　宇宏，太田　与洋，溝口　勲……206

t-ブチルパーオキシナイトレートの汚染大気中の挙動
……太田　与洋，ジャック・ジー・カルヴァート……210

母親と新生児における水銀の蓄積と相互関係（第2報）　母親静脈血と臍帯動静脈血の血球及び血漿
……二島太一郎，池田　真悟，長嶋　親治，藤谷　和正，
溝口　勲，野牛　弘，森本　敬三，香山　英一……214

週令によるラットのメチル水銀毒性に対する感受性の差（第1報）
……関　比呂伸，蓑輪　佳子，鈴木　昇，大井　玄……220

水中の 1,3,5-トリクロル-2-(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン（CNP）と 1,3-ジクロル-2-(4-ニトロフェノキシベンゼン（NIP）
……高橋　保雄，森田　昌敏，土屋　悦輝……224

下水道未整備地域における水質汚濁について（第3報）　秋川の水質とその汚濁状況
……中村　弘，押田　裕子，栃本　博，菊地　洋子，池島　伸至，友成　正臣…227

多摩地区浅層地下水の動向（第4報）　小平市における定点調査
……矢口久美子，大橋　則雄，藤沢　正吉，友成　正臣……238

東京及び東京近辺の湖沼，池，濠において採集された *Microcystis aeruginosa* の毒性
……渡辺真利代，大石　真之，松本　浩一……243

皇居内濠群の水質（第2報）　植物プランクトン量と懸濁態有機炭素量の変動
……渡辺真利代，松本　浩一……246

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第10報）
善福寺川に生息する2種のユスリカ幼虫の低濃度溶存酸素に対する耐性
……大野　正彦，松本　浩一，藤野　尚……250

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第11報）
善福寺川に生息するセスジユスリカの年間の世代数の算定
……大野　正彦，松本　浩一……256

キャピラリーカラムによる PCDF の分析
……中川　順一，森田　昌敏，樋口　育子……260

他　誌　発　表

感染症等に関する調査研究……265
医薬品等の安全性に関する調査研究……270
食品等の安全性に関する調査研究……270
生活環境保全に関する調査研究……272

学　会　発　表……275

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

An Outbreak of Acute Enteritis Due to *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* Occurred at a Nursery School in Tokyo
.....T. Itoh, K. Saito, Y. Yanagawa, M. Inaba, A. Kai, T. Maruyama, S. Sakai, M. Ohashi, A. Oka, M. Enjoji, T. Hishinuma and M. Chigusa..... 1

Ecological Surveys of *Clostridium botulium* Demonstration of *Clostridium botulinum* from Sludges, Fish and Shellfish and Bullfrog in a Fish Market in Tokyo
..... K. Saito, T. Itoh, M. Inaba and S. Sakai..... 7

Attempt for Purification of Staphylocoagulase by Affinity Chromatography
.....H. Igarashi, H. Ushioda, M. Takahashi, M. Shingaki, M. Inaba, T. Terayama and S. Sakai..... 12

Evaluation of Modified Cary-Blair Transport Medium for Detection of Enteropathogenic Bacteria
..... A. Kai, T. Itoh, S. Sakai and H. Jutajand..... 17

Isolation of Enterovirus from Sewage Treatment Plants and Children Suffering from Acute Respiratory Diseases in Tokyo in 1978
.....K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, Y. Hayashi, K. Iwasaki, J. Urano, H. Kohno and T. Watanabe..... 24

Incidence of Neutralizing Antibodies against Polioviruses among Healthy Inhabitants in Tokyo in Recent Years
..... K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, Y. Hayashi and K. Iwasaki..... 30

Effect of Chlorination on the Inactivation of Polio and Adeno Viruses Experimentally Added into Swimming Pool Water
.....K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, Y. Hayashi, Y. Tsuchiya, Y. Okamoto, Y. Kudoh and K. Iwasaki..... 35

Incidence of HI Antibodies against Influenza Viruses in Swine Raised in Tokyo (1978—1979)
..... T. Ito, K. Yamazaki, K. Iwasaki and F. Sakai..... 40

Seroepidemiology of Japanese Encephalitis Virus Infections among Swine in Tokyo, 1963—1978
..... K. Iwasaki, Y. Yoshida and S. Sekine..... 43

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1978
..... Y. Yoshida, K. Yabuuchi, S. Sekine, K. Iwasaki, T. Miyake and H. Miki..... 47

Regression Analysis on the Incidence of HI Antibody against Mumpsvirus in Healthy People in Tokyo
..... K. Iwasaki, Y. Yoshida and S. Sekine..... 52

Paddy Field Dermatitis in Tokyo (I) Epidemiological and Serological Studies on Paddy Field Dermatitis in Fuchu City, 1978
.....I. Murata, N. Ohkubo, H. Sasano, M. Yamaguchi, A. Nakao, M. Kawanaka, R. Saitoh and N. Suzuki..... 56

Sero-reaction for Syphilis on the Protein-A Adsorbed Fraction of Human Sera
..... K. Bushimata, M. Hori and N. Ohkubo..... 65

Morphological Observation of Bacterial Cells by Simplified Negative Staining Procedure for Electron Microscopy
..... G. Maeki..... 69

γ-Glutamyltranspeptidase Activity in Urine of the School Age Children
..... K. Bushimata and S. Shimoda..... 75

Statistical Analyses on the Urinary Hippuric Acid of School Children and High School Students in Metropolitan Area
..... K. Bushimata and S. Shimoda..... 79

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Quality Check of Drugs (VII) Hydralazine Hydrochloride
..... S. Uehara, N. Miyatake, T. Okamoto, S. Shigeoka, A. Shimohira and E. Takubo..... 85

Studies on Examination Method of Household-Necessities Containing Poisonous Chemical Substances (IV) Determination of Organotin Compound in Textile Products
..... C. Okumoto, M. Nagashima, T. Yoshihara and A. Shimohira..... 89

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (V) Quality of Licorice Root and Its Oriental Medicinal Preparations
..... I. Yasuda, T. Seto, A. Okusawa, A. Shimohira and E. Takubo..... 93

Determination of N-Nitrosodiethanolamine in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography using Thermal Energy Analyzer
..... M. Takeuchi, K. Mizuishi and H. Harada..... 98

Magnetic Flux Densities of Marketing Magnetic Medical Appliances
..... S. Nishida, K. Mori and H. Harada.....103

Hygienic Chemical Studies on Pigment for Cosmetics (I) Amount of 1-phenylazo-2-naphthol in D&C Red No. 31
..... K. Ito, K. Ebato and H. Harada.....106

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Effect of Sucrose on the Growth of *Staphylococcus aureus* and on the Production of Their Enterotoxin A–E
..... H. Igarashi, M. Shingaki, M. Takahashi, H. Ushioda, T. Terayama and S. Sakai.....111

Yearly Shift of Residual Amounts of Organochlorine Pesticides in Cow's Milk and Mother's Milk in Tokyo (1971—1978)
..... T. Yamagishi, T. Miyazaki, S. Horii and S. Kaneko.....117

Residual Levels of 1, 3, 5-Trichloro-2-(4-Nitrophenoxy)Benzene (CNP) in Short-necked Clam, Sand and Sea Water at Tokyo Bay
..... T. Yamagishi, K. Akiyama, S. Kaneko, S. Horii, T. Miyazaki and M. Morita.....123

Contamination of Fish and Shellfish in Tokyo Bay by 1, 3, 5-Trichloro-2-(4-Nitrophenoxy)Benzene (CNP)
..... T. Yamagishi, K. Akiyama, S. Kaneko, S. Horii, T. Miyazaki and M. Morita.....127

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (VII) Polychlorinated Biphenyl Content of Foods
..... K. Yamazaki, H. Yamanobe, S. Suzuki and H. Harada.....133

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (VI) Mercury Content of Fish and Shellfish
..... T. Amemiya, M. Takeuchi and H. Harada.....137

Studies on Hydrocarbons from Petroleum in Foods (IV) Contents of Hydrocarbons in Short-Necked Clam in Tokyo Bay and Transfer to Short-Necked Clam of Hydrocarbons
.....A. Ibe, M. Nishijima, H. Ushiyama, K. Yasuda, K. Saito, H. Kamimura, T. Nagayama and Y. Naoi.....140

Hygienic Studies on N-Nitroso Compounds (III) Survey of Processed Foods and Alcoholic Beverage for Volatile N-Nitroso Compounds
..... T. Maki, Y. Tamura, Y. Shimamura, M. Koseki, S. Nishigaki and Y. Naoi.....145

Quality of Caramel Color Determination of 4-Methylimidazole in Caramel Color
..... M. Hirokado, H. Usami, I. Nakajima, S. Mizoiri and F. Endo.....149

Survey of Natural Sweeteners (I) Determination of Glycyrrhizic Acid and Stevioside in Commercial Natural Sweetener Products
..... I. Nakajima, M. Hirokado, H. Usami, S. Mizoiri and F. Endo.....153

Sanitary Quality of Asbestos Used for the Filter Aid of Impurities in Beers or Food Additives
..... S. Ogino, T. Yasuno, A. Ono, T. Ohata and F. Endo.....157

Survey of Residual Acrylonitrile Monomer in AS and ABS Resin Food Containers
..... R. Yoshida, Y. Watanabe, K. Sato and F. Endo.....163

Statistical Analysis on Quality of Commercial Hamburg Steak
..... S. Fukano, K. Nishida, F. Ushio and M. Doguchi.....167

Quantitative Analysis of Vitamin A in Margarine by High Performance Liquid Chromatography
..... M. Iguchi, T. Tomomatsu and M. Doguchi.....173

Effect of Boiling and Steeping on the Concentration of Potassium in the Diets for Patients and in Various Commercial Foods
..... K. Nishida and M. Doguchi.....178

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Studies on Biochemical Indices in Blood for NO_2 Toxicity
..... T. Suzuki, M. Ohsawa, F. Kanoh, M. Fukuda, N. Terada and I. Mizoguchi.....183

Changes of Reticulocytes on Rats Exposed to NO_2
..... M. Fukuda, F. Kanoh, N. Terada and I. Mizoguchi.....189

The Effect of NO_2 Exposure on Urinary Excretion of Hydroxyproline in Rats
..... T. Kasahara, M. Ohsawa, T. Suzuki and I. Mizoguchi.....195

Intracellular Cyclic Nucleotides Contents Changes in Lymphocytes Exposed to Nitrogen Oxides *in vitro*
..... F. Kanoh, M. Fukuda, I. Mizoguchi, J. Cyong, C. Yang and K. Hanabusa.....199

The Relation between Washout Efficiency and Solubility of Air Pollutants to Water
..... T. Tada, T. Ohta and I. Mizoguchi.....206

The Fate of *t*-Butyl Peroxy Nitrate in NOx-Hydrocarbon Polluted Atmosphere
..... T. Ohta and J. G. Calvert.....210

Mercury Content Levels in Mother and Newborn and Their Interaction (II) Cell and Plasma of Maternal and Umbilical Cord Blood
.....T. Nishima, S. Ikeda, C. Nagashima, K. Fujitani, I. Mizoguchi, H. Yagyu, K. Morimoto and E. Kayama.....214

Age Factor in the Development of Methylmercury Poisoning in Rats (I)
..... H. Seki, K. Minowa, N. Suzuki and G. Ohi.....220

Residues of 1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy)benzene (CNP) and 1, 3-Dichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (NIP) in Water
..... Y. Takahashi, M. Morita and Y. Tsuchiya.....224

Studies of Water Pollution in the Area without Sewer Systems (III) Water Qualities and Pollution Loadings in the Akikawa River, Tokyo
.....H. Nakamura, H. Oshida, H. Tochimoto, Y. Kikuchi, N. Ikejima and M. Tomonari..... 227

Qualitative Evaluation on Well Waters Collected in Tama District of Tokyo (IV) Monitor Research in Kodaira City
.....K. Yaguchi, N. Ohashi, M. Fujisawa and M. Tomonari..... 238

Toxicity of *Microcystis aeruginosa* Collected from Lakes, Ponds and Moats in Tokyo and its Vicinity
.....M. F. Watanabe, S. Oishi and K. Matsumoto..... 243

Water Qualities of Inner Moats around the Imperial Palace (II) Variations of the Amounts of Phytoplankton and Particulate Organic Carbon
.....M. F. Watanabe and K. Matsumoto..... 246

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (X) Studies on the Tolerances of Two Species of Chironomids Larvae to Low Dissolved Oxygen
.....M. Ohno, K. Matsumoto and T. Fujino..... 250

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (XI) Number of Generations per Year of *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae) in the River Zempukuji
.....M. Ohno and K. Matsumoto..... 256

Analysis of Polychlorinated Dibenzofurans by Gas Chromatography using Glass Capillary Columns
.....J. Nakagawa, M. Morita and Y. Higuchi..... 260

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

I Papers Concerning on Infectious Diseases and Others 265
II Papers Concerning on Pharmaceutical Hygiene 270
III Papers Concerning on Food Hygiene..... 270
IV Papers Concerning on Environmental Hygiene..... 272

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS..... 275

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.*, 30-1, 1-6, 1979

東京都内の保育園で発生した *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* による集団下痢症

伊藤 武*, 斎藤香彦*, 柳川義勢*, 稲葉美佐子*
甲斐明美*, 丸山 務*, 坂井千三*, 大橋 誠*
岡 愛子**, 円城寺政子**, 菱沼 勉**, 千種操子**

An Outbreak of Acute Enteritis Due to *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* Occurred at a Nursery School in Tokyo

TAKESHI ITOH*, KAHIKO SAITO*, YOSHITOKI YANAGAWA*, MISAKO INABA*, AKEMI KAI*, TSUTOMU MARUYAMA*, SENZO SAKAI*, MAKOTO OHASHI*, AIKO OKA**, MASAKO ENJOJI**, TSUTOMU HISHINUMA** and MISAKO CHIGUSA**

An outbreak of acute enteritis due to *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* involving a total of 35 out of 74 children occurred at a nursery school in Tokyo on January 14, 1979 for a duration of 7 days. This was the first report of a community outbreak of infection with this organism in Japan.

The major symptoms observed in the patients consisted of diarrhoea (87.9%), abdominal pain (39.4%), fever (81.8%) and vomiting (6.1%). Detection rate of the organism from patients was 39.4%, although we failed to identify the incriminating food.

Sera of 4 patients showed elevated agglutinin titers against organisms ranging from 1:80 to 1:320.

Keywords: *Campylobacter*, outbreak, enteritis

緒 言

従来，ウシやヒツジなど家畜の流産や胎盤炎などの原因菌として知られていた *vibrio fetus* は，微好気性の非発酵性菌であることや，GC含量が他の *vibrio* 属とかなり異なっていること[1]などから，現在では *Spirillaceae* 科の中に新設された *Campylobacter* 属に分類されている[2]．

本菌は家畜のみならずヒトにも感染症を起こし，流産[3]，敗血症[4]，関節炎[5]，髄膜炎[6]などの原因となることが知られている．

最近，本菌属の *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* がヨーロッパ諸国[7,8]，アメリカ[9]，オーストラリア[10]などで，ヒトの下痢症患者よりしばしば検出され，ヒトの腸炎起因菌として注目されてきた．

著者らはこれまでに，東京都内に発生する集団下痢症の原因菌究明にあたり，腸炎ビブリオ，サルモネラなど既知の腸管系病原菌が検出されない，いわゆる不明下痢症の詳細な細菌学的検討を行なってきたが，それらの一部は，病原大腸菌の血清型に属さない大腸菌，*Bacillus cereus*，あるいは *Yersinia enterocolitica* によるものであることを明らかにしてきた[11]．1979年1月東京都東久留米市内の1保育園で発生した集団下痢症は，患者ふん便から *C. fetus* subsp. *jejuni* を高率に分離し，また患者血清中に分離菌に対する抗体が認められたことから，本菌による感染症であると結論した．*C. fetus* subsp. *jejuni* による集団下痢症例はわが国では最初のものと思われるので本事例の発生状況と細菌学的成績の詳細を報告する．

被検材料および方法

1. 被検材料

発病初期の発症園児ふん便33件，職員ふん便7件，および下痢症状のあった園児家族のふん便1件の合計41件，また，事件発生後約1ヶ月経過してから，再度，園児ふん便72件，職員ふん便19件，園児家族ふん便29件，職員家族ふん便18件を採取し，病原菌検索を行なった．

血中抗体を検討する目的で，患者4名について発病初期と回復期（発病22日後）の血清と，また，感染後の抗体消長を調査するために，発病1ヶ月後と2ヶ月後に，

* 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
**東京都東久留米保健所

Table 1. Campylobacter Enteritis Attack Rates among Children and Staff Member of a Nursery School and Distribution of Date of Onset of the Illness

Subjects	Number of persons at risk	Number of patients (attack rate, %)	Date of onset (January, 1979) 14	15	16	17	18	19	20
Children									
1-year-old	9	5 (55.6)	–	–	1	4	–	–	–
2-year-old	9	4 (44.4)	–	–	–	2	1	1	–
3-year-old	16	10 (62.5)	–	–	4	5	–	1	–
4-year-old	18	5 (27.8)	1	–	2	1	–	–	1
5-year-old	22	11 (50.0)	–	–	6	2	3	–	–
Staff members	19	1 (5.3)	–	–	1	–	–	–	–
Total	93	36 (38.7)	1	–	14	14	4	2	1

延べ108件の血清を採取した.

2. *Campylobacter* の検索方法

Campylobacter 属の分離には, ふん便を1,000 rpm 10分間遠心後, その上清を Pore size 0.65μm のメンブランフィルターで沪過し[7], 沪液を血液寒天平板に直接塗沫した. 培養は嫌気培養瓶を用い, 酸素5%, 炭酸ガス10%, 窒素85%の混合ガスで置換し, 37℃ 3日間行なった.

一部の材料では, 上述のメンブランフィルターによる沪過を行なわずに, Vancomycin(10μg/ml), Polymyxin B (2.5IU/ml), Trimethoprim (5μg/ml) を加えた血液寒天平板に直接塗沫する方法[12]を行なった.

3. *Campylobacter* の同定

血液寒天平板上の疑わしい集落について, グラム染色, ベン毛染色, 鏡検による運動性の確認などを行なった. また King[13] や Dekeyser ら[14] の記載に従って, 0.15%寒天加 Albimi Brucella Broth (Pfizer) を基礎培地として, 各種生化学的性状を調べた.

4. 血中抗体価測定法

C. fetus subsp. *jejuni* に対する血中抗体価の測定用抗原は, 患者からの分離株 CF-1 株を用い, 以下の様な方法により調整した2種のものを用いた. すなわち, 血液寒天平板を用い37℃ 3日間培養した菌体を集め, 一方は生理食塩液に浮遊させ 100℃ 2時間の加熱処理を行ない (加熱処理抗原), 他の一方は0.3%ホルマリン加生理食塩液に浮遊させた (ホルマリン処理抗原).

抗体価測定は小試験管を用い, 2倍希釈系列の定量的試験管内凝集反応で行ない, 50℃18時間反応後肉眼的に明瞭な凝集が認められた最終希釈倍数を抗体価として判定した.

成　績

1. 発生状況

1979年1月14日から20日の間に東京都東久留米市内の1保育園で, 園児74名中35名が下痢や発熱を訴えた. 初発は14日で, 16日と17日の両日に患者発生のピークが認められた (Table 1). 園児以外にも職員1名が16日に軽度の下痢を呈した. また園児の家族1名が17日に下痢症状を呈し受診した.

本集団発生には単一ピークがみられ給食などによる単一暴露が推察されたが, 感染源については明らかにできなかった.

患者の主症状は Table 2 に示したように, 下痢(87.9%), 発熱 (81.8%), 腹痛 (39.4%) であった. 下痢はほとんどが水様便であったが, 数名に粘血便が認められた. 発熱のあった27名中7名に 39℃ 以上の高熱がみら

Table 2. Major Symptoms of the Patients (Number of Patient studied : 33)

Symptoms	Number of patient	%
Diarrhoea	29	87.9
3 times or less per day	17	
4–6 times	8	
7 times or more	2	
Unknown	2	
Fever	27	81.8
37.0–37.9C	11	
38.0–38.9	9	
39.0 or higher	7	
Abdominal pain	13	39.4
Vomiting	2	6.1

Table 3. Results of Bacteriological Examination of the Fecal Specimens

Date of examination	Subject	Number of person tested	Number of positive for *Campylobacter* (%)
January 19th and 20th	Children with illness	33	13 (39.4)
	Family member with illness	1	1 (100.0)
	Staff members	7	2 (28.6)
February 16th and 17th	Children	72	3 (4.2)
	Staff members	19	−
	Family members of children	29	−
	Family members of staffs	18	−

れ，38℃から38.9℃までが9名，のこり11名は38℃以下であった．

2. ふん便からの *Campylobacter* の検出

発症者を中心とした41件のふん便を対象に病原菌の検索を行なった．その結果，赤痢菌やチフス菌をはじめとして，その他本集団例と関連づけられるような既知病原菌は検出されなかった．しかし，微好気的条件で培養した血液寒天平板上に，やや褐色をおびた偏平正円形の集落が純培養状に出現しているのを認めた．そこでこの集落について，形態学的ならびに生化学的諸性状を試験した結果，後述するように *C. fetus* subsp. *jejuni* と同定された．すなわち，Table 3 に示すごとく発症園児ふん便33件中13件 (39.4%)，職員ふん便7件中2件(28.6%) から，また下痢症状のあった園児家族のふん便1件からも本菌が検出された．

約1ヶ月後に行なった合計138名についての再検査では，職員やその家族また園児家族からは検出されず，園児3名のふん便から *C. fetus* subsp. *jejuni* が検出された．この陽性者3名についてはさらに10日後ふん便検査を行なったがいずれも陰性であった．

3. 分離菌株の性状

今回の集団発生例から微好気的条件で分離した合計19菌株は，いずれもグラム陰性の彎曲した杆菌で(Photo 1) ベン毛染色により一端あるいは両端に1本のベン毛が観察された．鏡検した運動性状はらせん状のいわゆるコックスクリュー状の運動を示した．生化学的諸性状は，好気的に発育せず，カタラーゼおよびオキシダーゼ陽性，ブドウ糖，乳糖，白糖を分解しないことから，Campylobacter 属に一致し，42℃や1% Glycine 存在下で発育することにより，Bergey's Manual 第8版による *C. fetus* subsp. *jejuni* と同定された．

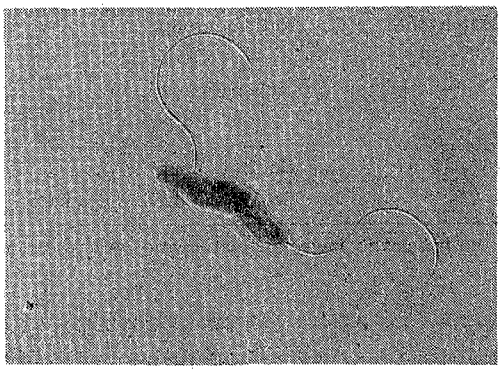


Photo 1. *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*

4. 患者血清中の分離菌に対する抗体価

Table 4. Serum Agglutinin Titer of Patients Against *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, Strain CF-1

Patient No.	Major symptoms	Detection of *Campylobacter* from feces	Agglutinin titer in serum drawn at	
			acute stage	convalescent stage
1	Diarrhoea	−	20	80
2	Diarrhoea, fever and abdominal pain	+	20	320
3	Diarrhoea and fever	+	40	320
4	Diarrhoea, fever and abdominal pain	+	40	160

Table 5. Levels of Serum Agglutinin Titer in Patients and Healthy Persons One and Two Months after the Outbreak

Date of examination	Subjects	Number of persons tested	Serum agglutinin titers						
			<20	20	40	80	160	320	640
February 15th	Patient group								
	Children	24	–	2	6	6	8	1	1
	Family member	1	–	–	–	1	–	–	–
	Staff member	1	–	–	1	–	–	–	–
	Non-patient group								
	Children	30	3	4	12	9	2	–	–
	Staff members	15	3	1	7	2	2	–	–
March 15th	Patient group								
	Children	18	1	2	8	5	1	1	–
	Non-patient group								
	Children	19	6	5	7	1	–	–	–
.....	Control group*								
	School children and adults	22	14	6	2	–	–	–	–

*Those who have no relationship with the nursery school.

急性期（1～2病日）と回復期（発病後22日）の2回採血が可能であった患者4名の血中抗体価の測定結果はTable 4 に示した．すなわち，急性期で20～40倍の抗体価を示したものが，回復期で80～320倍と抗体価の著しい上昇が認められた．なお用いた2種の抗原のうち加熱処理抗原の方が高い値を示したのでその値を示した．また以後は，加熱処理抗原のみを抗体価測定用抗原として用いた．

事件発生1ヶ月後と2ヶ月後にそれぞれ採取した延べ108名の血中抗体価は Table 5 にまとめた．

1ヶ月後の患者血清26例中17例（65.4%）が80倍以上の抗体価を示した．非発病の園児や職員においても80倍以上を示すものが15例認められた．

2ヶ月後の血清では，患者18名中7名が80倍以上を示し，うち1名は320倍の抗体価であった．また非発病者では1名に80倍の抗体価が認められた．

なお対照として，本集団例とはまったく関連のない学童10名，および健康成人12名の血清について，今回の分離菌に対する抗体価を測定したが，いずれも40倍以下であった．

考　察

C. fetus subsp. *jejuni* のヒトに対する起病性を詳細に論じたのは King[4,13] が最初である．その中で本菌の特徴として，42℃では発育するが25℃では発育しないことを認め，この性状は従来の *vibrio fetus* とは異なることから "Related *vibrio*" と称し，また抗原的にも家畜由来の *vibrio fetus* とは異なることを指摘した．

その後，ヒトの血液培養からはしばしば本菌が検出されていたが，下痢症の原因菌としてふん便から本菌を証明したのは，Dekeyser ら[14]が最初である．以後，Butzler ら[7] は900例の散発下痢症患者中45例（5.0%）より，また，Skirrow[8] は803例の散発下痢症患者のうち57例（7.1%）から，Steele ら[10] は224例の散発下痢症患者より13例（5.3%）からそれぞれ *C. fetus* subsp. *jejuni* を検出しており，本菌がヒトの下痢症の原因菌となりうることが確認された．

わが国においては，吉崎ら[15]が散発下痢症患者1名より本菌を証明しているが，今回の集団発生はわが国では最初の集団発生例である．

本事例が発生した保育園では集団給食を実施しており，発生に単一ピークがみられることから，給食を介して集団発生になったものと推察される．しかしながら，その原因食品については検査対象となるものが入手不能であったことから細菌学的検討を加えることができなかった．また疫学的な調査の面からも，保育園における特別な行事など特異事例もなく明らかにすることはできなかった．一方，Fig. 1 に示すごとく患者発生の地理的分布は，当然のことながら保育園を中心として分布しているが，水系感染などを疑わせるような片寄りはみられず，また同時期に周辺の小学校や中学校などにおいて下

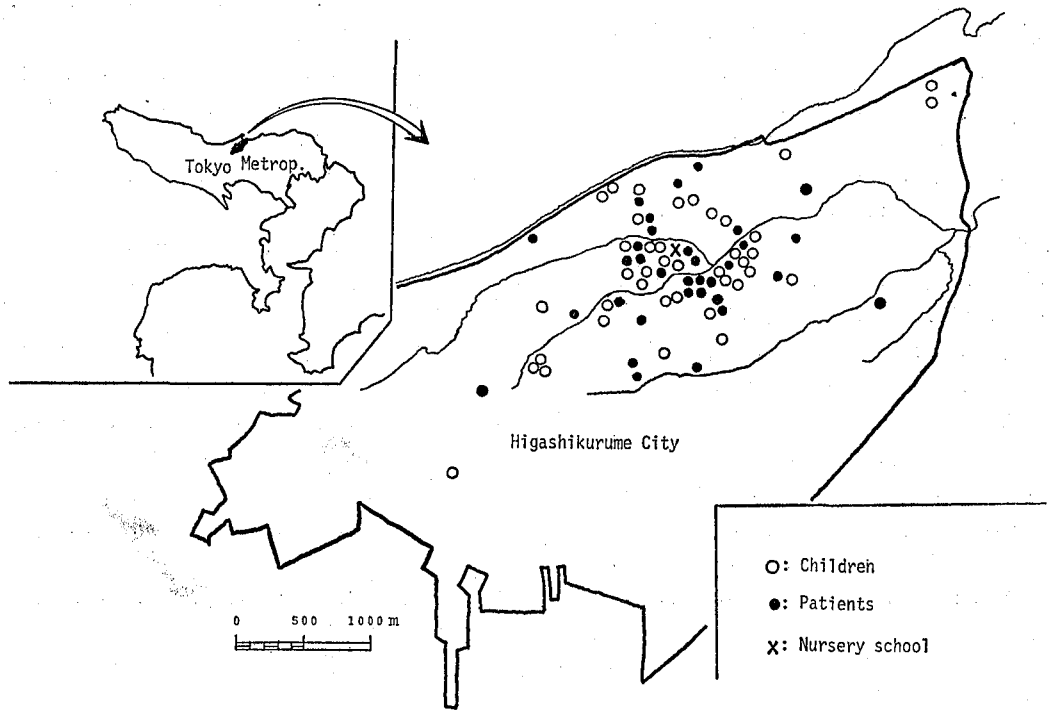


Fig. 1. Geographical Distribution of Patients

痢症等による集団欠席事例も認められなかった.

Skirrow[8] は患者と同居している家族から本菌を検出しており，ときには接触感染をも起こることを示唆する報告を行なっている．本集団事例でも患者家族のうち，下痢症状のあった1名から *C. fetus* subsp. *jejuni* が検出された.

患者血清を中心として行なった血清学的検索成績は，回復期の患者血清において分離菌に対する特異抗体の上昇を認めた．対照として行なった健康者の血清ではほとんど抗体保有はみられず，一部に20倍から40倍の抗体価を示すものが認められたのみであった．したがって少なくとも80倍以上の抗体価を示す例は本菌による感染があったものと推定できよう．臨床的に症状を示さなかった園児や職員でも抗体価の上昇を認めた例もあり，これらは不顕性感染者と推定された.

患者の血中抗体価は約1ヶ月後においても高い価を示すことが認められ，本菌感染症の診断に血中抗体の証明という血清学的診断法が応用できるものと思われる.

Campylobacter による集団発生例は，1978年5月アメリカにおいて水系感染により約2,000名にもおよぶ患者発生のあったことが報告[9] されている．また牛乳を原因食品とする集団下痢症例も報告[10]されており，今後も集団発生することは予想される．また DeMol の報告[17]では，子供の下痢症の細菌学的検査の結果，*Campylobacter* がサルモネラについで多数検出されており，本菌は下痢症の原因菌として重要な病原菌であると指摘している.

Smibert[18,19] はニワトリや七面鳥，その他の鳥類およびヒツジから *C. fetus* subsp. *jejuni* と同一性状菌を多数検出しており，本菌の汚染源としてこれらの動物が考えられるが，我が国においては本菌の生態学的調査はほとんど進められておらず今後の課題である.

結　論

1979年1月に東京都内の保育園において，園児74名中35名が下痢や発熱を訴える集団事例が発生し，発症者を中心としたふん便の細菌学的検索の結果，園児ふん便33件中13件（39.4%），職員ふん便7件中2件（28.6%）から *C. fetus* subsp. *jejuni* を検出した．また発症園児家族のうち下痢症状を訴えた1名からも本菌が検出された.

発症園児24名の分離菌に対する血中抗体価を測定した成績では，16名（66.7%）に80倍以上の特異抗体上昇がみられた．また非発症園児30名と職員15名の調査でも80倍以上の抗体価を示す例が15名もあり，本菌による不顕

性感染が示唆される成績を得た.

感染源としては保育園での給食が疑われたが，原因食品を明らかにすることはできなかった.

文　献

1) Sebald, M. and Vernon, M. : *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **105**, 897, 1963
2) Smibert, R. M. : *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 673, 1978
3) Vincent, R., Dumas, J., and Picard, N. : *Bull. Acad. Nat. Med.*, **131**, 90, 1947
4) King, E. O. : *J. Infec. Dis.*, **101**, 119, 1957
5) King, S. and Bromsky, D. : *J. A. M. A.*, **175**, 1045, 1961
6) Eden, A. N. : *J. Pediat.*, **61**, 33, 1962
7) Butzler, J. P., Dekeyser, P., Detrain, M., and Dehaen, F. : *J. Pediat.*, **82**, 493, 1973
8) Skirrow, M. B. : *Bri. Med. J.*, **2**, 9, 1977
9) C. D. C. : *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 27, 207, 1978
10) Steele, T. W. and McDermott, S. : *Med. J. Aust.*, **2**, 404, 1978
11) 伊藤　武，柳川義勢，丸山　務　他：第53回日本感染症学会総会，4月，1979，東京
12) *C. D. R.* 8, 1977
13) King, E. O. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **98**, 700, 1962
14) Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P., and Sternon, J. : *J. Infect. Dis.*, **125**, 390, 1972
15) 吉崎悦郎，神木照雄，坂崎利一，田村和満：第53回日本感染症学会総会，4月，1979，東京
16) Taylor, P. R., Wernstein, W. M., and Bryner, J. H. : *Am. J. Med.*, **66**, 779, 1979
17) DeMol, P. : *Lancet* **iii**, 604, 1978
18) Smibert, R. M. : *Am. J. Vet. Res.*, **26**, 320, 1965
19) Smibert, R. M. : *Am. J. Vet. Res.*, **30**, 1437, 1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 7-11, 1979

ボツリヌス菌の生態学的研究
東京都内の魚市場泥土および市場入荷魚介類における本菌の分布

斎藤香彦*, 伊藤　武*, 稲葉美佐子*, 坂井千三*

Ecological Surveys of *Clostridium botulinum*
Demonstration of *Clostridium botulinum* from Sludges, Fish and Shellfish and Bullfrog in a Fish Market in Tokyo

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

Keywords: ボツリヌス菌 *Clostridium botulinum*, ボツリヌス毒素 botulinum toxin, 分布 distribution, 魚介類 fish and shellfish, 食用カエル bullfrog, 泥土 sludge

緒　言

著者らは1973年9月東京都内の中川流域に生息しているカモなどの野鳥が多数斃死した事例について原因物質の究明を行ったところ，発症したカモや斃死野鳥からボツリヌスC型毒素およびC型菌を検出し，本事件がボツリヌスC型中毒であることを解明した[1]．

そこで本邦におけるボツリヌス菌の汚染状況を正確に把握し，ボツリヌス中毒予防の基礎資料を得る目的で中川流域の泥土および同河川で捕獲した淡水魚におけるボツリヌス菌の分布を調査した結果，同河川がC型菌により濃厚に汚染をうけていることが判明した[2]．

今回は限局された地域にかぎらず全国各地の魚介類が入荷される東京都内の魚市場について，入荷される魚介類のみでなく市場環境の材料なども対象に広範囲なボツリヌス菌の分布調査をおこなった．また，C型中毒の発生した中川の本菌による濃厚汚染の事実から推察して，関東一円の多くの河川も本菌により汚染されている可能性があり，それらの河川で捕獲された食用カエルも同市場に入荷されていたことから，これらの材料についてもあわせて検索を試みたのでその詳細について報告する．

材料および方法

1. 被検材料

1) 泥土　1975年9月採取の魚市場周辺の排水溝泥土24検体，1976年2月，前回とほぼ同一箇所から採取した泥土22検体の合計46検体について調査した．これらの試料はそれぞれ約200gに等量の生理食塩液を加えてかくはんし，約10分間静置した後，やや混濁した上清を8,000G20分間（4℃）遠心した．その沈渣を5m*l* の生理食塩液に再浮遊させたものを被検材料とした．

表1. 魚の種類と件数

魚種	件数	魚種	件数
カレイ	16	イカ	5
タイ	15	キス	4
カツオ	14	ホッケ	4
サバ	10	コイ	4
ムツ	10	サケ	4
メバル	7	メヌケ	4
カマス	7	マダラ	3
アジ	7	トビウオ	3
スズキ	7	アイナメ	3
スケトウダラ	6	コノシロ	3
イナダ	6	アンコウ	3
イワシ	6	その他	72
ハマチ	5		
		計	228

2) 魚介類　1976年5月～1977年3月にかけて魚市場に入荷された魚介類の腸管内容物228件を対象とした（表1）．なお，小魚介類の同一魚種の場合は腸管内容物が約50gの量になるように数匹のものをプールした．腸管内容物は滅菌ビニール袋に入れ，30℃7日間放置して腐敗させたのち，その2m*l* を被検材料とした．

3) 食用カエル　1976年7～8月に図1に示した地域で捕獲され，魚市場に入荷された210匹の食用カエル各々の腸管内容物に生理食塩液 2m*l* を加え，乳剤としたものを被検材料とした．

2. ボツリヌス菌の分離・同定

泥土からのボツリヌス菌検索方法は図2に示した．な

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

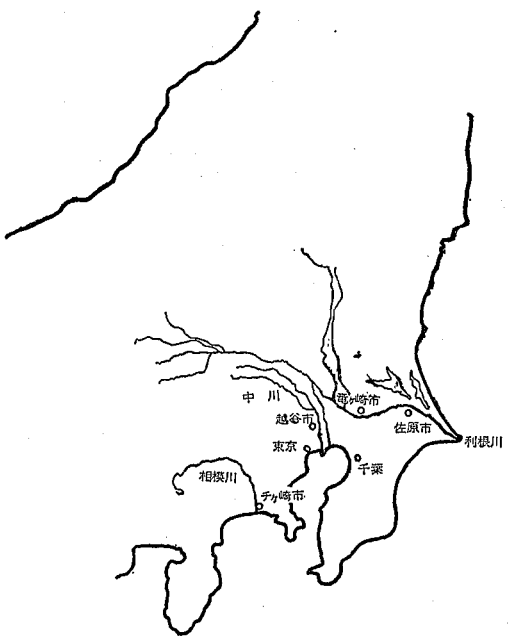


図 1. 食用カエルの捕獲場所

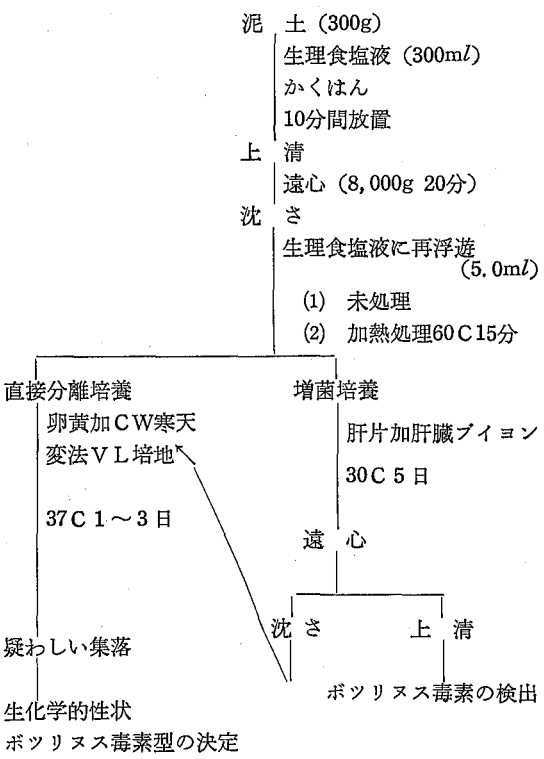


図 2. 泥土からのボツリヌス菌検索方法

お，魚介類および食用カエルからの本菌検索は泥土に準じて行った．

各被検材料は二分し，一方は加熱しない未処理のもの，他方は60℃15分間の加熱処理したものについて，それぞれ直接分離培養と増菌培養を行った．

直接分離用培地は CW 寒天基礎培地（日水製薬）に卵黄を10%に加えた卵黄寒天と変法 VL 培地（日水製薬）を用いた．前者の培地を用いた場合は嫌気性グローブボックス内で培養し，後者の培地を用いた場合は東[3]に従ってガス噴射法嫌気培養装置によって Roll-tube 培養を行った．

増菌培養は肝片加肝臓ブイヨンに検体を 0.5ml あて接種し30℃ 5 日間培養後，3,000rpm 10分間遠心し，上清は毒素の検出，沈渣は菌検索を行った．

分離菌株についての *Clostridium botulinum* の同定は Holdeman[4] および東[3] の記載に従い各種の生化学性状検査に基づいて行った．

3. ボツリヌス毒素の証明

前述の各被検材料の増菌培養については，図 2 に示すごとく菌の検出と並行して毒素の証明を行った．すなわち，30℃ 5 日間の培養液を，3,000rpm 10分間遠心し，上清をミリポアフィルター（孔径 0.45μm）でろ過滅菌し，本ろ液の 0.5ml を体重 15～20g のマウス 2 匹の腹腔内に接種し 5 日間観察した．マウスが発症あるいは死亡した場合は，マウスに接種したものと同じ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．

成　績

1. 魚市場排水溝泥土のボツリヌス菌の検出および毒素の証明

魚市場排水溝の泥土からのボツリヌス菌の検出および毒素の証明は表 2 に示したごとく，46件中 5 件からボツリヌス毒素が証明された．しかし，これらC型毒素が証明された検体も含めて全ての検体からボツリヌス菌の検出はできなかった．

表 2. 魚市場排水溝の泥土からのボツリヌス毒素の証明

採取年月	検査件数	培養上清のボツリヌス毒素(型)					
		A	B	C	D	E	F
1975年 9 月	24	—	—	3	—	—	—
1976年 2 月	22	—	—	2	—	—	—
計	46	—	—	5	—	—	—

表 3. 魚市場に入荷された魚介類からのボツリヌス毒素の証明および菌検出状況

検査年月	検査件数	ボツリヌス毒素 陽性数	型	ボツリヌス菌 陽性数	型
1976年5月	40	1	C	0	
7月	14	0		0	
9月	28	0		0	
10月	49	0		0	
11月	38	1	C	0	
1977年1月	23	0		0	
2月	22	0		0	
3月	14	1	E	1	E
計	228	3		1	

表 4. ボツリヌス毒素が証明された魚の種類と出荷先

魚種	検査年月	出荷先	ボツリヌス毒素型
アカガレイ	1976年5月	北海道 苫小牧郡	C
メゴチ	1976年11月	新潟県 新潟市	C
キス	1977年3月	新潟県 岩船郡	E

2. 魚介類

1976年5月～1977年3月にかけて魚市場に入荷した魚介類からのボツリヌス毒素の証明および菌検出状況を表3に示した.

被検材料228件中3件からボツリヌス毒素が証明された. そのうち2件はC型, 1件はE型であった. ボツリヌス毒素が証明された検体の魚種, 出荷先, 毒素型は表4に示したとおりで, C型は北海道苫小牧郡から出荷されたアカガレイおよび新潟県新潟市から出荷されたメゴチであった. また, E型は新潟県岩船郡から出荷したキスから検出した.

C型毒素が証明された検体からはC型菌を分離することはできなかったが, E型毒素が証明されたキスの被検材料からはE型菌を分離することができた. 分離したボツリヌスE型菌（CB26株, CB27株）の生化学的性状は表5に示した.

3. 食用カエル

図1に示した4地点で捕獲し魚市場に搬入された210件(210匹) の食用カエルからのボツリヌス毒素およびボツリヌス菌検出成績を表6に示した.

食用カエルの腸管内容物210件中39件（18.6%）からボツリヌス毒素が証明された. すなわち, 茨城県竜ケ崎近郊の利根川流域では78件中C型15件およびD型2件の計17件(21.8%), 千葉県佐原市近郊の利根川流域では40件中C型7件およびD型2件の計9件（22.5%), 埼玉県越谷市近郊の中川流域では82件中10件からC型(12.2%) が, また, 神奈川県相模川の茅ケ崎市近郊では10件中C型3件の毒素がそれぞれ証明された.

毒素が証明された合計39件の検体からはボツリヌス菌を検出することはできなかった.

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中村ら[5] や Kanzawa ら[6] が北海道全域にわたる調査を行い, 海岸の砂, 内陸の河川や湖沼の泥土から高率にE型菌を証明している. また, 青森県においても Yamamotoら[7,8] の本菌分布調査において湖沼の泥土や魚類からE型, F型菌を検出している. 児玉ら[9] は秋田県下の土壌から高率にE型菌を検出した. 関東地方における本菌の分布調査は小林[10]の報告によると, 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, 空地などの土壌中からはボツリヌス菌は検出されていな

表 5. キスから検出されたボツリヌスE型菌の生化学的性状

性状	CB 26	CB 27
好気培養	−	−
芽胞	ST	ST
運動性	+	+
レシチナーゼ	+	+
リパーゼ	+	+
硝酸塩	−	−
インドール	−	−
ゲラチン	+	+
牛乳	−	−
揮発性脂肪酸	B・A	B・A
ブドウ糖	+	+
マンニット	−	−
乳糖	−	−
白糖	+	+
マルトース	+	+
サリシン	−	−
グリセリン	+	+
キシロース	−	−
アラビノース	+	+
エスクリン	+	+

ST：偏在性　B：酪酸　A：酢酸

表 6. 魚市場に入荷された食用カエルからのボツリヌス毒素の証明

捕獲場所	検査件数	陽性数（%）	培養上清のボツリヌス毒素（型）					
			A	B	C	D	E	F
利根川（茨城県竜ケ崎市）	78	17 (21.8)	—	—	15	2	—	—
利根川（千葉県佐原市）	40	9 (22.5)	—	—	7	2	—	—
中川（埼玉県越谷市）	82	10 (12.2)	—	—	10	—	—	—
相模川（神奈川県茅ケ崎市）	10	3 (30.0)	—	—	3	—	—	—
計	210	39 (18.6)	—	—	35	4	—	—

い．また，山口県や九州地方での本菌分布調査の報告も少数例[11,12]はあるが，これまでの調査ではボツリヌスE型菌を中心に調査が行われ，北海道や東北地方に限られ濃厚にE型菌が分布するものと考えられていた．

著者らは1973年に発生したカモなど野鳥のC型ボツリヌス中毒を契機とし，1975年と1976年の2回にわけて中川河川底の泥土やそこに生息するフナなど淡水魚の本菌分布調査を行った．その結果，中毒発生のみられた地域のみならず，隣接する新中川の泥土や生息している淡水魚がC型ボツリヌス菌により濃厚に汚染されていることが明らかになった[2]．また，最近石川県の湖沼[13]や琵琶湖[14]からもC型菌やD型菌が証明されている．諸外国においても Ward ら[15]はメキシコ湾，Mortojudo ら[16]はインドネシア，Carroll ら[17]はヴェネズエラ，Smith ら[18]は英国，Tanasgarn[19]はタイでの泥土，海泥，魚介類などから，A型，E型菌と共にC型，D型菌も証明している．

今回の著者らの本菌分布調査においても，魚市場に搬入された食用カエルの腸管内容物から高率にボツリヌスC型毒素が証明された．食用カエルの捕獲場所は茨城，千葉県の利根川流域，埼玉県の中川流域，神奈川県の相模川流域のものであり，関東一円の河川の泥土はボツリヌスC型菌に濃厚に汚染を受けているものと考える．また，魚市場の排水溝泥土からはC型，新潟県および北海道から出荷された魚介類からもC型2例，E型1例を証明した．このような事実からして，わが国のボツリヌス菌の分布は特定な地域にのみ限局するものでなく，極めて広い地域にわたって分布しているものと考えるのが妥当であろう．

結　論

1973年に東京都内の中川流域で発生したカモなど野鳥のボツリヌスC型中毒事件を契機として本菌の汚染状況を正確に把握し，中毒予防の基礎資料を得る目的で，ボツリヌス菌の分布調査を行ってきた．今回は東京都内の魚市場の排水溝泥土，入荷した魚介類および食用カエルの汚染調査を実施した結果，次の結論を得た．

1) 魚市場排水溝泥土46件中5件からC型毒素が証明された．

2) 魚介類228件中3件からボツリヌス毒素が証明された．

3) ボツリヌス毒素が証明された3例中2例はC型，1例はE型毒素であった．なお，E型毒素が証明された検体からは同時にE型菌も検出された．

4) 食用カエルの腸管内容物からは210件（210匹）中39件（18.6%）からC型毒素35件，D型毒素4件が証明された．

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，大阪府立大学阪口玄二博士に深謝する．

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) 伊藤　武，斎藤香彦，稲葉美佐子，坂井千三：東京衛研年報，29-1，13，1978
3) 東　量三：水産生物化学，恒星社厚生閣，東京，1974
4) Holdeman, L. V. and Moore, W. E. C.: *Anaerobe Laboratory Manual*, 67, 1972, Virginia Polytechnic Institute and State University Virginia
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., Ono T., Karashimada T., and Iida H.: *Proceedings of the First U. S-Japan Conference on Toxic Microorganisms*, 299, 1968
7) Yamamoto, K., Kudo H., Asano, H., Seito, Y., Nabeya, S., Horiuchi, Y., Asawa, K., Sasaki, J., and Kimura, K.: *Hirosaki Med. J.*, 22, 92, 1970
8) 山本耕一，川村正栄，豊川安延，三上貞子，大友良

光：青森県衛生研究所報，12，1，1973
9) 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
10) 小林三郎：弘前医学，12，682，1961
11) 山県　宏：山口県衛生研究所年報，2，22，1959
12) Wakamatsu, T.: *Kitasato Arch. of Ezp. Med.*, *XXV*, 163, 1953
13) Serikawa, T., Nakamura, S., and Nishida, S.: *Microbiol.-Immunol.*, 21, 127, 1977
14) 林　賢一，徳地幹夫：滋賀県立衛生研究所報，12，27，1976
15) Ward, B. Q., Carroll, B. J., Garrett, E. S., and Reese, G. B.: *Appl. Microbiol.*, 15, 629, 1967
16) Mortojudo, J. W., Siagian, E. G., Suhadi, F., Ward, B. Q., and Ward, W. S.: *J. Appl. Bact.*, 36, 437, 1973
17) Carroll, B. J., Garrett, E. S., Reese, G. B., an Ward, B. Q.: *Appl. Microbiol.*, 14, 837, 1966
18) Smith, G. R. and Moryson, C.: *J. Hyg.*, 75, 371, 1975
19) Tanasugarn, L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 194, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 12-16, 1979

アフィニティークロマトグラィーによるブドウ球菌コアグラーゼの精製の試み

五十嵐英夫*, 潮田　弘*, 高橋正樹*, 新垣正夫*
稲葉美佐子*, 寺山　武*, 坂井千三*

Attempt for Purification of Staphylocoagulase by Affinity Chromatography

HIDEO IGARASHI*, HIROSHI USHIODA*, MASAKI TAKAHASHI*, MASAO SHINGAKI*, MISAKO INABA*, TAKESHI TERAYAMA* and SENZO SAKAI*

Staphylocoagulase is an extracellular protein produced by *Staphylococcus aureus*. This protein exerts clotting effect on plasmas of several animal species. Although several authors have reported on the purification of staphylocoagulase, none has described a procedure which permits a yield of sufficient purity.

A simplifed purification of staphylocoagulase was attempted by using rabbit plasma-Sepharose 4B affinity column. Affinity column was prepared by covalently linking rabbit plasma dialyzed against coupling buffer to commercially available CNBr activated Sepharose 4B. Purification of staphylocoagulase was carried out on culture filtrates of *Staphylococcus aureus*, strain st-213. Culture filtrate containing 1 M NaCl and 0.0001% thimerosal was then applied to the affinity column. The eluant of choice for eluting staphylocoagulase from affinity column was 0.05M phosphate buffer, pH 7.4, containing 3 M NaSCN, 1 M NaCl and 0.0001% thimerosal. After elution of the absorbed staphylocoagulase with eluant, the gel was equilibrated with the equilibration buffer (0.05M phosphate buffer containing 1 M NaCl and 0.0001% thimerosal, pH 7.4) before being used again. The yield of coagulase activity was about 70%.

These results show that rabbit plasma-Sepharose 4B affinity chromatography can be useful for isolation and purification of staphylocoagulase from the culture filtrate of *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, staphylocoagulase, coagulase, purification of staphylocoagulase, affinity chromatography, plasma-Sepharose

ブドウ球菌コアグラーゼ（以下 coag と略）は黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）の産生する菌体外蛋白質の1つで，ヒト，サル，ウサギなどの血漿を特異的に凝固する．また coag はブドウ球菌(以下ブ菌と略)の分類学上の重要な因子の1つでもある．

これまで多数の研究者[1-5]が coag の精製を試みており，数多くの精製法を報告している．しかしながら精製に用いる菌株および方法の違いによるものか，それとも純度の違いによるものか，それぞれの最終標品の物理化学的性状が非常に異っており，いまだ coag の蛋白化学的な性質も殆んど明らかにされていない．その原因の1つとして，精製法がきわめて困難で，再現性の高い精製法が確立されていないことがあげられる．

そこで，私どもは簡便な coag の精製法の確立を目的として，アフィニティークロマトグラフィーによるcoagの分離・精製を試みた．その結果，Sepharose 4B にウサギ血漿をリガンドとして結合させた，ウサギ血漿-Sepharose 4B カラムに coag が特異的に吸着し，溶離剤で溶出できることを明らかにしたので報告する．

材料および方法

使用菌株：coag 産生菌株として Zen-Yoji et al.[6] のコアグラーゼ型別法のⅡ型の reference 株である *S. aureus*, st-213 株を用いた．

使用培地：coag 産生培地として Brain Heart Infusion broth (Difco, BHI と略) を使用した．

培養方法：coag 産生性の高い集落を選択するために供試菌株を20%ウサギ血漿加標準寒天平板に分離培養し，大きい白濁環を形成した集落を選び，BHI 培地で35C，18時間振盪培養した．この前培養菌液を 1*l* コルベンに BHI 培地 200m*l* 分注，高圧滅菌したものに5m*l* 宛接種し，35C，18時間振盪培養した．

培養沪液の調製：上記条件による培養後，14,000rpm で遠心し，その上清をミリポアフィルターで沪過したのち，これに0.0001%にチメロサールを添加し，出発材料

* 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

とした．培養沪液の coag 活性は128MCD（後述）であった．

ウサギ血漿の調製：ウサギから抗凝固剤としてヘパリン（終末濃度：2μg/ml）を用いて採血した血液の遠心上清をウサギ血漿とした．この血漿はアフィニティークロマトのリガンド（反応基）として CNBr で活性化した Sepharose 4B と結合反応を行なうため，0.5M NaCl を含有する0.1M $NaHCO_3$溶液（pH 8.3)のカップリング緩衝液に５Ｃで，２日間透析した．

アフィニティーカラムの調製：CNBr で活性化した Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemical) へのウサギ血漿の結合反応は Cuatrecasas & Anfinsen[7] の方法に準じて行なった．その概略はFig. 1に示した．予備実験における アフィニティーカラムの調製は，Fig. 1 に示されている量の約1/10を用いて行なった．調製されたウサギ血漿–Sepharose 4B は使用時まで，４Ｃに保存した．

蛋白質の測定：蛋白質の 測定は 分光 光度計（島津，UV-210）による 280nm の吸収により行なった．

コアグラーゼ活性の測定：コアグラーゼ活性は試験管法と平板法のいずれかで測定した．試験管法は被検液の２倍連続希釈液の各 0.2ml に10倍希釈ウサギ血漿0.2ml を加え，37Ｃ１時間反応させ，血漿凝固を形成した最大希釈倍数の逆数を coag 力価（MCD: minimal clotting dose）とした．平板法は角型プラスチックシャーレ（14×10cm）で，予め作製した厚さ約5mm（40ml/平板）

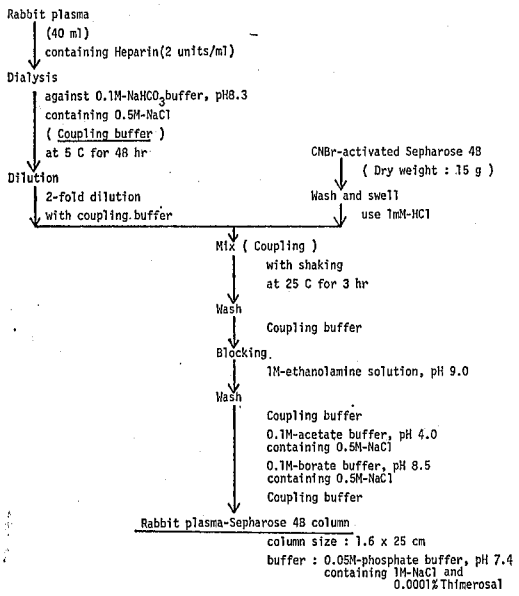


Fig. 1. Coupling Procedure of Rabbit Plasma with CNBr-activated Sepharose 4B

のウサギ血漿寒天平板に直径 2mm の孔をあけ，被検試料10μl をマイクロシリンジで注入し，湿潤箱内で37Ｃ，18時間反応させた後に生じる白濁環の直径をキャリパーで測定して coag 力価とした．ウサギ血漿寒天は0.85％ NaCl 加0.15Mリン酸緩衝液（pH 7.4, 0.001％チメロサール添加）100ml に 1.2g の寒天を加え，加熱溶解後，50Ｃで保温したもの 32ml にウサギ血漿 8ml（終末濃度20％）を加えて調製した．この方法は，予備実験でのcoag 活性の測定に応用した．

溶血活性の測定：溶血活性の測定は，被検液の２倍連続希釈液の各0.5ml に１％ウサギ赤血球浮遊液0.5ml を加え，37Ｃ，１時間反応させた後，完全溶血をおこした最大希釈倍数の逆数を溶血力価（MHD：minimal hemolytic dose）とした．

ウサギ血漿の凝固力価の測定：ウサギ血漿の凝固力価の測定は 被検液の２倍連続希釈液 の各 0.2ml に，*S. aureus* st–213 株の培養沪液の 10倍希釈液 0.2ml を加え，37Ｃ，１時間反応後の凝固形成を示した最大希釈倍数を血漿の凝固力価とした．

成績および考察

1. 予備実験

1) ウサギ血漿の透析に対する安定性：CNBr で活性化した Sepharose 4B に結合するときに使用する 0.5M NaCl 加 0.1M $NaHCO_3$ 溶液，pH 8.3，（血漿の50～100倍量）にウサギ血漿を５Ｃ，48時間透析した後と，透析する前の血漿の凝固力価を比較したが，両者には差がみられず，透析による血漿の凝固力価の低下は認められなかった．

2) CNBr で活性化した Sepharose 4B へのウサギ血漿の結合：Fig. 1 の約1/10量の CNBr で活性化した Sepharose 4B とウサギ血漿を Fig. 1 の手順に従ってカップリングした．カップリングする前のウサギ血漿の凝固力価は32倍，A_{280} は 138 であった．これに対して，カップリングした後の沪液の 凝固力価 は２倍以下 で，A_{280} は21であった．このことは，ウサギ 血漿中の紫外部吸収する物質の約80％が Sepharose 4B に結合していることを示している．このウサギ血漿–Sepharose 4B をカラムに充塡し，アフィニティーカラム（1.6×2.3cm）とした．

3) ウサギ血漿–Sepharose 4B による黄色ブドウ球菌培養沪液のアフィニティークロマトグラフィー：Fig. 2 はウサギ血漿–Sepharose 4B カラムに，*S. aureus*, st–213 株の培養沪液 10ml を流したときのパターンを示したものである．その結果，培養沪液の非吸着画分である素通り F–1 画分には coag 活性が認められなかった．

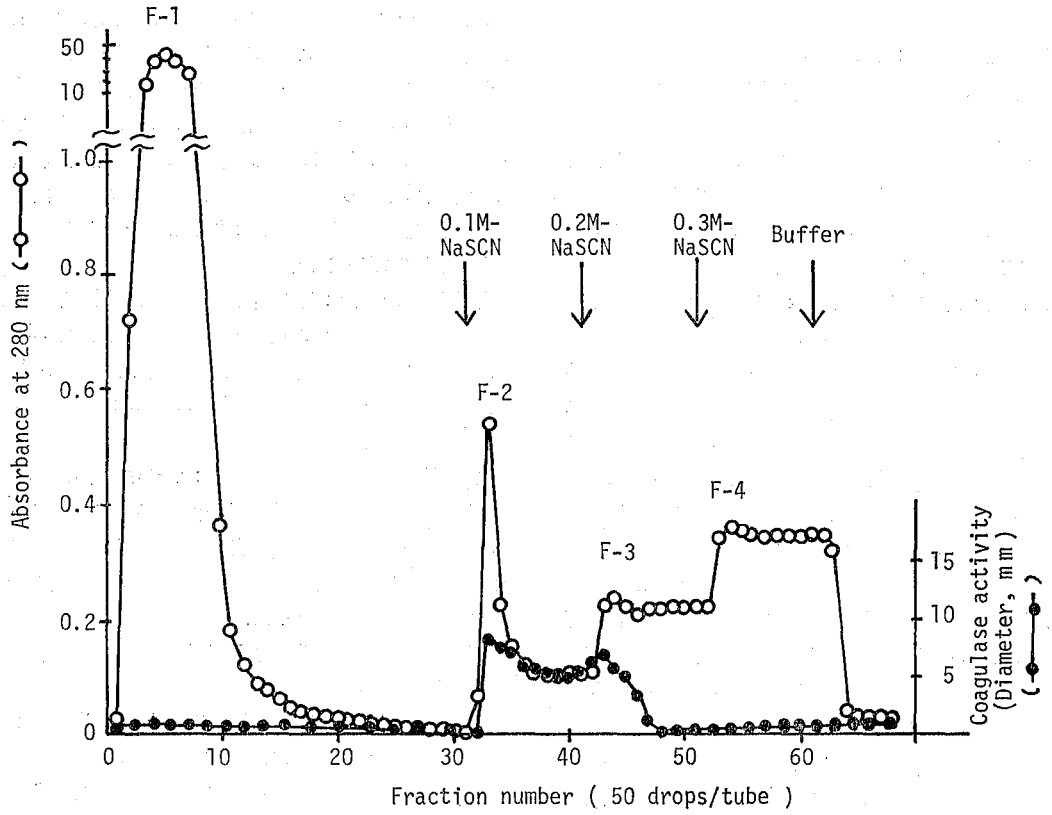


Fig. 2. Affinity Chromatography of Culture Filtrate of *Staphylococcus aureus*, strain st-213, on the Rabbit Plasma-Sepharose Column
Column size : 1.6×2.3cm, buffer : 0.05M phosphate buffer, pH 7.4, flow rate : 60m*l*/hr.
Sample : 10m*l* of culture filtrate of *S. aureus*, strain st-213.

このことは，培養沪液に含まれている coag がリガンドに吸着したことを示している．吸着した coag は，カラム調製に使用した0.05Mリン酸緩衝液，pH 7.4 で洗浄しても溶離することはなかった．つぎに，溶離剤として，1M，2Mおよび 3M NaSCN を含有する0.05Mリン酸緩衝液，pH 7.4 による stepwise elution を行なった．その結果，Fig. 2 に示したようにF-2，F-3，F-4の各画分が得られた．これらの画分のうちで，coag 活性はF-2，F-3のみにみられた．このようにウサギ血漿-Sepharose 4B に吸着した coag のほとんどが 1M～2M NaSCN を含有する0.05M-リン酸緩衝液，pH 7.4で溶離されることが証明された．

抗原抗体反応を利用したアフィニティークロマトグラフィーで血清から免疫グロブリン G (IgG) などの精製のときに，溶離剤として用いられる0.5M NaCl を含む0.2M glycine-HCl 緩衝液，pH 2.3 で，coag を溶出すると，紫外部吸収ピークが認められる．しかしながら，coag 活性はどの画分にも検出されなかった．また NaCl を溶離剤として coag の溶出の検討を行なったが，どの画分にも coag 活性はみられなかった．

Fig. 2 に見られるように，溶離剤の NaSCN の濃度が高くなるにしたがって紫外部吸収が段階的に高くなっているのは，溶離剤として用いた NaSCN 溶液が紫外部吸収を示すためである．

アフィニティーカラムは coag を溶出した後に，0.05Mリン酸緩衝液，pH 7.4で洗浄すると，また coag を吸着することができた．この様な操作を10回以上繰り返しても，coag 吸着能の低下は認められなかった．このように，ウサギ血漿-Sepharose 4B カラムに対する coag の吸着は可逆的であることが証明された．

以上のようにウサギ血漿-Sepharose 4B アフィニティーカラムに coag が吸着することが明らかになったの

で，Fig. 1 に示したような規模のアフィニティーカラム（1.6×25cm）を調製して，下記に示すような検討を行なった．

2. ウサギ血漿–Sepharose 4B アフィニティーカラムによるコアグラーゼの精製の試み

ブ菌は coag 以外に種々の毒素や酵素を産生しており，これらの代謝産物もこのアフィニティーカラムに吸着することが考えられる．図に示さなかったが，*S. aureus*, st–213 株の培養沪液をそのままアフィニティーカラムに流した場合，coag はカラムに吸着し，3M NaSCN で溶出される．そのパターンはほぼ Fig. 3 と同様であった．しかしながら，coag 活性を示す画分は同時に溶血活性も示した．このことはやはり，coag 以外のものも吸着していることを示唆している．ブ菌の代謝産物がどの様な結合様式によって，ウサギ血漿–Sepharose 4B カラムに吸着するのか不明であるが，リガンドとしたウサギ血漿に非特異的に結合していると推測される．そのため，coag を吸着するとき，高濃度に NaCl を培養沪液に添加し，使用する緩衝液にも NaCl を添加することによって，弱い非特異的吸着は抑制され，特異反応による吸着のみが起るのではないかと考えた．Fig. 3 は培養沪液と緩衝液に 1M NaCl を添加した場合のアフィニティークロマトグラムを示したものである．このクロマトグラムは培養沪液 100m*l* をapply したときのパターンであり，coag 活性を示す画分は無色透明な溶液で，その上溶血活性も認められなかった．このときの coag

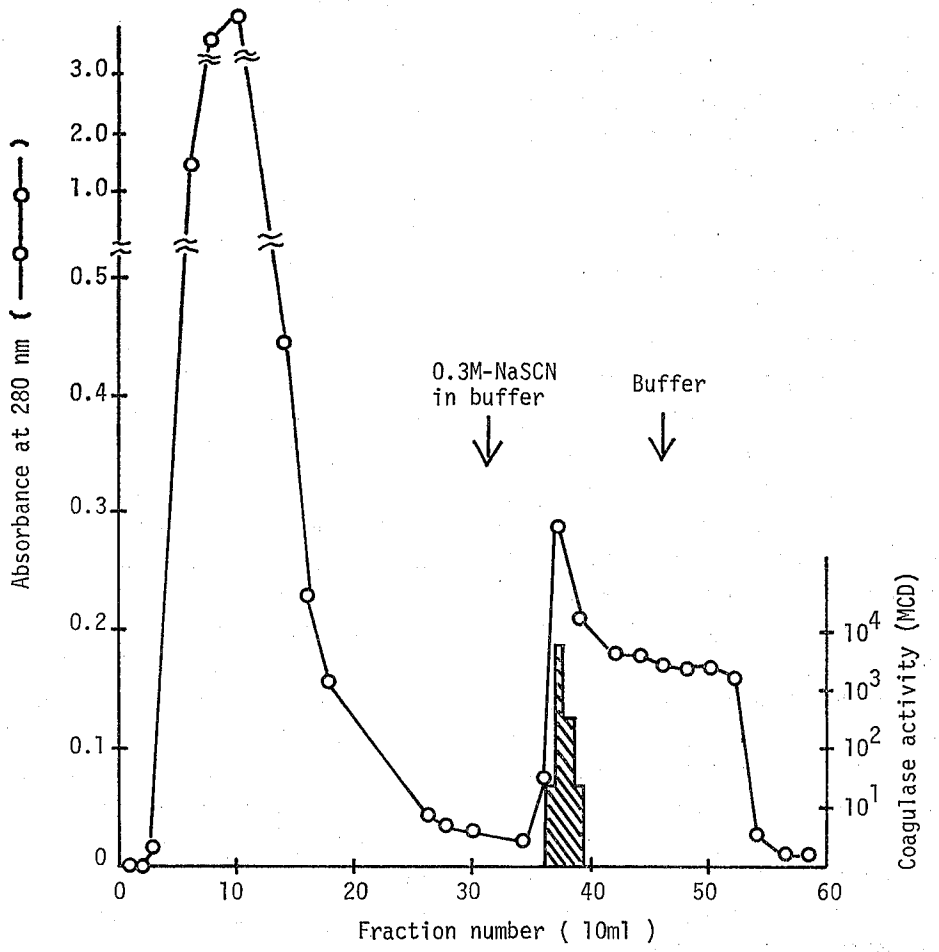


Fig. 3. Affinity Chromatography of Staphylocoagulase on Rabbit Plasma-Sepharose 4B
Column size : 1.6×25cm, buffer : 0.05M–phosphate buffer, pH 7.4, containing 1M–NaCl and 0.0001% Thimerosal, flow rate : 150m*l*/hr.
Sample : 100m*l* of culture filtrate of *S. aureus*, strain st–213, containing 1M–NaCl and 0.0001 % Thimerosal. Coagulase activity was present in the hatched peak.

活性の回収率は約70%であった．このように，アフィニティーカラムに使用するすべてのものに，1M NaClを添加することによって，アフィニティーカラムへの非特異的吸着を抑制することができた．このアフィニティーカラムも，予備実験でみられたと同様に，1.0M NaClを含有する0.05Mリン酸緩衝液で洗浄することによって吸着と溶出を繰り返すことが可能であった．このような操作を繰り返して，coag 活性を示す画分を集めることによって，coag の精製ができることが示された．

以上のように，これまでの coag の精製法に比べて，培養沪液から容易に coag を分画することが可能になった．

coag は免疫学的に8つの異なる型があることが潮田ら[8]によって明らかにされている．この8つの型の coag を精製する場合，各型により精製条件が異なるため従来の方法では非常な困難が予想される．しかしながら，免疫学的に異なった coag でも，ウサギ血漿に対する作用は，8つの型すべてが同じであると考えられるので，ウサギ血漿–Sepharose 4B アフィニティーカラムに対する吸着性も同一であると予想される．このようなアフィニティーカラムの特徴を用いることによって，免疫的に異った coag でも同じ操作により，比較的容易に coag の精製ができると考えられる．

coag がウサギ血漿–Sepharose 4B カラムに吸着し，それが NaSCN 溶液で溶出できることを明らかにし得たが，coag が種々の血漿蛋白質のどの蛋白質と反応しているのか明らかでない．1956年 Tager[9] は血漿中に存在して coag と反応する物質を coagulase reacting factor（CRF）と称している．1975年に Hemker ら[10]は coag がヒト・プロトロンビンと1：1の化合物を形成することを報告している．ウサギの血漿との反応においても，coag はプロトロンビンかその部分分解産物と反応しているものと推察される．

これらの coag と反応する血漿成分を単離して，アフィニティーカラムのリガンドにすれば，Sepharose 4B 当りの coag の吸着能がさらに上昇し，効率の良いそして再現性の高い coag の精製法が確立できるものと確信している．

本報ではウサギ血漿–Sepharose 4B アフィニティーカラムへの coag の吸着とその溶出条件の検討のみにとどめた．coag の純度や物理化学的性状の詳細については，次の機会に報告したい．

結　論

ウサギ血漿をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによる coag の精製の試みを行なった．その結果，*S. aureus*, st–213 株の培養沪液に含まれている coag がウサギ血漿–Sepharose 4B アフィニティーカラムに吸着することが証明された．このカラムへの coag の吸着は培養沪液および洗浄に用いる0.05Mリン酸緩衝液に1.0M NaCl を添加しても，NaCl 無添加と同様の coag の吸着がみられ，NaCl 添加による影響はみられなかった．これに対して，溶血素などは，1.0M NaCl 添加で，このアフィニティーカラムへの吸着が抑制された．このカラムに吸着した coag は 1～3M NaSCN 溶液で特異的に溶離することが証明された．0.5M NaCl を含む 0.2M glycine–HCl 緩衝液（pH 2.3）でも，coag は溶離するが，失活する事実が認められた．一方 3～5M NaCl を含む緩衝液を用いても，coag の溶離は認められなかった．

（本研究の概要は第51回日本細菌学会総会昭和53年4月で発表した．）

文　献

1) Dutie, E. S. and Haughton, G.: *Biochem. J.*, 71, 125, 1958
2) Murray, M. and Gohdes, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, 40, 518, 1960
3) 一言　広：日細誌，20，627，1965
4) Zajdel, M., Wegrzynowicz, Z., Jeljaszewicz, J., et al.: *Zent. Bakteriol. Prasit. Infekt. Hyg. 1. Abt.* Supp., 5, 549, 1976
5) Bas, B. M., Muller, A. D., and Hemker, H. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 379, 164, 1975
6) Zen–Yoji, H., Terayama, T., Benoki, M., and Kuwahara, S.: *Jap. J. Microbiol.*, 5, 367, 1961
7) Cuatrecasas, P. and Anfinsen, C. B.: In Methods in Enzymology, vol. 22, ed. by Jakoby, W. B., Academic Press, New York, p. 345, 1971
8) 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
9) Tager, M.: *J. Exper. Med.*, 104, 675, 1956
10) Hemker, H. C., Bas, B. M., and Muller, A. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 379, 180, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 17-23, 1979

腸管病原菌検索を目的としたふん便の保存・輸送培地；変法 Cary-Blair 培地の検討

甲斐明美*, 伊藤　武*, 坂井千三*, HUAD JUTAJAND**

Evaluation of Modified Cary-Blair Transport Medium for Detection of Enteropathogenic Bacteria

AKEMI KAI*, TAKESHI ITOH*, SENZO SAKAI* and HUAD JUTAJAND**

Cary-Blair transport medium was improved for convenience in laboratory works. Formula of the improved medium was as follows; sodium thioglycollate, 1.5g; Na_2HPO_4, 1.1g; NaCl, 10.0g; $CaCl_2$, 0.09g; agar, 1.0g; and distilled water, 1,000ml. Agar concentration was decreased from that of the original medium, while sodium chloride was increased in view of *Vibrio parahaemolyticus*.

Qualitative assessment was carried out with respect to enteropathogenic bacteria such as *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia entrocolitica*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, "NAG" vibrio and *Campylobacter* at 4℃, 20℃ and 30℃ respectively.

It's concluded that the modified Cary-Blair medium would show similar effects as those of the original, and would be easier to use because of its low concentration agar. It can be effectively used to isolate *Enterobacteriaceae* and pathogenic *Vibrio*. Results further suggest that it is preferable to maintain low temperature for both original and modified Cary-Blair media for transporting and holding fecal specimens.

Keywords: enteropathogenic bacteria, modified Cary-Blair medium, transport medium

下痢・腹痛を主徴とする急性胃腸炎は，微生物を原因とする場合が多いが，その原因究明は患者ふん便からの腸炎起因菌の検索によらなければならない．起因菌の検索においては，採取されたふん便を直ちに検査するのが理想であるが，実際には検査室への運搬なども含めて検査開始までにかなりの時間が経過することが多い．この間，ふん便材料は起因菌の生存に最も適した条件下で保存，運搬されなければならない．

微生物検体の輸送・保存培地を使用する場合，目的によって2通りの使用法がある．第1は，検体中のすべての微生物を採取時のままの状態で検査時まで保つ方法である．第2は，特定の病原菌を想定し，その菌のみを最適な条件下で保存し，あるいは増菌する方法である．近年，腸炎の起因菌として既知の病原菌に加えて，毒素原性大腸菌，いわゆる"NAG"ビブリオ，あるいはキャンピロバクターなどが報告され，益々起因菌の種類の多彩化が見られるようになった．こうした背景から，前者の目的を満足する良好な輸送培地の開発が望まれていた．

グラム陰性桿菌の保存・輸送用として開発された Cary-Blair 培地[1]（以下，ＣＢ培地と略す）は胆汁酸塩を含まず，培地中の酸化還元電位も低く保たれていることなどから，胆汁酸に抵抗性の低い菌はもとより，グラム陽性菌を含めたふん便中のすべての病原菌の保存・輸送にとって現在最も優れた培地である[2-5]．しかし，0.5%の寒天を含む本培地の使用法は，綿棒でふん便を採取し，それを培地中に穿刺して運搬し，検査時にペプトン水中などにその綿棒を浸して内容物を浸出させるというもので，その取り扱いはかなり繁雑であり，多数の検体を処理する場合に非常に不便である．

著者らは，このＣＢ培地の寒天濃度を0.1%に減量した「変法 Cary-Blair 培地」（以下，m-CB 培地と略す）を考案した．その使用法は，綿棒を用いず，プラスチック製ヘラ付スクリューキャップ容器を使用し，菌検索時にそのヘラで直接寒天平板に塗沫するという簡単な方法である．m-CB 培地は，その性能の面ではＣＢ培地と同様の保存効果を期待でき，その手技も簡単で，日常の検査において容易に使用できる．本報では，既知の腸炎起因菌および最近注目されている毒素原性大腸菌，NAG ビブリオあるいはキャンピロバクターの保存性について，m-CB 培地と原法のＣＢ培地や2%食塩加グリセリン保存液[6]を比較検討したのでその成績について報告する．

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

材料と方法

1. 供試菌株

用いた菌株はすべて当所で分離された下痢症患者由来の新鮮分離株で,サルモネラ(*Salmonella typhimurium*, 78-35), 赤痢菌 (*Shigella flexneri* 1b, 77-163), 腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus* O1:K56, T78-37), NAG ビブリオ (NAG *vibrio* O29, 78-139), 毒素原性大腸菌(*Escherichia coli* O148:K?:H28, E77259), エルシニア•エンテロコリチカ(*Yersinia enterocolitica* O3, Te20), コレラ菌 (*Vibrio cholerae eltor* Inaba, PSL 020) およびキャンピロバクター (*Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, CF-1) の8株である.

2. 輸送培地

1) Cary-Blair (CB) 培地: 市販の培地 (栄研化学) を用いた. その組成は, 培地 1,000m*l* 中にチオグリコール酸ナトリウム 1.5g, リン酸1水素ナトリウム 1.1 g, 塩化ナトリウム 5.0g, 塩化カルシウム 0.09g, 寒天 5.0g を含み, pH 8.4 に調整した.

2) 変法 Cary-Blair (m-CB) 培地: 上記CB培地の組成のうち, 寒天含量を培地 1,000m*l* 当たり 1.0g に減量し, 更に, 塩化ナトリウム濃度を 0.5%, 1.0% および 2.0% とした3種類のものを調整して, pH 8.4 とした.

3) 2%食塩加グリセリン保存液: 培地 1,000m*l* 中に塩化ナトリウム 20.0g, リン酸1水素カリウム 3.1g, リン酸2水素カリウム 1.0g, グリセリン 300m*l*, ブロムチモールブルー 0.02g を含む (pH 7.2).

各培地は加温溶解後, プラスチック製ヘラ付スクリューキャップ容器 (内径14mm, 深さ 90mm) にそれぞれ 10m*l* あて分注し, 121℃, 15分間高圧滅菌した.

3. 実験方法

Y. enterocolitica, キャンピロバクターを除くすべての被検菌は, 普通寒天平板 (但し, 腸炎ビブリオは3%食塩加普通寒天平板) で, 37℃, 18 時間培養した. *Y. enterocolitica* は普通寒天平板で, 25℃, 36時間培養した. キャンピロバクターは血液平板で, 37℃, 4日間微好気培養 (85% N_2, 10% CO_2, 5% O_2 条件下) したものを以下の実験に供した. 各被検菌を輸送培地 1 m*l* 中に10^5～10^8 個の割合で浮遊させた群, そして更に健康者ふん便 1g を添加した群を菌種別に7本ずつ, 3組用意し, 4℃, 20℃および30℃に保存して, 菌接種直後から10日目まで経日的に1本ずつ取り出し, 定量培養を行なった. 接種菌の菌数算定は10%ブイヨン加生理食塩水 (腸炎ビブリオは3%食塩加ペプトン水) で10倍希釈し, その 0.1m*l* を寒天平板上に塗沫して生じた集落について算定した. 菌の検出はすべて直接培養のみで, 増菌培養は行なわなかった. 菌数算定には以下の培地類を使用した. 赤痢菌および *Y. enterocolitica* には SS 寒天, サルモネラおよび大腸菌には DHL 寒天, 腸炎ビブリオには BTB ティポール寒天, コレラ菌および NAG ビブリオにはビブリオ寒天, キャンピロバクターには血液寒天である.

結　果

1. 変法 Cary-Blair 培地における最適食塩濃度の検討

BC培地およびその寒天含量を 0.1% に減量しただけの m-CB 培地 (食塩濃度 0.5%) に被検菌のみを単独接種して, 4℃, 20℃および30℃で保存後10日間, 接種菌の生存状況を観察した. その成績は図1に示したように, CB培地では, 4℃で保存した場合, 腸炎ビブリオは減少したが, 完全死滅までには至らず, 10日目でも 1m*l* 中10個以上生残した. 20℃および30℃ではすべての菌種にほとんど変動は認められなかった. 一方, m-CB培地では, いずれの温度においても腸炎ビブリオの生存率が低く, 特に4℃および30℃では3～5日後に消失した.

腸炎ビブリオは好塩性があり, 4%食塩加ペプトン水でよく増菌される事を考慮して, 食塩含量を1%および2%に増量して検討した.

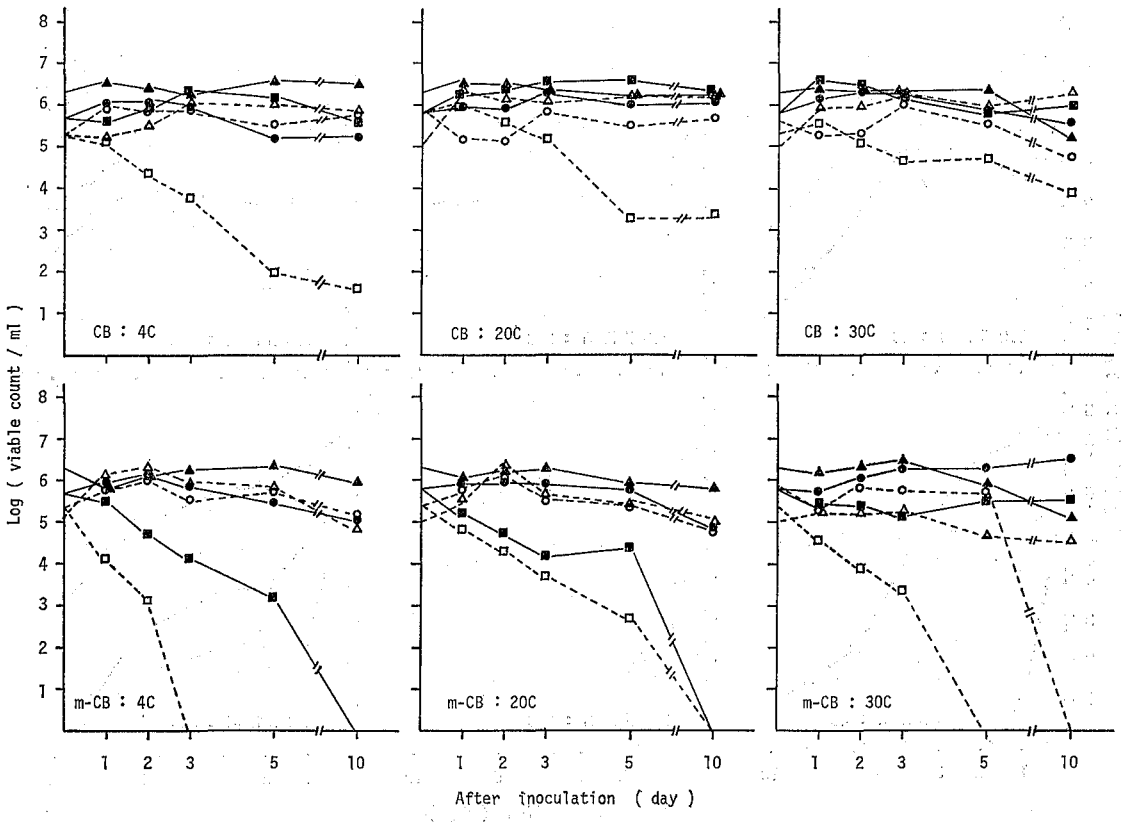
その成績は図2に示したように, 1%食塩加 m-CB 培地では, 腸炎ビブリオは10日目まで生残が確認され, 他のすべての被検菌もほとんどその菌数に変動はなかった. 2%食塩加 m-CB 培地では, NAG ビブリオの減少が著しく, 4℃では2日目に検出されなかった. 以上の成績より, m-CB 培地の食塩濃度は1%にした時すべての菌種の保存効果が認められ, 輸送培地として期待できることが明らかになった.

2. ふん便添加時における Cary-Blair 培地および1%食塩加変法 Cary-Blair 培地の検討

菌単独接種群で良好な成績を得た1%食塩加m-CB培地について, 実際に即した菌の消長を調べるために, 培地中にふん便を添加した場合の保存効果をCB培地と比較検討した. その成績を図3に示した.

CB培地で4℃に保存した場合, すべての菌種において著しい減少は認められなかった. 20℃では, コレラ菌が5日目に, 腸炎ビブリオが10日目に共に減少し, 培地 1m*l* 中の菌数はそれぞれ10個以下であった. 30℃では, 20℃の場合と同様, コレラ菌および腸炎ビブリオのほかに *Y. enterocolitica* の減少も認められた.

1%食塩加 m-CB 培地では, 4℃で保存した際, コレラ菌はやや減少したが, 10日目でも培地 1m*l* 中 1000



CB : Cary-Blair transport medium, m-CB : Modified Cary-Blair transport medium,
○-----○ : *Shigella*, ●——● : *Salmonella*, △-----△ : *E. coli*, ▲——▲
: *Y. enterocolitica*, □-----□ : *V. parahaemolyticus*, ■——■ : NAG *vibrio*

Fig. 1. Survival of Bacteria Held in Cary-Blair or Modified Cary-Blair (0.5% NaCl) Transport Media at 4C, 20C and 30C

個以上の生残が認められた．そのほかの菌種はほとんど変動がなかった．20℃および30℃では，コレラ菌と腸炎ビブリオが減少したほか，10日目にはNAGビブリオが，また赤痢菌も30℃では10日目で 1m*l* 中10個以下にまで減少した．

3. ふん便添加時における3種の培地の検討

培地中で特に死滅し易い腸炎ビブリオとコレラ菌について，2％食塩加グリセリン保存液，Cary-Blair 培地および1％食塩加変法 Cary-Blair 培地の3種の輸送培地を用いて比較検討し，その成績を図4に示した．

腸炎ビブリオは4℃で保存した場合にその生存率が最も高く，いずれの培地でも7日目まで 1m*l* 中100個以上生残した．特にCB培地および m-CB 培地ではほとんど菌数に変動がなかった．20℃および30℃ではいずれの培地でも菌数の減少が認められ，2％食塩加グリセリン保存液とCB培地では7日目まで生残したのに対し，m-CB 培地では3～5日目で検出されなかった．

コレラ菌は，4℃で保存した場合，CB培地および m-CB 培地では7日目まで 1m*l* 中1000個以上が検出されたが，2％食塩加グリセリン保存液では7日後の菌数は10個以下であった．20℃および30℃では，いずれの培地でも菌数は著しく減少し，3日後には 1m*l* 中1000個以下であった．

4. 3種の培地におけるキャンピロバクターの検討

最近，特に注目されているキャンピロバクターについて，2％食塩加グリセリン保存液，Cary-Blair 培地および1％食塩加変法 Cary-Blair 培地に菌のみ単独接種してその保存性を比較検討した．その成績は図5に示し

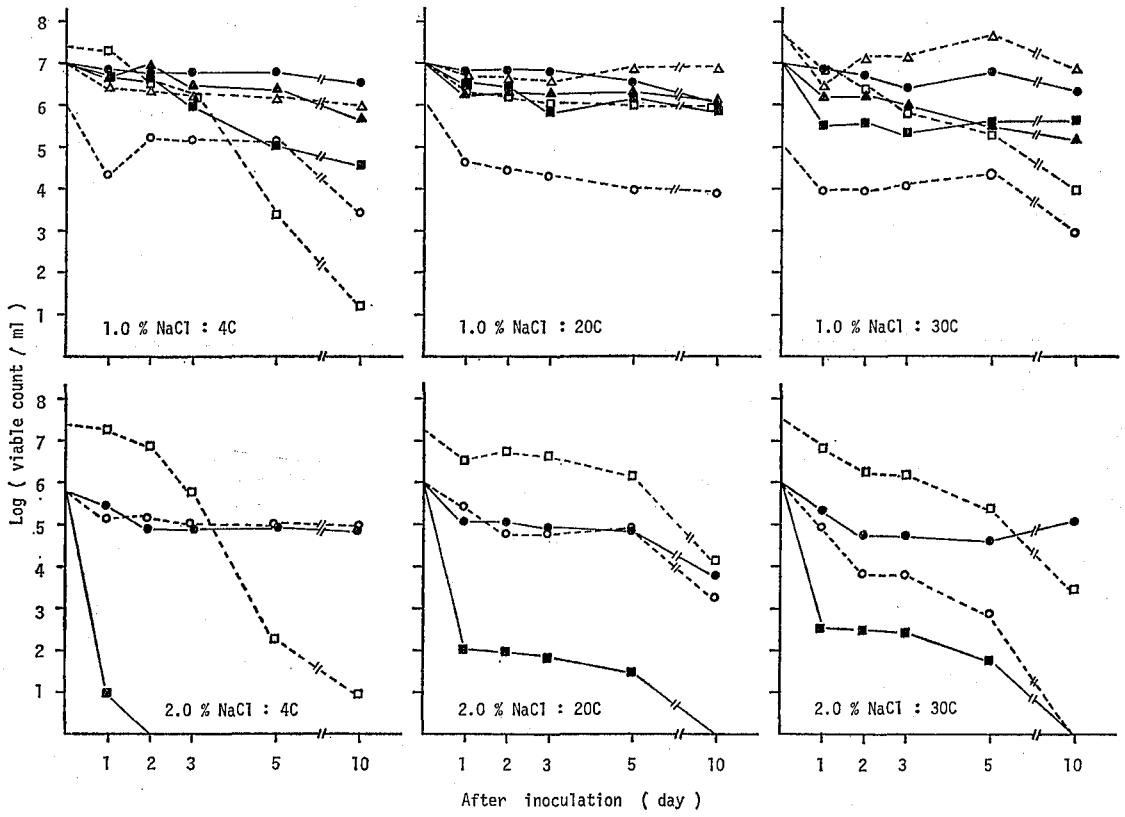


Fig. 2. The Effect of Sodium Chloride on Survival of Bacteria in Modified Cary-Blair Transport Media

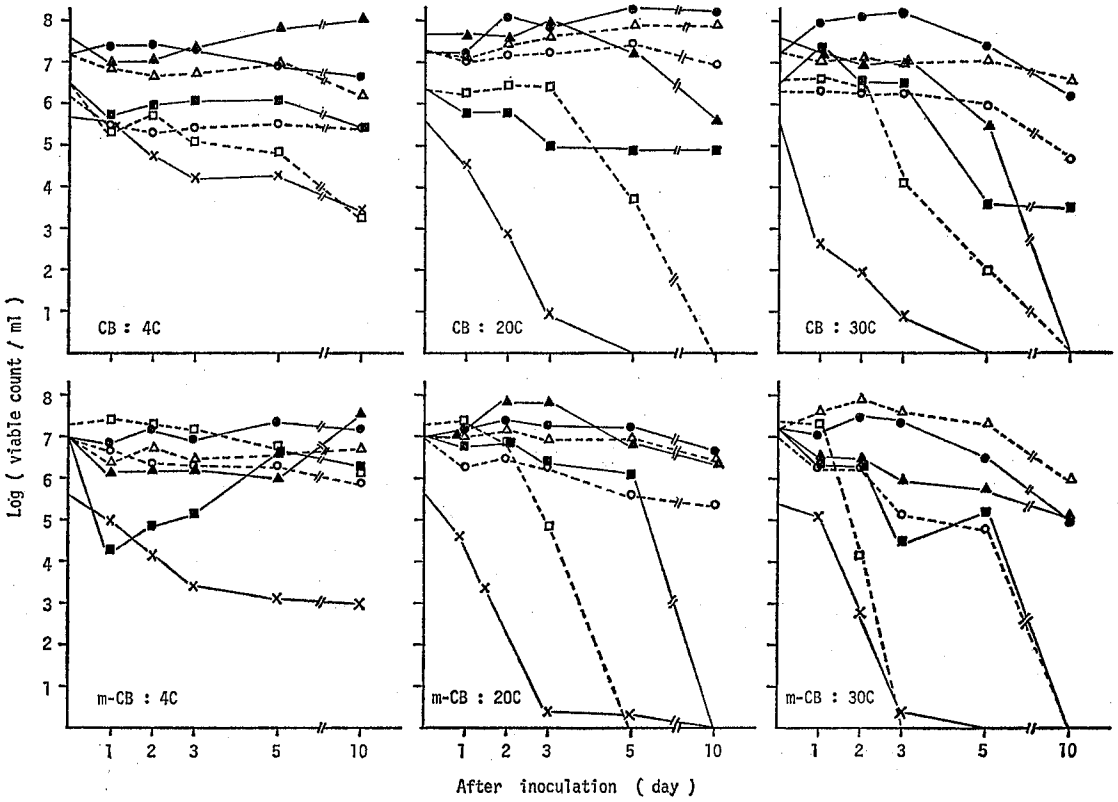
た.

4℃ではいずれの培地でも5日目まで菌数はほとんど変動せず，その後徐々に減少するが，10日目にも生残が確認された．20℃では，CB培地および m-CB 培地ではむしろ増菌の傾向を示したが，2%食塩加グリセリン保存液ではほとんど変化はなかった．30℃で保存した場合，2%食塩加グリセリン保存液では減少の一途をたどり，10日目には検出不能であったのに対し，CBおよび m-CB 培地では5日目まで増菌傾向を示し，その後減少した．しかし，10日目でも菌の生残が認められた．

考　察

近年，わが国の海外旅行者数は益々増加しているが，最近これらの旅行者が持ち帰るいわゆる“海外由来感染性腸炎”の実態が明らかにされ[7,8]，大きな問題となっている．これまで10数年来ほとんど見られなかったコレラの流行が1977年および1978年と連続して発生し[9]，また1978年にはその類似菌である NAG ビブリオの集団下痢症が発生している．更に，これまで獣疫部門でのみ問題とされていたキャンピロバクターがヒトの急性胃腸炎の病原となることが明らかにされ，その集団事例や散発事例が相ついで報告されるようになった[10-12]．こうした状況下で下痢症の起因菌の検索にあたっては，これら多彩な起因菌を考慮したふん便検査の必要性が生じてきた．

輸送・保存培地で特に問題となるのは，コレラ菌，NAG ビブリオおよびキャンピロバクターなどふん便中で死滅し易い菌種である．しかし，CB培地あるいは m-CB培地で低温保存すれば，3日間はほとんど菌数の減少も認められなかった．一般に，腸炎ビブリオは低温では死滅し易く，むしろ室温で保存した方が良いと言われてい



CB : Cary-Blair transport medium, m-CB : Modified Cary-Blair transport medium, ○-----○ : *Shigella*, ●——● : *Salmonella*, △-----△ : *E. coli*, ▲——▲ : *Y. enterocolitica*, □-----□ : *V. parahaemolyticus*, ■——■ : NAG *vibrio*, ×——× : *V. cholerae*

Fig. 3. Survival of Bacteria with Feces Held in Cary-Blair or Modified Cary-Blair (1.0% NaCl) Transport Media at 4C, 20C and 30C

るが，今回の成績から，これら死滅し易い菌種はもとより，毒素原性大腸菌，赤痢菌やサルモネラなどの腸管病原菌にとっても，2%食塩加グリセリン保存液，CB培地および m-CB 培地のいずれを使用した場合でも，ふん便を添加した状態ではむしろ低温の方がその生存率は高く，4℃で保存した場合，10日間はその生残が確認された．今後，広範な菌種の検索を考慮した場合，低温で保存・輸送することが非常に重要であることが強く示唆された．

CB 培地は確かに輸送・保存培地としては非常に優れているが，実際に検査を実施する場合，その手技の繁雑さが難点である．著者らが開発した1%食塩加m-CB培地は，その取り扱いの簡便さにおいて CB 培地に比べ数段優れている．しかも，その性能の面では CB 培地に少しも遜色のないことが明らかになった．

この1%食塩加変法 Cary-Blair 培地は，各種腸管起病性菌の保存性が優れているばかりでなく，その取り扱いは極めて簡便な保存・輸送培地であり，今後は2%食塩加グリセリン保存液にとってかわるべき優秀な保存・輸送用培地であると言える．

結　論

腸管病原菌検索を目的としたふん便の保存・輸送用培地である CB 培地を改良して，より実用的な m-CB 培地を開発した．また，既知の腸管病原菌および最近注目されている毒素原性大腸菌，NAG ビブリオおよびキャンピロバクターの保存性について，現在常用されている培地と比較検討し，つぎの結論を得た．

1) CB 培地の組成のうち，寒天濃度を 0.1% に減量

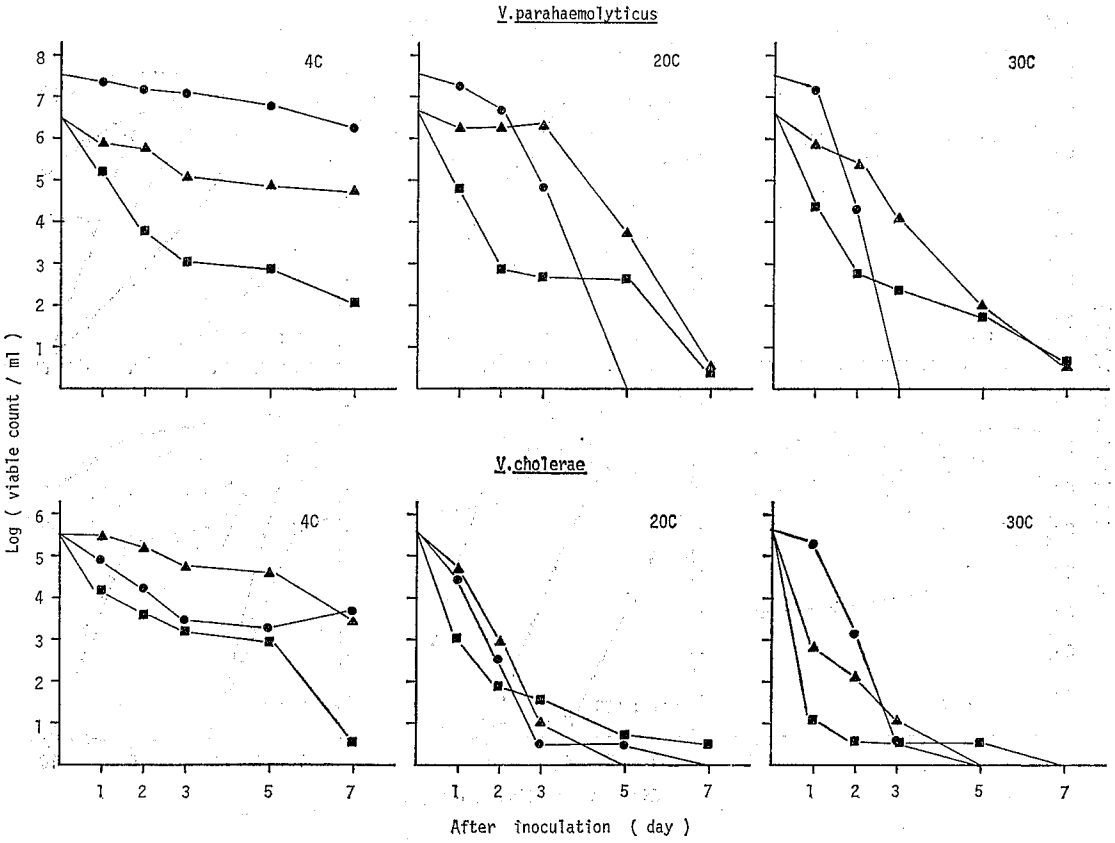


Fig. 4. Survival of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* with Feces Held in Various Media at 4C, 20C and 30C

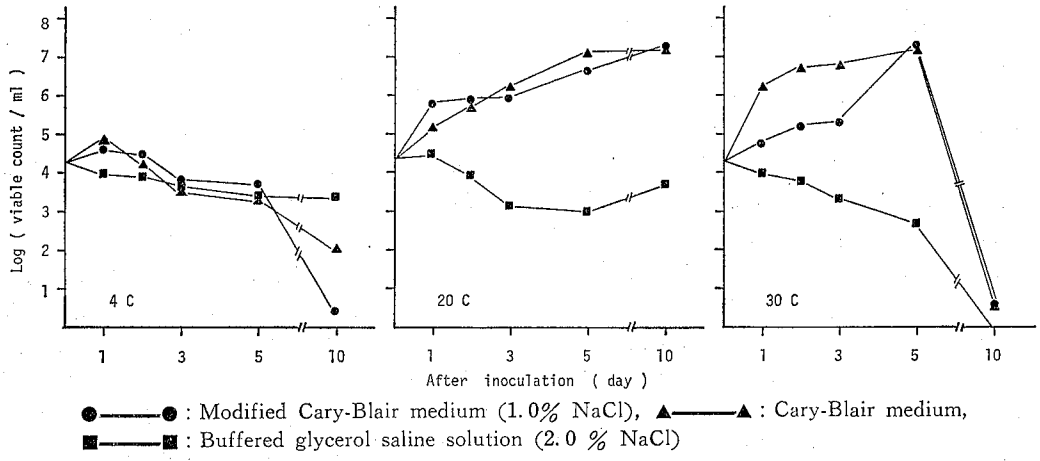


Fig. 5. Survival of *Campylobacter fetus* Held in Various Transport Media at 4C, 20C and 30C

し，更に食塩濃度を1％に増量した m-CB 培地を開発した．

2) m-CB 培地は，CB 培地と同等の保存効果を有している．但し，保存温度については，20℃および30℃の場合に，他の培地と同様に菌の死滅し易い傾向がみられた．しかし，4℃では菌の生存率が高く，菌量の経日的変動はほとんどみられなかった．

3) m-CB 培地は，その取り扱いの簡便さにおいて，CB 培地に比べ数段優れており，特に，大量の検体を処理する場合に著しい効果を発揮する培地である．

以上の成績から，今回開発した1％食塩加変法 Cary-Blair 培地は，今後の腸管病原菌検索用の輸送・保存培地として，現行の培地にとってかわるべき性能を有していると考える．

文　献

1) Cary, S. G. and Blair, E. B. : *J. Bacteriol.*, 88 (1), 96, 1964
2) Cary, S. G., Fusillo, M. H., and Harkins, C. : *Amer. J. Clin. Path.*, 43 (4), 294, 1965
3) Gaines, S., Ul Haque, S., Paniom, W., Duangmani, C., Cary, S. G., and Blair, E. B. : *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 136, 1966
4) Sakazaki, R., Tamura, K., Prescott, L. M., Bencic, Z., Sanyal, S. C., and Sinha, R. : *Ind. J. Med. Res.*, 59, 1025, 1971
5) 石塚　厳，高松悦子，原　恒美，青山　厳：モダンメディア，21 (9)，32，1975
6) 坂井千三，工藤泰雄，斉藤クラ，塚原　秋，善養寺浩：東京衛研年報，14，29，1964
7) 坂井千三，太田建爾，工藤泰雄，津野正朗，松下秀，大橋　誠：東京衛研年報，29-1，1，1978
8) 工藤泰雄：臨床と細菌，6 (1)，46，1979
9) 大橋　誠：臨床と細菌，6 (1)，8，1979
10) Center for Disease Control : *MMWR*, 27 (25), 207, 1978
11) 伊藤　武，斉藤香彦，柳川義勢 他：東京衛研年報，30-1，1，1979
12) Steele, T. W. and McDermott, S. : *Med. J. Aust.*, 2, 404, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 24-29, 1979

下水および急性熱性呼吸器疾患患児からのエンテロウイルス分離（1978年）

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

Isolation of Enterovirus from Sewage Treatment Plants and Children Suffering from Acute Respiratory Diseases in Tokyo in 1978

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

Virus isolation was made on sewage samples and on throat swabs taken from infants with high fever on a monthly basis in 1978. Results obtained are summarized as follows :

1) Throughout the survey period, a total of 73 strains of several kinds of viruses were isolated from 217 sewage samples. The most prevalent one was Coxsackie B5 virus and the next prevalent Coxsackie B4 virus, and most of them were detected during the summer season, 2) a total of 125 strains of various kinds of viruses were isolated from 675 throat swab samples. Comparison of isolated viruses from URI cases and those from other cases led us to an assumption that infantile URI cases were mainly concerned with types 4 and 5 Coxsackie B and type 3 Adeno viruses, 3) prevalence in isolation of Coxsackie B viruses from sewage samples and patients paralleled well seasonally.

Keywords: enterovirus surveillance, sewage treatment plant, acute respiratory diseases

緒　言

都民における腸管系ウイルス感染流行の実態をは握する目的で，1967年以来毎月下水検体を定期採取してウイルス分離試験を行い，検出ウイルス種類の年次推移，季節消長等については総括解析してきた[1]．しかし，下水ウイルス単独の検索結果からは，検出ウイルスの病因的役割を究明することはできない．その解明を意図してわれわれは，小児科受診患児の病因ウイルス検索と下水ウイルス検索を併行して行い，検出ウイルスの種類，および季節消長を対比考察した．また，熱性上気道炎患児（URI）からのウイルス検出状況を，他症例からのそれに対比させ，URIにおける検出ウイルスの病因的意義についても検討した．

材料と方法

下水検体　1978年1月から12月まで毎月定期採取した下水検体総計217件を供試した．過去10年間の検索結果からウイルス分離用検体としては，沈殿汚泥が最も効率の良いことがわかったので汚泥を主検体とした[2]．下水検体採取地点は，従来から観測定点としてきたO，S，M都内3下水処理場と，団地排水専用下水処理場6か所，計9か所とした．

検体処理方法，および保存方法は，既報の通りである[3,4]．

患児咽頭ぬぐい液　供試咽頭ぬぐい液は，1978年1月から12月に東京逓信病院小児科で受診した患児675名から採取した．咽頭ぬぐい液を採取した患児の症例別内訳は，URI 426名，下気道炎（LRI）82名，下痢症14名，手足口病（HFMD）42名，その他の発疹症32名，発熱その他79名であった．検体採取および処理方法は，前報の通りである[5]．

ウイルス分離　下水検体からのウイルス分離には，培養細胞系として FL，HEp#2，BGM，Vero#462 を使用した．咽頭ぬぐい液からのウイルス分離には FL，HEp#2，Vero 355，MDCK，HEL の各細胞系を使用した．HFMD 患児検体の分離培養には，哺乳マウスと Vero#462 細胞も併用した．ウイルス分離培養は，前報に準じて24穴のプラスチックプレート（コースター社製）を使用し，CPE および HA の出現を指標に行った．分離ウイルスの同定は，既知抗血清を用いた HI 試験，CF 反応，または中和試験の結果により判定した[5]．

* 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

結果と考察

下水検体からのウイルス分離　観測定点とした9か所の下水処理場において採取した下水検体217件からのウイルス分離成績を表1に示した．検出ウイルスの種類は12種であり，総括的にみれば都市部のO処理場では12件中8件（66.7%）から11株，S処理場では32件中6件（18.8%）から7株，M処理場では11件中4件(36.4%)から6株，また，都下の団地専用処理場では162件中41件（25.3%）から49株のウイルスを分離した．年間を通じたウイルス分離率は，観測地点によって差があり最低は15.4%，最高は66.7%であった．

エンテロウイルス感染は，主として低年令層で発生するので下水を流出している地域住民の年令構成，および人口密度がウイルス検出率を左右する大きな要因になっていると考える．しかし，検出ウイルス種類は，処理場別に著明な差がなく，この種のウイルス感染流行は広域的に発生するものと推定された．

下水検体総数217件の検索を行った結果73株(33.6%)の各種ウイルスを分離した．ウイルス種類別分離率は，ポリオウイルス7.4%，コクサッキーB群（CB）ウイルス20.7%，エコーウイルス1.4%，アデノ（AD）ウイルス4.5%であった．検出ウイルス73株の逐月消長を示すと表2の通りである．季節消長をみると，ポリオウイルスは，例年通り春秋の生ワクチン投与に対応して検出された．CBウイルスは，夏季をピークにして5型（31株）と4型（10株）が高率に検出された．1977年に高ひん度に検出されたエコー11型ウイルスは，1月に3株分離されたのみでその後は全く検出されなかった．ADウイルスは，1型，2型，5型を単発的に分離した．これらの下水ウイルス検索結果から，1978年に都内にお

表 1.　下水検体からの月別ウイルス分離状況（1978年）

処理場＼月		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O	沈殿汚泥					P2	CB4·5	CB5	CB5	CB5	AD1	P2, CB5	P1, AD2
S	K系 沈殿汚泥				—								
S	S系 沈殿汚泥				—	CB5	CB4·5	CB4				CB1	
S	S系 2次処理水				—	CB5		—			CB5		
M	沈殿汚泥			CB5	—	P2, AD2	CB5·6	CB4					
団地A	生下水	P1·2, E11		CB5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
団地A	2次処理水				—	CB5					CB5		
団地A	沈殿汚泥			CB5	P2	CB5		CB5	CB5	CB3	CB5		
B	生下水	E11	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—
B	2次処理水			CB4	—								
B	沈殿汚泥				P3	CB5		CB5, AD1				CB4	
C	生下水			CB4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C	2次処理水				—		AD5				CB5		
C	沈殿汚泥	E11			P1·2		CB4	CB5	CB4	CB5			
D	生下水				—	—	—	—	—	—	—	—	—
D	2次処理水				—			CB5					
D	沈殿汚泥	AD1			P3		CB4						
E	生下水				—	—	—	—	—	—	—	—	—
E	2次処理水				—								
E	沈殿汚泥				P2·3			CB5	CB5	CB5			AD1
F	生下水	—			P1·2·3		AD5	CB5		AD5		CB1·5	
F	2次処理水	—											
F	沈殿汚泥	—						CB5					

—：検査せず　　P1：ポリオウイルス1型　　AD1：アデノウイルス1型
CB1：コクサッキーB群1型ウイルス　　E11：エコーウイルス11型

表 2. 下水検体からの月別ウイルス分離株数（1978年）

		1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
Polio	1型	1			2								1	4
	2	1			4	2						1		8
	3				4									4
Cox. B	1											2		2
	3									1				1
	4			2			4	2	1			1		10
	5			3		5	3	8	3	3	4	2		31
	6						1							1
ECHO	11	3												3
Adeno	1	1						1			1		1	4
	2					1							1	2
	5						2			1				3
	計	6	0	5	10	8	10	11	4	5	5	6	3	73
	件数	20	22	23	9	18	17	18	18	18	18	18	18	217

いて高度に浸淫していたエンテロウイルスは，ＣＢウイルス４型，５型両ウイルスであったと推定した．11月に散発的に検出されたＣＢウイルス１型は，下水検索では９年ぶりの検出であった．

表 3. 症例別ウイルス分離状況（1978年）

	URI	LRI	下痢	発疹 HFMD	発疹 その他	発熱	その他	合計
Polio 1	2	1						3
Cox. B 1					1	1		2
2	2							2
3	1							1
4	10							10
5	11	2						13
Ent. 71				13				13
Adeno 1	5						1	6
2	13		1				6	20
3	27		1					28
4	3					2		5
5	3							3
6	1							1
Mumps	1							1
Inf. H1	14							14
H3	3							3
合計	96	3	2	13	1	3	7	125
件数	426	82	14	42	32	16	63	675
分離率	22.5%	3.7	14.3	31.0	3.1	18.8	11.1	18.5

小児科受診患児からのウイルス分離

1） **症例別ウイルス分離状況**　年間を通じて採取した患児咽頭ぬぐい液675件からの症例別ウイルス分離状況を表３に示した．URI 患児426件からは，ポリオウイルス２株，ＣＢウイルス24株，ＡＤウイルス52株，ムンプス１株，インフルエンザＡ型17株，合計96株(22.5%)のウイルスを分離した．HFMD42件からは，13株(31.0%）のエンテロ71を分離した．LRI，下痢，発熱，その他の症例207件からは，各種ウイルスを少数例分離したのみであった．症例別に検出ウイルスの種類にかなり特色が認められた．

2） **URI 患児からの月別ウイルス分離状況**　検索例数の最も多かった URI 患児からのウイルス分離成績を月別に表４に示した．季節消長によって検出ウイルス種類を対比すると，例年と変わらず夏季中心型のＣＢウイルス群，冬季中心型のインフルエンザウイルス群，年間を通じて分離されるＡＤウイルス群に整理された．しかし，ＡＤウイルスの中でも３型のみは，夏に多い傾向があった．このことは，夏季にプールを介して流行するプール性結膜炎，夏かぜ等がＡＤ３型に起因すると考えられている事実とよく一致する[6]．

3） **URI 患児からの年令別ウイルス分離状況**　検出ウイルス種類の年令推移を観察するために，年令別に検出ウイルス種類を整理して表５に示した．ポリオウイルスは，ワクチン投与年令に，ＣＢウイルスは主として５才以下の幼児に，ＡＤウイルスは１～15才の調査年令階

表 4. URI患児からの月別ウイルス分離状況 (1978年)

	1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
Polio 1				2									2
Cox. B 2									1		1		2
3								1					1
4						2	5	2				1	10
5						7	2		1			1	11
Adeno 1				1	1							3	5
2		1	1		4	3	1	1				2	13
3			1	2	4	8	7	1	1			3	27
4									1	1		1	3
5			1	1							1		3
6			1										1
Mumps												1	1
Inf. H1	1	11	2										14
H3	2		1										3
合計	3	12	7	6	9	20	15	5	4	1	2	12	96
件数	28	48	34	38	41	62	52	21	25	6	26	45	426
分離率	10.7	25.0	20.6	15.8	22.0	32.3	28.8	23.8	16.0	16.7	7.7	26.7	22.5%

表 5. URI患児からの年令別ウイルス分離状況 (1978年)

	0才	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11～15	合計
Polio 1	1		1										2
Cox. B 2				1	1								2
3							1						1
4		3	2		2	2			1				10
5		1	2		4	3	1						11
Adeno 1	2		2		1								5
2	2	7		2		1		1					13
3			4	1	5	8	2	1	1	2	1	2	27
4					1			1		1			3
5		1				1	1						3
6						1							1
Mumps												1	1
Inf. H1					1			5	1	1	2	4	14
H3			1						1			1	3
合計	5	12	12	4	15	16	5	8	4	4	3	8	96
件数	36	55	54	51	63	39	31	29	24	15	13	15	426
分離率	13.9	21.8	22.2	7.8	23.8	41.0	16.1	27.6	16.7	26.7	23.1	53.3	22.5%

層を通じて分離された．幅広い年令階層で分離される傾向が認められたADウイルスも型別にみると，2型は0～1才をピークに，3型は4～5才にピークがあった．

URI 患児から高率に検出されたCB，AD両ウイルスについて，その病因的意義を考察する目的で URI 以外の症例から検出したウイルスを対比させ，ウイルス型別分離率を図1に示した．両者の分離率の差の大きさを比較することにより，検出ウイルスの URI 病因としての特異性を検討した．URI 患児検体の検索で，AD2型は計13株検出されたが，そのうち9株 (69.2%) は0

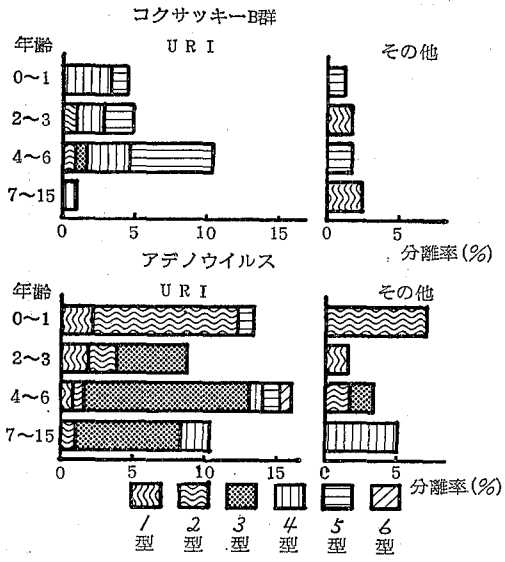


図 1. URI 患児と他症例のウイルス分離率

～1才で検出された．しかし，AD2型は他症例からもほぼ同率（43.9%）に分離されている事実から，このウイルスのURI病因としての比重は別として，URI特有の病因ウイルスとは考えられなかった．2～3才以上の年令になると，AD3型の検出比重が大きくなり，4～6才では11.2%に達した．同年令ではCB5型も6.0%に検出され，他症例との比較から両ウイルスが幼児URIの主要な病因であったことが容認された．7～15才では，低年令層に比較して検出ウイルス種類も減少したが，AD3型は7.3%に検出された．

以上の観察から，本調査期間中URIの病因として主要な役割を演じたウイルス種類は，乳児間ではCB4型，幼児および学童間ではAD3型，CB5型であったと推定した．

下水検体と患児材料からのウイルス分離状況の対比

逐月調査における，下水検体と患児材料から検出されたウイルス種類の一致度を図2に対比させた．両検体から高率に検出されたCBウイルスは，比較的よく一致した．その一致度の有意性は，Fisher の直接確率計算法により統計学的にも確認された（Pr=0.00026～0.000036）．しかし，患児から高率に検出されたAD3型，エンテロ71は，下水から検出されなかった．AD1，2，5型は，わずかな一致がみられたのみであった．ADおよびエンテロ71両ウイルスが下水から検出されにくい事実は，感染者1人当りの排出ウイルス量がポリオ，CBウイルスに比較して少いことに起因することも考えられるので，下水検体中のウイルス濃縮操作を行って，検出確認する必要がある．

結　論

1978年1月から12月まで定期採取した下水検体と，小児科受診患児咽頭ぬぐい液からウイルス分離を行い，次の結論を得た．

1) 下水検体217件から73株（33.6%）の各種ウイルスを分離した．高ひん度検出ウイルスは，CB5型（31株），同4型（10株）で，両ウイルスは夏季をピークに

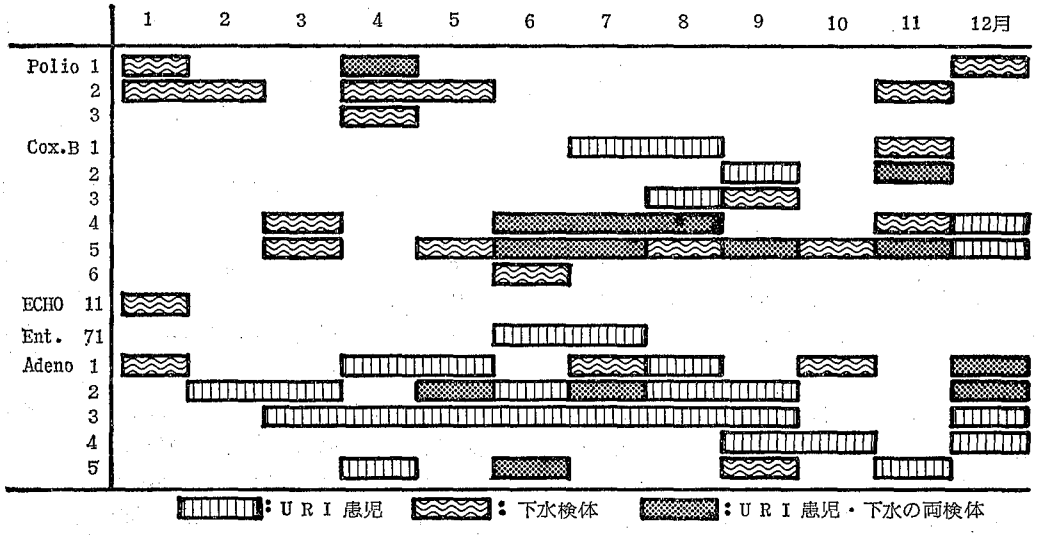


図 2. URI 患児と下水検体からの月別ウイルス分離状況の対比（1978年）

検出された.

2) 患児材料675件からは，125株（18.5%）の各種ウイルスを分離した．うち URI 患児材料426件からは，ポリオ2株，CB24株（2型2株，3型1株，4型10株，5型11株），AD52株（1型5株，2型13株，3型27株，4型3株，6型1株），インフルエンザA型17株，ムンプス1株，総計96株（22.5%）を分離した．HFMD症例42件からは，エンテロ71を13株（31.0%）分離した．その他の症例207件からは，各種ウイルスを少数例分離した.

3) URI 患児と他症例からのウイルス分離率の比較考察により，調査期間中に URI 特有の病因ウイルスとして，乳児間ではCB4型，幼児，学童間ではAD3，CB5型が主役を演じていたことが明らかにされた.

4) 下水検体と URI 患児材料からの検出ウイルス逐月消長を対比させると，CB群では各型ともよく一致した．患児から高率に検出されたエンテロ71，AD3両ウイルスは，下水から検出できなかった.

（本研究の概要は日本感染症学会第53回総会1979年4月で発表した.）

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) 岩崎謙二，藪内　清，矢野一好，柴田タツ美：臨床とウイルス，6，265，1978
3) 藪内　清，矢野一好，柴田タツ美，岩崎謙二，辺野喜正夫：東京衛研年報，29-1，44，1978
4) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二：日感染学誌，52，472，1978
5) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二：東京衛研年報，29-1，49，1978
6) 児玉威：水，6，86，1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 30-34, 1979

最近における東京都民のポリオウイルス中和抗体保有状況

藪内 清*, 矢野一好*, 柴田タツ美*, 林 志直*, 岩崎謙二*

Incidence of Neutralizing Antibodies against Polioviruses among Healthy Inhabitants in Tokyo in Recent Years

KIYOSHI YABUUCHI*, KAZUYOSHI YANO*, TATSUMI SHIBATA*, YUKINAO HAYASHI* and KENJI IWASAKI*

Keywords：ポリオウイルス poliovirus, 中和抗体 neutralizing antibody, 血清疫学 serological epidemiology

緒　言

ポリオウイルスによっておこる急性灰白髄炎（ポリオ・Poliomyelitis）は，中枢神経系の運動神経細胞および脳幹の破壊等によって運動麻痺などをおこす主として小児の重とくな感染症である．

わが国におけるポリオ患者の発生は，1947年本症に届出制が適用されて以来毎年1,000～4,000人が報告されていたが，1960年から61年にかけて北海道および九州で6,000人に近い大流行がおこるにいたって，生ワクチンの投与が実施され，以後の流行阻止に劇的な効果をあげたことは周知のとおりである[1]．その後毎年の生ワクチンの継続投与により患者発生数は確実に減少の一途をたどり，現在ではほとんど真性ポリオ患者は認められず，わが国からポリオは姿を消したと考えられている[1]．

その疫学的経過については，厚生省を中心として全国地方衛生研究所において実施されたポリオ流行予測事業により調査されている[2-5]．われわれもこの全国的なネットワークの一環として，野外毒感染の機会がなくなったと推測される現在の東京都民の間で，ポリオの免疫状態がどのように維持されているかを調査する目的で，これを血清疫学的に追及し，1971年までの成績についてはすでに報告した[6]．

本報は1972年以降の成績である．

実験材料と方法

健康都民血清　1972～74年および1978年の4年間，それぞれ毎年都内居住健康者から採血した．供血者の年令構成は表1にしめした．被検血清は採取後試験を実施するまで−20°に凍結保存した．

中和試験　厚生省流行予測事業急性灰白髄炎検査術式の記載に従っておこなった[7]．ポリオ1型ウイルスMahoney株，2型MEF-1株，3型Saukett株を使用し，被検血清につき100$TCID_{50}$量の各型ウイルスに対する中和抗体価を測定した．試験はすべてマイクロタイター法によった．

実験成績と考察

1972～74年および1978年の4年間に0～25才の健康都民539名について，ポリオ1，2，3型ウイルスに対する血中中和抗体価を測定した．検査結果は表1のとおりである．

各年度別の集計データについてポリオ各型ウイルスに対する抗体価≧1：4の抗体保有率をみると，2型抗体は最も高値でこの4年間91～97%の範囲で安定した値をしめし，1型は46～89%，3型は54～78%の範囲で変動がみとめられた．1965～1971年の同値は，1型52～100%，2型83～100%，3型40～90%であった[6]ので，各型共ほぼ同様の抗体保有率をしめしている．

次に，各型ウイルスについて，年度別，年令階層別にそれぞれの抗体価の累積陽性率を計算し，二元配置分散分析法による統計処理をおこない，抗体保有率の，年度別，年令階層別変動の有意性を検討した．1型ウイルスに対する中和抗体保有率の年度差は抗体価≧1：4で1%以下，≧1：8および≧1：16で5%以下の危険率でそれぞれ有意であったが，年令階層別の差はすべて有意でなかった．2型は全組合せで，年度差および年令階層差に5%以下の危険率では有意性がみとめられなかった．3型は抗体価≧1：64のところで年度差年令階層差共に5%以下の危険率で有意性がみとめられた．

特定の一点のみの抗体価を解析基準とする場合は，抗体価の値が変れば解析結果にも変化がでてくることがあるので，数点の抗体価を同時に基準としうる回帰分析法の応用を試みた．標本ごとに抗体価別の累積抗体保有率を算出して，片平方根値目盛のグラフ紙上の対応点にプロットし，最小自乗法によってそれら各点の至近距離を通る回帰直線を計算して画くと図1のようになる．これ

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

表 1. ポリオウイルスの年度別年令階層別中和抗体保有状況

年令(才)	年度	検査件数	1型 中和抗体価 (2×2ⁿ)							2型 中和抗体価 (2×2ⁿ)							3型 中和抗体価 (2×2ⁿ)						
			<1	1	2	3	4	5	≧6	<1	1	2	3	4	5	≧6	<1	1	2	3	4	5	≧6
0〜6	'72	20	7	1 (65.0)	6 (60.0)	4 (30.0)	1 (10.0)	1 (5.0)		1		2 (95.0)	9 (85.0)	6 (40.0)		2 (10.0)	6	4 (70.0)	9 (50.0)	1 (5.0)			
	'73	50	27	8 (46.0)	5 (30.0)	3 (20.0)	3 (14.0)	3 (8.0)	1 (2.0)	7	2 (86.0)	9 (82.0)	1 (64.0)	9 (62.0)	8 (44.0)	14 (28.0)	28	6 (44.0)	8 (32.0)	3 (16.0)	3 (10.0)	1 (4.0)	1 (2.0)
	'74	17	2	1 (88.2)	3 (82.4)	2 (64.7)	3 (52.9)	3 (35.3)	3 (17.7)			1 (100)	2 (94.1)	4 (82.4)	3 (58.8)	7 (41.2)	6	1 (64.7)	3 (58.8)	4 (41.2)	3 (17.7)			
	'78	102	32	10 (68.6)	18 (58.8)	7 (41.2)	14 (34.3)	11 (20.6)	10 (9.8)	7	2 (93.1)	6 (91.2)	1 (85.3)	16 (84.3)	22 (68.6)	48 (47.1)	32	9 (68.6)	13 (59.8)	18 (47.1)	14 (29.4)	8 (15.7)	8 (7.8)	
7〜11	'72	39	15	11 (61.5)	7 (33.3)	5 (15.4)	1 (2.6)			2	2 (94.9)	11 (89.7)	13 (61.5)	8 (28.2)	3 (7.7)		12	7 (69.2)	10 (51.3)	9 (25.6)	1 (2.6)			
	'73	16	11		2 (31.3)	2 (18.8)	1 (6.3)			1	1 (93.8)	3 (87.5)	2 (68.8)	5 (56.3)	2 (25.0)	2 (12.5)	9		4 (43.8)	1 (18.8)	2 (12.5)			
	'74	18	1	3 (94.4)	2 (77.8)	2 (66.7)	7 (55.6)	3 (16.7)				8 (100)	3 (55.6)	2 (38.9)	5 (27.8)		2	4 (88.9)	5 (66.7)	3 (38.9)	4 (22.2)			
	'78	45	7	4 (84.4)	12 (75.6)	10 (48.9)	8 (26.7)	4 (8.9)				6 (100)	12 (86.7)	9 (60.0)	9 (40.0)	9 (20.0)	13	5 (71.1)	9 (60.0)	11 (40.0)	6 (15.6)		1 (2.2)	
12〜25	'72	79	23	12 (70.9)	15 (55.7)	10 (36.7)	10 (24.1)	7 (11.4)	2 (2.5)	3	7 (96.2)	13 (87.3)	24 (70.9)	18 (40.5)	8 (17.7)	6 (7.6)	10	17 (87.3)	27 (65.8)	12 (31.7)	8 (16.5)	3 (6.3)	2 (2.5)	
	'73	72	28	3 (61.1)	4 (56.9)	9 (51.4)	14 (38.9)	8 (19.4)	6 (8.3)	5	4 (93.1)	9 (87.5)	4 (75.0)	12 (69.4)	12 (52.8)	26 (36.1)	18	10 (75.0)	14 (61.1)	5 (41.7)	17 (34.7)	6 (11.1)	2 (2.8)	
	'74	67	9	8 (86.6)	12 (74.6)	15 (56.7)	10 (34.3)	9 (19.4)	4 (5.9)	8	12 (88.1)	21 (70.2)	13 (38.8)	9 (19.4)	4 (6.0)		13	16 (80.6)	21 (56.7)	9 (25.4)	6 (11.9)	2 (3.0)		
	'78	14	2		3 (85.7)	5 (64.3)	2 (28.6)	1 (14.3)	1 (7.1)			1 (100)	3 (92.9)	2 (71.4)	4 (57.1)	4 (28.6)	4	2 (71.4)	2 (57.1)	2 (42.9)	2 (28.6)	1 (14.3)	1 (7.1)	

( ) =累積陽性率 (%)

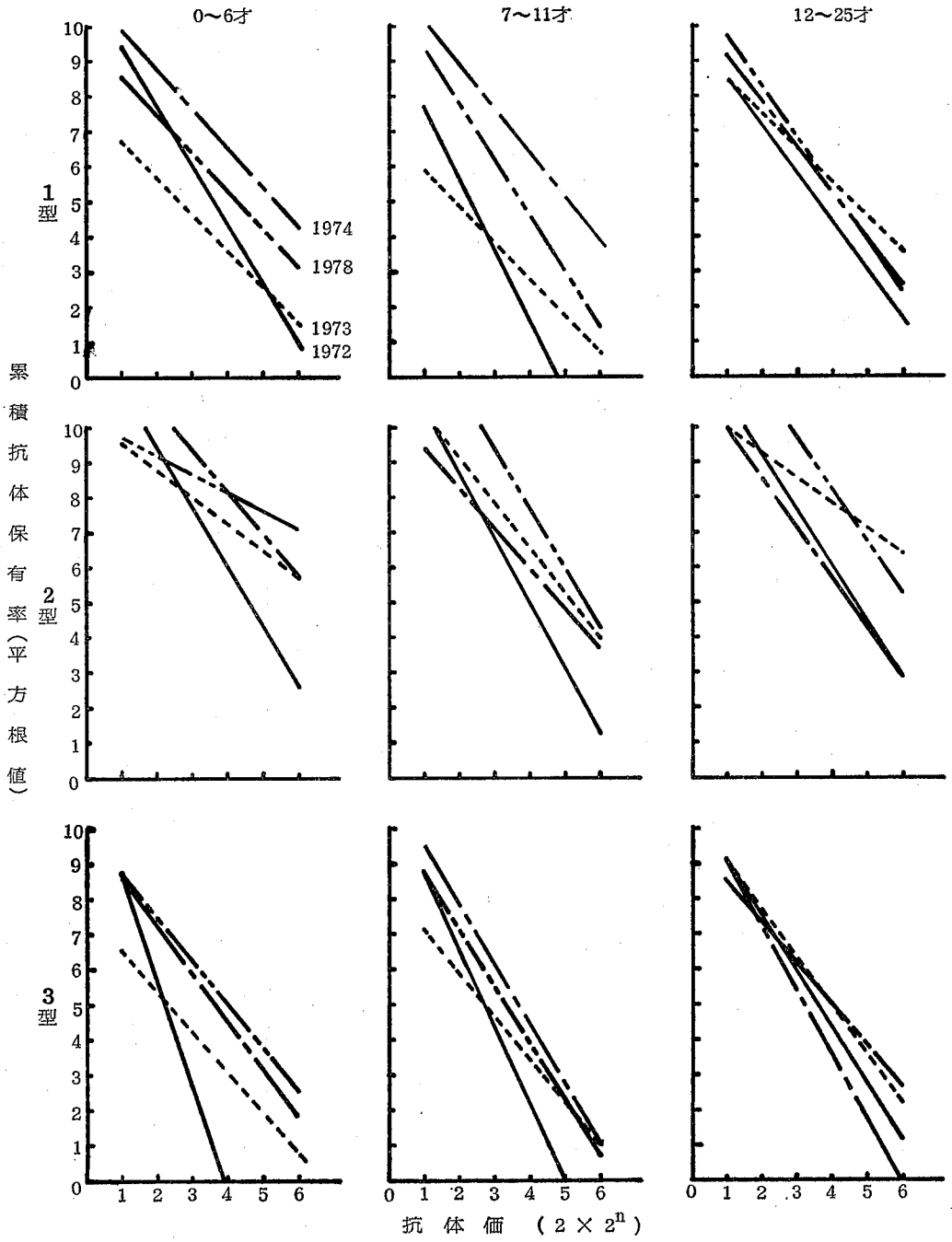


図 1. 年度別年令階層別中和抗体保有状況

ら回帰直線の位置によって抗体保有状況を表現し，その位置変化によって標本間の抗体保有の差異を解析した．1型ウイルスの抗体保有についてみると，0～6才および7～11才の両年令階層では明らかに年度による差をみとめたが，12～25才の階層では年度差はほとんどみとめられなかった．0～6才，7～11才の年令階層における年度差はほとんど同様で，1972，73両年が低く，74，78年が高値をしめした．2型ウイルス抗体は，1，3型に

表 2. 抗体保有の回帰分析結果

ウイルス型別	年度	0～6才		7～11才		12～25才	
		a値	a／b値	a値	a／b値	a値	a／b値
1型	1972	1.00	1.00	0.97	0.76	0.98	1.18
	1973	0.75	1.21	0.69	1.08	0.93	1.51
	1974	1.07	1.68	1.12	1.45	1.09	1.29
	1978	0.94	1.49	1.12	1.13	1.14	1.24
2型	1972	1.00	1.00	0.79	0.88	0.80	1.03
	1973	0.84	1.72	0.94	1.18	0.85	1.94
	1974	1.07	1.51	0.86	1.26	0.93	1.09
	1978	0.85	2.67	1.13	1.14	1.12	1.29
3型	1972	1.00	1.00	0.93	1.26	0.91	1.72
	1973	0.63	1.79	0.68	1.82	0.89	1.93
	1974	0.82	1.95	0.93	1.77	0.91	1.51
	1978	0.82	2.21	0.87	1.69	0.82	2.13

くらべると全年度，全年令階層を通じて高い保有状況をしめした．3型ウイルス抗体保有状況は最も低く，年度差，年令階層差はともに観察される．しかし，1型にくらべて小さかった．

各型とも1972年度の0～6才における抗体保有率（a値）と抗体価分布パターン（a/b値）をそれぞれ1として，各回帰線のa値，a/b値の比を算出すると表2のとおりである．前述の抗体保有変動は抗体保有率（a値比）の変動よりは，抗体価分布パターン（a/b値比）の変動により多く影響をうけていることがわかった．

以上の解析は必ずしも充分な検体数の調査結果に基づいたものばかりではないので，多少の変動はさけられなかった．

現在の都民のポリオウイルス中和抗体保有状況は，多少の年度変動をくりかえしながらも，総体的には1965年以来大きな変化なく維持されていると推測される．野生ポリオウイルスによる住民への免疫付与が考えられなくなった近年において，とくに若年者の免疫は生ワクチン接種に起因している．従って，このことは東京都におけるポリオ生ワクチンの予防接種率が1968～77年の10年間いずれも平均83%前後であったことと大いに関連がある．わが国においては，1961年の生ワクチン緊急一斉投与とそれ以後の計画的な継続投与によって，まず完全にポリオを駆逐することに成功し，強毒野生ポリオウイルスが存在しない状態が保たれていると推定されている．しかし，海外においては依然としてポリオ多発が報告されている[8,9]ので，それらの国への旅行者対策，一部地域で認められる生ワクチン予防接種率の低下傾向の防止対策および住民の抗体保有状況の正確なは握等について今後も努力を続ける必要があると思われる．

結　論

東京都民のポリオウイルスに対する免疫保有度を調査する目的で，1972～74年および1978年の4年間に採取した0～25才の健康都民血清539件について，ポリオ1，2，3型ウイルスに対する血中中和抗体価を測定した．

この4年間における抗体価≧1：4の総合抗体保有率は，2型が91～97%で最も高くかつ安定しており，次いで1型46～89%，3型54～78%であった．

回帰分析法を応用し，年度別および年令階層別の抗体保有状況を解析した結果，年度差はとくに0～6才，7～11才の層で大きく，12～25才では比較的小さいこと，またこれらの差は主として抗体価分布パターンの変化にもとづくことを明らかにできた．

現在の東京都民のポリオウイルス中和抗体保有率は，1965年以来ほぼ変化なく維持されていることがしめされた．

文　献

1) 多ケ谷勇：公衆衛生，41，566，1977
2) 高津忠夫：日本医事新報，2096，10，1964
3) 高津忠夫：日本医事新報，2248，31，1967
4) 多ケ谷勇，平山宗宏：日本医事新報，2659，31，1975
5) 厚生省：伝染病流行予測調査報告書，1972，1973，1974，1975，1976，1977

6) 岩崎謙二，山田澄夫，柳澤靖子，矢野一好，坂井冨士子，藪内　清，根津尚光：東京衛研年報，23，55，1971

7) 厚生省：伝染病流行予測事業急性灰白髄炎検査術式，1972，1973，1974，1978

8) WHO：Weekly Epidemiological Record, 52, 405, 1977

9) WHO：Weekly Epidemiological Record, 53, 321, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 35-39, 1979

塩素添加によるプール水中のポリオウイルスおよびアデノウイルス不活化実験

藪内 清[*1], 矢野一好[*1], 柴田タツ美[*1], 林 志直[*1]
土屋悦輝[*2], 岡本 寛[*2], 工藤泰雄[*3], 岩崎謙二[*1]

Effect of Chlorination on the Inactivation of Polio and Adeno Viruses Experimentally Added into Swimming Pool Water

KIYOSHI YABUUCHI[*1], KAZUYOSHI YANO[*1], TATSUMI SHIBATA[*1], YUKINAO HAYASHI[*1], YOSHITERU TSUCHIYA[*2], YUTAKA OKAMOTO[*2], YASUO KUDOH[*3] and KENJI IWASAKI[*1]

Keywords：塩素処理 chlorination, ポリオウイルス poliovirus, プール水 swimming pool water

緒 言

水泳プールの普及に伴い，汚染プール水による各種病原微生物の媒介が重要視されてきた．なかでもアデノウイルスはプール水を介して学童間に伝ばし，しばしば夏かぜや咽頭結膜熱の感染流行に発展することがよく知られている[1]．

塩素剤は，水中微生物の不活化に最も一般的に使用されている消毒剤であるが，水質の諸条件によって殺ウイルス効果が大きく左右される．高濃度に添加すれば，消毒剤としての効果は期待できるが，塩素ガスの発生や新しく形成される有機塩素化合物の人体への悪影響が問題となる[2-6]．特定条件下における塩素剤の微生物に対する不活化効果は，古くから報告されているが，実際のプール水中の効果はあまり究明されていない．

著者らは，都内9か所の営業プールにおいて採取したプール水について，各種濃度の塩素添加を行ない，検出遊離塩素量，およびウイルス不活化能を検討したので報告する．

材 料

ウイルス ポリオウイルスI型弱毒株（Lsc, 2ab株），およびアデノウイルス3型（GB株）を供試した．培養細胞系として，各々 CMK, HEp#2 細胞を用い，ウイルス接種後CPEの出現を確認して凍結融解した．3,000 rpm 15分間遠心沈殿し粗大成分を除去した上清をウイルス原液として実験に用いた．

塩素水 市販の次亜塩素酸ナトリウムを蒸留水で 200 ppm に希釈したものを原液とした．使用時さらに適応濃度に希釈し添加用塩素水とした．

水泳プール水 1978年7月から8月に都内営業用プール9か所で，遊泳者の多い時間帯にプールのほぼ中央点で採水した．採水容器は，20*l* ポリエチレンタンクで，採水直前に十分プール水で洗浄した．採取したプール水は，4°の冷室に保存し，遊離塩素が検出できなくなったことを確認してウイルス不活化実験に使用した．採取したプール水の水質試験成績は，採取直後とウイルス不活化実験後に分けて表1に示した．

方 法

遊離塩素の測定 DPD 法により測定した．被検試料の一部に0.2Mリン酸緩衝液を1/20量添加し，ただちにDPD 試薬により発色させた．515nm 波長の透過度を測定し，その値から試料中の遊離塩素濃度を算出した．比色計は，日立101型少量スイックエンシャルサンプラー付を使用し速やか（20～40秒後）に測定した．

ウイルス不活化実験 あらかじめ塩素消費のないことを確認した容器に，供試ウイルス含有プール水100m*l*をとり，マグネチックスターラーでかくはんしながら所期の塩素量を滴下法により添加した．検体の遊離塩素濃度は，塩素添加直後に測定したが，残存ウイルス量の測定は，所定時間経過後，試料を 4m*l* ずつとり塩素剤の作用を停止させる目的でM/200チオ硫酸ナトリウム液 0.1 m*l* を添加して行なった．

残存ウイルス量の測定 ポリオウイルスは，プラック形成法により感染ウイルス量を測定し，PFU/m*l* で表示した．プラック形成は BGM 細胞の単層培養を用いて行なった（クラスター社製6穴プラスチックプレート 25mmϕ/穴）．供試ウイルスサンプルは，10倍段階希釈

[*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
[*2] 同環境保健部水質研究科
[*3] 同微生物部細菌第一研究科
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. プール水の水質分析結果

プール水	PH 前※	PH 後※※	濁度 前	濁度 後	塩素イオン (mg/l) 前	塩素イオン (mg/l) 後	$KMnO_4$消費量 (mg/l) 前	$KMnO_4$消費量 (mg/l) 後	NH_3-N (mg/l) 前	NH_3-N (mg/l) 後	Alb-N (mg/l) 前	Alb-N (mg/l) 後	遊離塩素 前	一般細菌数 (個/ml) 前	一般細菌数 (個/ml) 後
A	7.0	7.3	0	2	82.7	81.0	1.9	5.2	0.10	0.29	0.11	0.13	0.7	0	5,100
B	7.4	7.7	0	4	72.1	74.9	3.1	4.9	0.06	0.95	0.33	0.24	1.2	0	46,000
C	7.3	7.7	0	1	91.2	87.8	4.3	4.6	0.07	1.28	0.39	0.28	0.4	0	6,700
D	6.8	7.1	0	0	51.7	50.4	4.9	4.2	0.04	0.34	0.20	0.16	1.5	0	56,000
E	7.1	7.4	0	0	32.7	30.6	4.3	2.6	0.02	0.19	0.11	0.10	0.6	0	26,000
F	8.2	7.4	0	5	45.6	44.9	5.9	10.1	0.03	0.20	0.24	0.55	1.5	0	13,000
G	8.0	7.2	0	0	20.4	25.2	4.3	3.6	0.10	0.32	0.54	0.17	1.5	0	11,000
H	7.4	7.9	1.0	0	473	473	9.6	4.2	0	0.50	0.29	0.21	0.6	0	970
I	7.0	7.9	0	0	1290	1310	9.6	4.9	0	0.01	0.21	0.28	0.6	0	26,000

※　前：採水直後の分析結果　　大腸菌群はすべて陰性
※※　後：ウイルス不活化実験時の分析結果

表 2. プール水別塩素添加直後の遊離塩素濃度（ppm）

プール No.	ウイルス添加	塩素添加量 (ppm) 0.79	1.56	2.30	3.00	3.76	4.47	5.16	5.82	回帰式
A	(+)	0	0	0.18	0.33	0.72	1.03	1.14	1.50	$y=-0.72+0.38x$
	(−)	0	0.31	0.72	0.91	1.38	1.72	2.10	2.42	$y=-0.48+0.50x$
B	(+)	0	0	0.08	0.12	0.20	0.31	0.45	0.76	$y=-0.42+0.18x$
	(−)	0	0.06	0.13	0.27	0.35	0.51	0.75	0.94	$y=-0.34+0.21x$
C	(+)	0	0.03	0.07	0.16	0.24	0.28	0.41	0.54	$y=-0.19+0.12x$
	(−)	0	0.12	0.23	0.28	0.34	0.42	0.59	0.84	$y=-0.16+0.15x$
D	(+)	0	0.04	0.32	0.66	1.08	1.46	1.86	2.35	$y=-0.90+0.54x$
	(−)	0	0.22	0.70	1.07	1.42	1.87	2.37	2.70	$y=-0.68+0.58x$
E	(+)	0	0.17	0.44	0.92	1.38	1.78	2.17	2.63	$y=-0.82+0.59x$
	(−)	0.18	0.68	1.07	1.72	2.17	2.37	2.89	3.37	$y=-0.29+0.62x$
F	(+)	0	0.02	0.05	0.09	0.17	0.25	0.35	0.47	$y=-0.19+0.11x$
	(−)	0.02	0.13	0.18	0.28	0.35	0.48	0.62	0.74	$y=-0.12+0.14x$
G	(+)	0	0.08	0.29	0.53	0.76	1.17	1.58	1.77	$y=-0.66+0.41x$
	(−)	0.09	0.37	0.76	0.92	1.45	1.78	2.20	2.75	$y=-0.45+0.52x$
H	(+)	0	0	0.08	0.15	0.35	0.75	1.13	1.38	$y=-0.98+0.40x$
	(−)	0	0.08	0.24	0.54	1.10	1.46	1.63	1.93	$y=-0.73+0.46x$
I	(+)	0	0.08	0.21	0.45	0.61	1.03	1.34	1.50	$y=-0.58+0.36x$
	(−)	0.12	0.44	0.51	0.73	1.25	1.33	1.88	2.32	$y=-0.34+0.42x$
		塩素添加量 (ppm) 0.24	0.48	0.71	0.93	1.15	1.37	1.58	1.78	
DW	(+)	0	0.01	0.08	0.22	0.37	0.62	0.94	1.22	$y=-0.58+0.94x$
	(−)	0.22	0.47	0.69	0.92	1.13	1.38	1.56	1.76	$y=-0.02+1.00x$

(+)：ウイルス液を添加　　(−)：プール水のみ　　DW：蒸留水
測定：塩素添加直後ＤＰＤ法により測定

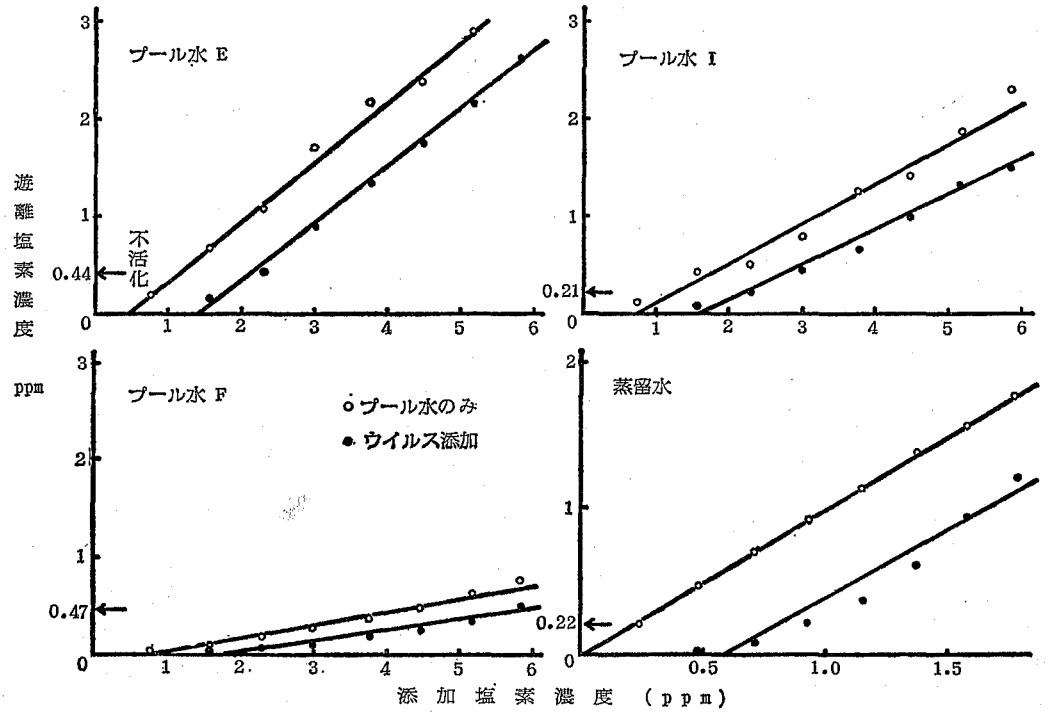


図 1. 添加塩素量と遊離塩素濃度の回帰直線

を行ない，各希釈を 1m*l* ずつ2穴に接種した．37° 90分間 CO_2 インキュベーター内でウイルス吸着をはかった後，常法に従って寒天培地を重層した．培養3日目に中性紅で染色し，その後連続3日間プラック数の増加を観察して，PFU/m*l* を判定した[7]．

アデノウイルスは，96穴組織培養プレート（クック社製）に培養した HEp#2 細胞を使用し，常法に従って $TCID_{50}$/0.05m*l* を求めた[7]．

結果と考察

塩素添加量と遊離塩素濃度 プール水9検体をそれぞれ2分して，1群には塩素のみを，2群には塩素と1/1000量のポリオウイルス液を添加して各プール水別の塩素消費量を調査するとともに，添加ウイルスの感染能不活化状況を検討した．それぞれのプール水検体への塩素添加量の範囲は，0.79～5.82ppm であった．対照として蒸留水中のポリオウイルス不活化実験も行なった（塩素添加量 0.24～1.78ppm）．塩素水添加直後に測定したそれぞれの遊離塩素濃度を表2に示した．添加量に対する遊離塩素濃度の比率は，検体間に大きな差がみられた．塩素添加量と遊離塩素濃度の対応値を基にして，最小自乗法によって算出した各々の1次回帰式は表2の通りである．直線の立ち上がりを示す回帰系数値（b値）をみると，ウイルス液添加後各プール水とも若干の低下傾向はあるが，概括的にウイルス液の塩素消費分だけ直線が平行移動した．ウイルス液添加前後の2本の回帰直線と x 軸との交点の差，つまりウイルス液が消費したと考えられる塩素量を求めると，蒸留水で 0.6ppm であった．プール水でも 0.5～0.9ppm（$\bar{x}$=0.77，SD=0.15）の範囲にあり，各プール水の間に差は認められなかった．しかし，各検体のb値（0.11～0.59）の間には差が認められた．供試したプール水の代表パターンを図1に示した．理論値に最も近いb値を示す蒸留水に比較してプール水の塩素消費量は，一様なものでなく検体によって大きな差があることがわかった．しかし，採取直後のプール水には塩素消費がなかったこと，また実験後に分析した水質試験データ（表1）に相関性が認められる項目がないことなどから，塩素消費と水質の関連性についてはさらに詳細な分析検討が必要である．

遊離塩素濃度とウイルス不活化

1) **ポリオウイルスの不活化** 1/1000量のポリオウイルス液を添加したプール水に表2に示した濃度の塩素水を添加し，ポリオウイルスの不活化効果を検討した．塩

表 3. 塩素添加5分後の残存プラック率

プール No.	塩素添加量 (ppm) 0.79	1.56	2.30	3.00	3.76	4.47	5.16	5.82
A	61.2 %	26.0	15.7	0.0 (0.33)				
B	44.3	29.0	19.7	6.9	3.4	0.0 (0.31)		
C	67.8	35.0	18.3	4.5	2.4	1.4	0.0 (0.41)	
D	41.6	1.8	0.0 (0.32)					
E	47.8	0.4	0.0 (0.44)					
F	34.5	24.1	12.6	1.5	0.8	0.2	0.1	0.0 (0.47)
G	38.7	5.2	0.0 (0.29)					
H	26.1	13.6	7.3	0.3	0.0 (0.35)			
I	53.1	5.9	0.0 (0.21)					

	塩素添加量 (ppm) 0.24	0.48	0.71	0.93	1.15	1.37	1.58	1.78
DW	33.9	5.2	0.3	0.0 (0.22)				

( ) 内は不活化時の遊離塩素濃度 (ppm)
ウイルス添加量 2.8×10^4～3.0×10^4 PFU/m*l*

表 4. 塩素によるアデノウイルスの不活化

塩素添加量	遊離塩素	接触時間 1分	10分
0 ppm	0 ppm	1.5※	1.5
197	0.03	1.5	0.5
394	0.41	1.0	0.0
788	0.83	0.0	0.0
1,575	1.61	0.0	0.0

※ $TCID_{50}$/0.05m*l* (log 10)

素接触時間は，前報に記載した塩素濃度とウイルス不活化時間の関連性の検討結果から5分間と一定にした[8]．ウイルス添加量は，2.8×10^4～3.0×10^4 PFU/m*l* とし塩素添加量別のウイルス残存率を表3に示した．ウイルス感染能が証明されなくなった時の最少塩素添加量は，最低値 2.3ppm（プール水D，E，G，I）から最高値 5.82ppm（プール水F）まで約2.5倍の差が認められた．蒸留水ではさらに低濃度となり0.93ppmでウイルス活性は証明されなくなった．一方，その時点の最少遊離塩素濃度は，最低値0.21ppm（プール水I）から最高値0.47 ppm（プール水F）の範囲にあり，各プール水の間に著明な差はみられなかった（$\bar{x}=0.35$，SD=0.08）．蒸留水も0.22ppm であり，この範囲内にあった．

以上のことから，プール水中のポリオウイルスを不活化するには，有効遊離塩素濃度を 0.5ppm 以上に保てば，ウイルス不活化効果は十分期待できることがわかった．遊泳者からプール水中に排出されたウイルス粒子は，有機固形物に吸着あるいは被覆された形で存在していることが考えられる．また，同一プールであっても，採水場所によって遊離塩素濃度に差異のあることはよく知られている事実である．実際のプール水中のウイルス不活化には複雑に多くの要因が関与してくるため，それぞれに応じた管理対策をとらなければならない．つまり，プール水中の遊離塩素量および水循環の均一性をはかり，死角をつくらないことが大切である．

2) **アデノウイルスの不活化** 蒸留水で希釈した高濃度塩素水（197～1,575ppm）にアデノ3型ウイルス液を等量接触させて行なったウイルス不活化試験結果を表4に示した．塩素添加量と遊離塩素濃度の回帰直線は図2に示した．培養ウイルス液の感染価が低く，試験には粗ウイルス液をそのまま使用したので塩素消費量は非常に高くなって回帰係数値もプール水に比較して b =0.0011と非常に小さくなったが，遊離塩素濃度 0.41ppm 10分間の接触でウイルス感染能は認められなくなった．アデノウイルス不活化に必要な最少遊離塩素濃度も，ポリオウイルスの場合とほぼ同程度であることが考えられた．組織培養によるアデノウイルスの感染価は $3.0TCID_{50}$/0.05m*l*，log 程度にしか上昇しないので，プール水中の不活化実験はできなかった．アデノウイルスの濃縮，精

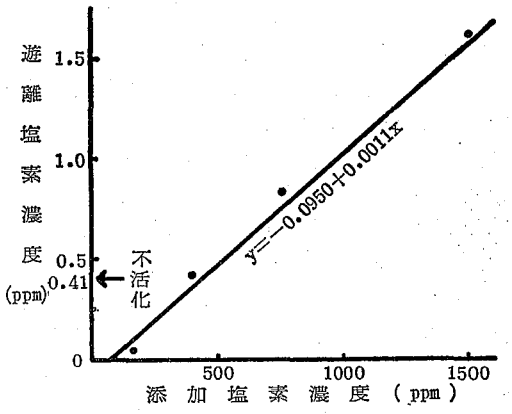


図 2. アデノウイルス不活化時の遊離塩素直線

製を行ない，塩素要求を少くして再検討する必要がある．

結　論

都内9か所から採水した営業用プール水にポリオウイルスを添加し，塩素による感染能不活化実験を行なった．アデノウイルスについても若干検討した．

1) 供試したプール水において塩素添加量0.79～5.82 ppm の範囲内で添加量と遊離塩素濃度の間に直線関係が成立した．回帰係数値は0.11～0.59の範囲にあり検体による差を認めた．この回帰係数値は同一ウイルス量の添加によってはほとんど変化しなかった．

2) 2.8×10^4～3.0×10^4 PFU/m*l* 量のポリオウイルスⅠ型弱毒株を接触5分間で不活化するのに必要な最少塩素添加量は，蒸留水で0.93ppm，プール水で2.3～5.82ppm であった．最少有効遊離塩素濃度は，蒸留水，プール水とも添加直後の測定で 0.21～0.47ppm の範囲であった（$\bar{x}=0.35$，SD＝0.08）．

3) アデノウイルス3型（$1.5TCID_{50}$/0.05m*l*，log）は，遊離塩素濃度 0.41ppm 10分間の接触で感染能が証明されなくなった．

謝辞　本研究を実施するにあたり，御援助をたまわった都衛生局水道課，細田三朗課長，鵜飼恒治係長に深甚の謝意を表する．

文　献

1) 児玉　威：水，6，86，1979
2) Glaze, W. H. and Henderson, J. E. : *J. W. P. C. F.*, 47, 2511, 1975
3) Murphy, K. L., Zaloum, R., and Fulford, D. : *Water Research*, 9, 389, 1975
4) Kott, Y., Nupen, E. M., and Rass, W. R. : *Water Research*, 9, 869, 1975
5) Scarpino, V., Berg, G. Chang, S. L., *et al.* : *Water Research*, 6, 959, 1972
6) Bruce, H., Roger, S., *et al.* : *J. A. W. W. A.*, 70, 573, 1978
7) 厚生省：微生物検査必携，第2版，60，1978，日本公衆衛生協会，東京
8) 矢野一好，薮内　清，柴田タツ美，岩崎謙二，辺野喜正夫：東京衛研年報，28-1，27，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 40-42, 1979

都内飼育ブタにおけるインフルエンザウイルスHI抗体保有調査（1978年6月～79年3月）

伊藤忠彦*, 山崎 清*, 岩崎謙二*, 坂井冨士子*

Incidence of HI Antibodies against Influenza Viruses in Swine Raised in Tokyo (1978–1979)

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

Keywords：インフルエンザウイルス Influenza virus, 血清疫学 sero epidemiology, ブタ swine

緒　言

1976年2月米国ニュージャージー州内で集団発生したかぜ患者の中に，ブタ型インフルエンザウイルス感染者が混在していたという報告はインフルエンザ研究者たちを注目させた[1]．過去のインフルエンザ流行史の記載から，A型インフルエンザウイルスの中の同一亜型による流行は10～15年の周期で終っていることが明らかとなっている．1968年にはじめて登場した現在流行のAH3型ウイルスは，消滅期が近づきつつあることが予測されているので，米国で検出されたブタ型ウイルスは次期流行ウイルスの有力候補として注目されることになった．

しかし，1977年11月以降になって，ソ連をはじめ他の国々でAH1型ウイルスが患者から検出され[2]，同ウイルスによる感染流行が確認されるようになって，ヒトにおけるブタ型ウイルスの次期流行説は影をひそめることになった．一方，ブタ間におけるブタ型ウイルスの感染流行は依然として衰えることなく現在では日本全国に波及している[3]．前報[4]で述べたように東京都内でのブタ型ウイルスの感染は，1977年3月にはじめて確認されて以来，時を追って急速にその感染流行は拡大した．著者らは都内飼育のブタ間におけるその後のブタ型ウイルス感染流行実態を探るとともに，AH3型，AH1型およびB型インフルエンザウイルスの感染実態を調査する目的で1978年6月～79年3月までに採取した都内飼育ブタ血清についてHI試験を行ない，得られた検査結果を解析した．

実験材料と方法

ブタ血清　1978年6月～79年3月の間に採取した都内飼育ブタ（生後6～8カ月）の血清461例を実験に供した．供試血清は検査時まで−20℃で凍結保存した．

インフルエンザウイルスHA抗原　A/NJ8/76 (Hsw 1N1) 株，A/USSR90/77 (H1 N1)株，A/東京 659/77 (H3 N2) 株およびB/神奈川3/76株ウイルスをふ化鶏卵に培養し，常法にしたがって作成した[5]．

HI試験　常法に準拠してマイクロタイター法で行なった[6]．ブタ血清中の normal inhibitor はRDE処理によって除去し，ニワトリ赤血球凝集素は，RDE処理血清に5％の割合で洗浄ニワトリ赤血球を混和することによって除去した．

実験成績および考察

1978年6月～79年3月までに逐月採取したブタ血清合計461例についてインフルエンザウイルス抗原を用いて行なったHI試験の成績を表1～3に示した．ブタ血清についてのHI試験の場合，8×2^1 以下の低希釈血清は，しばしば添加した赤血球の像が乱れ，結果の判定に困難をきたすことがあるので 8×2^2 以上のHI価を陽性とした．表1～3の成績より陽性率および陽性例の平均HI価を算出して抗体保有状況の変遷経過を検討した．インフルエンザウイルス A/NJ8/76 株に対する陽性率は6～9月に下降傾向が，そして10月以降では上昇傾向がみられた．一方，同抗原に対する平均抗体価は6～10月に軽度の上昇を，そして，それ以降は下降傾向を示した（図1）．A/東京 659/77 株に対する抗体陽性率には顕著な逐月変動はみられず，また平均抗体価はきわめて安定していたが，ブタ型 A/NJ8/76 株に比べて，抗体陽性率，平均抗体価は共に低値であった（図2）．A/USSR90/77 株に対する抗体は1976年11月～77年7月までの289例では，すべて 8×2^1 以下であったが，78年7月以降になって，8×2^2 以上を示したものがわずかながら認められた．しかし，その陽性率，平均抗体価はともにきわめて低値であった．B/神奈川3/76 株に対する抗体は全例とも 8×2^1 以下であった．

以上の観察結果から次のようなことが推察された．都内飼育ブタ間におけるブタ型インフルエンザウイルスの感染流行は依然として高頻度で発生しており，その感染流行には閑期がある．ヒト型のAH3型ウイルスの感染

* 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.　1978年6月～1979年3月におけると場ブタの抗体保有状況

採血年月日	検査頭数	A/NJ 8/76株 HI抗体価 (8×2ⁿ) <1	1	2	3	4	5	6	7	≧8×2²の陽性率(%)	平均HI価
1978. 6.21	40	5	4	4	11	8	7	1		77.5	3.68
7.19	48	26		3	4	7	3	4	1	45.8	4.18
8.23	47	17	1	2	9	8	7	3		61.7	4.00
9.20,27	43	29	1	2	1	3	4	2	1	30.2	4.46
10.25	46	19			3	9	13	1	1	58.7	4.56
11.22	46	17	1	4	2	11	8	3		60.9	4.14
12.13	47			7	16	12	7	4	1	100.0	3.74
1979. 1.24	47	20	2	3	11	8	3			53.2	3.44
2.21	50	11	2	6	12	11	6	2		74.0	3.62
3.28	47	2	1	2	17	17	7	1		93.6	3.73
合　計	461	146	12	33	86	94	65	21	4		

表 2.　1978年6月～1979年3月におけると場ブタの抗体保有状況

採血年月日	検査頭数	A/東京 659/77株 HI抗体価 (8×2ⁿ) <1	1	2	3	4	5	≧8×2²の陽性率(%)	平均HI価
1978. 6.21	40	16	11	12	1			32.5	2.08
7.19	48	17	3	20	5	3		58.3	2.39
8.23	47	20	7	12	8			42.6	2.40
9.20,27	43	16	6	17	4			48.8	2.19
10.25	46	25	5	13	3			34.8	2.19
11.22	46	7	18	15	5		1	45.7	2.38
12.13	47	13	14	16	4			42.6	2.20
1979. 1.24	47	21	15	8	2	1		23.4	2.36
2.21	50	27	10	9	4			26.0	2.31
3.28	47	15	9	16	6	1		48.9	2.35
合　計	461	177	98	138	42	5	1		

表 3.　1978年6月～1979年3月におけると場ブタの抗体保有状況

採血年月日	検査頭数	A/USSR 90/77株 HI抗体価 (8×2ⁿ) <1	1	2	3	4	B/神奈川3/76株 <1	1	2	3
1978. 6.21	40	37	2	1			40			
7.19	48	45		2	1		48			
8.23	47	45	1	1			47			
9.20,27	43	40	1	2			43			
10.25	46	43	1	2			46			
11.22	46	41	3	1	1		36	10		
12.13	47	38	8	1			45	2		
1979. 1.24	47	43	3		1		46	1		
2.21	50	47	1	1	1		50			
3.28	47	47					46	1		
合　計	461	426	20	11	4		447	14		

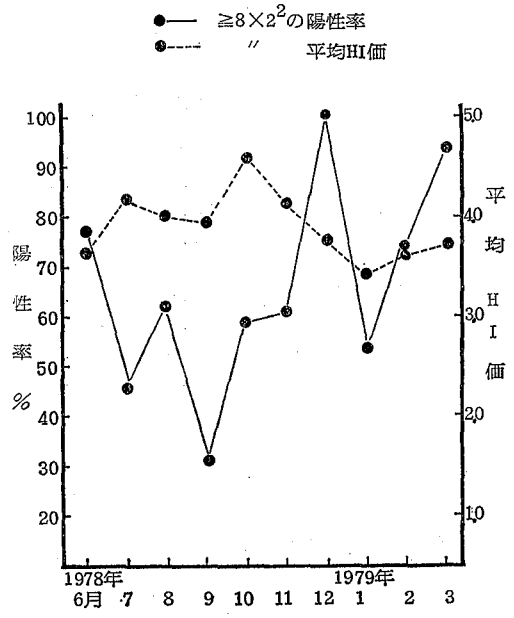


図 1. A/N J 8/76株に対する抗体保有の推移

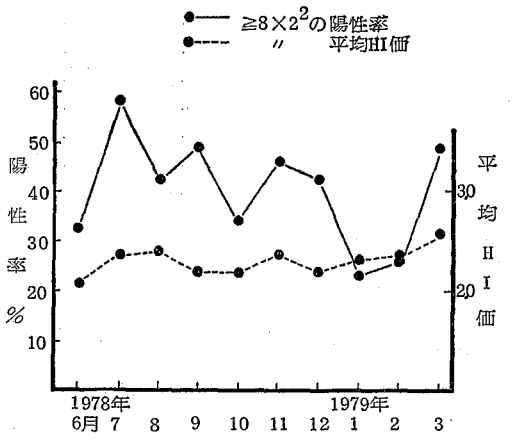


図 2. A/東京659/77株に対する抗体保有の推移

流行はブタ型ウイルスに比べると低頻度で発生し，流行消長にほとんど変動がない．AH1型ウイルスの感染はきわめて低率であるが，78年7月以降頃から発生しはじめた．B型ウイルスの感染はほとんど発生していない．

前述の観察事実について，さらに若干の考察を加えると，ブタに対する感染親和性の高いブタ型ウイルスが，ブタ間において高率に感染がおこっていることは，当然のことと受けとれるが，感染流行に顕著な閑期のみられたことは，きわめて興味のあるところである．この事実は，親和性の高いブタ型ウイルスのブタ集団内での感染流行が急拡大し，同一集団内に感染感受性のある個体が少なくなったところで流行は一時休息することになり，未感染個体が補給増加された時点になって流行が再び拡大することを考えさせる．一方，ブタ型ウイルスに比べてブタに対する親和性の低いと考えられるAH3型ウイルスのブタ集団における感染は急拡大することなく，細々と続くために明らかな逐月変動がなかったと考える．

結　論

1978年6月～79年3月までに採取した都内飼育ブタ血清461例についてブタ型およびヒト型インフルエンザウイルスに対するHI抗体保有調査を行なって次の結論を得た．

1. ブタ型ウイルスに対しては調査期間中高率にHI抗体保有が認められた．流行閑期の存在が想定された．

2. AH3型ウイルスに対する抗体保有状況はブタ型に比べ，抗体陽性率，平均抗体価ともに低値であり，調査期間を通じてその値に変動がほとんどみられなかった．

3. AH1型ウイルスの感染はきわめて低率であった．B型ウイルス感染は認められなかった．

文　献

1) *Morbidity and Mortality Weekly Report* : 25, 21, 1976
2) *Weekly Epidemiological Record* : 50-16, 401, 1977
3) 武内安恵：公衆衛生情報，1，4，1978
4) 岩崎謙二，伊藤忠彦，山崎清ほか：東京衛研年報，29-1，58，1978
5) 岩崎謙二，伊藤忠彦，吉田靖子ほか：東京衛研年報，27-1，74，1976
6) 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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 43-46, 1979

1963～78年の都内飼育ブタ間における日脳ウイルス感染の血清疫学

岩崎謙二*, 吉田靖子*, 関根整治*

Seroepidemiology of Japanese Encephalitis Virus Infections among Swine in Tokyo, 1963–1978

KENJI IWASAKI*, YASUKO YOSHIDA* and SEIJI SEKINE*

Keywords：血清疫学 seroepidemiology, 日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus, ブタ swine

まえがき

著者らは1962年以来毎年都内飼育ブタを対象にした日脳ウイルス感染調査を行い，ＨＩ抗体獲得率，ウイルス検出率など実測値の経過変化から当該年次の都内における日脳ウイルス汚染実状を究明し，単年次成績についてはすでに報告してきた[1–11]．それら成績から年次経過変遷を探ると，都内のウイルス汚染状態は1970年以降明らかに低下しており，近年はきわめて低汚染状態にあることが明らかである．

本研究ではこの実状を数理論的に解明することに焦点をおいた．ブタ集団の日脳ウイルス感染を支配する多くの想定要因の中から幾つかの主要因を抽出し，単純化した感染流行拡大様式を設定し，実際の調査成績を解析して感染流行拡大の諸要因の影響，流行期間，規模などを検討した．

実験材料と方法

被検ブタ血清　実験に供したブタ血清はと殺時に採取した都内飼育の肥育ブタ血清である．

日脳ウイルスＨＩ試験　常法に準じ[12]，マイクロタイター法によって実施した．ＨＡ抗原は市販品（武田薬品ＫＫ）を使用した．

日脳ウイルス分離と同定　日脳ウイルス抗原に対するＨＩ価が＜10であった被検血清については，乳のみマウス脳内接種を行って日脳ウイルス分離を試みた．ウイルス分離と同定は常法にしたがって行った[12]．

実験成績と考察

1963～78年の都内飼育ブタにおける日脳ウイルス感染調査成績　1963～78年各年次の流行期に行ってきた都内飼育ブタにおける日脳ウイルス感染率（JaGAr 01株抗原に対するＨＩ価が10以上）の経過推移調査成績を図示すると図１のとおりである．

年間最高感染率値は1969年以前の各年では100％ないしそれに近い高値を示していたが，1970年以降は明らかに低下し，わずか10％台にとどまった年次もあった．

各年次の感染率経過曲線の急上昇時期は年次によって差があったが，近年における立上り時期は後退している．都内における日脳患者発生があった1967年以前の年間最高感染率値はきわめて高値であった．日脳患者発生数の多い年次ほど感染率経過曲線の急上昇時点が早くなっている傾向が観察された．

1965～78年の供試ブタ血清の中からＨＩ価10以下であった8440例について実施した日脳ウイルス分離試験結果を図１の下段に示した．

２回以上ウイルスを検出した年次について，初回と終回ウイルス検出血清の採血月日をみると，1966年は８月８日と８月15日，67年は７月31日と８月11日，69年は８月25日と９月11日，70年は９月７日と10月12日，72年は９月18日と10月30日，75年は８月25日と９月29日であった．

最高感染率値が高値であった1966，67，69の各年次は短期間，最高感染率値が低値であった1970年，72，75の各年次は長期間にわたって日脳ウイルスが検出された．

この傾向は同時に実施した感染ブタにおける２ＭＥ感受性抗体検出試験の結果ともよく一致した．

この観察結果は年間最高感染率値の高い年の感染流行は短期間内に終息し，低い年の感染流行は長期間持続することを示唆する．

ブタ集団での日脳ウイルス感染流行拡大の理論構成　日脳ウイルス感染流行の拡大に関与する自然界の諸要因の中から，集団内の感受性個体数，感染源個体数およびウイルス伝播係数の３要因をとり上げ，流行過程の各時点における発生新感染個体数を上記３要因の積としてとらえるきわめて単純化した理論構成で解析を展開した．

先ずウイルス伝播係数値の影響力を確かめる目的で，出発時点の感染源の大きさ（Ｖ）を一定にしておき，異った幾つかのウイルス伝播係数値を与えたとき算出され

* 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, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

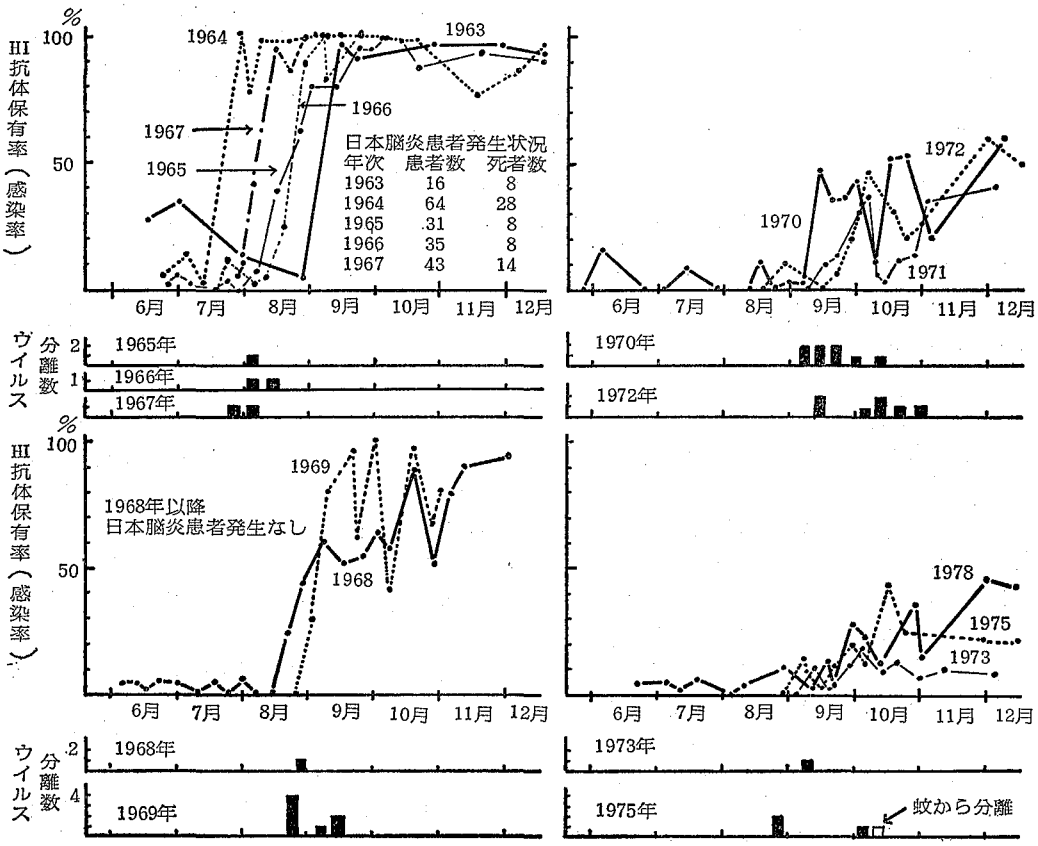


図 1. 1963～1978年東京都における場ブタ血清の日脳ＨＩ抗体
(JaGAr 01株) 保有状況とウイルス分離状況

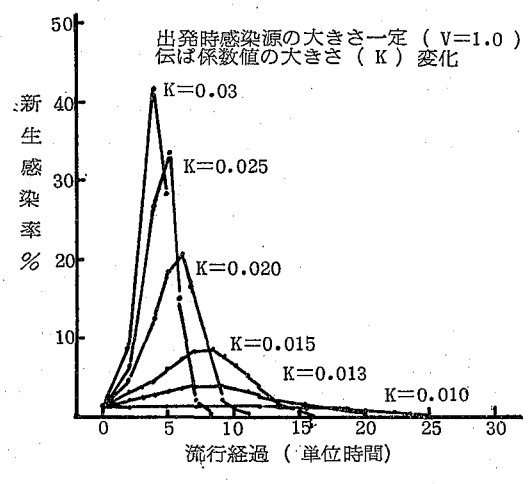


図 2. 感染伝播率別の新生感染率曲線

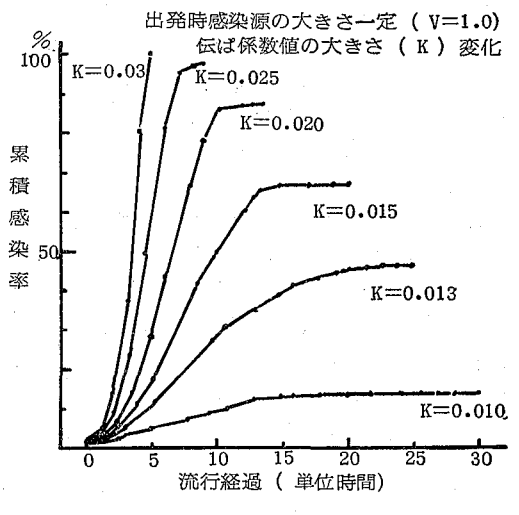


図 3. 感染伝播率別の累積感染率曲線

る各時点の新感染個体比率の経過曲線およびその累積値曲線を図2，3に示した．

ウイルス伝播係数値の大きさで流行期間の長さが決定づけられることがわかる．最高感染率値からウイルス伝播係数の大きさを推定することは容易である．

次は感染出発時点における感染源の大きさの影響力の検討である．ウイルス伝播係数値の大きさ（K）を一定にしておき，値の異った出発時の感染源の大きさを与えたとき算出される各時点の新感染個体比率累積値曲線を図4に示した．

感染源の大きさの影響は曲線の平行移動（x軸上）となってあらわれる．すなわち曲線立上り時点のみの変化である．感染源の大きさは最高感染率値の大きさにほとんど影響を与えないが，ウイルス伝播係数値が小さくなると若干の影響がでてくる．

実測成績の適用をはかるとき，流行経過上の1時間単

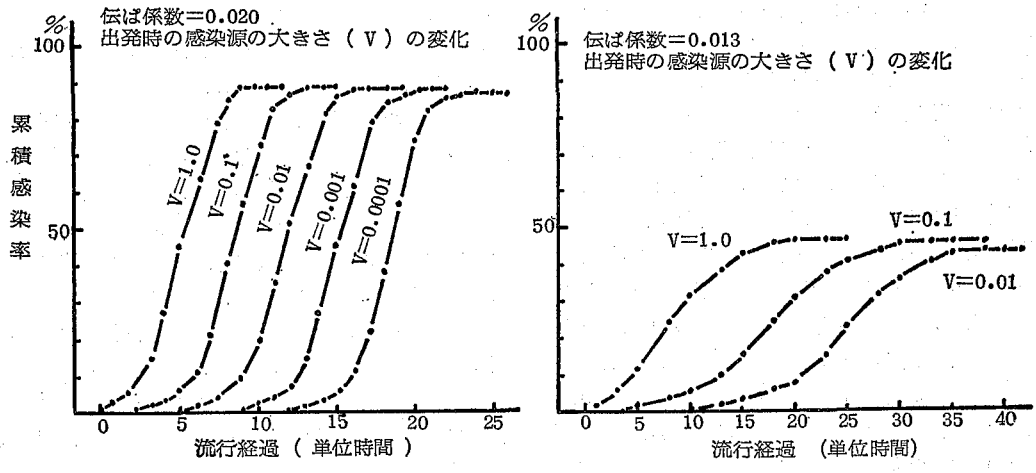


図 4.　出発時感染源の大きさと累積感染率曲線

表 1.　東京都下飼育豚間における日脳ウイルス感染流行の年次推移解析

年次	観測成績		計算成績		
	年間最高感染率（HI抗体陽性率）	年間最高2ME感受性抗体陽性率	ウイルス伝播係数	年間最高感染率	最高新感染発生率
1963	98.2%（9—12）		0.0223	93.2%	25.7%
1964	100.0（7—30）		0.0224	93.5	26.1
1965	98.6（10— 9）		0.0219	92.5	24.4
1966	100.0（8—29）		0.0218	92.3	24.1
1967	100.0（9— 4）		0.0246	97.6	32.3
1968	91.0（10—15）	19.2%（8—26）	0.0163	72.8	10.1
1969	100.0（9—29）	28.6（9— 8）	0.0194	85.5	18.9
1970	50.0（9—14）	18.2（9—14）	0.0126	43.0	3.4
1971	38.0（9—27）	7.7（9—13）	0.0118	30.0	2.2
1972	48.0（10— 9）	14.0（10— 9）	0.0131	47.3	4.1
1973	29.0（10— 1）	7.8（9—10）	0.0120	25.6	2.5
1974	16.0（9—24）	2.0（9—24）	0.0093	7.3	0.8
1975	46.0（10—13）	14.0（9—29）	0.0118	31.6	2.2
1976	26.0（7—28）	2.0（8—25）	0.0082	4.8	0.6
1977	32.0（9—28）	4.0（9—28）	0.0110	23.4	1.4
1978	46.0（11—22）	6.0（10— 4）	0.0113	27.8	1.6

（ ）内の数値：検体採取月日

位を何日とするかがまず問題になる．次項で述べる1963～78年の調査成績の適用においては，1時間単位を 1/2 週として扱ったところ実測値との適合度がよかった．

1963～78年の都内飼育ブタにおける日脳ウイルス感染調査成績の理論解析　前報に詳述した1963～78各年の都内飼育ブタ間における日脳ウイルスＨＩ抗体保有率推移調査成績から JaGAr 01 株抗原に対するＨＩ価10以上を示した個体を感染ブタとみなして，感染率上昇始点～終点の成績値を抽出し，前項の数理論に基いて各年次別のウイルス伝播係数値，年間最高感染率値(新感染発生率値の累積値）および最高新感染発生率値を算出した[1-11]．それら算出値を実測最高感染率値および実測の最高２ＭＥ感受性抗体検出率値と対比して表１に示した．

各年次の最高感染率値の実測値と計算値を対応させて相関性を検討したところ，0.98以上の係数値となり両値の間には強い正の相関のあることが確認された．

実測値である最高２ＭＥ感受性抗体検出率値と計算値である最高新感染発生率値を対応させて相関性を検討すると，係数値は0.87となり両値間に強い正の相関性を認めたが，最高感染率値に較べて相関性が多少劣った．

都内で日脳患者発生があった1963～67年のウイルス伝播係数値はいずれも 0.020 以上の値を示していたが，患者発生数は係数値の大きさに比例しなかった．患者発生がみられなくなった1968年以降各年次の伝播係数値は0.020を越えることがなかった．

最高新感染発生率値対最高２ＭＥ感受性抗体検出率値の比をみると，最高感染率値が高値であった1968，69の両年は１：1.9，１：1.5であったが，最高感染率値の低値であった1970年以降の各年は１：2.5～１：6.4と両値の差が大であった．

２ＭＥ感受性抗体は生体内で１週～10日程度保持されるので，実測２ＭＥ感受性抗体検出率には流行経過１時点における新感染発生個体ばかりでなく当該時点以前の１部感染個体をも含めた比率になるので，計算値の最高新感染発生率値よりも実測の最高２ＭＥ感受性抗体検出率値は常に大となっている．

1968，69年と70年以降各年における両値の比にみられた差は図２に示したウイルス伝播係数値別の新感染発生率曲線のパターンと対比すれば容易に理解することができる．

直観的には感染開始時期のずれとして理解される1963～67年における感染率推移曲線の立上り時点のずれは，理論的には感染開始時の感染源の大きさは常に一定であるとする仮定の下で直観的判定は承認されるものである．感染開始時は一定であるとすれば感染源の大きさが関与することになる．

疫学的な観測値には一定の条件を設定した場合にはじめてその意義が理解されるものが多い．

結　論

1963～78年の都内飼育ブタ間における日脳ウイルスＨＩ抗体保有率逐時調査成績から感染実態の年次変遷経過を究明した．

1）年間最高ＨＩ抗体保有率値（JaGAr 01株抗原，ＨＩ価≧10）およびブタ血清からのウイルス分離成績の観察によって都内飼育ブタ間における日脳ウイルス感染流行は1970年以降急激に縮小したが，流行期間は反対に長期化したことを明らかにした．

2）ウイルス伝播係数，感受性個体比率および感染源比率の３要因から構成する単純な流行拡大理論を想定し，数量的に実測成績を解析した．年間最高感染率値はウイルス伝播係数値の大きさと，また感染率急上昇時点の年次差は感染開始時の感染源の大きさと密接に関連していることを明らかにできた．

ウイルス伝播係数値が大になるほど流行は短期間内に終息することも明らかにできた．

謝辞　計算処理に際して，コンピュータープログラム作成に当研究所野牛弘所長の御援助を受けた．深く感謝します．

文　献

1）藪内　清，岩崎謙二，村上　一ら：東京衛研年報，20，39，1969
2）藪内　清，岩崎謙二，坂井冨士子ら：東京衛研年報，21，19，1970
3）藪内　清，佐々木路子，坂井冨士子ら：東京衛研年報，22，57，1971
4）藪内　清，佐々木路子，坂井冨士子ら：東京衛研年報，23，35，1972
5）藪内　清，坂井冨士子，伊藤忠彦ら：東京衛研年報，24，75，1973
6）藪内　清，坂井冨士子，伊藤忠彦ら：東京衛研年報，25，53，1974
7）柳澤靖子，藪内　清，伊藤忠彦ら：東京衛研年報，26-1，73，1975
8）吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二ら：東京衛研年報，27-1，66，1976
9）吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二ら：東京衛研年報，28-1，40，1977
10）吉田靖子，藪内　清，関根整治ら：東京衛研年報，29-1，79，1978
11）吉田靖子，藪内　清，関根整治ら：東京衛研年報，30-1，47，1979
12）大谷　明：ウイルス実験学各論，124，1967，丸善，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 47-51, 1979

1978年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 in Tokyo in 1978

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

Keywords: 疫学 epidemiology, 日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus, ブタ swine, 蚊 mosquito

緒　言

都内における日本脳炎（以下日脳と略す）ウイルスの汚染状況を知る目的で，と場ブタ血清のＨＩ抗体獲得状況を調査してきたが，ヒトの日脳患者発生が激減した現在では，患者が多発していた10数年前とくらべるとブタのＨＩ抗体獲得率は低下し，さらに感染流行の期間が不明瞭になった．しかしブタ間で日脳ウイルスの伝播が存在していることは明らかである[1]．

1978年日本全国の日脳患者発生数は88名で，数年ぶりの多発であった．その大半が九州地区に集中発生した事実は，今後の日脳患者発生動向に再び強い関心をひくことになった[2]．

本報では都内飼育ブタを対象とした1978年の抗体獲得状況調査結果から都内における日脳ウイルス汚染状況を推測する一方，一般都民の日脳ウイルス抗体保有調査も行ったのであわせて報告する．

実験材料および方法

患者血清　1978年７月と９月に発病した急性脳炎の疑いの患者２名から採取した計３件の血清である．

都内飼育ブタ血清　1978年１～12月に都下多摩地区で飼育されたブタからと殺時に採取した血清1,250件である．

健康都民血清　1978年５月19日～７月27日・９月11～18日に都内居住健康者から採取した血清406件である．供血者の年令範囲は２～86才で，都区内に住む240名と多摩地区２市に住む166名である．

ＨＩ試験　既報に準じてマイクロタイター法により実施した[3,4]．抗原は市販品を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　既報に準じた[3,4]．

検査成績および考察

疑似日脳患者の血清学的検査成績　血清学的検索を行った急性脳炎の疑いの患者２名は，７月20日・９月９日にそれぞれ発病した47才と10才の女性であった．採取した患者血清３件について，日脳ウイルス中山株・JaGAr 01株抗原を用いＨＩ試験を行ったが，急性期・回復期血清をペアで得られた47才の患者は，抗体の有意上昇が認められなかった．死亡により単一血清（11病日）しか得られなかった10才の患者は日脳ＨＩ抗体価中山・JaGAr 01株とも80倍を示したが，２ＭＥ感受性抗体は検出できず最近における日脳ウイルス感染は肯定できなかった．アデノ，コクサッキーＢ群，ヘルペス，ムンプスおよびポリオ１～３型の各抗原に対するＣＦ試験を行ったが，これらウイルスに対する有意の抗体価上昇は認められなかったことから，本疾患の病因は確定できなかった．

都内飼育ブタの日脳ＨＩ抗体獲得状況　1978年１～12月に都下多摩地区11ヵ所で飼育されたブタから採取した血清について，日脳ＨＩ抗体価（JaGAr 01株）を測定し，採血日時別の検査成績を表１に示した．

調査ブタのＨＩ抗体獲得率（ＨＩ価≧10）は８月初旬０％であったが，８月下旬以降獲得率は上昇しはじめ，抗体価の高いものが出現し，都内の日脳ウイルス汚染の動きが活発化したことが推測できた．また２ＭＥ感受性抗体も９月初旬から10月中旬まで出現し，1978年の都内日脳感染流行はほぼこの間に発生したと推定された．

1978年日脳ウイルス汚染が活発化しはじめた８月23日以降のブタ血清600件についてＨＩ価別の分布を図示すると，図１のようになりＨＩ価80に谷があった．

表１の成績からＨＩ価≧10と≧80について抗体獲得率を算出し図示すると図２になる．

両者の経過曲線は９月中旬まで開きがあったが，曲線

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

表 1. 1978年東京都におけると場ブタの日本脳炎ＨＩ抗体獲得状況

採血月日	検査数	HI抗体価 (JaGAr 01株)											陽性率 (≧10)	2ME感受性抗体保有率(透析法)		ウイルス分離***
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	≧5120				
78. 1.25	50	44	1				3		1	1			12%	0/5*	0%**	0/44
2.22	50	44					2	3		1			12	0/6	0	0/38
3.22	50	46	3										8	0/1	0	0/43
4.19	50	50											0			0/49
5.17	50	49								1			2	0/1	0	0/49
6.21	50	49	1										2			0/47
7. 5	50	48		1		1							4	0/1	0	0/48
7.12	50	49	1										2			0/49
7.19	50	47	2		1								6	0/1	0	0/47
7.26	50	49	1										2			0/49
8. 2	50	50											0			0/50
8. 9	50	50											0			0/50
8.17	50	47	3										6			0/47
8.23	50	48	1			1							4	0/1	0	0/48
8.30	50	45	2					1	2				10	0/3	0	0/45
9. 6	50	41	4	2	1			1		1			18	2/3	4	0/41
9.13	50	43	6	1									14			0/43
9.20	50	47	1						2				6	0/2	0	0/46
9.27	50	41	2							7			18	1/7	2	0/41
10. 4	50	37	1				1		2	4	5		26	3/12	6	0/37
10.11	50	43							3	3		1	14	2/7	4	0/43
10.18	50	30			1	1	4	3	8	3			40	2/20	4	0/30
10.25	50	44		3					1	2			12	0/3	0	0/44
11.22	50	27			1			4	8	7	3		46	0/23	0	0/27
12.13	50	29					8	8	4	1			42	0/21	0	0/29

* ヨードアセトアミド法 2ME感受性抗体陽性例/HI価 ≧40の例数
** %=(2ME感受性抗体陽性例/全検査数)×100
*** ウイルス分離はHI抗体価<10について，乳のみマウスを用いて行った．

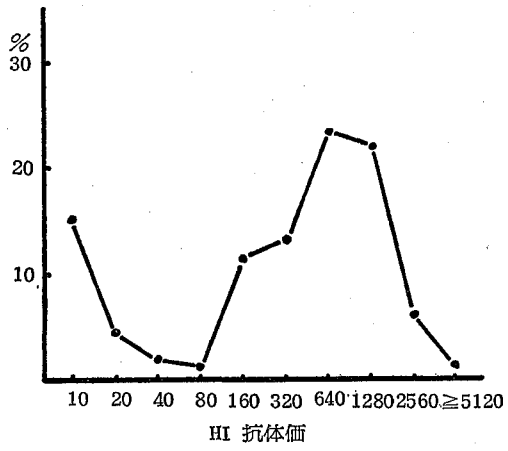


図 1. 1978年ブタ血清における日脳ＨＩ抗体価別の分布

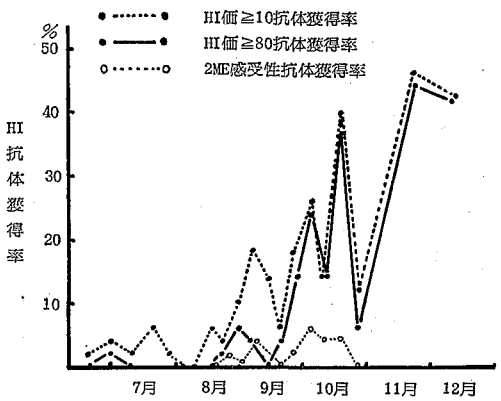


図 2. 1978年ブタ血清における経時的日脳ＨＩ抗体獲得率

の急上昇がはじまった9月下旬以降はきわめて平行接近した.

1978年全国各地におけるブタ間での日脳汚染度は非常に高かった. 厚生省の流行予測調査で得られたブタのHI抗体獲得率より日脳ウイルス汚染が推定された地区は, 東北地方の秋田・宮城県を含む2府37県に拡がっていた[5]. 汚染指定は沖縄県の6月29日を始めに, 10月23日の三重県まで続き, 全国的な日脳ウイルス感染流行期間は4カ月におよんだ. 東京都ではブタでの日脳HI抗体獲得率が50%以上に達せず, 日脳ウイルスの汚染指定はなかったが, 2ME感受性抗体をもったブタの出現時期から, 8月下旬から9月下旬まで日脳ウイルスの感染流行したことは明らかである.

1978年に採取した都内飼育ブタ血清計1250件について, HI価≧10を示した血清比率をみると JaGAr 01株抗原では153例 (12.2%)・中山株抗原では119例 (9.5%) であった.

6月以降の採取ブタ血清のうち, 両株抗原に対しHI価≧10を示した103例について平均HI価 (5×2^n) を算定し比較したところ, 中山株では $n=4.75\pm1.65$・JaGAr 01株では $n=5.49\pm2.68$ となり, 明らかにJaGAr 01株抗原の方が高かったが, 両抗原に対するHI価の間には強い正の相関性が観察された (相関係数 0.8606).

一方, 両株抗原に対するHI価が<10であった1087例については, 乳のみマウス脳内接種を行って日脳ウイルス分離を試みたが, ウイルスは全く検出できなかった.

コガタアカイエカの消長およびウイルス分離試験

1978年7月4日から10月31日にかけて都内5地点に一定日数の間隔でライトトラップを設置して飛来する蚊を捕集し, 捕集数消長を調査するとともに, 捕集したコガタアカイエカの雌についてウイルス分離試験を行った. 捕集コガタアカイエカ数の経時的消長を図3に示した.

雌コガタアカイエカは7月4日から10月3日にわたって捕集された. A～C調査地点では7月18日以降に捕集蚊数が増加し8月4日から8月11日にかけてピークがみられた. 8月22日以降になってもかなりの数の蚊が捕集されたが, 数の変動は激しかった. D・E調査地点では, A～C地点にくらべてはるかに捕集蚊数は少なかっ

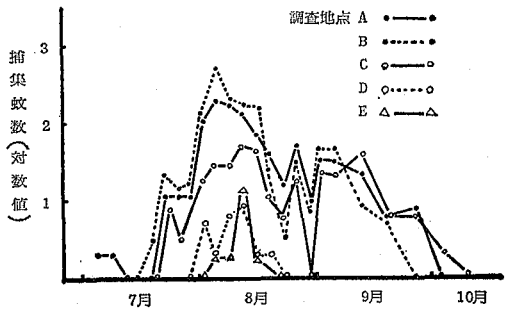


図 3.　雌コガタアカイエカの出現消長

表 2.　1978年一般都民における日本脳炎HI抗体保有状況

年令階層	検査数	HI抗体価 (JaGAr 01株) <10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	≧5120	抗体保有率 (≧10)	平均HI抗体価 (5×2^n)
≦5	40	7	5	5	5	5	8	3		1	1		82.5%	3.79±2.01
6～12	149	56	41	14	14	7	8	7	1	1			62.4	2.54±1.81
13～16	32	13	12	5	1	1							59.4	1.53±0.84
17～30	61	44	10	2	4	1							27.9	1.76±1.03
31～59	63	34	9	11	6	3							46.0	2.07±0.98
60≦	61	13	17	14	9	4	4						78.7	2.25±1.26

年令階層	検査数	HI抗体価 (中山株) <10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	≧5120	抗体保有率 (≧10)	平均HI抗体価 (5×2^n)
≦5	40	10	6	5	7	8	2		1	1			75.0%	3.13±1.72
6～12	149	88	27	14	3	5	7	3	2				40.9	2.48±1.81
13～16	32	20	10	2									37.5	1.17±0.39
17～30	61	52	7	1	1								14.8	1.33±0.71
31～59	63	40	20	3									36.5	1.13±0.34
60≦	61	31	19	7	2	1	1						49.2	1.60±1.00

たが，ピークは8月11日にありA～C地点と変わらなかった．ブタのHI抗体獲得率上昇が著明にみられたのは8月下旬以降であったが，捕集蚊数のピークはそれより先行して8月初旬～中旬にあった．

1978年に捕集した雌コガタアカイエカは2622匹で，これら捕集蚊を101のプール材料にして乳のみマウスの脳内に接種してウイルス分離試験を試みたが，日脳ウイルスを検出することはできなかった．

同期間中当研究所鶏舎内に4羽のウサギを飼育し，定期的に採血を行い日脳ウイルスHI抗体獲得状況を調査したが，調査期間中抗体上昇はみられなかった．

一般都民における日脳抗体保有調査　1978年5月19日～7月27日・9月11～18日に都内居住健康者406名から採血を行い，日脳ウイルス中山・JaGAr 01株両抗原を用いて血中HI抗体価を測定した．

供血者の年令は2～86才であり，年令階層別の抗体検索集計成績を表2に示した．

日脳ウイルス中山・JaGAr 01株に対するHI抗体保有率（HI価≧10）は年令階層によって明らかに差がみられた．いずれの年令階層においても中山株よりJaGAr 01株に対する抗体保有率の方が高かった．年令推移変化をみると両株ともに17～30才を底とした中だるみ像がみられた．

各年令階層別の平均HI抗体価を算出して比較すると，中山株よりJaGAr 01株の方が高かったが，年令推移傾向は両者に差がなく最高値は≦5才・最低値は13～16才でみられた．17～30才以降は年令上昇にともなって，抗体価再上昇傾向がみられたが，その度合は中山株よりJaGAr 01株でより明らかであった．

≦5才の被検者40名中JaGAr 01株に対するHI価＜10の7名は日脳ワクチン未接種者であり，77年ワクチン接種者16名の平均HI価はn＝4.69±1.92で，5才以下全体の平均HI価n＝3.79±2.01にくらべて明らかに高値であった．

各年令階層における抗体保有状況を回帰分析法[6,7]によって比較するため表2の実測値から算出した回帰直線を図4に示した．

各年令階層によって特色のある回帰直線がみられた．≦5才の年令階層では累積HI抗体保有率（a値）は一番高く，最高HI価（|a/b|値）も高かった．それ

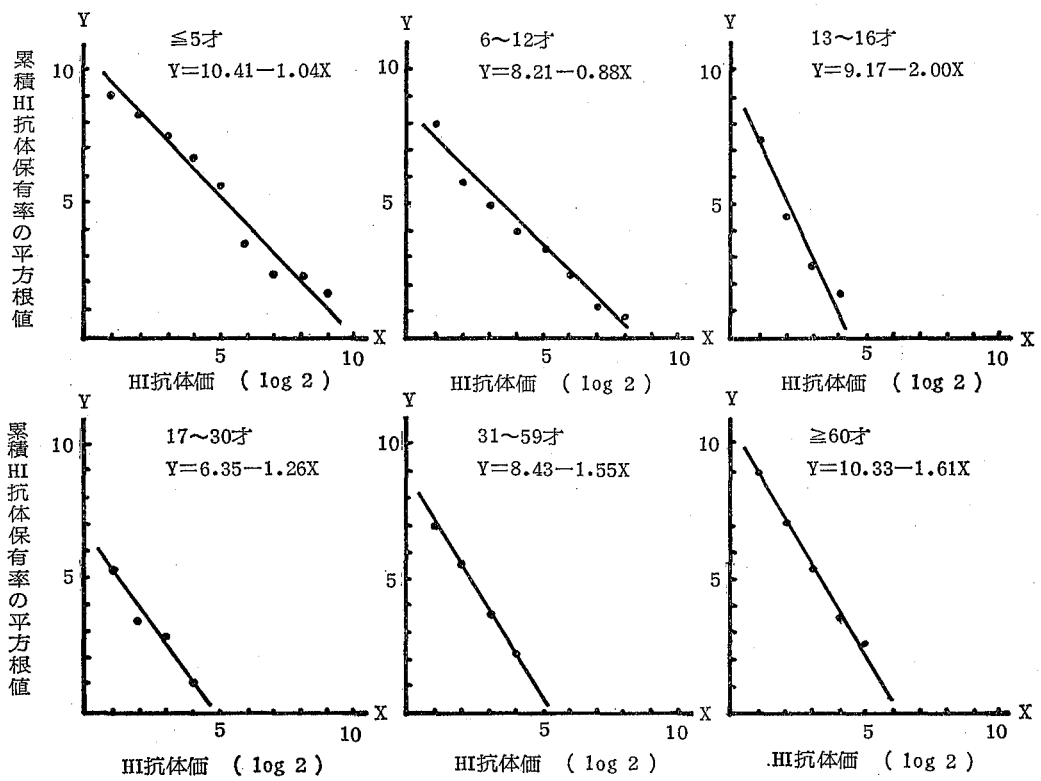


図 4.　各年令階層別のHI抗体保有率値の回帰直線（JaGAr 01株）

表 3. 一般都民における日本脳炎抗体保有状況

年令階層	検査数	HI陽性率（≧10）		HI抗体陰性者におけるNT陽性数		日本脳炎抗体陽性率	
≦ 5	40	J 33/ 40 N 30/ 40	82.5% 75.0	2/ 7	28.6%	35/ 40	87.5%
6～12	149	J 93/149 N 61/149	62.4 40.9	36/56	64.3	129/149	86.6
13～16	32	J 19/ 32 N 12/ 32	59.2 37.5	3/12	25.0	22/ 32	68.8
17～30	61	J 17/ 61 N 7/ 61	27.9 14.8	28/43	65.1	46/ 61	75.4
31～59	63	J 30/ 63 N 20/ 63	46.0 36.5	19/33	57.6	49/ 63	77.8
60≦	61	J 48/ 61 N 30/ 61	78.7 49.2	11/13	84.6	59/ 61	96.7

に対して17～30才の年令階層では，a値・｜a/b｜値とも一番低かった．

1978年採取した406例の血清のうち JaGAr 01・中山株両抗原に対するHI価が<10であった164例については，プラック減少法によって JaGAr 01株ウイルスに対する日脳中和抗体価を測定し，結果を表3に示した．

164例中99例（60.4%）は中和抗体価>10を示した．中和抗体保有率を加算した年令階層別日脳抗体保有率をみると，最低値68.8%（13～16才）・最高値96.7%（≧60才）を示し，HI抗体でみられた中だるみ的年令推移傾向は明らかでなくなった．

結　論

1978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い，次の結論を得た．

1) 1978年1～12月に都内飼育ブタを対象にして行った日脳ウイルス抗体獲得率（HI価≧10）の逐時調査成績によって日脳ウイルス感染は8月23日以降増加し，11月22日に46%に達した．

都内飼育ブタでのHI抗体獲得率が40%台に到達し，その値を持続したのは6年ぶりのことであった．2ME感受性抗体保有のブタは9月6日～10月18日に検出された．

2) 抗体価≧10と≧80のブタHI抗体獲得率経過推移を対比すると，9月中旬まで開きがあったが，下旬以降は両者の値はほぼ一致した．

3) 2622匹の雌コガタアカイエカを捕集したが，日脳ウイルスは検出できなかった．コガタアカイエカの出現ピークは8月上旬～中旬にあった．

4) 一般健康都民の年令階層別日脳HI抗体保有率は，JaGAr 01株で最高82.5%（≦5才）・最低27.9%（17～30才），中山株で最高75.0%（≦5才）・最低14.8%（17～30才）となり顕著な差がみられた．しかし中和抗体保有率を加算した日脳抗体保有状況では，最高96.7%（≧60才）・最低68.8%（13～16才）となり，年令階層間の差は小さくなった．

文　献

1) 吉田靖子，藪内　清，岩崎謙二ら：東京衛研年報，28-1，44，1977
2) 厚生省伝染病予防部会資料，1979. 3
3) 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
4) 吉田靖子，藪内　清，関根整治，岩崎謙二ら：東京衛研年報，29-1，79，1978
5) 厚生省保健情報課：全国日本脳炎情報，1978
6) 岩崎謙二：東京衛研年報，26-1，81，1975
7) 岩崎謙二：東京衛研年報，30-1，43，1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 52-55, 1979

回帰分析法を応用した東京都民のムンプスＨＩ抗体保有内容の解析

岩崎謙二*, 吉田靖子*, 関根整治*

Regression Analysis on the Incidence of HI Antibody against Mumpsvirus in Healthy People in Tokyo

KENJI IWASAKI*, YASUKO YOSHIDA* and SEIJI SEKINE*

Keywords：血清疫学 seroepidemiology, ムンプスウイルス mumpsvirus, 回帰分析 regression analysis

まえがき

最近における一般都民のムンプスウイルス血中抗体保有実状を調査する目的で，健康住民875名の血清についてムンプスウイルスＨＩ試験を行った．

検索ウイルス種類とは関係なく，集団の抗体保有状況を代表させる数値として抗体保有率値や平均抗体価は広く利用されているが，抗体保有率値は通常特定１点の値で代表しているので，抗体価別の分布内容をあらわすまでにはなっていない．

著者らは集団の抗体保有状況を，異なった値の抗体価数点の抗体保有率値を一定関連の形，すなわち各抗体価別の累積抗体保有率値を抗体価への回帰としてとらえる発想で，都民のムンプス抗体保有状況の内容的表現ならびに年令階層別の比較解析を試みた．

実験材料と方法

被検血清　1978年１年間を通して採取した健康都民血清875例を実験に使用した．供血者の年令は１～94才で，供血者の年令階層区分別に整理したそれぞれの供試血清数は表１に示した．被検血清は－20°に凍結保存した．

ムンプスウイルスＨＩ抗原　Enders 株ウイルスをふ化鶏卵内で培養増殖させて作成した．ウイルス培養は常法にしたがって行った[1]．抗原ウイルスの感染能はチメロサール添加によって不活化した．抗原は４°に冷蔵保存した．

ムンプスウイルスＨＩ試験　被検血清の抗体価はＨＩ試験で測定した．HI試験は常法に準拠して実施した[1]．RDE 処理によって被検血清のインヒビターを除き，クック社製96チャンネルの自動ドロッパーと自動ダイリューターを使用し，マイクロタイター法で実施した．

実験成績と解析結果

一般都民のムンプスウイルスＨＩ抗体保有　供試血清875例のムンプスウイルス試験成績を，10才刻みの８年令区分に整理して，ＨＩ価分布を示すと表１のとおりである．

ＨＩ価 2×2^1 以上の累積抗体保有率値を年令階層区分別に算出して比較すると，最高値（95.9%）は11～20才で，最低値（77.1%）は31～40才でみとめられ，年令推移傾向を探ると明らかな中だるみ現象が観察された．

ＨＩ価 2×2^2 以上と 2×2^3 以上の累積抗体率値を算出して同様の解析を行うと，全く同型の中だるみ的年令推移傾向をみとめたが，中だるみの度合は基準抗体価の上昇にともなってますます大きくなった．

またＨＩ価 2×2^1 以上の抗体陽性血清について，年令階層区分別平均ＨＩ価（2×2^n のｎ値）を算出して比較すると，１～10才では3.48，11～20才では3.21という高値であったが，他の年令階層の値は2.01～2.71と前２者の値に較べて低値であった．平均ＨＩ価の年令推移傾向も前述した抗体保有率値と同様の中だるみ像がみられたが，抗体保有率値に較べればその度合が不鮮明であった．

以上は一般に常用されている抗体保有率値および平均抗体価を利用した解析結果であるが，検索集団の抗体保有内容を一元的にあらわし得る抗体保有率値が得られず，また表１に示した抗体価分布成績から直観的に感じとれた年令階層区分間の差は算出した平均ＨＩ価の比較ではその差が縮小されている．

回帰分析法の導入と解析結果　表１の実測値をもとにして年令階層別に，ＨＩ価 4×2^6，4×2^5，4×2^4，4×2^3，4×2^2，4×2^1，4×2^0 それぞれの累積抗体保有率値を計算し，横軸に抗体価目盛（4×2^n のｎ値）を，縦軸に抗体保有率値目盛（平方根値）を刻んだグラフ紙上に対応計算値をプロットすると図１のようになる．

同一集団の各累積抗体保有率値はグラフ紙上でほとん

* 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.　1978年における一般都民のムンプスウイルスＨＩ抗体保有調査成績

年令区分	検査例	ＨＩ抗体価分布（2×2^n）								≧ＨＩ価2×2^n 陽性率	≧ＨＩ価2×2^n 平均ＨＩ価
		<1	1	2	3	4	5	6	7		
1～10才	141	20	11	13	32	39	24	2		85.8%	3.48±1.23
11～20	122	5	13	17	40	32	11	3	1	95.9	3.21±1.27
21～30	327	74	79	100	47	23	3	1		77.4	2.11±1.01
31～40	105	24	33	24	16	6	2			77.1	2.01±1.07
41～50	63	15	17	17	8	5	1			76.2	2.08±1.07
51～60	44	6	12	9	13	4				83.4	2.24±1.02
61～70	43	3	5	18	14	3				93.0	2.38±0.81
71～94	30	2	4	6	12	6				93.3	2.71±0.98
計	875	149	174	204	182	118	41	6	6	83.0	2.55±1.23

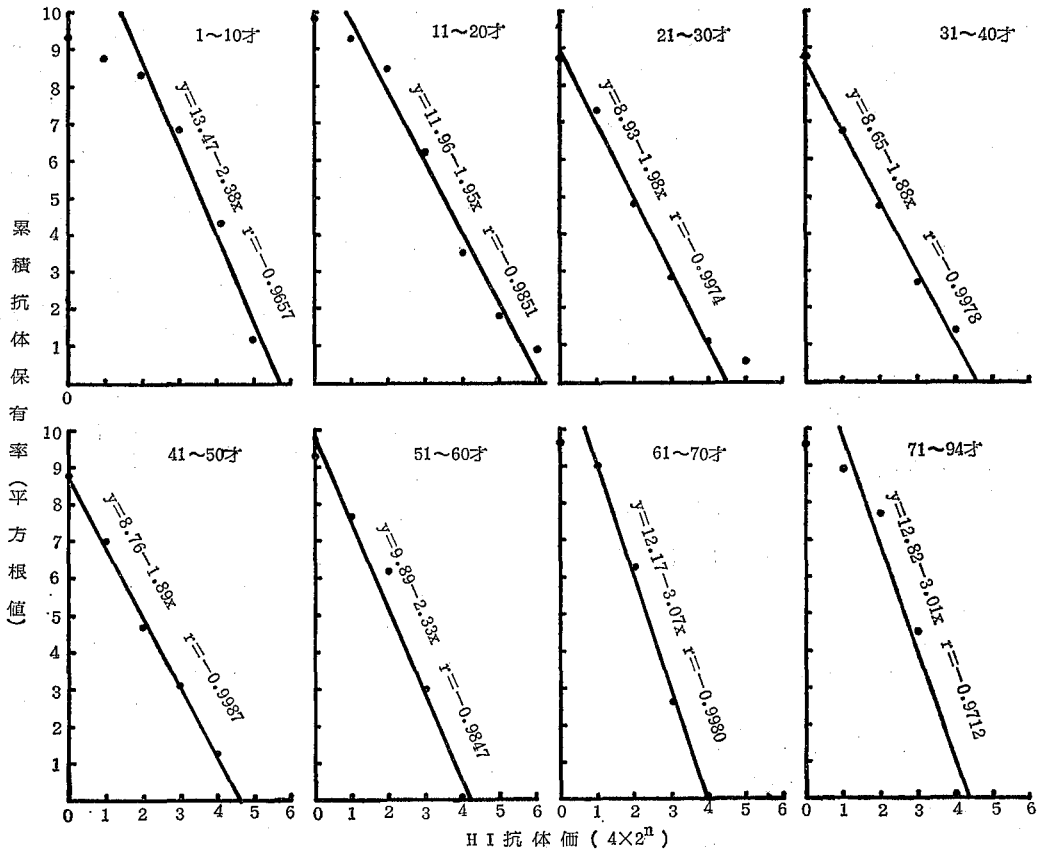


図 1.　都民のムンプスウイルスＨＩ抗体保有状況
抗体価別累積保有率実測値(・)と算出回帰線

ど一直線上に配列することが観察された．同一直線上の配列からはずれる抗体保有率値は一般に高値である．

有限母集団内のウイルス感染流行はある程度以上の規模になると拡大がしばしば抑制される事実と考えあわせることで，同一直線からのずれは理解されるであろう．

図１の観察結果から，集団の抗体保有内容を回帰直線

によって表現することを考えた．抗体価別累積抗体保有率平方根値（y）を抗体価（x）への回帰としてとらえ，実測値を用いて最小二乗法により回帰式 $y=a+bx$ を導き出した．aとbは常数値であり，xは抗体価 4×2^n のn値で与えられる．

図1に算出した年令階層別の回帰式を示した．

同一集団の抗体価別累積保有率値と回帰式から算出した対応値との相関係数値を計算すると，全例で高い正の相関がみられ，それらの値は1％危険率水準で有意であることが検定された．

回帰式のa値は抗体価 4×2^0 以上の累積抗体保有率値，b値は回帰係数値であり，a/b の絶対値（$|a/b|$）はx軸の交点であり，該当集団における抗体価分布の最高値と考えられる．

HI価 4×2^1 またはそれ以上の高抗体価での累積抗体保有率値が100％ないしそれに近い値を示す集団，すなわち1～10才，11～20才，61～70才，71～94才各集団のa値は，10（100％）以上の値を示し，非現実的な感じを与えるが，他集団の抗体保有状況との比較にはきわめて便利な数値である．

$|a/b|$ 値が高い集団には高い抗体価をもった個体が存在することを示唆するだけで，存在頻度すなわち抗体保有率値とは無関係である．

実測値の回帰分析を行うに先立って，著者らの考えている回帰分析理論についてふれておく．

回帰分析を導入した集団の抗体保有比較では抗体保有変化を3つにわけて考えることができる（図2）．

第1の変化はa値だけの変化である．回帰式 $y_1=a_1+b_1x$ であらわされた抗体保有内容を基準とするとき，a_1 から a_2 への変化にともなって回帰式 y' は $a_2/a_1\ (a_1+b_1x)$ と変わる．この場合はHI価を0～$|a_1/b_1|$ の範囲で変化させても y/y' 比は常に一定である．

第2の変化はb値だけの変化である．基準回帰式 $y_1=a_1+b_1x$ は，b_1 から b_2 への変化にともなって $y''=a_1+b_1\,(a_1b_2/a_2b_1)\,x$ と変わる．この場合は y''/y 比は x 値の変化にともなって変わる．

第3の変化はa値とb値の同時変化である．変化後の回帰式 y''' は $a_2/a_1\ \{a_1+b_1\,(a_1b_2/a_2b_1)\,x\}=a_2+b_2x$ となる．実際の応用で最も多く遭遇する変化である．

以上の分析理論に基づいて実測値の解析を行った．

1～10才年令階層のa値と $|a/b|$ 値を基準（1.0）にした各年令階層の対応値を計算して示すと図3のようになる．

a値の比率変化によって，1～10才と71～74才の両年令階層を頂点とした抗体保有率年令推移の中だるみ像が

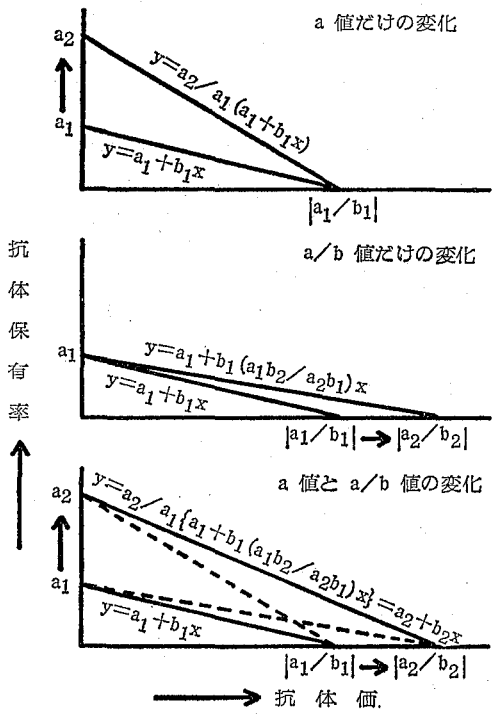


図 2. 回帰方程式を導入した集団抗体保有内容の解析理論

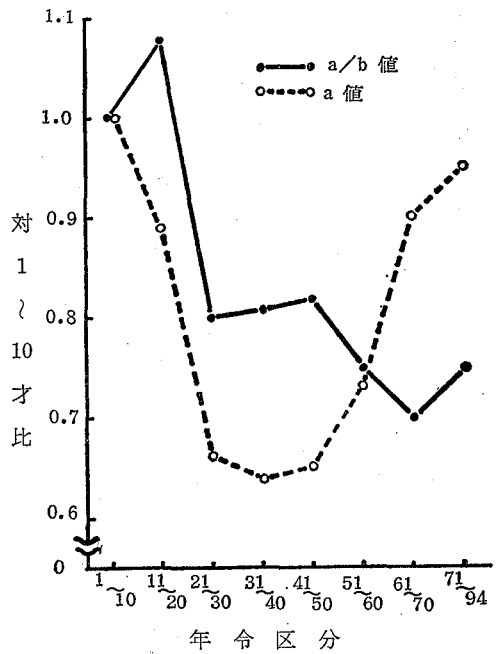


図3. 年令階層別ムンプス抗体保有状況の解析結果

定量的に表現できた.

一方 | a/b | 値の比率変化では, 1～10才, 11～20才の両階層の値が他の階層の値に較べて明らかに高く, 21～30才以上の | a/b | 値は年令上昇にともなってゆるやかに下降する傾向を示した. 1～10才, 11～20才の | a/b | 値の高さはこの年令階層に近い過去のムンプスウイルス感染経過者のあったことを推定させる.

総合判定をすれば, 20才以下の若年層ではムンプス抗体保有者の比率は高く, 高い抗体価をもった者（最近の感染者）が存在したこと, また60才以上の高令者層では抗体保有者の比率は高かったが, 高い抗体価をもった者は存在しなかったことが明らかになった.

回帰分析法の導入によりひき出された解析結果は, 直観的判断結果と定性的に一致したのみでなく, 数理論展開によって意義づけを明確にしたａ値(抗体保有者比率)と | a/b | 値（抗体価分布の最高値）を指標としたことにより, 定量的表現になっているという特色がある.

結　論

1978年に採取した健康都民血清875例について, ムンプスウイルスＨＩ抗体価を測定し, 集計成績から一般都民における年令階層別抗体保有状況を究明した.

集計成績の解析に回帰分析法の導入を試みた.

1) 集団の抗体保有状況の内容的表現をはかるために, 各抗体価別の累積抗体保有率値（平方根値, y）を算出し, それら各値を抗体価（4×2^n のｎ値, x）への回帰としてとらえる一次回帰式 $y=a+bx$ の導入を試みた. 集団間の抗体保有比較はａ値（抗体保有率）の比較と | a/b | 値（分布抗体価の最高値）の比較によって行った.

2) 回帰分析法による解析結果から, 一般都民における10才刻み８段階の年令階層別ムンプスウイルスＨＩ抗体保有は, 1～10才および11～20才では抗体保有率（ａ値), 分布抗体価（ | a/b | ）値がともに高く, 61～70才および71～94才では抗体保有率だけが高かったこと, 抗体保有率の年令推移傾向は明らかな中だるみ像を示し, 分布抗体価の最高値は1～10才と11～20才でとくに高く, 21～30才以上では年令上昇にともなってゆるやかに下降することを明らかにできた.

文　献

1) 芦原義守：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査, 第２版, 357, 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.*, **30**-1, 56-63, 1979

東京多摩地区で発生した水田皮膚炎（第1報）　府中市で発生した水田皮膚炎の疫学および免疫血清学的研究

村田以和夫*1, 大久保暢夫*1, 笹野英雄*2, 山口昌彦**
中尾厚義**, 川中正憲***, 斎藤玲子***, 鈴木了司****

Paddy Field Dermatitis in Tokyo (I)　Epidemiological and Serological Studies on Paddy Field Dermatitis in Fuchu City, 1978

IWAO MURATA*1, NOBUO OHKUBO*1, HIDEO SASANO*2, MASAHIKO YAMAGUCHI**, ATSUYOSHI NAKAO**, MASANORI KAWANAKA***, REIKO SAITOH*** and NORIJI SUZUKI****

Keywords: 水田皮膚炎 paddy field dermatitis, Tokyo, 疫学調査 epidemiology, 間接螢光抗体法 indirect fluorescent antibody test

はじめに

水田作業時に発生する皮膚炎については，1948年に田部[1]が“湖岸病”と呼ばれる皮膚炎の原因をムクドリ住血吸虫 *Gigantbilharzia sturniae* の cercaria 皮膚侵入によるものであると報告して以来，多くの報告[2-16]がある．

これら寄生虫の cercaria を原因とする皮膚炎に対して，1950年以降パラチオン，マラソン，2,4-Dなどの農薬や除草剤が多用されるようになって，これらの化学物質による皮膚炎[17]が報告され，次第に注目されるようになって来た．簑輪[18]らは，1976年石川県穴水町で多発した皮膚炎の原因として，まず，鳥類住血吸虫の cercaria が疑われたが，臨床症状，疫学的解析および貼付試験（パッチテスト）の成績などから，除草剤エックスゴニ粒剤による接触性皮膚炎であろうと報告している．

また，農村地帯に近接して工場や家屋が建てられ，その廃水が皮膚炎の原因に問われた例として，1972年，千葉県野田市で集団発生した皮膚炎をあげることができる．横川[19]らは，当初，工場団地からの廃水によるものと想定して，発生地区水田の水質について化学分析を行なったが，特に皮膚炎に直接関与する化学的要因を認め得なかった．しかし，寄生虫学的調査を実施して，ヒメモノアラガイ *Austropeplea ollula* から *Trichobilharzia* 属吸虫の病原 cercaria を証明し，臨床，疫学各所見から，この皮膚炎は鳥類住血吸虫の cercaria 皮膚侵入によるものと推定している．このように，水田耕作者に発生する皮膚炎の原因は，寄生虫，農薬（除草剤）および工場廃水など多岐にわたり，寄生虫性の要因と化学的要因とを区別することすら容易でない．くわえて，従来からの調査は，皮膚炎発生から早くて1週間，遅い場合で1か月以上も経過して着手されることが多い．その間に水田内の環境が変わって中間宿主貝から，病原 cercaria を見出すことが不可能となるばかりか，水質の変化や皮膚炎症状も変化してしまうために，本症の適確な診断および原因の究明は非常に困難である．そこで，村田[20]らおよび川中[21]らは，本症の原因究明と類似疾患との鑑別を容易にするために免疫血清学的手法，すなわち *Trichobilharzia brevis*（*T. brevis* と略）の cercaria を抗原とする間接螢光抗体法（IFA 法と略）を開発して来た．本法を用いて，ウサギおよびヒトの実験系における血中抗体の消長，ならびに，岐阜県と石川県で発生した皮膚炎患者血清について抗体価を測定した結果，きわめて有用性が高いことを報告した．

1978年6月，東京都府中市で本症が疑われる患者5名の集団発生があったので，原因追究のため，疫学，寄生虫学，水質化学，免疫血清学的調査を行なった結果，鳥類住血吸虫 *Trichobilharzia* 属の cercaria 皮膚侵入による皮膚炎と推定しうる成績が得られたので報告する．

*1 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
*2 同環境保健部水質研究科
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都府中保健所衛生課
*** 国立予防衛生研究所寄生虫部
****高知医科大学寄生虫学教室

材料および方法

1. **疫学調査**：皮膚炎発生から約10日を経た6月22日に通報を得て，同日，発症家族と縁者5名の皮膚症状，水田作業日程，共同作業者の発症の有無，野鳥の生態，中間宿主となる貝類の棲息状況，苗代，本田および用水路の立地状況，さらに農薬や肥料等の使用状況について，直接聞き取り調査を行なった．

2. **採取材料**：6月19日と23日の2回，苗代と隣接する本田の2か所から水および泥を採取した．また，6月22日と23日の両日，苗代および本田に棲息する約2000個体の貝類の採取を行なった．

3. **水質化学分析**：6月19日採取の水と泥について，有機燐（パラチオン，メチルパラチオン，EPN，メチルヂメトン），カドミウム，六価クロム，ヒ素，全水銀，PCB，n-ヘキサン抽水物質，フェノール類，陰イオン界面活性剤，および pH について検査した．また6月23日採取の水と泥については，聞きとり調査で有機燐製剤の使用が明らかとなったので，有機燐の分析定量を中心に，同様の検査を行なった．

4. **病原 cercaria の游出試験**：採取貝は種わけして50個体ずつ腰高シャーレ（径9cm，深さ6cm）に移し，くみ置水（脱塩素水道水）を8分目位入れて白熱螢光ランプで照射しながら，30分から12時間放置して cercaria の游出を検査した．

5. **免疫血清学的検査**：6月22日と約1か月後に採取した皮膚炎患者4名のペア血清と1名の初期採取血清について，Kawanaka, M. [22] *et al.* の方法で IFA 抗体価を測定した．すなわち，Fig. 1 に示す *T. brevis* の cercaria を抗原とする IFA 法の術式を用いた．各血清の10倍希釈液からスタートし，1：160までの2倍希釈段階をつくり，終末点1プラス“明らかな螢光色”と判定される血清希釈倍数を抗体価とした．

Cercarial suspension
↓
(Preparation of antigen)
Fixation : 1 % acetic acid in 95 % ethylalcohol
Centrifuge : 5min. at 1,500rpm. at 4–5C
Repeat : 3times, same condition
↓
Drop the cercarial antigen on slide-glass and dry up at room temperature
↓
(1st reaction)
Keep the slide antigen in a moist chamber
Mount the test serum on cercarial antigen
Incubation : at 37C, 45min.
↓
Rinse the slide antigen in PBS for 5min. 3times with gentle continuous vibration
↓
Dry up the slide antigen at room temperature
↓
(2nd reaction)
Mount the FITC conjugated antibody (1 : 100 diluted) on the cercarial antigen in a moist chamber
Incubation : at 37C, for 45min.
↓
Rinse the slide antigen in PBS for 5min. 3times with gentle continuous vibration
↓
Dry up the slide antigen at room temperature
↓
Mount the slide antigen in buffered glycerol and a cover slip
↓
Microscopic examination
(with fluorescence microscope using UV exiting filter system)

Fig. 1. Procedure of Indirect Fluorescent Antibody (IFA) Test with the Cercariae of *Trichobilharzia brevis* as Antigen

成　績

1. **疫学調査**　1) **発生地区**；この地区は Fig. 2(a & b) に示すように，府中市と国立市の行政区域境界線に近く，多摩川堤防に隣接し，最近，宅地化が進められつつある田園地帯である．用水は多摩川より本宿用水をひき，さらに西府用水を経てその支流に至る．皮膚炎発生の苗代および本田は，府中市四谷6丁目，K．H氏所有のもので，苗代にはガソリンスタンド（Fig. 2-b, G. S）が隣接するが，付近に化学工場は存在しない．2) **皮膚炎発生状況**；患者5名の発症日時および作業内容は，Table 1 に示すように，6月9日から15日にかけて，K．H氏宅の苗代作業に従事した後，直後から48時間後までの間に5名全員が発症をみている．S．H(女，29才)およびT．H（女，64才）およびK．H（男，34才）の3名は同一家族で，1977年の同期に今回と同様の皮膚炎を経験している．To. H（男，38才）とI．H（女，55才）は近所に住む縁者で，今回初めて発症をみた例であり，いずれも，9日から15日にかけて，田植に先だって苗取り作業で苗代に入田している．

本田は苗代に隣接するもの（Fig. 2-b, 1）とややはなれた所のもの（Fig. 2-b, 3）と2面あり，いずれも，田植直前に水張りをしたもので，b，3の本田のみで田植え作業に従事した2名（Table 1, A, B）は苗代に入らず発症を見ていない．また，6月9日以前の農作業日程は，5月1日頃，約 300m² の苗代に有機配合肥料（クミアイ）を小形バケツ1杯（約10*l*）と石灰 40kg 入3袋を給肥し，当日水張りを行なった．次いで5月

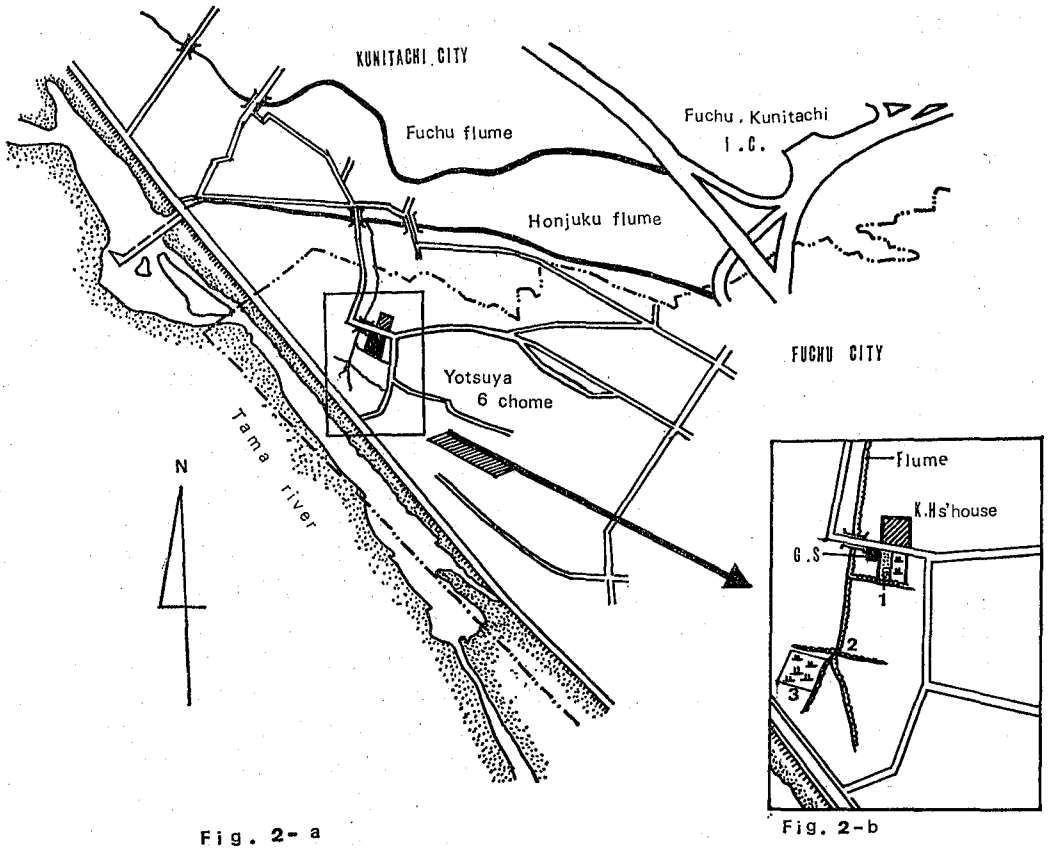


Fig. 2 (a & b) Survey Area

Table 1. Circumstance on Symptom onseted

Family	Name	History*	Dermatitis	Date of symptom onseted	Working place
No. I	S. H	Present	Present	12th, June, 1978	Rice nursery & Paddy field
	T. H	Present	Present	12th, June, 1978	
	K. H	Present	Present	12th, June, 1978	
No. II	To. H	Absent	Present	15th, June, 1978	Rice nursery & Paddy field
	I. H	Absent	Present	**13th, June, 1978	
No. III	A	Absent	Absent	No symptom onseted	Paddy field only
	B	Absent	Absent	No symptom onseted	

*: History of same symptom have onseted in 1977

**: Just after working in rice nursery and paddy field

13日，種まきと同時に殺虫剤スミチオンの3,000～5,000倍希釈液を1.8*l* 散布し，カモよけネットを設置したが，この間，皮膚炎の発生をみていない．3）**中間宿主となる貝類および終宿主となる野鳥の調査**；6月22日の調査で，苗代や本田内，畔および用水路の草むらに多数のヒメモノアラガイ *Austropeplea ollula* と，ごく少数のヒラマキミズマイマイ *Giraulus spirillus* が棲息分布していた．付近の多摩川流域では，近年カモ類

の飛来が多く，特にカルガモ *Anas poecilorhyncha zonorhyncha* はこの流域に住みついて夏期繁殖が行なわれていることが建設省の多摩川の鳥類生態調査[29]で明らかとなっている．また，K．H氏所有の苗代にも5月上旬の水張り以降，たびたび4，5羽のカルガモの飛来があり，Fig. 2-b, 2の用水路の草むらで仔ガモを捕獲したとの経験談を得ている．このほか，ムクドリ *Sturnus cineraceus* についても，この苗代付近で多数目撃されているが，ムクドリ住血吸虫 *Gigantbilharzia sturniae* の中間宿主であるヒラマキモドキ *Polypylis hemispaerula* はまったく認められなかった．

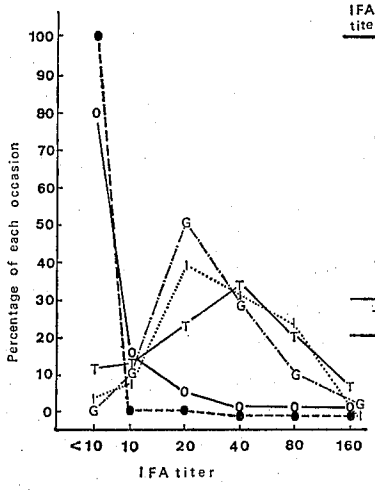
2. 病原 cercaria の游出試験 皮膚炎発生の苗代および本田から採取した，約2,000個体のヒメモノアラガイからは，数隻の *Echinostoma* 属 cercaria を検出したものの，水田皮膚炎の原因となる病原 cercaria はまったく認められなかった．

3. 皮膚症状 5名の患者の皮膚症状は写真4のように，発症後8～10日を経て極期を過ぎ，回復期に入っていたが，それぞれ，手足の入水部分に限定して3×3mm程度の孤立した，発赤，硬結，丘疹が1人平均各手足に30～50個ほど認められた．症状および皮膚瘙痒感は，比較的軽度のものから安眠できないと訴えるものまで，

Table 2. Results of IFA test with *T. brevis* cercariae as Antigen on 5 Patients

Name	Age	Sex	Serum No.	Date of sera obtained	History*	Serum diluted 1: 10	20	40	80	160
S．H	29	Female	1	6/22	Present	‡‡	‡‡	+	+	−
			2	7/11		‡‡	‡‡	+	+	±
T．H	63	Female	3	6/22	Present	‡‡	‡‡	+	±	−
			4	7/11		‡‡	‡‡	+	−	−
K．H	34	Male	5	6/22	Present	‡‡	+	+	−	−
			6	7/17		+	+	−	−	−
To. H	38	Male	7	6/22	Absent	+	+	−	−	−
I．H	55	Female	8	6/22	Absent	+	−	−	−	−
			9	7/17		±	−	−	−	−
Positive control serum			10			‡‡	+	+	±	−
Negative control serum			11			−	−	−	Not done	
			12			−	−	−	Not done	
FITC conjugated serum (1 : 100)			13			−	Not done			
PBS control			14			−	Not done			

*: History of same symptom have onseted in 1977



IFA titer \ Sera	T Tokyo	G • Gifu Pref.	I • Ishikawa Pref.	● Other dermatitis	O Control
160	0	0	0	0	0
80	2 22.2%	1 10%	3 23.1%	0	0
40	3 33.3%	3 30%	4 30.8%	0	0
20	2 22.2%	5 50%	5 38.5%	0	2 5%
10	1 11.1%	1 10%	1 7.7%	0	6 15%
<10	1 11.1%	0	0	11 100%	32 80%
Total	9	10	13	11	40

•: Kawanaka, M., Murata, I. and Suzuki, N.
[Jap. J. Parasit., Vol. 28, No. 4, 002- , 1979]

Fig. 3. Distribution of IFA titer in Human Cases of Normal and Cercarial·Dermatitis

個人差があり，初めての発症と2度目の発症との間には差が認められなかった．

4. 免疫血清学的検査成績 患者5名より採取した血清9例について，*T. brevis* の cercaria を抗原とする，IFA 法で抗体価を測定した結果，Table 2 に示すとおり，前年同期に今回と同様の皮膚炎を経験している患者3名（血清6例）は1：40以上の高い抗体価を示した．

一方，今回初めて罹患した2名（血清3例）は，前記の3名と比較してやや低く，それぞれ1：20と1：10の抗体価を示した．また，感染して約10日後と40日後に採取した血清の比較では，それぞれ著明な抗体価の変動が認められなかった．

5. 水質化学分析成績 6月19日と6月23日に採取した材料につき，有機燐をはじめ，カドミウム，六価クロム，ヒ素，全水銀，PCB など13項目を検査したが，いずれも，皮膚炎と関係づけられる成績が得られず，特に異常値を示したものは認められなかった．

考　察

府中市で発生した原因不明の皮膚炎について，疫学調査を行ない，立地条件，皮膚炎発生状況，中間宿主となる貝類の棲息状況，終宿主となる野鳥の生態ならびに臨床所見などから，鳥類住血吸虫の cercaria 皮膚侵入による水田皮膚炎を想定して，中間宿主貝であるヒメモノアラガイから病原 cercaria の游出を試みたが，ついに病原 cercaria を見出すことができなかった．しかし，皮膚炎発生後約10日および40日後に採取した患者血清について，*T. brevis* の cercaria を抗原とする IFA 法で抗体価を測定し，すでに Kawanaka, M. [22] et al. が報告している，岐阜県と石川県から送付された患者血清23例の成績と比較した結果，Fig. 3 に示すように，IFA 抗体価の分布パターンは，これら皮膚炎患者群ときわめてよく一致した．このことは，群としてとらえた場合，小林[14]らが岐阜県で発生した皮膚炎の原因を鳥類住血吸虫の cercaria と推定していることから，府中市の皮膚炎患者群が少なくとも鳥類住血吸虫の cercaria の皮膚侵入を受け，*T. brevis* の cercaria に対する抗体産生があったことを意味していると推察されよう．また，IFA 法による陽性と陰性の限界は，今回の成績とKawanaka, M. et al. の一連の成績から，5％の偽陽性反応を許容して，2倍希釈法でほぼ1：16前後に限界点が求められるため，府中市の患者5名のうち4名（血清9例のうち7例）が陽性反応を呈したといえよう．

水田作業時に発生する皮膚炎は，いわゆる“湖岸病”“かゆいかゆい病”または地方により，“泥かぶれ”，“肥かぶれ”，“稲かぶれ”とよばれ，ほぼ全国的に発生をみている．これらほとんどの原因は鳥類住血吸虫の cercaria によるものであることが明らかとなって来た．すなわち，1960年前後に多発した水田皮膚炎の原因は，田部[1]らの見出したヒラマキモドキを中間宿主とする *Gigantbilharzia sturniae* の cercaria によるが，その後，熊田[10]らの報告によると，*Trichobilharzia ocellata* と *T. physellae* による皮膚炎がわが国に存在することが判って来ている．*T. physellae* の中間宿主がモノアラガイ *Lymnaea japonica* であるのに対し，1967年以降，埼玉県で小津[3]ら，鈴木[4,5]らが初めて見出し，次いで，愛知県で熊田[10]ら，千葉県で横川[19]ら，茨城県で安羅岡[16]ら，徳島県で大久保[12]ら，静岡県で伊藤[13]らがそれぞれ報告した水田皮膚炎はヒメモノアラガイを中間宿主とするもので，鈴木[23]らは本種住血吸虫を *Trichobilharzia brevis* と同定した．今回，府中市で採取した貝類は，ヒラマキミズマイマイが少数含まれたものの，ほとんどのものがヒメモノアラガイであったので，前記の *T. ocellata* と *T. physella* による皮膚炎の報告がこの15年間まったくなされていないこと，および水質化学分析の成績とを合わせて考察すると，府中市で発生した皮膚炎の原因は，鳥類住血吸虫 *T. brevis* の cercaria 皮膚侵入による可能性が強い．

一方，農薬皮膚炎の多発実態は，菅谷[24,25]らが報じた農薬中毒臨床例全国調査の中で明らかとなっている．同様に高野[26]らが報告した昭和47年度農薬中毒臨床例の中にも，本症多発の事実が認められる．また，除草剤による接触性皮膚炎については簑輪[18]らおよび渡辺[27]らの報告などがある．1970年以降，野村[28]らは，農薬皮膚炎の診断基準に関する研究を行ない，農薬による貼布試験の標準的な術式の確立を検討してきた．

前述のように，原因を異にする皮膚炎の鑑別診断法として，著者らが行なっている鳥類住血吸虫の cercaria 皮膚侵入による皮膚炎の免疫血清学的診断法（IFA test）と，野村らが行なっている農薬など化学物質による皮膚炎を診断するアレルギー反応を利用した貼布試験（パッチテスト）とが二方向から確立されつつある．これら二法の併用は，水田皮膚炎の原因究明，つまり，患者を中心とした直接的因果関係を証明するために，きわめて有力な方法と思われる．

これまでの水田皮膚炎の報告は，寄生虫学，疫学，臨床所見に限っての記載が多く，今回府中市で行なったような，生物，化学両面からの要因を同時に解析した例はほとんどない．また，病原 cercaria の証明には2万を越える数多くの中間宿主貝の採取により，数個体の cercaria 游出に成功した例が普通で，疫学調査を含め原因

の推定に2，3年も経過することも少なくない．したがって，より迅速な原因究明を要求されている公衆衛生行政の立場からみると，多くの問題があったといえよう．

今回，著者らが行なった一連の調査で，病原 cercaria の検出はできなかったものの，初めて，IFA 法の成績と疫学，臨床，中間および終宿主の調査成績の意味付けに成功し，さらに水質化学分析の成績のうらづけもあって，この皮膚炎の原因を鳥類住血吸虫 *Trichobilharzia* 属 cercaria によるものと推定しえた．しかし，本症の原因となる鳥類住血吸虫の種の同定は今後に残された課題である．また，多摩地域にはまだ多くの水田が存在し，カモをはじめとする野鳥の分布[29]は，多摩川を中心にかなりの広がりをみているので，今後，調査範囲を拡大して詳細な調査を進めたい．今後の調査にあたり，日常の疫学情報の収集に努めるとともに，地域住民の通報ルートを設けて迅速な対応がはかられるよう準備を整える必要があり，再感染防止についての対策も検討してゆくべきと思われる．IFA 法に用いる抗原の保存性，供給性および近縁関係にある各種の cercaria に対する交叉反応性については，現在検討中である．

結　論

1973年6月，東京都府中市四谷地区で，水田作業後発症した原因不明の皮膚炎患者5名について，臨床所見，寄生虫学，疫学的解析，水質化学分析および免疫血清学的検査成績を総合的に検討した結果，鳥類住血吸虫，*Trichobilharzia* 属の cercaria 皮膚侵入による皮膚炎であると推定し，今後の広範な調査研究の足がかりとすることができた．

謝辞：本研究を行なうにあたり，貴重なご示唆とご指導をくださいました，国立予防衛生研究所寄生虫部長，林滋生博士，ならびに，患者家族との接点に立ってご協力をいただいた，東京都府中保健所の大沢泰邦所長，笹崎久江主査，藤沢秀子主査に対し深謝します．

（本研究の概要は，第28回日本農村医学会総会，1979年10月で発表する．）

文　献

1) 田部　浩：米子医学雑誌，1 (1)，2，1948
2) 田中　実：寄生虫学雑誌，9 (5)，615，1960
3) 小津茂弘，会田忠次郎，武井伸一，鈴木了司，石崎達，小島哲夫：日本農村医学会雑誌，21 (3)，361，1972
4) 鈴木了司，小津茂弘，会田忠次郎，武井伸一，沢浦正三郎：日本農村医学会雑誌，21 (5)，484，1973(a)
5) 鈴木了司，小津茂弘，会田忠次郎，武井伸一：日本農村医学会雑誌，21 (5)，491，1973 (b)
6) 鈴木了司，小津茂弘，会田忠次郎，武井伸一，小島哲雄，鈴木基雄，赤熊喜重：日本農村医学会雑誌，22 (2)，108，1973
7) 川中正憲，武井伸一，鈴木了司：日本農村医学会雑誌，27 (1)，89，1978
8) 鈴木了司，川中正憲，石田孝仁，山本　進，橋口俊照：日本農村医学会雑誌，25 (4)，604，1976
9) 太田秀夫，松井博範，高島一良，福田常男，小久保幸雄，小島成克，吉沢　繁，小島芳郎，堀尾正行，上村　彰，熊田信夫，大宅さほ子，真喜屋清：愛知県衛生研究所報，20，59，1970
10) 熊田信夫，大宅さほ子，真喜屋清，福田常男，高島一良，太田秀夫，松井博範，小島成克，吉沢　繁：愛知県衛生研究所報，20，65，1970
11) 野牛　弘，中田英吉，松本浩一，松本昌雄：東京衛研年報，22，177，1970
12) 大久保喜弘，久保一郎，松岡　澄，鈴木了司，川中正憲，松島　弘：日本農村医学会雑誌，27 (1)，93，1978
13) 伊藤二郎，望月　久：寄生虫学雑誌，27 (6)，507，1978
14) 小林貞雄，粕谷志朗，大友弘士，阿部貞夫：寄生虫学雑誌，26 (2)，支部大会記事，65，1977
15) 前島條士，山根洋右，矢崎誠一，福本宗嗣，加茂甫：寄生虫学雑誌，26 (6)，支部大会記事，81，1977
16) 安羅岡一男，大島司郎，入江勇治，飯野弘子，上野賢一，斎藤隆史，鈴木了司，川中正憲，久保田トモ子，宇津野俊夫：寄生虫学雑誌，26 (5)，支部大会記事，33，1977
17) 谷奥喜平，三浦　修，野口義圀，簇野倫　編：皮膚と免疫・アレルギー，406，1974，金原出版株式会社
18) 簔輪真澄，西　正美，河野俊一，小林　正，酒井義昭：日本公衆衛生学雑誌，4，193，1978
19) 横川宗雄，佐野基人，小林　仁，鈴木了司，小津茂弘，会田忠次郎：寄生虫学雑誌，25 (5)，366，1976
20) 村田以和夫，川中正憲，鈴木了司：寄生虫学雑誌，26 (5)，支部大会記事，34，1977
21) 川中正憲，村田以和夫，鈴木了司：寄生虫学雑誌，27 (増刊号)，38，1978
22) Kawanaka, M., Murata, I., and Suzuki, N.: *Jap. J. Parasit.*, 28 (4), 11, 1979
23) 鈴木了司，川中正憲：寄生虫学雑誌，26 (増刊号)，

61, 1977
24) 菅谷　彪ら：日本農村医学会雑誌，23 (3)，266, 1974
25) 菅谷　彪ら，若月俊一ら：日本農村医学会雑誌，25 (3)，328, 1976
26) 高野喜正：日本農村医学会雑誌，22 (3)，192, 1973
27) 渡辺　進，渡辺　悟：臨床皮膚科，24，945，1970
28) 野村　茂，松下敏夫，神辺　譲，堀内信之，菅谷　彪，木村瑞雄：日本農村医学会雑誌：27 (4)，734, 1978
29) 建設省：多摩川の環境管理計画「玉川の鳥類生態調査」28，1978

写　真　説　明

Explanation of Figures

1 : *T. brevis* cercaria antigen, Negative reaction with IFAtest (×400)

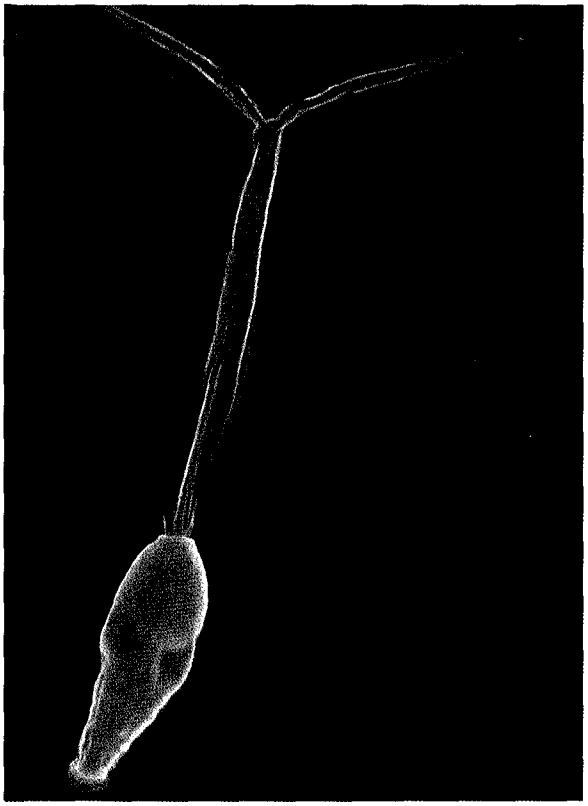
2 : *T. brevis* cercaria antigen, Positive reaction with IFAtest (×400)

(Photographic condition Exp. 30 sec., with fluorescence microscope using UV exiting filter system)

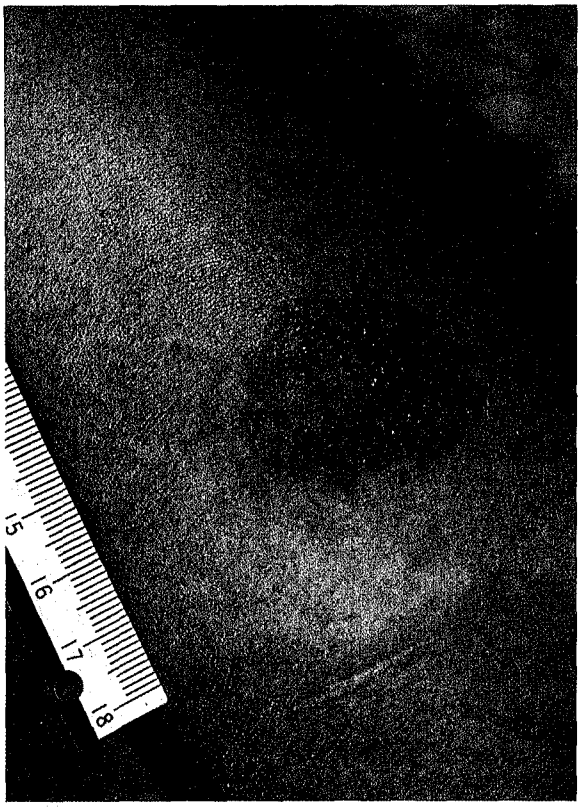
3 : Cercarial dermatitis experimentally infected with *T. brevis*, 100 cercariae

4 : Paddy field dermatitis of patient

1



2



3

4

ンパク質の流出についても観察を行なったので，それら一連のクロマトグラムを Fig. 1 に示す．

Fig. 1 で明らかなように，プロテインAに吸着された血清タンパク質のほとんどの部分が0.25モルの酢酸溶液で流出されているが，その後の0.5モルの酢酸溶液で脱離流出されてくる部分のあることも記録されている．なお，Fig. 1 には示されていないけれども，0.5モルの酢酸溶液で流出させたのちに，1.0モルの酢酸溶液に変換して展開を行なったが，その流出部分にタンパク質による紫外線（280nm）の吸収は認められなかった．

Hjelm[12]は，プロテインAに吸着されたヒト血清中のIgG の1，2および4の各サブクラスが，1.0モルの酢酸溶液によって脱離して流出されると報告しているが，すでに述べたようにそれよりも低濃度である0.5モルの酢酸溶液で完ぺきに流出されることがわかった．

そこで著者らは，今回はプロテインAに吸着される全ての血清タンパク質について，各梅毒血清検査法に対する反応を試みることにし，そのために以後の脱離流出は0.5モルの酢酸溶液を使用することとした．

また，この Fig. 1 にも示されているとおり，0.5モルの酢酸溶液でプロテインAに吸着された血清タンパク質を脱離流出させたのちに，移動相をもとの1.0モルの中性リン酸緩衝液に置換すると，そこに流出されてくるタンパク質分屑のあることが確認された．

梅毒陽性血清タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーによるそれぞれの分画分屑を，前述した方法で濃縮調整し，すでに述べた方法にしたがって各梅毒血清定量検査を行なった．また，それぞれの梅毒血清タンパク質分屑の分画程度を検討するために，常法にもとづいてポリアクリルアミドゲルを支持体としたデスク電気泳動をも併せて行なったので，それぞれの検査成績とともに Fig. 2 に示す．

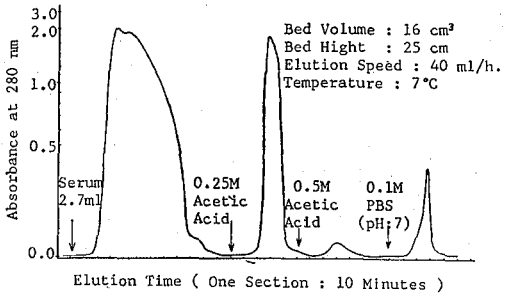


Fig. 1. Affinity Chromatogram of Human Serum Protein on Protein-A Sepharose CL-4B (Arrow indicates start of elution with eluants and sample)

Fig. 2 の電気泳動像で明らかなように，プロテインAに吸着され，0.5モルの酢酸溶液によって脱離流出された血清タンパク質分屑は，主として IgG の位置に明瞭に表われているほか，IgG よりも高分子および変性部分の泳動像の存在も観察された．また，1.0モルの中性リン酸緩衝液に置換した場合に流出される血清タンパク質分屑も，電気泳動像では IgG と同じ位置に示されたが，プロテインAの分子量（41,000）[13,14]がアルブミンよりも小さいことから考えると，全血清の泳動像に認められるアルブミンの位置と比較して，この分屑はプロテインAの変性部分として同定することは不可能である．したがって，この1.0モルの中性リン酸緩衝液で流出される分屑は，プロテインAと血清タンパク質との結合物，あるいはプロテインA吸着性の血清タンパク質ではあるが，IgG とは異なった性質の部分ないしは0.5モルの酢酸によって変性した IgG などであろうと考える．

また，Fig. 2 にも示したとおり，全血清における梅毒血清抗体価は，VDRL ガラス板法に1：2，Wassermann-CF 緒方法1：32，TPHA 法1：320，および IgG·FTA-ABS 法1：320であったが，IgM·FTA-ABS

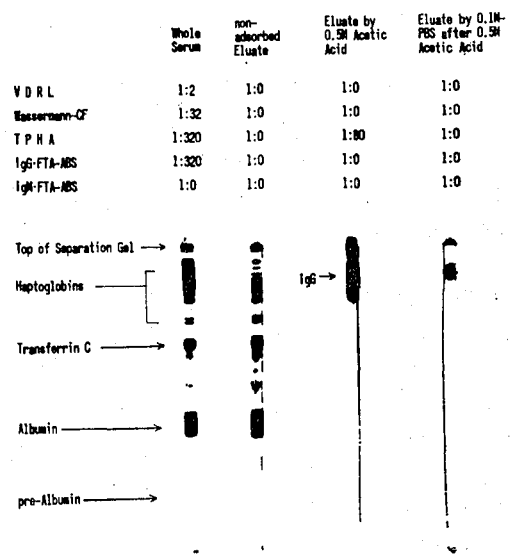


Fig. 2. Serological Responses and Disc Electrophoretic Patterns of Polyacrylamide Gels in the Fractions of Syphilitic Serum Protein obtained by Affinity Chromatography on Protein-A Sepharose CL-4B

Note; 1:0 Indicate <1:4 in Wassermann-CF Titer, <1:80 in TPHA Titer and <1:5 in FTA-ABS Titer

法の抗体価は認められなかった．このような各抗体価を示す梅毒血清タンパク質を，プロテインAアフィニティー流出クロマトグラフィーで分画し，それぞれの分屑について各梅毒血清定量検査を行なったところ，プロテインAに吸着され，0.5モルの酢酸溶液で脱離流出された分屑のみがただ一つTPHA法に反応し，その抗体価は全血清を用いた場合のそれよりも低い1：80であった．しかし，このほかの全ての分屑が，各梅毒血清検査に反応を示さなかった．これらのことから，酢酸による影響と思われる抗体価の低下がうかがわれるが，少なくともTPHA法の反応は，IgGの1，2および4の各サブクラスを含んだこの分屑が主体となって成立していることが示唆された．このことは，TPHA法の反応は梅毒特異性が強い[15]といわれていることを裏づけているものと考えられる．

なお，脂質抗原と反応する抗体はreaginと総称され，それらはIgのG，AおよびMの各タイプに含まれるといわれているが[4]，Fig. 2に示したように，プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによる梅毒血清タンパク質の各分屑が，脂質抗原を用いるガラス板法および緒方法と全く反応していないことから考えると，reaginと総称される抗体の定義について再検討する必要があろう．また，Fig. 2に示したそれらの結果から考えると，reaginと総称されていた抗体は少なくともIgG自体ではなく，それに結合していて0.5モルの酢酸でプロテインAから分離される複合成分，あるいはIgGには全く関係がなくて，分子量が25,000以下のためにセントリーフローCF-25のメンブランを通過してしまう低分子量成分であろうと推察される．このことについては，限外沪過装置を用いて，さらにくわしく追究してみる必要がある．

すでに述べたように，TPHA法における反応が，プロテインAに吸着されて，0.5モルの酢酸溶液によって脱離流出される梅毒陽性血清タンパク質分屑に残存することが認められたので，各被検血清別にTPHAの反応差異の有無について検討を行なった．すなわち，都立病院および都内の保健所から梅毒の血清検査依頼を受けた12の被検血清を用いて，全血清およびプロテインAアフィニティー分屑について，TPHA法による定量検査を行なったので，それらの抗体価をTable 1に示す．

この Table 1 の TPHA 法における判定成績を総体的に検討すると，その抗体価の変動が極端であるものおよびそれ程ではないが低下しているもののあることが認められる．その極端な変動を示したものとしては，CおよびLの患者のように，全血清で1：1280の抗体価を示しながら，プロテインAアフィニティー分屑ではそれが＜1：80となったもの，さらには全血清において抗体価が＜1：80であったのに，クロマト分屑では逆に1：1280もの高い抗体価が認められるようになったB患者が存在し，これらのものはきわめて特殊な反応として観察された．なお，C患者は，H患者を母親とする先天性梅毒の4才児期のものである．

Table 1. Comparison of TPHA Test Reading between Whole Serum and Protein-A adsorbed Fraction

Patient	A	B	C	D
Whole Serum	1:5120	<1:80	1:1280	<1:80
adsorbed Fraction	1:5120	1:1280	<1:80	<1:80
Patient	**E**	**F**	**G**	**H**
Whole Serum	<1:80	1:5120	1:80	1:5120
adsorbed Fraction	<1:80	1:1280	<1:80	1:320
Patient	**I**	**J**	**K**	**L**
Whole Serum	<1:80	1:1280	1:320	1:1280
adsorbed Fraction	<1:80	1:80	1:80	<1:80

すでに述べてきたこれらの抗体価に関する現象が認められたことは，被検全血清においていわゆるTPHA法における偽陽性あるいは偽陰性として反応したためなのか，こんごくわしく検討してみる必要がある．また，被検全血清とプロテインAアフィニティー分屑におけるTPHA法の抗体価の変動が，梅毒感染が先天性と後天性で相違があるのか，さらには治療経緯によって，プロテインAに吸着されない成分に生合成されてゆくことを反映しているのかなどについて，こんご追究してゆきたい．

まとめ

ヒトの血清を用いて，プロテインAセファローズCL-4Bを担体としたアフィニティークロマトグラフィーを行ない，プロテインAに吸着したタンパク質の脱離剤である酢酸の効果的作用濃度について検討した．また，そのクロマトグラフィーによって得た血清タンパク質分屑のそれぞれについて，ガラス板法，緒方法，TPHA法ならびにFTA-ABS法の各梅毒血清定量検査を行ない，各検査法の反応との因果関係について調べた．さらには，12例の被検血清を用い，全血清とプロテインAアフィニティー分屑について，梅毒特異性が強いといわれるTPHA法による検査を行ない，それぞれの抗体価の

変動についても検討した.

1. プロテインAアフィニティークロマトグラフィーでプロテインAに吸着されたヒト血清タンパク質分層は, 0.25モルの酢酸溶液によってそのほとんどの部分が脱離流出されるが, その後に0.5モルの酢酸溶液で展開した場合に流出される分層のあることが確認され, この濃度で脱離流出が完了することがわかった. また, このクロマトグラフィーでは, 移動相を0.5モルの酢酸溶液に続いて, 1.0モルの中性リン酸緩衝液によって流出されてくる血清タンパク質分層のあることを認めた. なお, このタンパク質は, 電気泳動像から検討したところ, IgGと同じ位の分子量であろうと考えられた.

2. プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって分画した梅毒陽性血清タンパク質のそれぞれの分層について, ガラス板法, 緒方法, TPHA法およびFTA-ABS法の各梅毒血清定量検査を試みたところ, プロテインAアフィニティー分層がただ一つTPHA法に反応し, その抗体価は全血清における1：320よりも低い1：80であった.

3. 12例の被検血清を用いて, 全血清におけるTPHA法の抗体価とプロテインAアフィニティー分層のそれとを比較したところ, その抗体価の変動は多種多様であり, その極端なものとしては, 全血清で1：1280であったものが<1：80となったもの2例が認められた. また, この例とは反対に, 全血清では抗体価が<1：80であったのに, クロマト分層では1：1280の抗体価が表われたもの1例があった. さらに, このほかの陽性被検体では, 全血清におけるTPHA抗体価に対し, プロテインAアフィニティー分層におけるそれは低下する傾向にあり, その変動差はそれぞれに異なったものであった.

(本研究の概要は第13回トレポネマトーゼ研究会1978年8月で発表した.)

文　献

1) 菅原孝雄：モダンメディア, 21, 348, 1975
2) 岡山虎男, 坂岸良克, 漆畑美枝子：衛生検査, 28, 469, 1979
3) 水岡慶二：医学のあゆみ, 30, 216, 1959
4) 丸田宏幸, 皆見紀久男：臨床免疫, 5, 51, 1973
5) 河合　忠, 岩田　進, 只野寿太郎, 近藤弘司：最新医学, 23, 1929, 1968
6) 皆見紀久男, 田代正昭, 児浦純生, 桑原淑子, 山口真吾：皮膚と泌尿, 30, 509, 1968
7) 富沢孝之, 笠松重雄, 山屋駿一：日本細菌学雑誌, 22, 607, 1967
8) Forsgren, A. and Sjöquist, J.: *J. Immunol.*, 97, 822, 1966
9) Kronvall, G. and Frommel, D.: *Immunochem.*, 7, 124, 1970
10) Tomizawa, T. and Kasamatsu, S.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 19, 305, 1966
11) Hunter, E. F., Deacon, W. E., and Meyer, P. E.: *Publ. Health Rep.*, 79, 410, 1964
12) Pharmacia Fine Chemicals AB note: Protein A, Protein A Sepharose CL-4B for Cell Surface and Immunoglobulin Studies
13) Björk, I., Petersson, B-Å, and Sjöquist, J.: *Eur. J. Biochem.*, 29, 579, 1972
14) Hjelm, H., Sjödahl, J., and Sjöquist, J.: *Eur. J. Biochem.*, 57, 395, 1975
15) 水岡慶二：臨床皮膚, 23, 67, 1969
16) 富沢孝之：臨床科学, 4, 324, 1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 69-74, 1979

ネガティブ染色による細菌諸器官の観察法

前木吾市*

Morphological Observation of Bacterial Cells by Simplified Negative Staining Procedure for Electron Microscopy

GOICHI MAEKI*

A simple and effective negative staining procedure for the observation of minor morphological structures of several bacterial cells, such as *Staphylococcus, Salmonellae, Vibrio cholerae, C. perfringens, B. cereus* and *E. coli* was developed. In this technique, 400mesh collodion monolayer (support film) and 2% phosphotungstic acid (PTA) pH6.0, were used for preparing samples.

JEM-100B type microscope was used at its maximum accelerating voltage of 100kV for effective electron micrographs whose shading contrast and tone were adjusted by the use of various size of objective apertures and catechol compensating developer.

It was found that at low magnification pictures with a good contrast of flagella of *Salmonellae* or spores of *C. Perfringens* with their bacterial cells could be obtained with the use of objective aperture at its maximum diameter of 120μm, while pili of *E. coli* could be observed at high magnification with the use of smaller objective aperture as 80μm, although pili of *E. coli* inherently showed a poor contrast (about 70A$=1/15\times10^4$mm).

Experiments to improve the observation method for pili of *E. coli* with the use of freeze-drying method suggest a good prospect.

Keywords : pili, flagella, bacterial cells, negative staining, electron microscopy

緒　言

細菌の外部形態を観察する手段として，これまでシャドウイング法[1,2]を多く用いてきたが，欠点として像の解像性や透過性の不足が生じ，試料作製上からは培養基に含まれる食塩成分の除去をめぐり，べん毛脱落等のトラブルがあり，その他真空蒸着処理，写真の中間ネガ作製等の煩雑な手数が気がかりとなってきた．そこで解像力アップおよび観察のスピードアップの方策として，燐タングステン酸塩（以下 PTA と略す）によるネガティブ染色[3-8]への転換を企てた．

ネガティブ染色の原理および手技は比較的簡単で，像の解像は5Aにも達し，高解像型電子顕微鏡にフィットする技法である．ネガティブ染色の成否は試料の精製度，染色剤の種類，濃度，pH および支持膜条件等で左右される．

一般に細菌のネガティブ染色ではサイズの大きい菌体部分に染色剤が偏り過ぎるため，菌体自身が染色剤中に埋没したり，微細なべん毛，線毛等の付属諸器官との間で像コントラストのバランスを失って観察困難となるケースが多い．染色剤 PTA の展開法にはグロー放電による支持膜表面の親水性化処理[9,10]の技法があり，余剰 PTA の除去には最近フリーズ・ドライ法[11]が発表されている．支持膜ではルーチンに使用できる理想的なものは見当らないといってよい．本研究は 100kV の加速電圧とコロジオン支持膜により，各種細菌の菌体およびそれらの付属器官であるべん毛，線毛まで，一回の試料作製により全体像の同時観察が可能な方法を検討した．さらにグロー放電と凍結真空乾燥の技法により，線毛を対象に微細構造検出のテストを行った．その結果，高解像で階調のよい細菌諸器官像の求め方について若干の知見を得たので報告する．

実験材料

供試菌株はブドウ球菌，サルモネラ，コレラ菌，ウェルシュ菌（有芽胞菌），セレウス菌，大腸菌等を用いた．大腸菌とサルモネラの培養にはべん毛，線毛の発育を図る目的でブイヨン培地を用いた．ブドウ球菌の培養には普通寒天培地，ウェルシュ菌の培養には芽胞を形成させるため変法 Duncan Strong 寒天培地を用いた．

実験方法

PTA の乾燥過程に，通常の自然乾燥による方法(A)

* 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

と，準フリーズ・ドライ法(B)の二通りを採用した．A法はすべての細菌試料の作製に応用したが，B法は大腸菌の線毛を対象にした試料作製に試みたものである．

A法 一般的なネガティブ染色

支持膜：400メッシュ上に平滑に張ったコロジオン単膜を使用する．作製法は安達式「支持膜のメッシュ乾式支持法」[12]に準ずる．オブジェクトグラス上にメッシュセメントを用いて約40枚のメッシュを方眼に貼付したものを用意し，メッシュ側を裏返して水面上のコロジオン膜に向い合わせ，通常の方法とは逆に上面から密着させ掬い上げて作製する．位相差光学顕微鏡でしわのないことをチェックして使用に供する．

ネガティブ染色法：メッシュを専用ピンセットで水平に保持し，予め2％PTA (pH6.0) を一白金耳だけ支持膜上に載せ，これに菌液中に挿入した白金耳の先端をone touch させる．余分の液を沪紙で吸取り後自然乾燥させる．

B法 準フリーズ・ドライ法によるネガティブ染色

上記Aと異る点は PTA を生乾きの状態から凍結真空乾燥[13]させる処理過程である．すなわちPTAの生乾き状態のメッシュを直ちにデュアーびん（JEM-100B試料汚染防止装置用のものを流用）内で液体窒素を用いて凍結し，次にデュアーびんごと真空蒸着装置内に入れて真空乾燥を行う．実験セットが不備のため凍結真空乾燥中の低温保持と温度調節ができない点が，本格的なフリーズ・ドライ法と異る．この実験で使用するコロジオン支持膜には，凍結真空乾燥によるダメージを予測して，予め60Aのカーボン補強を行い，カーボン膜表面にグロー放電による親水化処理を行った．

電顕観察法

電顕は日本電子KK製 JEM-100B，サイドエントリー方式のものを加速電圧 max. 100kV で使用した．対物絞りのサイズは，像コントラストの許す限り大とし，現用4個中で最大の 120μm 口径のものを用い，球菌，芽胞菌の観察にはフリー（無限大）とした．

撮影倍率は直接(×3,300)～(×20,000)の範囲で行い，液体窒素による試料汚染防止装置は試料周辺部だけ常時使用した．写真現像にはコダック D-19 (1：2) とカテコール表面現像液[14]を用いた．

各種細菌のネガティブ染色像の対照として，Cr シャドウイング法による写真を並行して作製し，両者の特徴，性能の比較を行った．

観察結果

各種細菌の菌体およびそれらのべん毛，線毛等について観察されたネガティブ染色像のうち，実験方法（A）による結果を写真1～5に示した．特徴をあげると

1. 支持膜が単層で薄いので，広視野でシャープな像が得られたこと．線毛は螢光板上で（×13,000）から観察できた．
2. 加速電圧を従来の 80kVから 100kV にアップさせたので，像の解像性，透過性が目立って向上した．
3. 対物絞りとして口径サイズの大型のものを用いたので，像質のよい写真を撮ることができた．
4. 有べん毛細菌では，菌体とべん毛のバランスのとれた写真を撮ることができた．
5. PTA の滲透性により菌体内部の隔壁，菌体表面のひだ様構造，細胞膜および細胞壁の有無等が観察できた．
6. コレラ菌では菌体やべん毛のねじれがみられ，有芽胞菌では菌体内外に存在する芽胞の判別がつき易くなった．

一方，弱点としては

1. 支持膜が切れ易いこと．このため像の流れが生じ易くなり，撮影し得る直接倍率の限度は（×20,000），引伸し綜合倍率（×100,000）が限度であった．
2. PTA 染色剤の偏りが著しいこと．これは丸くて厚味のあるブドウ球菌，菌体サイズの大きいセレウス菌で特に顕著であった．PTA の展開を図るため支持膜上で生乾きの中に真空引きする方法，あるいはグロー放電でコロジオン膜に対して親水性化処理を行ってみたが，いずれも予期した効果を得るまでに至らなかった．
3. 一般的なネガティブ染色法では，シャドウイング法に比べ線毛のコントラストが著しく低く，検出効率が著しく悪い．螢光板上で線毛を確認し得る最低倍率は（×13,000）であったが，対照の Cr シャドウイング法では（×3,300）であった．ただしネガティブ染色法でも直接倍率を（×33,000）までアップすると，線毛観察は突如として容易に行えるようになる．

個々の写真について以下若干の説明を補足する．

写真1はブドウ球菌[15]の分裂像をキャッチしたもので，対物絞りを抜いてフリーで観察した時に認められた．ウオーブラ (wabbler) を用いて正焦点を出し，フォーカスをアンダー側に変えてゆくと，黒々としたPTAの塊りの中に角張ったブドウ球菌の白い輪廓と隔壁が見え出した．撮影時のフォーカス修正は，常とは逆にこの状態から対物励磁電流増加の方向にズラしてゆき好結果を得た．**写真2**はサルモネラで，菌体とべん毛のコントラストのバランスがよくとれた例として示した．対物絞りは120μm口径を用いたが，これと殆んど同じ像コントラストのものを，加速電圧 60kV，対物絞りフリーの組

合せで出現させることができた．ただし本例の 100kV の方が像の解像性，透過性で一段と優れている．また同一試料についてのシャドウイング写真と比較してみると，ネガティブ染色による方がべん毛数が際立って多いことが認められた．写真3はコレラ菌で，ラセン状になった菌体，べん毛のねじれ[10]が珍しく捕捉された例である．ねじれの方向は右巻きに見えるが，にわかに判断は下せない問題である．写真4はウエルシュ菌の芽胞形成過程を示したパターンである．対物絞りはブドウ球菌同様フリーとして観察した．菌体は大型で重く支持膜が切れ易い傾向が強いので，電子ビームを弱めて暗い状態で観察し，20秒という長い露光時間をかけて撮影した．写真5はセレウス菌で，対物絞りはフリーである．菌体に厚みがあるのでPTAの偏りが著しく，A法の欠陥を端的に示す例となっている．写真6は大腸菌で，この視野の場合PTAの偏りが極端でなく，線毛の見え具合も比較的良好だったので，菌体，べん毛，線毛3者のバランスのとれた表現を意図した作例である．対物絞りは120 μm，直接撮影倍率（×20,000）で，現像はカテコール表面現像法を用い階調表現に留意した．菌は栄養型で菌体表面には独得のひだ様構造[17]がみえ，べん毛，線毛の重なりも認められる．菌体周辺部の線毛は PTA の影響でコントラストが低下し，また菌体内から流出した物質に視野を妨害されて見えにくくなっている．

写真7，8はB法による作例である．すなわち

1. 支持膜上の余剰 PTA は，凍結真空乾燥の結果白色を呈するが，支持膜上に固着しており粉末化していない．ブロワーによって PTA を大気中で飛散させる目的は，B法では困難と判断された．
2. 電顕視野に PTA 凝集塊が多数認められ，菌の見え具合は不安定である．時折写真7，8のような視野が見出され，このような場合 PTA の拡がりはA法に比べて良好で，線毛はコントラストがあり，螢光板上で凡そ（×5,000）から認め得るようになる．
3. B法ではカーボン補強したコロジオン支持膜を使用したが，写真8のように凍結真空乾燥の影響で支持膜上に亀裂の入るトラブルが多くみられた．写真8で下側の菌は栄養型のため亀裂は大であり，上側の菌はゴーストに近く軽いので亀裂は小さい．

考　察

ネガティブ染色用の支持膜は本来薄くて十分の強度を持たねばならないが，今回は対象がサイズの大きい細菌なので，使いなれたコロジオン単膜で通してしまった．マイクログリッドは穴径が細菌用には小さ過ぎることと，しばしば二重膜を生じて解像を低下させるので敬遠した．ネガティブ染色では染色剤の偏りによる支持膜へのストレスが意外に大きく，膜破れの著しい現象に悩まされた．殊に凍結真空乾燥の場合が激しいので，今後はカーボン膜使用を本格的に検討したい．支持膜の親水性化処理に当り，グロー放電による支持膜へのダメージが意外に大きいことも判った．

加速電圧では 100kV 採用が像のコントラストの強過ぎを緩和し，高解像を発揮して有利である．ただし撮影時フイルム感度が著しく低下するので露光量は大幅な増加を必要とする．撮影時のフォーカス調整は 60, 80kV に比べシビアーになり注意を要する．

対物絞りのサイズは，大きな値をとるにつれて像コントラストは低下し，解像性は逆に向上する．細菌のネガティブ染色では像コントラストの過大すぎることが問題なので，現用の 20, 40, 80, 120μm の組合せよりも，120μm を中心に上下に振分けた組合せの方が有用と考える．

最大の課題は細菌試料における PTA 染色剤の偏りをいかに解消するかにある．表面現像法による階調表現やその他幾通りかテストした方法も，強力な解決策にはならなかった．最も評価の高いカーボン膜とグロー放電の組合せも，高度の熟練さを要求されるであろう．最近登場したのがカーボン膜とフリーズ・ドライ法の組合せによるもので，その内容は PTA の展開を図るのでなく，余剰の PTA を液体窒素で凍結し，真空乾燥により粉末化し，ブロワーで飛散させるという着想である．PTA 粉末化には−85～90°で 1hr 保持しながら真空乾燥させることが必要条件という．本実験Bでは −90° で 1hr 保持する過程が装置の関係で欠如し，余剰 PTA を飛散させ得ないところに失敗の原因があると思われる．

ネガティブ染色と Cr シャドウイングの比較では，両者夫々に長所，短所があり一方的に優劣を決めかねることが判った．その好例は大腸菌の線毛が，通常のネガティブ染色法では（×13,000）から観察可能なのに対して，シャドウイングでは，その著しいコントラストの特徴から（×3,300）程度で可能となることである．最近蒸着材料にタングステンを用いる高解像シャドウイングが開発され[2]，シャドウイング技術の見直しが行われている情勢であり，今後両者は併用して生物試料分野の形態研究に役立たしめるべきと考える．

ま と め

透過型電顕の分野において，高解像観察と観察のスピード化への試みとして，従来のシャドウイング法重点を改め，PTA ネガティブ染色により各種細菌諸器官の観察法を検討した．染色効果の過剰な菌体と芽胞，染色効

果の希薄なべん毛，線毛の諸器官が，一葉のプリント上で階調よく同時表現のできる条件を求めてみた．その結果，薄いコロジオン支持膜，高い加速電圧100kV，大きい対物絞り 120μm，およびカテコール表面現像法等の簡易な組合せで，直接撮影倍率2万倍，引伸し綜合倍率約10万倍までの写真が安定して作製し得ることを見出した．使用電顕はJEM-100Bである．

また大腸菌の線毛を対象としてフリーズ・ドライ法の基礎実験を行い，ネガティブ染色における線毛の検出倍率を，これまでの（×13,000）から（×5,000）に引下げるのに成功した．

（本研究の概要は日本電子顕微鏡学会第35回学術講演会1979年5月で発表した．）

文　献

1) 前木吾市：東京衛研年報，23，27，1971
2) 安達公一：電子顕微鏡，18 (1)，48，1978
3) 水平敏知：電子顕微鏡，81，1972，医歯薬出版
4) 東　昇，遠山　益：電子顕微鏡学実習 146，1973，共立出版
5) 山田英智，矢島権八，渡辺陽之輔，相原　薫，浅野伍朗：応用電子顕微鏡学，227，1973，医歯薬出版
6) Amano, Y. 外：*J. Virol.*, 8 (5)，1971
7) 天野保二：第31回電顕学会抄録集，144，1975
8) 平野　正：第31回電顕学会抄録集，156，1975
9) 深井孝之助，保坂康弘，西村昭子：*J. Electron Microsc.*, 21 (4)，331，1972
10) 赤堀　宏，福岡孝寿：第30回電顕学会抄録集，171，1974
11) Hosoi, J., Iwata, H., and Okutomi, S.: *J. Electron Microsc.*, 28(1)，49，1979
12) 安達公一，石原信一，岡田正和ら：電子顕微鏡利用の基礎，150，1975，共立出版
13) 長武　均，田中敬一，福留初子，満島　明，阿藤孝二郎：第35回電顕学会抄録集，3，1979
14) 前木吾市：東京衛研年報，22，63，1970
15) 菅沼　淳：電子顕微鏡，11 (1)，12，1976
16) Brock, T. D.：微生物学概論上，関文威・柳沢嘉一郎訳，30，1979，共立出版
17) 梅田昭子，天児和暘：第31回電顕学会抄録集，158，1975

写真説明

Explanation of Figures

1：ブドウ球菌．*Staphylococcus.* 分裂過程を示す隔壁が見える．対物絞りはフリー．（×28,000）

2：サルモネラ．*Salmonellae.* 加速電圧 100kV と対物絞り 120μm の組合せで，菌体とべん毛の階調のバランスをとる．（×12,000）

3：コレラ菌．*Vibrio cholerae.* ファージ液中のコレラ菌．ラセン状の運動状態が想像される．カテコール表面現像法（×21,000）

4：ウェルシュ菌．*C. perfringens.* 対物絞りはフリー．矢印は芽胞形成過程を示す．左の栄養型の菌は細胞膜，細胞壁の輪郭が明瞭で右の芽胞を持った菌と対照的である．（×8,000）

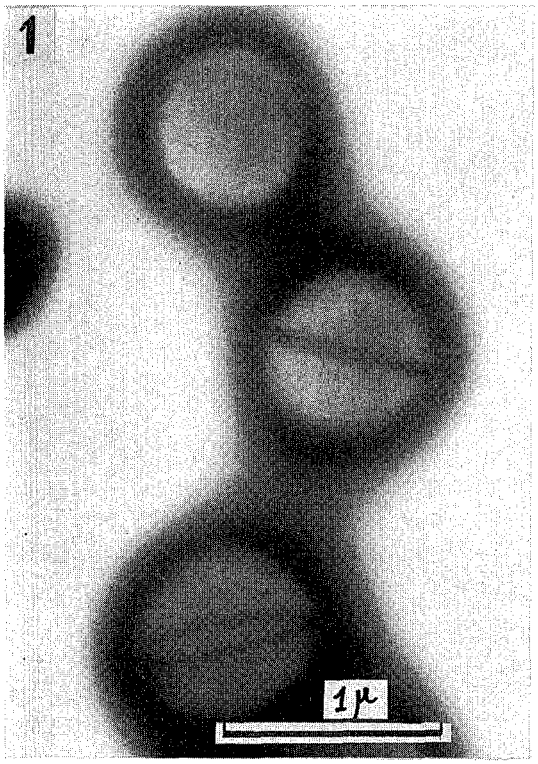
5：セレウス菌．*B. cereus.* 対物絞りはフリー．細菌のネガティブ染色で，最も陥り易い染色剤の偏りを生じた例．このため菌から出ているべん毛が離れて見え，不自然なパターンとなる．（×8,000）

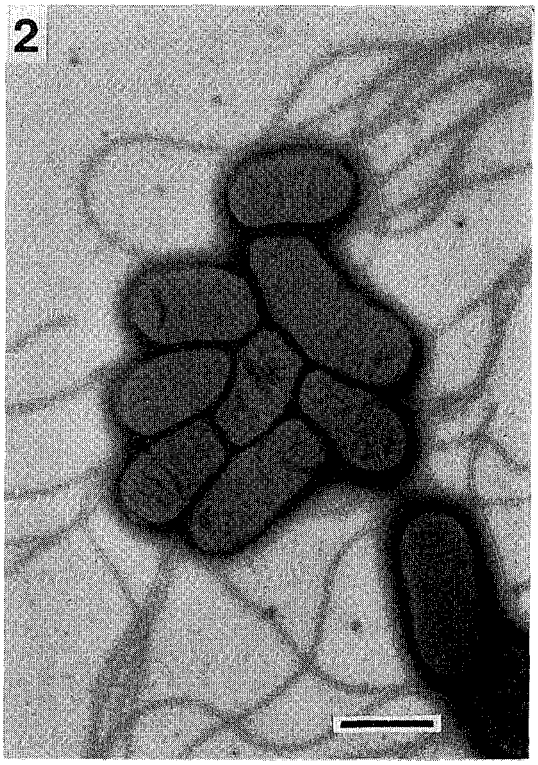
6：大腸菌．*E. coli.* 菌体表面，べん毛および線毛3者のバランスのとれた表現を狙って作製したもの．カテコール表面現像法による．この一般的なネガティブ染色では線毛は見えにくく，螢光板上（×13,000）から観察可能となる．測定値は線毛約70A，べん毛約180A．（×40,000）

7：大腸菌．*E. coli* (Freeze-drying)．ネガティブ染色した試料を凍結真空乾燥して観察したもの．線毛，べん毛のコントラストが高まり，螢光板上で線毛は（×5,000）から観察し得る．D-19 現像．測定値は線毛約80A，べん毛約220A．（×34,000）

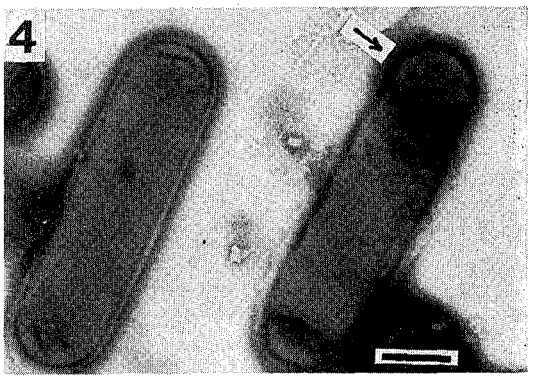
8：大腸菌．*E. coli* (Freeze-drying)．すべて写真7の場合に同じ．下方の栄養型菌の周りの支持膜の亀裂は，フリーズ・ドライによるトラブル．上方ゴースト菌の周りで線毛がよく見える．（×22,000）

Cr シャドウイングでは大腸菌線毛が（×3,300）から観察可能であり，線毛検出には有利であるが，密接して束の状態になった線毛を解像できにくくなる．一方ネガティブ染色では解像力がすぐれ，線毛の一本一本を解像し得る．


1
1μ


2

3


4

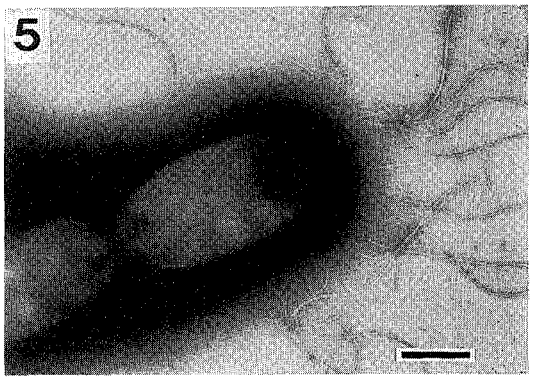

5

Table 1. Result of Statistical Analysis on the Urinary γ-GTP Activity in School Age Children

	Boy	Girl
Subject Number	103	117
Acceptance Number	101	111
Rejection Percentage	1.94	5.13
Mean Value (U/l)	25.7	25.9
Standard Deviation (U/l)	11.77	11.66
Coefficient Variation	0.4575	0.4508
upper Rejeciton Limit (U/l)	56.95	56.7

U/l と女子生徒の平均活性値25.9±11.66U/l の間には全く差が認められなかった．また，前述した方法によって求められた棄却限界上限活性値も，男子生徒および女子生徒ともにほとんど等しい水準であった．なお，Tableには示してないが，この時の棄却限界下限活性値は負の値として得られた．

さらに，この小中学生の一時尿における γ-GTP 活性値の，F分布にもとづいた棄却検定のくり返し演算において，異常に高い活性値であると判定されたために，平均活性値を算出する対象から除外されたものは，男子生徒の2/103例および女子生徒の6/117例であった．

佐野ら[4]は，健常成人の一日尿における γ-GTP の平均活性値（男性：26.7±18.1U/day，女性：23.0±14.1 U/day）について性差は認められなかったと報告しているが，すでに述べた小中学生の一時尿における γ-GTP の平均活性値は，男女子生徒ともに佐野らが求めた平均活性値にきわめて近い数値であり，その性差値もより小さい値であった．なお，Szasz[5]は，尿中 γ-GTP について男性は女性に比較して約50％の排泄増加があると報告しているが，著者らが求めた小中学生の一時尿における γ-GTP の平均活性値の性差を検討した結果からは，そのような関係は認められなかった．このことについては，一日尿を用いた場合の佐野ら[4]の報告と同じ結果であった．

これらのことから，もし健康な場合においては，その尿中に排泄される γ-GTP の量に老若男女の差が認められないものとするならば，無理に24時間の蓄尿を行なわなくても，一時尿を用いてその活性を測定するだけで，その臨床検査意義をみたすことが可能であると考えられる．

また，F分布の危険率5％水準における一回だけの棄却検定による小中学生の一時尿の γ-GTP 活性値の関係は，男子生徒においては危険率1％水準におけるくり返し演算方法にもとづいた場合よりも1例多く棄却され，その平均活性値25.4±11.5U/l（C. V.＝0.4507）は棄却活性測定値の数に変化がなかった女子生徒の平均活性値よりも，微差ではあるが逆に低値を示すとともに，棄却限界上限活性値も3.61U/l だけ低下した．

著者らが，この調査にもとづいて得た小中学生の一時尿中 γ-GTP の平均活性値は，すでに報告[6]されている学童の血清中 γ-GTP 活性の正常値8±4mU/ml のほぼ3倍の値であった．このことは，Szasz[5]が，健常者の尿中 γ-GTP 活性値は血清中のそれの2～4倍であると報告している結果と一致する．

つぎに，小中学生313人の一時尿における定性検査成績について検討したところ，タンパク質では疑陽性および陽性に判定された生徒が32人（10.22％）に及び，そのうち完全に陽性であった生徒は14人（4.47％）であった．この完全陽性者の検索率は，東京都予防医学協会が報告[7]している昭和52年度の中学生の陽性率4.40％に匹敵するものであった．また，ウロビリノーゲンの2＋以上の判定を受けた生徒は22人（7.03％）であり，糖が疑陽性および陽性であった生徒は17人（5.43％）という結果であった．

一般に，尿細管型の腎疾患では，タンパク質の量としてはそれほど多くはないが，尿中に低分子量のタンパク質が確認されるようになる[8]．そこで，尿タンパク質が陽性（疑陽性者を含む）であった生徒については，尿中

Table 2. Relationship between Value above the 50U/l of Urinary γ-GTP Activity and Reading of Urinalyses

No.	Age	Sex	γ-GTP Activity	Urinalysis		
				Pro.	Ug.	Sugar
1	13	Girl	79.9(U/l)	+	++	±
2	13	Boy	79.	±	++	−
3	14	Girl	66.9	−	Normal	−
4	11	Boy	65.3	−	++	++
5	13	Girl	64.4	±	++	±
6	8	Girl	61.8	−	+++	+
7	13	Girl	60.5	+	Normal	−
8	14	Girl	59.1	−	Normal	−
9	11	Girl	55.6	±	+++	−
10	14	Boy	54.7	−	Normal	−
11	14	Boy	53.0	−	++	−
12	14	Girl	51.2	−	++	−
13	14	Boy	50.0	−	Normal	−

Pro. : Protein, Ug. : Urobilinogen

低分子量タンパク質の一つである β_2-ミクログロブリンの定量検査を行なってみたが，このたび調査した小中学生の被検尿の中に，それが定量的に確認できるような例はなかった．

なお，すでに述べた小中学生の一時尿中 γ-GTP の活性測定値が50U/l よりも高いものについて，すでに述べた方法にもとづいて行なった尿定性検査成績と対比させたものを Table 2 に示す．

Table 2 に示した成績の関係について検討したところ，この程度の尿中 γ-GTP 活性値水準では，タンパク質の定性検査成績よりも，肝機能の目安であるウロビリノーゲンとの関連性がより強く示唆されているような結果であった．このことから，一般に血清における γ-GTP 活性値は，肝炎や肝硬変症あるいは閉塞性黄疸ならびに肝癌などの際に上昇する[6]ものであるために，腎疾患のみならず肝機能との関連性も尿中 γ-GTP 活性値に影響を及ぼしているためと考えられた．

そこで，肝機能の目安である尿中ウロビリノーゲンの定量値と，尿中 γ-GTP 活性値との関連性についてくわしく検討するために，小中学生のそれぞれの検査値を相関的にプロットしたものを Fig. 1 に示す．

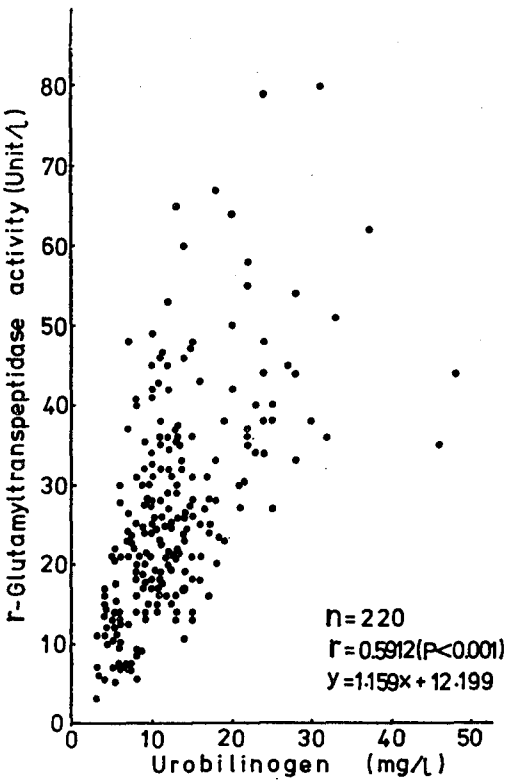


Fig. 1. Relationship between γ-Glutamyltranspeptidase and Urobilinogen in the Temporary Urines of the School Age Children

Fig. 1 に示したように，小中学生の一時尿中のウロビリノーゲン濃度と γ-GTP 活性値との相関係数 $\gamma=0.5912$ は，危険率 0.1%以下の水準でその有意性が示された．しかし，各プロットの散布状態について検討したところ，著者ら[9]が求めた同年令期の一時尿中ウロビリノーゲン濃度の棄却限界上限値（男女の平均値27.5mg/l）以上の測定値範囲においては，それらに対応する γ-GTP 活性測定値がウロビリノーゲン濃度の上昇とは反対に低下していることがうかがわれた．この点については，Table 2 に示した定性的な傾向と一致しなかった．そこで，ウロビリノーゲンの濃度が 27mg/l 以上の測定値を対象にして，γ-GTP 活性値との相関性について検討したところ，この場合の相関係数 $\gamma=-0.1198$ (n=11)は負の符号で示された．また，この時の回帰直線は，$y=-0.2254x+55.18$ の式で与えられた．このことは，尿中ウロビリノーゲンの濃度で肝機能状態を表わした限りにおいては，尿中 γ-GTP 活性値が肝機能を端的に反映していないことを意味している．

以上のことから，尿中 γ-GTP 活性の測定意義については，こんごさらにくわしく検討する必要があるが，このたび調査した範囲から推察すると，血清中 γ-GTP 活性の測定意義とは異なって，肝機能とのかかわりの程度は小さいものと考えられた．この点については，一日尿中 γ-GTP と血清中 γ-GTP との活性の相関は認められなかったという長ら[10]の報告と同じ意味あいの結果であった．

なお，このたび対象とした小中学生の一時尿中タンパク質陽性者はきわめて低濃度の定性判定成績であったために，β_2-ミクログロブリン量や γ-GTP 異常活性値との関連性が認められず，腎障害の機能部位を明らかにするまでに至らなかった．このことは，腎尿細管における再吸収の障害だけの者については，低分子量タンパク質の尿中排泄量がそれほど多いものでないために，定性検査で陰性と判定されている可能性のあることを示している．なぜならば，尿中 γ-GTP というのは，多量の尿タンパク質を認めた場合以外は尿細管からの分泌排泄が示唆されたという長ら[10]の報告からも裏付けられる．

これらのことから考えると，腎尿細管性障害の検査方法としては，尿タンパク質が定性検査で陽性を示した者よりも，それが陰性であった者についての検索方法にかかわる研究が重要であると考えられた．

ま と め

小中学生の男女子生徒の早朝一時尿313検体について定性検査を実施し，そのうちの220検体については γ-GTP 活性およびウロビリノーゲンの濃度を定量的に測定した．

1. 尿定性検査において，32人（10.22%）の生徒がタンパク質疑陽性および陽性と判定され，そのうち完全陽性者は14人（4.47%）であった．なお，尿タンパク質が検出された32人の生徒については，β_2-ミクログロブリンの定量的検査も試みたが，これらの被検尿の中にそれが定量的に確認できたものはなかった．また，ウロビリノーゲンの2＋以上の判定を受けた生徒は22人（7.03%），糖が疑陽性および陽性であった生徒は17人（5.43%）であった．

2. 小中学生の一時尿中 γ-GTP の推測統計的平均活性値は，男子生徒の 25.7±11.77U/l および女子生徒の 25.9±11.66U/l であり，両者の間に有意差は認められなかった．なお，F分布の危険率1%水準における棄却検定によって，男子生徒2人および女子生徒6人の活性測定値が，異常高値として棄却された．また，この時の棄却限界上限活性値は，男子生徒の 56.95U/l および女子生徒の56.7U/l という値であった．

3. この小中学生の一時尿中のウロビリノーゲン濃度と γ-GTP 活性値との関連性について検討したところ，その相関係数 $\gamma=0.5912$ は危険率 0.1% 以下の水準で有意性が示され，その回帰式は $y=1.159x+12.199$ であった．しかし，ウロビリノーゲン濃度が 27mg/l 以上の異常的測定値を対象にして γ-GTP 活性値との相関性を検討したところ，相関係数 $\gamma=-0.1198$ (n=11) は負の符号で示され，回帰直線も $y=-0.2254x+55.18$ の式で与えられた．

文 献

1) 金井 泉：臨床検査法提要，改訂増補第21～23版，Ⅱ-9，1964，金原出版K. K.，東京
2) 陳 敏鞏：臨床検査，6，497，1962
3) Szasz, G. : *Clin. Chem.*, 15, 124, 1969
4) 佐野紀代子，長 裕子，青木フサ子，保崎清人：臨床病理，23，819，1975
5) Szasz, G. : *Zschr. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, 8, 1, 1970
6) 藤沢 洌，川口陽太郎，田中健一，木村篤人，長村日出男，栗原宣夫，岡部和彦，高橋忠雄：日本臨床，364号，644，1973
7) 東京都予防医学協会：東京都予防医学協会年報，8号，35，1977
8) Peterson, P. A., Evrin, P, E., and Berggard, I. : *J. Clin. Invest.*, 48, 1189, 1969
9) 武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，30-1, 79, 1979
10) 長 裕子，佐野紀代子，保崎清人：臨床病理，25，921，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 79-83, 1979

小学生および高校生の尿中馬尿酸について

武士俣 邦 雄*, 霜 田 さと子*

Statistical Analyses on the Urinary Hippuric Acid of School Children and High School Students in Metropolitan Area

KUNIO BUSHIMATA* and SATOKO SHIMODA*

Keywords: 尿中馬尿酸 urinary hippuric acid, 推計学的解析 statistical analyses, 小高校生 school children and high school students

尿中に排泄される馬尿酸は，ベンゼン環がグリシンと抱合した解毒代謝終末産物として，肝臓機能検査はもとより，労働衛生の分野でもよく知られており，その成分の定量分析値を，シンナー系有機溶剤の暴露程度の指標にしようとする試みが盛んに行なわれている[1-12]．なぜならば，有機溶剤のほとんどが肝臓毒，腎臓毒，血液毒および神経毒などとして作用し[13]，その中毒が高じた場合には時としてヒトの生命を脅かす例も少なくないからである[14]．そのために，有機溶剤などの有害物質を取り扱う職場の作業従事者に対しては，労働基準法で特殊健康診断を行なうように勧奨し，あるいは義務づけている[15]．

また，自動車の排気ガスに含まれる鉛による中毒問題が提起された昭和45年以降，とくにタクシーなどでトルエンを主とした有機溶剤を燃料として使用するものが増加しているとともに[5]，オクタン価を上げる目的でトルエンを添加したガソリンが一般にも使用されている[16]．このことから，トルエンなどの有機溶剤が自然蒸散したり，あるいはエンジンでの不完全燃焼によって，大気を汚染する恐れのあることが想定される．

さらには，近年若者たちの間でシンナーによる幻覚遊びが流行し，社会問題となっていることは周知のところである．

したがって，検査によって被検者が受けたシンナー系有機溶剤の影響を評価するためには，その代謝産物の一つである尿中馬尿酸の測定意義が認められるが，そのためにはその被検濃度を比較する基準資料を作成しておく必要がある．またこのことは，今後の環境汚染との関連性を観察するためにも，現状をは握しておくことがきわめて重要である．

そこで著者らは，小学校および高等学校に通学する生徒の早朝一時尿を用いて，馬尿酸および肝機能の目安であるウロビリノーゲンを定量的に分析し，それらの測定値について推測統計的な解析を試みたので報告する．

検査の材料および時期

検査材料としては，総被検者407名の早朝一時尿を収集し，目的成分の定量分析に供した．この調査は，昭和52年の9月から10月にかけて都立小岩高等学校の生徒（以下小岩高校生と記す）99名（男子48名，女子51名）および都立国立高等学校の生徒（以下国立高校生と記す）147名（男子79名，女子68名）について，また12月には，江東区立南陽小学校の低学年生徒（以下南陽小学生と記す）85名（男子46名，女子39名）および立川市立第八小学校の低学年生徒（以下第八小学生と記す）83名（男子47名，女子36名）について定量検査を行ない，それらの成績を対象にして推測統計的にまとめたものである．

定量分析方法

ウロビリノーゲン[17]：採尿当日に還元処理操作を行ない，約14時間後に沪過し，沪液をエールリッヒの呈色反応にもとづいて発色させ，佐藤法による対照にしたがって比色して定量値を算出した．

馬尿酸：Ogata et al. の方法[18]にもとづいて尿中の馬尿酸を抽出し，抽出溶媒を蒸発乾固させたのちに，残留物を Umberger et al. の方法[19]にもとづいた呈色反応で発色させ，その呈色液を比色して定量値を求めた．

結果および考察

被検一時尿試料を，前述した定量方法にしたがって分析し，得られた馬尿酸およびウロビリノーゲンのそれぞれの測定値について，F分布にもとづいた危険率1％水準で，棄却値をまったく含まなくなるまでくり返して演算を行ない，その99％信頼範囲内の測定値だけを対象にして求めた推測統計的な数値を Table 1 に示す．

この Table 1 に示した小学生および高校生の馬尿酸濃度に関する推測統計的な数値の差異について，性別，

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Results of Statistical Analysis on the Urinary Hippuric Acid and Urobilinogen

	Sex	S. No.	Hippuric Acid (mg/ml)					Urobilinogen (mg/l)				
			R. No.	Mean	S. D.	C. V.	u. R. L.	R. No.	Mean	S. D.	C. V.	u. R. L.
Koiwa H. S.	Boy	48	0	0. 276	0. 088	0. 3195	0. 517	1	16. 23	5. 72	0. 3521	31. 91
	Girl	51	0	0. 289	0. 119	0. 4110	0. 612	0	16. 71	7. 67	0. 4590	37. 65
Kunitachi H. S.	Boy	79	2	0. 29	0. 108	0. 3720	0. 579	7	13. 38	4. 87	0. 3640	26. 46
	Girl	68	5	0. 295	0. 119	0. 4022	0. 615	0	15. 46	6. 82	0. 4412	33. 85
Nanyō E. S.	Boy	46	0	0. 375	0. 161	0. 4296	0. 817	0	9. 37	4. 13	0. 4404	20. 71
	Girl	39	0	0. 434	0. 177	0. 4085	0. 927	4	10. 55	3. 58	0. 3393	20. 6
Daihachi E. S.	Boy	47	0	0. 521	0. 158	0. 3032	0. 955	4	12. 35	5. 58	0. 4521	27. 76
	Girl	36	0	0. 473	0. 215	0. 4545	1. 075	0	13. 23	6. 22	0. 4695	30. 62
H. S. Students	Boy	127	4	0. 280	0. 096	0. 3423	0. 534	10	14. 26	5. 09	0. 3572	27. 72
	Girl	119	8	0. 284	0. 109	0. 3842	0. 572	6	15. 52	6. 68	0. 4302	33. 19
S. Children	Boy	93	0	0. 449	0. 176	0. 391	0. 915	7	10. 35	4. 53	0. 4375	22. 42
	Girl	75	2	0. 438	0. 178	0. 406	0. 914	3	12. 07	5. 4	0. 4471	26. 56

Note : S. No. : Subject Number, R. No. : Rejection Number, S. D. : Standard Deviation, C. V. : Coefficient Variation, u. R. L. : upper Rejection Limit Value, Koiwa H. S. : Tokyō-To Koiwa High School, Kunitachi H. S. : Tokyō-To Kunitachi High School, Nanyō E. S. : Kōtō Ward Nanyō Elementary School, H. S. Students: High School Students, Daihachi E. S. : Tachikawa City Daihachi Elementary School, S. Children: School Children.

年令層別および通学地域別に解析を行なった．まず，同年令層における推測統計的な平均濃度（以下平均排泄濃度と記す）の性差を，Welchの差の検定にもとづいて比較したところ，小学生および高校生ともに性別による有意差は認められなかった．しかし，小学生の一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度（男子：0.449±0.176mg/ml，女子：0.438±0.178mg/ml）と，高校生の一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度(男子：0.280±0.096mg/ml，女子：0.284±0.109mg/ml）を，Welch の差の検定にもとづいて比較検討したところ，同性間においては，男女子生徒ともに危険率 0.1% 以下の水準で小学生の平均排泄濃度の方が有意に高値であることが認められた．

なお，これらの小学生および高校生の一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度の算出に際して，小学生では女子の2例（男女子生徒全体として1.19%）および高校生の男女子生徒合せた12例（全体として4.88%）の各測定値が，F分布にもとづいた棄却検定によって異常高値であると判定されたために，その計算対象から除外された．これらの棄却測定値が，どのような理由によって異常値を示すことになったのかについては，単にシンナー系有機溶剤を用いた幻覚遊びだけによってもたらされたものとしてのみ結論づけることはできない．なぜならば，栄養上必須とされるアミノ酸の一つであるフェニールアラニンや[20]，炭酸を含まない清涼飲料水の保存料として0.6g/kg の割合で添加することが認められている安息香酸ナトリウム[21]が，生体内で代謝をうけて馬尿酸に生合成され，その後に尿中へ排泄されるからである．したがって，F分布の棄却検定によって異常高値として棄却された尿中馬尿酸のそれらの測定値については，被検者の摂取食物などとの関係についても合せて考察しなければならないが，このたびの調査では検査の主目的が異なる材料を利用しているために，それらの点については明らかにできない．

尿中馬尿酸濃度に影響を及ぼすようなものを摂取した者の測定値を，F分布の棄却検定で平均排泄濃度の計算対象から除外したものとするならば，すでに述べた小学生および高校生の平均排泄濃度は，普遍的な食生活者の正常な値を示しているものと考えることができる．このように考えると，高校生の一時尿中に排泄される馬尿酸量が，小学生のそれの6割強でしかないのは，筋肉質成長期の高校生の方が小学生よりも，必須アミノ酸であるフェニールアラニンの要求度が高いために，その代謝成分である馬尿酸の尿中排泄量が低下していることなどが推察される．

また，小学生および高校生のこれらの一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度を，友国ら[22]が抽出比色法にもとづいて求めた正常人の平均濃度 0.38±0.20mg/ml（n=20）に比べると，小学生では危険率20%強という低い確率でありながらも有意に高い値であったが，高校生では逆にほぼ5%という危険水準でその平均排泄濃度は有意に低値であることが，Welchの差の検定によって示された．

つぎに，一時尿中に排泄される馬尿酸濃度の通学地域による相違を，同年代の同性間において Welch の有意差検定にもとづいて比較検討した．その結果，工場地域と考えられている環境（城東地区）にある南陽小学校の男子生徒の平均排泄濃度 0.375±0.161mg/ml よりも，空気清浄な環境とされている多摩地区にある第八小学校の男子生徒の平均排泄濃度0.521±0.158mg/ml の方が，危険率 0.1% 以下の水準で有意に高い値であると判定された．

しかし，前記した両校の女子生徒間および城東地区の小岩高校と多摩地区の国立高校の男女子生徒ともに，その通学地域による平均排泄濃度の有意差は認められなかった．けれども，この尿中馬尿酸の平均排泄濃度の算出に際して，F分布の棄却検定にもとづいて異常高値であると判定されたために，計算対象から除外された測定値の出現は，国立高校生の7人（男子2人，女子5人）だけであった．このことを，第八小学校の男子生徒の尿中馬尿酸の平均排泄濃度が，南陽小学校の男子生徒のそれよりも有意に高かったことと合せて考えると，多摩地区の食生活を含めた全生活環境の中に排泄増加を来すような何らかの因子があるように思われる．なぜならば，すでに著者ら[23]は，一時尿中に排泄されるコプロポルフィリンの平均濃度および棄却異常高値の出現率が，城東地区の中学生よりも多摩地区の中学生の方が高かったことを報告してあり，地域的にはこのたび調査した尿中馬尿酸の関係も同じ傾向であったことはきわめて興味深い結果であった．

さらに，Table 1 に示した一時尿中のウロビリノーゲン濃度の推測統計的な数値について検討を行なう．まず，小学生および高校生の一時尿中ウロビリノーゲンの平均排泄濃度を，Welch の差の検定にもとづいて比較したところ，男女子生徒ともに危険率1%以下の水準で高校生の方が有意に高値であると判定された．また，性別について同様に比較すると，小学生および高校生ともに危険率 0.1% 以下の水準で女子生徒の方が有意に高い状態であったが，通学地域別ではそれぞれが異なった関係であって，共通的な関連傾向は認められなかった．

すでに述べてきた馬尿酸は，肝臓のミトコンドリアに存在する *glycine acyltransferase* により，ベンゼン環

のグリシン抱合解毒反応が促進されることから，臨床生化学の分野では，被検者に安息香酸ナトリウムを静脈注射もしくは経口的に投与し，その後に尿中へ排泄されてくる馬尿酸量を経時的に測定して，肝実質障害の有無を調べる検査として確立されている[24]．そこで，肝機能の目安であるウロビリノーゲンと馬尿酸の尿中濃度の相互関係について検討するために，小学生および高校生のそれぞれの測定値を相関的にプロットした散布図をFig. 1およびFig. 2に示す．

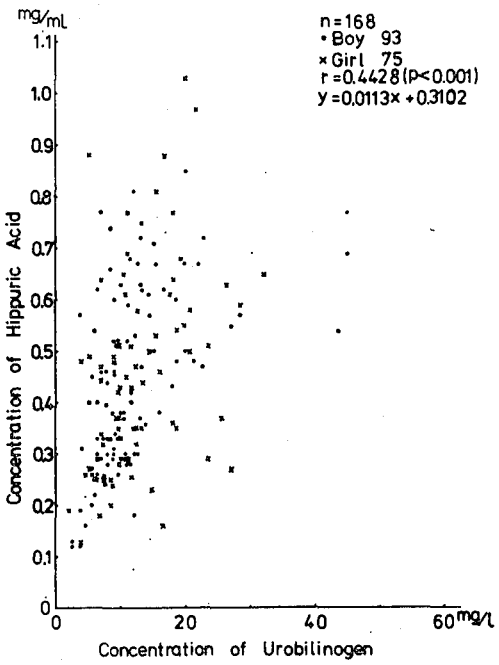


Fig. 1. Relationship between Urobilinogen and Hippuric Acid in the Temporary Urines on the School Children

この Fig. 1 は，小学生における一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸のそれぞれの測定値を，相関的にプロットした散布図である．この男女子生徒全体の一時尿中ウロビリノーゲンと馬尿酸の相関係数 $r=0.4428$ は危険率0.1%以下の水準で有意であったが，性別に相関度を検討したところ，男子生徒の相関係数 $r=0.5057$（$P<0.001$）と回帰直線 $y=0.0112x+0.3138$ に対し，女子生徒における相関係数 $r=0.3711$（$P<0.001$）は小さくそのうえ回帰直線 $y=0.0068x+0.1857$ も x 軸に対する角度が小さい結果であった．また，肝機能の目安であるウロビリノーゲンのF分布における薬却限界上限値以上の測定値と馬尿酸の濃度との関係について検討したところ，相関係数 $r=0.6089$（$n=8$）は20%弱という高い危険率水準でようやく有意性が示されるていどであり，その回帰直線は $y=0.0109x+0.2028$ であった．

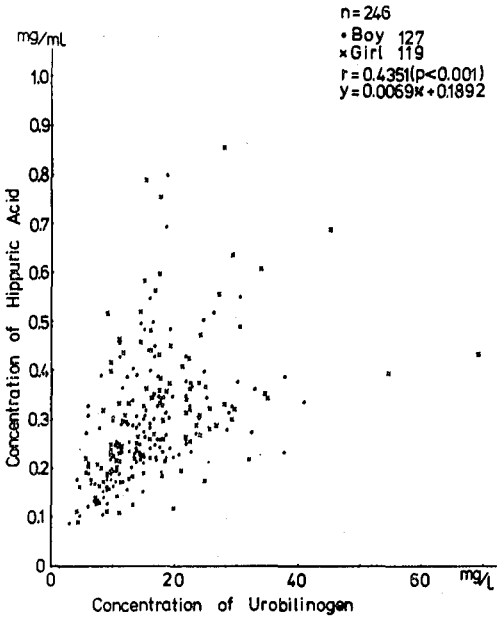


Fig. 2. Relationship between Urobilinogen and Hippuric Acid in the Temporary Urines on the High School Students

さらに，Fig. 2 は高校生における一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸のそれぞれの測定値を，相関的にプロットした散布図である．この男女子生徒全体の相関係数 $r=0.4351$ は，危険率0.1%以下の水準で有意であった．なお，小学生の場合と同様に，相関度を性別に検討したところ，男子生徒における相関係数 $r=0.4133$（$P<0.001$）と女子生徒のそれ $r=0.4444$（$P<0.001$）の間には小学生の場合ほどの差は認められず，その回帰直線もそれぞれ $y=0.0068x+0.1857$ および $y=0.0069x+0.1948$ の式で示された．さらに，高校生について尿中ウロビリノーゲンのF分布における薬却限界上限値よりも高値であった測定値を対象にして，その被検体の馬尿酸との相関度を検討したところ，その相関係数 $r=0.1241$（$n=15$）は，危険率を相当に高くしてもその有意性は認められず，その回帰直線 $y=0.0016x+0.3449$ もすでに述べてきたものに比べると，もっとも x 軸に傾斜したものであった．このことは，肝機能が低下した場合には馬尿酸の生合成代謝が遅れることおよび代謝経路の変化を示しているものと推察されるので，こんご肝障害者における馬尿酸の尿中排泄水準および解毒抱合能などについて検討する必要があるものと考える．

まとめ

江東区立南陽小学校の低学年生徒85名および立川市立第八小学校の低学年生徒83名ならび都立小岩高等学校の生徒99名および都立国立高等学校の生徒147名の早朝一時尿を用いて，馬尿酸およびウロビリノーゲンの濃度を測定し，それぞれの測定値を学年期別，性別および通学地域別に比較するとともに，両成分の相関性についても検討し，それらの関連性などを推測統計的手段にもとづいて総合的に解析を行なった．

1. 一時尿中馬尿酸濃度の推計統計的平均値を，Welchの差の検定にもとづいて比較したところ，小学校の男子生徒の平均濃度0.449±0.176mg/ml（n=93）と女子生徒の平均濃度0.438±0.178mg/ml（n=73）および高校生の男子生徒の平均濃度0.280±0.096mg/ml（n=123）と女子生徒の平均濃度0.284±0.109mg/ml（n=111）の間において性差は認められなかった．しかし，小学生と高校生の同性間においては，男女子生徒ともに危険率0.1%以下の水準で，小学生の方が有意に高値であることが認められた．

なお，推測統計的平均値を算出する際に，F分布の棄却検定にもとづいて異常高値であると判定されたために，その計算対象から除外した測定値は，小学生は女子生徒の2例のみであり，高校生では男子生徒の4例および女子生徒の8例であった．

また，通学地域別に尿中馬尿酸濃度を比較検討したところ，南陽小学校の男子生徒の平均濃度0.375±0.161mg/ml（n=46）よりも第八小学校の男子生徒の平均濃度0.521±0.158mg/ml（n=47）の方が，危険率0.1%以下の水準で有意に高値であると判定された．しかし，両校の女子生徒間および高校生の男女子生徒間ともに，同性のあいだにおいて平均濃度の差異は認められなかった．なお，F分布の棄却検定によって異常高値であると判定されたために，その平均濃度の計算対象から除外された測定値は，第八小学校と同じ地域にある国立高校の男子生徒の2例および女子生徒の5例のみであった．

2. 尿中ウロビリノーゲンの推測統計的な平均濃度を，小学生と高校生の同性間において，Welchの差の検定にもとづいて比較したところ，男女子生徒ともに危険率1%以下の水準で高校生の方が有意に高値であった．また，性別についても比較したところ，小学生および高校生ともに危険率0.1%以下の水準で女子生徒の方が有意に高値であったが，地域的に共通な傾向は認められなかった．

3. 小学生における一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸の濃度の相関係数 $r=0.4428$ は，危険率0.1%以下の水準で有意であった．なお，性別に相関度を検討したところでは，男子生徒における相関係数 $r=0.507$（$P<0.001$）は女子生徒における相関係数 $r=0.3711$（$P<0.001$）よりも大きかった．

また，高校生における一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸の濃度の相関係数 $r=0.4351$ も，危険率0.1%以下の水準で有意であった．さらに，高校生についても性別に相関度の検討を行なったところ，男子生徒における相関係数 $r=0.4133$ および女子生徒における相関係数 $r=0.4444$ ともに危険率0.1%以下の水準で有意であったが，両係数の大きさの差は，小学生の場合ほど明瞭ではなかった．

文献

1) El Masry, A. M., Smith, J. N., and Williams, R. T.: *Biochemical J.*, 64, 50, 1956
2) Ikeda, M. and Ohtsuji, H.: *Brit. J. industr. Med.*, 26, 162, 1969
3) Ikeda, M. and Ohtsuji, H.: *Brit. J. industr. Med.*, 26, 244, 1969
4) Ogata, M., Tomokuni, K., and Takatsuka, Y.: *Brit. J. industr. Med.*, 27, 43, 1970
5) 野見山一生，小松富三男：産業医学，12，6，1970
6) Ohtsuji, H. and Ikeda, M.: *Brit. J. industr. Med.*, 27, 150, 1970
7) Ohtsuji, H. and Ikeda, M.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 18, 321, 1971
8) 友国勝麿，緒方正名：産業医学，14，24，1972
9) 佐藤章夫，藤原幸子：産業医学，14，32，1972
10) 堀口俊一，寺本敬子，清田郁子，円藤吟史：産業医学，16，228，1974
11) Sollenberg, J. and Baldesten, A.: *J. Chromat.*, 132, 467, 1977
12) Kira, S.: *Brit. J. industr. Med.*, 34, 305, 1977
13) 池田正之：労働の科学，25，14，1970
14) 原　一郎：労働の科学，25，4，1970
15) 労働省令第24号抜すい：労働の科学，25，44，1970
16) 吉原武俊，寺島　潔，遠山逸雄，奥本千代美，長嶋真知子，渡辺四男也：東京衛研年報，28-1，66，1977
17) 陳　敏馨：臨床検査，6，497，1962
18) Ogata, M., Tomokuni, K., and Takatsuka, Y.: *Brit. J. industr. Med.*, 26, 330, 1969
19) Umberger, C. J. and Fiorese, F. F.: *Clin. Chem.*, 9, 91, 1963
20) 近藤金助：アミノ酸の栄養・生化学，初版，497，1960，産業図書K. K.，東京
21) 日本薬学会編：衛生試験法注解，大改訂版，171，1973，金原出版K. K.，東京
22) 友国勝麿，緒方正名：産業医学，14，103，1972
23) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京衛研年報，27-1，223，1976
24) 金井　泉：臨床検査法提要，第21～23版，XII-29，1964，金原出版 K. K.，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 85-88, 1979

市販医療用医薬品の品質について（第7報）　塩酸ヒドララジン

上原真一*, 宮武ノリエ*, 岡本朋子*, 重岡捨身*
下平彰男*, 田窪栄一*

Quality Check of Drugs (VII)　Hydralazine Hydrochloride

SHIN-ICHI UEHARA*, NORIE MIYATAKE*, TOMOKO OKAMOTO*, SUTEMI SHIGEOKA*, AKIO SHIMOHIRA* and EIICHI TAKUBO*

Keywords：塩酸ヒドララジン hydralazine hydrochloride, *p*-ニトロベンツアルデヒド *p*-nitrobenzaldehyde, hydralazine nitrobenzate, 比色定量法 colorimetric determination

市販医療用医薬品のうち，今回は降圧剤として使用されている塩酸ヒドララジン（以下HHと略す）の定量法を検討したので報告する．

HH (Fig. 1) は，スイス，チバ・ガイギー研究所のDruey ら[1] によって合成されたフタラジン誘導体で，無臭，苦味のある白色結晶性粉末で，水に溶け，エタノールに溶けにくく，エーテルに不溶である．

Fig. 1. Hydralazine Hydrochloride

HHは末梢細動脈の血管平滑筋に直接作用し，血管を拡張させて降圧作用を現わすといわれるが，作用機序については十分明らかにされていない．降圧作用は強力で広範囲な症例に適用され，特に拡張期血圧の降下が著明である．現在第9改正日本薬局方（J. P. IX），第19改正米国薬局方（USP XIX）に収載され，医薬品第12次再評価においても，経口では本態性高血圧症，妊娠中毒症による高血圧に，注射では高血圧性緊急症（子癇，高血圧性脳症等）に有効と判定されている．

HHおよび製剤中のHHの定量法として，ヨウ素酸カリウム滴定法，紫外部吸収法[2-4] が知られている．前者はヒドラジノ基の還元性に基づく反応を利用したものであり，後者は，HH水溶液の λmax 260nm における吸光度を測定する方法で現在 USP XIX Hydralazine Hydrochloride Tablets の Content uniformity に利用されている．HH水溶液のUV吸収はフタラジン由来の吸収と考えられ，さらに溶液が酸性になるにしたがい吸収曲線に変化がみられる．(Fig. 2)

J. P. IX はHHの確認試験として，nitrobenzaldehyde（以下 NBA と略す）を反応させ，シッフ塩基 (hydralazine-nitrobenzate 以下 H-NB と略す) を生成しその融点を測定しているが[2] (Fig. 3)，著者らはこの反応に

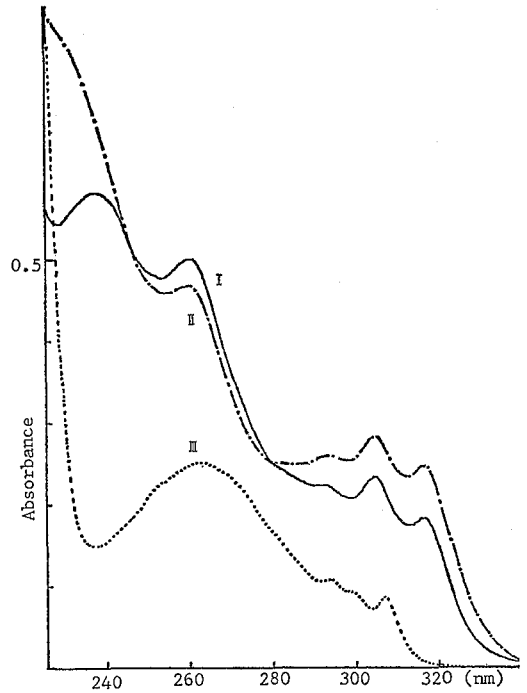


Fig. 2. Absorption Spectra of HH and Phthalazine
I : HH in Water II : HH in 0.2N HCl
III : Phthalazine in Water about 40μg/mℓ

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

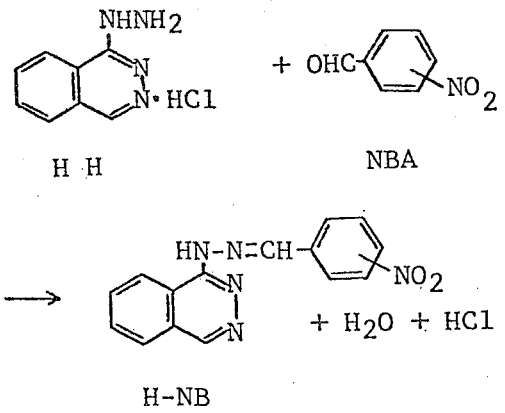


Fig. 3.

着目し，検討した結果，生成するシッフ塩基は溶媒に溶けにくいが，溶液の λmax における吸光度はHH濃度に比例することを認め，比色定量法を検討し良好な結果を得た．

本法は反応試薬として *p*-NBA を用い，生成するH-*p*-NB をセロソルブに溶解し λmax 420nm における吸光度を測定するものである．

前述のようにヨウ素酸カリウム滴定法，紫外部吸収法はHHに特異的ではなく，特に製剤においては，滴定法は比較的多量の試料を必要とし，また終まつ点の確認が困難な例がしばしば見うけられる．一方UV法では，使用される賦形剤による pH の影響などの妨害が見られる．これらの方法に比較して本法はその反応機構から考えてもHHに選択的で，検討の結果再現性は良好で，他物質の影響を受けることが少く，少量の試料で行うことができ，HHおよびHH製剤の定量法としてきわめて有用な方法であると考える．

実験の部

1. 試薬・試液 ①HH標準品：J. P. IX塩酸ヒドラジンを J. P. IX の定量法にしたがい定量し，$C_6H_8N_4 \cdot HCl$ として 99.0%以上のものを標準品とした．②*o*-, *m*-, *p*-NBA（いずれも和光純薬特級）③*p*-アルデヒド液：P-NBA の0.15%エタノール溶液．④H-*o*-, *m*-, *p*-NB：*o*-, *m*-, *p*-NBA をそれぞれとり，J. P. IX HH 確認試験（1）にしたがって得た沈殿をろ取し，水洗したのち希エタノールから2回再結晶し，105°で3 hr 乾燥したもの．(mp; *o*-, 240° *m*-, 224.5° *p*-, 244.5°) ⑤ヒドラジンニトロベンツェート標準液 (ortho, metha, para)（それぞれ H-*o*-, *m*-, *p*-NB 標準液と略す）：H-*o*-, *m*-, *p*-NB のそれぞれ約 3mg を精密に量り褐色メスフラスコにとり，セロソルブを加え必要なら加温して溶解し，正確に 200m*l* とする．この液 20 m*l* を正確にとりセロソルブを加えて正確に50m*l*とする．溶解および希釈は光をさけて行う．⑥セロソルブ（エチレングリコールモノエチルエーテル）（和光純薬特級）その他のものは J. P. IX による．

2. 定量法 試料液(T) HH約 20mg を精密に量り，水を加えて溶解し，さらに水を加えて正確に100m*l* とする．この液 10m*l* を正確にとり，水を加えて 50m*l* とする．

HH標準液（S）HH標準品約 20mg を精密に量り，水を加えて溶解し，以下（T）と同様に操作する．

操作 (T), (S), 水 (B) のそれぞれ 5m*l* を正確に量り，それぞれ 100m*l* の褐色マイヤーフラスコにとる．*p*-アルデヒド液 1.0m*l* をそれぞれに加え，ゆるやかに振り混ぜたのち，冷却器をつけ30分間水浴上でおだやかに還流する．一旦室温まで冷却したのち，冷却器をはずし，再び水浴上で蒸発乾固するまで加熱を続ける．残留物にセロソルブ 50m*l* を正確に加え溶解し，（B）を対照として層長10mm で 420nm 附近の λmax における吸光度 A_T, A_S を測定し，定量する．残留物をセロソルブに溶解してからのちは，光をさけて操作する．

3. 定量法検討

H-NB セロソルブ溶液収吸曲線および反応試薬選定 H-*o*-, *m*-, *p*-NB 標準液はそれぞれ 400, 380, 420nm に λmax を持つ．(Fig. 4) 比吸光度は *o*-, *m*-, *p*-の順に大となり，したがって反応試薬として *p*-NBA を用いることにし，以下検討を行った．

H-*p*-NB の生成 再現性および検量線 HH標準液，水，それぞれ 5m*l* を正確にとり，2. 定量法にしたがって操作し，吸収曲線を測定した結果，H-*p*-NB 標準液の吸収曲線と一致した．再現性は良好で（n＝15, CV＝0.9%），またHH濃度 (0～0.06mg/m*l*) の範囲で検量線を作成するとき，原点を通る直線性を示した．(Fig. 4)

***p*-アルデヒド液の濃度** HH標準液 5m*l* (HH 1.02×10^{-6}mole を含む) に対し，各濃度の *p*-アルデヒド液(2×10^{-6}～1.5×10^{-5}mole/m*l*) を使用し，定量法にしたがって操作し，吸光度を測定した．*p*-アルデヒド液濃度は 6×10^{-6}mole/m*l* 以上で吸光度がほぼ一定最大を示した．(Fig. 5) したがって 0.15% エタノール溶液 (9.9×10^{-6}mole/m*l* を含む) を使用することにした．

フタラジン，ヒドラジン塩の影響 HH，フタラジン，硫酸ヒドラジン共存（モル比1：1：1）の溶液について，定量法にしたがってHHの回収率を測定した結果は，100.0%（n＝5，σ=1.2%）で，フタラジン，

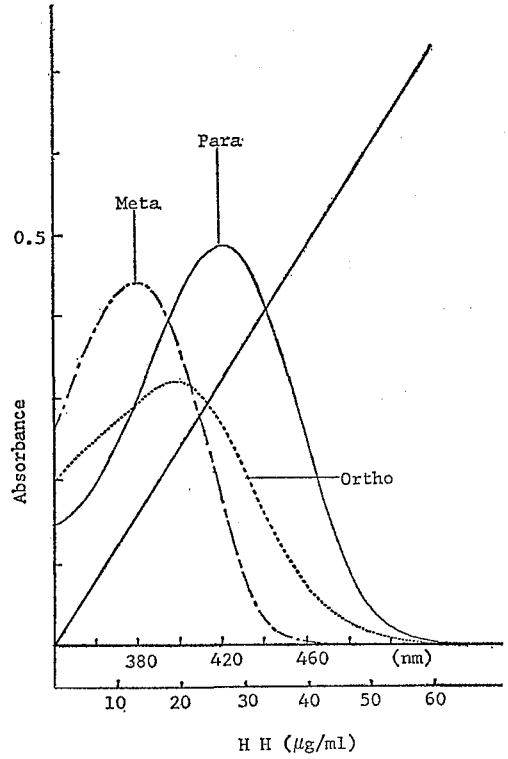


Fig. 4. Absorption Spectra of H-NB and Calibration Curve of HH

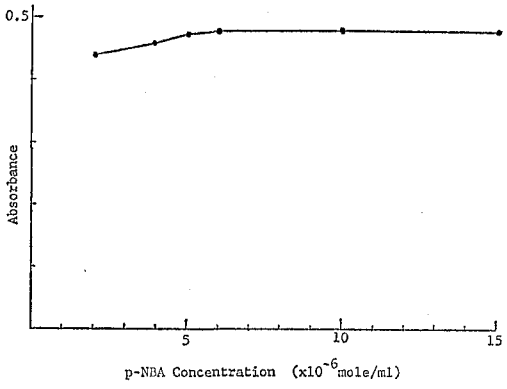


Fig. 5. Effect of *p*-NBA Concentration on the Absorbance at 420nm

ヒドラジン塩とも妨害しなかった.

測定溶媒の選択と溶液の安定性 H-NB は *o*-, *m*-, *p*- いずれもクロロホルム, セロソルブ, エタノール, メタノールにきわめて溶けにくく, 水にほとんど溶けないが, 沸点が高く, 安定で比較的溶解性のまさるセロソルブを用いることにした. またいずれの溶媒を用いても, その溶液は光に対し不安定であるが, しゃ光した状態では少くとも 5hr は安定である. したがって溶解および測定は暗所で行うことにした.

4. 製剤中のHHの定量 HH製剤は現在, 錠, 顆粒, 散剤, 注射液, 注射用剤が承認されており, いずれもHH単味の製剤である. 今回はこれら市販製剤のうち, 素錠, 糖衣錠, 散剤, アンプル入り凍結乾燥粉末 (注射用剤) について検討を行った.

定量 試料液 (T'): 注射用剤: HH約 20mg を精密に量り, 水を加え溶解したのち, さらに水を加えて正確に100m*l* とする. その 10m*l* を正確にとり, 水を加えて正確に 50m*l* とする.

散剤および錠剤: 散剤はそのまま試料とし, 錠剤は20錠以上をとり, その重量を精密に量り, 粉末とし試料とする. 試料のHH約 20mg に対応する量を精密に量り, メタノール 75m*l* を加えて, 30 分間振り混ぜたのち, メタノールを加えて正確に 100m*l* とする. この液を遠心分離し, 上澄の 10m*l* を正確にとり, 水浴上でメタノールを留去する. 残留物に水を加えて溶解したのち, 水を加えて正確に 50m*l* とする.

(T'), (S), 水 (B) のそれぞれ 5m*l* を正確にとり以下 2. 定量法 操作にしたがって操作し, 吸光度 A_T', A_S を測定する. 別に (T') の 5m*l* を正確にとり, *p*-アルデヒド液に替え, エタノール 1m*l* を正確に加え上記と同様に操作して, 吸光度 A_t' を測定する.

$$\text{HHの量(mg)} = \text{HH標準品の量(mg)} \times \frac{A_T' - A_t'}{A_S}$$

試料液の調製にあたり, 散剤および錠剤については色素, 賦形剤をできるだけ除くため, メタノール抽出とした.

定量結果 本法と同時に下記, ヨウ素酸カリウム滴定法により定量を行い, Table 1 を得た.

Table 1. Determination of HH in Commercial Preparations

Sample	Type	Contents (%) (n=3) Proposed method	KIO_3 method
I	Tablet	91.5	93.6
II	Sugar Coated Tablet	94.4	94.0
III	Powder	101.5	100.3
IV	Sugar Coated Tablet	90.4	94.8
V	Lyophilized Powder (for Injection)	104.4	104.8

ヨウ素酸カリウム滴定法：散剤および錠剤：散剤はそのまま試料とし，錠剤は20錠以上をとり，その重量を精密に量り粉末とし試料とする．試料のHH約150mg に対応する量を精密に量り，水 30m*l* を加え15分間振り混ぜたのち，遠心分離し，上澄をヨウ素フラスコにとる．残留物はさらに水30，20，20m*l* ずつで同様に抽出し，上澄はヨウ素フラスコに合し，試料液とする．

注射用剤：HH約 150mg を精密に量り，ヨウ素フラスコに入れ，水 100m*l* を加え溶解し試料液とする．

試料液について USP XIX HH tablets の定量法にしたがって定量する．

謝辞 本研究に際して貴重な原体を提供して下さった，山之内製薬株式会社，検体の収集にあたられた薬事監視員の方々に深謝したします．

文　献

1) Hartmann, M. and Druey, J.: *U.S. Pat.* 2, 484, 029(1949)
2) 日本公定書協会：第九改正日本薬局方解説書　第1版　C-435，1976，広川書店
3) USP XIX 234，1975
4) B.P. 1963，364，1964

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 89-92, 1979

有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究（第4報）
繊維製品中の有機スズの定量

奥本千代美*, 長嶋真知子*, 吉原武俊*, 下平彰男*

Studies on Examination Method of Household-Necessities Containing Poisonous Chemical Substances (IV)
Determination of Organotin Compound in Textile Products

CHIYOMI OKUMOTO*, MACHIKO NAGASHIMA*, TAKETOSHI YOSHIHARA* and AKIO SHIMOHIRA*

The examination method of the household-necessities containing harmful agents has been studied. In this paper, determination of tributyl-tin compounds contained in textile materials is discussed.

The procedure employed is as follows: tributyl-tin was extracted from textile materials using HCl-methanol as a solvent, and separated from the extract by means of column chromatography with benzene-acetic acid (100:1), to which dithizone was added to form a complex. The complex was measured by obtaining an absorbance at 435nm. Tributyl-tin was detectable within the range of 2.23–22.25μg/m*l* as tributyl-tin oxide. Upon examination of 150 specimens collected from textile materials on the market, tributyl-tin was not detected at all in accordance with this method.

Keywords : tributyl-tin compound, colorimetry with dithizone, textile materials

緒　言

農産物，木材および塗料などの殺菌剤，防腐剤として，あるいはプラスチックの安定剤などとして広く使用されている有機スズ化合物の毒性が問題視されるようになり，一連の化合物のうちトリフェニルスズ化合物に関しては昭和53年9月，「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」により，おしめなどの繊維製品および家庭用接着剤などに含まれる同化合物が規制され，同時に定量法などが規定された．しかし，繊維の防かび加工剤として主に使用され，かつ毒性がトリフェニルスズ化合物よりも強いといわれるトリブチルスズ化合物に関しては同法の規制対象外である．トリブチルスズ化合物のうちトリブチルスズオキサイドは木材の防腐剤として広く使用されており，木材中の同化合物の分析法として原子吸光法[1]およびポーラログラフ法[1,2]などが報告されており，ジチゾンと反応させて生じたトリブチルスズ-ジチゾン錯体の透過度を測定して防腐剤中の同化合物の濃度を測定する方法[3]も報告されている．著者らは，このトリブチルスズ-ジチゾン錯体が435nm付近に極大吸収を持つことに着目して繊維製品中のトリブチルスズ化合物の定量法について検討し，あわせて市販繊維製品中の同化合物の含有量を測定したので報告する．

実験方法

試薬・試液　特に記載のないかぎり試薬特級を用いた．1) 各種有機スズ標準原液および標準液：ビス-トリブチルスズオキサイド（以下TBTOと略す），トリブチルスズアセテート（TBTA）以上吉富製薬社製，トリブチルスズクロライド（TBTC），テトラノルマルブチルスズ(TeBT)，ジブチルスズジアセテート（DBT）以上東京化成製，モノブチルスズトリクロライド（MBT）アルファ社製，以上の各有機スズ化合物をベンゼンに溶かし，それぞれ11,000μg/m*l* の標準原液を調製し，ベンゼンを用いて必要濃度に希釈し標準液とした．2)塩化第二スズ標準液：和光純薬製原子吸光分析用試薬(1,000 μg/m*l*) の適量をとり，メタノールを用いて必要濃度に希釈した．3)ジチゾン溶液：日局九に準じて精製したジチゾンをベンゼンに溶かし0.02w/v%溶液を調製した．4)ホウ酸緩衝液：ホウ酸 12g，四ホウ酸ナトリウム 19gおよびEDTA2.5g を水に溶かし1*l* とした．5)希アンモニア水：28%アンモニア水 1m*l* に水を加えて 50m*l* とした．6)シリカゲルカラム：和光純薬製カラムクロマト用ワコーゲル（C-200）の 8g をとり，ベンゼンに懸濁させ，内径 1.5cm，長さ 30cm のカラム管に充てんし，その上に無水硫酸ナトリウムの 4g を積層させた．

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

7)薄層クロマトグラフィー用展開溶媒：2，2，4−トリメチルペンタン・アセトン・酢酸（16・3.5・0.5）[4]，同発色試薬：ジチゾンをアセトンに溶かし 0.1w/v% 溶液を調製した．8)防かび加工剤：サナTS（TBTO を10%含有）大和化学工業製

装置 日立自記分光光度計 EPS-3T 型

試料 1)自家製加工布：防かび加工剤 2m*l* をとり，水を加えて 200m*l* とした加工浴を調製し，被加工布20gを用いて，加工浴の温度をはじめ常温，ひき続き浴温を60°に上昇させてから，それぞれ20分間浸漬したのち乾燥した．2)市販繊維製品：52～53年度行政試験の検体中から「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」による，トリフェニルスズ化合物の規制対象品目であるおしめ，おしめカバー，くつ下などを中心として150種の製品を選び試料とした．

ジチゾン比色法による TBTO の定量法 TBTO 標準液（2.23～22.25μg/m*l*）の 5m*l* をとり，ホウ酸緩衝液 3m*l* およびジチゾン溶液 5m*l* を加えて振とうし，10分間静置したのちベンゼン層を分取した．ベンゼン層はアンモニア水 5m*l* および水 5m*l* を用いて，それぞれ3回ずつ洗浄したのち，ベンゼン 5m*l* を同様に操作した液を対照として 435nm の吸光度を測定した．

繊維製品中のトリブチルスズ（以下 TBT と略す）の定量法 細切した試料の 1.0g をとり，塩酸メタノール(0.05v/v%) 100m*l* を用いて70°の水浴中で10分間抽出し，ガラスフィルター（G 2）を用いてろ過し，抽出に用いた容器などは少量のメタノールで洗い，洗液を先の抽出液に合せた．抽出液10に対し，ホウ酸緩衝液およびベンゼンをそれぞれ5：3の容積比で加え，5分間振とうし，静置したのちベンゼン層を分取した．同様操作を数回繰り返し，全ベンゼン層を合わせて 1m*l* 以下に濃縮したのち，シリカゲルカラムに通導した．はじめにベンゼン 50m*l* を流したのち，ベンゼン・酢酸（100：1）の 200m*l* を用いて溶出し，溶出液中の酢酸は水洗により除去し，既述の比色操作を行ない，別に求めた TBTO の検量線より試料中の TBT 含有量を求めた．

結果および考察

ジチゾン比色法 既述の比色操作を行なった結果，TBTO 2.23～22.25μg/m*l* の範囲で検量線が得られた．Chromy ら[3] は TBTO−ジチゾン錯体を四塩化炭素中で 570nm の透過度を測定することにより，TBTO の定量を行なっているが，著者らは Fig. 1 に示したように TBTO−ジチゾン錯体が 435nm に極大吸収を持つことから，この波長での吸光度を測定した．なお未反応でのこるジチゾンは 445nm 付近に極大吸収が見られるので，アンモニア水を用いて過剰のジチゾンを除去した．また，TBTO−ジチゾン錯体は光に対して不安定で極大吸収が長波長側に移動するので，しゃ光して行なうと4時間経過後も極大吸収波長および吸光度の変化はほとんど認められなかった．つぎに各種濃度の TBTO 標準液（2.23～22.25μg/m*l*）について，それぞれ10回ずつ比色操作を繰り返し，同一濃度の TBTO の示す吸光度の変動係数を求めた結果，Fig. 2 に示すとおり良好な値が得られた．つぎに TBTO とブチル置換基数の等しい TBTA および TBTC また置換基数の異なる TeBT，DBT，MBT および塩化第二スズ（いずれも TBTO として 2.23～22.25μg/m*l* に相当するスズ濃度）について同様にジチゾン比色法を行ない，TBTO の定量におよぼす影響を調べた結果，TBTA および TBTC は，TBTO とほぼ等しい吸収曲線を示し，これら3化合物の検量線はほとんど一致した．また，赤木ら[4] の方

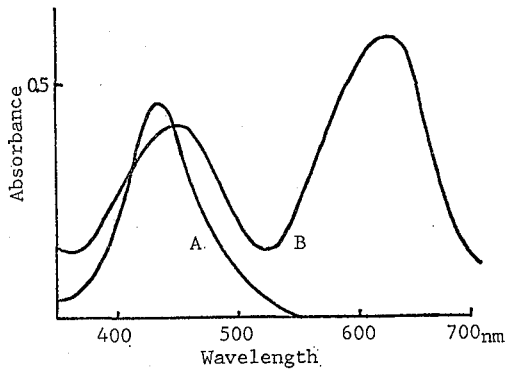


Fig. 1. Absorption spectra of TBTO-Dithizone Complex(A) and Dithizone(B) in Benzene

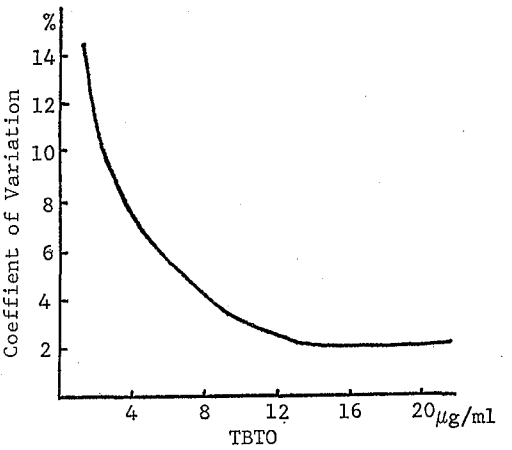


Fig. 2. Variation of Absorbance of TBTO-Dithizone Complex by Standard Solution contained 2.23～22.25μg/m*l* of TBTO

法により薄層クロマトグラフィーによる分析を行なった結果，これらの化合物はいずれも Rf 値の等しい黄色のスポットとなり，相互の判別が不可能であった．以上の結果から，今回の実験においては TBTO, TBTA および TBTC を含めた TBT として測定し，数値は TBTO として表わすこととした．一方，ブチル置換基数の異なるスズ化合物では DBT が 485nm に極大吸収を示したが，他のスズ化合物はいずれもこの実験条件下では発色しなかった．

繊維製品中の TBT の定量法 繊維製品中の TBT 抽出法として各種溶媒について検討した．すなわち，自家製加工布を用いて，塩酸メタノール，メタノール，エタノール，酢酸エチル，ジクロルメタン，クロロホルムおよびヘキサンの7種の溶媒により抽出される TBT の値を比較した結果，それぞれ，1019.8, 866.8, 683.3, 489.5, 458.9, 367.1および 204.0μg となり塩酸メタノールを用いた場合に最も高い値を示した．また塩酸メタノールにより抽出される TBT の値の変動を調べた結果，変動係数は5.12%を示し，再現性の良い値が得られた．さらに TBT 抽出ずみの試料に，硝酸を加えて湿式分解し，実験方法に記載した条件を用いて薄層クロマトグラフィーによりスズ化合物の確認を行なった結果，TBT および他のスズ化合物はいずれも検出されず，塩酸メタノールの 100ml を用いて30分間抽出する方法が TBT の抽出方法として適当と考えられた．小嶋ら[5]は繊維製品中の有機スズを塩酸メタノールによって，Williams[1]は針葉樹中の TBTO をエタノールにより Challen ら[6]はマツ類中の TBTO をクロロホルムにより抽出しているが，繊維製品中の TBT の抽出には塩酸メタノールが，上記の実験結果より適当であると考え，我々の実験では塩酸メタノールを抽出溶媒として用いることとした．つぎにカラムクロマトグラフィーにより抽出液中の TBT を分離する方法について検討した．抽出液を濃縮してカラムに通導すると，抽出液中に溶出した糊料や染料などが，TBT と共に溶出し，比色時の妨害となった．そこで塩酸メタノール 100ml に TBTO 5mg を添加し，小嶋ら[5]の方法により，メタノール中の TBTO をベンゼン層に転溶したのち，ベンゼン層を濃縮してカラムに通導した．はじめにベンゼン 50ml を流して，色素などのベンゼン可溶の不純物を除去したのち，ベンゼン・酢酸（100：1）の 200ml を用いて，それぞれ 10ml ずつに分画しながら溶出した結果，Fig. 3 に示す溶出曲線が得られた．また各種濃度の TBTO 標準液（5～11,000μg/ml）の各 1ml について，ベンゼン・酢酸（100：1）溶出液 200ml 中の回収率を

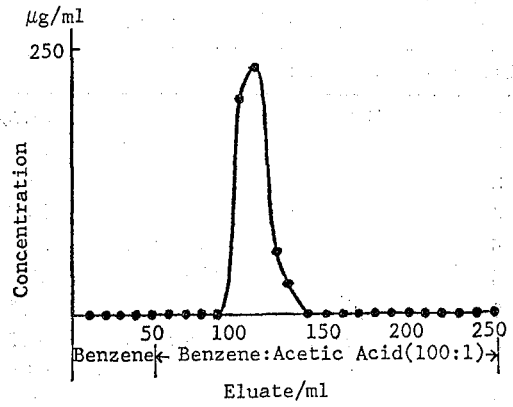


Fig. 3. Elution of TBTO in Column Chromatography on Wakogel C-200

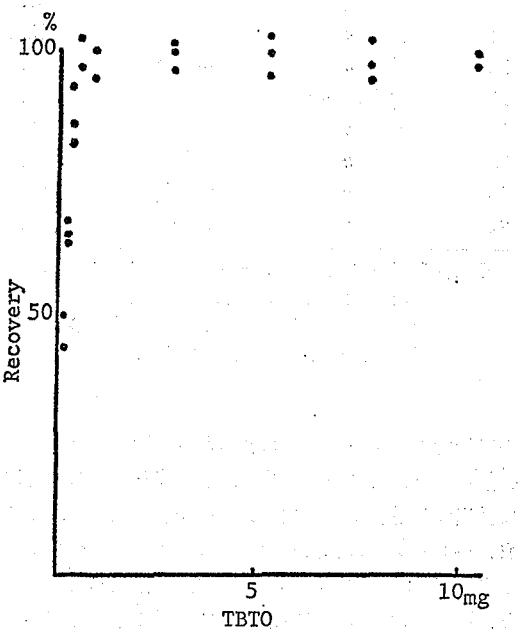


Fig. 4. Effect of TBTO Concentration by Column Chromatography
Eluate; Benzene : Acetic Acid(100 : 1)
The initial 50ml of eluate was used benzene only in order to remove the impurities.

求めた結果，Fig. 4 に示す結果が得られた．防かび効果のあらわれる TBTO の加工濃度は繊維製品の場合 0.5%以上といわれることから，試料 1g につき，5mg 以上の TBTO の含有が予想されるが，この量の TBTO は高い回収率を示し，カラムクロマトグラフィーによる TBTO の分離法は適当と思われた．つぎに前記したように DBT は TBT と同様ジチゾンで発色し，TBT

Table 1. Recoverys of Tributyl-tin Oxide added to Various Textile Products

Sample No.	Made of:	Appearance	Recovery
1	Cotton		97.2%
2	〃		98.5
3	〃		96.0
4	Wool	red	98.6
5	〃	fluorescent	97.9
6	〃	blue	96.8
7	Nylon		99.1
8	〃	fluorescent	98.9
9	〃		95.9
10	Acryl	red	100.5
11	〃		101.2
12	〃	red	96.0
13	Polyester		97.4
14	〃		95.7
15	〃	brown	97.2
16	Unknown		101.1
17	〃		99.5
18	〃	red	99.1
19	〃	purple	97.3
20	〃	blue	98.6

Note – 1m*l* of TBTO Standard Solution (5mg/m*l*) was added to the each Sample.
"Appearance" means the Tone of Color in the Extracted Test Solution.

の定量を妨害すると考えられるため，TBT と DBT の分離を試みたところ，DBT は抽出液をベンゼンを用いて抽出する過程で，塩酸メタノール層に大部分が残り，またベンゼン層に転溶した一部の DBT もベンゼン・酢酸（100：1）の 200m*l* 中には全く溶出してこなかった．DBT は樹脂の安定剤として繊維の中に存在が予想されるが，市販の繊維製品には染色その他種々の繊維加工がなされており，これら加工剤による妨害が考えられるため，色，材質などの異る20種の試料について TBTO 標準液（5mg/m*l*）の 1m*l* を添加し，既述の定量法に従って実験を行ない TBTO の回収率を調べた結果，Table 1 に示す結果が得られた．また同一試料を 1g ずつ30回とり，TBTO 標準液（5mg/m*l*）をそれぞれ 1m*l* ずつ添加し，既述の定量法を行ない再現性を検討した結果，変動係数は6.04%であった．

市販繊維製品中の TBT 試料150種について，既述の定量法を行なった結果，いずれの試料からも TBT は検出されなかった．なお，このうち6件（アクリル製カーテン：1，レーヨン製カーテン：1，ナイロン製おしめカバー：2，ナイロン製ブラスリップ：1，アクリル製ベビー帽子：1）から DBT が検出された．

ま と め

繊維製品中の防かび剤として用いられる TBT の定量法について検討し，次の結果を得た．

1. ジチゾン比色法による TBT の定量範囲は TBTO として 2.23～22.25μg/m*l* であった．

2. 繊維製品中から TBT を抽出するには 0.05v/v%塩酸メタノールを用いることが最も適当と思われた．

3. 抽出液中の TBT はシリカゲルカラムによって単離された．

4. 市販の繊維製品150種について，TBT の定量を行なった結果，いずれの試料からも TBT は検出されなかった．

謝辞 本研究にあたり，TBTO および TBTA を供与された吉富製薬株式会社，TBTO 加工剤を分与され，また種々のご助言を下さった国立衛生試験所療品部家庭用品第一室の中村晃忠氏はじめ室員の皆様に感謝いたします．

（本研究は，昭和51，52年度当所調査研究課題「有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究―繊維製品中の有機スズの定量法について」として実施したものである．）

文 献

1) Williams, A. I.: *Analyst*, 98, 233, 1973
2) Woggen, H. and Jehle, D.: *Nahrung*, 17, 739, 1973
3) Chromy, L. and Uhacz, K.: *J. Oil. Col. Chem. Assoc.*, 51, 494, 1968
4) Akagi, H., Takeshita, R., and Sakagami, Y.: *Bull. Inst. Publ. Health*, 19, 185, 1970
5) 小嶋茂雄，中村晃忠，鹿庭正昭：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（1977）
6) Challen, S. B. and Kučera, M.: *J. of Chromatog.*, 31, 345, 1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 93-97, 1979

生薬の品質評価に関する研究（第5報） 甘草およびそれを含有する漢方処方製剤の品質

安田一郎*, 瀬戸隆子*, 奥沢昌子*, 下平彰男*, 田窪栄一*

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (V) Quality of Licorice Root and Its Oriental Medicinal Preparations

ICHIRO YASUDA*, TAKAKO SETO*, AKIKO OKUSAWA*, AKIO SHIMOHIRA* and EIICHI TAKUBO*

Tests on various commercial licorice roots (*Glycyrrhiza spp.*), Tongpei licorice and Sipei licorice (peeled), revealed them to be in conformity with all the requirements of Japanese pharmacopoeia. However, 7 out of 14 samples for glycyrrhizinic acid extraction (Sinkiang licorice, licorice of Afghanistan and USSR origins) were found not fulfilling the requirements.

Each licorice root was distinguishable by means of thin layer chromatography (TLC). Of 12 samples of licorice root powder as raw material for pharmaceuticals and 48 samples of the oriental medicinal preparations, 7 were identified as Sinkiang licorice.

The substance identified as Sinkiang licorice was noted to be licochalcone A, and its structure was clarified on the basis of spectroscopic studies in preferential use of ^{13}C Nuclear Magentic Resonance (^{13}C-NMR).

Keywords : licorice root, *Glycyrrhiza spp.*, thin layer chromatography, oriental medicinal preparation, licochalcone A, carbon-13 nuclear magnetic resonance

緒 言

甘草 *Glycyrrhizae Radix* はマメ科（Leguminosae）の *Glycyrrhiza* 属の根およびストロンで，漢方においては傷寒論110処方中74処方に配合され，緩和剤，解毒剤などとして広く用いられる生薬である．一般の医薬品中においても去痰剤，粘滑剤あるいは矯味矯臭剤として用いられるほか，胃潰瘍，十二脂腸潰瘍などにも使用されている．

甘草の薬理学的研究はすでに Takagi らをはじめ多くの研究者によって報告[1]されており，抗潰瘍性作用，消炎作用および鎮痙作用が認められ，これらが総合的に働いていると考えられるが，これらの有効成分はいまだに明確なものとなっていない[2,3]．一方，甘草中の1成分であるグリチルリチン酸は，天然から得られる甘味料として注目され，サッカリンに代わり近年食品添加物に使用されるようになった[4]．その結果，甘草の需要は生薬としてよりむしろグリチルリチン酸抽出用として高まっている．

今日，生薬としては，良品と言われている東北甘草のほか，西北甘草あるいは西北甘草（皮去り）と称するものが中国から輸入されている．また，グリチルリチン酸抽出用甘草としては，新疆甘草と称するものが中国から輸入されるほか，アフガニスタン産甘草あるいはソ連産甘草などが輸入されている．そして，このグリチルリチン酸抽出用甘草が多量に流通するようになった現在，これがそのまま生薬として用いられる懸念がある．そこで今回，医薬品製造過程より入手した原料生薬および漢方処方製剤について，使用されている甘草の調査を行なうこととした．調査を行なうにあたり，まず各種市場品甘草を第9改正日本薬局方（以下日局と略す）の基準に照らし試験を行なった．つぎに薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と略す）を用いて，各種市場品甘草の識別法を検討し，そしてそれを医薬品製造原料用甘草末および漢方処方製剤に応用した．その際，識別指標となる物質の構造についても検討したので合わせて報告する．

実験の部

1. 実験材料

東北甘草 径 0.6～1.6cm，長さ 1m におよび，ほぼ円柱棒状形でやや湾曲している．外面はかっ色～暗かっ色を呈し，周皮はややはがれやすく，質は疎で軽い．1977～1979年中国からの輸入品19検体を用いた．

西北甘草 径 0.5～1.6cm，長さ 1m におよび，ほぼ円柱棒状形でやや湾曲している．外面は赤かっ色～かっ色を呈し，質は密で堅く，繊維質である．1977～1979年

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

中国からの輸入品26検体を用いた.

西北甘草（皮去り） 径 0.7～1.7cm, 長さ 70cm, ほぼ円柱棒状形で, 周皮はほとんど除かれている. 外面は淡黄色を呈し, 質は密で堅く, 繊維質である. 1977～1979年中国からの輸入品6検体を用いた.

新疆甘草 径 0.7～3.3cm, 長さ 7～10cmに切断されたもので, 太いものは縦割りにされている. 外面は暗灰かっ色を呈し, 切断面は不規則で淡黄かっ色～灰黄色を呈する. 質は密で繊維質である. 1977～1979年中国からの輸入品6検体を用いた.

アフガニスタン産甘草 径 0.8～3.1cm, 長さ4～7cmに切断された円柱棒状形のもので, 外面は暗かっ色, 切断面は淡黄かっ色～灰黄色を呈する. 質は密で堅く, 繊維質である. 1978～1979年の輸入品4検体を用いた.

ソ連産甘草 径 0.8～2.8cm, 長さ19～32cmの円柱棒状形または偏平棒状形で, かなり湾曲したものも含まれ, 形は不揃いである. 外面は暗灰かっ色を呈し, 細根を付着するものもある. 切断面は不規則で黄色を呈す. 1978～1979年の輸入品4検体を用いた.

医薬品製造原料用甘草末 1978年末, 薬事監視員が都内各メーカーに立ち入り, 収去した医薬品製造原料用甘草末12検体を用いた. 鏡検を行なったところ, 2検体は赤かっ色のコルク層をほとんど認めない皮去り品であった.

甘草含有の漢方処方製剤 1978年, 薬事監視員が都内販売業より収去した市販医薬品中, とくに甘草を多く含有する漢方処方製剤48検体を用いた. うち錠剤27検体, 分包剤21検体である.

2. 試料の調製 各種市場品甘草はその 100g を粗切した後よく混和し, その30gを粉末として試料とした.

原料用甘草末はその 250～500g をよく混和し, そのまま試料とした.

漢方処方製剤は甘草 10g 相当量をとり, 粉末とし, よく混和して試料とした.

3. 灰分, 酸不溶性灰分, 乾燥減量およびエキス含量

灰分, 酸不溶性灰分, 乾燥減量およびエキス含量は日局[3]により定量した.

4. TLC による検討

試料溶液の調製 各種甘草試料および原料用甘草末試料それぞれ 2g にメタノール 20m*l* を加え1夜放置, ろ過後ろ液が約 1m*l* になるまで減圧濃縮, 濃縮液にメタノールを加え正確に 2m*l* とし試料溶液とした.

漢方処方製剤試料の甘草 4g 相当量をとり, 水40m*l* にてときどきかきまぜ1昼夜放置, ろ過後ろ液をベンゼン 20m*l* で3回, さらに水飽和 *n*-ブタノール 20m*l* で3回抽出, 各抽出液を約 0.5m*l* になるまで減圧濃縮した. そして, ベンゼン抽出液にメタノールを加え正確に 1m*l* とし, ベンゼン分画試料溶液とした. また, *n*-ブタノール濃縮液にメタノールを加え正確に 2m*l* とし, *n*-ブタノール分画試料溶液とした.

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, メタノールより再結晶を繰り返し, 精製した標準品 100mg を少量のアンモニア水に溶解し, メタノールで正確に 20m*l* とし標準溶液とした.

TLC の条件 Kieselgel 60 F_{254}, pre-coated, 10×20 cm, 0.25mm (Merck 社製) のプレートを用い, クロロホルム：メタノール：水 (65：35：10) およびベンゼン：酢酸エチルエステル（1：1）を移動相とし, 約12 cm 展開した. スポット量は約10μl.

スポットの検出 紫外線ランプ (254nm および 365 nm) を照射し, スポットを確認したのち, 10% 硫酸を噴霧し徐々に加熱した.

5. 識別指標物質 (Comp. I.) の分離と同定

機器 紫外線吸収スペクトル（以下UVと略す）は日立 EPS-3T, 赤外線吸収スペクトル（以下IRと略す）は日立 EPI-G3, 高分解能マススペクトルは日本電子 D-300, マススペクトル（以下MSと略す）は島津 LKB-9000, ^{13}C- 核磁気共鳴スペクトル（以下 ^{13}C-NMR と略す）は Varian NV-16 (15.10MH_Z) を用いた.

Comp. I. 新疆甘草 100g を粉末とし, ベンゼン300m*l* で3回熱時抽出, 抽出液を合わせ減圧濃縮し, かっ色粘稠性残渣を得. これを Kieselgel 60 (0.040～0.063 mm, Merck 社製) のカラムクロマトグラフィーに付し, ベンゼン：酢酸エチルエステル（2：1）にて溶出, 溶出物質をベンゼンから再結晶して mp101° の黄かっ色針状結晶 (Comp. I.) 220mg を得た. $C_{21}H_{22}O_4$, *Anal. Calcd.* M^+338.1518, *Found.* M^+338.1556 (高分解能マススペクトル), IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3440 (OH), 1640 (C=O). UV λ_{max}^{EtOH} nm (logε)：238 (3.76), 313 (3.91), 371(4.17), ^{13}C-NMR の結果は Chart 1 に示した. MS *m/e* (%)：338 (M^+, 15), 323(7), 308(20), 307 (90), 121 (100), 93 (20), 65 (22), 43 (22). 本物質の mp, UV, IR および MS は licochalcone A の文献値[5]に一致する.

結果および考察

灰分, 酸不溶性灰分, 乾燥減量およびエキス含量 各種市場品甘草について, 日局甘草の規定に適合しないものの数を Table 1 に示した. 東北甘草および西北甘草（皮去り）はすべて日局の基準に適合したが, 西北甘草26検体中7検体は適合しないものであった. また, グリ

Table 1. Number of out of Requirement Specified in Japanese Pharmacopoeia

	No. of tested	Total ash ≦7.0%*	Acid-insoluble ash ≦2.0%*	Loss on drying ≦12.0%*	Content of extract ≦25.0%*	Out of requirement
Tongpei licorice (Tohoku Kanzo)	19	0	0	0	0	0
Sipei licorice (Seihoku Kanzo)	26	3	0	0	4	7
Sipei licorice peeled (Seihoku Kanzo Kawasari)	6	0	0	0	0	0
Sinkiang licorice (Shinkyo Kanzo)	6	1	0	0	3	3
Licorice from Afghanistan	4	0	0	0	2	2
Licorice from U.S.S.R.	4	2	0	0	0	2

* The regulation stipulated in Japanese Pharmacopoeia IX

チルリチン酸抽出用甘草では，新疆甘草6検体中3検体，アフガニスタン産甘草4検体中2検体，ソ連産甘草4検体中2検体が日局の基準に適合しないものであった．エキス含量は，甘草の薬理活性がいずれも水性エキス分画から報告[1]されていることから，甘草の品質を評価するうえで考慮するものの1つであると思われる．そしてこのエキス含量の高いものはソ連産甘草（35.8～34.8%）および東北甘草（38.3～26.6%）であり，低いものは新疆甘草（32.1～18.9%）およびアフガニスタン産甘草（32.9～15.8%）であった．

TLC TLC のパターン分析を行なう前にその展開溶媒を種々検討したが，グリチルリチン酸よりRf値の低い位置に各種甘草とも特徴的なスポットを認めにくい．極性をさらに強くして展開すると各種甘草特有のスポットが押し上げられ，その TLC 像が比較しにくい．また，展開時間が比較的短くて済むなど，いくつかの理由により，クロロホルム：メタノール：水（65：35：10）を展開溶媒に選んだ．

各種甘草のメタノールエキスの TLC 像は Fig. 1 に示すとおりである．グリチルリチン酸は試薬を噴霧し加熱しただけでは充分に呈色しないので，試薬噴霧前に紫外線照射下で確認したところ，Rf 0.08 にいずれの甘草からも暗紫色のスポットとして確認された．東北甘草の TLC 像は試薬噴霧後黄かっ色を呈す Rf 0.44 の物質を主成分とし，そのほかいくつかのスポットを示すものであった．西北甘草の TLC 像は東北甘草のそれとよく類似したが，Rf 0.90，0.40 に紫外線照射下いずれも青白色の蛍光を発するスポットが検出されず，この点に差異を認めた．西北甘草（皮去り）は西北甘草の極性の低い部分にあらわれるいくつかのスポットが，薄いかあるいはないものであった．一方，新疆甘草の TLC 像はほかの甘草のそれとははなはだ異にするものであった．と

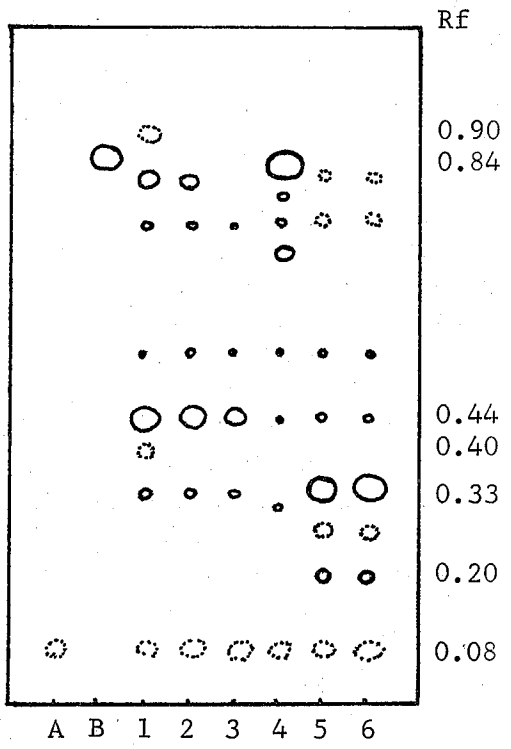


Fig. 1. Thin Layer Chromatogram of MeOH Extract of Licorice Root
A : glycyrrhizinic acid, B : Comp. I., 1 : Tongpei licorice, 2 : Sipei licorice, 3 : Sipei licorice peeled, 4 : Sinkiang licorice, 5 : Licorice from Afghanistan, 6 : Licorice from U.S.S.R.
Solvent : $CHCl_3$: MeOH : H_2O (65:35:10)

くに Rf 0.84 のスポットは，紫外線照射下で黄緑色の螢光を発し，試薬噴霧後加熱すると鮮やかな赤色を呈するもので，新疆甘草特有なものであり，その物質（Comp. I.）の構造については後述した．また，アフガニスタン産甘草およびソ連産甘草の TLC 像は互によく類似するもので，試薬噴霧後加熱すると，Rf 0.33 に黄かっ色を呈する物質を主成分とし，Rf 0.20 に淡赤色の特有なスポットを示すものであったが，ややソ連産甘草の方がその呈色は強く，スポットもはっきりと確認された．以上の結果，その特有の TLC 像から各種市場品甘草の識別が可能となった．

そこで，日局にいずれも適合した原料用甘草末12検体について，同様に TLC の操作を行ない，上記の実験結果から比較検討したところ，東北甘草6検体，西北甘草1検体，西北甘草（皮去り）2検体のほかに，グリチルリチン酸抽出用甘草である新疆甘草3検体を確認した．

次に，漢方処方製剤について検討した．漢方処方製剤は通常，水抽出されたものが多く，メタノール抽出の場合と異なり，充分に含有成分の確認が行ないにくい．また，ほかの生薬が配合されているので，甘草の特徴的なスポットが明確に判読しにくいなどの理由から，水抽出物をさらにベンゼン分画と *n*-ブタノール分画に分けた．ベンゼン分画は濃縮後，ベンゼン：酢酸エチルエステル（1：1）にて展開，*n*-ブタノール分画は濃縮後，クロロホルム：メタノール：水（65：35：10）にて展開し，それぞれの原料甘草の鑑別を試みた．その結果は，まず48検体いずれからもグリチルリチン酸のスポットが明らかに認められ，甘草を含有していることを確認した．そして錠剤27検体中3検体，分包剤21検体中1検体，計4検体から Comp. I. を含む新疆甘草の TLC 像を確認した．また，アフガニスタン産甘草あるいはソ連産甘草と思われる TLC 像は48検体中に検出されなかった．一方，東北甘草，西北甘草および西北甘草（皮去り）の場合，漢方処方製剤中に配合されるほかの生薬（たとえば黄芩，芍薬など）中に，Rf 値を同じくし，同じような呈色を示すスポットが認められるため，それらを相互に識別するのは困難な場合があった．

Comp. I. の構造 新疆甘草のベンゼン抽出エキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し，Comp. I. を得た．本物質は高分解能マススペクトルから分子式 $C_{21}H_{22}O_4$ が明らかにされ，その ^{13}C-NMR においてケトンに由来する炭素が1ケ，オレフィン炭素が16ケ，メトキシル基に由来する炭素が1ケ，メチル炭素が2ケおよびメチン炭素が1ケ，それぞれシグナルとなって出現し，分子式および UV と考え合わせ，メトキシル基1ケ，水酸基2ケおよび α, α-dimethylallyl 基1ケを有するカルコン誘導体と推定した．その結合位置はMSにおいて，分子イオンピーク *m/e* 338 が強度15%なのに対し，*m/e* 307 の脱メトキシルピークが90%とかなり強く観測されることから，B環の2位にメトキシル基を有し[6]，さらに，^{13}C-NMR で3位に帰属されるシグナルが，101.3ppm とかなり高磁場に出現することから，4位に水酸基を，かつ，5位の116.4ppm のシグナルが，off-resonance decoupling 実験では singlet となることから，α, α-dimethylallyl 基はこの5位に結合していると考えられた．またA環においては，そのケミカルシフト値から4′位に水酸基を有すると推定された．以上の推定構造は，先に Saitoh らが新疆甘草の1成分として報告[5]している licochalcone A と同一であり，mp, IR, UV およびMSを文献値[5]と比較したところよく一致したので，本物質を licochalcone A と同定した．なお，^{13}C-NMR の帰属は single frequency off-resonance decoupling 実験あるいはそのケミカルシフト値を考慮して Chart 1 に示すように決定した．カルコン誘導体は種々報告されているが，このように2′位（あるいは6′位）に水酸基を持たない化合物はきわめて少ない．とくに本物質は天然の新疆甘草以外にその報告をみないもので，新疆甘草の識別指標物質として有効なものである．

以上まとめると，今回入手した各種市場品甘草中，東北甘草および西北甘草（皮去り）はすべて日局の基準に適合したが，グリチルリチン酸抽出用甘草中には日局の基準に適合しないものが約半数認められた．各種甘草を TLC で識別することは可能であり，医薬品製造原料用

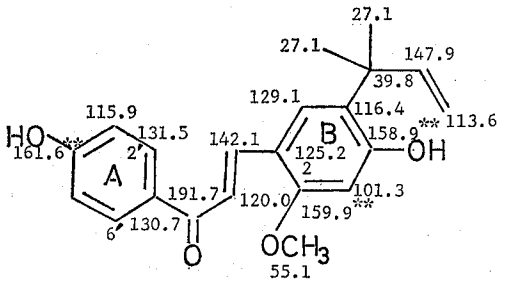


Chart 1. ^{13}C Chemical Shifts* of Licochalcone A

* Solvent: $CDCl_3$, In part per million downfield from TMS

** represents the signals where the assignments may be reversed

甘草末および漢方処方製剤を試験したところ，新疆甘草の一部が，従来から漢方処方に用いてきた甘草と同じように使用されているのを確認した．日局ではグリチルリチン酸抽出用甘草も基準に適合すれば日局甘草と認めている[3]が，グリチルリチン酸抽出用甘草は，従来から漢方処方に用いてきた甘草とは，その含有成分も異なり，日局に適合しないものも少なくないなど，生薬としてそれを使用するにあたっては充分な配慮が必要と思われる．なお，新疆甘草中，独特な呈色を示す物質は licochalcone A であることが明らかになったが，本物質はほかの生薬中にも認められず，新疆甘草を識別する上で指標となるものである．

謝辞 本研究にあたり医薬品原料用甘草末および漢方処方製剤の収去に労を取られた衛生局薬務部薬事監視員の方々，終始御指導していただいた国立衛生試験所生薬部佐竹元吉氏，甘草の流通事情ならびに各種甘草試料の提供に御尽力下さった方々に深謝いたします．

文　献

1) a) Takagi, K., Okabe, S., Kawashima, K., and Hirai, T.: *Jap. J. Pharmacol.*, **21**, 832, 1971; b) 赤星三彌：日本薬剤師協会誌, **8**, 2, 1966; c) Ishii, Y.: *Jap. J. Pharmacol.*, **20**, 71, 1970

2) 渡辺和夫：代謝, **10**, 臨時増刊, 626, 1973

3) 日本公定書協会：第9改正 日本薬局方解説書, D-189, 1976, 広川書店, 東京

4) a) 冠　政光, 西島基弘, 観　公子, 中里光男, 木村康夫, 直井家壽太：東京衛研年報, **29-1**, 193, 1978; b) 中嶋　巌, 広門雅子, 宇佐美博幸, 溝入茂, 遠藤英美：東京衛研年報, **30-1**, 153, 1979

5) Saitoh, T. and Shibata, S.: *Tetrahedron Letters*, 4461, 1975

6) Furuya, T., Matsumoto, K., and Hikichi, M.: *Tetrahedron Letters*, 2567, 1971

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 98-102, 1979

熱エネルギー分析器を用いる化粧品中のN-ニトロソジエタノールアミンの高速液体クロマトグラフィー

竹内正博*, 水石和子*, 原田裕文*

Determination of N-Nitrosodiethanolamine in Cosmetics by High Performance Liquid Chromatography using Thermal Energy Analyzer

MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI* and HIROFUMI HARADA*

A quantitative method has been developed for determining N-nitrosodiethanolamine (NDELA) by high performance liquid chromatography (HPLC) using a thermal energy analyzer (TEA).

To a conical flask containing 5g of cosmetic was added 250mg of ammonium sulphamate and 50m*l* of acetonitrile. The mixture was stirred for 10min and 10g of anhydrous sodium sulfate was added. The mixture was stirred for another 5 min and then filtered. The filtrate was washed with 20 m*l* of n-hexane, concentrated by a rotary evaporator, and adjusted to 5 m*l* with acetonitrile. After filtering the solution, if necessary, it was injected into TEA-HPLC. Conditions of TEA-HPLC were as follows: column; Zorbax CN (du Pont), 25cm × 4.6mm i.d., mobile phase; dichloromethane, flow rate; 1.0m*l*/min, furnace temperature; 550°, cold traps; −72° (ethanol-dry ice) and −130° (ethanol-liquid nitrogen).

The detection limit of NDELA by TEA-HPLC was about 0.5ng. The recovery of NDELA added to several samples was over 90% in all cases.

Keywords: N-nitrosodiethanolamine, thermal energy analyzer, high performance liquid chromatography, cosmetics

緒　言

N-ニトロソ化合物は多くの動物種に対して発がん作用を示す物質として知られており，最近とくに欧米において，人の生活環境のごく身近かなところに存在する発がん性物質として社会的関心を集めている．わが国においても，これまで食品中のN-ニトロソ化合物には関心がもたれ含有量の調査[1-4]が行なわれているが，食品以外の分野では問題視されるようなことはほとんどなかった．しかし，1977年春アメリカにおいて Fine ら[5]が化粧品中からN-ニトロソ化合物の一種であるN-ニトロソジエタノールアミン（以下 NDELA と略す）を検出したことを発表し，さらに FDA の追試[6]によってその存在が確認されるにおよんで，アメリカはもとよりわが国においても化粧品中の NDELA の問題が大きく取り上げられ，対応策の検討が急がれることとなった．

このような状況から，著者らは化粧品中の NDELA の分析法を検討することにした．これまで N-ニトロソ化合物の分析は種々の方法で行なわれているが，熱エネルギー分析器（Thermal Energy Analyzer : TEA）を検出器としたガスクロマトグラフィー（TEA-GC）または高速液体クロマトグラフィー（TEA-HPLC）が最も信頼性の高い方法と評価されている[7-14]．しかし TEA はかなり高価な装置であり，また用途も特殊であるため，わが国においてはそれほど一般的になっていないが，最近当研究所に TEA が設置され，いち早く操作する機会に恵まれたので，TEA-HPLC による化粧品中の NDELA の分析を試みたところ，良好な結果が得られたので報告する．

実　験

1. 装置

1) TEA-HPLC Thermo Electron 社製 TEA-502 型に島津製 HPLC-LC 2 型（UV検出器付き）を直結して使用した．装置の概略を Fig. 1 に示す．

HPLC の分離カラムは Zorbax CN を充てんした長さ 25cm，内径4.6mmのステンレススチール製を用い，移動相としてジクロルメタンを 1.0m*l*/min の流速で流した．また，TEA の操作条件はつぎのように設定した．分解炉温度：550°，アルゴン流量：(20～30) m*l*/min，オゾン流量：5m*l*/min，コンセントレーション：0，アテネーション：×8

* 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

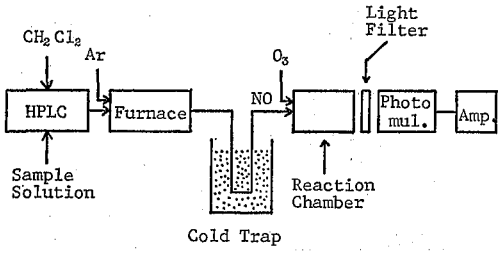


Fig. 1. Schematic Diagram of TEA-HPLC

2) ガスクロマトグラフ—質量分析計 (GC-MS) 日本電子製D-300を使用した．GCの分離カラムは1％シリコンOV-1，クロモソルブW(AW-DMCS)を充てんした長さ 1m，内径 2mm のガラス製を用い，温度は80°とした．

2. 試薬

1) NDELA 標準品 東京化成製を使用した．ただし，残存する可能性のある亜硝酸塩を除去するために，約 1g を三角フラスコにとりアセトン 100ml に溶かしてから，スルファミン酸アンモニウム 1g を加え，2時間マグネチックスターラーで撹拌した．ついで，過剰のスルファミン酸アンモニウムをろ別してから，減圧下でアセトンを完全に留去した．

2) その他の試薬は特級をそのまま使用した．

3. 操作法

1) 試料溶液の調製 試料（シャンプー，クリーム，ローション等）5g を三角フラスコにとり，スルファミン酸アンモニウム 250mg を加え混和してから，アセトニトリル 50ml を加え，マグネチックスターラーを用いて10分間撹拌した．ついで，無水硫酸ナトリウム 10g を加え，さらに5分間撹拌したのち内容物をろ過した．残査をアセトニトリル 10ml で洗ってから，ろ液に n-ヘキサン 20ml を加えはげしく振り混ぜたのち，アセトニトリル層をロータリーエバポレーターで濃縮した．この濃縮液をアセトニトリルで正確に 5ml に調整し，必要ならばろ過してから TEA-HPLC の試料溶液とした．

2) 定量法 NDELA 標準品をアセトンに溶かして 1mg/ml の標準保存溶液を調製し，それを希釈して(0.1～0.5) μg/ml の標準溶液を調製した．各標準溶液25μl を TEA-HPLC に注入し，濃度とピーク高から検量線を作成した (Fig. 2)．つぎに試料溶液 25μl を TEA-HPLCに注入し，得られたクロマトグラムから NDELA のピーク高を測定し，検量線を用いて濃度を求めた．

結果および考察

1. NDELA 標準品の確認

使用した NDELA 標準品の確認を GC-MS で行なった．ただし，NDELA は不揮発性であり，そのままでは GC-MS にかけるのが困難であるので，アセチル誘導体にしてから分析した．すなわち，NDELA 標準品100μg をとり，ピリジン・無水酢酸（1：1）1ml を加え60°で1時間反応させ，その 5μl を GC-MS に注入した．得られた EI- および CI-MS スペクトルを Fig. 3 に示す．EI-MS スペクトルには分子イオンピークは認められないが，NDELA のジアセチル誘導体 $(CH_3COOC_2H_5)_2NNO$, mol wt 218, に特有のフラグメ

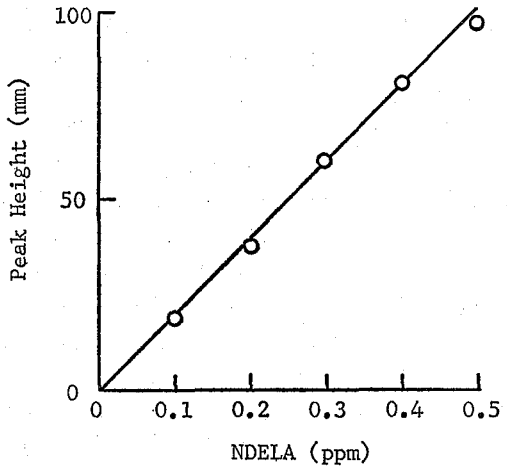


Fig. 2. Calibration Curve of NDELA
Sample Size : 25μl, Attenuation : ×8, Concentration : 0

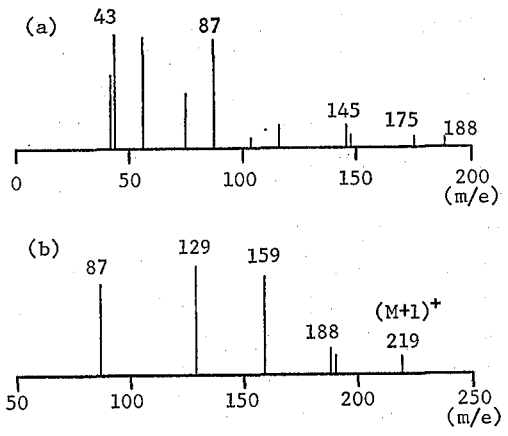


Fig. 3. Mass Spectra of Di-Acetyl Derivative of NDELA
(a) : EI-MS, (b) : CI-MS (Reagent Gas; Methane)

ントイオンに基づくピークが m/e 188, 175, 145 等に認められ，また CI-MS スペクトルには $(M+1)^+$ に基づくピークがm/e 219 に認められた．これらのことから，本物質はNDELA のジアセチル誘導体であり，したがって今回の実験に使用した標準品は NDELA であることが確認された．

2. コールドトラップの検討

TEA で N-ニトロソ化合物を分析する場合，原理的には他成分の影響をまったくうけないが，多量の他成分が反応室に入るとこれと密着して取り付けてある光学フィルターが汚れ，その結果ベースラインのドリフトおよびノイズの増大をまねくことになる．したがって，これを防ぐために Fig. 1 に示したように分解炉と反応室の中間にコールドトラップを設け，多量の他成分を捕集する．

TEA-GC の場合は移動相が気体であり，また試料溶液の注入量もわずかであるため他成分の量はきわめて少なく，コールドトラップによる捕集は比較的容易である．したがってこの場合は，コールドトラップの条件をあまりきびしく考えなくても装置を感度よく安定に作動させることが可能である．しかし TEA-HPLC の場合は，移動相が液体であり，その流速は毎分数 m*l* 程度にまでなることがあるので，移動相を効率よく捕集することは容易でなく，この場合の装置の安定動作はコールドトラップの良否にかかっている．そこで，TEA-HPLC 系のコールドトラップ条件について検討した．

使用したトラップはThermo Electron社製のものとほぼ同じ形状のガラス製2連式であるが，容量はオリジナルのものより若干大きく，トラップ(1)が約 300m*l*，トラップ(2)が約 200m*l* である．また，オリジナルのものは透明であるが，光はできるだけ避けたほうがよいので表面に吹き付け加工を施し褐色に仕上げてある．それぞれをステンレススチール製ジュワーびんに首のところまで入れ，トラップ(1)はエタノール・ドライアイス浴で−72°に，トラップ(2)はエタノール・液体窒素浴で−130°に冷却した (Fig. 4)．

トラップ(1)の目的は主として HPLC の移動相の捕集であるので，通常は冷却浴の温度を移動相溶媒の氷点近くに設定するが，あまり氷点に近すぎると冷却浴が過冷却状態になったときに，トラップ内で移動相が氷結し分析不能となる．したがって，トラップ(1)の冷却浴の温度はHPLC の移動相溶媒の氷点より多少高めに設定したほうがよい．本実験では移動相としてジクロルメタン (fp −95°) を使用したので，トラップ(1)をエタノール・ドライアイス浴 (−72°) で冷却した．

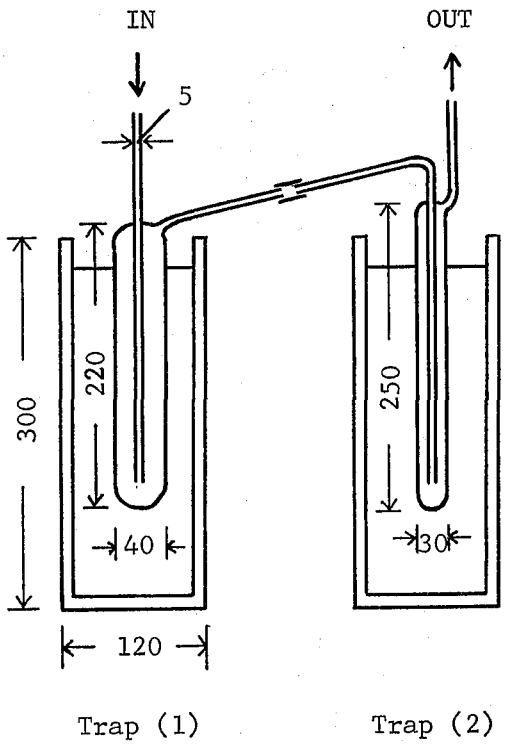


Fig. 4. Cold Traps
Trap (1) was maintained at −72°
(Ethanol-Dry Ice)
Trap (2) was maintained at −130°
(Ethanol-Liquid Nitrogen)
Unit of figures : mm

トラップ(2)の目的はニトロシルラジカル以外のラジカル，あるいはトラップ(1)で捕集できない低沸点成分の捕集である．そのためトラップ(2)の温度はニトロシルラジカルが捕集されないかぎりなるべく低温に設定することが望ましく，イソペンタン・液体窒素浴で−160°程度まで冷却することが推奨されている．しかし，イソペンタンは蒸気圧および引火性が高いので，防災上問題があり，また労働衛生上も好ましくない．その上，トラップ(1)とトラップ(2)の温度差があまり大きいと，トラップ(1)で捕集しきれなかった移動相の蒸気がトラップ(2)に入ったところで急激に冷却され，その結果トラップ(2)内で氷結が生じ分析不能となることがある．以上の理由により，トラップ(2)の場合にもエタノールを用い，エタノール・液体窒素浴で−130°に冷却し，先のトラップ(1)と連結して使用したところ，TEA-HPLC を安定に作動させることができた．

3. 検出感度

シャンプー5gにNDELA 1.0μg を添加したものを試料とし，前記の方法によって調製した試料溶液のTEA-HPLC クロマトグラムを Fig. 5 に示す．なお，比較のためにUV検出器（254nm）でモニターしたクロマトグラムも同時に記録した．

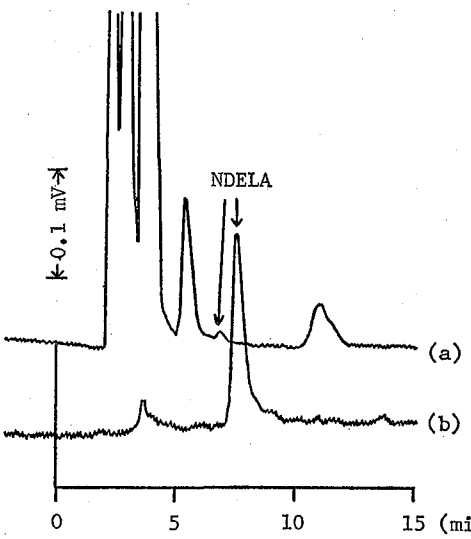


Fig. 5. UV- and TEA-HPLC Chromatograms (a) : UV (254nm; ×4), (b) : TEA (×8) Sample : 5g of a shampoo product containing 1.0μg of standard NDELA, Column : Zorbax CN, 25cm × 4.6mm, Mobile Phase : Dichloromethane, Flow Rate : 1.0ml/min, Sample Size : 25μl

TEA とUVでは NDELA に対する感度にかなりの差が認められた．すなわち，ノイズ幅の2倍に相当するピーク高（S/N=2）を与える NDELA の量を検出限界とすると，TEA の場合は約 0.5ng，UVの場合は約 5ng であった．したがって，TEA はUVより10倍程度 NDELA に対する感度が高いことが明らかとなった．

4. 共存物質の影響

クリーム 5g に NDELA 1.5μg を添加したものを試料とした場合について，得られた TEA- および UV-HPLC クロマトグラムを Fig. 6 に示す．

化粧品は種々の成分の混合物であり，またその成分も化粧品の種類および銘柄によって非常に異なるので，画一的な前処理法ですべての試料を効果的にクリーンアップすることは不可能である．とくに，今回検討した前処理法は，Fan ら[7] の方法の問題点である回収率のバラ

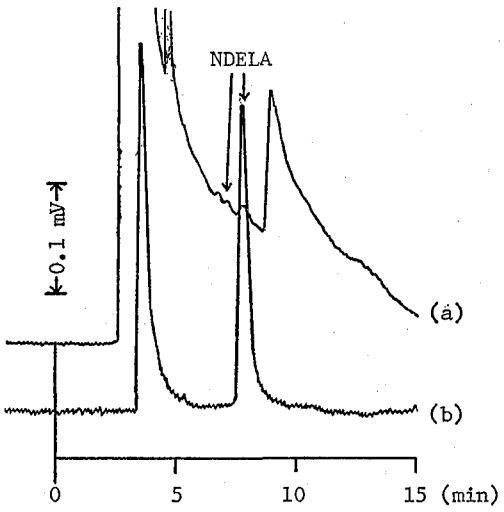


Fig. 6. UV- and TEA-HPLC Chromatograms (a) : UV (254nm; ×4), (b) : TEA (×8) Sample : 5g of a cream product containing 1.5μg of standard NDELA, Column, Mobile Phase and Sample Size : Same as in Fig. 5

ツキをなくし NDELA を定量的に回収することに重点をおいたため，操作がかなり簡略化されている．そのため，試料溶液中には除去されずに残っている多くの成分が存在する．したがってUV検出器を使用する場合は，Fig. 5 の試料のように紫外部に吸収をもつ成分が NDELA のピークと重ならなければ定量が可能であったが，Fig. 6 の試料のように紫外部に吸収をもつ成分のピークが NDELA のピークと重なると正確に定量することが不可能になった．また場合によっては，他成分を NDELA と誤認する危険性さえ認められた．それに対し，TEA の場合はN-ニトロソ化合物以外はほとんど応答しないので，試料溶液中に多くの他成分が共存しても NDELA を正確に定量することができた．

5. 各種試料への適用性

今回検討した方法を種々の試料に適用し，NDELAの添加回収実験を行なうとともに，そのときの操作性について検討した．すなわち，銘柄の異なる5種類のシャンプー，クリームおよびローション計15検体の各 5g に NDELA 1.0μg を添加したものについて，前記の方法で試料溶液を調製し，TEA-HPLC で NDELA の定量を行なった．

いずれの場合も回収率は90%以上であり，試料の種類および銘柄の相違による回収率のバラツキはほとんど認められなかった．また，試料溶液の調製法に関しては，

濃縮中に界面活性剤の影響で発泡する場合があること以外は，とくに問題となる個所は認められず，操作性についてもほぼ満足できる結果となった．今回は，化粧品の中からシャンプー，クリームおよびローションの3種を選びそれらについての適用性を検討したが，本法はその他の化粧品試料あるいは原料にも適用可能であると考えられる．

結　言

不揮発性のN-ニトロソ化合物の分析はTEA-HPLCが最適であるといわれているが，TEAが新しい装置であるために未解決の問題が多く，TEA-HPLCを感度よく安定に作動させることはこれまで必ずしも容易ではなかった．今回，TEA-HPLCの操作条件のうち，とくにコールドトラップ条件について検討した結果，感度よく安定に作動させることができるようになった．そこで，TEA-HPLCによる化粧品中のNDELAの定量法を検討したところ，ほぼ満足できる結果を得たので，今後各種化粧品および原料等について調査を行なう予定である．

文　献

1) 酒井綾子，谷村顕雄：食衛誌，12，485，1971
2) 中村全良，臼杵睦夫：*ibid.*，14，265，1973
3) 真木俊夫，田村行弘，嶋村保洋ら：東京衛研年報，28-1，145，1977
4) 真木俊夫，田村行弘，嶋村保洋ら：*ibid.*，29-1，256，1978
5) The Boston Herald Americans: Thursday, March 24, 1977
6) Division of Cosmetics Technology, Food and Drug Administration: Progress Report on the Analysis of Cosmetic Products and Raw Materials for N-Nitrosodiethanolamine, February 1, 1978
7) Fan, T. Y., Goff, U., Song, L., Fine, D. H., *et al.*: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 15, 423, 1977
8) Fine, D. H., Rufeh, F., and Lieb, D.: *Nature*, 247, 309, 1974
9) Fine, D. H., Rounbehler, D. P., Pellizzari, E. D., *et al.*: *Bull. Envir. Contam. and Toxicol.*, 15, 739, 1976
10) Fine, D. H., Rounbehler, D. P., Belcher, N. M., *et al.*: *Science*, 192, 1328, 1976
11) Fine, D. H., Ross, R., Rounbehler, D. P., *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1069, 1976
12) Fine, D. H., Rounbehler, D. P., Sawicki, E., *et al.*: *Envir. Sci. and Technol.*, 11, 577, 1977
13) Fine, D. H., Rounbehler, D. P., Rounbehler, A., *et al.*: *ibid.*, 11, 581, 1977
14) Fan, T. Y., Rounbehler, D. P., Ross, R., *et al.*: *Nature*, 238, 70, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 103-105, 1979

市販磁気治療器の磁束密度について

西田茂一*, 森謙一郎*, 原田裕文*

Magnetic Flux Densities of Marketing Magnetic Medical Appliances

SHIGEKAZU NISHIDA*, KENICHIRO MORI* and HIROFUMI HARADA*

Keywords: 磁気治療器 magnetic medical appliance, 磁束密度 magnetic flux density, 磁性体測定器 gauss meter

緒　　言

家庭用医療用具のうち磁気治療器の占める割合は極めて高く，その種類も多岐にわたっている．型態としては磁性体を内蔵したネックレス，シート，まくら，腹巻，肩掛，腕輪等がある．また磁性体を直接皮膚に接触させるものとして指輪や皮膚貼付式のものもある．

磁気治療器の効能は血液の循環をよくし肩こり等に効くとされている[1]．また中川[2]は人体に磁場を作用させた場合，効果を発揮させるためには 500 Gauss 程度以上の磁束密度（以下 MFD と略す）が必要であろうと述べている．

市販品の MFD に関する報告は少なく，実態はあまり知られていない．そこで今回，各種製品を入手し，これらについて調査したのでその結果を報告する．

実験方法

1. 試料　各種型態の磁気治療器47種およびはりきゅう用器具3種である．

2. 装置　磁性体測定器：横川電機製ガウスメーター3251型，測定方式：ゲルマニウムホール発電器定電流駆動方式，標準磁石：日本電機計器検定済 IKG，レコーダー：日立製 QPD54.

3. 測定原理　MFD の測定原理は導体の板のある方向に電流を流し，これに直角に磁場を作用させると，電流と磁場に垂直な方向に起電力を生ずる．このホール効果を利用したものである．すなわち 1 kHz 発振器の出力は増幅され，ホール発電器を定電流駆動する．ホール発電器に測定磁界が加わるとホール効果によって 1 kHz キャリヤーを被測定磁界で変調された出力電圧を発生する．発生電圧を安定な増幅器で増幅，整流し指示計が駆動される．出力は磁界に比例しているのでその大きさが直読される．

極性の判別は増幅器の出力を同期整流することによって行なわれる．

4. 操作方法

1)　測定器の検定と測定法　検定済の標準磁石を用いて測定器の指示計が正しく所定の MFD を示すかをしらべる．この際，指示計の指針は著しく振れるため測定値を目視でとらえることはむずかしい．そこで測定器の記録計用出力端子に記録計を接続し，記録紙に記録する．

2)　試料の MFD 測定法　試料には磁性体の表面を布や金属カプセルで覆ったものと，磁性体そのものを皮膚に直接触れさせるものとの2種に大別できる．いずれも使用時の状態で測定した．すなわち試料表面にホール素子を内蔵したプローブを当て極性をしらべたのち，MFD を測定する．プローブを試料表面に密着させ，わずかずつ移動させ，指針の振れに注意しながら最高値を示す位置を探す．測定は 20～23° の室温で行なう．

結果および考察

1. 検量線　標準磁石を用い上記の方法により測定し，得られたピーク高より検量線を作成したところ，

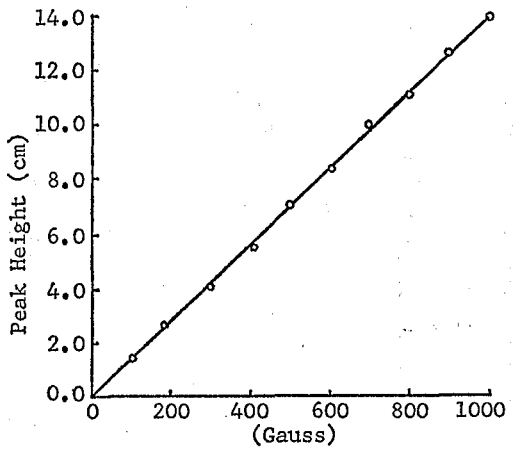


Fig. 1. Calibration Curves of Magnetic Flux Density by Standard Magnet

* 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. Magnetic Flux Densities of Magnetic Medical Appliances

Sample No.	Maker	Sample type	N*	Gauss
1	A	Necklace	11	610
2	A	〃	11	610
3	B	〃	11	800
4	C	〃	8	1250
5	C	〃	9	1250
6	C	〃	11	1250
7	C	〃	9	1250
8	D	〃	17	590
9	E	〃	10	600
10	F	〃	10	600
11	G	〃	10	600
12	H	Ring	1	70
13	H	〃	1	70
14	H	〃	1	70
15	H	〃	1	80
16	H	〃	1	80
17	H	〃	1	70
18	H	〃	1	70
19	H	〃	1	80
20	H	〃	1	50
21	H	〃	1	50
22	H	〃	1	60
23	H	〃	1	60
24	H	〃	1	70
25	H	〃	1	50
26	H	〃	1	70
27	H	〃	1	50
28	H	〃	1	60
29	I	〃	1	600
30	I	〃	1	980
31	I	〃	1	900
32	E	Stomach band	24	600
33	E	〃	8	1200
34	E	〃	8	1180
35	J	〃	16	680
36	K	Sheet	160	540
37	K	〃	160	600
38	L	〃	4	720
39	K	Shoulder pad	12	450
40	E	Leg band	4	540
41	M	Arm band	6	740
42	N	Belt	9	540
43	M	Pillow	1	510
44	O	Walnut-shape	1	800
45	P	Plaster	1	610
46	P	〃	1	700
47	P	〃	1	700
48**	Q	〃	1	5
49**	Q	〃	1	5
50**	Q	〃	1	5

* : Numbers of magnet in the sample
** : Acupancture appliance

Fig. 1 のようにMFDとの関係は原点を通る直線となった.

2. 市販磁気治療器の MFD 測定の結果は Table 1 のとおりである.

1) ネックレス：ネックレスの磁性体部分はフェライト磁石の表面をホーローで覆ったものや鋳造磁石に銅，ニッケル，パラジウム等をメッキしたものがある．また希土類磁石をアルミニウムや黄銅製カプセルに封入したものもある．これらの磁性体9～17個を鎖でつなぎ合わせ，ネックレスとしたものである．

11種のネックレスの MFD は最高 1,250 Gauss，最低 590 Gauss であった．このうちメーカーCの金属カプセル入りのものは希土類磁石が内蔵されていたが，カプセルから取り出して測定したところ 1,700 Gauss を示した．すなわち磁石とプローブの距離に応じてMFDは増減することが認められた．

2) 指輪，磁気指輪の母体金属は銅，ニッケル，コバルトまたはクロム，コバルト，鉄系の合金で形状は甲丸である．20種について行なったがメーカーHの MFD は 50～80 Gauss でメーカーIのものは 600～980 Gauss であった．すなわちメーカーによって著しい差のあることが認められた．

3) 腹巻：伸縮性腹巻の内部に円盤状のフェライト磁石が8～24個接着固定されたもので，S極，N極が交互に配列されている．MFD は 600～1,200 Gauss であった．

4) シート：試料 No. 36 は就寝時の敷物で，約 60cm ×100cm のウレタンマットシートに直径 20mm，厚さ 3 mm の円盤状磁石160個を等間隔で配列してある．MFD は1個あたり 540～600 Gauss であった．身体に接する磁石数は取扱った試料の中でもっとも多かった．

試料 No. 38 はウレタンマットシートに直径 30mm，厚さ 16mm のフェライト磁石4個を取り付け，全体をビニールレザーで覆い，幅 130mm，長さ 600mm，厚さ 18mm としたもので，これを添付の敷布のポケットに入れて用いる構造になっている．添付された敷布の表面から測定したところ平均 720 Gauss であった．

5) 肩掛け：直径 20mm，厚さ 3mm のフェライト磁石12個を内蔵させ，肩当て状に縫製したものである．MFD は 450 Gauss で縫製品の中でもっとも低い値であった．

6) 足用バンド：直径15mm，厚さ 7mm の円盤状磁石4個を合繊布地で包み，50mm×400mm のベルト状にしたものである．下肢に巻いてマジックテープで固定するよう縫製されてある．MFD は 540 Gauss であっ

た.

7) 腕輪：アルミニウム合金のカプセル中に永久磁石を収容し，これを時計バンドと同じような伸縮性の板バネによる金属性バンドに取り付けたものである．磁石は板バネとの間に6個取り付けてあり，N極とS極は交互に配列してある．内容磁石は 13mm×9mm×5mm でカプセル表面から測定したところ 740 Gauss であった.

8) ベルト：腹部と背部装着部位に磁石を組み入れたベルトである．背部用は8個の磁石がN極で，腹部用は1個の磁石がS極でそれぞれ身体に接する構造になっている．MFD は腹部用 540 Gauss，背部用は 440 Gauss であった.

9) まくら：普通のまくらの中に 1,000 Gauss の板状永久磁石が組み入れてある．後頭部に接する部分を強く圧して測定したところ最高 510 Gauss であった．この製品は測定部位によって著しく異なる.

10) クルミ型の握り具：試料 No. 44 は磁石をクルミ状のプラスチック容器に入れたものである．これは巷間のクルミを用いる手指の屈伸運動からヒントを得たものと思われる製品である．内蔵される磁石は17mm×17mm×20mm の直方体でバリウムフェライト磁石である．MFD は 800 Gauss であった.

11) 皮膚貼付式のもの

(1) 試料 No. 45, 46, 47 は磁石を皮膚に密着させる貼り付け方式のものである．これは直径 22mmの円形接着テープの粘着面中央に外径 5.2mm，厚さ 2.5mm の円盤状フェライト磁石を貼り付けたものである．皮膚に接する側がN極となっており，MFD は 610～700 Gauss であった.

(2) 試料 No. 48, 49, 50 は(1)と同様に皮膚貼付式のもので，8mm 角の絆創膏の中央に直径 1.2mm の金属球が貼付されたものである．本品は磁気治療器ではなく，薬事法施行令にいうはりきゅう用器具に属するものである．しかし表示には磁気刺激持続療法と記されていたので MFD を測定したところ，極めて低値で数 Gauss に過ぎなかった.

総　括

1. 磁気治療器は磁性体を布，プラスチック，金属等で覆ったものと皮膚に直接接触させるものとの2種に分けられ，型態的には多数の磁石を組みこんだものと単独で使用するものとに分けられる.

2. MFD は低値のもので 50 Gauss，最も大きいものでは 1,250 Gauss を示し，その差は極めて大きいことが認められた.

3. 磁石を金属カプセルや部厚な布地で覆うと当然のことながら MFD は低値を示す．すなわち内蔵磁石とプローブの距離に応じて MFD は増減する．したがってまくらの様に内蔵磁石が芯部にある場合は身体に作用する MFD は小となる.

4. 身体に接触する側の極性はN，S交互に配列されたものが多かったが，皮膚貼付式のものはN極であり，ベルトは背部用がN極，腹部用はS極であった.

5. 指輪の様に1個の磁性体から成るものとシートの様に 160 個もの磁石を配列したものがあり，型態によって規模に著しい差が認められた.

6. 皮膚貼付式のものに磁気治療器と混同され易いはりきゅう用器具がある．これは表示を明確にすることが望ましい.

謝辞 本調査に御協力いただいた東京都衛生局薬事衛生課の方々に深謝いたします.

文　献

1) 厚生省：厚生法規総覧，4, 1, 558-8, 1967

2) 中川恭一：日本医事新報，2745, 30, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 106-110, 1979

化粧品用色素に関する衛生化学的研究(第1報)
赤色219号中の1-phenylazo-2-naphtholの含有量

伊藤弘一*, 江波戸舉秀*, 原田裕文*

Hygienic Chemical Studies on Pigment for Cosmetics (I)
Amount of 1-phenylazo-2-naphthol in D&C Red No. 31

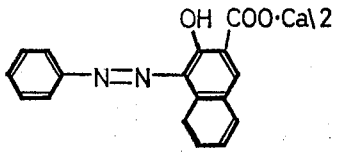
KOICHI ITO*, KIYOHIDE EBATO* and HIROFUMI HARADA

1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I), suspected to be a cause of Melanosis Riehl, in commercial pigments of D&C Red No. 31 (Brilliant Lake Red R) was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The extraction of 1-phenylazo-2-naphthol from a pigment was continued with chloroform in a Soxhlet apparatus for 72 hours. After concentration, the extract was passed through a sample clarification kit for HPLC, eluted with benzene, and determined by HPLC with a visible absorbance detector. HPLC conditions were as follows: column; Zorbax CN (normal-phase adsorption chromatographic column) (DuPont), 4.6 mm i.d. × 250 mm, mobile phase; chloroform : hexane (5:95), flow rate; 2.0 m*l*/min., detection; 480 nm. With this method, a calibration curve showed linearity in the range of 5–300 ng and the limit of detection was 5.0 ng. The content of 1-phenylazo-2-naphthol in ten commercial pigments ranged from 0.084 to 0.304%.

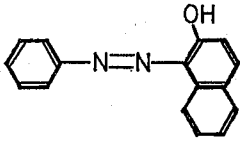
Keywords : high-performance liquid chromatography, 1-phenylazo-2-naphthol, Sudan I, D&C Red No. 31, Brilliant Lake Red R, Melanosis Riehl

緒　言

近年，化粧品による皮膚障害について種々論議されているが，その一つにファンデーションやほお紅など色素含有量が高いメークアップ製品を連用したために発症した顔面黒皮症があげられる[1-3]．従来化粧品によって生ずる黒皮症はパラフィンや香料中の光感作性物質によるものとされていたが[4-6]，現在では多数の研究者により，光感作と関係なく，化粧品用タール色素赤色219号(Brilliant Lake Red R, D&C Red No. 31)によることが報告されている[7-13]．そして小塚ら[14]および小林ら[15]は，赤色219号に夾雑するスダンⅠ(1-phenylazo-2-naphthol, CI. No. 12055)によっても黒皮症が発症することを報告している．そこでわれわれは市販赤色219号中のスダンⅠ含有量を調査することは，化粧品の安全性確保の観点から意義のあることと考え，その分析法を確立し，市販品について調査を行なったので報告する．



Ca salt of 1-phenylazo-2-hydroxy-3-naphthoic acid



1-phenylazo-2-naphthol

Fig. 1. Structures of Ca Salt of 1-phenylazo-2-hydroxy-3-naphthoic Acid and 1-phenylazo-2-naphthol

実験方法

1. **試料**　市販の赤色219号．国内5社の10種を調査対象とした．

2. **試薬**　試薬はすべて特級を用いた．

3. **標準色素**　スダンⅠ(東京化成KK)を濃縮ゾーン付薄層クロマトプレート(メルク社製)を用いて分離後，スダンⅠに相当するゾーンをかきとり，石油ベンジ

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

ンより再結晶して精製した．なお赤色219号およびスダンIの構造式を Fig. 1 に示す．

4. 装置および器具　高速液体クロマトグラフ（以下HPLC と略す）：日立635型，波長可変紫外可視モニター付　高性能薄層プレート（以下 HPTLC と略す）：メルク社製シリカゲル60　スポットキャピラリー：カマグ社製　セップパック（HPLC 用サンプル前処理カートリッジ）：ウォーターズ社製シリカカートリッジ　赤外分光光度計：日立 EPI-G_3 型　自記分光光度計：日立 EPS-3T 型　元素分析装置：柳本 CHNcorderMT$_2$ 型

5. 操作法

5—1 試験溶液の調製　デシケータ中で十分乾燥した試料 10～30g を円筒ろ紙（東洋ろ紙 No. 84）に正確にはかりとり，ソックスレー抽出器を用い，クロロホルム 200m*l* を抽出溶媒として水浴上で72時間抽出を行なう．このクロロホルム抽出液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固したのち，残留物にベンゼン1m*l* を加えて溶かし，全量をセップパックに吸着させ，さらに器壁も出来るだけ少量のベンゼンで洗い，これもさきのセップパックに吸着させる．ついでこのセップパックにベンゼン 20m*l* を流して，クリーンアップを行ない，流出液を再びロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固し，ここに得た残留物にクロロホルム20m*l* を加えて溶かし，試験溶液とする．

5—2 薄層クロマトグラフィー　試験溶液および標準色素のクロロホルム溶液をスポットキャピラリーで HPTLC に塗布し，ベンゼン：クロロホルム（10：1）を用いて展開し，定性を行なう．

5—3 高速液体クロマトグラフィー　試験溶液をクロロホルムで適宜希釈し，以下の条件において HPLC による定性および定量を行なう．

〔HPLC の測定条件〕　カラム；ゾルバックスCN 5μm(デュポン社製) 4.6 ID× 250mm カラム温度；室温　移動層；クロロホルム：ヘキサン（5：95）流速；2.0m*l*/min.　カラム入口圧；100kg/cm^2　検出器；可視検出器，480nm　サンプル注入量；2μ*l*

5—4 定性および定量法　試験溶液について前記の条件で HPLC を行ない，得られたクロマトグラムとあらかじめ標準色素について同様に行なって得られたクロマトグラムの保持時間を対比させて定性を行なう．また試験溶液のクロマトグラムからスダンIのピーク高を求め，あらかじめ作成した検量線よりその含有量を算出する．

実験結果および考察

1. 抽出条件の検討　一般に試料より微量物質を抽出する方法としてソックスレー抽出法がひろく用いられている．本実験においてもソックスレー抽出法を用いることとして，その際使用する抽出溶媒を検討した．すなわちクロロホルム，メタノールおよびヘキサンの3種の溶媒を用い，同一ロットの市販赤色219号の一定量を試料として，それぞれ72時間ソックスレー抽出を行ない，ここに得た抽出物について後述の条件で薄層クロマトグラフィーを行なった．そのクロマトグラムを Fig. 2に示す．Fig. 2 にみられるように赤色219号はスダンIのほか種々の夾雑物を含有しているが，溶媒によって抽出される夾雑物の量が異なっている．これらのうちでスダンIの抽出量が多いものをみるために，スダンIのスポットをかき取り，クロロホルムで溶出させ，その吸光度を測定した．その結果スダンIの含有量が最も高い値を示したものはクロロホルム抽出物であった．さらに同一ロットの赤色219号10種について，それぞれクロロホルム抽出を行ない，後述の条件で HPLC により定量したところ，標準偏差2.26，変動係数1.67％と良好な結果を示し，抽出操作によるバラツキはほとんどみられなかった．そこで本実験の抽出溶媒にはクロロホルムを用いることにした．

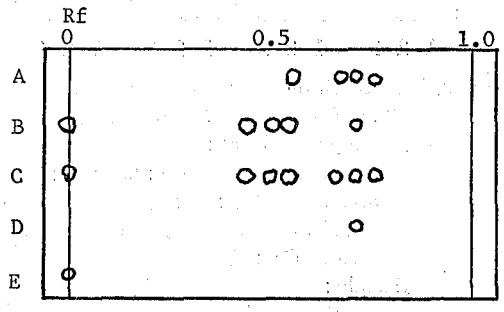


Fig. 2.　TLC Chromtogram of Extracts of D&C Red No. 31 with Various Solvents
Sample：A；extracts with chloroform
B；extracts with methanol
C；extracts with hexane
D；1-phenylazo-2-naphthol
E；D&C Red No. 31
Developing solvent：benzene: chloroform (10：1)

2. 薄層クロマトグラフィー　TLC プレートの担体として，シリカゲル，アルミナおよびセルロースについて検討したところ，分離度および展開時間の点で，シリカゲルを用いた HPTLC プレートが最もよいことが認められた．つぎに展開溶媒について検討した．この展開溶媒に関しては種々報告があり，持田ら[16]はメチルエチ

ルケトン：ベンゼン：酢酸(25：90：2)を，小塚ら[14]はベンゼンを，Molitor[17]はジクロルメタンをまたMarshall[18]はベンゼン：クロロホルム（10：1）をそれぞれ使用している．そこで今回，これらの溶媒について追試を行なったところ，Fig. 3 に示すクロマトグラムが得られ，スダンⅠの展開溶媒としてはベンゼン：クロロホルム（10：1）が適当であると認めた．

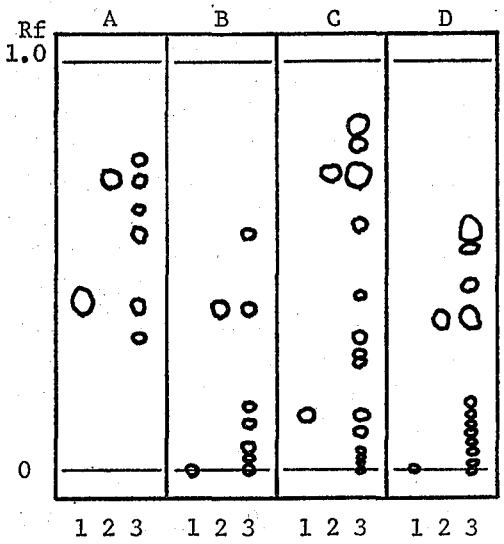


Fig. 3. TLC Chromatograms of Extracts with Chloroform of D&C Red No. 31
Developing solvent :
A ; methylethylketone : benzene : acetic acid (25 : 90 : 2) B ; benzene
C ; dichlormethane D ; benzene : chloroform (10 : 1)
Sample :
1 ; D&C Red No. 31 2 ; 1-phenylazo-2-naphthol 3 ; extracts of D&C Red No. 31

3. クリーンアップ条件の検討 試験溶液中のスダンⅠをHPLCで定量する場合，溶液中に含まれる夾雑物を出来るだけ除去することが必要である．そこで高速液体クロマトグラフィー用サンプル前処理カートリッジ（セップパック）を使用して試験溶液のクリーンアップを試みた．セップパックにはシリカと C_{18} の2種があり，目的によって選ぶことになっている．今回の目的にはシリカが適しており，また溶離液としてはベンゼンがすぐれていることが認められた．Fig. 4 にクリーンアップ後の試験溶液と未処理の試験溶液について行なった薄層クロマトグラムを示した．ここにみられるようにセップパックを用いることによってスダンⅠよりRf値の低いものはすべて除去される．さらに定量を行なう場合のクリーンアップを考慮して溶出液のベンゼンの量について検討したところ，スダンⅠが50mg以下であれば，20 m*l* のベンゼンを使用することにより99.5%が回収でき，またこの液量であれば他の夾雑物の溶出もなく，クリーンアップの目的は十分達せられることがわかった．

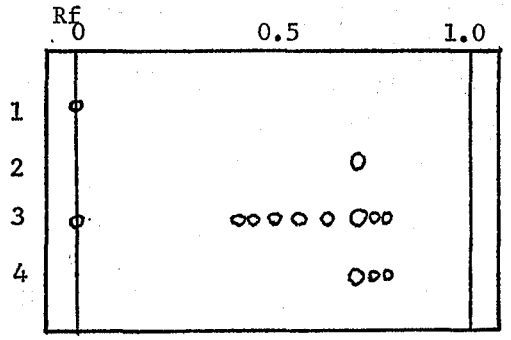


Fig. 4. TLC Chromatogram of Extracts of D&C Red No. 31
Sample : 1 ; D&C Red No. 31
2 ; 1-phenylazo-2-naphthol
3 ; extracts of D&C Red No. 31
4 ; extracts of D&C Red No. 31 treated by SEP-PAK
Developing solvent ; benzene : chloroform (10 : 1)

4. 高速液体クロマトグラフィーの条件

4—1 測定波長 メタノール溶液としたスダンⅠの吸収スペクトルをFig. 5 に示す．スダンⅠの極大吸収は紫外領域では230nm，可視領域では480nmにそれぞれあるが，このうち230nmは溶媒の吸収波長と重なるため，高感度で測定するためには不適当であった．そのため本実験においては480nmを測定波長として用いることにした．

4—2 充填剤 スダンⅠの分離に適した充填剤について検討を行なった．すなわち逆相系充填剤としてパーマフェーズODS，順相系充填剤としてゾルバックスCN，ゾルバックスSILおよびリクロソルブSI 100の計4種を用い，それぞれの比較を行なったところ，最も良い分離を示したのはゾルバックスCNであった．

4—3 移動相 ゾルバックスCNカラムを使用した場合の適正な溶離について種々検討したところ，クロロホルム：ヘキサン（5：95）が良好なクロマトグラムを示した．

4—4 検量線および検出限界 スダンⅠの検量線を上記定量条件において作成した．その結果Fig. 6 に示すよ

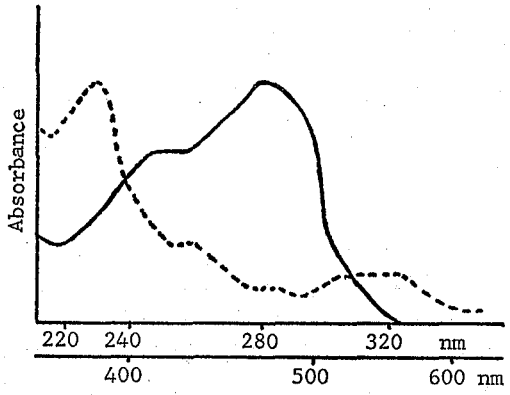


Fig. 5. UV. and VIS. Spectrum of 1-phenylazo-2-naphthol in Methanol
····· UV. spectrum
—— VIS. spectrum

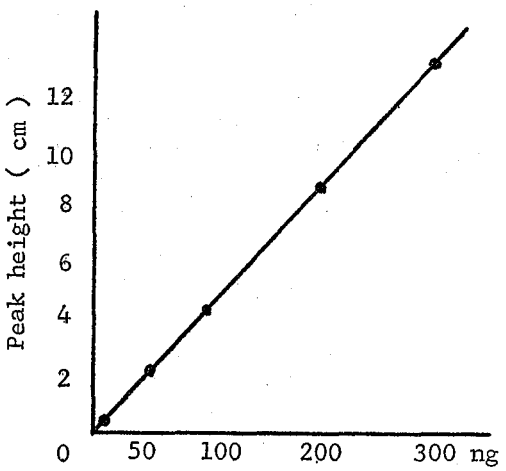


Fig. 6. Calibration Curve of 1-phenylazo-2-naphthol by HPLC

うに 5.0～300ng の範囲で原点を通る良好な直線が得られた．検出限界は 5.0ng であった．

5. 市販赤色 219 号中のスダン I 含有量 Table 1 に示すように市販品10品目についてスダンⅠの定量を行なったところ，その含有量は0.084～0.304%で，平均値は0.208% であった．なお市販品から抽出し，薄層クロマトグラフィーおよび HPLC でスダンⅠと認められたものをさらに確認する意味でつぎの操作を行なった．すなわち，市販品のクロロホルム抽出液を濃縮ゾーン付薄層プレートに塗布し，ベンゼン：クロロホルム（10：1）で展開後スダンⅠに相当するゾーンをかきとり，クロロホルムで抽出したのち，ロータリーエバポレーターで濃縮乾固する．この抽出物をメタノールに溶かし，紫外部および可視部の吸収スペクトルを測定したところ標準品のそれと一致した．また抽出物について赤外スペクトル測定および元素分析を行なった結果も標準品と一致することが認められた．それらのデーターを Table 2 に示す．また市販赤色 219 号よりの抽出物の HPLC クロマトグラムを Fig. 7 に示す．

結　論

女子顔面黒皮症の原因物質の一つとされているスダンⅠ（1-phenylazo-2-naphthol）について，分析法を検討し，さらに市販されている化粧品用赤色 219 号における含有量調査を行なった．スダンⅠの抽出はソックスレー抽出法を用い，抽出溶媒にはクロロホルムを用いる方法が最適であることを認めた．また分析は，高速液体クロマトグラフ用前処理カートリッジ（セップパック）を用

Table 1. Amount of Chloroform Extract and 1-phenylazo-2-naphthol in Commercial D&C Red No. 31

Sample	Weight of Sample (g)	Weight of Chloroform Extract (%)	1-phenylazo-2-naphthol (%)
A—1	30	1.12	0.195
A—2	10	1.32	0.204
B—1	30	0.69	0.174
B—2	10	1.77	0.298
B—3	10	1.40	0.216
C—1	10	0.83	0.244
C—2	10	0.64	0.146
C—3	10	0.40	0.084
D—1	10	0.97	0.304
E—1	10	0.75	0.213

Table 2. Properties of 1-phenylazo-2-naphthol extracted from Commercial D&C Red No. 31

	elementary analysis			spectroscopic analysis		
	H (%)	C (%)	N (%)	I. R. (KBr, cm^{-1})	U. V. (nm)[a)]	VIS. (nm)[a)]
Standard sample	4.82	77.44	11.26	3420	229	480
Extracted sample	4.87	77.40	11.28	3420	229	480

a) solvent; methanol

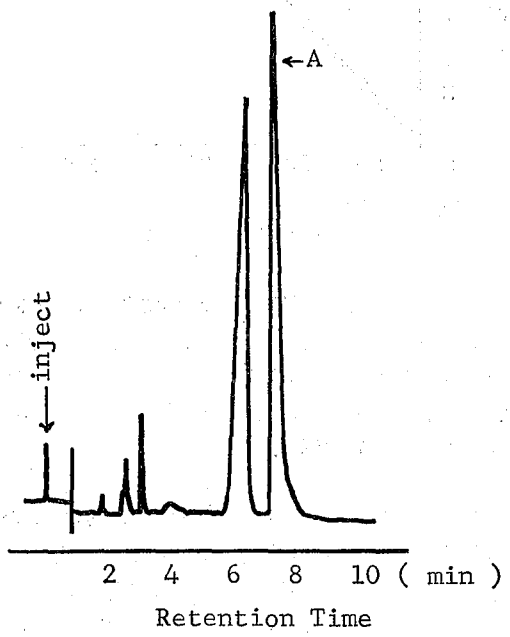


Fig. 7. HPLC Chromatogram of Extract of Commercial D&C Red No. 31
Peak A; 1-phenylazo-2-naphthol
Operating conditions……packing; ZORBAX CN 5 μm (Dupont instruments), column; 4.6mm ID×250mm, mobile phase; chloroform : hexane (5 : 95), flow rate; 2.0ml/min., pressure; 100 kg/cm², column temperature; room tem., sample size; 2 μl, detection; 480nm

いて抽出物をクリーンアップ後，高速液体クロマトグラフィーにより行なった．本法を適用した場合，10回のくりかえし実験による変動係数は1.67%で精度よく定量を行なうことができた．市販赤色219号における含有量調査を行なったところ，スダンⅠは全製品より検出され，その含有量の最高値は0.304%であり，平均0.208%であった．

この赤色219号をはじめ化粧品用タール色素は薬事法によって品質に規格が設定されている[19,20]が，今回われわれが検討したような微量の夾雑物までは触れられていない．しかし緒言で述べたようにその夾雑物によって皮膚障害が発生する可能性があれば，当然規制の対象とする必要があると考えられる．

文　献

1) 早川律子，小林美恵，上田宏ら：日皮会誌，84，631，1974
2) 石原　勝：皮膚臨床，16，859，1974
3) 岡崎　薫，田浦　直，野中薫雄：臨床皮膚，21，25，1967
4) Findlay, G. H.: *S. Afr. Med. J.*, 26, 373, 1952
5) 古谷達孝，鳥居ユキ：皮膚臨床，6，311，1964
6) 斉藤文雄：*ibid.*, 6, 333, 1964
7) 高橋洋子，須貝哲郎，高木　喬：臨床皮膚，30，873，1976
8) 河瀬章子，小林美恵，早川律子：皮膚，19，173，1977
9) 小林美恵，石垣　優，早川律子：*ibid.*, 19, 179, 1977
10) 藤本圭一，橋本誠一，中村由美ら：*ibid.*, 19, 170, 1977
11) 藤本圭一，橋本誠一，中村由美ら：*ibid.*, 20, 235, 1978
12) 山本幸代，須貝哲郎，高橋洋子：*ibid.*, 20, 252, 1978
13) 石原　勝：日皮会誌，86，710，1976
14) 小塚雄民，田代　実，奥村雄司ら：皮膚，19，191，1977
15) 小林美恵，滋野　広，福田金寿ら：*ibid.*, 20, 245, 1978
16) 持田研秀，古謝紀和，佃井典子：国立衛生試験所報告，89，158，1971
17) Molitor, J. C.: *J. AOAC*, 50, 1198, 1978
18) Marshall, P. N.: *J. Chromatogr.*, 136, 353, 1977
19) 厚生省令第30号（昭和41年8月31日）
20) 厚生省令第55号（昭和47年12月31日）

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.*, 30-1, 111-116, 1979

黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン（A-E）産生に及ぼす蔗糖の影響

五十嵐英夫*, 新垣正夫*, 高橋正樹*, 潮田　弘*
寺山　武*, 坂井千三*

Effect of Sucrose on the Growth of *Staphylococcus aureus* and on the Production of Their Enterotoxin A—E

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

Effect of the presence of 5 to 40% sucrose in Brain Heart Infusion broth (water activity levels: 0.98 to 0.94) 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 sucrose in concentrations of 5 to 10% added to the medium remarkably inhibited the growth of *S. aureus* strain 243 and FRI 326 which produce enterotoxins B and E.

When enterotoxin producing strains of *S. aureus* were incubated at 35C for 24 hours, it was found that the addition of sucrose in a concentration of 40% to the medium strongly inhibited production of enterotoxins B and C.

When toxin producing strains of *S. aureus* were incubated 35C for 72 hours, it was found that 5 to 40% concentration sucrose added to the medium decreased pH value to about 5 without a commensurate effect on the various concentration of sucrose.

However, cell counts always reached to 10^8/m*l* even in presence of 40% sucrose.

Keywords : *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal enterotoxins, production of enterotoxin, water activity, effect of sucrose

近年，食品の保存性を高めるために，食品の水分活性（Aw と略）を調節する方法が試みられている．私どもは，食中毒予防に関する研究の一環として，Aw を調節する方法がブドウ球菌食中毒の予防に，有効な手段かどうかを明らかにする目的で研究を進めている．これまで黄色ブドウ球菌（ブ菌と略）の増殖とエンテロトキシン（Ent と略）産生に及ぼす，種々の因子の影響に関する研究が数多く報告されている[1-6]．私どももすでに，塩化ナトリウムの影響について検討した[7]．その結果，Ent 産生菌の増殖は，塩化ナトリウム濃度が高くなっても，著明な変化を受けなかった．これに対して，Ent 産生は塩化ナトリウムによって影響を受け，塩化ナトリウム濃度が高くなると，Ent B および C 産生が Ent A，D および E 産生に比較して，著しく抑制された．このように塩化ナトリウムによる Ent 産生の抑制の受け方は，供試した菌株の違いよりも，Ent 型によって異なることを明らかにした．この塩化ナトリウムの添加の結果生じた Ent 産生の著明な低下は，その中に存在する Na^+ イオンもしくは Cl^- イオンのいずれかの直接的影響によるものか，あるいは塩化ナトリウムの添加の結果，培地中の Aw が低下をきたし，その結果，阻害効果となって表われたものであるのか今のところ明らかでない．

そこで，今回は蔗糖で Aw を調節した培地を用いて，塩化ナトリウムを添加した培地で見られたような Ent 産生の抑制が起るかどうかを明らかにする目的で実験を試みたのでその成績について報告する．

材料および方法

使用菌株は Ent A：100; Ent B：243; Ent C：FRI 361; Ent D：494; Ent E：FRI 326 で，各 Ent 型の reference 株である．

使用培地は Brain Heart Infusion broth (BBL 製，以下 BHI と略) に蔗糖を加えて，最終濃度 5，10，20，30，40% (それぞれ Aw は 0.98，0.97，0.96，0.95，0.94) にそれぞれ調製した．対照培地として，BHI 培地（蔗糖無添加，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，mode/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

西独）を用いて滅菌後の各蔗糖濃度の培地を測定した．

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

菌数の測定は培養4，8，12，18，24，48，72時間の各試料について，Spiral plating 法[8] で行ない，そのときの標準寒天平板上のコロニー数より算出した．

Ent の定量は，各培養時間後の試料を遠心し，その上清を Yamada ら[9] によって確立された逆受身赤血球凝集反応（RPHA と略）を用いて行なった．水分活性の調節剤として加えた蔗糖は，RPHA 反応になんの影響も与えないので，蔗糖を反応系から除去する必要はなかった．

各培養時間後の試料の pH は，pH メーター mode/HM-18B（東亜電波）を用いて25Cで測定した．

成　績

ブドウ球菌の増殖に及ぼす蔗糖の影響：Fig. 1 は蔗糖濃度の異なる BHI 培地を用いて，35Cで培養したときの各 Ent 産生菌の菌数を経時的に測定したものである．蔗糖濃度が20，30および40%よりも，5および10%含有する BHI 培地で培養したときの方が，各 Ent 産生菌

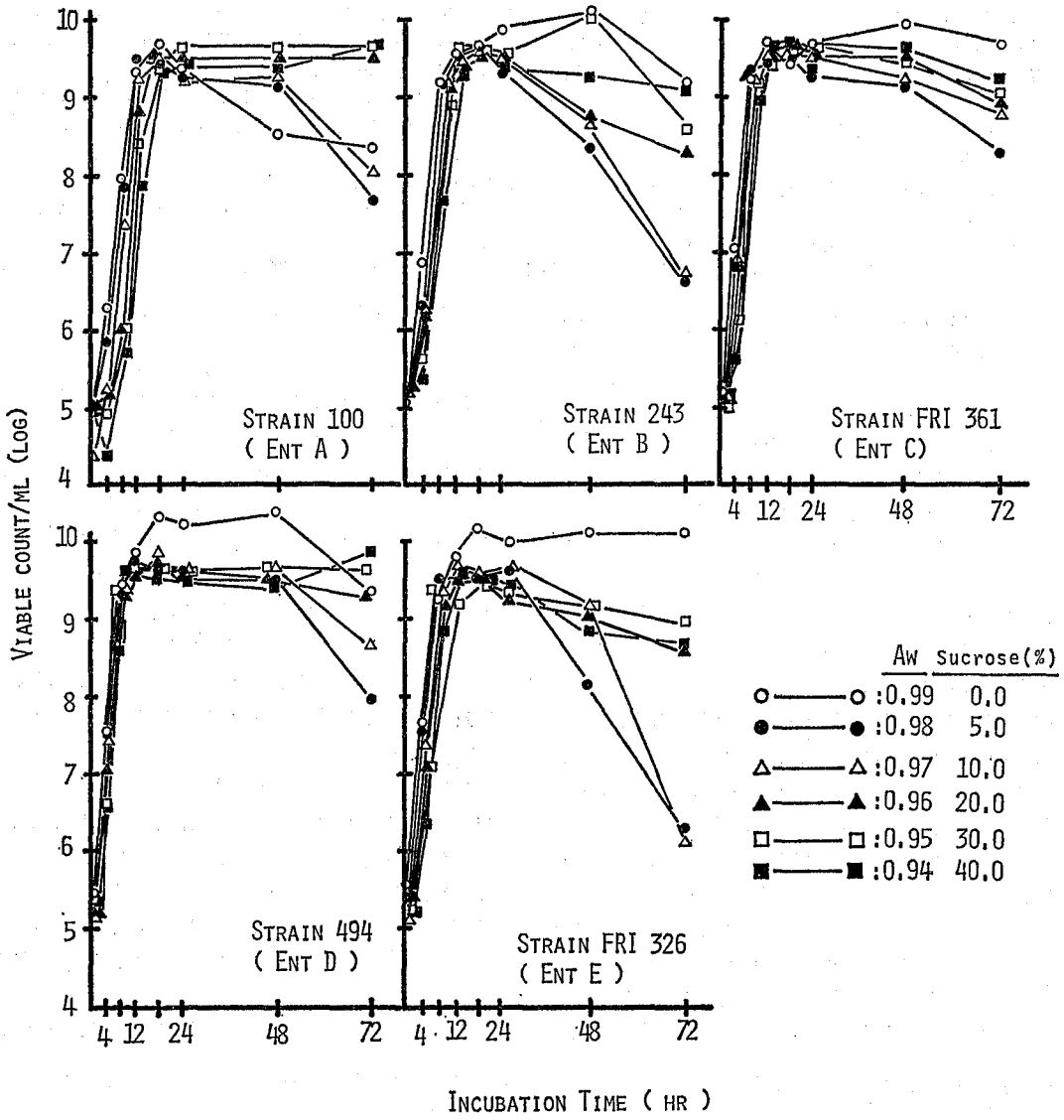


Fig. 1. Effect of Sucrose on Growth of *Staphylococcus aureus*

の菌数は減少することが認められた．その中でも，培養48～72時間後の Ent B およびE産生菌の菌数が，他の Ent 産生菌に比較して，著しく減少することがみられた．

蔗糖の添加量と Ent 産生菌の増殖の関係を，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に及ぼす蔗糖の影響を検討し，その結果を Fig. 2 に示した．蔗糖を添加しない対照培地での Ent A～E産生菌のGTは，それぞれ43分，32分，36分，40分および45分であった．Ent A産生菌のGTは，5および10%の蔗糖濃度のとき，それぞれ37分および33分で，対照培地でのGTよりも短かくなった．さらに，蔗糖濃度が20，30および40%と高くなると，それぞれ39分，45分および56分とGTが長くなることが認められた．これに対して，Ent B～E産生菌では，5～30%の蔗糖添加により，それぞれの対照培地でのGTよりも短かくなり，40%蔗糖添加の場合の Ent B～E産生菌のGTは，それぞれ33分，

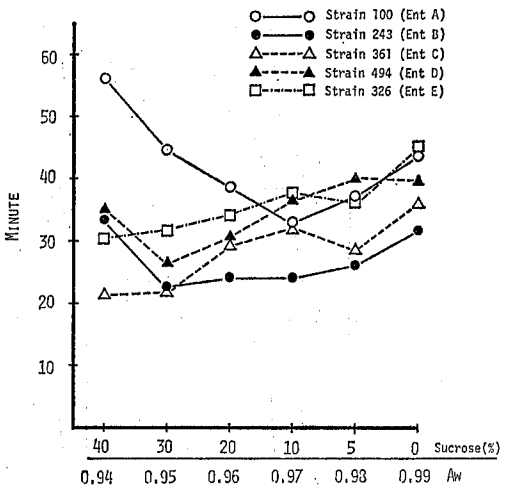


Fig. 2. Effect of Sucrose on Generation Times of *Staphylococcus aureus*

Table 1. Effect of Sucrose on the Production of Enterotoxins (A–E) in the Different Incubation Period

Strain	Sucrose (%)	Aw	Enterotoxin production (μg/ml) 0	4	8	12	18	24	48	72hr
100 (EntA)	0	0.99	0	0.004	0.4	4	10	10	10	10
	5	0.98	0	0.004	0.1	4	4	4	4	4
	10	0.97	0	0.004	0.1	4	4	4	4	4
	20	0.96	0	0.004	0.04	1	1	1	4	4
	30	0.95	0	0.001	0.01	1	1	1	4	4
	40	0.94	0	0	0.001	0.1	1	1	4	4
243 (EntB)	0	0.99	0	0	64	256	256	256	256	256
	5	0.98	0	0	16	16	16	16	16	16
	10	0.97	0	0	4	4	4	16	16	16
	20	0.96	0	0	4	4	4	1	1	1
	30	0.95	0	0	0.1	0.1	0.1	1	1	1
	40	0.94	0	0	0.016	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
FRI 361 (EntC)	0	0.99	0	0.002	16	64	256	256	256	256
	5	0.98	0	0.001	16	16	16	16	16	16
	10	0.97	0	0.001	4	16	16	16	16	16
	20	0.96	0	0.001	4	4	4	4	4	4
	30	0.95	0	0	1	1	1	1	4	4
	40	0.94	0	0	0.004	1	1	1	1	1
494 (EntD)	0	0.99	0	0.004	1	1	1	1	1	1
	5	0.98	0	0.004	0.4	1	1	1	1	1
	10	0.97	0	0.004	0.4	0.4	1	1	1	1
	20	0.96	0	0.004	0.1	0.4	1	1	1	1
	30	0.95	0	0.001	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	40	0.94	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
FRI 326 (EntE)	0	0.99	0	0.016	0.4	0.4	1.6	1.6	1.6	1.6
	5	0.98	0	0.004	0.4	0.4	0.4	1.6	1.6	1.6
	10	0.97	0	0.004	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	20	0.96	0	0.004	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	30	0.95	0	0.001	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	40	0.94	0	0	0.1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

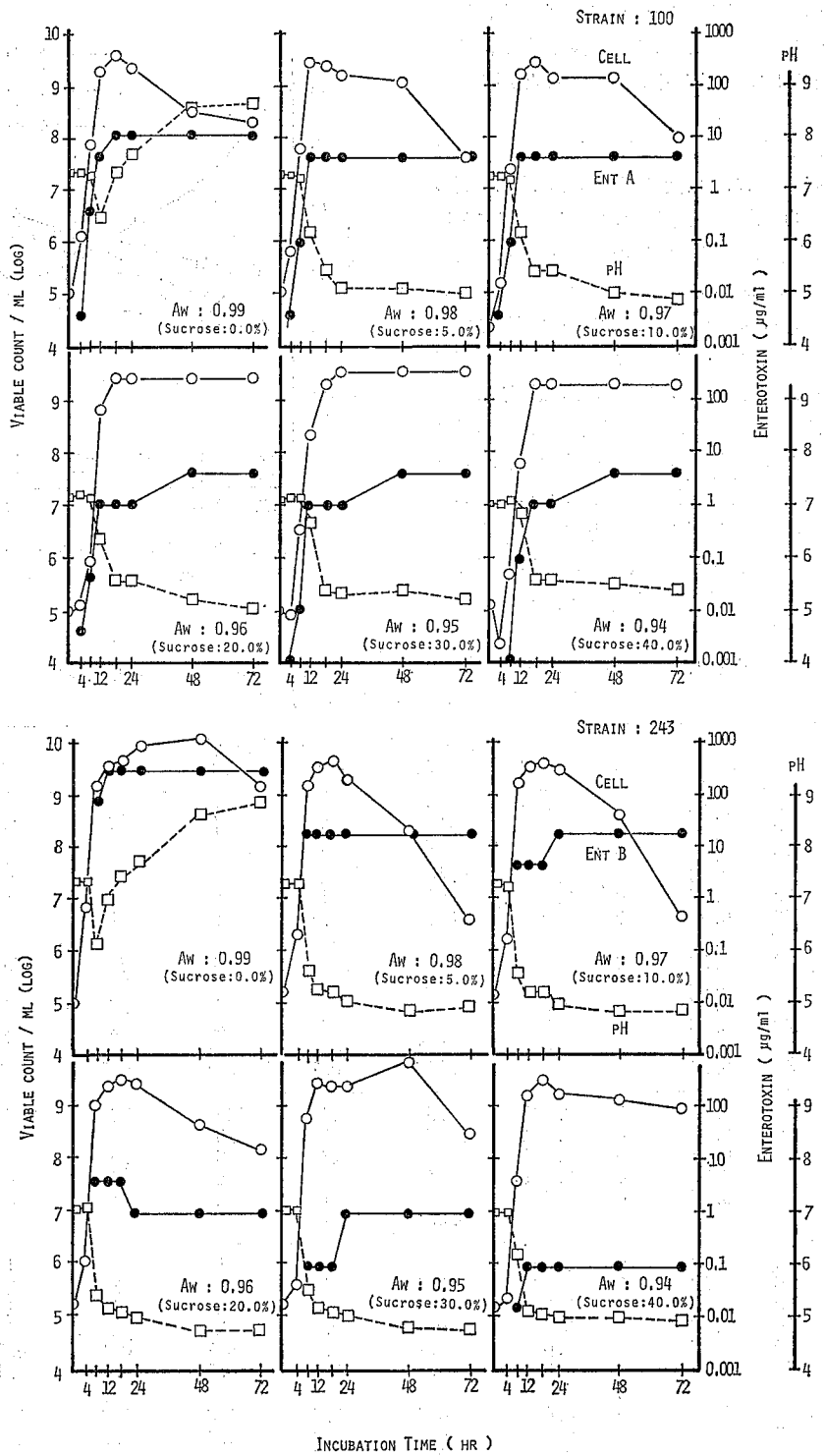


Fig. 3. Effect of Water Activity (Aw) on Growth and Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus*

22分，35分，30分であった．このようにEnt B～E産生菌においては，蔗糖40%添加した培地でのGTは，対照培地でのGTに比較して同じか，短かかった．

エンテロトキシン産生に及ぼす蔗糖の影響：Table 1は蔗糖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．培養4時間後の各型のEnt産生を蔗糖濃度の異なる培地ごとにみてみた．その結果，Ent Aにおいては，5～30%の蔗糖を添加しても，Entが検出され，蔗糖を40%添加した培地では，Entが検出されなかった．Ent Bでは，蔗糖を無添加の対照培地においても，Entが検出されなかった．Ent Cでは，蔗糖5～20%添加までEntが検出されるが，蔗糖を30%，40%に添加した培地ではEntが検出されなかった．Ent DおよびEにおいては，5～30%蔗糖の添加までEntが検出され，40%蔗糖では検出されなかった．このように，培養4時間後のEnt産生をみてみると，Ent B以外のEnt産生が認められたEnt産生菌においても，蔗糖濃度が30%，40%と高くなると，Ent産生が抑制されることが確認された．

培養24時間後の各型のEnt産生量を蔗糖濃度の異なる培地ごとに比較した．その結果，Ent Aでは，対照培地での産生量は10μg/mlである．これに対して，5%，10%蔗糖添加した培地は4μg/ml，20%，30%，40%蔗糖添加培地では，いずれも1μg/mlであった．Ent BおよびCでは，対照培地で，両者とも256μg/mlであり，5%および10%蔗糖を添加すると，いずれも16μg/mlで，対照培地での産生に対し，1/16であった．蔗糖を20%，30%添加した培地でのEnt BおよびCの産生量は，いずれも1μg/mlで，対照培地での産生量に対して1/256であった．40%蔗糖添加した培地でのEnt B産生は，0.1μg/mlと更に減少した．このように，Ent BおよびC産生は，20%～40%の蔗糖添加で著明に減少することが明らかになった．Ent Dについては，蔗糖5～20%添加で対照培地と同じ産生量を示し，30%および40%蔗糖添加では0.1μg/mlであった．Ent E産生の場合は，5%蔗糖添加と対照培地との産生量は1.6μg/mlで同じであり，10～40%蔗糖添加では，いずれも0.4μg/mlであった．このように蔗糖を含む培地でのEnt産生量は，72時間まで培養を延長しても，24時間培養後の産生量とほぼ同様であり，Ent産生量の増加が認められなかった．

培地のpHの経時変化：対照培地のpHは7.28であるが，BHI培地に蔗糖を5，10，20，30および40%添加したときのpHは，それぞれ，7.23，7.21，7.13，7.07，7.00であった．このように，蔗糖の添加によって培地のpHのわずかな低下がみられた．Ent AとB産生菌の各培地で培養したときのpHの経時変化をFig. 3に示した．図にみられるように，蔗糖を5～40%含有する培地のpHは，培養後8～24時間の間で著しく低下することが認められた．いずれの蔗糖濃度においても，72時間培養後のpHは4.8～5.4であり，蔗糖濃度の違いによるpHの変化の差は認められなかった．これに対して，蔗糖を含まない対照培地のpH変化は，培養8～12時間後にpH 6.1～6.4まで低下した．さらに培養時間を延長すると，pHは再び上昇し，72時間後にはpH 8.6～8.8であった．

以上のような傾向は，Ent AおよびB産生菌以外のEnt C，DおよびE産生菌についてもみられた．

考　察

Awの調節剤として蔗糖を用いて調製したBHI培地での各型のEnt産生菌の増殖およびEnt産生について検討した．その結果，Ent BおよびE産生菌の増殖は5%および10%の蔗糖濃度において，培養時間の経過にしたがって，著しく抑制されることが認められた．このような現象は，Aw調節剤として，塩化ナトリウムを用いてAw：0.92に調節した培地においてはみられなかった[7]．なぜ，このEnt BおよびE産生菌の増殖だけが，特に抑制されるのか不明である．蔗糖をAw調節剤としたとき，培地のpHの低下が認められたが，pHの経時的な測定において，Ent BおよびE産生菌の培地が，他のEnt産生菌の場合よりも，pHが特に低下している結果は得られなかった．このように，Awの調節剤の種類の違いによって，Ent産生菌の増殖に及ぼす効果が多少異なることが認められた．

Ent産生に及ぼす蔗糖の影響については，塩化ナトリウムでAwを調節した培地で認められた[7]と同様に，Ent A，DおよびE産生に比較してEnt BおよびC産生が，著しく抑制されることが認められた．このことは，塩化ナトリウムや蔗糖でみられるEnt BおよびC産生の抑制は，Aw調節剤とした化合物そのものの作用によるものではなく，Awの低下によることを示唆している．そしてEnt型の違いによる，Ent産生におけるAwの効果の差は，そのEnt産生機構において，Awの感受性が異なることによるものではないかと考えられる．

一方，蔗糖添加の培地を用いた場合，黄色ブ菌が蔗糖を代謝し，酸を産生するために，培地のpHが著しく低下することが認められる．近藤および勝野[10]はEnt Bの産生がpHの低下によって抑制されることを報告しており，蔗糖の分解による培地のpHの低下がEnt B

およびC産生に影響していることも考慮する必要があろう．黄色ブ菌は蔗糖を分解するため，培養後の培地のAw値に，どのように影響するのかを明らかにする目的で，72時間培養した各 Ent 産生菌の培養上清の Aw を測定した．その結果は，各蔗糖濃度の培地において，菌接種前の培地の Aw 値と同じであり，ブ菌の代謝による Aw 値の変化は認められなかった．

Ent 産生が蔗糖を添加しても，ほとんどEnt産生が抑制されないEnt A，DおよびE型のグループと抑制されるEnt BおよびC型のグループに分けることができた．前者の代表としてEnt A，後者の代表として Ent Bの両 Ent 産生菌の増殖，Ent 産生および培地の pH を経時的に検討した結果を Fig. 3 に示した．この図から，各培地での Ent AおよびB産生菌の増殖，Ent 産生および pH の変化の3つの要因の関連を比較してみることができる．図に示してはないが，Ent C，DおよびE産生菌についても同様の検討を行なった．その結果は，それぞれの代表の Ent 産生菌でみられるパターンと同様であった．

以上のように，Aw の調節剤の種類によって，Aw の効果以外の作用も考慮しなければならないが，塩化ナトリウムおよび蔗糖で Aw を調節した培地での，Ent BおよびC産生が，Ent A，DおよびE産生に比して，著しく影響を受け，Ent 産生の抑制が認められた．このことは，やはりこれまでの著者らの成績[11]にみられるように，自然界の Ent 産生ブ菌の分布においてEnt 型の片寄りが認められないにもかかわらず，ブ菌食中毒から分離されるブ菌の産生は，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．

今後，実験的に Aw を調節した食品を調製し，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，ブ菌食中毒の予防対策の一助にしたい．

結　論

ブ菌の増殖に及ぼす蔗糖の影響を検討した結果，5～10%蔗糖濃度のとき，ブ菌の増殖が抑制され，特に Ent BおよびE産生菌の抑制が著明であった．蔗糖を添加しない BHI 培地での各型の Ent 産生菌のGTは，それぞれ43分，32分，36分，40分および45分である．40%蔗糖添加の培地（Aw：0.94）での Ent 産生菌のGTは，それぞれ56分，33分，22分，35分および30分であり，Ent A産生菌のGTのみが対照培地でのGTより延長することが認められた．Ent A以外の Ent 産生菌のGTは，蔗糖濃度が高くなっても，対照培地のGTと同じか，それよりも短かかった．

Ent A～E産生に及ぼす蔗糖の影響を検討した．その結果，対照培地で24時間培養した後の Ent A～E産生量は，それぞれ10，256，256，1，1.6μg/ml であった．

蔗糖を40%含有する培地での Ent A～E 産生量は，それぞれ 1，0.1，1，0.1，0.4μg/ml であった．このように Ent BとC産生が，他の Ent A，DおよびE産生に比較して，蔗糖の添加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 7.8）に蔗糖を添加すると pH が低下し，40%蔗糖を含有する BHI 培地の pH は7.00であった．5～40%蔗糖含有する培地で8～24時間培養すると，pH は著しく低下することが認められた．さらに培養を継続し，72時間後の pH は 4.8～5.4 であり，蔗糖濃度の違いによる pH 変化の差が認められなかった．これに対し，対照培地の pH 変化は培養8～12時間後に，pH の低下がみられ，さらに培養し続けると，pH は上昇し，72時間培養後の pH は 8.6～8.8 であった．

（本研究の概要は第36回，日本食品衛生学会，昭和53年12月で発表した．）

文　献

1) Genigeorgris, C. and Sadler, W.W.: *J. Bacteriol.*, **92**, 1383, 1966
2) McLean, R. A., Lilly, H. D., and Alford, J. A.: *J. Bacteriol.*, **95**, 1207, 1968
3) Troller, J. A.: *Appl. Microbiol.*, **21**, 435, 1971
4) Troller, J. A.: *Appl. Microbiol.*, **24**, 440, 1972
5) Tompkin, R. B., Ambrosino, J. M., and Stozek, S. K.: *Appl. Microbiol.*, **26**, 833, 1973
6) Troller, J. A. and Stinson, J. V.: *J. Food Science*, **40**, 802, 1975
7) 五十嵐英夫，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，寺山武，坂井千三：東京衛研年報，**29**-1，6，1978
8) Donnelly, C. B., Gelchrist, J. E., Peeler, J. T., and Campbell, J. E.: *Appl. Microbiol.*, **32**, 21, 1976
9) Yamada, S., Igarashi, H., and Terayama, T.: *Microbiol. Immunol.*, **12**, 675, 1977
10) 近藤雅臣，勝野真吾：日細誌，**29**，323，1974
11) 寺山　武，五十嵐英夫，潮田　弘，善養寺　浩：食衛誌，**13**，549，1972

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 117-122, 1979

牛乳および母乳中の残留農薬濃度の年別推移（1971～1978）

山岸達典*, 宮崎奉之*, 堀井昭三*, 金子誠二*

Yearly Shift of Residual Amounts of Organochlorine Pesticides in Cow's Milk and Mother's Milk in Tokyo (1971-1978)

TATSUNORI YAMAGISHI*, TOMOYUKI MIYAZAKI*, SHOZO HORII* and SEIJI KANEKO*

A total of 440 specimens, consisting of 290 raw milk from 8 milk plants and 150 mother's milk from 6 maternity hospitals in Tokyo, was collected at regular intervals during the period from March 1971 through December 1978, and subjected for the presence of residual organochlorine pesticides. The residual amounts detected on whole milk basis from raw milk showed gradual decline in the last 8 years, i. e., on total BHC, the amount was declined from 0.009 to 0.0023ppm; on total DDT, 0.0016 to 0.0009ppm; and on dieldrin, 0.0009 to 0.0003ppm. In mother's milk, however, the decline of residual amounts on fat basis was slightly slower than that of on cow's milk. Namely, in the same period, the amount of total BHC was declined from 2.51 to 1.09ppm, and of total DDT from 3.034 to 0.605ppm, while dieldrin from 0.827 to 0.001ppm. In other words, it is indicating that the period required for their 50% reduction in mother's milk was twice as long as that of required in cow's milk.

Keywords : raw milk, mother's milk, residual organochlorine pesticides, BHC, DDT, dieldrin

緒　言

わが国で，食品の有機塩素系農薬汚染が上田ら[1]により初めて報告されて以来，環境[2]，食品[3]および人体[4]の農薬汚染の実態[5]が次第に明らかにされてきた．なかでも，牛乳[6,7]，母乳[8]への農薬移行が大きく社会問題にまで発展したことは記憶に新しい．とりわけ，母乳中のβ-BHC 濃度が欧米諸国のそれと比較して明らかに高い[9]という実情があったため，母子衛生上の安全性が危惧[8]された．これが契機となり，わが国では1971年にBHC, DDT などの農薬の生産中止，使用禁止などの規制措置[10]がとられた．しかし，自然環境中での有機塩素系農薬の残留性が極めて高いといわれている点から，著者らは，食品の農薬汚染の指標として牛乳を，また人体の農薬汚染の指標として母乳をとり上げ，それらの残留濃度の年次別推移のモニタリングを実施している．今回は1971年から1978年までの過去8年間の牛乳および母乳中の残留濃度の推移をまとめ，若干の知見を得たので報告する．

材料および方法

1. **材料**　牛乳：試料は1972年5月から1978年12月までの期間に，都内の牛乳工場から毎年6回または12回にわたって採取した原料牛乳，計290例を対象にした．なお，都内の原料牛乳の工場は8社（G社，KO社，KU社，MI社，MO社，S社，U社，Z社）で，これら原料牛乳の主な産地は東京近県の埼玉，千葉，茨城，群馬などであった．

母乳：試料は1971年3月から1978年11月までの期間で，杉並区のN産院，葛飾区のK産院および都立のA産院，S産院，TA産院，TV産院で出産した産婦から毎年1回または2回，出産後2週間以内の母乳を対象に計150例を採取した．母乳の採取に当っては，*n*-ヘキサンで洗浄後，乾燥，滅菌した容器を用いた．また，採取した母乳は密栓後，ドライアイスをつめたアイスボックスを用いて運搬した．なお，母乳は採取当日，ゲルベル法で脂肪含量を測定し，残りの試料は分析を行なうまで−20°で凍結保存した．

2. **検査方法**　有機塩素系農薬の測定はAOAC法[11]に準じて実施した．

結果および考察

牛乳，母乳中に残留する農薬濃度の年次別推移を観察するにあたり，予め残留濃度をどのような単位で表わすかを検討した．すなわち，母乳の場合は，対象とする試料が個人別であるため，試料中の脂肪含量が0.43～6.8%（平均2.8±1.5%）と広くバラついていること，ま

* 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

た，同一個体より得た試料であっても，採取時により脂肪量が変化し，全乳中に含まれる農薬量も大きく変動[12]するといわれている点などから，母乳中の残留農薬濃度は脂肪あたりの濃度で示すことにした．一方，牛乳の場合は，個々の乳牛から集め均質化された試料であるため，乳脂肪の含量は3.0～4.1%（平均3.4±0.2%）とほぼ一定の値を示したこと，また全乳あたりの濃度で表わされていることが多く，他の報告例と比較することが容易であるという点から，牛乳では全乳あたりのppmで示すことにした．

1. 牛乳中の残留農薬濃度の年次別変化 牛乳中の残留濃度を年次別にみると，本調査の開始時にあたる1972年の牛乳中の total BHC, total DDT および dieldrin の残留濃度は，Table 1 に掲げたごとく，平均値がそれぞれ 0.009ppm, 0.0024ppm, 0.0009ppm であった．これらは年ごとに低下し，1978年には total BHC 0.0023 ppm, total DDT 0.0016ppm, dieldrin 0.0003ppm となり，モニタリング開始時のそれぞれ約 1/4, 1/1.5, 1/3までに低下した．なかでも γ-BHC の残留濃度は，1974年以降急速な減少を示し，現時点では検出限界以下まで低下した．なお調査当初は δ-BHCおよび *p, p'*-DDD が検出されたがその後は全く検出されていない．

一方，BHC 中で各異性体が占める割合を比較してみると，本調査の開始時における α-BHC, β-BHC, γ-BHC および δ-BHC の比率がそれぞれ 30：52：16：2 の割合であったのが，1978 年には α-BHC と β-BHC

Table 1. Residual Level of Organochlorine Pesticides in Cow's Milk
(ppm on whole milk basis)

Year	No.	Item	α-BHC	β-BHC	γ-BHC	T-BHC	*p, p'*-DDE	*p, p'*-DDT	T-DDT	dieldrin
1972	41	range	0.001	0.001	tr	0.004	tr	nd	nd	nd
			～0.010	～0.014	～0.005	～0.039	～0.007	～0.003	～0.007	～0.003
		mean	0.0027	0.0047	0.0014	0.0090	0.0013	0.0009	0.0024	0.0009
		S.D.	0.0022	0.0048	0.0010	0.0067	0.0014	0	0.0017	0.0010
1973	65	range	0.001	tr	tr	0.002	tr	nd	nd	nd
			～0.004	～0.016	～0.005	～0.022	～0.004	～0.001	～0.005	～0.011
		mean	0.0023	0.0041	0.0015	0.0080	0.0015	0.0006	0.0021	0.0022
		S.D.	0.0010	0.0032	0.0010	0.0042	0.0010	0	0.0014	0.0030
1974	59	range	0.001	tr	tr	0.001	tr	nd	nd	nd
			～0.005	～0.009	～0.001	～0.013	～0.002	～0.001	～0.004	～0.007
		mean	0.0023	0.0035	0.0006	0.0064	0.0014	0.0005	0.0019	0.0013
		S.D.	0.0010	0.0020	0	0.0022	0	0	0.0010	0.0020
1975	35	range	tr	0.001	tr	0.001	0.001	nd	nd	nd
			～0.007	～0.006	～0.001	～0.014	～0.002	～0.001	～0.003	～0.002
		mean	0.0019	0.0035	0.0006	0.0061	0.0011	0.0002	0.0013	0.0004
		S.D.	0.0017	0.0017	0	0.0032	0	0	0	0.0010
1976	30	range	tr	tr	tr	0.002	tr	nd	nd	nd
			～0.014	～0.004	～0.001	～0.015	～0.002	～0.001	～0.002	～0.003
		mean	0.0028	0.0024	0.0001	0.0053	0.0009	0.0003	0.0012	0.0008
		S.D.	0.0035	0.0010	0	0.0036	0	0	0	0.0010
1977	30	range	tr	0.001	tr	0.002	tr	tr	nd	nd
			～0.004	～0.010	～0.001	～0.013	～0.004	～0.001	～0.004	～0.006
		mean	0.0017	0.0034	0.0001	0.0052	0.0014	0.0004	0.0018	0.0016
		S.D.	0.0010	0.0020	0	0.0024	0.0010	0	0.0010	0.0014
1978	30	range	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr
			～0.003	～0.005		～0.007	～0.001	～0.034	～0.034	～0.002
		mean	0.0009	0.0014		0.0023	0.0004	0.0012	0.0016	0.0003
		S.D.	0.0010	0.0014		0.0017	0	0.0061	0.0061	0

Keys for abbreviation, T-BHC＝total BHC, T-DDT＝total DDT, tr＝trace,
nd＝not detected, S.D. ＝Standard Deviation

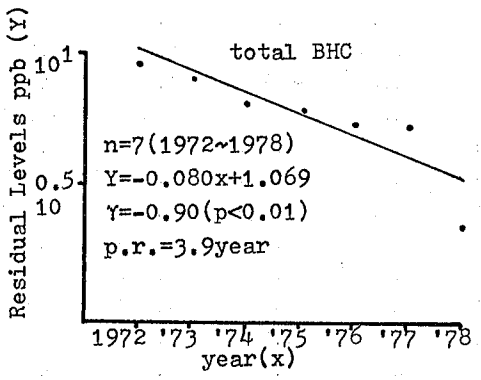
の比率が36:64となった.

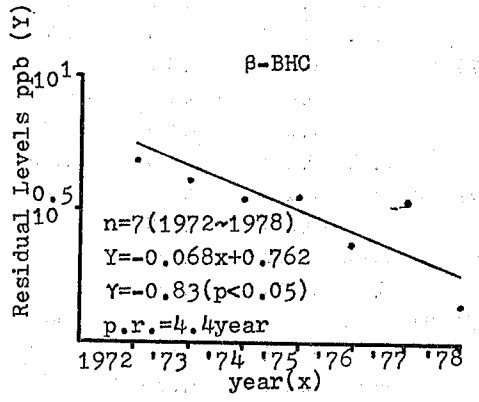
次に，牛乳中の残留農薬濃度と経過年数との関係[13]についてみると，牛乳中の γ-BHC, β-BHC および total BHC の残留濃度は，各年次の平均値 (ppb) を対数に変換した値(Y)と経過年数(X)との間に相互に密接な関係を示し，それらの相関係数 (r) は，γ-BHC が−0.93 ($p<0.01$)，β-BHC が−0.83($p<0.05$)，total BHC が−0.89 ($p<0.01$) であった．したがって，これより回帰直線を求め，γ-BHC, β-BHC および total BHC が1/2に減少するに要した期間を仮に半減期として表わすと，Fig. 1 に示すごとく，γ-BHC が1.1年，β-BHC が4.4年，total BHC で3.7年を要したことになる.

一方，牛乳中の DDT や dieldrin の残留濃度は経年的に減少しているとはいえ，各年次の平均値にバラツキが大きい．これらの要因には，乳牛へ給与される飼料が大きく関与しているものと考える．つまり，大豆粕，ビートパルプ，トウモロコシなどの配合飼料の原料の多くは外国産であり，DDT 系農薬の汚染が高い[5]こと，他方，dieldrin 剤が国内で林業種苗などに現在も一部使用されており，土壌や牧草のイタリアングラスからdieldrinが検出されることなど，外国産飼料の DDT 系農薬汚染と国内産飼料の dieldrin 系汚染に由来する移行残留がその大きな要因となっているものと推察される.

2. 母乳中の残留農薬濃度の年次別変化　母乳中の残留濃度を年次別にみると，調査当初における1971年の total BHC, total DDT および dieldrin の残留濃度は Table 2 に示すごとく，fat basis で total BHC 2.510 ppm, total DDT 3.034ppm, dieldrin 0.827ppm を示した．しかし，1974年以降，それらは経年的に漸減し，1978年には total BHC 1.391ppm, total DDT 0.605 ppm, dieldrin 0.001ppm までそれぞれ低下した．なかでも殺虫剤の主成分である γ-BHC の残留量は，母乳中から消失する速度が早く，1977年以降 γ-BHC を検出していない.

また，p,p'-DDT の残留濃度は γ-BHC の場合と比べて消失する速度が緩慢であるが，1978年のレベルは調査当初と比較すると明らかに低下 ($p<0.01$) した．なお，現在の母乳中の total DDT の残留量は諸外国のそ





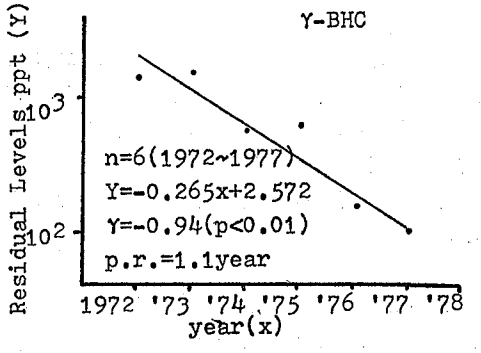


Fig. 1. Yearly Shift on Residual Level of Organochlorine Pesticides in Raw Milk (whole basis)

p. r. : The period required for 50% reduction

Table 2. Residual Level of Organochlorine Pesticides in Mother's Milk (ppm on fat milk basis)

Year	No.	Item	α-BHC	β-BHC	γ-BHC	T-BHC	*p, p'*-DDE	*p, p'*-DDT	T-DDT	dieldrin
1971	30	range	nd	tr	nd	0.230	tr	tr	0.374	tr
			~0.361	~6.773	~1.991	~8.469	~7.041	~1.562	~8.872	~4.918
		mean	0.075	2.111	0.324	2.510	2.230	0.780	3.034	0.827
		S.D.	0.077	1.446	0.474	1.611	1.500	0.398	1.754	1.109
1972	10	range	0.024	0.545	0.018	0.649	0.430	0.210	0.607	0.062
			~0.062	~2.985	~0.139	~3.133	~4.366	~1.423	~5.400	~0.279
		mean	0.050	1.817	0.055	1.922	1.514	0.628	2.165	0.166
		S.D.	0.012	0.857	0.039	0.867	1.214	0.341	1.509	0.072
1973	10	range	0.026	0.449	0.015	0.564	0.896	0.204	1.114	0.152
			~0.139	~9.508	~0.175	~9.627	~6.826	~1.180	~7.726	~0.789
		mean	0.078	2.666	0.099	2.843	3.310	0.703	4.043	0.331
		S.D.	0.034	2.571	0.060	2.558	1.617	0.272	1.771	0.183
1974	30	range	tr	0.360	0.009	0.438	0.543	0.220	0.839	nd
			~0.177	~5.745	~1.025	~6.005	~4.895	~1.783	~6.229	~0.484
		mean	0.087	2.009	0.070	2.164	1.907	0.654	2.562	0.110
		S.D.	0.046	1.276	0.180	1.308	1.118	0.362	1.393	0.121
1975	20	range	tr	0.347	tr	0.347	0.287	0.088	0.385	0.059
			~0.063	~5.900	~0.290	~5.954	~3.423	~0.520	~3.671	~0.199
		mean	0.029	1.822	0.028	1.878	1.248	0.308	1.557	0.101
		S.D.	0.016	1.393	0.062	1.401	0.776	0.104	0.815	0.041
1976	20	range	0.009	0.420	nd	0.476	0.278	0.094	0.434	0.040
			~0.083	~6.955	~0.122	~7.001	~2.134	~0.743	~2.832	~0.250
		mean	0.049	1.488	0.013	1.551	0.955	0.358	1.313	0.128
		S.D.	0.020	1.440	0.026	1.440	0.560	0.183	0.712	0.063
1977	10	range	0.110	0.918	nd	1.028	0.923	0.209	1.179	0.018
			~0.305	~4.473		~4.631	~8.717	~0.625	~9.050	~0.058
		mean	0.157	1.653		1.810	2.803	0.341	3.134	0.037
		S.D.	0.055	0.976		0.980	2.335	0.112	2.360	0.011
1978	20	range	nd	tr	nd	0.001	0.013	tr	0.013	nd
			~0.102	~6.822		~6.831	~1.057	~0.332	~1.389	~0.022
		mean	0.016	1.375		1.391	0.434	0.168	0.605	0.001
		S.D.	0.022	1.743		1.746	0.345	0.108	0.427	0.001

Keys for abbreviation, T-BHC=total BHC, T-DDT=total DDT, tr=trace, nd=not detected, S.D. =Standard Deviation

れ[14]と比べると，ドイツ (1970, 3.8ppm)，カナダ，(1972, 2.4ppm)，スウェーデン (1977, 1.8ppm) よりも低い値である．次に，母乳中の残留農薬濃度と経過年数との関係についてみると，Fig. 2 に示すごとく母乳中の γ-BHC，β-BHC，*p, p'*-DDT および dieldrin の残留濃度が経過年数との間にそれぞれ密接な関係を示し，それらの相関係数は γ-BHC −0.90 ($p<0.05$)，β-BHC −0.89 ($p<0.05$)，*p, p'*-DDT −0.90 ($p<0.01$)，dieldrin −0.77 ($p<0.1$) を示した．また牛乳の場合と同様に残留濃度が 1/2 に減少するに要した期間を求めたところ，γ-BHC が1.3年，β-BHC が8.1年，*p, p'*-DDT が 3.5年，dieldrin が 2.3年となった．なかでも，母乳中の β-BHC の半減に要する期間は上述の牛乳中のそれと比べると約2倍の期間を要したことになる．

以上，母乳中の残留農薬量は減少の一途をたどっているとはいえ，牛乳中のそれと比較するとなお楽観を許さぬものがある．これは，外国から輸入される食肉，魚介

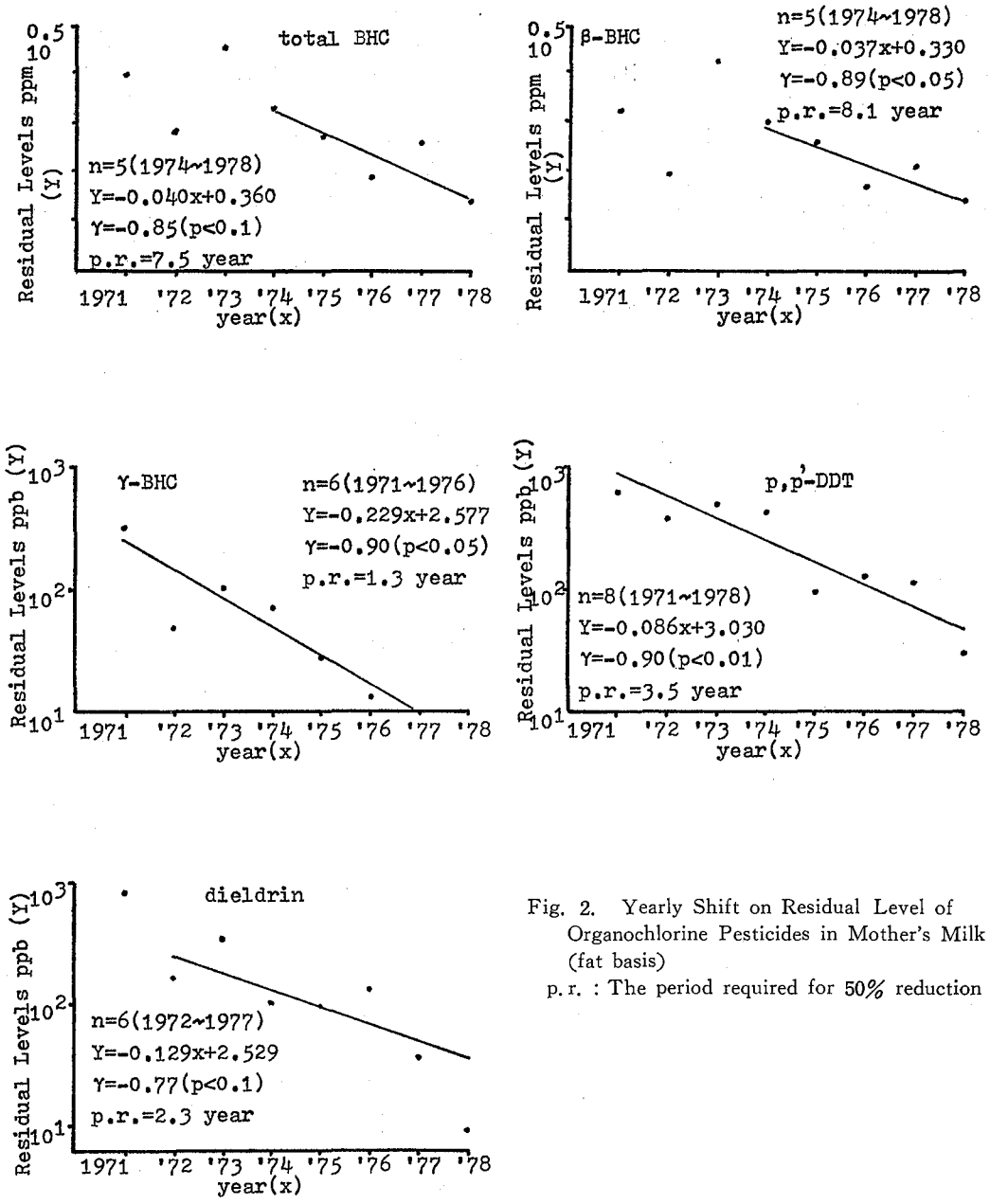


Fig. 2. Yearly Shift on Residual Level of Organochlorine Pesticides in Mother's Milk (fat basis)
p. r. : The period required for 50% reduction

類などの多種類の食品中から β-BHC, *p, p'*-DDE が今日もなお検出されている事実と相まって今後も人体への農薬汚染が食物を通じて継続して起こる可能性があることを示唆し, モニタリングを続ける必要があることを示すものである.

謝辞 本調査にご協力をいただいた東京都衛生局獣医衛生課牛乳検査室および食品監視課機動班ならびに母子衛生課の各位に深謝いたします.

文 献

1) Uyeta, M., Taue, S. and Nishimoto, T.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 11, 256, 1970
2) 立川 涼：食衛誌, 11, 1, 1970
3) 金沢 純：農技研報告, C25, 109, 1971
4) 道口正雄, 牛尾房雄, 庭山邦子, 西田甲子：東京衛

研年報, 22, 131, 1970
5) 山岸達典：臨床栄養, 51, 1, 33, 1977
6) 山岸達典, 堀井昭三, 境野米子, 竹葉和江, 森本キミ, 春田三佐夫：東京衛研年報, 25, 197, 1974
7) 厚生省乳肉食品農薬汚染研究班：食衛誌, 13, 299, 1972
8) 厚生省母乳農薬汚染研究班：食衛誌, 13, 438, 1972
9) 西本孝男, 上田雅彦, 田植　栄：医学のあゆみ, 73, 275, 1970
10) 厚生省環境衛生局長通達：環乳第60号, 昭和46年6月15日, 1972
11) Horwitz, W.: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 11th Ed., 475, 1970, A. O. A. C., Washington, DC
12) Newton, K. G. and Greene, N. C.: *Pestic. Monit. J.*, 6, 4, 1972
13) 桐谷圭治：科学, 44, 434, 1974
14) Musial, C. J. and Hutzinger, O.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 258, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 123-126, 1979

1, 3, 5-Trichloro-2-(4-Nitrophenoxy)Benzene (CNP) の東京湾産アサリ，底質，海水中での残留濃度の推移

山岸達典[*1]，秋山和幸[*2]，金子誠二[*1]，堀井昭三[*1]
宮崎奉之[*1]，森田昌敏[**]

Residual Levels of 1, 3, 5-Trichloro-2-(4-Nitrophenoxy)Benzene (CNP) in Short-necked Clam, Sand and Sea Water at Tokyo Bay

TATSUNORI YAMAGISHI[*1], KAZUYUKI AKIYAMA[*2], SEIJI KANEKO[*1], SHOZO HORII[*1], TOMOYUKI MIYAZAKI[*1] and MASATOSHI MORITA[**]

Monitoring of residual 1, 3, 5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (CNP) in short-necked clam, sand, sea water collected at 5 different sampling stations in Tokyo Bay was conducted between May and August in 1977 and 1978. At each sampling station, 1kg of short-necked clam, 1kg of sand and 3*l* of sea water were sampled at one month interval. In every year, there was a monthly shift on the levels of residual CNP in short-necked clam, with a peak in May or June. The highest in the consecutive 2 years of the survey was 2,900 ppb, which recorded on short-necked clam obtained at the station C in May 1977. The residual amounts in the shellfish declined quickly, with a half-life (reduced by half) of 33.8 ± 8.4 days in average. There was positive correlation between the residual amounts in short-necked clam and that of the sea water, indicating that the contamination of shellfish comes from the polluted sea water originally derived from the effluent of paddy rice field where considerable amounts of the herbicide are used once a year between April and June.

Keywords : monitoring, CNP, short-necked clam, sand, sea water, contamination

緒　言

過去数年間，著者らは食品中の化学汚染物質のモニタリングを実施している．その1つは，1969年以降実施している市販牛乳を対象とする残留有機塩素系農薬のモニタリング[1]である．他の1つは，1975年より実施しているもので，東京湾の魚介類を対象とする PCB，HCB，および微量元素[2]などのモニタリングである．このような定期的なモニタリングが契機となり，著者らはさきに除草剤の主成分である 1, 3, 5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (CNP) が東京湾産ムラサキイガイ中に残留していることを発見し，ECD-GC, GC-MS, IR および UV-Spectra によりこれを確認，報告した[3]．

今回は，東京湾の CNP 汚染の実態を把握するために，湾内産のアサリ，底質および海水を定期的に採取し，それらに残留する CNP 濃度の経月変化を観察し，若干の知見を得たので報告する．

材料および方法

1. **試料**　対象としたアサリは，大井京浜島(A)，三枚洲(B)，千葉中央港(C)，木更津人工島(D)および富津公園(E)の5ケ所の観察地点 (Fig. 1) より，1977年と1978年の5月から8月までの期間に，アサリの大きさを定めずに約 1kg ずつ毎月1回採取した．同時に底質約 1kg と海水約 3*l* を各観察地点で採取した (1977年は底質を，1978年は海水を対象とした)．

2. **抽出方法**　(1)アサリはむき身にして，ホモゲナイズしたもの 30g を n-hexane—methanol 混合液(4：1) 200m*l* 中に室温で一昼夜浸漬し，十分に振とうし，n-hexane 層を遠心分離 (3,000r. p. m., 15分) した．この n-hexane 層を 30m*l* の2％食塩溶液で1回，30m*l* の蒸留水で2回洗浄し，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，Kuderna-Danish 濃縮装置により濃縮乾固 (50°) した．次いで，1N-KOH—methanol 溶液 50m*l* を加え，90°，1時間ケン化した．ケン化溶液が約50°の時に50m*l*

*1 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
*2 同環境保健部環境衛生研究科
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 国立公害研究所

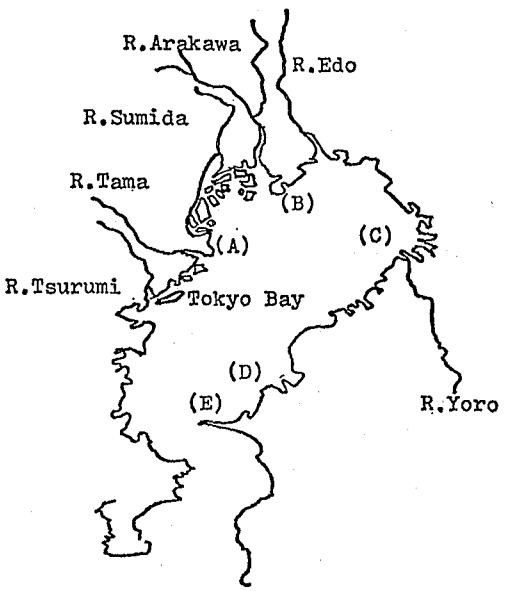


Fig. 1. Sampling Stations in Tokyo Bay

の n-hexane を加え振とうした後，n-hexane 層を得た．この n-hexane 層を 30m*l* の2％食塩溶液で1回，30 m*l* の蒸留水で2回洗浄し，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，Kuderna-Danish 濃縮装置により約 5m*l* に濃縮し，粗抽出液とした．この粗抽出液は Florisil column により分離精製した．すなわち，Florisil (PR grade, 60/80 mesh, 650° で一昼夜活性化) を，内径 23mmのガラスカラムに高さ 10cm になるように，n-hexane の湿式法で充てんし，初流の n-haxane 分画 150m*l* は捨て，20% ether—hexane 分画 200m*l* を集め，Kuderna-Danish 濃縮装置で 2m*l* に濃縮したものを分析用の試料とした．(2)底質は 50g，海水は 1.5*l* をとり，それぞれ n-hexane 200m*l* を加え 15 分間振とうした後，n-hexane 層を分取した．さらに残留物は n-hexane 200m*l* で2回抽出を繰り返し，n-hexane 層を集め，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，Kuderna-Danish 濃縮装置で濃縮乾固 (50°) し，1N-KOH—methanol 50m*l* を加えてケン化 (90°，1時間) した．その後の操作はアサリと同様の方法で実施し，分析用の試料とした．

3. 測定方法および装置 分析用の試料をガスクロマトグラフ (ECD, ^{63}Ni) に注入し，CNP の定量を実施した．ガスクロマトグラフの分離カラムおよび測定条件は下記のごとくとした：2% OV-17(Chromosorb WAN DMCS, 80/100 mesh) 220°, N_2 80m*l*/min; 2% OV-1 (Gaschrom Q, 80/100mesh) 220°, N_2 40m*l*/min; 1.5% QF-1(Anachro-ABS, 80/100 mesh) 220°, N_2 40m*l*/min; column size 3mm×2m.

結　果

1. アサリ中の残留 CNP 濃度の経月変化 1977年に採取したアサリは，観察地点A，B，C，DおよびEのいずれの地点においても，5月または6月に最高値を示し，それ以降，これらの残留濃度は経月的に低下する傾向を示した (Fig. 2)．また，観察地点別のアサリ中の残留 CNP 濃度は，C地点が最も高く 242—2,900ppb (wet basis)，次ぎにB地点が 9—44ppb，A地点が 3—43 ppb，D地点が4—23ppb の値を示し，E地点が最も低く 4—20ppbであった．一方，1978年に採取したアサリ中の残留 CNP 濃度は，前年に比較するといずれの観察地点でも著しく低下していた．すなわち，A地点が trace—21ppb，B地点が trace—24ppb，C地点が trace—18ppb，D地点が trace—15ppb およびE地点が trace—4ppb であった．しかし，5月に採取したアサリ中の残留 CNP 濃度は，前年の調査の場合と同様に，いずれの観察地点においても最も高い値を示すという傾向がみられた．

2. アサリ中に残留する CNP 濃度と経過日数との関係 1977年に採取したアサリ中に残留する CNP 濃度と経過日数との関係について，下記のように数値を変換

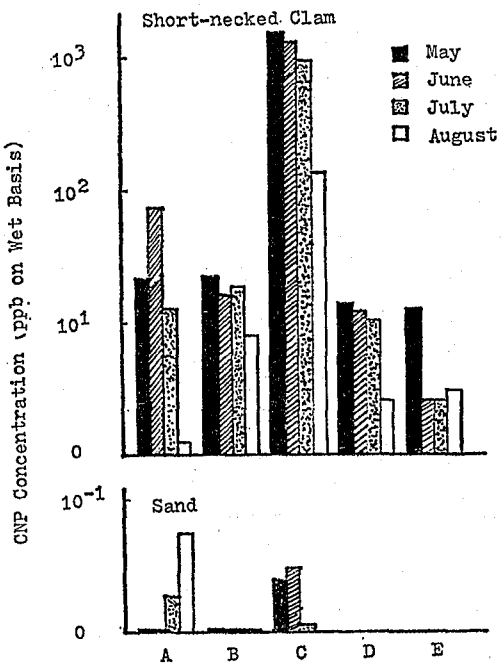


Fig. 2. Seasonal and Regional Variation of CNP Concentrations in Sand and Short-necked Clam (*T. philippinarum*)

して試算したところ，残留濃度と経過日数との間に相互に密接な関係を認めた．すなわち，残留 CNP 濃度(ppb)の値を対数に変換した値と，各観察地点における第1回目のアサリ採取月日を第1日目として算定した経過日数との関係 (Fig. 3) を求めると，各観察地点別の残留 CNP 濃度はほぼ一定に負の勾配で低下し，相関係数が −0.99～−0.77であった．また，仮に残留 CNP 濃度の半減するに要する日数を半減期[4] として言い表わすならば，観察下のアサリ中の残留 CNP 濃度の半減期は，平均33.8±8.4日であった．

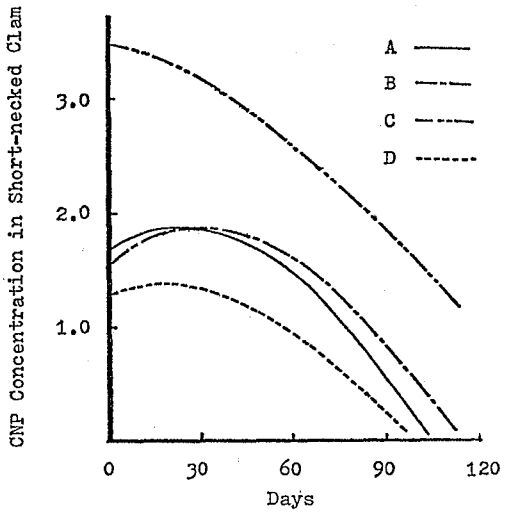


Fig. 3. Variation of CNP Concentration in Short-necked Clam (*T. philippinarum*) during the Sampling

3. 底質中の CNP 濃度の経月変化　1977年に採取した底質中の CNP は観察地点A，BおよびCから trace—1.0ppb で検出し，アサリ中の残留濃度の傾向と同様にC地点が最も高く 1.0ppb であった．しかし，DおよびE地点からは CNP を検出しなかった．これらの残存濃度の経月変化は，C地点でアサリ中の残留濃度のそれとほぼ比例する傾向を示し，5月に最高値をとり，以降漸次減少した．しかし，A地点では7，8月に増加する傾向であった (Fig. 2)．

4. 海水中の CNP 濃度の経月変化　1978年に採取した海水中より CNP を nd—1,900ppt の範囲で検出した．この海水中の濃度は，各観察地点ともに，5月に最も高くB地点で最高値 1,900ppt を検出し，その他の地点では，20～80ppt であった．

5. アサリおよび海水中の CNP 濃度の関係　1978年に採取したアサリと海水中の CNP 濃度の間には，アサリ中の残留濃度 (ppt) と海水中の残存濃度 (ppt×10) を対数に変換したときに，正の相関関係を認めた ($r=0.66$, $p<0.01$)．すなわち，海水中の CNP 濃度が増すに伴って，アサリ中の CNP 濃度が増す傾向を示した (Fig. 4)．

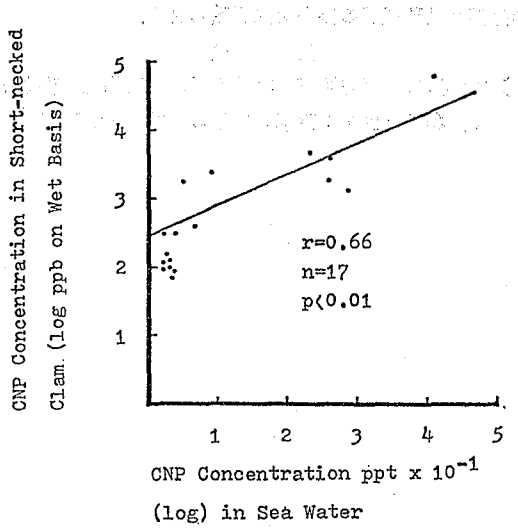


Fig. 4. Relation between CNP Concentration in Short-necked Clam (*T. philippinarum*) and Sea Water

考察および結論

1977年および1978年の5月から8月までの期間に，東京湾内の5ケ所の観察地点で，アサリ，底質，海水を毎月1回採取し，残留 CNP 濃度の調査をしたところ，各観察地点ともに毎年5月または6月に最も高い値を示し，以後，急激に減少する傾向を示した．これらの調査結果は，農業用水路水中の CNP が田植開始時期から約1ケ月後に最も高い残存濃度を示し，以後，急激に減少する傾向を認めたという鈴木ら[5] の北九州での調査結果ならびに，東京湾に接する県下では，CNP を主成分とする除草剤を，田植期の4月上旬から6月下旬までの期間[6] に，毎年1回だけ水田に散布しているという使用実態と一致するものである．以上のことより，東京湾内産アサリの CNP 汚染は，散布土壌から農業用水へ流出した CNP が河川水へ放出され，さらにそれが海水中へ移行し，アサリを汚染したものと推測される．

一方，CNP によるアサリの汚染が，潮干狩の全盛期である初夏に最も高い値を示すという点から，貝類を介してヒトが CNP に汚染される可能性をも示唆してい

る．したがって，環境汚染化学物質の食用動物への移行・残留防止対策を講ずる上で，沿岸に定着性があり，蓄積性化学物質である PCB，農薬などの生物濃縮が観察できるアサリを，海域における環境汚染化学物質の指標生物として，今後もモニタリング活動を継続することが極めて重要であると考える．

謝辞 本調査の試料採取に当たり，東京都衛生局環境衛生部食品監視課の協力を感謝致します．

文　献

1) 山岸達典，堀井昭三，境野米子，竹葉和江，森本キミ，春田三佐夫：東京衛研年報，25，197，1974
2) 堀井昭三，山岸達典，村上　一：東京衛研年報，29-1，170，1978
3) Yamagishi, T., Akiyama, K., Morita, M., Takahashi, R., and Murakami, H. : *J. ENVIRON. SCI. HEALTH*, **B13** (4), 417, 1978
4) 桐谷圭治：科学，44-7，434，1974
5) 鈴木　学，大和康博，秋山　高：日本農芸化学会講演要旨，468，1978
6) 石塚皓造，百武　搏：日本農薬学会誌，2，568，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 127-132, 1979

1, 3, 5-Trichloro-2-(4-Nitrophenoxy)Benzene (CNP) による東京湾産魚貝類の汚染

山岸達典[*1], 秋山和幸[*2], 金子誠二[*1], 堀井昭三[*1]
宮崎奉之[*1], 森田昌敏[**]

Contamination of Fish and Shellfish in Tokyo Bay by 1, 3, 5-Trichloro-2-(4-Nitrophenoxy)Benzene (CNP)

TATSUNORI YAMAGISHI[*1], KAZUYUKI AKIYAMA[*2], SEIJI KANEKO[*1], SHOZO HORII[*1], TOMOYUKI MIYAZAKI[*1] and MASATOSHI MORITA[**]

During the period from August 26 through September 27, 1977 and from August 6 through September 10, 1978, goby, sea bass, short-necked clam and a species of ark shell collected at 12 different sampling stations in Tokyo Bay was investigated for the presence of residual 1, 3, 5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy)benzene (CNP). The highest level found in goby's muscle and liver, and short-necked clam at the sampling station B-1 in 1977 was 360, 91, 400 and 240 ppb, respectively. The correlation coefficient of the residual CNP levels between goby's liver and muscle, goby's liver and short-necked clam, and goby's muscle and short-necked clam was 0.91, 0.99 and 0.94, respectively. These results suggest us that CNP used on a paddy rice field was likely to be a cause of the contamination of local marine biota, since CNP was also detected from a kind of trout which was caught at the river in Tokyo.

Keywords : goby, sea bass, short-necked clam, a species of ark shell, CNP, contamination, a kind of trout

緒　言

昭和40年にわが国で開発された 1, 3, 5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy)benzene (CNP) を主成分とする除草剤は，主に水田の1年生雑草，ノビエ，カヤツリグサなどの発生を防除する目的で，全国各地でほぼ一致した期間，いわゆる稲作の田植時期である4月下旬から6月上旬までの限られた期間に多量に使用されているのが特徴のひとつである．現在，製剤の生産量は年間約50,000 t，原体にして約6,000 t にも達している[1,2]．

このように，わが国特有とも言える本剤の使用実態からみれば，CNP が陸水，海水を汚染し，さらにそれがそこに生息する生物を汚染する恐れがある．一方，CNP に汚染された食用動物を介してヒトが影響を受けるという問題に発展する恐れもあることなどから，本剤の短期間における多量使用には，公衆衛生上等閑視できない問題を包含している．

そこで，著者らは CNP による海産生物の汚染実態を把握する目的で，東京湾内に生息する魚貝類を対象に，それらに残留する CNP 濃度および範囲について調べ，若干の興味ある知見を得たので報告する．

材料および方法

1. 試料　1977年8月26日から9月27日まで，および1978年8月6日から9月10日までの期間に，東京湾沿岸の神奈川県金沢八景から千葉県富津までの区域 (Fig. 1) から得たマハゼ (*Acanthogobius flavimanus*) 22例とアサリ (*Tapes philippinarum*) 10例を対象にした．その他の試料としては，スズキ (*Lateorabrax japonicus*) を東京都の羽田沖，浦安沖などから，サルボウガイ (*Scapharca subcrenata*) を三枚洲からそれぞれ採取した．一方，淡水魚のヤマベ (*Oncorhynchus masou var. ishikawae*) を1978年9月3日に栃木県小山市思川から千葉県野田市江戸川までの4地点で採取した．これらの試料は採取後直ちにドライアイスで凍結し，分析するまで−20°で凍結保存した．

2. 試料の調製　魚類では，魚種と捕獲月日，場所などが同一の場合，これらの魚種を1つの試料(3例以上)

[*1] 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
[*2] 同環境保健部環境衛生研究科
[*] Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
[**] 国立公害研究所

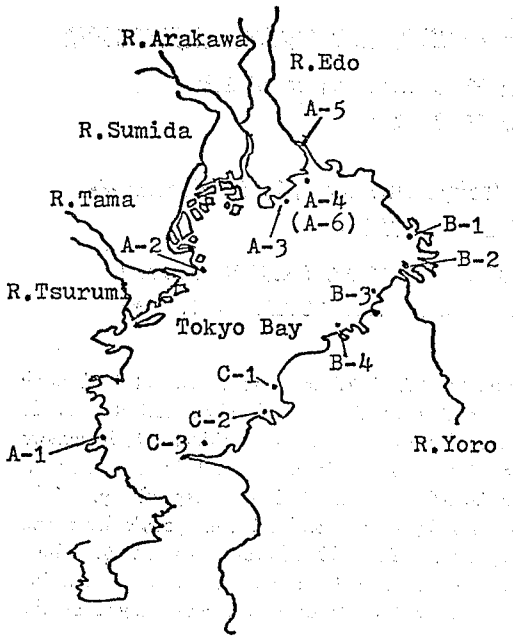


Fig. 1. Sampling Stations in Tokyo Bay

として取扱い，各魚体は水道水で十分に洗浄して開腹した後，背部筋肉と肝臓（一部で内臓全体）を摘出し，それぞれの組織，臓器をプールしてホモゲナイズ（Ultra-turrax）した．なお，スズキの場合は，肝臓，腎臓，心臓などの各臓器を摘出し，上記と同様にそれぞれホモゲナイズした．一方，貝類では，魚類の場合と同様に貝の種類，採取場所などが同一である場合，1つの試料とみなし，むき身（約100g）をそのままプールしてホモゲナイズした．

3. 抽出方法 ホモゲナイズした試料（貝類および魚類の筋肉部では30g，魚類の内臓部では5g）をn-hexane—methanol 混合液（4：1）200m*l* 中に室温で一昼夜浸漬し，十分に振とうし，n-hexane 層を遠心分離（3,000 r.p.m., 15分）して得た．この n-hexane 層は 30m*l* の2％食塩溶液で1回，30m*l* の蒸留水で2回洗浄し，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，Kuderna-Danish 濃縮装置により濃縮乾固（50°）した．次いで，1N-KOH—methanol 溶液 50m*l* を加え，90°，1時間ケン化した．ケン化溶液が約50°の時に 50m*l* の n-hexane を加え振とうした後，n-hexane 層を得た．この n-hexane 層は 30m*l* の2％食塩溶液で1回，30m*l* の蒸留水で2回洗浄し，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，Kuderna-Danish 濃縮装置により約 5m*l* に濃縮した．この粗抽出液は Florisil column により分離精製した．すなわち，Florisil（PR grade, 60/80mesh, 650° で一昼夜活性化）は，内径 23mm のガラスカラムに高さ10cm になるように，n-hexane の湿式法で充てんし，初流の n-hexane 分画 150m*l* は捨て，20% ether—hexane 分画 200m*l* を集め，Kuderna-Danish 濃縮装置で 2m*l* に濃縮したものを分析用の試料とした．

4. 測定方法および装置 分析用の試料をガスクロマトグラフ(ECD, ^{63}Ni)に注入し，CNP の定量を行なった．ガスクロマトグラフの分離カラムおよび測定条件は下記のごとくとした：2% OV-17 (Chromosorb WAN DMCS, 80/100mesh) 220°, N_2 80m*l*/min; 2% OV-1 (Gaschrom Q, 80/100mesh) 220°, N_2 40m*l*/min; 1.5% QF-1 (Anachro-ABS, 80/100mesh) 220°, N_2 40m*l*/min; column size 3mm×2m.

調査結果

1. 魚貝類中の CNP 体内分布 (1)スズキ (Fig. 2) に残留する CNP 濃度の体内分布について調べた結果，脂肪組織，胆のう，腎臓および肝臓中に残留する CNP 濃度は，心臓，筋肉および鰓中のそれらと比較すると高く，1,350～1,660ppb (wet basis) の範囲の値を示した．なお，心臓，筋肉および鰓中の CNP 濃度はそれぞれ 210, 43, 44ppb の値で，上記の臓器および組織中のそれらと比較すると，心臓が約 1/7，筋肉，鰓などが約

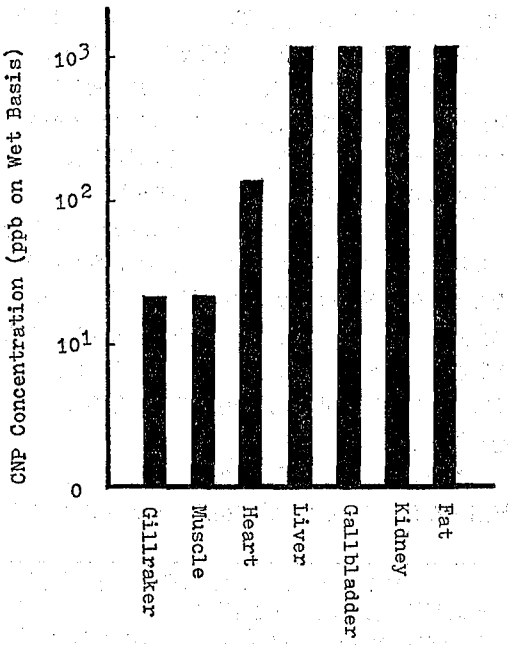


Fig. 2. CNP Concentrations in Tissues of Sea Bass (*L. japonicus*)

Table 1. Comparison of CNP Concentration in Muscle and Viscera of Short-necked Clam (*T. philippinarum*)

Tissues	CNP Concentration (ppb on Wet Basis) n=3	Ratio of Concentration in the Tissues (A/B)
A) Viscera	23.5±1.6	4.7±0.3
B) Muscle	5.0±0.8	

Data for several group are represented by the mean± standard deviation of three analyses on a pooled specimen of thirty shellfish. The concentrations are significantlly different ($p<0.001$) to the T-test.

1/35とそれぞれ低い値を示した．(2)アサリ筋肉部中の残留 CNP 濃度と内臓部中のそれとの関係は，無作為に抽出した30個のアサリを筋肉部と内臓部に分け，それぞれホモゲナイズしたものを試料とし，それらの残留 CNP 濃度を調べた．その結果，Table 1 に示したように，両者の間に有意な差（$p<0.001$）を認め，内臓部中の残留 CNP 濃度が筋肉部中のそれよりも高く約5倍であった．

2. 残留 CNP 濃度と魚貝類の体重との関係 (1)マハゼ：1978年に捕獲したマハゼの体重(g)と残留 CNP 濃度(ppb)を対数に変換した値との関係を求めると，Fig. 3 に示すように，残留 CNP 濃度は魚の体重が増すに伴って高くなる傾向を示した（$r=0.57$, $p<0.01$）．(2)アサリ，サルボウガイ：残留 CNP 濃度と貝のむき身重量との間には，ほとんど関係を認めず，残留 CNP 濃度はほぼ一定の含量を示した (Table 2).

3. 各採取地点別魚貝類の残留 CNP 濃度 (1)マハゼ：1977年に採取したマハゼの筋肉部中残留CNP濃度は，

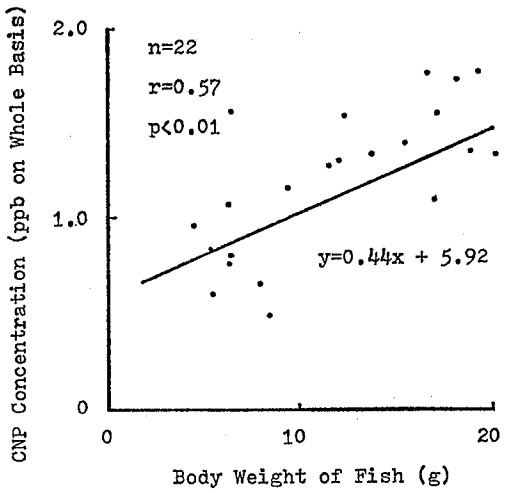


Fig. 3. Relation Between CNP Concentration (ppb) on Whole Basis and Body Weight of Goby (*A. flavimanus*)

採取地点B-1（千葉中央港）付近で採取したものが局地的に最も高く 360ppb を示した (Table 3). しかし，その他の採取地点では 30ppb 以下の値であった．また，このような局地的あるいは偏在的な残留濃度を示す傾向は，肝臓中のそれらにもみられ，同じく採取地点B-1で 91,400ppb の値を示した．なお，各採取地点における肝臓中の残留 CNP 濃度と筋肉中のそれらとの間には，それぞれの残留濃度（ppb）の値を対数に変換すると，相互に密接な関係を示し，高い正の相関関係を認めた（$r=0.91$）．すなわち，筋肉中の CNP 濃度が高くなれば，肝臓中のそれも高くなる傾向を示した (Fig. 4).

Table 2. Relation Between CNP Concentration and Body Weight of Short-necked Clam (*T. philippinarum*) and a Species of Ark Shell (*S. subcrenata*)

Shellfish	Groups	Weight (g) n=3	CNP Concentration (ppb on Wet Basis) n=3
T. philippinarum	Small	0.9±0.1	21.0±1.4
	Medium	1.9±0.2	22.3±1.5
	Large	5.5±0.3	19.6±1.0
S. subcrenata	Small	1.7±0.3	0.65±0.04
	Medium	6.4±0.4	0.63±0.07
	Large	11.4±0.5	0.52±0.02

Data for several group are represented by mean ± standard deviation for three analyses on a pooled specimen of thirty shellfish. The concentrations are not significantly different ($p<0.01$) to the T-test.

Table 3. The Difference of CNP Concentration in Muscle and Liver of Goby (*A. flavimanus*) Caught at Different Sampling Stations

Sampling Stations	CNP Concentration (ppb on Wet Basis)			
	1977		1978	
	Muscle	Liver	Muscle	Liver
A—1	4	ND*	0.2	8.3
A—2	7	950	0.1	4.0
A—3	7	6,880	0.1	6.5
A—4	8	2,920	0.3	2.6
A—5	4	408	NT**	NT**
A—6	1	59	0.3	17.9
B—1	360	91,400	0.1	11.7
B—2	17	80,000	0.2	22.1
B—3	30	4,280	0.1	14.2
C—1	6	1,080	1.3	13.2
C—2	10	814	0.3	63.3
C—3	3	809	NT**	NT**

* ND : Not Detected ** NT : Not Tested

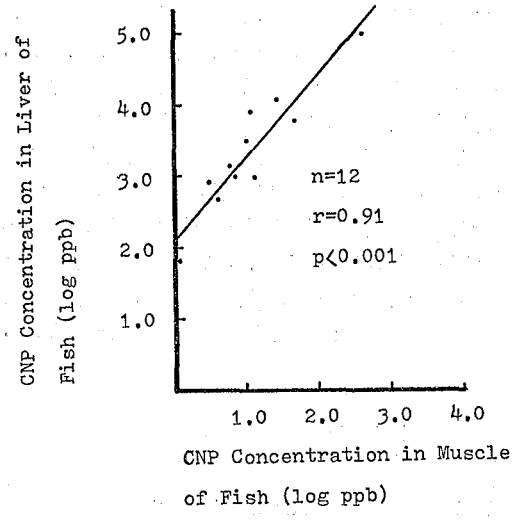


Fig. 4. Correlation of CNP Concentrations Observed in Liver and Muscle of Goby (*A. flavimanus*)

一方，1978年に採取したマハゼの筋肉中の残留 CNP 濃度は，採取地点C－1（木更津人工島海岸）付近で採取したものが最も高く 1.3ppb であった．その他の地点では 0.1～0.3ppb の値であった．また，肝臓中では採取地点C－2（小櫃川）付近で採取したものが高く，63.3 ppb であった．しかし，他の採取地点ではいずれも低い値を示した．すなわち，1978年の残留 CNP 濃度は，Table 3 より明らかなように前年に調査した同一地点におけるそれぞれの値と比べると，各採取地点ともに著しく減少した．(2)アサリ：1977年に採取したアサリ中の残留 CNP 濃度は，マハゼにみられた局地的な汚染傾向と同様に採取地点B－1が最も高く，約 240ppb であった．しかし，その他の地点では約 20ppb 以下の値であった．一方，1978年の同一採取地点における残留 CNP 濃度は，前年のそれらとを比較するといずれの採取地点においても低く，約 1ppb 以下の値であった(Table 4)．

4. **アサリとマハゼの残留 CNP 濃度の関係** 1977年

Table 4. CNP Concentrations in Short-necked Clam (*T. philippinarum*) Caught at Different Sampling Stations

Sampling Stations	CNP Concentrations (ppb on Wet Basis)	
	1977	1978
A—2	21	1.27
A—6	15	0.75
B—1	242	NT*
C—2	2	0.12
C—3	4	0.18

* NT : Not Tested

Table 5. Relation Between CNP Concentration of Goby (*A. flavimanus*) and Short-necked Clam (*T. philippinarum*)

Sampling Stations	CNP Concentration (log ppb on Wet Basis)		
	Shellfish	Fish	
		Muscle	Liver
A—2	1.32	0.85	2.98
A—6	1.17	0.60	2.61
B—1	2.38	2.56	4.96
C—2	0.30	1.00	2.91
C—3	0.60	ND*	1.77

* ND : Not Detected

におけるアサリの採取地点はA−2，A−6，B−1，C−2およびC−3の5ケ所であり，これらのアサリ中に残留するCNP濃度と，それぞれ同一地点で採取したマハゼの筋肉および肝臓中の残留CNP濃度との間には，相互に密接な関係があり，正の相関関係を示した(Table 5)．すなわち，残留濃度（ppb）を対数に変換すると，アサリとマハゼの肝臓との間では $r=0.99$ であり，アサリとマハゼの筋肉との間では $r=0.94$ であった．

5. ヤマベ中の残留 CNP 濃度 1978年9月3日に栃木県小山市および野木市の思川，茨城県古河市の利根川，千葉県野田市の江戸川までの東京湾に流入する一河川系の4地点でヤマベを捕獲し，残留CNP濃度を測定した．その結果，1.1～3.9ppb（whole basis）の濃度でCNPを検出した．

考　察

従来，CNPが環境を汚染する可能性は極めて低いと考えられていた．つまり，鍬塚[3]，山田ら[4]の報告によると，湛水土壌，畑土壌のいずれの条件下においても散布されたCNPは速やかに消失し，その半減期は短く，約7日～10日であるとされている．すなわち，CNPは散布土壌中で構造上のニトロ基が，微生物により還元されて主に除草効果のないアミノ誘導体を生成し，また，その水溶液は太陽光線下で速やかに分解されて，フェノール類などの中間分解生成物になるといわれている．一方，CNPは水に対して難溶性で0.4ppmを限度として溶解するにすぎないといわれている．

しかし，今回の調査で明らかになった魚貝類中に残留するCNPは，下記の観点から水系汚染に由来するものと推測される．すなわち，(1)さきにわれわれが調査した東京湾における魚貝類，海水および底質中のCNP濃度が5月または6月に最も高い値を示し[5]，この時期がCNPの水田への使用時期と一致していること．(2)汽水である河口付近に生息するマハゼ，スズキなどの肝臓中の残留濃度が高いこと．(3)マハゼの肝臓および筋肉中の残留濃度と沿岸に生息するアサリのそれとの間には相互に密接な関係を示している上，これらの濃度が海水中のCNP濃度をよく反映していること．(4)東京湾に流入する江戸川水系で捕獲したヤマベ中にCNPを検出したこと．などから，その汚染経路は，水田に散布されたCNPが農業用水路を経て[6]河川に流出し，さらに海水中に移行・拡散し，それぞれの場所に生息する生物に蓄積されたものであると考える．その要因としては，(1)陸水，海水圏における微生物の分解能力以上にCNPが多量に使用されたこと．(2)主に湛水状態の水田にCNPが使用されるため，土壌への吸着が低下していること．などが挙げられる．

次に，海産魚貝類中のCNP濃度についてみると，魚類の臓器および脂肪組織中の残留濃度は，筋肉中のそれよりも高く，最高値で91,400ppbの値を示している点からみて，魚体内のCNPの大部分が臓器，脂肪組織中に蓄積されるものと考える．なお，小林ら[7]の報告によると，淡水魚でのCNPの濃縮係数は約2,000倍であるという．

以上の点から，CNPの海洋汚染は，食用魚貝類中への移行・残留がある点から，それらの海産食品を介してヒトが健康上の危害を被るかも知れないという問題を含んでおり，早急にその使用に対する適切な指導をすべき重要な問題であると考える．

ま と め

1977年8月26日から9月27日までと，1978年8月6日から9月10日までの期間に，東京湾沿岸の神奈川県金沢八景から千葉県富津までの海域で，スズキ，マハゼ，アサリ，サルボウガイを対象にそれらのCNP汚染の実態を調査した．その結果，(1)調査対象とした魚貝類のすべての試料中からCNPを検出した．(2)マハゼの残留CNP濃度は，筋肉中のそれよりも肝臓中の残留濃度が高く約60～91,400ppbの範囲で検出され，局地的な濃厚汚染の傾向を認めた．スズキでは，筋肉中の残留濃度が肝臓，腎臓などの臓器と比べると約1/35と低い値を示した．(3)マハゼの筋肉中の残留濃度と肝臓中のそれとの間に高い相関関係を認めた．(4)アサリ中の残留濃度とマハゼの肝臓，筋肉中のそれとの間に密接な関係を認めた．(5)東京湾に流入する一河川系で捕獲したヤマベ中にCNPを検出した．(6)各試料とも，1977年に比べて1978年の残留濃度は，著しく減少した．

謝辞 本調査の試料採取に当たり，東京都衛生局環境衛生部食品監視課の協力を得たことを感謝致します．

文　献

1) 日本植物防疫協会：農薬要覧，138，1970
2) 遠山輝彦，玉川重雄：農薬科学，3 (4)，178，1976
3) 鍬塚昭三：日本農薬学会誌，2，201，1977
4) 山田忠雄，中村　拓：日本雑草防除研究会第12回講演要旨，111，1973
5) 山岸達典，秋山和幸，金子誠二，堀井昭三，宮崎奉之，森田昌敏：東京衛研年報，30-1，123，1979
6) 鈴木　学，大和康博，秋山　高：日本農芸化学会講演要旨，468，1978
7) 小林邦雄：日本水産学会講演要旨，120，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab P.H.*, 30-1, 133-136, 1979

東京都における PCB 汚染の実態について（第7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 (VII) Polychlorinated Biphenyl Content of Foods

KIYOKO YAMAZAKI*, HIDEO YAMANOBE*, SUKEJI SUZUKI* and HIROFUMI HARADA*

Keywords：ポリ塩化ビフェニール polychlorinated biphenyl, 汚染 pollution, 食品 foods, 母乳 human milk

緒　言

ポリ塩化ビフェニール（以下 PCB と略す）は，製造および使用に関する規制措置がとられて7年を経過した現在，その成果が現われ，全国的に行なわれている汚染の追跡調査によっても全体的に減少傾向が報告されている[1-3]．

われわれも都民の食生活の安全性を確保する目的で，魚介類を中心とした食品の PCB 汚染調査を行なってきた．本報では1978年度の結果について報告する．

実験方法

調査試料は1978年4月より1979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．内訳は魚介類60種類300検体，食肉6種類30検体，乳製品4種類50検体，鶏卵20検体，容器包装紙20検体および都内在住の産婦から提供された母乳20検体，合計440検体である．

操作および定量は第2報[4]に述べたように，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 を定量した．

結果および考察

魚介類可食部の PCB 測定結果を Table 1 に示す．300検体中0.01ppm以上を検出したものは226検体で75.3％を占め，平均値は 0.05ppm であった．検出率，平均値とも前年度に比べて増加しているが，これは今回の調査において比較的 PCB 含有量の高い魚種であるボラやキスなどの検体数が多かったことに起因すると思われる．最高値はスズキの 1.42ppm があげられるが，暫定規制値を越えるものはみられなかった．また，平均値が0.1ppm を越えるものにはアン肝（アンコウの肝臓）0.27ppm，ボラ 0.30ppm，キス 0.13ppm，メカジキ 0.96 ppm，スズキ 0.33ppm，タチウオ 0.19ppm，コノシロ 0.21ppmがあったが，こういった比較的高い PCB 含有量を示す魚種の傾向も例年と変わらなかった．

魚介類の内臓は前年度高い値を示した魚種についてのみ PCB 濃度を測定した（Table 2）．その結果ボラのように 11.50ppm と高濃度が検出されるものもあったが，年度毎に比較すると大きな変化は見られなかった．われわれはこれまでの調査で魚介類の PCB 濃度が漸次低下の傾向にあることを報告してきたが[5]，調査初期に比べて汚染の度合いもかなり低下し，今後しばらくは横ばい状態になるのではないかと思われる．

乳製品についてはバター，チーズ，育児用粉乳，牛乳の PCB 濃度を測定したが（Table 3），全量中の濃度が 0.01ppm を越えたものはバターのみであった．

母乳については出産後2～8週間の産婦20名の協力を得て PCB の検査を行なった．0.005ppmから0.047ppm の範囲ですべての母乳から検出され，平均 0.023ppm となり，前年度の結果および昨年の全国平均値 0.024ppm とほぼ同じ値を示した．また，1976年度から1978年度の50検体について母乳の PCB 濃度と産婦の年令および出産から母乳採取までの日数との間の相関々係を調べた．年令は20才から35才，出産後の日数は6日から54日にわたっているが，両者とも関連性は認められなかった．

肉類の PCB 濃度測定結果を Table 4 に示す．豚肉，豚肝，牛肉，牛肝，鶏肉，鶏肝，鶏卵とも濃度は極めて低かった．

容器包装紙は紙皿，紙コップ，合成樹脂製容器など20検体について検査したが，パウンドケーキ型敷紙 0.03 ppm，紙皿 0.02ppm，ポリエチレン製の容器のフタ0.11 ppm の他は検出されなかった．

結　論

1978年度に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，いずれからも暫定規制値を上回るものは見い出されなかった．ま

* 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.)		
	N	Range	Mean
Ainame (greenling, *Hexagrammos otakii*)	2		0.01
Aji (horse-mackerel, *Trachrus trachrus*)	10	0.01—0.12	0.04
Akanishi-gai (rock shell, *Rapana thomasiana crosse*)	1		0.00
Anago (conger eel, *Astroconger myriaster*)	8	0.00—0.39	0.07
Anko (angler, *Lophius litulon*)	3	0.00—0.01	0.00
Ankimo (angler liver)	3	0.12—0.45	0.27
Ayu (ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis*)	5	0.01—0.02	0.01
Bora (grey mullet, *Mugil cephalus*)	7	0.04—0.83	0.30
Buri (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	22	0.01—0.16	0.07
Hamo (sea eel, *Muraenesox cinereus*)	2		0.01
Hatahata (sandfish, *Arctoscopus japonicas*)	3	0.00—0.06	0.03
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	6	0.00—0.02	0.00
Hokkoku-aka-ebi (*Pandalus borealis*)	2		0.01
Houbou (gurnard, *Chelidonichthys kumn*)	1		0.00
Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	5	0.01—0.09	0.03
Ishimochi (croaker, *Argyrosomus argentatus*)	2	0.03—0.05	0.04
Itoyori (*Nemipterus virgatus*)	2		0.00
Iwashi (sardine, *Sardinos melanosticta*)	9	0.01—0.05	0.03
Kaki (oyster, *Crassostrea gigas*)	3	0.01—0.04	0.02
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	6	0.01—0.08	0.03
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	2		0.02
Kichiji (*Sebastolobus macrochir*)	7	0.01—0.04	0.02
Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	6	0.03—0.40	0.13
Kochi (flathead, *Platycephalus indicus*)	3		0.01
Koi (carp, *Cyprinus carpio*)	3	0.00—0.01	0.01
Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	9	0.05—0.58	0.21
Madai (sea bream, *Chrysophrys major*)	25	0.00—0.09	0.02
Madako (octopus, *Octopus vulgaris*)	3	0.00—0.01	0.01
Madara (codfish, *Gadus macrocephalus*)	3	0.01—0.05	0.03
Mafugu (fugu, *Fugu vermicularis porphyreus*)	2		0.00
Magarei (flat fish, *Limanda herzensteini*)	13	0.00—0.04	0.01
Maguro (tuna, *Thunnus thynnus*)	5	0.01—0.09	0.04
Mahata (*Epinephelus septemfasciatus*)	2		0.01
Makajiki (marlin, *Makaira mitsukurii*)	1		0.00
Managatsuo (harvest fish, *Pampus argenteus*)	5	0.00—0.01	0.01
Masu (trout, *Oncorhynchus masou*)	4	0.01—0.02	0.02
Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)	5		0.01
Mekajiki (broadbill, *Xiphias gradius*)	1		0.96
Menuke (rockfish, *Sebastes matsubarai*)	2	0.01—0.02	0.02
Mutsu (japanese bluefish, *Scombrops boops*)	1		0.01
Nijimasu (rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*)	6	0.00—0.01	0.01
Nishin (herring, *Clupea pallasi*)	4	0.00—0.02	0.01
Onaga (*Alopias pelagicus*)	1		0.00
Saba (mackerel, *Pneumotophorus japonicus*)	11	0.02—0.07	0.04

Sample	PCB concentration in fish meat (ppm wet wt.)		
	N	Range	Mean
Sake (salmon, *Oncorhynchus kete*)	3		0.00
Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	4	0.00—0.01	0.01
Sawara (spanish mackerel, *Scomberomorus niphonius*)	4	0.00—0.22	0.09
Sayori (halfbeak, *Hemirhamphus sajori*)	3	0.02—0.13	0.06
Shiira (dorado, *Coryphana hippurus*)	1		0.01
Shirauo (whitebait, *Salanx microdon*)	1		0.02
Silver	2		0.00
Suketo-dara (walleye pollack, *Theragra chalcogramma*)	4		0.00
Surume-ika (cattlefish, *Todarades pacificus*)	17	0.00—0.13	0.02
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)	7	0.01—1.42	0.33
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	5	0.07—0.28	0.19
Taisho-ebi (prawn, *Penaeus orientalis*)	2		0.00
Takabe (*Labracoglossa argentiventris*)	2		0.02
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	6	0.00—0.01	0.01
Unagi (eel, *Anguilla japonica*)	9	0.01—0.03	0.02
Yoroiitachiuo (*Hoplobrotula armata*)	4		0.00
Total	300	0.00—1.42	0.05

N : number of samples

Table 2. PCB Concentrations in Internal Organ (ppm)

Sample	1978			1977		1976		1975	
	N	Range	Mean	N	Mean	N	Mean	N	Mean
Aji	9	0.03— 0.27	0.10	8	0.09	8	0.17	3	0.11
Bora	7	0.04—11.50	2.76	1	0.32	2	0.53	2	0.83
Konoshiro	6	0.08— 0.46	0.20	4	0.09	1	0.08	3	0.27
Saba	11	0.02— 0.28	0.08	7	0.06	10	0.18	13	0.05
Sayori	3	0.12— 2.67	0.98	2	1.10	—		—	
Surume-ika	15	0.00— 0.43	0.12	11	0.21	6	0.12	3	0.57
Suzuki	7	0.05— 3.90	1.75	3	3.82	3	3.44	2	8.80

N : number of samples

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	10	0.00 — 0.03	0.01		
Process cheese	10		0.00	0.00 — 0.09	0.02
Modified milk powder	10		0.00	0.00 — 0.04	0.01
Milk	20		0.00	0.00 — 0.07	0.03
Human milk	20	0.005— 0.047	0.023	0.308— 1.002	0.633

N : number of samples

Table 4. PCB Concentrations in Meats (ppm)

Sample	N	Range	Mean
Pork	5	0.00—0.01	0.00
Pig liver	5		0.00
Beef	5	0.00—0.02	0.00
Cow liver	5	0.00—0.01	0.00
Chicken	5	0.00—0.01	0.01
Chicken liver	5		0.00
Hen's egg	20	0.00—0.01	0.00

N : number of samples

た，全般的に昨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獣医衛生課，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) 岡田　作，宇野正清，陰地義樹，上田栄次：奈良県衛生研究所年報，12，115，1977
2) 菅野　猛，小西泰子，三島靖子：仙台市衛生試験所々報，7，139，1977
3) 本田久義，吉岡　康，山崎晴美ら：千葉衛研報告，2，29，1978
4) 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
5) 山崎清子，山野辺秀夫，鈴木助治，原田裕文：東京衛研年報，29-1，234，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 137-139, 1979

東京都における水銀汚染の実態について（第6報） 魚介類中の水銀含有量調査

雨宮 敬*, 竹内正博*, 原田裕文*

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (VI) Mercury Content of Fish and Shellfish

TAKASHI AMEMIYA*, MASAHIRO TAKEUCHI* and HIROFUMI HARADA*

Keywords: 総水銀 total mercury, メチル水銀 methyl mercury, 魚 fish, 定量 determination

はじめに

著者らは，1973年（昭和48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[1-5]．また前回までの調査においては数10種という広範囲の魚介類を対象としてその汚染状況をある程度把握した．そこで1978年度（昭和53年）は過去の調査で高値を示したうちから数種の魚をえらび，追跡調査の目的で本調査を行なったので報告する．

実験方法

1. **試料** 1978年4月から1979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4種96検体で，そのうちわけはスズキ48検体，ハモ26検体，ムツ12検体およびユメカサゴ10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[1-6]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．

1. スズキ 今回の調査において48検体中総水銀の規制値である 0.40ppm をこえるものが14検体みられ，これは全体の 29.2% に相当し，これらのうち最も高い値は 0.84ppm で，全検体の平均値は 0.32ppm であった．今回のスズキの水揚げ先は岩手県大船渡市15検体，千葉県銚子市33検体であった．またスズキの総水銀含有量を年次別にみると，1974年度（昭和48年）から順に 0.56ppm (0.16—0.78ppm)[1], 0.42ppm (0.18—0.76 ppm)[2], 0.18ppm (0.08—0.22ppm)[3], 0.09ppm[4] および 0.25ppm (0.10—0.41ppm)[5] となっている．つぎにメチル水銀の最高値は 0.72ppm で規制値を大幅にうわまわったものもみられ，平均値は 0.27ppm であった．

2. ハモ 26検体について調査したところ，総水銀ではこれらのうち1検体のみが0.45ppmと規制値をこえ，他はすべて規制値以下で，その平均値は 0.19ppm であった．今回の調査に用いたハモの出荷先は熊本県芦北郡21検体，山口県下関市5検体であった．ハモの年次別の調査結果は 0.37ppm (0.16—0.90ppm)[1], 0.08ppm (0.06—0.09ppm)[2], 0.14ppm[4] である．つぎにメチル水銀についてみると，最高 0.40ppm を示し，平均値は 0.16ppm であった．

3. ムツ 12検体について調査を行なった．これらはすべて長崎県長崎市に水揚げされたものである．このうち総水銀において0.83ppmという高値を示したものもあり，全平均値は0.52ppmであった．また12検体中6検体が規制値をこえ，それらの平均値は0.77ppmを示した．ムツは過去の調査においても高濃度の水銀を検出し，順に 0.36ppm (0.18—0.53ppm)[1], 0.49ppm (0.25—0.62 ppm)[2], 0.28ppm (0.05—0.87ppm)[3], 0.46ppm[4] および 0.56ppm (0.27—1.09ppm)[5] で，とくに前年度には1.09 ppm というものもみられた．またメチル水銀の最高値は0.76ppm，平均値は 0.46ppm であった．

4. ユメカサゴ 10検体について調査を行なった結果，最高 0.80ppm の総水銀を検出し，平均値は0.46ppmであり，またメチル水銀においては最高値 0.68ppm，平均値 0.39ppm であった．検体のすべてはムツ同様長崎市に水揚げされたものである．ユメカサゴは1976年（昭和51年）にはじめて調査したところ，1検体ではあるが 0.95ppm という高濃度の水銀を検出している．

今回の調査に用いたスズキ，ハモ，ムツおよびユメカサゴは深海性の魚種で，過去の調査結果同様，高値を示した．またメチル水銀量の総水銀量に対する比率は平均値でスズキ83.5%，ハモ80.7%，ムツ86.6%およびユメカサゴ81.7%となり，この値は他の研究者の調査とほぼ

* 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) Range	T-Hg (ppm) Mean	Me-Hg (ppm) Range	Me-Hg (ppm) Mean	Me-Hg/T-Hg (%) Range	Me-Hg/T-Hg (%) Mean
1.	Suzuki (Perch) *Lateolabrax japonicus*	48	0.12—0.84	0.32	0.09—0.72	0.27	72.2—92.7	83.5
2.	Hamo (Sea eel) *Muraenesox cinereus*	26	0.06—0.45	0.19	0.04—0.40	0.16	66.7—88.9	80.7
3.	Mutsu *Scombrop boops*	12	0.20—0.83	0.52	0.17—0.76	0.46	80.0—91.6	86.6
4.	Yumekasago (Scorpionfish) *Scorpaena*	10	0.12—0.80	0.46	0.10—0.68	0.39	66.7—86.7	81.7

N : number of samples

Table 2. Content of Total Mercury in Muscle of Fish on Size of Fish

	Name	Range / Length cm	< 0.10	0.10–0.19	0.20–0.29	0.30–0.39	0.40–0.49	0.50–0.59	0.60–0.69	0.70–0.79	0.80 ≦	(ppm)
1.	Suzuki	50—59		4	8	2						
	(Perch)	60—69		3	13	3	2	2	1			
		70≦				1	5	2			2	
2.	Hamo											
	(Sea eel)	50—59		2								
		60—69		4		1						
		70—79	5	3	3	1						
		80—89		2	1							
		90—99			1							
		100≦	1			1	1					
3.	Mutsu											
	(*Scombrop*	30—39									1	
	boops)	40—49			3	3	1				1	
		50≦									3	
4.	Yumekasago	10—19		2								
	(Scorpionfish)	20—29				2						
		30≦						4		1	1	

一致している.

つぎに魚体の大きさと水銀含有量の関係について Table 2 に示す.

まずスズキについては48検体の平均体長は 62.6cm, 範囲は 50—87cm であった. これらを10cm 間隔で①50—59cm, ②60—69cm および③70cm 以上の3クラスに分け, 体長と総水銀量との関係をみた. これによると①に分けられたものは14検体で全体の29.2%, ②は24検体で50%, ③は10検体で20.8%であった. ①の比較的小型のものについては規制値をこえるものはみられず, 平均値は 0.22ppm を示し, ②は24検体中5検体が 0.40ppm 以上であり, ③は9検体が規制値をこえた. また 0.80 ppm 台が2検体みられた. これらのことから70cm 前後の大型のものは高値を示し, ほとんど規制値をこえることがわかった.

ハモ26検体の平均体長は 74.5cm で, 50—110cm の範囲であった. 50—70cm のものは総水銀において 0.20 ppm 前後で, 100cm をこえるものは 3検体のうち1検体ではあるが 0.40ppm 以上を示した.

ムツ12検体を10cm間隔で区分したところ, Table 2 に

みられるように 30cm 台は1検体, 40cm 台は8検体, 50cm 台は3検体となり, これらのうち 30cm 台のものは体長 39cm であったがかなり 成育がよく 体重の点で 40cm 台に匹敵しているため 0.80ppm 以上を示した. また 40cm 台のものについては2検体, 50cm 以上であるとすべて規制値をこえていた.

ユメカサゴ10検体のうち 10—20cm の比較的小型のものは総水銀において 0.20ppm 程度であったが, 30cm のものになるとすべて規制値をこえ, なかには0.80ppm 以上のものもみられた.

追跡調査に用いた魚種については同一魚種において, 魚体が大きいほど水銀含有量も高値を示している. また今回の4種のみならず過去の調査でかなりの高値を示した他の魚種についても調査を継続していくことが望まれる.

まとめ

1. 今回の調査に用いた魚種は各年度において高値を示し, 追跡調査の目的で本調査を行なった. 魚種はスズキ, ハモ, ムツおよびユメカサゴの4種96検体である.

2. 従来から指摘されているとおり, 同一魚種でも体長の大きいものほど高値を示した.

3. 今回の4種および他の魚種についても今後さらに追跡調査を行なう予定である.

謝辞 本調査に御便宜をはかっていただいた東京都衛生局環境衛生部食品監視課の方々に深謝いたします.

文献

1) 伊藤弘一, 竹内正博, 江波戸舉秀, 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, 江波戸舉秀, 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, 江波戸舉秀, 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, 江波戸舉秀, 原田裕文：東京衛研年報, **28-1**, 104, 1977
5) 雨宮 敬, 竹内正博, 伊藤弘一, 江波戸舉秀, 原田裕文：東京衛研年報, **29-1**, 167, 1978
6) 竹内正博, 江波戸舉秀, 伊藤弘一, 雨宮 敬, 原田裕文, 戸谷哲也：東京衛研年報, **25**, 133, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 140-144, 1979

食品中の石油系炭化水素に関する研究（第4報） 東京湾産あさりの石油汚染実態調査ならびに飼育実験による汚染物質の取り込みについて

井部明広*, 西島基弘*, 牛山博文*, 安田和男*
斉藤和夫*, 上村 尚*, 永山敏廣*, 直井家壽太*

Studies on Hydrocarbons from Petroleum in Foods (IV) Contents of Hydrocarbons in Short-Necked Clam in Tokyo Bay and Transfer to Short-Necked Clam of Hydrocarbons

AKIHIRO IBE*, MOTOHIRO NISHIJIMA*, HIROFUMI USHIYAMA*, KAZUO YASUDA*, KAZUO SAITO*, HISASHI KAMIMURA*, TOSHIHIRO NAGAYAMA* and YASUTA NAOI

Keywords : 3, 4 ベンツピレン 3, 4 benzopyrene, ジベンゾチオフェン dibenzothiophene, *n*-パラフィン類 *n*-paraffins, プリスタン pristan, 石油汚染 petroleum pollution, あさり short-necked clam, 東京湾 Tokyo Bay, 炭化水素 hydrocarbon

緒 言

著者らは東京湾産のあさりを中心とした貝類および砂について，一般に石油汚染の指標になると考えられている3, 4ベンツピレン，ジベンゾチオフェン，*n*-パラフィン類およびプリスタンの含有量調査を行い前報[1]で報告した．

そこで今回は引き続き東京湾産のあさり，砂および海水について同様の調査を継続すると共に，これらの調査物質を添加した人工海水であさりを飼育し，あさり中への取り込みについて検討したところ若干の知見が得られたので報告する．

実験方法

1. 試料，採取場所および採取年月日 前報[1]と同様，東京湾5地点で1978年5月から9月にわたり採取したあさり23件，砂（表層下約10—30cmの砂層を採取）24件，および海水24件を試料とした．なお，飼育実験用のあさりは木更津市牛込海岸にて1979年2月に採取した約2,000個を試料とした．

2. 試薬 1) 人工海水：塩化ナトリウム(局方)1,338g，塩化カリウム 37.5g，塩化マグネシウム 171g，塩化カルシウム 25.5gおよび硫酸マグネシウム（いずれも和光純薬工業㈱社製一級）105g を秤取し 50*l* の水に溶解した後，1/2M炭酸ナトリウム溶液で pH を 8.0—8.5 に調整した．2) 他の試薬類は前報[1]に準じた．

3. 試験法 前報[1]に準じた．なお，飼育実験のあさりのサンプリング方法は，あさり約40個を2時間清浄海水で飼った後むき身とし，さらにむき身をヘキサンで洗浄したものを用いた．

4. あさりの飼育方法 あさりを一昼夜人工海水で飼育後，人工海水50*l*を入れた容器5個に，それぞれ約380個を投入し，C重油およびそれぞれの標準物質を表1に示した通りに添加し，エアレーションを行い，水温16—19°で餌を与えずに飼育した．

結果および考察

1. 実態調査 東京湾内富津，木更津，千葉中央港，三枚洲および大井埠頭5地点におけるあさり，砂および海水中の3, 4ベンツピレン，ジベンゾチオフェン，*n*-パラフィン類およびプリスタンの含有量の調査結果を表2に示した．

1) 3,4ベンツピレン あさり中の3,4ベンツピレン含有量はいずれの採取場所のものも Tr—0.20ppb の範囲であり，砂は 0.01—10ppb の範囲であった．また海水ではいずれも Tr であった．

各採取場所ごとにあさりと砂の平均値を比較すると，あさりは砂の1/10—1/100であり，砂の影響を受けにくいことが推察された．また，あさりと砂の含有量には特に相関関係はみられなかった．各採取場所の平均値を比較すると，大井埠頭のあさりは 0.16ppb，砂は 6.6ppb であり，他の場所のあさりの Tr—0.04ppb，また，砂の 0.11—2.2ppb と比較して，いずれも高い値を示した．

2) ジベンゾチオフェン あさり中のジベンゾチオフェンの含有量はいずれの採取場所のものも Tr—2.7ppb，砂はTr—1.3ppb，海水はTr—0.14ppb の範囲であった．

各採取場所のあさりと砂および海水中の平均値を比較

* 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

表1. あさりの飼育条件

		添加物質および添加量	備考
実験 1	1	C重油　20ppm	各物質を添加した人工海水中で飼育
	2	3,4 ベンツピレン　0.5ppb,　ジベンゾチオフェン　5ppb *n*-パラフィン類 (C_{15}～C_{29})　1ppm,　プリスタン　1ppm	
実験 2	3	C重油　500ppm	各物質を添加した人工海水中で5日間飼育後，清浄海水中に移行して飼育
	4	3,4 ベンツピレン　5ppb,　ジベンゾチオフェン　50ppb *n*-パラフィン類 (C_{15}～C_{29})　10ppm,　プリスタン　10ppm	
対照	5		人工海水のみで飼育

表2. 3,4 ベンツピレン，ジベンゾチオフェン，*n*-パラフィン類およびプリスタンの調査結果

場所	試料	件数	含有量 3,4 ベンツピレン ppb	ジベンゾチオフェン ppb	*n*-パラフィン類 ppm	プリスタン ppm
富津	あさり	5	Tr ～0.01	Tr ～0.37 (0.07)	Tr	Tr
	砂	5	0.13～9.2 (2.1)	0.10～1.3 (0.28)	Tr	Tr
	海水	5	Tr	Tr ～0.14 (0.05)	Tr	Tr
木更津	あさり	5	Tr ～0.05 (0.02)	Tr ～0.81 (0.83)	Tr	Tr
	砂	5	0.24～2.5 (1.4)	Tr ～0.11 (0.09)	Tr	Tr
	海水	5	Tr	Tr ～0.10 (0.04)	Tr	Tr
千葉中央港	あさり	3	0.03～0.07 (0.04)	0.31～1.2 (0.73)	Tr	Tr
	砂	5	0.27～4.9 (2.2)	Tr ～0.10 (0.08)	Tr	Tr
	海水	5	Tr	Tr ～0.11 (0.05)	Tr	Tr
三枚洲	あさり	5	0.01～0.05 (0.03)	0.14～0.67 (0.37)	Tr	Tr
	砂	4	0.01～0.19 (0.11)	Tr ～0.10 (0.04)	Tr	Tr
	海水	4	Tr	Tr	Tr	Tr
大井埠頭	あさり	5	0.03～0.20 (0.16)	0.28～2.7 (1.1)	Tr	Tr
	砂	5	2.0 ～10 (6.6)	Tr ～1.0 (0.40)	Tr	Tr
	海水	5	Tr	Tr ～0.10 (0.03)	Tr	Tr
			Tr=0.01 ppb 未満	Tr=0.10 ppb 未満	Tr=0.20 ppm 未満	Tr=0.01 ppm 未満

( ) =平均

すると，あさりは富津で採取したものを除き砂よりも3—10倍程度高く，また，海水よりも15倍以上高い値を示した．これはあさり中の3,4ベンツピレンが砂の1/10—1/100であったことを考えた場合，ジベンゾチオフェンがあさり中で濃縮されることも考えられることから石油汚染の指標になり得ることも期待できる．また，採取場所による平均値は，大井埠頭のあさりは 1.1ppb，砂は 0.4ppb であり，他の場所のあさり 0.07—0.83ppb，砂 0.04—0.28ppbと比較して高い値を示した．海水については0.14ppb 以下であり場所による差はみられなかった．

3) ***n*-パラフィン類およびプリスタン**　あさり，砂および海水中の含有量は採取地点に関係なくいずれも Tr であった．

2. **飼育実験**　著者らは3,4ベンツピレン，ジベンゾチオフェン，*n*-パラフィン類およびプリスタンがいずれも石油成分であることから，これらがあさりの石油による汚染の指標になり得ると考え，調査を継続して来た．今回これらの物質を添加した海水であさりを飼育し，あさり中への取り込みを調査して石油汚染の指標となり得るかの検討を行った．

1) **3,4 ベンツピレン**　実験1による結果を図1に示した．重油添加のものおよび標準品添加のものはいずれも3,4ベンツピレンは急速にあさり中に取り込まれ，ほぼ3日で2—3ppbといずれも最大値を示した．この値は対照のあさりの3,4ベンツピレン含有量 (0.01ppb)と比較した場合約250—300倍であった．しかし以後急速に減少し，10日目では重油および標準品を添加したものともほぼ 1ppb となり，以後17日目までの調査ではほとんど変化がみられなかった．この値は対照のあさりと比較した場合約100倍であった．

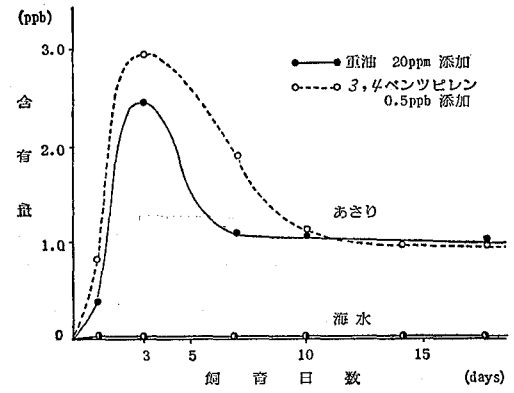


図 1. 3,4ベンツピレンの挙動

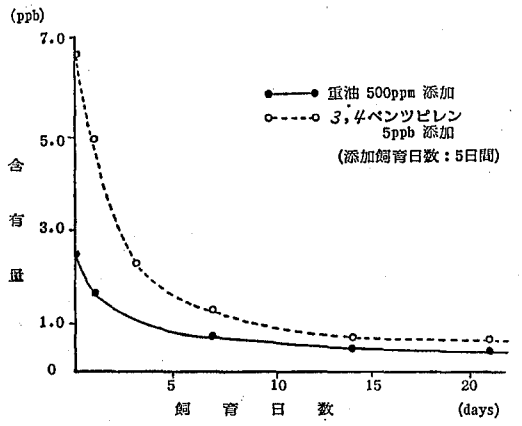


図 2. 清浄海水に移行後の3,4ベンツピレンの挙動

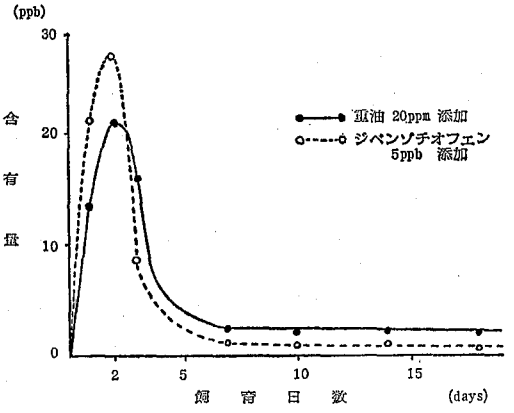


図 3. ジベンゾチオフェンの挙動

実験2による結果を図2に示した．清浄海水移行直後の値は重油添加のもので 2.5ppb，標準品添加のものは 6.7ppb であったが経日的に急速に減少し，21日後ではそれぞれ 0.5ppb および 0.7ppb であった．これらの値は対照のあさりと比較して約50倍であった．

実験1および2の結果から，添加量により含有量に差がみられた．すなわち，高濃度に添加した場合は，含有量が高くなる傾向が見られたが，いずれも最高値に達した後は急速に減少し，添加濃度にかかわらず3,4ベンツピレンの含有量変化のパターンが類似していることが分った．また，実験1では10日目以後は約 1ppb，実験2では 0.5—0.7ppb であることから，あさり中の3,4ベンツピレン含有量は汚染後の海水の汚染状況が関与することも考えられる．

あさり中の含有量が添加3日後に最大値を示す原因として，海水中の3,4ベンツピレンの含有量が同じく3日後に高くなることが考えられたが，海水中の含有量は添加直後から飼育終了日まで常に Tr であったことから，海水による影響ではなく，むしろあさりの生理作用に起因しているものと考えられる．

2) **ジベンゾチオフェン** 実験1による結果を図3に示した．重油添加のものおよび標準品添加のものはいずれもジベンゾチオフェンが急速にあさり中に取り込まれ，ほぼ2日で20—30ppbといずれも最大値を示した．この値は対照のあさりのジベンゾチオフェン含有量（0.12 ppb）と比較した場合約200—250倍であった．しかし以後急速に減少し，7日目以後は重油添加のもので約2ppb，標準品添加のもので約 1ppb とほぼ一定となった．これらの値は対照のあさりと比較して約10—20倍であった．なお，人工海水中のジベンゾチオフェン含有量はいずれも Tr であった．

実験2による結果を図4に示した．清浄海水移行直後の値は重油添加のもので 27.1ppb，標準品添加のもので

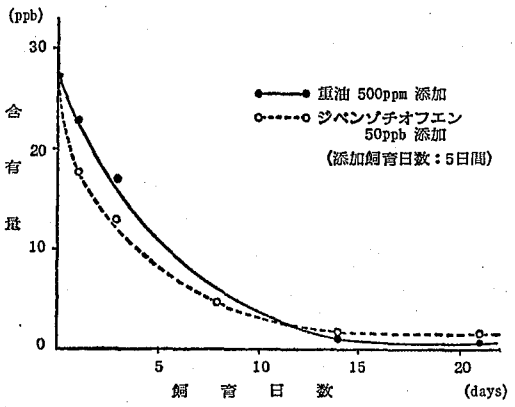


図 4. 清浄海水に移行後のジベンゾチオフェンの挙動

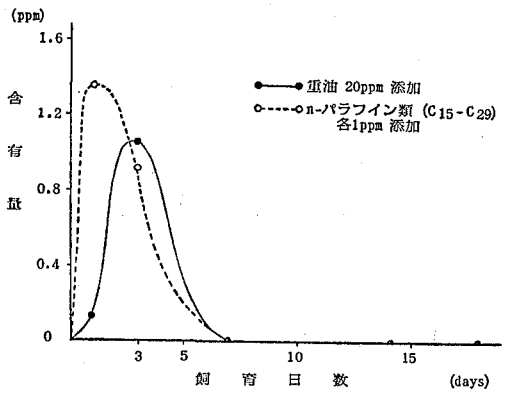


図 5.　*n*-パラフィン類の挙動

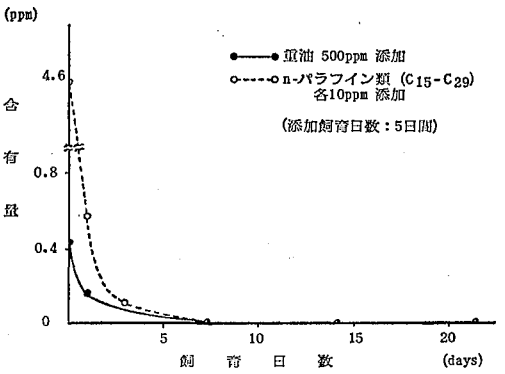


図 6.　清浄海水に移行後の*n*-パラフィン類の挙動

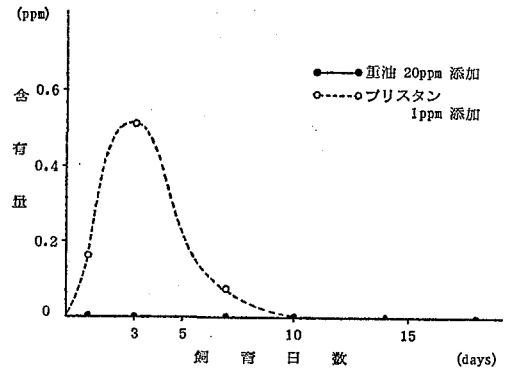


図 7.　プリスタンの挙動

26.8ppb であったが，経日的に急速に減少し，21日後ではそれぞれ 1.1ppb, 1.8ppb となった．これらの値は対照のあさりと比較して10—20倍であった．

3) ***n*-パラフィン類**　実験1による結果を図5に示した．重油を添加した場合，重油中の *n*-パラフィン類はあさり中で3日後に 1.1ppm と最大となり，その後

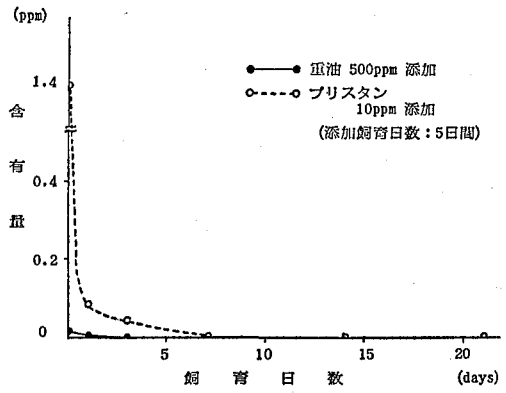


図 8.　清浄海水に移行後のプリスタンの挙動

は急速に減少し7日目では Tr となった．標準品を添加した場合は1日後で 1.3ppm と最大になり，その後は急速に減少し，7日目には Tr となった．

実験2による結果を図6に示した．清浄海水に移行後は重油中の *n*-パラフィン類および標準品の *n*-パラフィン類はいずれも急速に減少し，7日目にはいずれも Tr となった．これらのことから *n*-パラフィン類はあさりの石油汚染の指標となりにくい事が推察された．

4) **プリスタン**　実験1による結果を図7に示した．重油 20ppm 中のプリスタンは含有量が少ないため検出されず，重油約 5,000ppm に相当する標準プリスタン1 ppm を添加した場合，3日で 0.5ppm と最大となり以後徐々に減少し，10日で Tr となった．

実験2による結果を図8に示した．重油を 500ppm 添加した場合，清浄海水移行時には 0.01ppm，標準品を添加したものは 1.4ppm であったが，経日的に急速に減少し，重油添加のものは2—3日後 Tr となり，標準品添加のものは7日目で Tr となった．これらのことからプリスタンはあさり中への残留性は認められず指標物質となりにくい事が推察された．

結　　論

東京湾産あさりの石油汚染のバックグランドを知る目的で東京湾内5地点のあさり，砂および海水中の 3,4 ベンツピレン，ジベンゾチオフェン，*n*-パラフィン類およびプリスタンの含有量の調査を行った．また，これらの物質が石油汚染の指標になり得るかについて推察するため人工海水であさりを飼育して，あさり中への残留性についての調査を行った．

1.　東京湾産あさりの含有量は3,4ベンツピレンで Tr —0.20ppb，ジベンゾチオフェンで Tr—2.7ppb であり，*n*-パラフィン類およびプリスタンはいずれも Tr であった．

2. 3,4ベンツピレンとジベンゾチオフェンについて，あさりの含有量を砂の含有量と比較した場合，3,4ベンツピレンは砂の1/10—1/100であり，ジベンゾチオフェンは3—10倍であった．

3. 飼育実験の結果，いずれの添加物質もその濃度によってあさりの取り込み量に差がみられた．またいずれの物質もあさり中に急速に取り込まれるが，ほぼ1—3日で最高となり，その後は急速に減少し，3,4ベンツピレンおよびジベンゾチオフェンは7—10日程度で一定となり，以後はほとんど変化がみられなかった．

4. 飼育実験における各物質の残留性は3,4ベンツピレンおよびジベンゾチオフェンが比較的高く，*n*-パラフィン類，プリスタンは7—10日以後はいずれも検出限界以下となり残留性は少ないことが分った．これらのことから3,4ベンツピレン，ジベンゾチオフェンは石油汚染の指標となり得る要素は備えているが，実際の海洋汚染を考えた場合，特に3,4ベンツピレン等は石油のみでなく多くの原因が考えられるため，今後石油汚染等の調査を行う場合は，ジベンゾチオフェンを中心として3,4ベンツピレンや指標物質になる可能性のある物質についても同時に調査して総合的に判断する必要があると考える．

（本研究の概要は日本食品衛生学会第37回学術講演会1979年5月で発表した．）

文　献

1) 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：東京衛研年報，29-1，238，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 145-148, 1979

N-ニトロソ化合物に関する衛生学的研究（第3報） 加工食品およびアルコール飲料中の揮発性N-ニトロソ化合物の含有量

真木俊夫*, 田村行弘*, 嶋村保洋*, 小関正道*
西垣 進*, 直井家壽太*

Hygienic Studies on N-Nitroso Compounds (III) Survey of Processed Foods and Alcoholic Beverage for Volatile N-Nitroso Compounds

TOSHIO MAKI*, YUKIHIRO TAMURA*, YASUHIRO SHIMAMURA*,
MASAMICHI KOSEKI*, SUSUMU NISHIGAKI* and YASUTA NAOI*

Keywords：揮発性N-ニトロソアミン volatile N-nitrosamine, 熱エネルギー検出器・ガスクロ TEA-GC, 市場調査 survey, 加工食品 processed foods, アルコール飲料 alcoholic beverage

緒 言

がんの疫学的調査によると食生活を通して摂取される発がん物質の一つとしてN-ニトロソアミン(以下NNAと略す）が重視され[1]，とくに日本人の胃がんと魚肉との関係を示唆する報告も見られるようになった[2]．

われわれは前報[3,4]において，亜硝酸塩使用食肉加工品，野菜入り缶詰食品，魚介干物，魚介くん製品等について揮発性 NNA の含有量の現状把握に関する調査を行って来た．その結果，亜硝酸塩使用が許可されている食肉加工品より，亜硝酸塩が使用されていない魚介加工品の方から比較的高濃度の NNA が含有されていることが判明した．また，これらを加熱処理するとNNAの増量が見られ，食品からの NNA の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性がでてきた．

そこで，調査試料の種類と個体数をふやし調査を続けることとした．

今回，魚介加工品を含めて，一般に，亜硝酸塩が用いられていない食品で今までに比較的高濃度の NNA が検出されたもの，また，日本人の食生活において比較的摂取頻度が高く，NNA 含有量に関する報告が少ない，みそ，醤油，アルコール飲料，肉および野菜入り[1]レトルト食品等を対象とした．これら食品中の NNAについて TEA-GC で分析を行い，また，一部の食品につき，揮発性塩基窒素および pH を測定し，NNA 含有量との関連について検討を行ったので合わせて報告する．

実験方法

1. **試料** 魚介加工品24，調味料10，肉および野菜入りレトルト食品9，みそ，醤油，チーズ27，アルコール飲料43，鶏卵10，調整粉乳5，計7種128検体でいずれも市販品である．

2. **試薬** NNA 標準物質として今回は次の7種のものを使用した．ジメチルニトロソアミン (DMNA)，ジエチルニトロソアミン (DENA)，ジノルマルプロピルニトロソアミン (D*n*-PNA)，ジイソプロピルニトロソアミン (D-*iso*-PNA)，ジノルマルブチルニトロソアミン (D*n*-BNA)，ジイソブチルニトロソアミン (D-*iso*-BNA)，メチルブチルニトロソアミン (MBNA) (関東化学社製95%以上)．なお，その他の試薬類はいずれも前報[4]に準じた．

3. **定量法および NNA の分離抽出法** 前報[4]に準じた．

4. **加熱装置** 電子レンジ：サンヨー EM 7000型，加熱度は調理，強，600Wの三段階付，照射距離 19cm

結果と考察

各種食品中の NNA の定量結果および VBN，pH の分析結果の一部を Table 1 に示した．

1. **魚介加工品**

1) 魚介干物15検体すべてからDMNAを検出し，その含有量は 3.0—37.9ppb の範囲であった．最も高い値 (37.9ppb) を示したものはさきいかで，これは今回調査した全ての食品中でも最高値である．一般的にイカ加工品は魚介類加工品のうちでも高い DMNA 含有量が認められるが，今回の供試さきいか3検体から得られた DMNA 値の範囲は 17.7—37.9ppb で前回の調査の結果とほぼ同程度の値であり，これは魚種の特異性であると思われる．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Occurrence of Volatile Nitrosamines, Volatile Basic Nitrogen and pH in Commercial Foods

Samples	No. of samples examined	DMNA	DENA	DnPNA	DisoPNA	MBNA	DisoBNA	VBN (mg%)	pH
		(ppb)							
Fish, dried	15	3.0–37.9 (15)	—	—	—	—	—	40–220	
dried		5.0–33.7 (4)	—	—	—	—	—	52–76	
city gas		13.9–152 (4)	—	—	—	—	—	28–60	
electric oven		6.7–89.6 (4)	—	—	—	—	—	11–93	
katsuobushi	3	2.6–6.8 (3)	—	—	—	—	—	54–114	
furikake containing katsuo	6	1.0–5.1 (2)	—	—	—	—	—	11–29	
Seasoning	10	—	2.3 (1)	—	—	—	—		4.3–6.9
Retort food containing meat & vegetable	9	0.7–1.3 (3)	—	—	—	—	—		5.1–6.9
Miso & soy sauce	18	0.4–0.7 (6)	—	—	—	—	—		av. 4.7
Cheese	9	—	—	—	—	—	—		
Alcoholic beverage									
sake	17	—	—	—	—	—	—		av. 4.5
sake lees	2	0.5 (1)	—	—	—	—	—		5.0
beer dom.	19	tr.–4.2 (19)	—	—	—	—	—		4.3
foreign	5	1.2–6.2 (5)	—	—	—	—	—		4.3
Other food									
dried milk	5	—	—	—	—	—	—		6.8
egg	10	0.7–2.9 (10)	0.9–2.4 (2)	—	—	—	—		

— : not detected, limit 0.1ppb (NNA), ( ) the number of samples detected NNA

われわれは前報において，スルメ等を都市ガスを用いて金網上で焼いた段階でNNA含有量がかなり増加するものがあることを認めた．焼く時に使用する都市ガスから発生する窒素酸化物がニトロソ化に関与しているようであるが，この原因を明らかにするために，電子レンジで照射したものとの比較を行った．電子レンジは使用法の表示通りに設定し，スルメおよび干し鱈をそれぞれ片面30秒間ずつ照射し，NNA生成量を比較した．その結果，スルメ1検体に焼く前より電子レンジ照射後に4倍のDMNA量増加が観察されたものの，他の検体では差がほとんど見られなかった．

一方，都市ガスで焼いた段階でのDMNAの増量は干し鱈1検体に見られ，焼く前に5ppbであったものが，焼くことにより152ppbと約30倍の増量が見られた．都市ガスによるDMNAの生成は著しく増量することのあることが認められるが，電子レンジからは窒素酸化物の発生がないと考えられることからDMNA生成の要因の一つには都市ガスから発生する窒素酸化物が関与していると推定された．

しかし，DMNA以外のNNAはいずれの場合の試料からも検出されなかった．

2) 煮干および桜えび5検体すべてからDMNAを検出し，その範囲は3.0—36.8ppbであった．煮干から36.8ppbと今回調査した試料の中でも高レベルのDMNAが検出された．煮干は汁のだし取りに用いられていることから注目される．しかし，桜えびは3検体とも3ppb前後と魚介干物類としては低い値を示した．

3) かつお節およびかつおのふりかけ9検体のうち5

検体からDMNAを検出した．かつお節3検体の含有量は 2.6—6.8ppb の範囲であった．また，かつおのふりかけ2検体の含有量は1.0と5.1ppbであり，かつお節と同レベルであることから，魚種に依存しているように思われる．

2. 調味料およびレトルト食品

1) 調味料（マヨネーズ，コンソメ等）10検体のうちチキンコンソメ1検体から 2.3ppb の DENA が検出された．

今回の調査全試料中DENAが検出されたのは1検体だけであった．その他のNNAはいずれの試料からも検出されなかった．前報で調査したチキン入りレトルト食品2検体からもDENAを検出していることから，鶏肉加工品に特異的であるとも考えられ，さらに調査する必要がある．

2) 肉および野菜入りレトルト食品9検体のうち3検体（麻婆豆腐の素，茶碗むし）から DMNA を検出した．その含有量は 0.7—1.3ppb の範囲であった．肉および高濃度の硝酸塩を含有する野菜等のレトルト食品は調理加熱高圧殺菌等の加工中にNNA生成を増加する要因となり得るのではないかと懸念されたが，DMNA 値は 1ppb 前後と低く，加工中に野菜の硝酸塩の関与はないとみてよい．

3. みそ，醤油およびチーズ類

1) みそおよび醤油18検体のうち醤油6検体からDMNA を検出した．その含有量は 0.4—0.7ppb と微量であった．みそからは NNA は検出されなかった．

今回，調査した醤油の DMNA 含有量は河端ら[1] も痕跡程度の DMNA を認めていることとほぼ同じレベルであり，今後とも，特に問題にするほどのものではないと思われる．

2) 輸入チーズ9検体（醗酵調整剤入り3，醗酵調整剤なしナチュラル5，プロセス1）いずれからも NNA は検出されなかった．チーズ中のNNA含有量に関しては若干の報告[5-7] がみられるが，最近，Gough ら[8] は英国の市販チーズ中の NNA 含有量の中で 0.1ppb 以下が約80％を占めていると報告していることや，Gray ら[9] がチーズの製造にあたっては高濃度の硝酸塩を使用しているが NNA 含有量は低いレベルであると述べていることを合わせてチーズ中での NNA 生成は特に問題はないと考える．

4. アルコール飲料

1) 日本酒17検体，酒粕2検体のうち，酒粕1検体から 0.5ppb と微量の DMNA を検出し，日本酒からは全く NNA は検出されなかった．人によっては毎日摂取されるが，現時点では日本酒からのNNA混入はないものと思われる．

2) ビール24検体のうち日本製ビール19検体から痕跡（2検体)—4.2ppb のDMNA，外国製ビール5検体から 1.2—6.2ppb の DMNA が検出された．しかし，DMNA 以外の NNA が検出されたものはなかった．

最近，Spiegelhalder ら[10] や河端ら[1] もビール中にNNA の存在を認めており，人によっては毎日 1l 位は摂取されるため，大きな問題となったが，ほとんどのビールから DMNA が検出されたことから，ビール製造工程上どこに生成原因があるか調査中である．

5. その他

1) 特殊調整粉乳5検体いずれからも NNA は検出されなかった．この特殊調整粉乳は，特に，乳幼児が利用することから個体数をふやし調査をする必要があると考える．

2) 前報[4] において，飼料中の DMNA の鶏卵への移行性を考慮して調査を行ったが，検体数が充分でなかったので，さらに調査を続けた．

鶏卵10検体すべてから 0.7—2.9ppb の範囲で DMNA が検出された．また，2検体からDENAを検出し，それぞれ，0.9と 2.4ppb であった．その他の NNA は検出されなかった．

今回，鶏卵から DMNA および DENA が検出されたことから，NNA を含む魚粉等の動物飼料からニワトリ体内へ吸収されると，鶏卵へ移行する可能性を示唆するものであった．

先に述べたように，鶏肉食品からも DENA の存在を認めていることから，鶏卵を含めて，これらの加工食品は特異的に DENA に関与すると考えられる．

要　約

1. 市販食品計128検体について TEA-GC 法によりNNA の分析を行った．一部の試料については同時に，VBN および pH を測定した．

その結果，亜硝酸塩が使用されていない魚介加工品のすべてから 3.0—37.9ppb の DMNA を検出し，前年度の結果と合わせて，一般食品中，高濃度の DMNA を含有しているものであることが判った．また，魚介干物，都市ガスで焼いたものおよび電子レンジで処理したものとのDMNA含有量の比較を行ったところ，大部分の試料は電子レンジで処理しても干物そのものより著しく増加するものがなかった．

一方，都市ガスで焼いた場合は著しく増加することのあることを認めた．

2. アルコール飲料のうち，ビールから DMNA が

痕跡—6.2ppb の範囲で高率に検出された．しかし，日本酒からは全く検出されなかった．

3. みそ，醤油，調味料，レトルト食品，鶏卵等においては一部の試料からNNAが検出されたが，いずれも低いレベルであった．

4. 今回調査した全試料のうち，鶏肉，鶏卵使用食品から DMNA，DENA が検出されたが，他の試料からは，DMNA，DENA 以外の高級揮発性 NNA は検出されるものはなかった．

文　献

1) 河端俊治ら：食品衛生学会第37回学術講演要旨集（東京），23，1979
2) Marquardt, H., Rufino, F., and Weisburger, J. H.: *Science*, **196**, 1000, 1977
3) 真木俊夫，田村行弘ら：東京衛研年報，**28-1**，145，1977
4) 真木俊夫，田村行弘ら：ibid., **29-1**，256，1978
5) Kröller, E.: *Dent-Lebensm. Rundschau*, **63**, 303, 1967
6) Möhler, K. and Mayrhofer, O. L.: *Z. Lebensm. Untersuch u. Forsch.*, **135**, 313, 1968
7) Sen, N. P., Smith, D. C., et al.: *J. AOAC*, **52**, 47, 1969
8) Gough, T. A., Webb, K. S., and Coleman, R. F.: *Nature*, **272**, 161, 1978
9) Gray, J. I., Irvine, D. M., and Kakuda, Y.: *J. Fd. Protection*, **42**, 263, 1979
10) Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G., and Preussmann, R.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **17**, 29, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 149-152, 1979

カラメルの品質について　カラメル中の4－メチルイミダゾールの定量法

広門雅子*, 宇佐美博幸*, 中嶋　巖*, 溝入　茂*, 遠藤英美*

Quality of Caramel Color　Determination of 4-Methylimidazole in Caramel Color

MASAKO HIROKADO*, HIROYUKI USAMI*, IWAO NAKAJIMA*, SHIGERU MIZOIRI* and FUSAYOSHI ENDO*

For isolating and quantitatively determining 4-methylimidazole (4-MeI) in caramel color, we modified the conditions of the liquid-liquid partition and the gaschromatography of the method of the Voluntary Specifications (the Federation of Food Additives Association in Japan) : the solvent of 5% Carbowax 20M+2%KOH was coated on the base washed column packing material, and diisopropyl phthalate was used as an internal standard.

The modified method gave a higher recovery rate of added 4-MeI than the Voluntary Specifications. A single analysis by the modified method required 5 hours.

We found that concentrations of 4-MeI in 20 commercial caramel colors ranged from 10 to 100 μg/g, and those in 3 other samples were greater than FAO/WHO limit of 200 mg/kg.

Keywords : 4-methylimidazol, caramel color, determination, liquid-liquid partition, gaschromatography, internal standard, diisopropyl phthalate

緒　言

近年，赤色2号などの合成タール色素の毒性が問題化し，安全性の不安が高まる中で，天然着色料の使用が急増しているが，天然物は品質のバラツキが多く，不純物の含有量が多いと考えられる．しかし我国では天然着色料に対する規格基準や表示義務など法的規制がまったくなく，早急な規格化が要求されている．

特にカラメルは，コーラなどの清涼飲料，しょう油・ソースなどの調味料およびプリン・米果・ビスケットなどの製菓等と幅広く使用され，その年間使用量は17,000 tといわれる．しかしカラメルの大部分は着色促進剤としてアンモニウム塩を用いて製造されており，製造過程で多くの含窒素複素環化合物（イミダゾール類やピラジン類）を生成することが報告[1-4]されている．またアンモニアで処理した糖蜜飼料を家畜に与えたところ激しい“hysteria”症状を起し[5,6]，Wiggins や Wise ら[7,8]がその成分を調べたところ，イミダゾール類10%とピラジン誘導体20%が含まれていた．イミダゾール類やピラジン類の中でも毒性が強いと報告[9]されている4－メチルイミダゾール（以下4-MeI と略す）は FAO/WHO 規格でも許容量が定められていることから，我々は，我国の市販カラメル中の 4-MeI 含量の実態を調査するため，定量法を検討することにした．

従来，カラメル中からの 4-MeI の分離定量法としては，日本食品添加物団体連合会（The Federation of Food Additives Associations in Japan）の自主規格（以下 FFAA 規格と略す）[10]や FAO/WHO 規格（以下 WHO 規格と略す）[11]，Wilks ら[12]および Fucks ら[13]の方法等がある．FFAA 規格では，液－液抽出－GC検出法，WHO 規格および Wilks らの方法では，セライトカラム分離－GC検出法を用いている．後者について追試したところ，均一なカラム充塡操作に困難を伴い，また 4-MeI の定量的な溶出に難点があることがわかったので，本法では FFAA 規格を採用し，これに改良を加えて定量法を確立し，市販カラメル44検体中の 4-MeI の分析を行い，天然添加物規格をつくる際の資料とした．

実験の部

試薬　4－メチルイミダゾール：東京化成(株)製の試薬を 40mmHg で減圧蒸留し，沸点 104～105° で留出した物質を標準品として用いた．フタル酸ジイソプロピル：内部標準品，東京化成(株)製．他の試薬は特にことわりのない限り，すべて JIS の特級品を用いた．

装置，器具　ガスクロマトグラフ：島津製作所(株)製 GC-5A 型（検出器 FID），単式プラニメーター：内田洋行(株)製

* 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

分析試料 都食品監視課より1977年11月—1979年3月にかけて当所に送付されたカラメル製造7社の製品44検体を用いた.

実験操作

1. 分配抽出 カラメル 10g を秤取し, 20%炭酸ナトリウム試液 10m*l* に溶かして, 250m*l* の分液ロートに入れ, クロロホルム—エタノール混液 (80 : 20)100m*l* を加え, 2分間強く振り混ぜて抽出し, 15分間放置した後, 下層を移す. 分液ロート内の水層にクロロホルム—エタノール混液 (80 : 20) 100m*l* を加えてさらに抽出する. 下層を初めの抽出液に合せ, 無水炭酸カリウム 10g を加えて強く振り混ぜ脱水し, 10分以内に乾燥ろ紙でろ過する. 残留物に抽出溶媒 10m*l* を加えて洗い, 洗液をろ液に合せる. 次いで, このろ液に 0.5N 硫酸 15m*l* を加えて約2分間振とうし, 静置した後水層をとる. この操作を2回繰り返し行い水層を合せる. この水層に粉末炭酸水素ナトリウムを少量ずつ加え, pH9 以上にした後, 分液ロートに移し, クロロホルム—エタノール混液 (80 : 20) 100m*l* を加えて約2分間強く振る. この抽出操作を2回繰り返し行い, クロロホルム層を合せ, 40° 以下の水浴上でロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固する. 濃縮残留物に内部標準物質としてフタル酸ジイソプロピルアセトン溶液 (1→1000) 1m*l* を加え, アセトンで全量 5m*l* とし試験溶液とする. また別に 4-MeI 250, 500, 750, 1000μg/m*l* の濃度のアセトン溶液それぞれ 1m*l* をとり, これに内部標準溶液 1m*l* を加え, アセトンで全量 5m*l* とし, 標準溶液とする.

2. ガスクロマトグラフィー(以下GCと略す) 試験溶液および標準溶液につき下記の条件でGCを行い, 標準溶液より得られたクロマトグラムの内部標準のピークの面積に対する 4-MeI のピークの面積の比より検量線を作成し, これを用いて試験溶液中の 4-MeI を定量する. GCの条件 : カラム管 内径 3mm×長さ 2m のガラス管, カラム充塡剤 Anakrom AB (60～80 *mesh*) に PEG 20M+KOH (5+2) をコーティング, 温度 カラム恒温槽 195° 試料注入口230° 検出器 230°, キャリヤーガス 窒素 35m*l*/min, 試料注入量 2μ*l*

実験結果および考察

1. 抽出溶媒の検討 カラメル中からの 4-MeI の抽出溶媒として, クロロホルム—エタノール (80 : 20) 混液 (FFAA 規格で採用) と塩化メチレンが考えられたが, 塩化メチレンはカラメル水溶液と振とうした際強固なエマルジョンを形成し, 分離が困難となった. クロロホルム—エタノールの混液は, カラメル水溶液との分離が非常に良く, カラメル色素もほとんど除去でき, 抽出層も下部にくるため分取操作が簡便で良好であったので, 本法ではこの混合溶媒を用いた. このクロロホルム—エタノール (80 : 20) 混合溶媒100m*l*を用い, 水層 (10m*l* および 30m*l*) からの 4-MeI の抽出率を検討したところ, 水 10m*l* の場合の1回の抽出率は 100%, 30m*l*, の場合の1回の抽出率は87%, 2回の抽出率は99.7%となり, 水層の量は 30m*l* 以下の少量におさえるべきであることが判明した. 従ってカラメルは, 10m*l* の20%炭酸ナトリウム溶液に溶かすことにした.

FFAA 法では, クロロホルム—エタノール混液で抽出した後, クロロホルム層に無水炭酸カリウム20gを加え, 3—4回脱水操作を繰り返し行っているが, この操作でカラメル色素は除去できるが 4-MeI の回収を悪くする原因となるので, 本法では 10g で1回のみにとどめた. 続いてクロロホルム層 200m*l* から酸への抽出率を検討した. 0.05N 硫酸 25m*l* (FFAA 法) および 0.5N 硫酸 15m*l* (15m*l* を用いたのは次の操作のクロロホルム層への転溶を考え, 水の総量を 30m*l* におさえるためである) のクロロホルム層からの 4-MeI の抽出率はそれぞれ57.5%および85%であり, 0.5N 硫酸の方が抽出率が高かった. (なお 0.5N 硫酸 15m*l* の2回の抽出率はほぼ100%であった.) この酸抽出操作でGC測定の際の妨害物質は除去されるので簡便化の目的でこの操作を略くことは出来なかった. また FFAA 法および WHO 法では, この酸抽出物を濃縮し中和した水溶液をそのままGC測定に用いているが, カラムの劣下も早く, テーリングを起こす原因となるので, 本法では水層から, さらにクロロホルム層に転溶させた. 全抽出操作による所要時間は約3時間であった.

2. GC の検討 テーリングを防ぐため, アルカリ処理した極性カラム (WHO 法で採用) を用いた. FFAA 法および WHO 法では, 内径 6.4mm, 長さ 1m 以下の太くて短いカラムを用いているが, 妨害物質との分離を良くするため, 本法では, 内径 3mm, 長さ 2m のカラムを用いた. Fig. 1 は代表的なカラメル抽出物のクロマトグラムであるが, テーリングもなく分離も良好であった. また, Wilks ら[12] は内部標準に 2-MeI を用いているが, 我国の市販カラメルの場合, 2-MeI の Rt と重なる物質が抽出されるので他の物質を検討したところ, 4-MeI より Rt の遅いフタル酸ジイソプロピルが内部標準物質として良好であった.

なお検量線は 40～400ng の間で直線性を示し, 検出限界は 2ng であった.

3. 添加回収実験結果 カラメル (砂糖を焙焼して作ったもので 4-MeI を含まない) 10g に, 100, 200, 500,

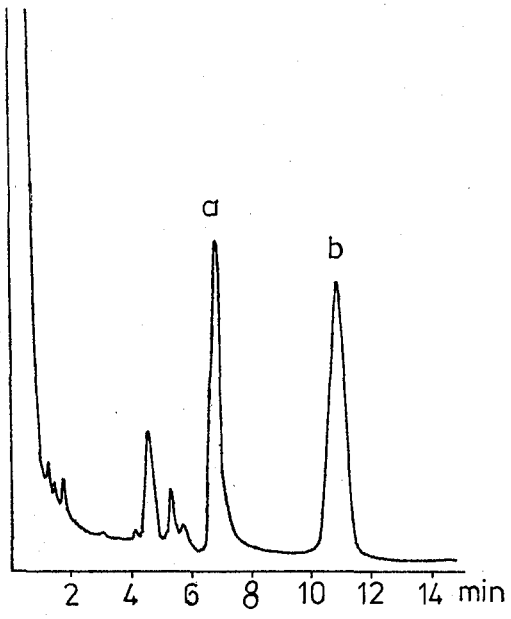


Fig. 1. Gaschromatogram of the Extract of Caramel Color Sample
a : 4-Methylimidazole
b : Diisopropyl Phthalate (I. S.)

Table 1. Recovery of 4-Methylimidazole Added to Caramel Color

Sample		4-Methylimidazole			
		Added (μg/g)	Recovered (μg/g)	Mean	Recovery (%)
A	1	100	66.9		
	2	〃	70.0	72.4	72.4
	3	〃	80.3		
A	1	200	166.0		
	2	〃	174.0	169.7	84.9
	3	〃	169.0		
B	1	500	465.0		
	2	〃	465.0	470.0	94.0
	3	〃	480.0		
B	1	1000	914.0		
	2	〃	938.0	923.3	92.3
	3	〃	918.0		

1000ppm の濃度になるよう 4-MeI を添加し，試験溶液の調製に従い回収実験を行った結果を Table 1 に示した．200ppm (FAO/WHO の許容量) 以上では，回収率85%をこえ，ほぼ満足する結果が得られた．参考のため，本法と FFAA および WHO 法の添加回収結果の比較を Table 2 に示したが，本法による回収率は他

Table 2. Comparison of Analytical Results got by Means of Three Different Methods (MFFAA, FFAA and WHO Method)

Sample	Added (μg/g)	4-Methylimidazole Recovery (%)		
		MFFAA[1]	FFAA[2]	WHO[3]
A	10	53.0	32.4	6.0
〃	50	67.0	50.9	4.3
〃	100	76.2	52.9	12.0
〃	200	84.9	50.0	10.6
B	500	94.0	51.0	
〃	1000	92.3	49.0	

1) Modified the Method of FFAA Method
2) Method of the Federation of Food Additives Associations in Japan
3) Method of FAO/WHO

Table 3. Concentration of 4-Methylimidazole in Various Caramel Colors (1977 and 1978)

Concentration of 4-Methylimidazole (ppm)			
1977		1978	
1	55.0	1	10.1
2	47.0	2	63.6
3	70.6	3	204.3
4	76.4	4	23.0
5	68.6	5	80.8
6	1627.0	6	6.6
7	22.1	7	11.4
8	80.3	8	5.8
9	106.8	9	6.9
10	264.5	10	21.6
11	93.1	11	16.2
12	78.4	12	19.8
		13	62.5

の方法に比べ高かった．

4. **市販カラメル中の 4-MeI の分析結果** 市販カラメル25検体中の 4-MeI の分析結果を Table 3 に示した．10ppm ～100ppm の 4-MeI を含む検体が多かった．200ppm (FAO/WHO の許容量) をこえたものは3検体で全体の 6.8% に相当した．最高含量は1627ppmであった．なお4-MeIが検出されなかった検体はTable 3 に示さなかったが，1977年度収去品2検体および1978

年度収去品9検体あった．これらはアンモニア法で作られたカラメルではないと考えられる．Table 3 より市販カラメル中の 4-MeI 含量は，1977年度より1978年度収去品の方が減少しているが，まだ 200ppm (FAO/WHO の許容量) をこえるものがあることを考慮すると，我国でも規格を早急に作成する必要があると考える．

要　約

カラメル中からの4-MeI の定量法として，FFAA 法および WHO 法等があるが，本法は FFAA 法に改良を加え，簡易化と回収率の向上を検討した．

1) 本法の分析所要時間は5時間であった．

2) 回収率は，200ppm (FAO/WHO の許容量) 以上ではほぼ満足する結果が得られた．100ppm 以下では回収率にバラツキが見られたが，それでも他の方法よりすぐれていることが認められた．

3) GCでは，注入試料溶液を有機溶媒にし，アルカリ処理した極性カラムを用いたので，テーリングを防ぐことができ分離も良好であった．検量線は40～400ngの間で直線性を示し，最小検出感度は 2ng であった．

4) 市販カラメル44検体について，4-MeI 含量の実態調査を行ったところ，10～100ppm の濃度のものが20検体あった．200ppm をこえたものは全体の 6.8% で，最も多いものは 1627ppm も含まれていた．

謝辞　試料収集に当り御協力いただいた東京都衛生局環境衛生部食品監視課ならびに食品機動監視班各位に深謝いたします．

(本研究の概要は第36回日本食品衛生学会学術講演会昭和53年12月で発表した．)

文　献

1) 河本正彦：農化，**36**, 407, 1962
2) 河本正彦：農化，**36**, 461, 1962
3) Grimmett, M. R. and Richards, E. L. : *J. Chem. Soc.*, 3751, 1956
4) Takayuki, S. and Richard, A. B. : *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 3, 1977
5) Wiggins, L. F. : *Sugar J.*, **18**, 18, 1956
6) Bertlett, S. and Broster, W. H. : *J. Agric. Sci.*, **50**, 60, 1958
7) Wiggins, L. F. and Wise, W. S. : *Chem. Ind.*, **23**, 656, 1955
8) Wiggins, L. F. : *Sugar J.*, **57**, 435, 1955
9) Nishie, K., Waiss, A. C., and Keyl, A. C. : *Toxicology and Applied Pharmacology*, **14**, 301, 1969
10) 日本食品添加物団体連合会：天然食品添加物規格（着色料），1975
11) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : *WHO Food Additives Series*, **7**, 35, 1976
12) Wilks, R. A., Johnson M. W., and Shingler A. J. : *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 605, 1977
13) Fucks, G. and Sundell, S. : *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 120, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 153-156, 1979

天然甘味料の実態調査（第1報） 市販天然甘味料製剤中のグリチルリチン酸およびステビオサイドの定量

中嶋 巖*, 広門雅子*, 宇佐美博幸*, 溝入 茂*, 遠藤英美*

Survey of Natural Sweeteners (I) Determination of Glycyrrhizic Acid and Stevioside in Commercial Natural Sweetener Products

IWAO NAKAJIMA*, MASAKO HIROKADO*, HIROYUKI USAMI*, SHIGERU MIZOIRI* and FUSAYOSHI ENDO*

Concentrations of glycyrrhizic acid and stevioside in 32 natural sweetener products (licorice and stevia products) commercially available were determined. Glycyrrhizic acid and stevioside in these products were respectively determined by high performance liquid chromatography and gas chromatography.

Results obtained were as follows: 1) the concentration of glycyrrhizic acid in licorice products ranged from 0.1 to 13.1%, 2) the concentration of stevioside in stevia products ranged from 1.1 to 8.3%.

The ratio of results to the labeled contents were from 3 to 75% for glycyrrhizic acid and from 32 to 83% for stevioside.

Keywords: glycyrrhizic acid, stevioside, natural sweeteners, licorice, stevia

緒 言

近年，合成甘味料サッカリンに対する発ガン性問題が起きてから甘草・ステビアなどの天然甘味料の使用が著しく増加している．しかし我国では，それらは天然物であるという理由で成分規格，使用基準もなく自由に使用されている．

今回我々は，天然甘味料の使用実態を把握する目的で，都食品監視課の先行調査との関連で収去された天然甘味料製剤中のグリチルリチン酸およびステビオサイド含量について分析を行ったのでその結果を報告する．

実験の部

試料 都食品監視課より昭和53年6月～54年1月にかけて当所に送付された天然甘味料製剤32種（甘草製剤21種，甘草・ステビア混合製剤8種，ステビア製剤3種）を用いた．

試薬 グリチルリチン酸標準溶液：グリチルリチン酸（丸善化成㈱）をメタノールにより2回再結晶を繰り返し精製した後，この50mgを50%メタノール溶液に溶かして50m*l*とした．ステビオサイド標準溶液：ステビオサイド（山陽国策パルプ㈱）をメタノールにより2回再結晶を繰り返し精製した後，この200mgを90%メタノール溶液に溶かし10m*l*とした．展開溶媒(i)：*n*-ブタノール：3N-アンモニア：エタノール（5：2：1）展開溶媒(ii)：クロロホルム：メタノール：水（30：20：4）クエン酸緩衝液（pH5.0）：M/10クエン酸ナトリウムおよびM/10水酸化ナトリウムより調製した．その他の試薬はすべてJIS規格特級品を用いた．

装置 高速液体クロマトグラフ：日立633型（検出器UV254nm）ガスクロマトグラフ：島津4A型（検出器FID）

実験操作

1. **試験溶液の調製**

i) グリチルリチン酸試験溶液 試料をグリチルリチン酸50mgを含むよう正確にはかり，水に溶かして50m*l*とした．

ii) ステビオサイド試験溶液 試料をステビオサイド100mgを含むよう正確にはかり，90%メタノール溶液に溶かして5m*l*とした．

2. **定性**

i) グリチルリチン酸の定性 薄層板（Kieselgel 60 F254, Merck）の下端より2cmの位置に試験溶液およびグリチルリチン酸標準溶液をそれぞれ5μl塗布し，展開溶媒(i)を用いて約15cm展開した後風乾し，紫外線下（254nm）で観察した．

ii) ステビオサイドの定性 薄層板（Kiselgel G, Merck）の下端より2cmの位置に試験溶液およびステビ

* 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

オサイド標準溶液をそれぞれ 5μl 塗布し，展開溶媒 (ii) を用いて約 15cm 展開した後，風乾する．次に，50%硫酸を噴霧し100°で10～15分間加熱し，それによって発色するスポットを観察した．

3. 定量

i) グリチルリチン酸の定量 試験溶液およびグリチルリチン酸標準溶液について，下記の測定条件により高速液体クロマトグラフィーを行ない定量した．

測定条件 カラム：Lichrosorb RP-18 (4mmϕ×25 cm)；移動相：クエン酸緩衝液 (pH5.0)：メタノール (47.5：52.5)；流速：1.25ml/min；圧力：180kg/cm^2；検出器：UV254nm

ii) ステビオサイドの定量 日本食品添加物団体連合会規格[1]を準用した．試験溶液 250μl をシリカゲル薄層板 (20×20) の下端より 2cm のところに約15cm線状に塗布する．また，同一薄層板のすみにステビオサイド標準溶液を塗布し，展開溶媒 (ii) を用いて約 15cm 展開した後，風乾する．次に，標準溶液の展開部分に50%硫酸を噴霧し100°で10～15分間加熱し，それによって発色するステビオサイド部分 (Rf=0.4～0.7) と同一の試験溶液のステビオサイド部分をかきとる．これを 100mlのビーカーに入れ，50% エタノール溶液 20ml を加えて約 50° 水浴中で10分間温浸した後，ろ過する．この操作を3回繰り返し，ろ液を合せ約 50° 水浴中で減圧濃縮し，残留物に20%硫酸 5ml を加えて2時間還流する．冷後，エーテル 80ml で2回抽出し，エーテル層を合せ，水20 ml で洗浄する．エーテル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し，ろ過後，ろ液を約 40° の水浴中で蒸発乾固する．この残留物をクロロホルム 2ml で溶かし，ジアゾメタン—エーテル溶液 0.5ml を加え室温で20分間放置する．この液に氷酢酸 0.5ml を加えてよく振り混ぜた後，これを試験溶液とする．また，ステビオサイド標準溶液についても同様に操作し，下記の測定条件によりガスクロマトグラフィーを行ない定量した．

測定条件 カラム：ガラス製 4mmϕ×2m；充てん剤：2%OV-17/chromosorb W (DMCS, 60—80mesh)；温度：注入口260°，カラム槽240°，キャリヤーガス：N_2 1.1kg/cm^2，H_2 0.8kg/cm^2，Air 1.0kg/cm^2

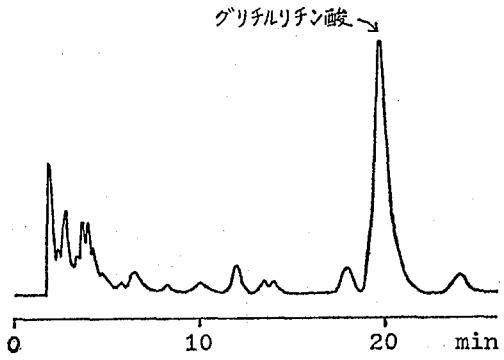


図 2. 甘草製剤の高速液体クロマトグラム

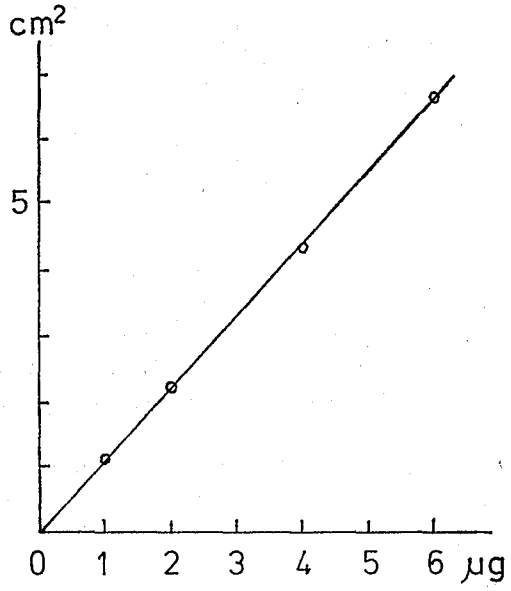


図 1. グリチルリチン酸の検量線

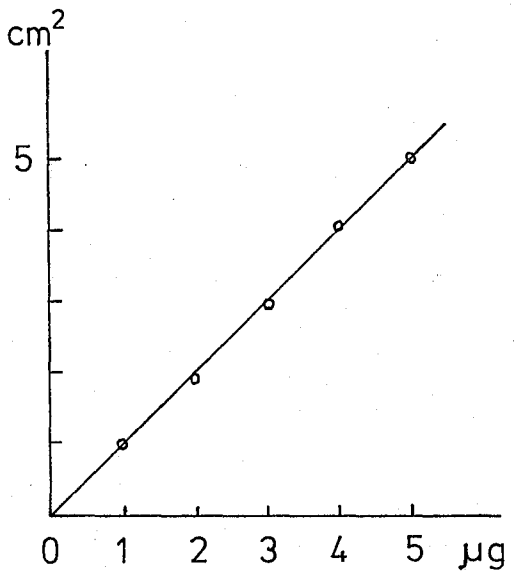


図 3. ステビオサイドの検量線

表 1. 天然甘味料製剤の表示，表示量およびグリチルリチン酸・ステビオサイドの測定値

		表示	表示量(%)	グリチルリチン酸測定値(%)	表示	表示量(%)	ステビオサイド測定値(%)
甘草製剤	1	甘草エキス	20.5	11.9			
	2	〃 (グリチルリチン)	18	8.5			
	3	〃 (高濃度)	20.5	9.5			
	4	甘草抽出成分	20.5	1.8			
	5	〃	20.5	2.2			
	6	甘草抽出精製物	16	4.4			
	7	天然甘草	3.05	0.1			
	8	グリチルリチン	20	12.2			
	9	天然物純グリチルリチン	16	8.3			
	10	〃	16	5.8			
	11	〃	16	8.1			
	12	天然物グリチルリチン	18	7.9			
	13	〃	16.5	4.7			
	14	〃	18	7.6			
	15	〃	16	6.3			
	16	天然グリチルリチン	18	11.8			
	17	〃	18	8.0			
	18	天然中純度グリチルリチン	23	7.8			
	19	〃	23	6.6			
	20	〃	23	7.3			
	21	天然物最純度グリチルリチン	17.5	13.1			
甘草・ステビア混合製剤	22	純グリチルリチン	11	3.3	ステビアサイド	6	2.4
	23	〃	11	3.7	〃	6	1.9
	24	〃	11	4.0	〃	6	2.1
	25	純良グリチルリチン	11	3.2	〃	5	2.5
	26	〃	14	4.0	〃	3	1.1
	27	天然物グリチルリチン	15	7.4	ステビオサイド	5	2.7
	28	グリチルリチン	3	1.5	〃	10	4.4
	29	〃	6	3.9	〃	10	4.2
ステビア製剤	30				〃	10	8.1
	31				〃	10	6.5
	32				高純度90%ステビオサイド	10	8.3

結果および考察

定性結果より，甘草製剤およびステビア製剤からそれぞれグリチルリチン酸およびステビオサイドが表示のとおり確認された．

グリチルリチン酸の定量法として，ガスクロマトグラフ法[2,3]，薄層クロマトグラフ法[4]，高速液体クロマトグラフ法（以下 HPLC と略す）[5,6] が報告されているが，このうち HPLC は簡易さ，精度等の点ですぐれており[6,7]，その有用性が知られている．今回我々は，甘草製剤中のグリチルリチン酸の定量を，他の添加剤（クエン酸ナトリウム等）の影響を考慮し，移動相にクエン酸緩衝液を用い，逆相型樹脂カラムによる HPLC で行なったところ，分離が良く，検量線も図1に示したように直線性を示し良好な結果が得られた．甘草製剤の高速液体クロマトグラムの1例を図2に示した．また，ステビア製剤中のステビオサイドの定量は，薄層クロマトグラフィーにより他の夾雑物を除き，日本食品添加物団体連合会規格に基づいてガスクロマトグラフィーを行なったところ検量線も図3に示したように直線性を示し良好な結果が得られた．

天然甘味料製剤の表示，表示量およびグリチルリチン酸とステビオサイドの測定値を表1に示した．

甘草製剤中のグリチルリチン酸含量は0.1～13.1%，ステビア製剤中のステビオサイド含量は1.1～8.3%であった．また，表示量に対するグリチルリチン酸およびステビオサイドの測定値の割合は，グリチルリチン酸では3～75%，ステビオサイドでは32～83%で，表示量の50%以下のものは，甘草製剤では29検体中22検体，ステビア製剤では11検体中7検体であった．また，表示の名称も甘草エキス，甘草抽出成分，グリチルリチン，純グリチルリチン，天然グリチルリチン等様々に用いられている．

以上，現在使用されている天然甘味料は精製度の高いものはあまり使用されておらず，その品質にも大きな差のあることが認められた．また，表示の名称も様々で，今後これらの統一が望まれる．

天然甘味料の使用は年々増加の傾向を示しており，今後も，種類，使用量および使用範囲がさらに広がることが予測されるので，引き続き実態調査を行なう必要があると思われる．また，使用範囲の広がりにより，天然甘味料製剤が複雑化することが考えられるので，系統的分離定量法についても検討していく予定である．

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53年度当研究所調査研究課題「天然甘味料の品質に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1) 日本食品添加物団体連合会：天然食品添加物規格，1975
2) 吉田豊三，寺門正夫，小野田光正：昭和49年度厚生科学研究報告，P. 186, 1975
3) 冠　政光，西島基弘，観　公子：東京衛研年報，29-1, 193, 1978
4) 田中一郎，寺山博行，吉沢　弘：昭和49年度厚生科学研究報告，P. 196, 1975
5) 小川俊太郎，吉田昭義，三谷洋子：薬誌，96, 1488, 1976
6) 小川俊太郎，吉田昭義，三谷洋子：薬誌，96, 122, 1976
7) 安田公夫，渋谷具久，野崎正勝：薬誌，98, 1545, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 157-162, 1979

石綿のろ過助剤としての安全性

荻野周三*, 安野哲子*, 小野綾子*, 大畠敏子*, 遠藤英美*

Sanitary Quality of Asbestos Used for the Filter Aid of Impurities in Beers or Food Additives

SHUZO OGINO*, TETSUKO YASUNO*, AYAKO ONO*, TOSHIKO OHATA* and FUSAYOSHI ENDO*

Food hygienic quality of asbestos used as a filter aid for the manufacture of beer, Japanese sake wine and kansui (lye) was investigated. Both samples AW (acid washed) and NAW (non acid washed) were tested in respect of following items: 1) loss on drying and ignition, 2) chemical composition, 3) migration into water, diluted hydrochloric acid, 4%-acetic acid and various kinds of alkali solution.

The loss on drying and ignition were 1.04% and 14.47% for AW, and 1.33% and 14.50% for NAW. Except for magnesium, the amounts of the elements migrated from samples into acids were almost the same as that of diatomaceous earth. Furthermore, samples were stable to alkali solution.

Keywords: 石綿 asbestos, ろ過助剤 filter aid, 移行 migration, 食品衛生 food hygiene

緒　言

石綿の繊維状構造は金網などのろ材に対して架橋を形成し，プレコートを容易かつ堅固にする働きがあり[1]，この特性を利用して長年，ビール，日本酒等の醸造食品工業に，またかんすいのろ過に幅広く利用されてきた．

一方，石綿の使用に対する衛生問題はおもに労働衛生面から，石綿暴露による石綿沈着症[2]あるいは肺癌[3]との関連で議論されているが，食品衛生学上の立場からはいまだに検討されていない．

そこで筆者らは，ろ過助剤としての石綿の品質について，食品中への溶出に関する試験を主体として検討を加えた．

なお試験を行なうにあたり，石綿と同じ目的に使用され，食品衛生法に規格が定められているケイソウ土の試験法[4]を参考とし，市販ケイソウ土の品質[5]と比較検討した．

実　験

1. 試料　ケベック（カナダ）産の Chrysotile（温石綿）2種を用いた．両者は同一メーカーの製品で，製造過程で塩酸による洗浄処理（Acid-Washed）を施したものと，そうでないものである．（以下前者を試料AW，後者を NAW と呼ぶ）

2. 試薬　希塩酸：塩酸 23m*l* に水を加えて 100m*l* とした．希硫酸：硫酸 5.7m*l* を水 10m*l* に徐々に加え，冷後，水を加えて 100m*l* とした．48%フッ化水素酸，30%炭酸ナトリウム溶液，30%炭酸カリウム溶液，炭酸ナトリウム・炭酸カリウム・トリポリリン酸ナトリウム・ピロリン酸ナトリウム（各12.5・12.5・2.5・2.5%）混合溶液，pH5.5 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液：0.2N-酢酸 95m*l* に 0.2M-酢酸ナトリウム溶液を加えて 1000 m*l* とした．pH8.2 ホウ砂・塩酸緩衝液：0.2M-ホウ砂溶液 600m*l* に 0.1N-塩酸を加えて 1000m*l* とした．5%過硫酸アンモニウム溶液，メチルイソブチルケトン（MIBK），0.1M- テノイルトリフルオロアセトン（TTA)-MIBK 溶液，2%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）溶液，10%モリブデン酸アンモニウム溶液，10%シュウ酸，20%塩化第一スズ—塩酸溶液，塩化第一スズ—エタノール溶液：塩化第一スズ 50g を塩酸 100m*l*に溶かし，その 7.5m*l* をとりエタノールで100m*l* とした．4%酢酸，20%ヨウ化カリウム溶液，亜鉛錠剤：日本ジャーレル・アッシュ製バインダー配合無ヒ素亜鉛を水適量と練り，錠剤成型器につめ 70° で20分間乾燥した．以上，MIBK と DDTC は和光純薬㈱製原子吸光分析用を，その他，特にことわりのないかぎりすべて試薬特級品を使用した．

3. 装置　原子吸光分析装置：日本ジャーレル・アッシュ AA-1-MARK Ⅱ型，微量ヒ素測定装置付，自記分光光度計：日立 356 型，ガラス電極 pH メーター：日

* 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

立一堀場製M-5型，高速振動試料粉砕機：平工 TI-500型，タングステンカーバイト製容器付．

4. 試験方法

1) **乾燥減量** 試料約 2g を精密にはかり，105°で2時間乾燥した後，その減量を測定した．（以下の各試験において，乾燥した試料とはすべてこの方法によって処理したものとする）

2) **強熱減量** 乾燥した試料約2gを白金ルツボに精密にはかり，1000° で恒量になるまで強熱した後，その減量を測定した．

3) **組成分析** 2)で強熱処理した試料を粉砕機を用いて粉砕し，その約 1g を白金ルツボに精密にはかり，無水炭酸ナトリウム約 5g を加えて十分にかき混ぜた後，加熱熔融した．さらに 1000° で30分間強熱し，冷後希塩酸 150m*l* を入れたビーカー中にルツボごと入れ，ホットプレート上で内容物を完全に溶解させた．溶液は蒸発乾固し，冷後残留物に塩酸 10m*l* と温水 100m*l* を加え，ホットプレート上で加温した．不溶性のケイ素をろ紙5種Bを用いてろ別し，ろ紙上のケイ素を5％温塩酸と温水で洗い，ろ液と洗液を合わせ，ホットプレート上で蒸発乾固し，さらに石綿付金網上で1時間加熱し，再び前述の方法で塩類を溶かした後，同一ろ紙を用いてろ過した．ろ紙上のケイ素を5％温塩酸および温水でよく洗った後，ろ紙は白金ルツボに入れて灰化し，さらに 1000° で強熱後重量をはかった．これに硫酸 0.1m*l* および48％フッ化水素酸10m*l* を加えて蒸発乾固し，ついで1000° で強熱後重量をはかり，その減量からケイ素量を求めた[6]．またケイ素以外の成分については，先のろ液を検液として直接原子吸光分析を行ない，その含量を求めた．

4) **水可溶物および液性** 乾燥した試料約 10g を精密にはかり，水 100m*l* を加え，沸騰水浴上で2時間加熱し，以下第四版食品添加物公定書（以下食添四と略す）中「ケイソウ土（乾燥品）」[4] の純度試験(1)水可溶物および液性の項の方法に準じて処理した．

5) **塩酸可溶物** 乾燥した試料約2g を精密にはかり，希塩酸 50m*l* を加え，約50°で15分間振り混ぜながら加熱し，以下食添四中，「ケイソウ土(乾燥品)」の純度試験(2)塩酸可溶物の項の方法に準じて処理した．さらに30，60，120および240分間加熱したものについて同様に処理し，浸漬時間と可溶分の関係をしらべた．

6) **酢酸可溶物** 乾燥した試料約2g を精密にはかり，4％酢酸 50m*l* を加え，約50°で15分間振り混ぜながら加熱し，冷後ろ過し，残渣を水で洗い，ろ液と洗液を合わせ，さらに水を加えて全量を 100m*l* とした．その50m*l* をあらかじめ秤量したガラス蒸発皿にとり，水浴上で蒸発乾固し，さらに105°で1時間乾燥し，冷後ガラス蒸発皿の重量をはかり，残留物の重量を求めて酢酸可溶分とした．さらに30，60および 120 分間加熱したものについて同様に処理し，浸漬時間と可溶分の関係をしらべた．

7) **アルカリ可溶物** 乾燥した試料約 2g を精密にはかり，30％炭酸ナトリウム溶液，30％炭酸カリウム溶液および炭酸ナトリウム・炭酸カリウム・トリポリリン酸ナトリウム・ピロリン酸ナトリウム（各 12.5・12.5・2.5・2.5％）混合溶液（以下アルカリ混合溶液と呼ぶ）50m*l* を加えたものそれぞれを約 50° で振り混ぜながら加熱し，冷後あらかじめ秤量したガラスろ過器3G4を用いてろ過し，残渣は水 100m*l* で洗った後，105°で2時間乾燥し，冷後ガラスろ過器の重量をはかり，浸漬前との重量差を求めてアルカリ可溶分とした．さらに30，60および 120 分間加熱したものについて同様に処理し，浸漬時間と可溶分の関係をしらべた．

8) **ヒ素** 乾燥した試料約 0.5g を精密にはかり，希塩酸 10m*l* を加え約70°で15分間振り混ぜながら加熱しすみやかに冷却した後ろ過し，残渣を希塩酸 10m*l*，ついで水 20m*l* で洗い，ろ液と洗液を合わせ，さらに水を加えて全量を 50m*l* とした．その 20m*l* をとり，塩酸 5m*l* を加え，ついで20％ヨウ化カリウム溶液 1m*l*，さらに2分後に20％塩化第一スズ—塩酸溶液 0.5m*l* を加え，10分間放置した後，微量ヒ素測定装置にセットし，亜鉛錠剤1錠を加えてヒ化水素を発生させ，原子吸光分析を行なった．

9) **水，塩酸，4％酢酸およびアルカリ可溶物の成分** 水，塩酸および4％酢酸可溶物の成分は，それぞれ4)～6)の試験で得られたろ液について直接原子吸光分析を行ない定量した．

アルカリ可溶物の成分は，7)の試験に準じて処理して得た浸出液をろ紙を用いてろ過し，残渣は水で洗い，ろ液は洗液と合わせて全量を水で 100m*l* とし，これを検液として次に述べる処理を行なった．

鉄，ニッケル，銅，マンガンおよびクロムについては，検液 20m*l* をビーカーにとり，希塩酸で中和した後，5％過硫酸アンモニウム溶液 1m*l* を加え，希塩酸または希アンモニア水を用いて pH4 に調整し，ただちに時計皿でふたをして15分間水浴上で酸化した．冷後分液ロートに移し，pH5.5 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 5m*l* を加え，ついで2％DDTC 5m*l* を加えて3分間振り混ぜた後，正確に MIBK 10m*l* を加えて5分間振り混ぜ抽出した．MIBK 層は乾燥ろ紙でろ過した後，原子吸光分析を行なった．

アルミニウムについては，検液 20m*l* を分液ロートに

とり，希塩酸で中和し，pH5.5酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 5m*l* を加えた後，正確に 0.1M-TTA—MIBK 溶液 10m*l* を加えて5分間振り混ぜ抽出した．MIBK 層は乾燥ろ紙でろ過した後，原子吸光分析を行なった．

マグネシウムおよびカルシウムについては，検液 5m*l* を分液ロートにとり，希硫酸で中和した後，pH8.2 ホウ砂・塩酸緩衝液 5m*l* を加え，以下アルミニウムに準じて処理し，原子吸光分析を行なった．

ケイ素については，検液 5m*l* をビーカーにとり，希塩酸で中和し，水を加えて全量を約 20m*l* とし，さらに塩酸 (1→2) 2m*l* を加え，ついで10%モリブデン酸アンモニウム 5m*l* 加え，3分間放置した後10%シュウ酸5m*l* を加え，約50°で15分間加熱した．冷後分液ロートに移し，正確に MIBK 20m*l* を加えて5分間振り混ぜ抽出した．この MIBK 層 10m*l* を分取し，正確に塩化第一スズ—エタノール溶液1m*l*を加え，15分間放置したのち，波長 770mμ で吸光度を測定した[7]．なおアルカリ混合溶液で浸漬した検液では，リンによる妨害を防ぐために，検液は 2m*l* をとり，10%モリブデン酸アンモニウムおよび10%シュウ酸溶液はそれぞれ 7m*l* を加えた．

なお以上の各試験においては標準溶液を試験溶液と同様に操作して吸光度を測定し，検量線を作成した．

結果および考察

石綿には工業的利用価値が高く，全石綿生産量の95%を占める Chrysotile[6]と，需要の低い Amosite，および近年他の石綿に比較してその暴露による中皮腫等の発生率の高さを指摘される Crocidolite (青石綿)[8] がある．その構造はそれぞれ，($3MgO \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$)，($1.5MgO \cdot 5.5FeO \cdot 8SiO_2 \cdot H_2O$) および ($Na_2O \cdot 3FeO \cdot Fe_2O_3 \cdot 8SiO_2 \cdot H_2O$) である．この3種の石綿を比較的簡便に類別するには，結合水の重量をはかればよい．Chrysotile の2分子の結晶水は 300° 以上で放出される[9]．そこで1000°における強熱減量を測定したが，理論的な結晶水の重量比13.00%は，実験値，NAW14.50%および AW14.47% とほぼ一致した．一方，理論的な Amosite と Crocidolite のそれは，共に2%以下であり，これにより Chrysotile と他の2者を明確に区別することができる．なお乾燥減量の測定値，つまり吸着水分は NAW で 1.33%，AW では1.04%であった．

Chrysotile はその構成元素であるマグネシウムおよびケイ素以外に種々の夾雑鉱物性物質を含有している．夾雑物の種類と量は，産地，鉱脈に左右され，さらに石綿繊維の長さによってその混入率が異なる．Table 1 に NAW，AW の2試料についての組成分析結果を示す．NAW と比較して，AW中のマグネシウムおよびケイ素量に減少はみられず，製造時の塩酸による洗浄は石綿自体の化学構造に変化をもたらさないと推定されるが，一方，鉄，アルミニウム等の夾雑物は明らかに減少していた．

ろ過助剤として石綿を使用するにあたり，衛生上の問題は，おもに食品中への夾雑物の移行である．そこで筆者らは水，希塩酸，4%酢酸および各種アルカリ溶液に対する溶出試験を行なった．なおアルカリ溶液はかんすいのろ過を想定したもので，特にアルカリ混合溶液の成分はリン酸塩を含有するかんすいの代表的な処方にならった．

水に対する溶解性は低く，水可溶分は NAW で試料 1g あたり 3.2mg，AW では 0.5mg であり，市販ケイソウ土 (乾燥品) における値 0.3～10.0mg と比較してほぼ同程度であった．

Table 1. Chemical Composition of Samples (%)

	Fe	Ni	Cu	Mn	Cr	Mg	Ca	Al	Ti	SiO_2
NAW (Non Acid-Washed)	7.02	0.24	0.0024	0.0845	0.15	25.74	0.09	0.64	0.0180	44.10
AW (Acid-Washed)	3.75	0.27	0.0015	0.0675	0.18	29.24	0.01	0.47	0.0041	46.63

Table 2. Elements Eluted from 1g of Sample into Distilled Water (mg)

	Fe	Ni	Cu	Mn	Cr	Mg	Ca	Al
NAW	T	T	T	T	T	0.70	0.26	T
AW	T	T	T	T	T	0.11	0.03	T

T : Trace <0.001 mg

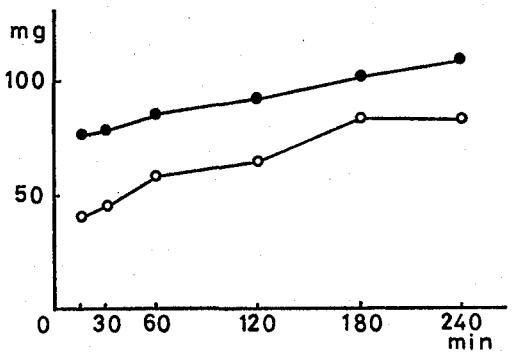


Fig. 1. Relation between Amount of Eluted Substances per Gram of Sample and Duration of Steeping in 10%-HCl
●——● NAW
○——○ AW

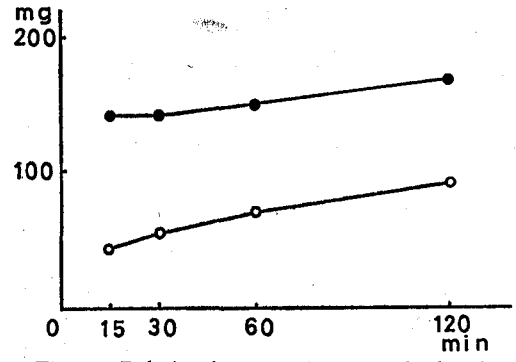


Fig. 2. Relation between Amount of Eluted Substances per Gram of Sample and Duration of Steeping in 4%-CH_3COOH
●——● NAW
○——○ AW

なお Table 2 に示すように，水可溶分の組成はマグネシウムとカルシウムを除き，すべて0.001mg以下であった．

また浸出液の液性は NAW が pH8.85，AW は pH 8.75で両者の間に顕著な差は認められなかった．

塩酸可溶分と浸漬時間の関係を Fig. 1 に示す．可溶分は15分間の浸漬で試料 1g あたり AW40.8mg および NAW76.9mg と，前述のケイソウ土の 8.8～43.8mg に比較して大きな値を示した．

一方，可溶分の組成は Table 3 に示すように，石綿成分であるマグネシウムが主体で，その溶出率は 240 分

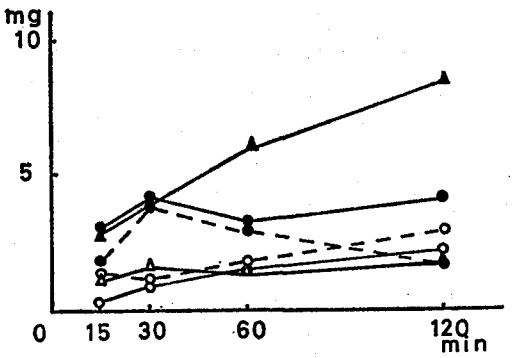


Fig. 3. Relation between Amount of Eluted Substances per Gram of Sample and Duration of Steeping in Alkali Solutions
●——● Na_2CO_3 NAW ○——○ Na_2CO_3 AW
●----● K_2CO_3 NAW ○----○ K_2CO_3 AW
▲——▲ Alkali Mixture NAW
△——△ Alkali Mixture AW

Table 3. Elements Eluted from 1g of Sample into 10%-HCl (mg)

	min.	Fe	Ni	Cu	Mn	Cr	Mg	Ca	Al
NAW	15	14.82	2.47	4.52*	0.41	0.52	101.6	0.77	1.09
	30	14.94	2.46	4.01*	0.42	0.50	110.2	0.93	1.25
	60	19.36	2.54	3.75*	0.45	0.63	127.1	0.84	1.19
	120	23.82	1.93	4.93*	0.52	0.74	146.8	0.87	1.98
	180	26.95	1.85	3.78*	0.55	0.77	177.0	0.95	2.63
	240	31.46	1.90	4.87*	0.55	0.87	189.8	0.97	2.98
AW	15	3.75	0.43	0.58*	0.33	0.35	58.6	0.16	1.17
	30	4.23	0.48	0.01*	0.31	0.40	63.4	0.18	0.66
	60	5.37	0.60	0.21*	0.35	0.50	80.5	0.19	0.99
	120	6.44	0.62	0.60*	0.38	0.62	85.1	0.17	1.70
	180	8.81	0.82	1.27*	0.42	0.78	114.4	0.21	2.17
	240	12.40	1.10	1.16*	0.44	0.98	145.4	0.21	2.32

* : in μg

Table 4. Elements Eluted from 1g of Sample into 4%-CH_3COOH (mg)

	min.	Fe	Ni	Mn	Cr	Mg	Ca	Al
NAW	15	3.55	0.61	0.25	0.09	20.6	0.28	0.16
	30	3.22	0.55	0.27	0.10	20.9	0.29	0.12
	60	3.06	0.68	0.27	0.10	21.6	0.31	0.11
	120	3.41	0.83	0.28	0.11	23.1	0.32	0.09
AW	15	0.02	0.03	0.09	0.06	6.0	0.05	0.06
	30	0.02	0.04	0.12	0.07	7.7	0.05	0.04
	60	0.02	0.05	0.15	0.08	9.9	0.05	0.03
	120	0.02	0.06	0.18	0.10	13.2	0.05	0.02

Table 5. Elements Eluted from 1g of Sample into 30%-Na_2CO_3, 30%-K_2CO_3 and Alkali Mixture Solutions (mg)

Solvent		min.	Fe	Ni	Mn	Cr	Mg	Ca	Al	Si
30%-Na_2CO_3	NAW	15	ND	ND	ND	ND	0.26	0.06	ND	ND
		30	ND	ND	ND	ND	0.36	0.07	ND	0.03
		60	ND	ND	ND	ND	0.34	0.07	ND	0.02
		120	ND	ND	ND	ND	0.30	0.06	ND	0.07
	AW	15	ND	ND	ND	ND	0.15	0.06	ND	0.04
		30	ND	ND	ND	ND	0.15	0.01	ND	0.05
		60	ND	ND	ND	ND	0.16	0.06	ND	0.06
		120	ND	ND	ND	ND	0.16	0.18	ND	0.10
30%-K_2CO_3	NAW	15	ND	ND	ND	ND	0.30	0.10	ND	0.01
		30	ND	ND	ND	ND	0.30	0.13	ND	0.01
		60	ND	ND	ND	ND	0.28	0.13	ND	0.04
		120	ND	ND	ND	ND	0.28	0.15	ND	0.08
	AW	15	ND	ND	ND	ND	0.11	0.06	ND	0.03
		30	ND	ND	ND	ND	0.12	0.08	ND	0.05
		60	ND	ND	ND	ND	0.13	0.03	ND	0.05
		120	ND	ND	ND	ND	0.14	0.13	ND	0.05
Alkali Mixture	NAW	15	0.01	ND	ND	ND	0.92	0.12	ND	0.27
		30	0.01	ND	ND	ND	0.97	0.13	ND	0.26
		60	0.01	ND	ND	ND	1.02	0.13	ND	0.33
		120	0.01	ND	ND	ND	1.22	0.15	ND	0.27
	AW	15	ND	ND	ND	ND	0.23	ND	ND	0.13
		30	ND	ND	ND	ND	0.28	ND	ND	0.15
		60	ND	ND	ND	ND	0.31	0.01	ND	0.08
		120	ND	ND	ND	ND	0.35	0.01	ND	0.15

ND : No Detection

間の浸漬でAWが50%，NAW では74%に達した．

夾雑物の溶出は前述のケイソウ土のそれに比較して同程度もしくはそれ以下にとどまり，さらにAWはNAWに比べ，総じて溶出率の低減傾向が認められた．

4%酢酸に対する可溶分は Fig. 2 に示すように，120分間の浸漬で 1g あたり AW 90.6mg，NAW では166.8

mg に達するが，これは可溶分を酢酸塩として秤量することに起因し，マグネシウムおよび夾雑物の溶出量は前述の希塩酸による浸漬に比べ，Table 4 に示すとおり，大幅に減少した．特にAWにおける鉄，ニッケル，カルシウムならびにアルミニウムについてその差が著しかった．

炭酸ナトリウムおよび炭酸カリウムに対する可溶分は Fig. 3 ならびに Table 5 に示すように，浸漬時間には無関係で，しかも微量にすぎず，カルシウム以外の夾雑物の溶出は認められない．アルカリ混合溶液による浸漬では，浸漬時間とともにわずかな溶出量の増加がみられマグネシウムおよびケイ素の溶出は，前述のアルカリによる浸漬に比べてやや多く，さらに NAW については微量の鉄の溶出を認めた．酸化マグネシウムは，リン酸塩と反応してリン酸マグネシウムカリウムとなり，溶出が促進されると考えられる．

石綿からのヒ素の溶出は微量で，試料1gあたりNAW 0.16μg，AW では 0.06μg にとどまった．

結　語

ろ過助剤として利用される石綿の品質について食品衛生学的な立場から種々の検討を加えた．特に重視すべき食品中への移行に関しては，酸性液に対する可溶分がやや大きな値を示したが，これは石綿成分である酸化マグネシウムの溶出に起因し，その他の石綿成分ならびに夾雑物の移行量は，同様の目的で用いられるケイソウ土のそれと比較して同程度もしくはそれ以下にとどまり，また製造時に塩酸による洗浄工程を経ることでその量はさらに減少することが確かめられた．一方，かんすい等の強アルカリ性液のろ過に対しては高い安定性を示し，これらの結果より判断して，ろ過助剤としての石綿の利用に，特に危惧すべき点は認められなかった．

文　献

1) 杉本泰治：沪過と沪過助剤，1967，地人書館
2) Cooke, W. E. : *Pulmonary asbestosis, Brit. Med. J.*, 2, 1024, 1927
3) Spencer, H. : *Pathology of the Lung*, 1962, The Mac Millan Co., N. Y.
4) 日本食品衛生協会：第四版食品添加物公定書，137，1978
5) 遠藤英美，小野綾子，安野哲子，荻野周三，大畠敏子，藤居　瑛：東京衛研年報，26-1，225，1975
6) Interscience Publishers : *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*, 6, 259, 1967, John Wiley and Sons, Inc.
7) 石井大道，武内次夫：分析化学，10，1394，1961
8) Sunderman, F. W. : 新しい毒性学，池田良雄訳，447，1973
9) 音馬　峻，竹　滋雄：粘土科学，14，116，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 163-166, 1979

AS, ABS 樹脂製器具および容器におけるアクリロニトリルモノマーの残留実態調査

吉田令子*, 渡辺悠二*, 佐藤憲一*, 遠藤英美*

Survey of Residual Acrylonitrile Monomer in AS and ABS Resin Food Containers

REIKO YOSHIDA*, YUJI WATANABE*, KENICHI SATO* and FUSAYOSHI ENDO*

A total of 101 AS and ABS resin food containers were investigated for the presence of acrylonitrile (AN) monomer in the material. AN monomer was determined by gas chromatography. It was found that residual AN monomer was less than 200 ppm in all of ABS and 80% of AS resin samples, whereas 16 AS resin samples were found to contain 204—376 ppm AN monomer. The latter were mostly containers used for storing food.

Keywords: acrylonitrile monomer, AS resin, ABS resin

緒　言

ポリスチレン（以下ＰＳと略す）は成形性，着色性，化学的安定性，機械的性質のよさ，低温での強度の低下が少ないなどの利点をもった合成樹脂であるが，耐衝撃性，耐熱性の低さなどの欠点をもっている[1]．その欠点を補うものとして，スチレンとアクリロニトリル（以下ＡＮと略す）との共重合体であるＡＳ樹脂，さらに機械的性質，耐候性にすぐれたスチレンとＡＮ，ブタジエンとの共重合体である ABS 樹脂が開発された．ＡＮの配合率はいずれの樹脂も20～30%である[2]．これらのＡＮ系合成樹脂は主に電気，工業用，包装用，文具，事務機類，玩具などに利用されており，一部調理用器具，食品保存容器などの台所用品にも利用されている．

この合成樹脂の衛生規則としては従来厚生省告示第434号による溶出規格試験が適用されていたが，1979年5月28日ＰＳの材質および溶出規格試験が新たに告示され(第98号)，スチレンの配合率が50%以上のものはこの適用をうけることになった．しかしこの規制は欧米諸国の規格基準と比較すると決して十分なものとはいえない．1977年3月11日FDA(米国食品医薬品局)は，飲料中へのＡＮモノマーの溶出を理由に AS, ABSを含む飲料用ＡＮ樹脂製容器の使用を禁止した[3]．ＡＮモノマーはスチレンモノマーや他の揮発性物質と異なり，室温における水への溶解度が８%と高く，また空気中に20ppm以上含まれると危険であるほど猛毒であるため[4]，微量の溶出も問題となる．そこで最近の市販製品中の残留実態を把握するため調査を行なったので報告する．

実験の部

1. 試料　スーパーマーケット，デパート，小売店などからの収去検体86種および買いあげ品15種の合計101種．使用状況別の内訳：飲食用器具（直接，口に接触するもの）12種，調理用器具（短時間，食品と接触するもの）41種，保存容器類（長時間，食品と接触する可能性のあるもの）39種，その他（調理器具などの一部分に使用されていて食品と直接には接触しないもの）９種．材質別の内訳：ＡＳ製品79種，ABS 製品22種．

2. 装置　日立163型ガスクロマトグラフ（FID検出器付き）

3. 試薬　1) ジメチルホルムアミド（以下DMFと略す）：水酸化カリウムを加え１～２日放置後蒸留し，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ことを確認したもの．

2) ＡＮ：市販のＡＮ（98%）を用いた．

4. 試験法　1) **試験溶液の調製**　試料を破砕し，その約 0.5g を精秤し，DMF を加えて冷暗所に24時間放置したのちよく振とうして溶かし，DMF を用いて全容を 10m*l* とした．

2) **ＡＮ標準溶液の調製**　ＡＮ0.1g を精秤し，DMF に溶かし 100m*l* とし標準原液とする．この標準原液1m*l* をとり DMF を用いて 100m*l* としたのち，各1, 2, 3, 4m*l* をとり DMF を用いて各々全容 10m*l* とし，この液を 1, 2, 3, 4μg/m*l* の標準溶液とした．

3) **ＡＮモノマーの定量**　試験溶液について次の条件でＧＣを行ない，同様に操作して得た標準溶液の示すピーク高から検量線を作成し，これを用いて定量を行なった．なお検出限度は 0.2ppm である．

ＧＣ操作条件

カラム：Porapak R 80/100mesh，ステンレス製3mm

* 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, Hyakuninchō 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. AS，ABS樹脂製品（材質）中のANモノマー量および揮発性物質量

No.		品名	AN[1]	揮発性物質[2]	材質
飲食用器具	1	ふた付コップ(本体)	12	1,300	AS
	2	〃 (ふた)	184	7,100	〃
	3	コップ	64	820	〃
	4	〃	256	4,360	〃
	5	スプーン	38	3,520	〃
	6	フォーク	33	3,070	〃
	7	ナイフ	37	3,400	〃
	8	ランチセット	90	1,880	〃
	9	割子飯器	30	1,350	ABS
	10	幕内弁当箱	80	1,200	〃
	11	ちらしずし桶	46	3,530	〃
	12	弁当箱	6	410	〃
		平均	73	2,660	
調理用器具	1	メジャーボール	33	1,040	AS
	2	〃	48	6,700	〃
	3	〃	52	1,830	〃
	4	〃	61	1,790	〃
	5	〃	65	1,920	〃
	6	〃	68	1,750	〃
	7	〃	71	2,800	〃
	8	メジャーカップ	33	5,610	〃
	9	〃	38	820	〃
	10	〃	39	860	〃
	11	〃	46	1,290	〃
	12	〃	56	1,780	〃
	13	〃	234	2,970	〃
	14	〃	260	3,490	〃
	15	おろし器	34	3,330	〃
	16	〃	56	1,780	〃
	17	〃	132	3,080	〃
	18	〃	238	3,210	〃
	19	しぼり器(しぼり部)	60	1,780	〃
	20	〃	188	4,800	〃
	21	野菜調理器(容器部)	4	560	〃
	22	〃	8	10,320	ABS
	23	〃	12	1,410	〃
	24	〃(調理部)	20	1,180	〃
	25	〃(〃)	26	1,550	AS
	26	〃	32	1,090	ABS
	27	〃	68	2,520	〃
	28	バット	59	2,290	AS
	29	しょうゆさし(ふた)	97	1,390	〃
	30	〃 (〃)	111	1,510	〃
	31	シェーカー	144	5,160	〃
	32	つぎ口	26	1,160	〃
	33	〃	138	2,770	ABS
	34	ドーナッツ調理器	30	1,460	〃
	35	卵切り器	40	1,370	〃
	36	〃	54	3,500	〃
	37	そば湯桶(ふた)	0	920	〃
	38	〃 (本体)	28	960	〃
	39	〃 (〃)	12	570	〃
	40	はし入れ(本体)	0	270	〃
	41	〃 (ふた)	48	1,310	〃
		平均	68	2,343	

No.		品名	AN[1]	揮発性物質[2]	材質
保存用容器	1	密封容器	22	1,270	AS
	2	〃	24	1,400	〃
	3	〃	38	1,520	〃
	4	〃	68	2,370	〃
	5	〃	104	2,760	〃
	6	〃	108	2,550	〃
	7	〃	112	2,230	〃
	8	〃	118	1,300	〃
	9	〃	178	3,960	〃
	10	〃	198	2,400	〃
	11	〃	204	2,420	〃
	12	〃	244	2,300	〃
	13	〃	292	3,080	〃
	14	〃	300	2,950	〃
	15	〃	316	4,330	〃
	16	〃 (ふた)	46	1,400	〃
	17	〃 (〃)	46	1,090	〃
	18	〃 (〃)	56	1,300	〃
	19	パンケース(本体)	10	950	〃
	20	〃 (ふた)	46	930	〃
	21	バターケース	316	4,380	〃
	22	ポット (本体)	92	2,350	〃
	23	〃 (ふた)	308	3,730	〃
	24	〃 (本体)	36	800	〃
	25	〃 (ふた)	64	2,980	〃
	26	水さし	376	4,100	〃
	27	料理用ジャー	194	4,580	〃
	28	冷凍庫用水筒	288	4,900	〃
	29	油ひき器(本体)	32	1,340	〃
	30	〃 (〃)	38	1,550	〃
	31	〃 (〃)	56	2,350	〃
	32	〃 (〃)	88	1,090	〃
	33	〃 (〃)	98	2,130	〃
	34	〃 (〃)	98	2,130	〃
	35	〃 (〃)	98	2,130	〃
	36	〃 (〃)	270	2,280	〃
	37	〃 (ふた)	212	2,240	〃
	38	漬けもの器(本体)	240	4,820	〃
	39	製氷器	20	3,540	ABS
		平均	140	2,460	
その他	1	漬けもの器(ふた)	90	4,140	AS
	2	〃 (押棒)	90	2,690	〃
	3	氷鉢(外型)	18	1,100	〃
	4	〃 (〃)	61	2,410	〃
	5	からし入れ(ふた)	38	2,480	〃
	6	トレー	124	7,390	〃
	7	ごますり器(ハンドル)	7	100	ABS
	8	野菜調理器(ふた)	12	380	〃
	9	〃 (〃)	16	1,450	〃
		平均	51	2,460	
総平均			95	2,440	

(ppm)

1) AN : Acrylonitrile monomer

2) 揮発性物質 : Toluene, Ethyl benzene, *iso*-Propyl benzene, *n*-Propyl benzene, Styrene monomer

表 2. 残留ANモノマー量の分布

		計	0～49	50～99	100～199	200～299	300～399(ppm)
飲食用器具	AS	8	4	2	1	1	0
	ABS	4	3	1	0	0	0
調理用器具	AS	27	10	10	4	3	0
	ABS	14	11	2	1	0	0
保存容器	AS	38	10	9	7	7	5
	ABS	1	1	0	0	0	0
その他	AS	6	2	3	1	0	0
	ABS	3	3	0	0	0	0
計	AS	79	26	24	13	11	5
	ABS	22	18	3	1	0	0

表 3. 原料スチレンに起因する揮発性物質量の分布

		計	0～999	1000～1999	2000～2999	3000～3999	4000～4999	5000≦(ppm)
飲食用器具	AS	8	1	2	0	3	1	1
	ABS	4	1	2	0	1	0	0
調理用器具	AS	27	3	13	3	4	1	3
	ABS	14	4	6	2	1	0	1
保存容器	AS	38	3	10	16	3	6	0
	ABS	1	0	0	0	1	0	0
その他	AS	6	0	1	3	0	1	1
	ABS	3	2	1	0	0	0	0
計	AS	79	7	26	22	10	9	5
	ABS	22	7	9	2	3	0	1

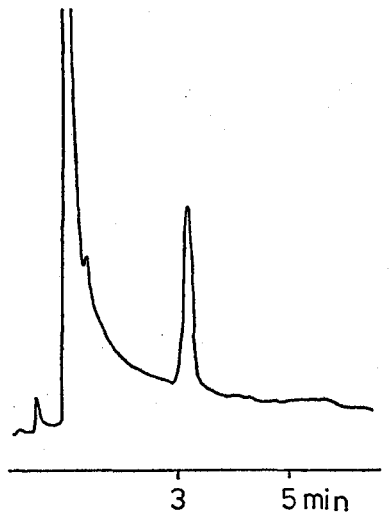


図 1. アクリロニトリルモノマーのガスクロマトグラム

×2m; カラム槽 190°, 注入口 240°; キャリヤーガス: N_2 30m*l*/min; 保持時間 3.1 分 (図 1 参照)

結果と考察

AS, ABS 樹脂製品 (材質) 中の残留ANモノマー量を表 1 に示した. なお参考までに原料スチレンに起因する揮発性物質量 (toluene, ethyl benzene, *iso*-propyl benzene, *n*-propyl benzene, styrene monomer の総計) をあわせ示した. このデータをまとめたものを表 2, 表 3 に示した.

用途的にはAS製品は保存容器に最も多く次いでメジャーカップ, コップなどに, ABS 製品は主に調理用器具, 和食器などに利用されていた.

残留ANモノマーは ABS 製品 2 検体を除き検出され (99/101 検出率 98%), 最高は水さしの 376ppm, 最低は野菜調理器の 4ppm であった. 用途別では保存容器類が残留の多い傾向を示した (表 1 参照).

材質別にみるとAS製品の検出率は 100% (79/79) で, その残留量は 4～376 (平均114) ppmであり業界の指導基準といわれる 200ppm を超えて検出されたものが 20% (16/79) あった (表 2 参照). また業界ではAN系樹脂はすべて調理用器具に使用し, 食品容器には使用し

ないことを申しあわせているが，ＡＳ樹脂は用途的に食品を長時間保存する可能性のある密封容器，バターケース，ポットなどに多く利用されており（48%，38/79），内容食品へのＡＮモノマーの移行がけ念される．

ABS 製品の検出率は91%（20/22）で，最高は 138 ppm，平均32ppmであり，50ppm以下のものが81%（18/22）とＡＳ製品に比較して残留量は少なかった（表１参照）．これはＡＳ樹脂と ABS 樹脂の重合法の違いによるものではないかとおもわれる．用途も器具，容器などの部品として利用されているものが多く長期接触の可能性があるものは製氷器だけであったことから，ABS 製品はその使用状況からみてもあまり衛生上の問題はないと考えられる．

しかし西独の規格では最終製品中のＡＮモノマー最高残留量をＡＮ共重合物で5ppm 以下としており，米国のそれでは非アルコール性食品に使用を制限しＡＳ樹脂で50ppm以下，ABS 樹脂で 11ppm 以下としている[5]ことから，これにあてはめてみると適合するものはＡＳ樹脂では25検体（32%）ABS 樹脂では５検体（23%）のみであった．またオランダ，ベルギー，スペインはＡＮモノマー移行量として 0.3ppm 以下と規定している．したがってモノマーの溶出についても検討の必要が認められる．

原料スチレンに起因する揮発性物質量についてみると厚生省告示第98号のＰＳの新規格 5,000ppm を超えたものが表３よりＡＳ製品では５検体，ABS 製品では１検体認められ，ＡＮモノマーを含めるとさらにＡＳ製品で２検体増え全体では８%（８/101）が不適であった．また揮発性物質はＡＳ製品に ABS 製品より多く残留していることがわかる．たとえば 2,000ppm 以上検出されているものに着目すると，ABS 製品では27%（6/22）であるのに対しＡＳ製品では58%（46/79）である．これは原料スチレンの配合比率が現在我国では ABS 樹脂 40～50%，ＡＳ樹脂70～80%となっているためである．

この配合比率より揮発性物質量を逆算すると 5,000 ppmを超えるものがさらに12（ABS 製品５，ＡＳ製品７）検体増え，全体で約20%の不適率となる．また平均値も 2,440ppm と，1977年ＰＳ製食品容器実態調査結果において，ほとんどのものが 2,000ppm 以下であった[6]ことに比較すると高い値を示している．これはＡＳ，ABS 樹脂の用途が緒言に述べたように電気，工業用，雑貨に多く用いられており，食品容器として繁用されているＰＳのように総揮発性物質を低く抑える（1974年11月自主規制基準 5,000ppm）[7]といった特別な配慮が，なされていないためではないかとおもわれる．

ま と め

食品に接する AS，ABS 樹脂製品（材質）中のＡＮモノマーの残留実態について調査した．その結果，材質中のＡＮモノマー量はＡＳ樹脂製品では約80%が業界の指導基準といわれる 200ppm 以下であり，ABS 樹脂製品ではすべて 200ppm 以下であった．なおその約80%は 50ppm 以下である．

しかしＡＳ製品では 200ppm を超えるものが 16 検体もあり保存容器として多く利用されていることから，その移行性が問題となるので，ひき続きＡＮモノマーの溶出について検討を行なう予定である．

謝辞 本調査に御協力いただいた衛生局環境衛生部食品監視課および葛飾食品機動班の各位に深謝いたします．

文 献

1) プラスチック技術協会編：プラスチック読本，116，1954，㈱プラスチック・エージ
2) 村橋俊介，小田良平，井本 稔：プラスチックハンドブック，464，1961，朝倉書店
3) FDA：Chemical week，22，1977
4) 高分子学会編：高分子辞典，6，1971，朝倉書店
5) 塩ビ食品衛生協議会編：技術参考資料，98，187，1978
6) 渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，遠藤英美：東京衛研年報，28-1，175，1977
7) 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，107，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 167-172, 1979

市販ハンバーグの品質の統計的解析

深野駿一*, 西田甲子*, 牛尾房雄*, 道口正雄*

Statistical Analysis on Quality of Commercial Hamburg Steak

SHUNICHI FUKANO*, KOKO NISHIDA*, FUSAO USHIO* and MASAO DOGUCHI*

Keywords: ハンバーグ hamburg, 主成分分析 principal component analysis, 相関表 correlation table, コレステロール cholesterol, アミノ酸 amino acids, たん白質 protein, 脂質 fat, でん粉 starch, 価格 price, β-シトステロール β-sitosterol

緒　言

近年日本人の動物性たん白質摂取量は年々増大し，特に畜肉製品の伸びは高く中でも加工食品としてのハンバーグは手軽なたん白質源として一般家庭に浸透している．消費者にとって，これら市販ハンバーグの栄養学的価値を知ることは重要な事と思われるが適当な調査が行われていない．そこで今回は都内小売店より購入したハンバーグについて成分分析，コレステロールおよびアミノ酸分析を行い各成分について検討を加えた．しかし一つの製品に対して栄養成分は多種類あり，あるものはすぐれているがあるものは劣っている場合も多くその製品の価値判断が困難な場合が多い．そこで各成分について，さらに多変量解析の一手法である主成分分析により各製品の総合的位置づけを行ったので報告する．

試料および実験方法

1. 試料

昭和53年9月都内にて購入したもので，日本農林規格[1]に準じて分類すると，冷凍食品ハンバーグ10検体，チルドハンバーグ7検体，レトルトパウチハンバーグ4検体，その他3検体でそのうち5検体のみが日本農林規格品であった．試料No 25は市販試料と比較するため特別に調製した試料でその配合割合は，牛肉40%，豚肉17%，生パン粉7.6%，玉ねぎ25.3%，卵4.4%，牛乳3.8%，生クリーム0.3%，赤ワイン0.6%，香辛料である．これらの試料を凍結乾燥後ミキサーにて粉末とし，各成分の分析に供した．

2. 実験方法

1) **水分**　試料と海砂を混合し常圧加熱乾燥法により100℃で乾燥した．なおこの水分含量は凍結乾燥法による水分量とも一致した．

2) **たん白質**　ケルダール分解した試料の一部をミクロケルダール蒸留装置により，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．

3) **脂肪**　ソックスレー脂肪抽出法に従って定量した．

4) **でん粉**　チルドハンバーグの日本農林規格測定法に従い，アルカリ分解後ソモギー変法により定量した．

5) **灰分**　常法に従い灰化した．

6) **コレステロール**　日本油化学協会の基準油脂分析試験法 2, 4, 23, 1-17ステロール分析法[2]に準じてガスクロマトグラフィーにより分析した．コレステロールは99%以上含有の SIGMA 社製を標準物質とし，カンペステロールとβ-シトステロールは MERCK 社製のβ-シトステリンを標準物質としガスクロマトグラフィーのピーク面積法により定量した．

7) **アミノ酸**　試料をソックスレー抽出器で脱脂後，一般のアミノ酸は塩酸分解法，シスチン，システィンは過ギ酸酸化法，トリプトファンはアルカリ分解法により加水分解し，常法に従いアミノ酸自動分析計日本電子 JLC. 6AH により定量した．

8) **エネルギー**　3栄養素より常法により算出した．

3. 主成分分析法

各試料について測定されたたん白質，脂肪，コレステロール，アミノ酸含量等の特性値を相互に比較するためには単位または測定値の重みが異なるため，まず測定値の標準化を行った．これより各試料についての特性値の分散・共分散行列を作成し，常法により総合特性値である第1および第2主成分等を求めた．さらに試料の分類あるいは順位づけをする目的で各主成分上に試料の散布図を描かせた．なお使用したコンピューターは Hitac 10 Ⅱ (4KW) である．

結果および考察

得られた結果は平均値，標準偏差，最大値，最小値と

* 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. 市販ハンバーグの成分測定値

No	エネルギー	水分	たん白質	脂質	でん粉	灰分	コレステロール	カンペステロール	β-シトステロール	価格
	Kcal	g	g	g	g	g	mg	mg	mg	¥
1	221	60.0	14.2	12.5	5.6	1.5	64	1	2	164
2	257	55.7	12.6	16.3	7.9	1.3	41	1	2	200
3	362	46.1	13.2	29.3	3.1	1.1	65	0	1	272
4	193	64.7	13.2	10.7	3.8	1.4	69	2	2	186
5	221	57.5	12.3	11.4	6.6	2.3	53	9	20	107
6	258	55.1	13.5	17.0	6.3	2.7	46	2	3	88
7	232	57.4	14.1	13.4	5.5	2.3	58	0	2	96
8	219	58.6	13.2	12.0	4.6	2.7	49	2	2	100
9	287	52.8	12.8	20.8	6.4	2.5	51	0	3	67
10	291	52.9	11.2	21.2	8.1	1.7	35	2	8	117
11	255	54.7	12.7	15.7	8.0	2.1	40	1	5	96
12	218	55.8	10.2	9.8	9.8	2.6	30	1	5	119
13	202	60.3	13.9	10.0	5.2	2.7	35	1	3	83
14	190	61.3	12.7	8.4	3.9	2.5	28	4	12	77
15	208	60.4	10.7	11.3	8.7	2.5	37	3	8	54
16	203	62.0	11.0	11.4	6.1	2.4	39	8	11	109
17	271	51.5	15.1	15.8	7.8	1.7	48	2	5	95
18	293	52.5	11.7	21.2	7.4	1.6	44	2	5	117
19	224	58.4	13.6	12.8	3.5	2.6	31	0	5	69
20	211	57.4	10.0	9.6	7.9	2.6	30	2	4	109
21	221	58.4	13.3	11.6	7.3	1.9	40	4	12	105
22	281	53.7	11.6	19.7	7.8	1.6	44	2	7	117
23	191	62.0	11.2	9.1	6.7	2.5	37	5	8	100
24	221	57.3	11.2	11.6	8.0	2.7	48	6	18	63
25	221	59.3	17.8	12.0	4.7	1.8	74	2	4	300
最大値	362	64.7	17.8	29.3	9.8	2.7	74	9	20	300
最小値	190	46.1	10.0	8.4	3.1	1.1	28	0	1	54
平均値	238.0	57.03	12.68	14.18	6.43	2.13	45.4	2.5	6.3	120.4
標準偏差	40.4	3.99	1.67	4.90	1.75	.51	12.4	2.3	4.9	59.6

単位：試料100gに対する値を示す.

共に表1に示した.

1) エネルギーは国民栄養調査[3]によれば所要量以上摂取しており，他の食品からも容易に得られるためそれほど問題とはならないが，最高値と最低値では2倍ほどの差があり製品によるバラツキが大きかった.

2) 水分含量は変動係数7.0と小さい値を示し特に水分の多い製品はみあたらなかった.

3) たん白質含量は10.0~15.1%範囲内で標準偏差も小さく製品中のたん白質含量は一定で，でん粉，野菜等を多量に添加した製品はみあたらなかった. またこのたん白質含量は水産ねり製品のそれとほぼ等しい値であった. なお最高値の17.8%は試作品の値である.

4) 脂肪含量は最高値，最低値ともにエネルギーのそれと一致しており脂肪含量がエネルギー差の原因であることを示している. なお最高値29.3%は日本農林規格のチルドハンバーグについて定められている28%以下をうわまわる値であるが，この製品は農林規格品ではなかった.

5) でん粉含量の最高値と最低値とは3倍の差があり変動係数も27.2と大きいが，チルドハンバーグの上級品

表 2. 市販ハンバーグの各成分および原材料間の相関表

たん白質	脂質	でん粉	糖類	灰分	コレステロール	シトステロール	価格	牛肉	豚肉	とり肉	植物たん白	肉類等	
−359	992	51	−657	−726	134	−180	190	70	562	44	−698	−41	エネルギー
	−444	−784	−372	−93	734	−382	585	133	−304	135	107	−172	たん白質
		97	−581	−661	25	−150	91	19	567	26	−643	−3	脂質
			304	219	−516	499	−468	−102	151	−37	−170	220	でん粉
				679	−721	353	−587	−140	−314	−214	713	45	糖類
					−413	369	−555	−303	−415	−28	542	375	灰分
						−255	833	394	−59	115	−493	−171	コレステロール
							−320	−202	−183	248	1	156	シトステロール
								654	6	−179	−436	−284	価格
									−245	−547	−182	−290	牛肉
										−183	−380	−58	豚肉
											−153	−225	とり肉
												−179	植物たん白

単位：1×10^{-3}，有意水準：0.472（危険率1％）

に定められている日本農林規格でも10％以下で，今回調査の全ての製品について規格以下であった．

6) 灰分は平均値2.13％で，原料である牛肉，豚肉類の1％より高く，玉ねぎの0.5％より高い，しかし脱脂大豆や市販されている植物たん白質の灰分は6.0％と高い事からこれら植物たん白の添加による影響が考えられる．

7) ステロール類含量はコレステロールが最も高く全体の約84％を占め植物に由来するシトステロール類はわずかであった．シトステロール類は製造の際使用される揚げ，又はばい焼油あるいは野菜などに由来するものと思われる．なお今回調査の製品からはNo 5を除いて多くの植物油に存在するスティグマステロールは検出されなかった．このスティグマステロールはナタネ油中に存在しないことから大部分の製品はナタネ油を主に使用しているものと思われる．No 5の製品はスティグマステロールを4mg/100g含有しており大豆油等が使用されているものと考えられる．なお表中に0mg/100gとあるのは検出限界以下（1mg/100g未満）のものでチャート上ではわずかではあるがピークがみられtraceを意味する．

相関係数による考察 以上の結果の示すように個々の成分について吟味した場合は特に品質の劣る製品は見当らなかったが，原材料の配合に対し価格が適正であるか，また各成分値より原材料を予想することが出来るかを吟味するため各成分，価格および原材料間の相関係数表を作成し表2に示した．相関係数表作成に当り使用した各項目の説明は以下の通りである．各成分値の項目は製品の品質特性をより正確に表現するため水分を除いた固形分当りの成分％とした．また全体を100とし各成分値を除いた値をでん粉以外の糖類とし新たに項目に加え，カンペステロールとβ-シトステロールは和をもって植物に由来するステロールとして1項目とした．原材料については，配合表が入手できないため製品に表示されている原材料の順位から配合割合を推測した．例えば牛肉，豚肉，とり肉，植物たん白と表示されている場合はその配合割合を7：6：5：4とした．マトン，馬肉，魚肉等は一かつして肉類等とし，その他の副原料は除いた．なお植物たん白の成分値は最も一般的に使用されていると思われる脱脂大豆より製造した味の素社製のアジプロTR1の値を採用した．

以上のようにして15項目についての各相関係数を求めた結果，まずエネルギーとの相関は脂肪が最も高く，相関係数（以下γと略す）0.992とほぼ直線関係で脂肪含量に対しエネルギーが増加した．エネルギーはこの他豚肉とも$\gamma=0.562$の相関があり脂肪の多い豚肉がエネルギー増加の一因と考えられる．この他エネルギーと糖類，灰分，大豆とは負の相関があり，これらの成分の多い製品はエネルギーが少なかった．

たん白質はコレステロールと$\gamma=0.585$の相関がありコレステロール含量がたん白質含量の一指標となりうることを示している．これに対しでん粉とは$\gamma=-0.784$と負の相関を示し，たん白質の少ない製品はでん粉で強度（アシ）を補っていることを示唆している．

脂肪は豚肉を多く配合した製品と相関があり，植物たん白を配合した製品とは負の相関がみられた．

糖類と植物たん白とは $\gamma=0.713$ と高い相関があり糖類の分析値が高い製品は安価な植物たん白を多く配合していることを示している．ここで植物たん白と他の成分との相関を見ると，エネルギー，脂肪，コレステロールと負の相関があり，糖類と灰分では正の相関を示した．これらの事実から大豆たん白を多く配合した場合，でん粉以外の糖類が増し（これは大豆の炭水化物組成はしょ糖，ガラクタン，スタキオース等が多く，でん粉がほとんど含まれていないことに由来する．）灰分も多く，逆にこれらの成分値が多くコレステロール，脂肪等が少ない製品は大豆たん白を多く使用しているものと思われる．

牛肉，豚肉，とり肉と各成分との相関は豚肉を多く配合した製品のみが脂肪が多く，エネルギーも高いという傾向がみられたがその他には特に相関はみられず各成分値より原料肉の配合割合を予想することは困難であった．

価格との相関はコレステロールが最も高く（$\gamma=0.833$）次いで牛肉（$\gamma=0.654$），たん白質（$\gamma=0.585$）の順で，逆に負の相関では糖類（$\gamma=-0.587$）および灰分（$\gamma=0.555$）が高かった．これらの結果より価格の高い製品は牛肉を多く配合し，たん白質含量も多く従って肉類に由来するコレステロール値も高く，糖類の少ない良質のハンバーグであることを示唆している．

主成分分析による考察　以上のように各成分間の相関係数よりある程度の予測は可能であるが2成分間の類似関係をみるのみで多数の成分間の類似関係を総合的にみるには適していない．そこで価格を除く8成分と25試料および原材料である牛肉等を加え主成分分析を行った．その結果累積寄与率は第1（Z_1）および第2（Z_2）主成分までで66%，第3（Z_3）主成分までで86%と各主成分に充分な情報が集められていることが明らかとなった．これら総合特性値を Z_1, Z_2 軸上にとり，各製品を分類して図1に，各成分値の因子負荷量を図2に示した．

図1より明らかなように牛肉，豚肉，パン粉，植物たん白等の各原材料が周辺部に位置し，中心に各製品が分布した．このことは周辺部の原材料の配合によりハンバーグが構成されていることを示しており，例えば植物たん白に近いところに位置している製品はその配合量が多いことが予想される．製品の中で配合割合が既知の試料No 25は牛肉，豚肉等に最も近い位置にありこの予想を裏付けている．価格が高く図上の位置が植物たん白に近い製品は粗悪品と考えられるが，そのような製品はみあたらなかった．最も植物たん白の近くに位置するNo 14は価格が固形分100g当り199円で平均281円に対し安価な製品であった．なお試料中最も安価な製品はNo 15で

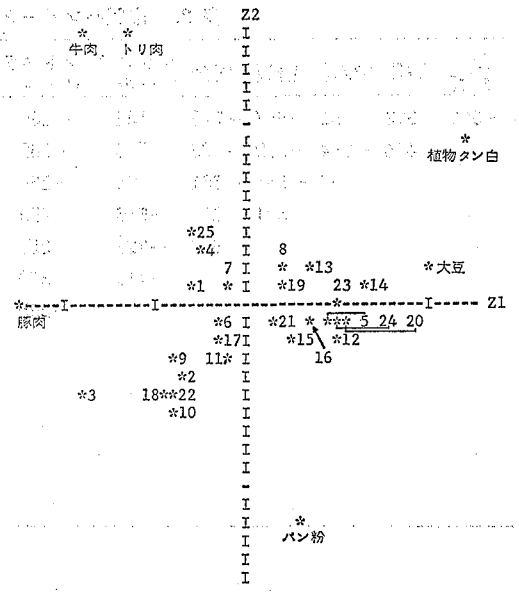


図 1.　主成分分析によるハンバーグの散布図（成分値による分類）
注：各番号は試料Noを示す．

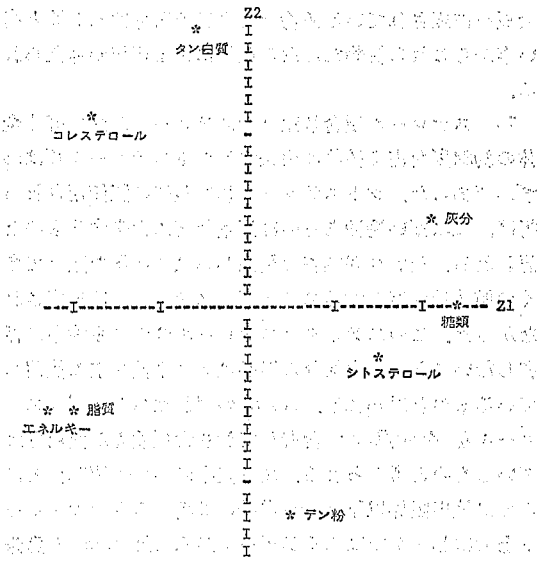


図 2.　主成分分析による各成分の因子負荷量．

固形分100g当り136円，最も高価な製品は試作品のNo 25で固形分100g当り737円であった．

図2は8種類の各成分値が第1(Z_1)，第2(Z_2)主成分にどのような重みで寄与しているかを図示したもので，Z_1 軸の正方向は糖類および灰分が位置し植物たん白の成分に近似し，負方向はエネルギー，脂肪と豚肉に近い成分

表3. 市販ハンバーグのアミノ酸構成比

No	Ileu	Leu	Lys	Met	Cys	Phe	Tyr	Thr	Try	Val	Arg	His	Ala	Asp	Glu	Gly	Pro	Ser
1	3.7	7.4	7.5	2.9	1.4	3.9	3.1	4.0	1.4	4.0	6.4	3.9	6.3	9.1	18.3	6.1	6.0	4.8
2	4.0	7.7	7.4	2.7	1.3	4.0	3.3	4.4	1.2	4.3	5.6	2.7	5.5	8.3	21.2	5.4	6.1	4.8
4	3.9	7.1	7.7	2.8	1.6	3.9	3.0	4.2	1.5	4.6	6.6	3.0	6.2	9.1	18.3	6.2	6.0	4.5
5	4.1	7.5	6.9	2.6	1.4	4.4	3.0	4.2	1.9	4.5	5.7	2.4	5.9	9.3	21.9	5.3	6.2	4.8
6	3.7	7.1	6.9	2.5	1.4	4.1	3.0	3.9	1.5	4.2	5.5	2.8	5.0	9.4	21.4	9.4	6.0	4.8
7	3.9	7.0	7.0	2.7	1.2	4.1	3.1	4.1	1.3	4.3	6.7	3.4	5.5	9.1	19.8	5.7	6.2	4.9
9	3.9	7.4	6.4	2.0	1.3	4.4	3.2	4.0	1.3	4.4	6.0	3.7	5.3	9.2	20.9	5.4	6.5	4.9
10	4.1	7.2	5.4	2.6	1.5	4.3	3.1	3.5	1.5	4.4	5.2	3.1	4.6	6.9	25.9	4.6	7.7	4.5
11	4.1	7.5	6.0	2.8	1.4	4.1	3.1	4.2	1.3	4.4	6.0	2.3	4.7	9.9	22.8	4.7	6.0	4.9
12	3.7	7.4	6.4	2.8	1.4	4.1	3.1	4.1	1.5	3.9	4.8	2.4	5.3	9.5	22.8	5.1	6.6	5.2
13	3.8	7.8	5.8	2.4	1.4	4.3	3.2	4.0	1.5	4.6	5.6	2.3	5.1	10.1	21.1	5.4	6.4	5.1
14	3.6	6.9	5.1	2.4	1.5	4.4	3.1	3.7	1.3	4.1	5.0	2.3	5.5	8.5	23.1	6.8	7.5	5.2
15	3.5	7.0	5.1	2.5	1.6	4.1	2.8	3.7	1.6	4.0	5.1	2.1	5.0	7.5	25.3	6.0	8.6	4.7
16	3.4	7.1	6.5	2.9	1.2	3.9	3.0	4.2	1.4	4.1	5.0	3.0	6.3	9.7	19.6	7.7	6.2	4.8
17	4.1	7.0	6.2	2.5	1.7	4.5	3.2	3.7	1.2	4.8	6.2	2.7	5.3	8.4	21.0	6.1	6.9	4.6
20	4.1	7.8	5.9	2.8	1.3	4.5	3.3	4.1	1.3	4.8	5.3	2.7	5.2	9.4	21.6	5.2	6.1	4.7
21	3.8	7.1	5.3	2.5	1.2	4.2	2.8	3.5	1.0	4.3	5.2	2.2	5.0	6.8	26.6	5.9	8.2	4.4
22	4.3	7.3	5.3	2.8	1.5	4.4	3.1	3.6	1.1	4.6	4.9	3.0	4.7	7.1	25.6	4.9	7.4	4.4
24	4.0	7.1	4.5	2.3	1.6	4.5	2.9	3.3	1.0	4.4	5.7	2.3	4.5	7.4	26.4	5.4	8.3	4.5
25	3.9	7.4	8.0	2.4	1.2	4.2	3.6	4.5	1.2	5.1	6.1	3.3	6.1	9.8	17.2	5.6	5.8	4.7
牛肉	4.8	8.8	9.1	2.2	1.2	4.5	3.5	4.5	1.3	5.4	6.2	3.5	6.4	9.3	17.6	4.2	4.5	3.4
鶏肉	5.4	7.4	9.3	3.1	1.3	3.9	3.2	4.5	1.2	5.4	6.1	2.7	5.6	9.4	16.0	4.6	4.1	5.0
豚肉	5.2	8.5	9.3	2.7	1.2	4.2	3.5	4.5	1.4	5.4	6.0	4.2	5.9	9.6	14.7	4.5	3.8	3.5
大豆	5.3	7.9	7.5	1.3	1.4	5.8	4.0	4.7	1.6	5.4	7.5	2.6	4.4	11.5	19.3	4.6	7.3	5.8

単位：たん白質100ｇ当りのｇ数

が位置した．Z_2 軸の正方向はたん白質を負方向はでん粉質と極めて適切に分類された．これを図1と対比すると各軸方向に片寄った製品はその軸方向の成分が多く含まれていることになり，例えば試料 No 3は脂肪の多い製品であることを示している．このように各成分値と原材料を散布図に描くことにより各製品の成分および配合上の位置づけを明らかにした．

アミノ酸含量による考察　表3に各製品のアミノ酸構成比（%）を，なお参考として日本食品アミノ酸組成表[4]より牛肉，豚肉，とり肉および植物たん白の代表として大豆のアミノ酸組成について記した．全アミノ酸中グルタミン酸が最も多く，次いでアスパラギン酸，リジンの順で少ないものはシスチン，トリプトファンの順であった．グルタミン酸は原料肉類と比べ明らかに高く調味料として加えられたものと思われる．このためグルタミン酸を除き主成分分析を行い各製品のアミノ酸パターンによる分類を試みたが原材料の配合を予測できるような結果は得られなかった．これはハンバーグを調味するに当り肉エキス，たん白加水分解物等を添加しアミノ酸組成が変化しているためと思われる．なお主成分分析によれば試作品 No 25が最も牛肉，豚肉のアミノ酸パターンと類似した試料であった．

ハンバーグが他の食品と比べたん白質源としてどのような位置を占めるかを吟味するため10種類の必須アミノ酸構成について主成分分析を行いけい卵，人乳，牛乳等と比較した．累積寄与率は第1主成分39%，第2主成分61%で，これら主成分上に各製品を投影させた結果を図3に示した．この散布図によればハンバーグ類はけい卵，牛乳等とは離れた位置に分布し，従ってその必須アミノ酸も異なった構成であることが考えられる．なお Z_1 軸の正方向の因子はバリン，イソロイシン，負方向の因子はスレオニンで，Z_2 軸の負方向はロイシンであった．

要　約

昭和53年9月に都内で購入したハンバーグ24検体につ

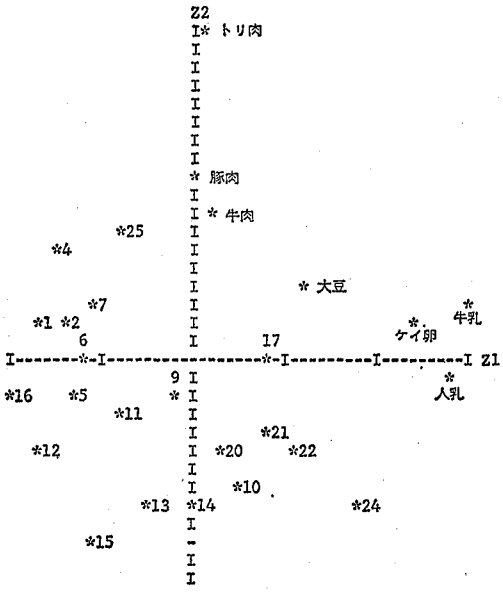


図 3. 主成分分析によるハンバーグの散布図
(必須アミノ酸による分類)
注：各番号は試料Noを示す.

いて水分，たん白質，脂肪，でん粉，灰分，ステロール類，アミノ酸等を測定し原材料肉類の予測と必須アミノ酸の構成比について多変量解析の一手法である主成分分析によって考察した．この結果主成分分析の散布図上で牛肉の近くに位置する No 25, No 4, No 1 等の製品はコレステロール，たん白質含量が多く，実際に主原料が牛肉であることが表示されており，また反対にコレステロールが少なく糖類，灰分が多い製品は大豆たん白等が多く配合されていることが予想され，これら統計的分析法が有効であることが示された．なお価格が高い製品でありながら糖類が多く安価な大豆たん白を多く使用したと思われる粗悪品は見当らなかった．

ハンバーグ中の必須アミノ酸パターンは卵，牛乳等とは異なり，バリン，イソロイシンが少なくむしろ牛肉，大豆等のそれと類似した構成であった．

なお今回調査した24検体中5検体のみが日本農林規格品であったが，その他の製品も規格を大きく外れる製品は見当らなかった．

謝辞 試料収集に当り御協力いただいた食品監視課ならびに食品機動監視班の職員各位，統計計算においてコンピュータープログラムを作成していただいた当研究所野牛弘所長に深謝致します．

文 献

1) 日本農林規格協会：ハンバーガー類の日本農林規格（昭和52年10月 8 日農林省告示第1016号他）
2) 日本油化学協会：基準油脂分析試験法，1978，社団法人日本油化学協会
3) 厚生省公衆衛生局栄養課：国民栄養の現状（昭和50年国民栄養調査成績），1978，第一出版株式会社
4) 科学技術庁資源調査会編：日本食品アミノ酸組成表，1966年

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 173-177, 1979

高速液体クロマトグラフィーによるマーガリン中のビタミンAの定量

井口正雄*, 友松俊夫*, 道口正雄*

Quantitative Analysis of Vitamin A in Margarine by High Performance Liquid Chromatography

MASAO IGUCHI*, TOSHIO TOMOMATSU* and MASAO DOGUCHI*

Keywords: ビタミンA vitamin A, Aパルミテート A-palmitate, カートリッジカラム cartridge column, 高速液体クロマトグラフィー high-performance LC

緒　言

ビタミン強化食品中のビタミンAの公定定量法として，三塩化アンチモンの呈色による Carr Price 法が採用されている[1,2]．この方法では，β-カロチンやその他の呈色妨害物質をクロマト操作によって除去する必要があり，分析操作が煩雑となっている．また呈色妨害物質を除去してもビタミンAの発色そのものが不安定であるという欠点がある．

最近高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による強化食品中のビタミンAの迅速分析が検討されている[3,4]．HPLC によってビタミンAを分析する場合，検液の調製法として，試料をアルカリけん化し，溶媒抽出後濃縮する方法（けん化，抽出法）と試料を直接溶媒に溶解してこれを検液とする方法（直接注入法）がある．前者はビタミンAアルコールを検出するもので後者はビタミンAエステルが添加されている場合はそのままエステルとして検出される．James ら[3]，丸山ら[4]はけん化，抽出法でそれぞれ強化食品および油脂食品中のビタミンAの分析を行ないその結果を報告している．阿部ら[5]，田部井ら[6]はそれぞれ血清，肝臓中および製剤中のビタミンAエステルを直接注入法で行ない良好な結果を得ている．そこで阿部ら，田部井らの直接注入法をマーガリン中のビタミンA分析にそのまま適用しうるか否かを検討した結果，種々改良する必要を認めた．著者らは James らのけん化，抽出法を追試し，また阿部らの方法を改良して HPLC によってマーガリン中のビタミンAの簡便かつ迅速な分析法を追求し，良好な結果を得たので報告する．

実験方法

試料　市販のビタミンA強化マーガリン（Y社製）各200g 包装のもの

装置　高速液体クロマトグラフ：Model 5000型（バリアン社），検出器：自記分光光度計バリアンテクトロン Model 635（バリアン社），カラム：Micro Pak MCH-10（バリアン社）30cm×4mm，螢光光度計：八木式微量ケイ光光度計MR（島津製作所）

試薬，器具　ビタミンA標準液：ビタミンAアセテート 100万 IU/g 油性（和光純薬），ビタミンAパルミテート100万 IU/g 油性（和光純薬），ビタミンAアルコールは上記パルミテートまたはアセテートを日本薬局法第2法[7]でけん化してAアルコールとし，その単位数を算出したものを用いた（用時調製）．HPLC 移動相：メタノール，アセトニトリル，テトラハイドロフランはいずれも液体クロマトグラフ用（和光純薬），コーン油：市販の精製油（油蠟薬品株式会社），その他は市販の試薬特級を用いた．カートリッジカラム：SEP-PAK Silica Cartridge（ウォーターズ社）Lot No. 822202，薄層クロマトグラフ：ワコーゲル プレート（和光純薬）．

カートリッジカラムによるビタミンAエステル溶出試験　ビタミンAが 1m*l* 中に 50IU の濃度になるようにビタミンAパルミテート標準液をヘキサンに溶解し，さらにこれにコーン油を加え，その油脂量が 1m*l* 中に 60 mg および 30mg 含むような溶液を調製する．この溶液 1m*l* 中の油脂量はそれぞれマーガリン 2g および 1g を 25m*l* ヘキサンにとかしたときのそれにほぼ等しい．これらの 1m*l* をそれぞれカートリッジカラムに注入し，カラムクロマトグラフィーを行なう．ヘキサン 30m*l*，1％エーテル—ヘキサン溶液 20m*l* および5％エーテル—ヘキサン溶液 20m*l* を流速 8～10m*l*/min で順次溶出し，各フラクション2m*l*ずつを分取し，ヘキサンで10m*l* に希釈して，螢光強度を測定する．フィルターは励起光フィルターにビタミン B_1 用，螢光選択フィルターにビタミン B_2 用のものを使用した．

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

定量操作

Ⅰ．けん化，抽出法（ビタミンAの定量）

常法[1]に従って試料をけん化，抽出した．得られたエチルエーテル抽出液を窒素ガスを通じながら留去し，残留物を 2m*l* のクロロホルム—メタノール（1：2）にとかし，この 10μl を HPLC に注入した．チャート上のピーク高さを測り，別にビタミンAアルコールを用いて検量線を作製し，これよりAアルコールの単位数を算出した．HPLC 条件は，移動相：メタノール—水（91：9），カラム温度：室温，流速：1.0m*l*/min，検出波長：325nm，AUFS 0.5，チャートスピード：5mm/min で行なった．

Ⅱ．カートリッジカラム分別法（ビタミンAエステルの定量）

試料 2g を 50m*l* ビーカーに秤取し，これにヘキサン約 10m*l* を加え，温浴上でゆるやかに加温溶解させた後，ヘキサンでビーカーを洗浄しながらメスフラスコにうつし，全量を 25m*l* とする．数分間暗所に静置したのち，一部を共栓付遠沈管にとり，無水硫酸ナトリウムで脱水し，遠心分離（5000rpm，5分）する．上清の 1m*l* をカートリッジカラムに注入し，流速 8～10m*l*/min でヘキサン 30m*l*，つぎに1％エーテル—ヘキサン 20m*l* で溶出する．得られた溶出液を，フィルター（ポアサイズ 1.0μm）を通し，ナス型フラスコで窒素ガスを通じながら留去する．残留物をテトラハイドロフラン—クロロホルム溶液（1：1）0.2m*l* に溶解し，その 15μl を HPLC に注入する．得られたピーク高さを測り，別にビタミンAパルミテート標準品を用いて検量線を作製し，これよりビタミンAパルミテートの単位数を算出する．HPLC 条件は移動相：テトラハイドロフラン—アセトニトリル—水(40：54：6)，カラム温度：室温，流速：1.0m*l*/min，検出波長：325nm，AUFS：0.1，チャートスピード：5mm/min で行なった．

Ⅲ．Carr Price 法

常法[1]に従って行なった．

結果および考察

Ⅰ．けん化，抽出法（ビタミンAの定量）

HPLC 条件は James ら[4]の方法により，逆相分配型カラム（ODS），移動相にメタノール—水（91：9）を用いたところ，分離，保持時間とも良好であった（Fig. 1）．得られた定量値は Carr Price 法よりも全体に高い

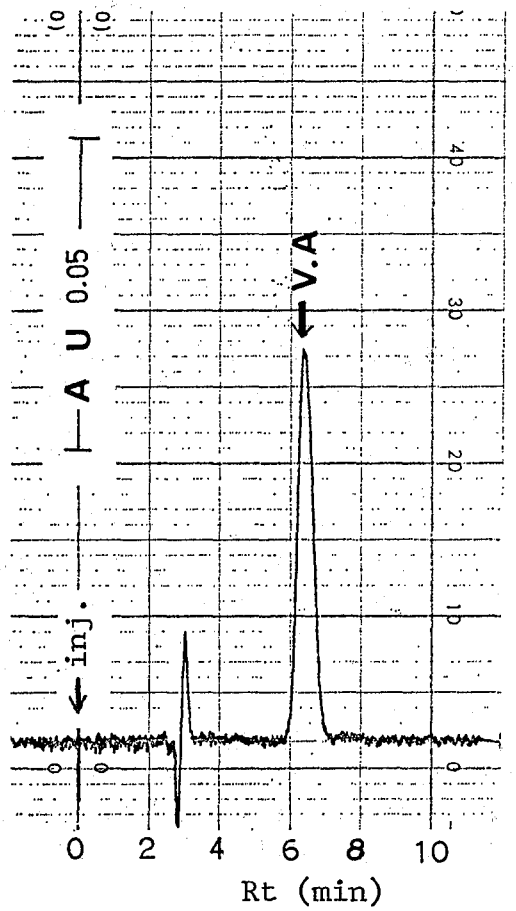


Fig. 1. Chromatogram of Vitamin A in Margarine (Saponification Method)

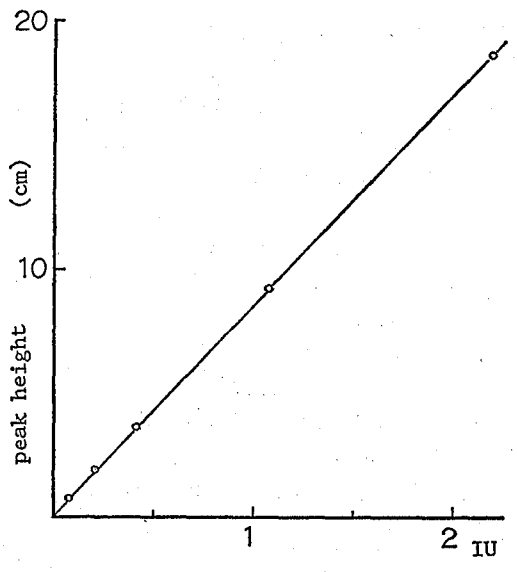


Fig. 2. Calibration Curve of Vitamin A

値であった (Table 1).

検量線 ビタミンAパルミテート標準液を定量操作Ⅰ. に従って試料と同様に処理してビタミンAアルコールを調製し，その 0.087～2.188IU 相当量を HPLC に注入しピーク高さを測定した結果，この範囲で直線関係が得られることを認めた (Fig. 2). また 0.655 IU 相当量のビタミンAを HPLC に注入したときのピーク高さおよび保持時間のくりかえし変動係数はそれぞれ 1.3% および 0.7% であった.

添加回収試験 マーガリンにビタミンAパルミテート標準液を添加して，定量操作Ⅰ. に従って回収率を求めた. その結果は Table 2 に示すとおりほぼ100%の回収率が得られた.

Ⅱ. カートリッジカラム分別法（ビタミンAエステルの定量）

Barron ら[8]，加藤[9]は中性脂質をケイ酸カラムを用いて，炭化水素，ステロールエステルおよびトリグリセライドなどに分画している. そこでマーガリン中のビタミンAパルミテートをトリグリセライドなどの脂質と分離，濃縮したのち，HPLC に注入する方法を試みた. カートリッジカラムはディスポーザブル型のものを用い

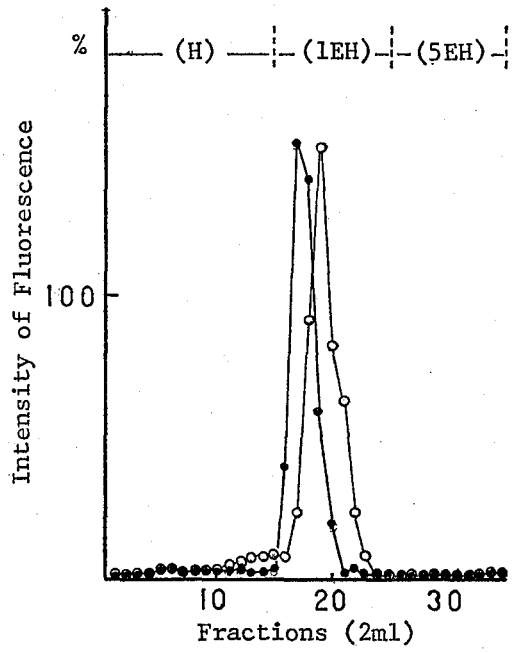


Fig. 3. Fractionation of Vitamin A Palmitate in Corn Oil by Cartridge Column
Solvents : Hexane (H), 1% diethylether in hexane (1EH) and 5% diethylether in hexane
○——○ 60mg of Oil Injected
●——● 30mg of Oil Injected

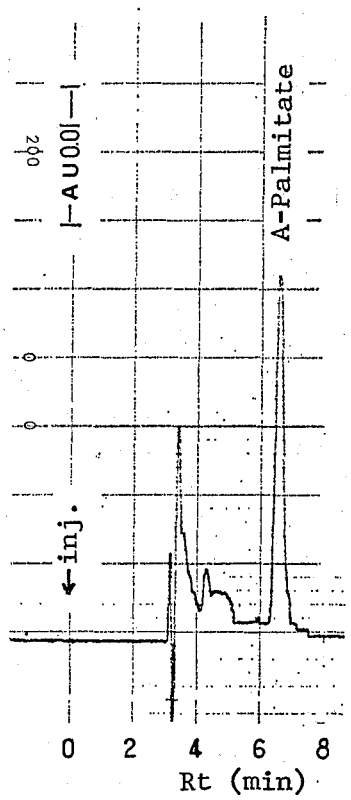


Fig. 4. Chromatogram of Vitamin A Palmitate in Margarine (Cartridge Column Method)

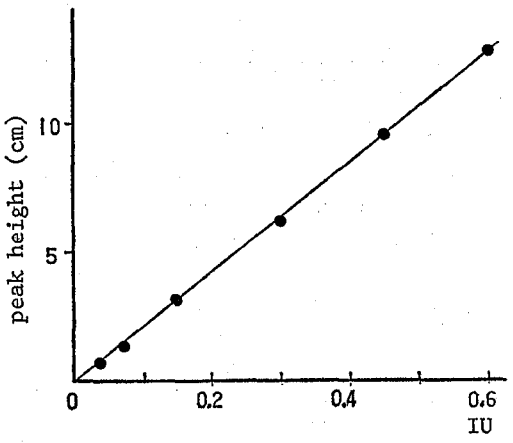


Fig. 5. Calibration Curve of Vitamin A-Palmitate

て操作を簡略化した．ビタミンAパルミテートにコーン油として 30mg および 60mg の脂質を含むように調製した溶液をカートリッジカラムに注入したところ，Fig. 3 に示すように良好に分画された．試料検液の調製にはこれらを考慮して，採取量を 2g とした．HPLC の移動相にイソプロパノール—水系およびテトラハイドロフラン—水系について検討したがピーク前後のベースラインが安定せず，かつピークもブロードとなった．テトラハイドロフラン—水系に中間の極性をもつアセトニトリルを加えることにより改善され，テトラハイドロフラン—アセトニトリル—水（40：54：6）では良好なピークが得られた（Fig. 4）．

検量線 ビタミンAパルミテート標準液をテトラハイドロフランで希釈し，0.037～0.60 IU 相当量を HPLC に注入し，ピーク高さを測定した．この範囲でほぼ原点を通る直線が得られた（Fig. 5）．また 0.15 IU 相当量のビタミンAパルミテートを注入したときピーク高さについてのくり返し変動係数は 2.8% であった．

添加回収試験 マーガリンにビタミンAパルミテート標準液を添加して，試料と同様に処理して回収率を求めた．結果は Table 2 に示すとおりである．けん化，抽出法による値に比べて低い値であった．

Table 1. Comparison of Vitamin A Concentrations in Margarine Measured by Three Different Analytical Methods

Sample	Carr Price Method	HPLC Method (1)	HPLC Method (2)
1	6260	7020	6510
2	4220	4763	4010
3	5360	6269	4930
4	4970	5871	5200

(IU/100g)

HPLC Method (1) Saponification Method
(2) Cartridge Column Method

Table 2. Recovery of Vitamin A Added in Margarine by (1) Saponification Method and (2) Cartridge Column Method

	Added IU/g (A)	Vitamin A observed IU/g: Without addition (B)	Vitamin A observed IU/g: Vitamin A added (C)	Recovery (%) $\frac{C-B}{A}\times 100$
(1)	50.9	58.7	111.2	103.3
	28.1	58.7	87.1	101.0
(2)	51.2	54.5	95.0	79.1
	25.6	54.5	75.7	82.8

確認試験 ヘキサン 1ml 中に約 500 IU を含むビタミンAパルミテート標準液について試料と同様にカートリッジカラムにより溶出し，2ml ずつのフラクションを 1～15，16～25および26～35に分画し（Fig. 3 参照），この濃縮液について TLC を行なった．また HPLC によって得られたAパルミテートに相当するピーク部分を分取し，濃縮後 TLC を行なった．TLC は John ら[10]，勝井ら[11]の方法に従って，ベンゼンを移動相とした．Rf 値の測定，紫外線照射，発色試薬による検出を行なったところ，いずれもフラクション 16～25 および HPLC で相当するピーク部分にAパルミテートを認めた．

以上 HPLC による 2 方法について検討を行なったが，けん化，抽出法は回収率も良好で，従来の Carr Price 法に比べ，迅速かつ精度よく定量することができた．またカートリッジカラム分別法によって，さらに前処理時間を短縮することができた．この方法は回収率はけん化，抽出法に比べ劣るが，その精度は Carr Price 法にほぼ等しく，多数の試料の迅速分析法または品質管理上のスクリーニング法として使用可能と考える．

要　約

高速液体クロマトグラフィーによりマーガリン中のビタミンA分析の精度向上ならびに迅速化を試みた．

1. マーガリン中のビタミンAパルミテートをけん化，抽出し，Aアルコールとして検出した．逆相分配型カラムを使用して，移動相にメタノール—水（91：9），検出波長 325nm で測定した結果，従来の Carr Price 法のような不けん化物に由来する妨害もなく，迅速かつ精度よく定量できることを認めた．

2. マーガリン中のビタミンAパルミテートをカートリッジカラムにより分別し，エステル型として検出する方法を検討した．逆相分配型カラムを使用して，移動相にテトラハイドロフラン—アセトニトリル—水（40：54：6），検出波長 325nm で測定した．けん化操作を省くことにより，前処理時間を著しく短縮することが可能となり，マーガリン中のビタミンAパルミテートの定量の迅速化をはかることができた．

文　献

1) 東京都衛生局公衆衛生部：東京都特殊栄養食品指導実施要項，34，昭和46年9月3日付　46衛公栄発第419号
2) 科学技術庁：日本食品標準成分表の改訂に関する調査報告第77号，16，1978
3) 丸山武紀，牛草寿昭，兼松　弘ら：食衛誌，18，

487, 1977

4) James N. Thompson and William B. Maxwell: *J. A. O. A. C.*, 60, 766, 1977

5) 阿部皓一，石橋恭子，大前雅彦ら：ビタミン，51，275，1977

6) 田部井智三，大前雅彦，河部　靖：薬誌，96，669，1976

7) 日本薬学会編：衛生試験法注解，138，1973，金原出版株式会社

8) Barron J. Edward and Hanahan J. Donald: *J. Biol. Chem.*, 231, 493, 1958

9) 加藤久太：生化学，28，714，1957

10) John K. V., Lakshmanan M. R., Jungalwala F. B., and Cama H. R.: *J. Chromatogr.*, 19, 53, 1965

11) 勝井五一郎，石川靖二，清水美智子，西本行雄：ビタミン，28，41，1964

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 178-182, 1979

食事ならびに食品中のカリウム含量におよぼす浸漬，煮沸処理の効果

西田甲子*，道口正雄*

Effect of Boiling and Steeping on the Concentration of Potassium in the Diets for Patients and in Various Commercial Foods

KOKO NISHIDA* and MASAO DOGUCHI*

Keywords：カリウム含量 potassium content，食事療法 dietetics，調理効果 effect of cooking

緒　言

慢性腎不全，血液透析患者はカリウム摂取が制限されているので，低カリウム含量の食事の提供が要求される．病院におけるこれら患者用食事の調製には，ナマの野菜や果実などをゆでこぼすことによって脱カリウムを行うとか，缶詰の果実を用いることによりカリウム含量の低下を計っている．

しかし，これらの処理がどの程度有効であるかについては実際に分析検討した例は少ない．そこで都内M病院の外来透析患者昼食献立を採用し，同病院で実際に行っているのと同条件で作成した食事と，同一献立内容で，患者食として特別の処理すなわち野菜類について，ゆでこぼしなどをほどこさず作成した食事中の，カリウム含量の差異を検討した．また調理によるカリウムの消長は一部[1,2]の食品を除いて明確に把握されていないので，病院給食において使用頻度の高い食品，ならびに常用量の多い食品およそ70種をとり上げ，水さらし，ゆでこぼしによるカリウム含量の減少効果を検討したのでその結果について報告する．

試料および実験方法

1. 試料

昭和53年2，4，6，8月における人工透析通院患者昼食献立から，各月ごとに適宜1献立をえらび出し（計4回），当日病院で行っていると全く同じ条件で食事(以下患者食とする）を調製し試料とした．また比較のために同じ献立内容で，野菜類にゆでこぼし処理をほどこさない食事（以下普通食とする）も作成した．

ちなみにこの献立の栄養価は，主食，デザートを加えて1食分が，たんぱく質23～24g，エネルギー800～850 kcal，水分350～400m*l*，塩分1.5g の基準でつくられている．

また各種食品試料は獣鳥肉卵類17，魚貝類16，果実類12，豆類6，海草類4，茸類4，野菜類13を都内小売店より購入し測定に供した．

2. 実験方法

患者食，普通食とも各献立ごとに各々3食分を調製し，その1食分ずつを別々にホモヂナイズし，さらに約20g ずつ2試料採取し，乾式灰化後，フレームホトメーター（EKO フレームホトメータN型）を用いカリウム（以下Kとする）を測定した．すなわち1献立について6試料調製し測定することになり，それらの平均値をもって各献立におけるK含量とした．

又個々の食品については，試料 100～200g を水洗後，精製水にて洗浄，水分を拭い一定の型に切断し，10～30 g を採取しナマのまま（以下未処理とする），500m*l* の精製水に30分間浸漬（以下水浸漬とする），500m*l* の沸とう水で2～10分間ゆでたもの（以下水煮とする）3種の試料につき各2回，（動物性食品では未処理と水煮のみで水浸漬は行わず）先きと同じ方法にて測定し，K含量の比較を行った．一部の食品については未処理のみの結果を示す．

結果および考察

1）人工透析患者食（表1，表2）

第1～4の献立で，○印を付した野菜類は一旦ゆでこぼしを行ったものである．

第1～3の献立では，いずれも患者食，普通食間にK含量の顕著な差異は認められなかったが，献立4の普通食は 321mg% とK含量が高く，また同一献立の患者食の2倍以上の数値を示した．これはこぶ，だし，すり身などが原因と考えられ，患者食では野菜類，こぶをゆでこぼした結果 151mg% と半減し，調理処理の効果が著るしかった．

1食分の食事重量を実測（3食分の平均値）したところ，4献立とも患者食＜普通食であった．この重量で1食

* 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. 血液透析患者の昼食献立

1	フライ盛合せ		そぼろ煮	
	ほたて貝	40g	○南瓜	60g
	白身魚	20	豚肉	20
	○なす	30	○グリンピース	5
	低たんぱく粉	8	油	5
	水	10	しょう油	5
	パン粉	10	さとう	3
	油	10		
	パセリ	少々		
2	ホイル焼		グリーンサラダ	
	とり肉	60g	○さやえんどう	30g
	○じゃがいも	30	○きゅうり	30
	たまねぎ	20	チェリー(缶)	8
	マッシュルーム	10	ドレッシング	10
	油	2	食塩	0.3
	食塩	0.5		
	トマト			
	ケチャップ	10		
	白ワイン	2		
3	なすグラタン		シーフードサラダ	
	○なす	60g	白身魚	20g
	油	13	えび	15
	豚肉	60	○きゅうり	20
	たまねぎ	10	たまねぎ	10
	トマト		パイン	
	ケチャップ	10	アップル	20
	ウスター		マヨネーズ	10
	ソース	2	パセリ	少々
	マクトン	5		
	赤ワイン	5		
	スープ	50		
	低たんぱく粉	3		
	無塩バター	3		
	粉チーズ	2		
	食塩	0.5		
4	洋風おでん		マカロニサラダ	
	とり肉	30g	マカロニ	10g
	○とうがん	30	○にんじん	10
	○セロリ	20	○たまねぎ	10
	すり身	30	グリンピース	5
	だし	30	マヨネーズ	10
	○こんぶ	2		
	食塩	0.5		
	しょう油	1		

分のK摂取量を算出したところ，患者食では 268～411 mg，普通食では 314～632mg となり何れも患者食が低かった．以上は昼食のみの結果であったが，朝，夕食にも数種の野菜についてゆでこぼしを行えば脱Kの効果は更に大きいと思われる．しかし，ゆで野菜を更に調理すると云う二重調理のため，手数のかかった割には出来上った料理の見映えが悪く，味の低下，色彩の退色，また或種の栄養素の損失など患者食としては好ましくない結果をも生ずると考えられる．

表 2. 患者食ならびに普通食のカリウム含有量

献立 No.		カリウム (mg%)	食事重量 (g)	カリウム 摂取量(mg)
1	患者食	161	255	411
	普通食	184	273	502
2	患者食	173	155	268
	普通食	199	158	314
3	患者食	171	209	357
	普通食	191	246	470
4	患者食	151	179	276
	普通食	321	197	632

表 3-1. 獣鳥肉類のカリウム含有量および残存率

食品名		含有量 (mg%)	残存率 (%)	調理条件
牛肉	A	334		1×0.2×4 cm
	C	48	14	C＝2分
豚肉	A	318		1×0.2×4 cm
	C	73	23	C＝2分
とり肉	A	231		1×0.2×4 cm
	C	112	48	C＝2分
豚レバー	A	209		0.5×1×3 cm
	C	106	51	C＝2分
とりレバー	A	171		0.5×1×3 cm
	C	75	44	C＝2分
ロースハム	A	208		0.2×1×4 cm
	C	86	41	C＝1分
ウインナソーセージ	A	107		皮ごと0.2cm斜切り
	C	43	40	C＝2分

A＝未処理　　C＝水煮

表 3-2. 卵，乳類のカリウム含有量

鶏	卵	121(mg%)
卵	白	134
卵	黄	98
牛	乳	130
スキムミルク		1543
プロセスチーズ		44
ヨーグルト		130
無塩バター		12
バター		13
マヨネーズ		12

表 4. 魚貝類のカリウム含有量および残存率

食品名		含有量 (mg%)	残存率 (%)	調理条件
鯵	A	280		皮なし，幅1cm
	C	150	54	C＝2分
かれい	A	215		皮つき，幅1cm
	C	119	55	C＝2分
生さけ	A	252		皮なし，幅1cm
	C	158	63	C＝2分
さんま	A	210		皮なし，幅1cm
	C	105	50	C＝2分
いわし	A	314		
	C	151	48	
さば	A	453		皮なし，幅1cm
	C	234	52	C＝2分
甘鯛	A	332		皮なし，幅1cm
	C	189	57	C＝2分
まぐろ赤身	A	377		
	C	125	33	
まぐろ脂身	A	274		
	C	108	37	
いか	A	315		
	C	152	48	
たこ	A	60		
	C	9	15	
白す干	A	93		
	C	7	8	
かき	A	82		
	C	17	21	
あさり	A	178		
	C	82	46	
貝柱	A	291		
	C	161	55	
うなぎ白やき		233		

A＝未処理　C＝水煮

表 5. 果実類のカリウム含有量および残存率

食品名		含有量 (mg%)	残存率 (%)	調理条件，その他
りんご(紅玉)	A	109		C＝2分
	B	81	74	青森産
	C	50	48	
りんご(ふじ)	A	93		C＝2分
	B	82	88	長野産
	C	52	56	
りんご(スターキング)	A	104		C＝2分
	B	87	84	山形産
	C	31	30	
バナナ	A	267		C＝2分
	C	173	65	フィリピン産
いちご	A	184		C＝2分
	C	110	60	群馬産
プリンスメロン	A	189		C＝3分
	C	58	31	熊本産
富有柿	A	128		C＝2分
	C	83	65	岐阜産
次郎柿	A	155		C＝2分
	C	82	53	福島産
みかん	A	151		C＝2分
	C	85	56	福岡産
夏みかん		105		神奈川産
レモン汁		61		
干ぶどう		714		

A＝未処理　B＝水浸漬　C＝水煮

現在患者食では野菜のみを処理しているが，それ以外の食品の浸漬，水煮などの処理による脱K効果が顕著であれば，併用することによって更に適切な献立の作成が可能となるとの考えに基いて，以下の食品類について検討を加えた．

2) 獣鳥肉，卵，乳類（表3－1．表3－2）

肉類未処理では 107～344mg% の範囲であり，牛肉，豚肉の未処理は共に近似な値を示した．豚，とりのレバーは肉質部より低含量であった．牛肉，豚肉の水煮は他の肉類より残存率が低く，特に牛肉は最低で14%，48 mg% であった．鶏卵では卵黄より卵白の含量が高く，乳類ではスキムミルクが最高で，牛乳とヨーグルトは近値であった．

3) 魚貝類（表4）

未処理生鮮魚貝類では，さばの 453mg% が最高で，かきの 82mg% が最低であった．又かき水煮は残存率21%，17mg% で脱K効果は最大であった．たこ（ゆでたもの），白す干はすでに加熱ずみの加工品であるため両者とも未処理の値は 100mg% 以下の低含量で，さらに水煮処理によって 10mg% 以下と著るしいKの減少を示した．

肉類，魚貝類のゆでこぼしによる脱K効果は殊の他大きかった．ただし今回の調理条件は，ゆで時間が2分で切断型が実際調理の場合に比べ小型であったため，その効果が大となる傾向にあったと思われる．しかしこれらの結果は動物性食品にもゆでこぼし操作を施せば野菜類と同じく低K食作成に寄与するものであることを示唆する．

4) 果実類（表5）

表 6.　豆，海草，茸類の含有量および残存率

食品名		含有量 (mg%)	残存率 (%)	調理条件，その他
大豆	A	1710		B＝20時間浸漬
	B	663	39	C＝4時間加熱
	C	267	16	北海道産
豆腐	A	117		1×2×0.5cm
	C	53	45	C＝2分
がんもどき	A	88		3×3×3cm
	C	50	57	C＝2分
油あげ	A	74		3×0.5×0.2cm
	C	10	14	C＝2分
小豆		1120		
ゆで小豆（缶）		164		
こんぶ	A	5261		B＝30分浸漬
	B	1169	22	C＝30分加熱
	C	949	18	
わかめ	A	5309		B＝7分
	B	759	14	
とろろこんぶ		5988		
乾のり		1971		
しめじ	A	279		C＝2分
	C	115	41	長野産
生椎茸	A	162		C＝2分
	C	40	25	群馬産
えのき茸	A	229		C＝2分
	C	50	22	長野産
マッシュルーム（缶）		86		

A＝未処理　B＝水浸漬　C＝水煮

表 7.　野菜類のカリウム含有量と残存率

食品名		含有量 (mg%)	残存率 (%)	調理条件，その他
さつま芋	A	534		C＝10分
	B	467	87	茨城産紅系
	C	340	57	
さつま芋	A	420		C＝10分
	B	359	85	茨城産金時
	C	211	50	
じゃが芋	A	323		C＝3分
	B	247	76	千葉産
	C	107	33	
長いも	A	251		4×0.4×0.4cm
	B	171	68	岩手産
	C	57	23	
さといも	A	520		厚み0.5cm
	C	323	62	C＝7分 千葉産
やまといも		458		
大根	A	158		せん切り
	B	114	72	C＝2分 千葉産
	C	24	15	
かぶ	A	166		せん切り
	B	146	88	C＝2分 埼玉産
	C	58	35	
大根葉	A	211		
	C	145	69	
かぶ葉	A	279		
	C	193	69	
みつば	A	462		3cm　C＝2分
	B	432	94	茨城産
	C	161	35	
きゅうり	A	136		4×0.5×0.3cm
	B	116	85	ビニールハウス
	C	59	43	
ひね生が	A	394		3×0.2×0.2cm
	B	251	64	埼玉産

A＝未処理　B＝水浸漬　C＝水煮

りんご（紅玉，ふじ，スターキング）の未処理では93～109mg%，水浸漬では 81～87mg%，水煮では31～52 mg% であった．りんごは皮を剥き変色防止のため水浸けを行い，また煮りんごとして用いることもあるので脱Kのためには好ましい調理法と思われる．果実中でK含量が高いと定評のあるバナナは今回も267mg%と最高値を示し，水煮では173mg%で他の果実の未処理値よりも高いので喫食量にもよるがK制限食事には不適当と思われた．いちご未処理はりんご未処理よりも高く，水煮した値がりんごのナマに近かった．しかしゆでいちごは外観がすこぶる悪く，その生命であるイチゴ色と新鮮さが全く失われてしまうので，使用量を制限し，水さらしのみで料理に添えるのが適当ではないかと思われる．

5)　豆類，海草類，茸類（表6）

大豆の水浸漬条件は試料約 3g を 500ml に20時間浸漬したもので，残存率39%で 663mg% であった．大豆水煮は試料約 3g を水 100ml を保ちながら食用となるまで4時間加熱した結果残存率 16%で 267mg% であった．豆腐，がんもどき 100g を2分間ゆでた値と，大豆 20gをやわらかくゆでた値とはほぼ同じであった．こんぶの使用目的はこんぶを食す場合と煮出汁を用いる2通りがある．今回はこんぶのみの値で煮出汁については測定していないが，浸漬でこんぶ中のKが78%，水煮で82% が失われているのでつけ汁，煮出汁に多量のKが溶出していると考えられる．わかめ未処理もこんぶと同じく高含量であったが，7分間の水浸漬でこんぶ水煮に近い値であった．茸類は未処理，水煮とも野菜類に類似のK含

量であった.

6) 野菜類（表7）

前報[2]の追加として主にいも類を測定したが，未処理では251～534mg%，水浸漬で171～467mg%，水煮で57～340mg% となった．中でもさつまいもはK含量が高く，ゆでこぼしによる効果も少く食品構成上不可欠の食品でもないのでK制限食事には不適当と思われる．

結　論

① 患者食と普通食を比較したところ，4種の献立について，すべての患者食が低含量であった．また1食分のK摂取量では 46～356mg の差があった．

② 個々の野菜[2]については，水浸漬によりK含量の5（かぼちゃ）～36%（ひね生が）が，水煮では10(枝豆)～85%（大根）が溶出し，果実では水浸漬で12（りんごのふじ）～26%（りんごの紅玉），水煮で35（バナナ，富有柿）～70%（りんごのスターキング）溶出の結果を得た．また豆類では大豆，小豆とも高含量であったが，大豆水煮では84%が溶出した．海草類のこんぶ，わかめも高K含有食品であるが共に水浸漬によって80%前後が溶出された．

③ 獣鳥肉類は，水煮で49（豚レバー）～86%（牛肉），魚貝類では37（生さけ）～92%（白す干）の溶出結果を得た．数値の上では野菜類より大きい溶出率であったが，これら動物性たん白質食品のほとんどは加熱調理されるものであり，あらかじめ水煮してからの本調理では風味が落ち調理上も不都合と思われる．従って特別に高いK含量を示す材料または水煮することが調理上適当な食品を除いては，脱K操作はそれほど必要とは思われない．ただし調理の際の煮汁，溶出液の利用はさけることが望まれる．

謝辞 患者食事調製に当り御協力いただいた病院栄養士佐藤ミヨ子氏に深謝いたします．

文　献

1) 小野房子，佐藤文代：臨床栄養，39-5，678，1971
2) 友松俊夫，西田甲子，道口正雄：東京衛研年報，29-1，273，1978

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.*, 30-1, 183-188, 1979

NO_2 の生体影響における生化学的諸指標の検討

鈴木孝人*, 大沢誠喜*, 狩野文雄*, 福田雅夫*, 笠原利英*
寺田伸枝*, 溝口 勲*

Studies on Biochemical Indices in Blood for NO_2 Toxicity

TAKAHITO SUZUKI*, MASANOBU OHSAWA*, FUMIO KANOH*, MASAO FUKUDA*, TOSHIHIDE KASAHARA*, NOBUE TERADA* and ISAO MIZOGUCHI*

The present study was conducted to investigate the sensitive biochemical index for the toxic effects of nitrogen dioxide. Male Sprague-Dawley rats were continuously exposed to nitrogen dioxide at the concentrations of 0.5, 2, 4 and 8 ppm for four weeks. Animals were sacrificed at one week intervals, and then the alterations of enzyme activities, immunoglobulin contents in serum and hematological changes in blood were examined.

The activity levels of amylase of all exposure groups decreased at two and four weeks. Those of β-glucuronidase reduced at more than 0.5 ppm at one week, and thereafter recovered to the control level. Those of cholinesterase fluctuated during the period of exposure. IgA levels increased at more than 2 ppm from two to four weeks.

Keywords : nitrogen dioxide, amylase, β-glucuronidase, cholinesterase, IgA

緒 言

都市部における大気汚染物質としては SO_2, NO_2, O_3, 粉じん等が知られているが, 過去に最も汚染が注目されていた SO_2 に代り, 現在では NO_2 が代表的な汚染物質となってきている. NO_2 の生体影響に関する報告は数多くなされ, それらの研究結果によると, その作用機序は O_3 と類似しており, フリーラジカルや過酸化脂質の生成により呼吸器, 呼吸器以外の臓器及び血液に障害を及ぼすと推定されている[1-3]. しかし, 量一反応関係やその作用機序については今だ不明な点が多い. NO_2 の生体影響を正しく評価するためにはこれらの点の解明が必要とされている. $^{15}NO_2$ 及び ^{15}NO を用いた研究結果によると, $^{15}NO_2$ 及び ^{15}NO は肺組織に吸収されるだけでなく, 高濃度に血液中にも吸収され, 尿中に NO_2^- 及び NO_3^- として排泄されるという報告[4-6] もあるので, 血液に対する影響も充分考えられる. 今回, 我々は NO_2 の生体影響を把握する上で, 疫学的調査にも利用できる鋭敏な血液生化学的, 血液学的諸指標の検索とその量一反応関係を明らかにする目的で, NO_2 濃度を段階的に変えて曝露したラットにおける血液中の変化を検討した.

実験方法

実験動物は Sprauge-Dawley 系の雄性ラットを用い, 7週令から NO_2 曝露を開始した. ラットは温度24±0.5°, 湿度55±5%, 換気回数約10回/時, 粉じん濃度 0.01mg/m³ 以下にコントロールされた曝露チャンバー (内容積約1.6m³, 夏目製) 内で NO_2 濃度を 0, 0.5, 2, 4, 8ppm の5段階の群に分けて連続4週間の曝露を行った. NO_2 濃度はケミルミネッセンス法による窒素酸化物連続測定機 (Monitor Labs Model 8440) で, 粉じん濃度はピエゾバランス粉じん計 (日本科学工業製51-1111型) で測定した. 実験中, NO_2 濃度は±5%以内の変動範囲であった.

採血は1週間の曝露毎にネンブタール麻酔後, 腹部大腿静脈より行った. 血清中の GOT (2. 6. 1. 1.), ALP (3. 1. 3. 1.), ChE (3. 1. 1. 8.), 総蛋白 (TP) 及び総コレステロール (CHO) は Autoanalyzer (日本電子製 JCA-HS 6型)によって分析した. 血清中の amylase (3. 2. 1. 1.) 活性は伊藤らの方法[7], β-glucuronidase (β-Gl., 3. 2. 1. 31.) 活性は Kato らの方法[8] で測定した. amylase 測定の際, 標準血清として Versatol-E を使用した. 血清中の免疫グロブリン量は市販の抗ラット IgA ヤギ血清, 抗ラット IgG ウサギ血清及び抗ラット IgM ウサギ血清を用いて一元平板免疫拡散法[9] によって定量した. IgG 濃度は市販のラット IgG を標準に用いて mg/dl の値で示したが, IgA 及び IgM は拡散した直径 (mm) で表わした. 過酸化脂質含量 (TBA-

* 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. Biochemical and Hematological Changes on Blood of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide for One and Two Weeks

	One Week Exposure					Two Weeks Exposure				
	Control	0.5ppm	2.0ppm	4.0ppm	8.0ppm	Control	0.5ppm	2.0ppm	4.0ppm	8.0ppm
Body Weight (g)	287±17#	285±14	285±15	290±14	293±17	343±23	337±19	343±24	342±18	339±25
GOT (KU)	81.0±12.6	72.6±12.5	88.6±27.0	73.2±11.6	78.7±12.5	61.6±34.6	53.3±27.9	93.8±47.2	94.0±62.6	111.5±69.3
ALP (mIU/m*l*)	695±49	593±117	696±126	681±93	617±57	567±92	501±153	516±97	491±216	545±52
ChE (ΔpH)	0.21±0.04	0.21±0.07	0.19±0.03	0.21±0.05	0.17±0.02*	0.18±0.04	0.16±0.03	0.16±0.05	0.13±0.06*	0.15±0.03*
Amylase§	536±90	622±119	631±73*	606±107	446±118	596±60	465±37**	534±114	478±74**	461±82**
β-Glucuronidase$^{\pi}$	20.8±4.7	15.5±3.2*	15.7±4.7*	16.3±3.5*	15.2±6.7	18.8±6.7	18.2±5.2	18.0±1.3	17.2±4.2	18.7±5.0
Ig A (mm)	4.45±0.30	4.70±0.26	4.76±0.12*	4.61±0.22	4.68±0.20	4.29±0.18	4.57±0.20*	4.56±0.09**	4.56±0.20*	4.59±0.20**
Ig G (mg/d*l*)	58±27	49±11	58±16	56±13	61±28	99±43	91±45	87±43	102±58	87±50
Ig M (mm)	4.61±0.27	4.70±0.98	4.53±0.17	4.63±0.25	4.83±0.27	4.80±0.28	5.05±0.69	5.06±0.34	5.10±0.32	5.04±0.41
TP (g/d*l*)	4.48±0.29	4.48±0.13	4.47±0.19	4.53±0.20	4.39±0.19	4.91±0.24	4.96±0.30	5.00±0.22	4.33±1.72	5.03±0.23
CHO (mg/d*l*)	54.8±1.34	42.1±4.9	50.7±3.6	46.2±6.8	44.2±3.3	53.4±5.8	57.7±6.7	49.9±3.5	—	—
TBA Reactants$^{\phi}$	4.82±1.39	4.98±0.87	4.18±1.08	3.71±0.36	3.34±0.39	4.25±0.46	3.89±0.33	4.18±0.48	4.11±0.47	3.89±0.28
Hb (g/d*l*)	11.5±1.0	11.4±0.9	10.6±1.1	11.4±1.1	11.7±0.8	13.0±0.6	13.0±0.5	13.1±0.7	12.8±0.8	12.8±0.7
RBC (10^6/mm^3)	5.3±0.5	5.1±0.5	4.9±0.5	5.3±0.5	5.4±0.3	6.1±0.3	5.9±0.3	6.0±0.4	5.8±0.4	5.8±0.2*
Ht (%)	32.7±2.8	32.3±2.6	30.4±3.1	32.4±3.2	33.1±2.2	35.3±1.6	34.8±1.5	34.6±1.9	33.6±2.2	33.5±1.4*
MCV (μ^3)	63±2	65±2	62±1	61±2	62±2	59±1	60±1	59±2	59±2	59±2
MCH ($\mu\mu$g)	22.1±0.6	22.8±0.9	21.8±0.5	21.7±0.8	22.0±0.3	21.6±0.5	22.2±0.7	22.2±0.5	22.4±0.5**	22.2±0.7
MCHC (%)	35.1±0.6	35.3±0.7	35.1±0.5	35.4±0.4	35.4±0.5	36.6±0.6	37.3±0.7	37.7±0.5	38.1±0.6**	37.9±0.7**

#: Data are expressed as mean and standard deviation on eight to nine animals.

§: Somogi units/d*l*, π: Free p-nitrophenol μg/hr/m*l*, ϕ: malonaldehyde n moles/m*l*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$

Table 2. Biochemical and Hematological Changes on Blood of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide for Three and Four Weeks

	Three Weeks Exposure					Four Weeks Exposure				
	Control	0.5ppm	2.0ppm	4.0ppm	8.0ppm	Control	0.5ppm	2.0ppm	4.0ppm	8.0ppm
Body Weight (g)	366±28	362±21	366±27	367±21	361±29	387±32	392±23	398±32	401±26	383±40
GOT (KU)	100.8±23.6	89.4±9.9	90.3±11.3	102.6±19.9	100.0±15.1	135.1±51.9	145.6±70.2	128.5±27.2	197.1±10.3**	136.8±27.4
ALP (mIU/m*l*)	769±127	817±114	833±106	766±84	723±85	496±43	511±96	471±55	464±44	522±146
ChE (ΔpH)	0.26±0.06	0.27±0.07	0.24±0.03	0.24±0.05	0.23±0.03	0.15±0.06	0.21±0.04*	0.19±0.06	0.18±0.05	0.17±0.04
Amylase	639±103	644±119	550±99	552±46*	614±56	673±54	572±105*	593±61*	497±73**	521±58**
β-Glucuronidase	22.7±3.0	23.3±4.0	22.0±3.0	24.0±5.2	22.8±3.8	24.5±5.5	20.7±3.3	21.7±4.8	20.5±4.3	17.7±4.3*
Ig A (mm)	4.31±0.17	4.31±0.19	4.53±0.18*	4.63±0.25*	4.65±0.27*	4.19±0.38	4.16±0.11	4.56±0.19*	4.57±0.14*	4.59±0.15*
Ig G (mg/d*l*)	109±23	129±46	137±38	152±26**	153±35*	159±63	148±54	155±64	164±56	224±97
Ig M (mm)	5.43±0.29	5.40±0.26	5.27±0.69	5.32±0.42	5.00±0.36	5.18±0.34	5.29±0.67	5.36±0.52	5.32±0.46	5.51±0.42
TP (g/d*l*)	4.73±0.39	4.93±0.20	4.86±0.12	5.03±0.09	5.04±0.10	5.66±0.24	5.81±0.25	5.79±0.25	5.72±0.39	5.78±0.23
CHO (mg/d*l*)	58.1±11.2	58.0±8.9	61.4±4.6	58.8±3.6	65.9±14.7	51.2±5.6	—	51.7±6.2	50.7±7.4	53.8±6.0
TBA Reactants	3.73±0.39	3.73±0.40	3.56±0.17	3.25±0.33*	2.97±0.38**	3.75±0.27	3.52±0.26	3.67±0.31	4.28±0.28**	4.08±0.26*
Hb (g/d*l*)	12.9±1.0	12.8±1.0	13.0±0.4	12.3±0.8	12.2±0.5	13.0±0.7	13.0±0.7	13.2±0.5	12.0±1.4	13.3±0.9
RBC (10^6/mm^3)	6.1±0.4	5.9±0.5	6.1±0.3	5.8±0.4	5.8±0.2	6.3±0.3	6.4±0.3	6.5±0.4	6.7±0.5	6.7±0.3**
Ht (%)	35.7±2.7	35.1±2.9	36.2±1.2	33.9±2.3	33.4±1.3*	36.1±1.9	36.3±1.9	36.6±2.4	37.7±4.2	36.5±1.9
MCV (μ^3)	60±1	61±1	60±2	59±1	59±1	58±2	58±3	57±2	57±4	55±2**
MCH ($\mu\mu$g)	21.6±0.5	22.0±0.7	21.6±0.7	21.5±0.3	21.4±0.7	20.8±0.6	20.8±1.0	20.5±0.8	18.2±2.4*	20.1±0.8
MCHC (%)	36.2±0.6	36.4±0.6	35.9±0.4	36.4±0.3	36.6±0.5	35.9±0.5	35.7±0.7	36.0±1.5	32.2±6.0	36.4±0.5

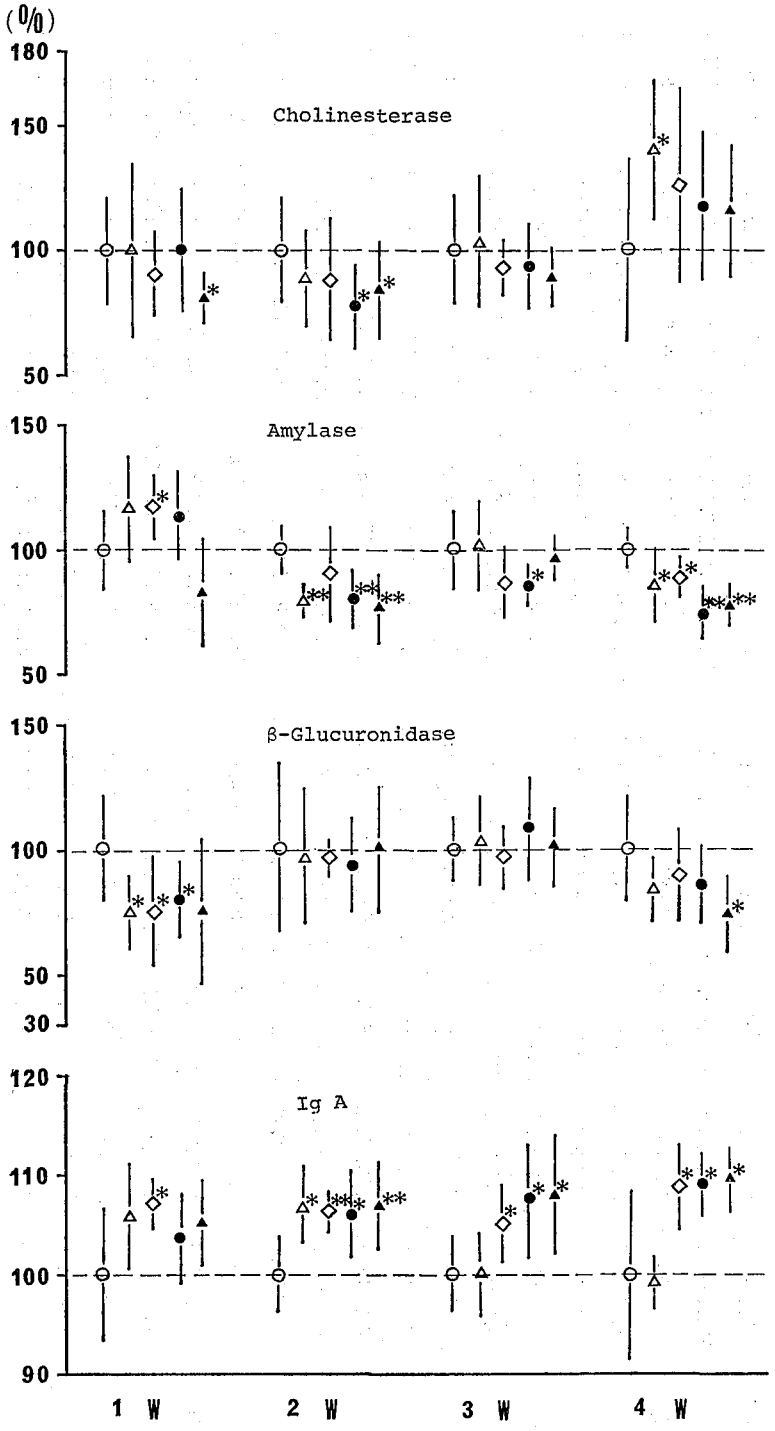


Fig. 1. Percent Changes of Biochemical Values on Rats Exposed to Nitrogen Dioxide against Average Value of Control at Various Weeks

Figure shows the mean value±standard deviation on eight to nine animals.

○ : Control, △ : 0.5ppm, ◇ : 2 ppm, ● : 4 ppm, ▲ : 8 ppm

* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$

Reactants) は山崎の方法[10] によって分析し，その含量を malonaldehyde の 532nm における分子吸光係数(1.56×10^5) を基にして算出した．また，血液学的検査は Coulter Counter Model S (Coulter Electric 社製) により赤血球数 (RBC)，ヘモグロビン (Hb)，ヘマトクリット値 (Ht)，平均赤血球容積 (MCV)，平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) 及び平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) を測定した．なお，各週における対照群と NO_2 曝露群との平均値の比較には t-検定を用いた．

実験結果

Table 1 と 2 に実験結果を示したが，amylase，β-Gl.，ChE，IgA を除き，2 ppm 以下の曝露群では，対照群と比較して有意な差は認められなかった．しかし，4 ppm 以上の曝露群では IgG，過酸化脂質及び RBC 等の血液学的検査項目に 2 週目以降に有意差のあるものも存在した．

Fig. 1 は各週における対照群の平均値を 100 とした NO_2 曝露群の amylase，β-Gl.，ChE 活性及び IgA 含量の%変化量の平均と標準偏差を示したものである．amylase は 2 週目と 4 週目に 0.5ppm 以上の群で活性の低下が見られる．β-Gl. も 0.5ppm 以上の群で 1 週目に活性低下がみられるが 2 週目には対照レベルに戻った．ChE は 2 週目に活性が若干低下するが，4 週目では上昇傾向がみられた．IgA 含量は 2 週目以降は2ppm 以上で増加が認められた．また，これらの変動についての量—反応関係は必ずしもはっきりしなかった．

考　察

NO_2 曝露によって引き起こされる病理学的変化よりも早期の段階でその影響の把握ができ，また，量—反応関係を究明しやすい点で生化学的検索は一つの強力な手段になると思われる．以下，今回の実験結果で変化の認められた項目について若干の考察を加えてみた．

amylase は肺組織中にも存在しており[11]，肺炎，気管支喘息の患者では amylase 活性の上昇とアイソザイムパターンの変化が起こるというデータから[12-15]，NO_2 による肺に対する障害によって血清中の amylase 活性の上昇が予想されたが，本実験では活性の低下が認められた．現在のところ，活性低下の原因は不明であるが，30～45ppm の NO_2 の 2 時間曝露により副腎皮質ホルモンの血清中での上昇とその上昇が 5～19日間持続するという報告[16]，更に，このホルモンによって肝の糖質代謝が亢進し，血清中の amylase 活性の低下が起こるという報告[17]から考えると，NO_2 による amylase 活性の低下の可能性も考えられるが，今回の実験条件でホルモン分泌が亢進されたか否かは不明なので，このメカニズムの解明は今後の課題と言えよう．

β-Gl. は β-D-glucuronide の水解酵素であるが，この酵素は酸性ムコ多糖を代謝してヘキソサミンを生成することが知られている．Drozdz らによれば[18,19]，1ppm NO_2 を 6 ケ月間曝露されたモルモットの肺及び肝のヘキソサミンの減少を報告しており，また，1ppm NOx を 6 ケ月間曝露したモルモットで尿中酸性ムコ多糖の排出が増加したという報告[20]もあり，更に，0.25ppm の O_3 を 3 時間曝露されたウサギの肺 β-Gl. 活性の低下についての Hurst らの報告[21]から考えると，NO_2 や O_3 によって肺及び肝などの β-Gl. 活性の低下が考えられ，それが血清中にも反映するのではないかと予想されたが，今回の実験では一過性の β-Gl. 活性の低下のみが認められた．しかし，我々の実験では一過性の低下であったが，Drozdz らの結果を考えるならば，NO_2 を長期間曝露した場合 β-Gl. 活性の変動が長期間に渡ることが予想されるので今後も追求する必要があると思われる．また，今回の実験結果から，0.5ppm 程度の低濃度でも曝露初期に活性低下が生じたことからそれ以下の濃度で変動する可能性が示唆される．

ChE についての報告例では，0.4～2.7ppm に 4～6 年間曝露された労働者の血清 ChE 活性の低下[22]，1 ppm に 6 ケ月間曝露されたモルモットの肝 ChE 活性の低下[23]など比較的低濃度の NO_2 曝露で活性低下が認められている．ChE の活性低下については，セリン酵素である ChE が過酸化脂質によって影響を受け易いためと解釈されているが，本実験結果では 2 週目で低下しているが，その後は上昇傾向を示していた．このことは ChE は過酸化脂質による影響だけでなく，生体側の何らかの補償機構の関与が示唆される．

NO_2 などの曝露により免疫グロブリン量の変動が起こることはいくつか報告されているが，種属差や曝露条件等によってその結果は必ずしも一定ではない．しかし，抗体産生能や感染抵抗性に及ぼす NO_2 の影響を評価する指標としては重要であると思われる．肺気腫の患者では IgA は増加するが IgG，IgM は変化しないこと[24]，農夫肺の患者では IgA と IgG が増加すること[25]，0.5～2.7ppm NO_2 に 6 年間以上曝露された労働者では IgA と IgM の増加と IgG の減少が報告されている[26]．今回の実験でも，IgA の増加が認められたが，IgG と IgM は変化しなかった．これら免疫グロブリンの増加理由について，Balchum によって[27]，NO_2 を曝露したモルモットの肺蛋白が変性して自己抗原様物質になり，それが循環系に放出されるために抗体価が上

昇するという可能性が示唆されている．一方，曝露期間中の感染による IgA の増加の可能性も考えられるが，その場合には IgA のみでなく他の免疫グロブリンの増加も当然考えられるので，今回 IgM 及び IgG が変化しなかったことから，むしろ，2 ppm 程度の比較的低濃度の NO_2 曝露によっても免疫機構に何らかの影響を与え得る可能性が示唆されると思われる．

今回，4項目で変化が認められたが，それらの量—反応関係がはっきりと示されないことから必ずしも鋭敏な指標であるとは断定できないが，現在までなされてきた報告と考え合せると今後も詳細な検討が必要と思われる．

（本研究は昭和53年度当研究所調査研究課題「複合大気汚染に係る健康影響調査に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1) Stokinger, H. E. and Coffin, D. L.: Air Pollution, I, 2nd Ed., 446, 1968, Acad. Press, New York & London
2) Fournir, E.: *Eur. J. Toxicol. Hyg. Environ.*, 6, 109, 1973
3) Mueller, P. K. and Hitchcock, M.: *J. Air Poll. Cont. Assoc.*, 19, 670, 1968
4) Shrorcova, S. and Kant, V.: *Cesh. Hyg.*, 16, 71, 1971
5) Goldstein, E.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 115, 403, 1977
6) 吉田克己，今井正之，笠間一男，北畠正義：大気汚染研究，11，212，1976
7) 伊藤和幸，片桐健二，後藤和夫，宮治　真，武内俊彦：臨床病理，25，674，1977
8) Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H., Nobunaga, M., Masuya, T., and Sawada, T.: *Chem. Pharmac. Bull.*, 8, 239, 1960
9) Mancini, G., Carbonara, A. O., and Heremans, J. F.: *Immunochem.*, 2, 235, 1965
10) 山崎晴一郎：臨床病理，15，616，1967
11) Otsuki, M., Yuu, H., Maeda, M., Saeki, S., Yamasaki, T., and Baba, S.: *Cancer*, 39, 1656, 1977
12) 大槻　真：最近医学，33，831，1978
13) McGeachin, R. L. and Adams, M. R.: *Cancer*, 10, 479, 1957
14) 原田紀久子，北村元仕：医学と生物学，82，155，1971
15) 北村元仕：内科，29，834，1972
16) Tusl, M., Vyskocil, and Seninova, V.: *Reinhaltung Luft*, 35, 210, 1975
17) Janowitz, H. D. and Dreiling, D. A.: *Am. J. Med.*, 27, 924, 1959
18) Drozdz, M. E., Kucharz, K., Ludyga, K., and Drozdz, T. M.: *Eur. J. Toxicol. Environ. Hyg.*, 9, 287, 1976
19) Drozdz, M. E. and Kucharz, K. L.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 38, 259, 1977
20) Kosmider, S.: *Potol. Polska*, 24, 107, 1973
21) Hurst, D. J., Gardner, D. E., and Coffin, D. L.: *J. Reticuloendoth. Soc.*, 8, 288, 1970
22) Kosmider, S.: *Wiad. Lek.*, 8, 729, 1973
23) Kosmider, S.: *Patologia Polska*, 24, 381, 1973
24) Biegel, A. A. and Krumholz, R. A.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 97, 217, 1968
25) Roberts, R. C., Wenzel, F. I., and Emanuel, D. A.: *J. Allerg. Clin. Immunol.*, 52, 297, 1973
26) Kosmider, S., Misiewicz, A., Felus, E., Drozdz, M., and Ludyga, K.: *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 31, 9, 1973
27) Balchum, O. J., Buckley, R. D., Sherwin, R., and Gardner, M.: *Arch. Environ. Health*, 10, 274, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 189-193, 1979

NO_2 暴露によるラットの Reticulocyte 出現率の変動

福田雅夫*, 狩野文雄*, 寺田伸枝*, 溝口 勲*

Changes of Reticulocytes on Rats Exposed to NO_2

MASAO FUKUDA*, FUMIO KANOH*, NOBUE TERADA* and ISAO MIZOGUCHI*

Hematological changes were examined on the rats exposed to nitrogen dioxide at concentrations of 0.5, 2, 4 and 8 ppm. Following four weeks of continuous exposure, reticulocytes elevated as the concentration of nitrogen dioxide increased; on the other hand, erythrocyte counts increased in the rats exposed to 8 ppm NO_2. We noted that reticulocytes appearance showed a more sensitive response to NO_2 exposure than erythrocytes.

Keywords : reticulocyte, erythrocyte, rat, nitrogen dioxide

緒 言

窒素酸化物は健康への有害作用の可能性および光化学スモッグ生成の一原因物質として注目されるようになり，NOx の排出規制や NO_2 の環境基準が設定されてきたが，NO_2 の都市部における広域化および濃度の増加傾向が認められている．人体への影響を把握するために，より精密な疫学調査の必要性が世界的に要請されるとともに，現実の汚染レベルに近い濃度での長期動物暴露によるデータの蓄積が必要とされている．われわれは疫学調査に使用可能な感度の高いパラメーターの探究を課題として赤血球系への NO_2 の作用を検索した．

NO_2 の血液成分に対する影響に関して，Ehrman ら[1]はNO_2 5および10ppmに1時間暴露したマウスは赤血球数およびHbの減少を，10ppmではMeHbの増加を，1ppmでは赤血球数およびHbには変化のないことを報告している．鈴木ら[2]は5, 10, 20ppmのNO_2に24時間暴露したラットは赤血球数およびHbの増加，MCVの減少を，Furiosiら[3]は2±1ppmのNO_2に3および6ヶ月暴露したラットは赤血球数の増加，MCVの低下をすることを，Freeman ら[4]は 15ppm NO_2 の生涯暴露を行い，動脈酸素分圧が減少し多血球血症が起ることを，Petr ら[5]は疫学調査で NO_2 と SO_2 の汚染地域はそうでない地域に比べ，若い安定した型の赤血球の増加することを報告している．以上のごとく，NO_2 が血液成分に影響を与えることを示唆する知見が得られているが，NO_2 濃度が高濃度すぎること，および個々の知見についての量—反応関係が明確でない．今回われわれは NO_2 濃度と赤血球数とくに Reticulocyte の出現率について検討し，現在までに行われた実験の NO_2 濃度より低濃度で，量—反応関係についても明らかな結果をえたのでここに報告する．

方 法

実験動物 Sprague-Dawley 系ラット（♂，日本チャールス・リバー）を1週間清浄空気で環境順化させた後，7週令より NO_2 暴露を開始し，4週目に各群8～9匹を実験に供した．

暴露方法 ヘパフィルター，活性炭槽を通じた室内空気に1％および 1,000ppm NO_2 ガス（高千穂化学）を添加し，同タイプの5系列の動物暴露チャンバー（夏目製作所製）に導入した．各チャンバーの濃度は，0，0.5，2，4および 8ppm NO_2 である．NO_2 濃度の変動は±5％であった．暴露チャンバーは内容積 1.6m³で，毎時10回換気を行った．温度は24±0.5°C，湿度は55±5％，騒音は48ホーン（A特性），照度は100ルクスであった．照明は午前7時に点燈し午後7時に消燈した．浮遊粒子測定は Kanomax Piezobalance 51-1111型測定器を用いて行い，全実験期間を通じて 0.01mg/m³以下であった．NO_2 測定は Monitor Labs 8440型 NOx 計を用いた．

測定方法 NO_2暴露した各群8～9匹のラットをネンブタール麻酔を行い，ヘパリン加注射器を用いて下大静脈より採血した．Reticulocyte の測定[6]は採血後直ちに清浄なスライドグラスに塗抹標本を作製し，3分間メタノール固定後 1：2000 Acridineorange で2～3秒染色し，螢光顕微鏡で観察した．Reticulocyte の出現率は赤血球 1,000 個当りで算定（‰）し，血液 1mm³当りの

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Hematological Changes on Rats

	n	RBC $\times 10^6/mm^3$	Reticulocyte ‰	Reticulocyte $\times 10^4/mm^3$	Hb g/dl	Ht %	MCV μ^3
Control	9	6.3±0.3	15.3±2.6	9.5±1.4	13.0±0.7	36.1±1.9	58±2
0.5ppm	8	6.4±0.3	18.1±3.0	11.5±2.1*	13.0±0.7	36.3±1.9	58±3
2.0ppm	9	6.5±0.4	18.7±3.1*	11.8±1.9*	13.2±0.5	36.6±2.4	57±2
4.0ppm	8	6.7±0.5	20.5±3.4**	13.4±2.1***	12.0±1.4	37.7±4.2	57±4
8.0ppm	9	6.7±0.3*	21.8±2.8***	14.6±1.6***	13.3±0.9	36.5±1.9	55±2**

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

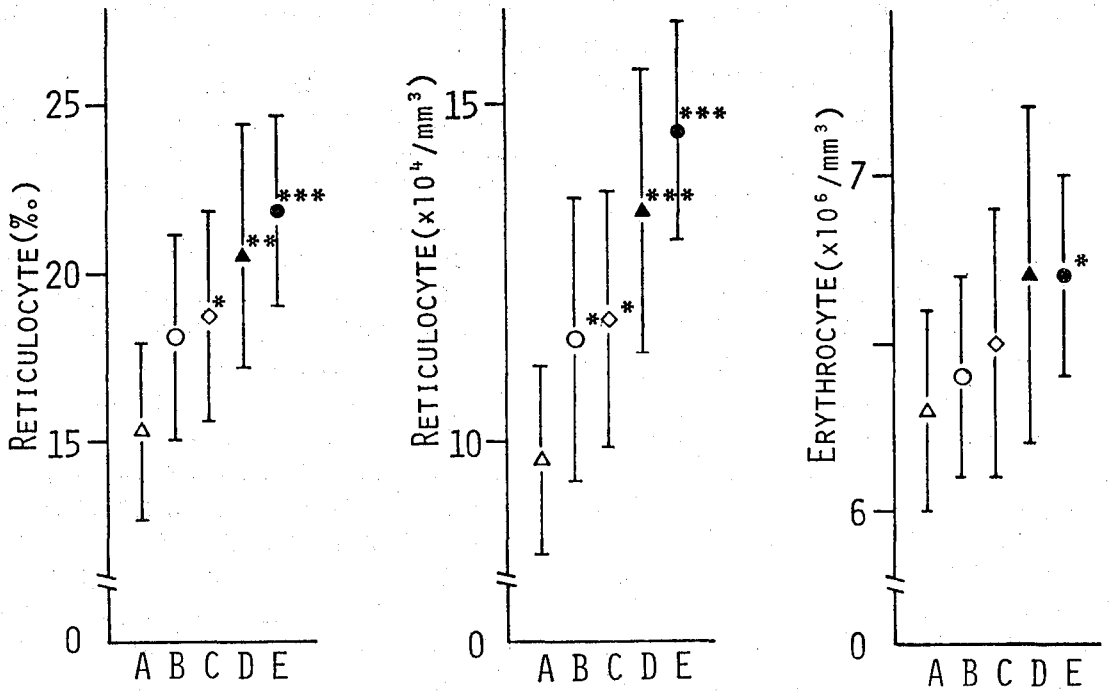


Fig. 1. Changes of Reticulocytes and Erythrocytes
A Control B 0.5ppm C 2.0ppm
D 4.0ppm E 8.0ppm
* $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

数値に換算した．赤血球数 (RBC)，血色素量 (Hb)，ヘマトクリット値 (Ht)，平均赤血球容積 (MCV)，平均赤血球血色素量 (MCH)，平均赤血球血色素濃度 (MCHC)，白血球数 (WBC) は Coulter Counter Model S (Coulter Electric) で測定した．

結　果

Reticulocyte は多量のRNAを含有[7]し，一方Acridine-orange は RNA に対して強い親和性をもち，赤色の螢光を発する[8]．メタノール固定標本の Reticulocyte は写真のごとく赤血球体がほぼ均一の赤色の螢光像として

Exposed to NO_2

MCH	MCHC	WBC
$\mu\mu g$	%	$\times 10^3/mm^3$
20.8±0.6	35.9±0.5	6.9±1.2
20.8±1.0	35.7±0.7	6.5±2.3
20.5±0.8	36.0±1.5	6.2±2.1
18.2±2.4*	32.2±6.0	6.6±2.0
20.1±0.8	36.4±0.5	7.9±1.7

みられ，正常成熟赤血球は暗緑色を示し容易に識別できた．Reticulocyte の出現率を統計的な有意性の検定（t-test）でしらべると，NO_2 8 ppm 群では危険率 0.1％で，4 ppm 群は危険率1％で，2 ppm 群では危険率5％で有意の増加を認めた．又 0.5 ppm 群は増加傾向を示した．Reticulocyte の出現率を血液 1 mm^3 あたりの数に換算すると，NO_2 4 および 8 ppm 群では危険率 0.1％で，0.5 および 2 ppm群では危険率5％で有意の増加を認め，NO_2 濃度の増加にともなって Reticulocyte 数は増加した．（表1，図1）

赤血球数は NO_2 8 ppm 暴露群のみが危険率5％で有意の増加を認め，他の暴露群は増加傾向を示した．

Reticulocyte 数は赤血球数の変化よりも明確に NO_2 濃度の増加に対応して増加した．Reticulocyte 数と赤血球数の間に相関（r=0.392）がみられ，NO_2 濃度が濃い群ほど右上に出現し，NO_2 濃度と Reticulocyte 数および赤血球数の関係をよく示している．（図2）

Hb，Ht，MCHC，WBC には各暴露群とコントロール群間で差が認められず，MCV は NO_2 8 ppm 群で，MCH は 4 ppm 群で減少したが量—反応関係は明らかでなかった．

考　察

前述した諸報告[1-5]から，短期（1時間）暴露では赤血球数の減少がみられ，長期（1日～数ケ月）暴露では赤血球数の増加傾向が認められるが，NO_2濃度との間に量—反応関係は必ずしも明確でなかった．本実験の赤血球数も前述の報告と同様に明らかな量—反応関係は得られなかったが，Reticulocyte 数は NO_2 濃度との間に明確な量—反応関係が認められ，しかもその関係はReticulocyte 数を出現率（‰）で表わすよりも，血液 1 mm^3 当りの数で表わした方がより明らかであった．

各 NO_2 暴露群の赤血球の産生数／崩壊数について試算[9]すると，コントロール群を1.00とすると，0.5 ppm 群は1.19，2 ppm 群は 1.20，4 ppm 群は 1.32，8 ppm 群は1.43となった．赤血球の産生数／崩壊数が NO_2 濃度の増加に対応して増えることからも赤血球産生が亢進していることがうかがえる．

NO_2 暴露による Reticulocyte，赤血球の増加に対するメカニズムとしてつぎの2通りが考えられる．一つは NO_2 暴露により副腎皮質ホルモンのコルチコステロンが分泌されることを Tusl ら[10]が報告している．このことから一般代謝が亢進し酸素需要をおこし，Erythropoietin活性を増強して赤血球産生が促進されることである．二つ目は Freeman ら[4]は NO_2 の生涯暴露を行い動脈酸素分圧が減少し多血球血症が起ること，織田ら[11]は NO_2 暴露したマウスは NOHb を産生し，血液中の NOHb 濃度は NO_2 濃度の増加に対応して増加することを報告している．このことより，NO_2 暴露により NOHb および MeHb が生成し，血液の酸素結合容量が低下する．それを補うために赤血球の産生が亢進するのではないかという考えである．

NO_2 暴露による Reticulocyte の増加は，赤血球の増加よりも敏感に影響をつかむことができると考える．当研究室の実験で，ヒトに NO_2 1ppm 30時間暴露を行うと，Reticulocyte および好塩基斑点赤血球の増加傾向を示した[12]ので，今後疫学調査の一指標としての使用可能性を考える場合，現実の汚染レベルに近い濃度での長期動物暴露実験を検討してゆく必要性が残されている．

なお，Reticulocyte の測定についての従来の方法—超生体染色法はその操作算定をできるだけ敏速におこなわなくてはならない欠点があったが，工藤の方法は塗抹標本なので手技が容易で標本の長期保存ができるので，疫学調査において利用価値がでると考える．

結　論

0，0.5，2，4および 8 ppm の NO_2 に4週間連続暴露されたラットについて血液学的変化の検討をおこなった．Reticulocyte は 0.5 ppm から 8 ppm の NO_2 暴露で明確に量—反応関係が認められた．赤血球数はNO_2 8 ppm 暴露のみ有意の増加が認められ，0.5 ppm から4 ppm の NO_2 暴露では増加傾向を示した．Reticulocyte は赤血球よりも鋭敏に NO_2 暴露の影響をとらえられることができた．

謝辞　本研究にあたり，御指導を頂きました当研究所細菌第二研究科主任研究員加納尭子氏に感謝の意を表します．

（本研究は昭和53年度当研究所調査研究課題「複合大

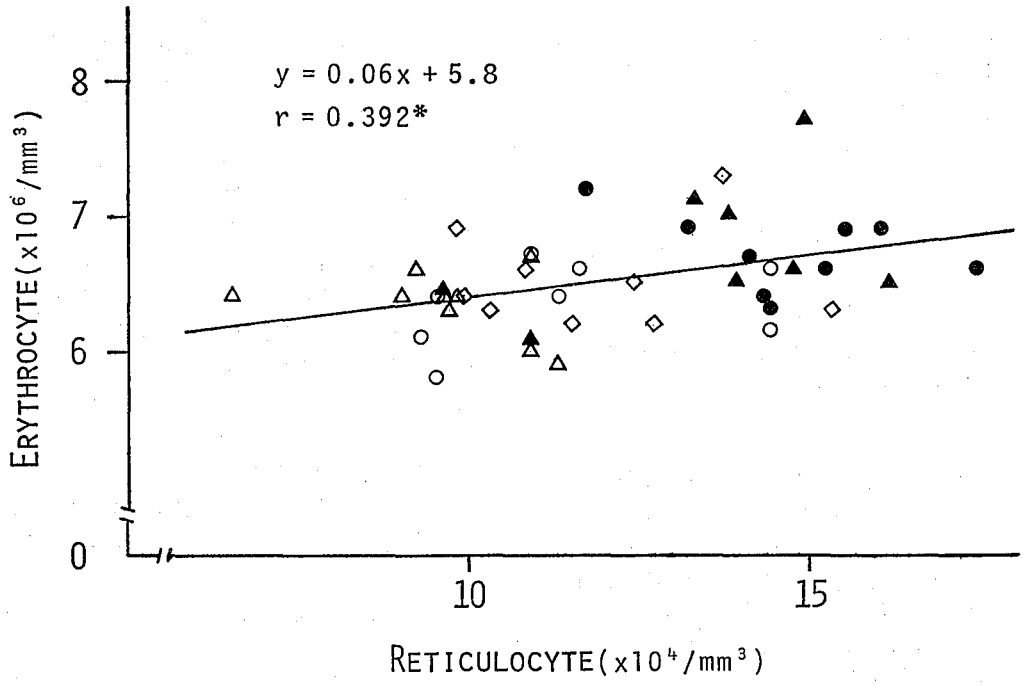


Fig. 2. Correlation between Reticulocytes and Erythrocytes
△ Control ○ 0.5ppm ◇ 2.0ppm
▲ 4.0ppm ● 8.0ppm * $p<0.05$

気汚染に係わる健康影響調査に関する研究」として実施したものである.)

文 献

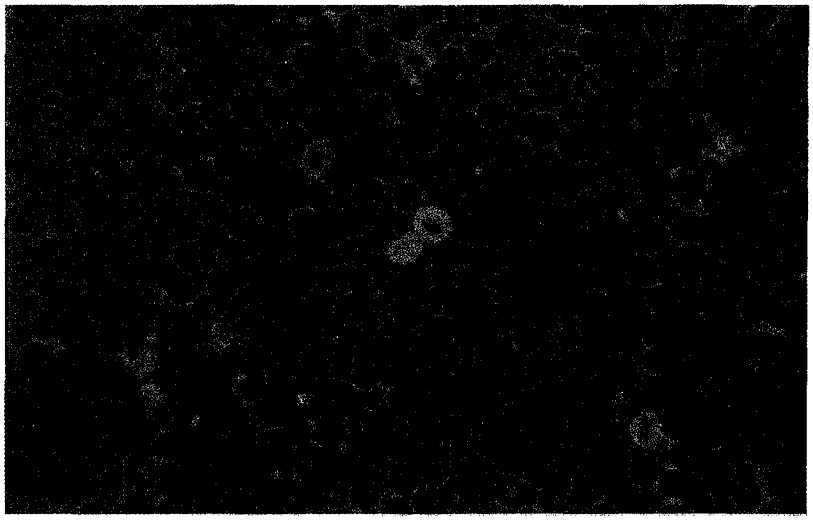
1) Ehrman, R. A., Treshow, M., and Lytle, I. M.: *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, 33, 751, 1972
2) 鈴木 明, 市瀬孝道：国立公害研究所研究発表会予稿集, 155, 昭和54年
3) Furiosi, N. J., Crane, S. C., and Freeman, G: *Arch Environ. Health*, 27, 405, 1973
4) Freeman, G., Crane, S. C., Furiosi, N. J., et al.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 106, 563, 1972
5) Petr, B., Schmidt, P.: *Hyg. and Sanit.* 31, 111, 1966
6) 工藤吉郎：慈医誌, 81, 356, 1966
7) 妹尾左知丸：細胞化学シンポジウムⅠ, 74, 1953
8) Armstrong, J. A.: *Exp. Cell Res.*: 11, 640, 1956
9) 野村武夫：赤血球 生成機序と調節, 50, 昭和44年, 中外医学社
10) Tusl, M. Vyskocil, and A., Seninova, V.: *Reinhaltung Luft*, 35, 210, 1975
11) Oda, H., Kusumoto, S., and Nakajima, T.: *Arch Environ. Health*, 30, 453, 1975
12) 福田雅夫：未発表

写 真 説 明

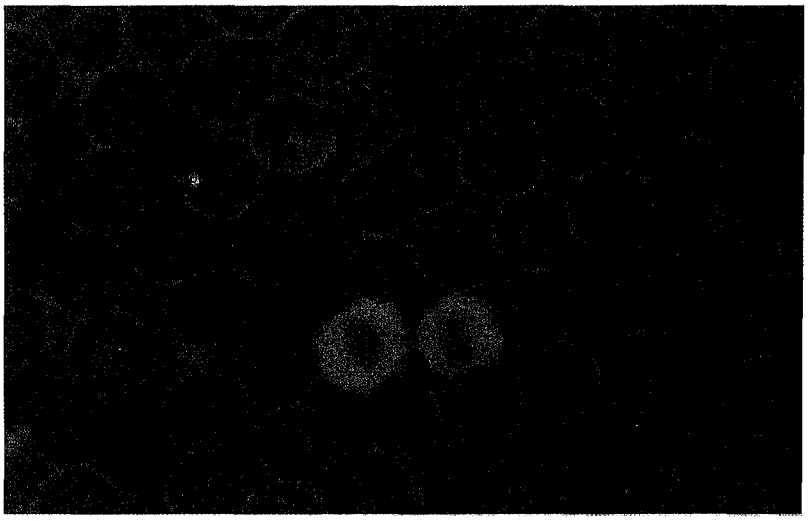
Photo 1. Reticulocytes Viewed through Fluorescence Microscope × 400

Photo 2. Reticulocyte and Basophilic Stippled Erythrocyte × 1000

1



2



東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 195-198, 1979

ラット尿中ハイドロキシプロリン排泄に及ぼす NO_2 曝露の影響

笠原利英*, 大沢誠喜*, 鈴木孝人*, 溝口 勲*

The Effect of NO_2 Exposure on Urinary Excretion of Hydroxyproline in Rats

TOSHIHIDE KASAHARA*, MASANOBU OHSAWA*, TAKAHITO SUZUKI* and ISAO MIZOGUCHI*

Changes in urinary hydroxyproline excretion of male Fischer rats caused by nitrogen dioxide (NO_2) were studied during 110 days of continuous exposure at the concentrations of 0.3, 0.5 and 1.0 ppm and 4 weeks of exposure at 1.0 ppm.

Urinary hydroxyproline of rats exposed to 1.0ppm NO_2 increased at one week over the control value, whereas the rats exposed to 0.5ppm excreted more hydroxyproline even at 30 day than the non-exposed ones. In both cases urinary hydroxyproline excretion thereafter returned to the control level. Exposure to 0.3ppm induced no alterations in hydroxyproline excretion.

These results suggest that NO_2 disturbs collagen metabolism in the body at the initial stages of exposure.

Keywords : nitrogen dioxide, urinary hydroxyproline, rat

緒　言

二酸化窒素（NO_2）は燃焼等の過程により生ずる大気汚染物質の主要な構成成分である．NO_2 が人間や動物に対して何らかの生化学的，生理学的および病理形態学的な影響を与えることは，疫学的にも実験的にも明らかになってきている．現在，人体への影響を明らかにするための疫学調査では，健康障害を代表する指標として，肺機能，呼吸器疾患罹患率，持続性せき・たん有症率および死亡率などが用いられているが，その他に客観性を持ち，NO_2 に対して特異的である鋭敏な指標を探究することが急務となっている．動物実験においては，比較的低濃度の NO_2 の長期曝露が呼吸器系に対して種々の作用，たとえば肺気腫[1-4]，肺繊維症[5]あるいは肺胞壁肥厚[6]など，その成因の一部分として結合組織の変化が関与すると思われるような影響を及ぼすことが報告されている．

以上の観点から，我々はコラーゲン代謝に NO_2 が影響するのかどうかを明らかにし，またその代謝産物である尿中ハイドロキシプロリン（以下 Hyp と略す）排泄量が NO_2 毒性に対する指標となるかを検討することを目的とした．

本報告は，低濃度の NO_2 の尿中 Hyp 排泄量に及ぼす影響をラットを用いて比較的短期間の曝露において調べたものである．

実験方法

動物・飼料および NO_2 曝露　動物は Fischer 系雄ラットを用い，1群を10匹として5週令（平均体重91g）より曝露チャンバー（温度24±0.5°，湿度55±5％）内にて0.3，0.5および1.0ppm の NO_2 を110日間曝露した．また 1.0ppm の4週間曝露実験においては，1群8匹ずつ60日令（平均体重 200g）より曝露を開始した．NO_2 濃度の測定はケミルミネッセンス法による窒素酸化物連続測定装置（Monitor Labs Model 8440）で行なった．給与した固型飼料の Hyp 含量は0.17％であった．

採尿方法　動物をガラス製代謝ケージ（杉山元医理器）に移し，常法に従い防腐剤として1，2滴のトルエン存在下で24時間尿を採取した．採尿中動物には水と飼料を自由に摂取させた．採取した尿は数時間低温下に静置し，わずかな混入飼料片を沈めた後上澄を分析まで凍結保存した．採尿中 NO_2 曝露は行なわなかった．

尿中 Hyp の定量　試料尿を 6M 塩酸下，105°にて18時間加水分解後，活性炭カラム（ツルミコール GL-80, 0.8×2.0cm)にて脱色した．Hypの定量はBergman, I. らの方法[7]に従った．尿水解物中には Hyp の発色阻害物質が含まれているので，その補正を内部標準法[7]により行なった．本操作の添加回収率は99％であった．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

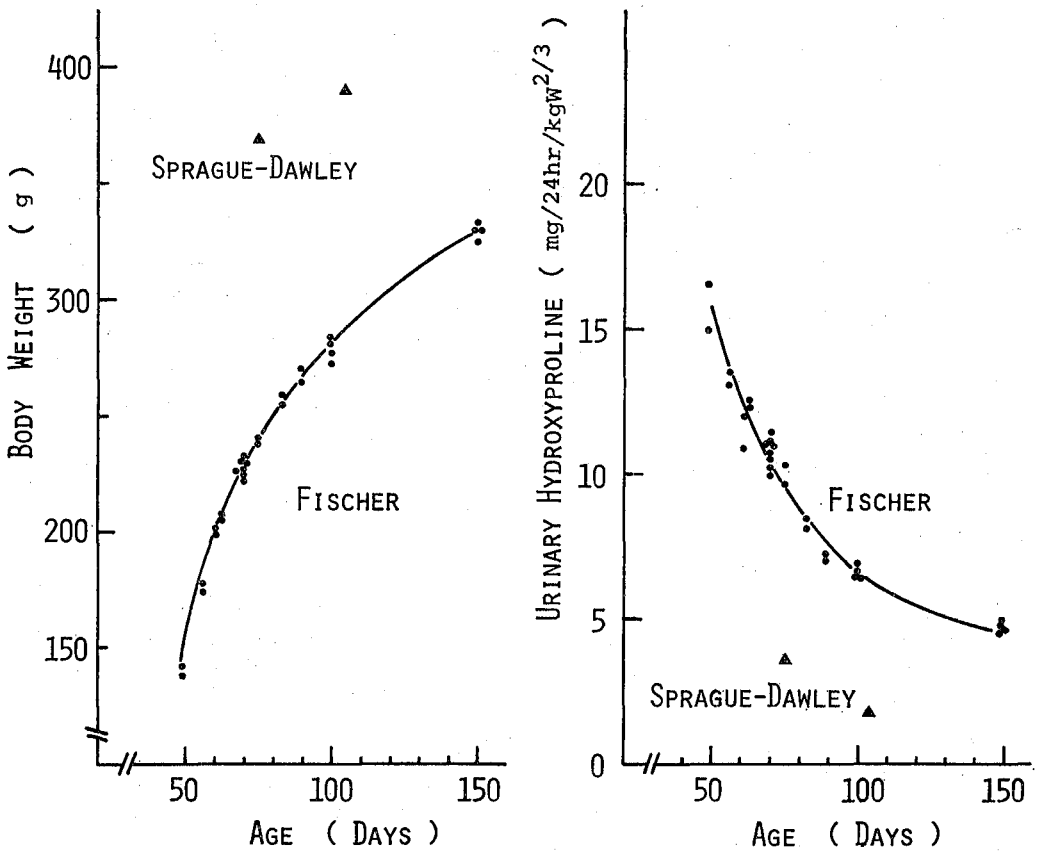


Fig. 1. Changes in Body Weight and Urinary Hydroxyproline with Age

実験結果

成長に伴う尿中 Hyp 量の変化 本実験および付随実験に用いた Fischer 系雄ラットの体重および尿中 Hyp 量の日令による変化を，各実験群の平均値として Fig. 1 に示した．さらに比較として Sprague-Dawley 系雄ラットのそれも示してある．尿中 Hyp 排泄量は体の結合組織量に依存しており，体のサイズを補正するには，体重あたりより体表面積あたりで示した方が適当である[8]ので，結果は体表面積あたりの排泄量を相対的に示す kg $W^{2/3}$（体重kgの 2/3 乗）あたりの値で表わした．尿中 Hyp 量は，動物の体重がほぼ対数曲線的に増加するのに対応して，指数曲線的に減少している．またＳＤ系ラットの場合も同様に日令とともに尿中 Hyp 量は減少するが，同一日令の Fischer 系ラットのそれと比較すると明らかに低い．これはＳＤ系ラットの方が Fischer 系ラットより成長が速く，同じ日令でも体重が大きいことと関係しているものと思われる．成長に伴う尿中 Hyp 量の低下は可溶性コラーゲン量の減少によるのであろう[9]．

NO_2 曝露による尿中 Hyp 量の変化 0.3，0.5 および 1.0ppm の NO_2 を継続曝露した時の 30，60 および 110日目における尿中 Hyp 量を Table 1 に示した．各実験群における体重および尿量には差はない．0.3ppm NO_2 に曝露されたラットの尿中 Hyp 量はどの曝露期間でも対照と差がなかった．0.5ppm の場合は30日目で対照より尿中 Hyp 量は多く（+14%，$p < 0.01$），以後対照の値に近づく．1.0ppm NO_2 曝露では，30日目と 110 日目において対照より大きな値を示すが，有意差はなかった．

1.0ppm NO_2 を４週間曝露した時の体表面積あたりの尿中 Hyp 量の変化を，曝露前を 100 として Fig. 2 に示した．NO_2 曝露ラットの尿中 Hyp 量は曝露１週間

Table 1. Urinary Hydroxyproline Excretion during Continuous NO_2 Exposures

Days Exposed	Urinary Hydroxyproline (mg/24hr/rat)			
	Control	0.3 ppm	0.5 ppm	1.0 ppm
30	3.64±0.34§ (100)	3.70±0.39 (102)	4.16±0.34 (114)**	3.87±0.54 (106)
60	2.74±0.20 (100)	2.78±0.34 (102)	2.96±0.34 (108)	2.69±0.35 (98)
110	2.23±0.15 (100)	2.30±0.20 (103)	2.30±0.19 (103)	2.37±0.28 (106)

§ Values are expressed as mean±SD from ten rats.
Values in parentheses are percentage of control values.
** $p<0.01$

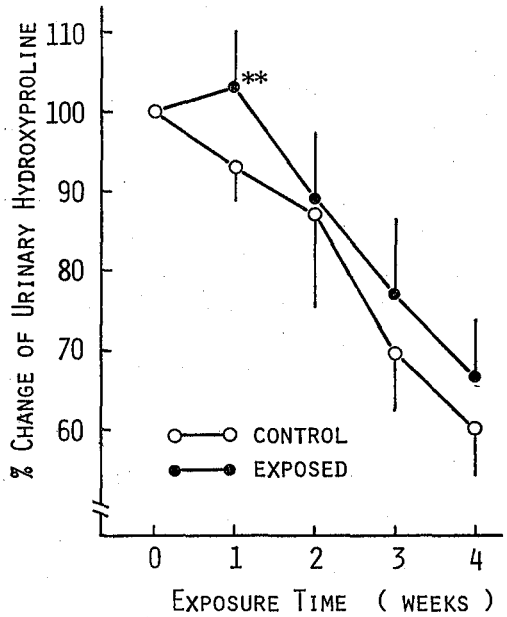


Fig. 2. Change in Urinary Hydroxyproline during 1 ppm NO_2 Exposure
Percent change was calculated on the basis of urinary hydroxyproline per $kgW^{2/3}$. Vertical bars indicate standard deviation from eight rats.
** $p<0.01$

目では対照のそれに比して有意に ($p<0.01$) 大きく，以後対照の値に近づくが4週目でも幾分大きな値を示している．

以上の結果は0.5および1.0ppmのNO_2曝露は一時的に尿中 Hyp 排泄量の増加を引起こすが，さらに曝露が継続すると徐々に対照レベルに戻ることを示している．しかもこの現象は NO_2 濃度が高い方が早く起こる傾向がうかがえる．このことは本実験に先立って行なった Sprague-Dawley 系雄ラットへの 8ppm NO_2 曝露実験からも傍証される．すなわち 8ppm NO_2 を3日間あるいは24日間動物に曝露した時，尿中 Hyp 量は3日目までに有意に ($p<0.01$) 増加するが (Table 2)，曝露24日目の尿中 Hyp 量は対照のそれと差がなかった．

考　察

本実験で示された NO_2 曝露による一時的な尿中 Hyp 量の増加の理由はどのように考えられるであろうか．

第一に，尿中 Hyp が主に可溶性コラーゲンの分解に由来する[9,10]ことから考えて，NO_2 の刺激がコラーゲン生合成の活性化，架橋形成の低下による成熟阻害あるいは不溶性コラーゲンの可溶化を引起こし，可溶性コラーゲン量が増加する可能性がある．あるいは NO_2 刺激により可溶性コラーゲンの代謝回転が一時的に亢進することも考えられる．これを直接証明するような結果は報告されていないが，NO_2 と同じオキシダントであるオゾンをラットに 0.2～0.8ppm の濃度で曝露した時，コラーゲン生合成の特異的酵素であるプロリルハイドロキシラーゼ活性が肺において上昇し，しかも濃度が高い方が早い時期に，割合も高く上昇し，その後再び対照レベルに戻ることを示す報告がなされている[11]．本実験結果との類似性を考えると，NO_2 曝露によっても同様なプロリルハイドロキシラーゼ活性の変化があり，可溶性コラーゲンの代謝回転の一時的な亢進が引起こされる可能性もある．

第二は，NO_2 によりコラーゲンの変性が起こり，それによってコラーゲン分解酵素に対する感受性が高まり，コラーゲンの分解が亢進する結果，尿中 Hyp 量が増加する可能性である．Buell, G. C. [12,13] は 1ppm NO_2 の1時間曝露[12]あるいは 0.25ppm NO_2 の24～36日間曝露（4時間／日，5日／週）[13]によりウサギ肺のコラーゲン繊維に構造変化が起こることを報告している．

Table 2. Urinary Hydroxyproline Excretion during Continuous 8 ppm NO_2 Exposure (mg/24hr/rat)

Before Exposure	During Exposure		
	1 day	2 day	3 day
0.96±0.15§	1.08±0.13	1.17±0.17*	1.24±0.15**
(100)	(113)	(122)	(129)

§ Values are expressed as mean±SD from five Sprague-Dawley rats (male; mean BW, 390g; 104-day old). Values in parentheses are percentage of value before exposure.
* $p<0.05$, ** $p<0.01$

最近，Dróżdż, M. ら[3] はモルモットへの 2mg/m³ (1.1ppm) NO_2 の 180日間曝露（8時間／日）による尿中 Hyp 量の増加，肺コラーゲン含量の減少および皮膚の可溶性コラーゲンの増加と不溶性コラーゲンの減少を観察し，形態学的にも肺気腫様変化を認め，NO_2 曝露による結合組織の損傷の主要なメカニズムとしてコラーゲン成熟の阻害およびコラーゲン分解の亢進を考察している．本実験のように曝露初期にみられる一時的な尿中 Hyp の増加が同様なメカニズムで起こるかどうか，またそれが直接的に肺気腫様変化に関係するものであるかどうかは今後の検討を待たねばならない．

要　約

Fischer 系雄ラットに 0.3, 0.5 および 1.0ppm の二酸化窒素(NO_2) を継続曝露して，曝露開始後30, 60および110日目に採尿し，尿中ハイドロキシプロリン(Hyp) 排泄量を対照のそれと比較した．また 1.0ppm NO_2 を4週間継続曝露して，その間一週目毎に尿中 Hyp 量を測定し，低濃度の NO_2 が尿中 Hyp 排泄に及ぼす影響を調べた．

1.0ppm では曝露開始後一週目に尿中 Hyp 量の増加がみられ，0.5ppm では曝露30日目においても尿中 Hyp 量は対照のそれより多かった．両濃度ともに，その後の尿中 Hyp 量は徐々に対照レベルに戻った．0.3ppm NO_2 曝露ラットの場合には対照との差はどの曝露期間においても認められなかった．これらの結果は，少なくとも 0.5ppm 以上の NO_2 は曝露開始後その初期に一時的にコラーゲン代謝に影響を及ぼすことを示唆している．

謝辞　本研究にあたり有益な御助言をいただいた環境保健部の石川隆章氏に深謝します．

（本研究は昭和53年度当研究所調査研究課題「複合大気汚染に係る健康影響調査に関する研究」として実施したものである．）

文　献

1) Blair, W. H., Henry, M. C., and Ehrlich, R. E.: *Arch. Environ. Health*, 18, 186, 1969
2) Freeman, G., Juhos, L. T., Furiosi, N. J., Mussenden, R., Stephens, R. J., and Evans, M. J.: *Arch. Environ. Health*, 29, 203, 1974
3) Dróżdż, M., Kucharz, E., and Szyja, J.: *Environ. Res.*, 13, 369, 1977
4) 陳　震東，中島泰知，楠本繁子，坪田康子，米川恵都子：大阪府立公衛研報告　労働衛生編，10, 43, 1972
5) Hattori, S. and Takemura, K.: *J. Clin. Microscopy*, 6, 350, 1973
6) 京野洋子，河合清之：第18回大気汚染研究全国協議会講演集，220, 1977
7) Bergman, I. and Loxley, R.: *Clin. Chim. Acta*, 27, 347, 1970
8) Jasin, H. E., Fink, C. W., and Ziff, M.: *J. Clin. Invest.*, 41, 1928, 1962
9) Lindstedt, S. and Prockop, D. J.: *J. Biol. Chem.*, 236, 1399, 1961
10) Jasin, H. E. and Ziff, M.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 110, 837, 1962
11) Hussain, M. Z., Mustafa, M. G., Chow, C. K., and Cross, C. E.: *Chest*, 69, 273, 1976
12) Buell, G.: *59th Annual Meeting of Air Poll. Contr. Assoc., San Franscisco*, 1966
13) Buell, G.: *Inhalation Carcinogenesis*, 209, 1970, U. S. Atomic Energy Commission

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 199-205, 1979

窒素酸化物の *in vitro* 暴露によるリンパ球内 Cyclic Nucleotides 量の変動

狩野文雄*, 福田雅夫*, 溝口 勲*, 丁 宗鉄**, 梁 哲宗**, 英 清道**

Intracellular Cyclic Nucleotides Contents Changes in Lymphocytes Exposed to Nitrogen Oxides *in vitro*

FUMIO KANOH*, MASAO FUKUDA*, ISAO MIZOGUCHI*, JYONG-CHYUL CYONG**, CHOL-JONG YANG** and KIYOMICHI HANABUSA**

Inhalation of nitrogen dioxide has been shown to reduce the pulmonary functions in human and experimental animals. The role of cyclic nucleotides in many aspects of lung bronchial physiopathology in asthma has been well documented. Splenic lymphocytes that have the same β_2-adenoceptor as that of lung bronchial tissue were obtained from mice. During *in vitro* exposures of NO_2 and/or NO, the cyclic AMP levels in lymphocytes decreased as compared to that of control. NO_2 at the concentration of 0.3 ppm caused the cyclic AMP contents in lymphocytes obtained from the Bordetella pertussis vaccine injected mice to decrease as compared to that of normal mice significantly. These results suggest that the low levels of NO_2 and/or NO can enhance the bronchial sensitivity and accelerate the release of the chemical mediator from the mast cell in asthma.

Keywords : nitrogen dioxide, nitric oxide, asthma, cyclic nucleotides, lymphocyte, cyclic AMP, mice, Bordetella pertussis

I 緒 言

近年，各種大気汚染物質の動物に対する実験的研究が進み，その中でも生体諸機能に広範な作用を及ぼす二酸化窒素（NO_2）が注目されている．現在までの所，NO_2 の生体作用として，肺機能の低下，気道粘膜の刺激，感染抵抗性の減弱，免疫能の低下等が明らかにされている[1]．また，疫学調査から NO_2 の年平均濃度が0.02ppm以上になると，持続性のせき，たんの増加傾向が認められ，NO_2 が気管支喘息の有症率を高めることが考えられている[2]．ところで従来より臨床的に肺気管支系の β-受容体（レセプター）の研究が行なわれ，今日の医学的仮説として，気管支喘息の病態生理に肺気管支細胞内の環状ヌクレオチドが重要な役割を担っていることが認められている[3]．なかでも cyclic AMP は組織においてホルモンやカテコールアミンの情報を伝える二次伝達物質であり[4]，生体作用を把握する時，その動態を抜きにして語れない．そこで，我々は窒素酸化物の肺気管支系への作用を実験的に確かめるために，薬理作用として肺気管支系組織に存在するものと同じ β_2-レセプターを有し[5]，*in vitro* の反応実験に有用なマウス脾臓リンパ球を標的細胞として，NO_2 と NO の暴露を行ない，cyclic AMP と cyclic GMP の変動を検討した．

II 実験方法

II－1 脾臓リンパ球浮遊液の作成

SPF 条件下飼育の DDD 系マウス（♂，6週令）を頸椎脱臼により殺し，脾臓を摘出した．リン酸緩衝液加生理的食塩水（PBS^-）中でスライドグラスを用いてすりつぶし，結合織から血球を分離した．これに3％デキストラン加生食(ヘマセル ヘキスト）を等量加え，室温にて30分間放置し，赤血球を凝集，沈澱させた後，その上清を1,200 rpm，10分，2回遠心し，脾リンパ球を分離した．0.2％トリパンブルー液でリンパ球の生存率と数を算定し，生細胞 1×10^7 個/ml になるように，0.2％ gelatine 加 PBS^-(G-PBS) 中に浮遊させた．

II－2 暴露方法

リンパ球浮遊液 15 ml を 37° にセットした恒温槽に固定した大試験管内に入れ，細ガラス管を試験管の底面に先端が届くようにセットし，ガスを通気した．なお，

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**北里研究所附属東洋医学総合研究所 108 東京都港区白金 5—9—1
**Oriental Medicine Research Center of the Kitasato Institute, 9-1, Shirokane 5 chome, Minato-ku, Tokyo, 108 Japan

細胞とガスとの接触を良くするために気泡を小さくするフィルターをガラス管の先端に用いた．暴露は対照として，活性炭フィルターを通過させた空気を用い，NO_2 は N_2 バランスした1％ NO_2 ガスを希釈したものを用い，NO は N_2 バランスした 100ppm の NO ガスを希釈した後，ソーダライム層を通気させ，NO_2 を除去させたものを使用した．なお，流量はいずれも 100m*l*/min になるように流量調整した．NO_2 及び NO の濃度は chemiluminescence 検出法による測定器 (Monitor Labs Model 8440) により測定した．

Ⅱ—3 Cyclic nucleotides の分析

空気ならびにガスを暴露後，経時的にリンパ球浮遊液 1m*l* を採取し，ただちに90° に加温し，cyclic nucleotide 産生，代謝酵素系を失活させることにより反応を止めた．試料を超音波破砕器 (Polytron PT-10) にてホモジナイズした後，3,000 G. 30分間遠心し，蛋白を沈澱させ，上清中の cyclic nucleotides を定量した．cyclic AMP は Gilman の方法により[6]，cyclic GMP は Kuo らの方法[7] に従った competitive protein binding assay で行った．(Boehringer-Mannheim 社製 Kit 使用) なお，液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-230) により計数された値から，標準線に基づき各 nucleotides 量を算定した後，細胞 1×10^6 個当りに換算し比較した[8]．

Ⅱ—4 百日咳菌ワクチン処理

気管支喘息発症の作用機序を説明する有力な仮説として，アトピー性患者には β-レセプター遮断状態があるとする Szentivanyi らの β-blockade theory[9] が広く認められている．そこで我々は，マウスに実験的に気道過敏性等の喘息様症状を生じさせる作用を有し，その機序としては，β-レセプターとプロスタグランディンレセプターをともに block する作用を有する百日咳菌ワクチンを腹腔内に接種し[10,11]，一日後，処理マウスから脾臓リンパ球を分離した．すなわち，ヒスタミン増感因子分画を有する百日咳菌ワクチン (1×10^{10} cells of killed organism) を接種したマウスから得たリンパ球浮遊液に無処理マウスと同様の NO_2 暴露を行ない，cyclic AMP の変化を調べた．

Ⅱ—5 NO_2^- の cyclic AMP 量への作用

NO_2 は水溶液中で反応し，NO_2^- を遊離すると言われている[12]．そこで，NO_2 と NO_2^- の作用を比較するために，$NaNO_2$ 添加による cyclic AMP 量の変化を調べた．すなわち，リンパ球浮遊液中に，濃度として，0.05μg/m*l*，0.5μg/m*l*，5μg/m*l* の $NaNO_2$ を添加し，

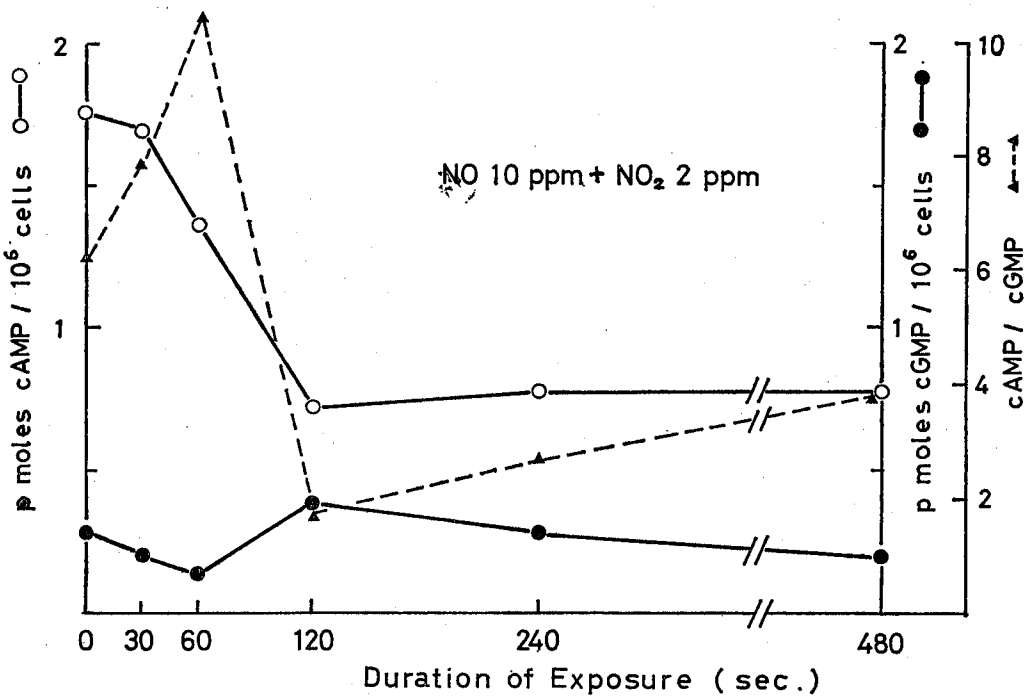


Fig. 1. Changes of Intracellular Cyclic Nucleotides in Murine Spleen Cell Exposed to NO_2 and NO *in vitro*

経時的に浮遊液を採取し，同様の処理をした．

Ⅲ 実験結果

Ⅲ—1 NO と NO_2 混合暴露の影響

図1に，NO と NO_2 混合暴露の際のリンパ球内cyclic AMP 量と cyclic GMP 量を経時的に追跡した結果を示した．cyclic AMP 量は暴露後急激に減少し，120 秒以降はほぼ一定値に安定した．一方，cyclic GMP は暴露後わずかの変動はあるが，480 秒間，ほぼ一定値であった．両 nucleotides の絶対値とともに，相対的な値（cAMP/cGMP）が細胞の機能調節に働いているので[13]，両 nucleotides の相対比を比較すると，暴露により 480 秒後で約50%の減少が見られた．これらの結果から，NO と NO_2 暴露による cyclic AMP 値の変動には，暴露直後の急激な応答と後期の比較的定常的な二つの相が存在していることが示唆された．なお，リンパ球の生存率はトリパンブルー染色法で見ると，480 秒にわたって対照と差はなかった．

Ⅲ—2 NO_2 暴露による cyclic AMP 量の変動

図2に，NO_2 暴露により経時的に変化した cyclic AMP 量を対照の cyclic AMP 量の値を 100 として，それに対する率を用いて示した．暴露前の値（対照と各実験群を含めた平均値）は 0.60±0.12 p moles/1×10^6 cells であったが，0.3ppm の NO_2 暴露により，60秒後に 0.31 p moles まで減少した．その後徐々に上昇し，480秒後には0.63 p moles まで回復した．一方，1.0ppm の NO_2 では暴露直後一過性に上昇したが，以後減少し，240秒後には 0.46 p moles まで低下した．以上の結果から，NO_2 にはリンパ球内 cyclic AMP 量を減少させる作用があり，0.3ppm ではわずかの回復傾向が見られることがわかる．0.3ppm と 1ppm との間には，対照値を 100 とした場合の減少率に dose-response 関係が見られた．

Ⅲ—3 NO 暴露による cyclic AMP 量の変化

図3に，NO 暴露による cyclic AMP 量の変化を暴露前の値を 100 として計算した各濃度別の変化率を経時的に示した．対照として，活性炭フィルターを通過させた空気を用いたが，cyclic AMP 量は初期値に対して増加する傾向が見られた．それに対して，NO暴露群で

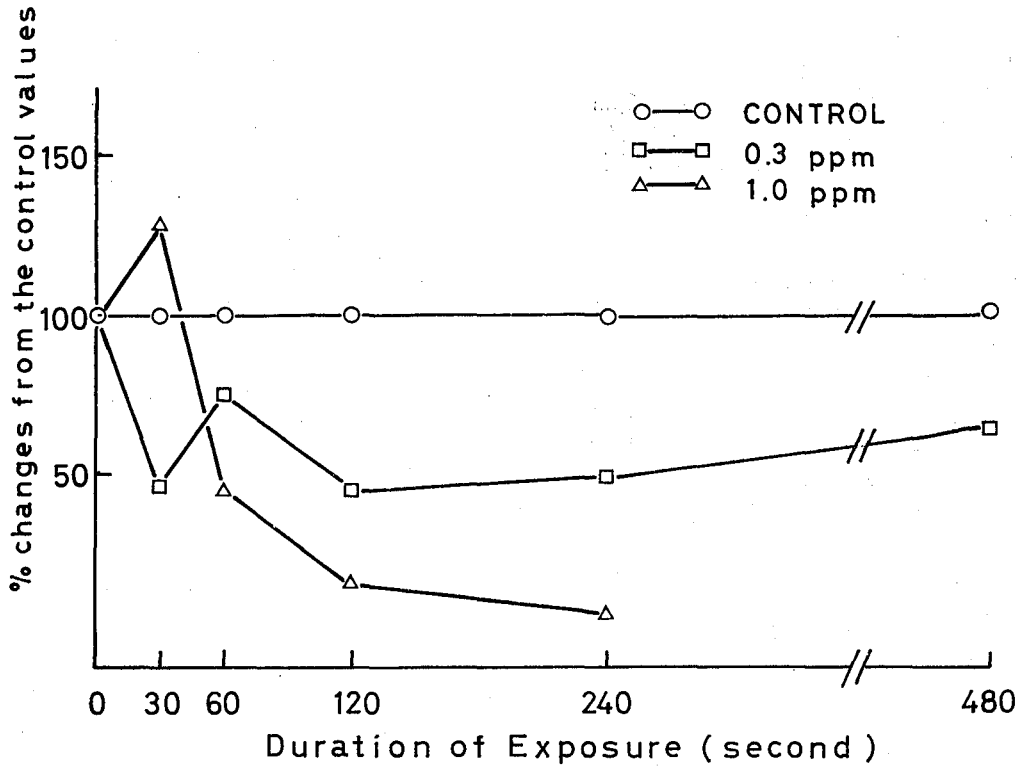


Fig. 2. Changes of Cyclic AMP Levels in Murine Spleen Lymphocytes Exposed to NO_2

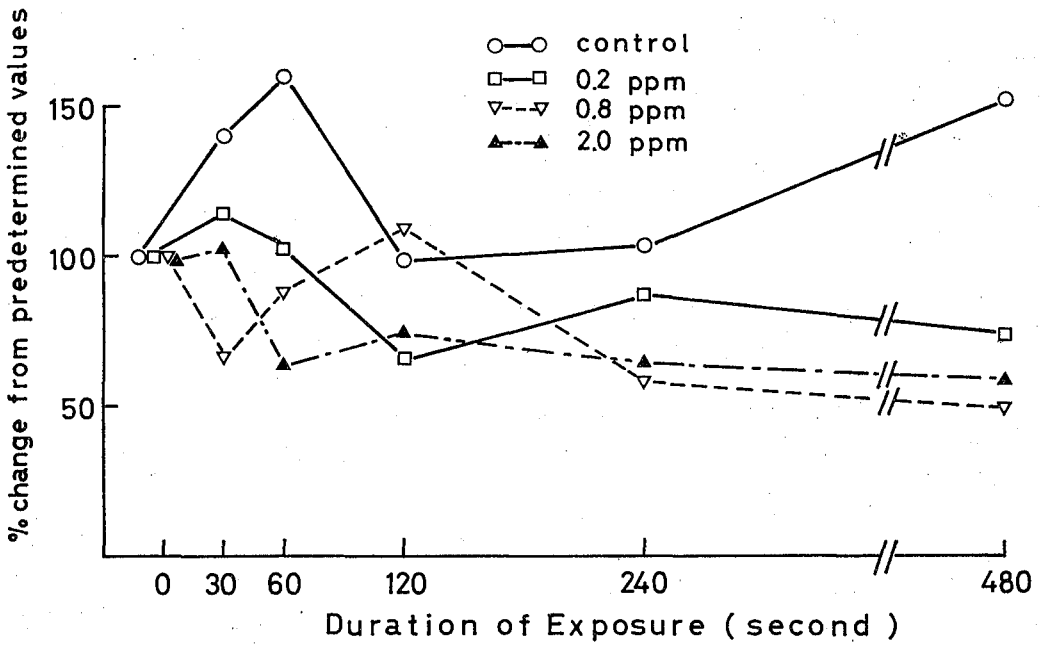


Fig. 3. Changes of Cyclic AMP Levels in Murine Spleen Cell Exposed to NO

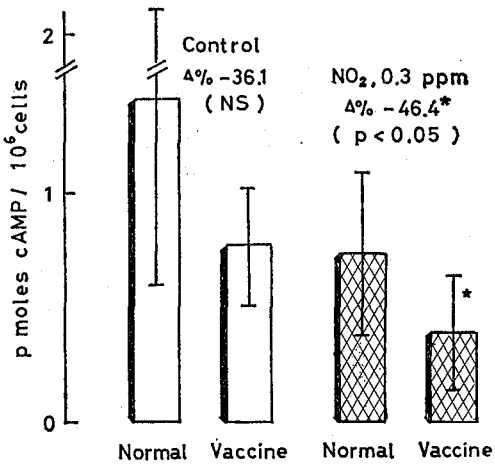


Fig. 4. Effects of Bordetella Vaccine upon the Cyclic AMP Levels in Murine Spleen Cell Exposed to NO_2
Δ% value is expressed as percent variation from the value in normal mice. P values compare the difference between the percent changes above to the normal value.

は，いずれも初期値に対して減少した．すなわち，0.2 ppm では480秒後に初期値に対して26%，0.8ppm では50%，2.0ppm では42% の減少率を示し，0.8ppm と2ppm 間では，明確な dose-response 関係が見られなかった．なお，120秒以降，0.2ppm NO 暴露では多少回復傾向が見られたが，0.8 ppm，2.0 ppm では見られなかった．

Ⅲ—4 百日咳菌ワクチン処理による効果

図4に，百日咳菌ワクチン接種マウスより分離したリンパ球と正常マウスリンパ球とに，0.3ppm の NO_2 を暴露した時の cyclic AMP 量を対照と比較して示した．なお，この値は，暴露後比較的定常的な値を示す60秒以降の値を平均したものである．対照では正常リンパ球とワクチン処理リンパ球との間に，ワクチン処理群に減少傾向は認められるものの，統計的な有意差はないが，0.3ppm NO_2 暴露により，ワクチン処理リンパ球に著明な cyclic AMP 量の減少が観察された．($p < 0.05$) この結果により，NO_2 は，cyclic AMP 産生酵素系が阻害された条件下でもなお，cyclic AMP 量を減少させる作用を有することが示唆された．

Ⅲ—5 $NaNO_2$ 添加による cyclic AMP 量の変化

表1に，$NaNO_2$ 添加によるリンパ球内 cyclic AMP 量の変動を示した．この値は，$NaNO_2$ 添加後経時的に採取した試料の cyclic AMP 量の60秒以後の平均値と標準偏差及び $NaNO_2$ 添加前の値を 100 とした変化率とを示している．この結果から，$NaNO_2$ 添加により

Table 1. Effects of $NaNO_2$ upon the Cyclic AMP Levels in Murine Spleen Cells*

Dose	n.	cAMP**	Δ%changes from the predetermined value
PBS⁻alone	5	0.53±0.07	112±24***
$NaNO_2$ 0.05μg/ml	5	1.05±0.17	141±23
$NaNO_2$ 0.5μg/ml	5	0.89±0.31	191±66
$NaNO_2$ 5μg/ml	5	0.61±0.20	203±66 p<0.05

* Murine spleen cells were incubated with $NaNO_2$ for 480 seconds.
** p moles/10^6 cells Mean±SD.
*** Each value is expressed as the percent variation from the predetermined values. P values compare the difference between the percent changes above to the control (PBS^-) values.

cyclic AMP 量が増加すること，特に，その変化率との間に明らかな dose-response 関係があることがわかる．

Ⅳ 考　　察

NO_2 は呼吸器に吸入させると，気道末梢部にまで到達し，肺気管支細胞に種々の障害を与えることが知られている[14]．肺機能を中心とした呼吸生理学的実験から，実験動物に対する長期暴露の結果，呼吸数の増加と一回換気量の減少が認められ[15]，気道閉塞や肺の過膨張を示す所見も得られている[16]．健康人と気管支炎患者に対する暴露実験によると，両者ともに気流抵抗の有意な増加と，暴露後のアセチルコリン吸入による気道過敏性の有意な亢進が認められている[17]．なかでも，0.1ppm NO_2 を1時間暴露した場合，喘息患者20名中13名に carbamylcholine（カルバコール）吸入による気道狭窄効果が著明に増強されたという Orehek らの報告は[18]，現在までの所，実験的に検出された最低の濃度による影響であり極めて注目される．

気道狭窄等の気管支平滑筋収縮の発現機序として細胞内二次伝達物質としての cyclic nucleotides の役割がしだいに明らかになり，平滑筋の収縮弛緩を調節する，protein kinase の活性化が，cyclic AMP と cyclic GMP 量の動態とかかわることがわかっている．さらにアトピー型の気管支喘息の発症における cyclic AMP 産生酵素系の異常は，細胞表面の特異的レセプター（β-レセプター）を介していることが明らかである．ところで，アセチルコリンやカルバコールなどの副交感神経刺激剤は平滑筋表面の cholinergic レセプターと結合し，収縮を起こさせるが[19]，NO_2 がその作用を増強するという事実から，NO_2 は細胞膜レセプターに作用して，細胞内 cyclic nucleotides 量に変動を与えることが十分に予想される．そこで，気管支平滑筋の膜レセプターと同一の β_2-レセプターを持つリンパ球を標的細胞として，NO_2 および NO の暴露を行なった結果，両ガスとも，低濃度で脾リンパ球内 cyclic AMP 量を著明に減少させることがわかった．さらに NO_2 とNOの作用を比較した結果，NO_2 には暴露経過にともなう cyclic AMP 量の回復傾向が見られたが，NO暴露では不可逆的な減少のみが観察され，両ガスの作用機序の違いが示唆された．また，NO暴露では，明らかな dose-response 関係が見られなかったことから，NOが細胞内 cyclic AMP 量に変動を与える際に，critical な dose があり，作用としては all or none 的であることが示唆された．さらに，NOが直接的に cyclic AMP 産生酵素系（adenylate cyclase）や代謝酵素系（phosphodiesterase）に作用するのでなく，何らかの機序を介した，何段階かの cascade reaction の結果による間接作用の可能性もあり，今後さらに検討していきたい．

また，NO_2 は Medium 中で水と反応し，NO_2^- イオンを遊離し，イオンとして細胞膜を透過し，細胞内分子と反応し，細胞毒性を発揮すると言われている．そこで我々は $NaNO_2$ 添加による cyclic AMP 量の変動を検討した結果，NO_2^- は NO_2 とは相反な cyclic AMP 量の増加作用を持つことが観察された．この結果から，NO_2 には直接的作用とともに間接的な NO_2^- 作用があり，NO_2 暴露経過に見られる二相性変化はこれら二つの異なる機序に基づくことが示唆された．細胞内にNO_2^-を生じさせるニトログリセリンや亜硝塩酸（$NaNO_2$）は従来から臨床的に血管拡張剤として使用されているが[20]，副作用として嘔吐や Met-Hb 形成などが問題となっている．今まで，Macrophage の代謝に対するNO_2と NO_2^- の作用は等しいと言う報告があるが[21]，今回の結果では，NO_2 と NO_2^- は，cyclic nucleotides 系への作用に関して相反であることが示唆された．一方，NO と NO_2 暴露による cyclic GMP 量の変化はなかった．NO の作用に関する知見は NO_2 に関するものに比べて少ないが，Arnold らは，ラットの各種組織を用いた cell-free 系で NO 暴露の影響を調べている[22]．その結果，NO が肺気管支組織の guanylate cyclase を活性化させ，細胞内 cyclic GMP を増加させると報告している．さらに彼らは，多形核白血球に対するNitroso化合物の作用を検討し，細胞内に NO を生じさせる薬物は，白血球内 cyclic GMP とともに cyclic AMP を増加させると報告している．白血球に対する後者の結果

は，今回の我々の結果と cyclic AMP に関しては一致するが，cyclic GMP に対する作用の点で異なっている．これらの不一致が，cell-free 系と intact-cell 系の違いによるのか，Radioimmunoassay と protein binding assay の違いによるのか不明であるが，今後さらに検討していきたい．

百日咳菌ワクチンがリンパ球内 cyclic AMP 量に対して協同的な減少作用を起こしたことから，NO_2のα-レセプターや cholinergic レセプターへの作用あるいは phosphodiesterase の活性化が示唆される．ところで，喘息発現には，IgE 抗体を介した肥満細胞や好塩基球からのヒスタミンや Slow-reacting-substance of anaphylaxis (SRS-A) の遊離が関与しており，その遊離機構に，cyclic AMP が重要な働きをしている[23]．すなわち，cyclic AMP の増加は，遊離を抑制し，その減少は逆に促進する[24]．林は NO_2 が，モルモット肺の肥満細胞を減少させ，ヒスタミン感受性を亢進させると報告しているが[25]，我々の結果からも，NO_2 が肺気管支組織に作用し，cyclic AMP を減少させることにより，血管透過性を亢進させ，肥満細胞からの chemical mediator の遊離を促進させることが示唆され，NO_2 の喘息患者に対する気道狭窄増強作用に関する，Orehek らの結果をその作用機序の点から裏付けることができる．

肺気管支系の実験モデルとして使用した脾臓リンパ球は網内リンパ系の種々の機能や免疫応答において重要な役割を担っている[24]．NO_2 は呼吸器系に吸入された後，50～60%が血液循環に入り，肺以外の組織に細胞毒性を発揮する可能性が示唆されている．すなわち，NO_2 の作用は，脈管系ばかりでなく，網内系においても発揮されることは，感染抵抗性や免疫能低下に関する多くの報告から十分に考えられる[26]．その際，リンパ球の抗体産生能や標的細胞との反応性に及ぼす細胞内 cyclic nucleotides の動態把握が必要となろう．我々は，植物性血球凝集素 (PHA-P) とリンパ球の反応において，NO_2 の暴露により，リンパ球の幼若化率，すなわちDNA合成能が変化することを観察したが[27]，今後，さらに検討を加え，NO_2とNO暴露によるリンパ球subpopulationへの作用を明らかにしていきたい．

V 結　　語

NO_2 とNOの肺気管支系への作用を明らかにするため，肺気管支組織に存在するものと同じ β_2-レセプターを有する脾リンパ球に *in vitro* の暴露を行ない，細胞内 cyclic nucleotides 量の変動を調べ，以下の結果を得た．

1) 脾リンパ球内 cyclic AMP は NO_2 及び NO 暴露により著明に減少した．
2) 脾リンパ球内 cyclic GMP は対照に比較して有意な差は見られなかった．
3) 百日咳菌ワクチン処理マウスから分離した脾リンパ球内 cyclic AMP 量は NO_2 暴露により正常マウスのものに比較して有意な減少を示した．

NO_2 暴露によりもたらされる細胞内 cyclic AMP 量の減少は，肺気管支組織の血管透過性を増加させ，肥満細胞からの chemical mediator の遊離を促進し，気道過敏性を亢進させることが考えられ，NO_2 が気管支喘息の誘発や気道狭窄効果を増強することが示唆された．

謝辞　本研究に当り貴重な百日咳菌ワクチンを提供して下さった北里研究所　高津邦芳氏ならびに当研究所ウイルス研究科長　岩崎謙二氏に感謝します．

（本研究は昭和53年度当研究所調査研究課題「オキシダントの人体影響に関する研究」として実施し，その概要は第62回東京都衛生局学会54年5月で発表した．）

文　　献

1) 中央公害対策審議会大気部会：二酸化窒素に係る判定条件等についての専門委員会報告，1978
2) 東京都 NOx 検討委員会：NO_2 環境基準改定に関する検討結果報告書，1979
3) Morley, J.: Asthma, 1977, Chapman and Hall, London
4) Liddle, G. W. and Hardmann, J. C.: *New Engl. J. Med.*, 285, 560, 1971
5) Conolly, M. E. and Greenacre, J. K.: *Br. J. Pharmac.*, 59, 17, 1977
6) Gilman, A. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 67, 305, 1970
7) Kuo, J. F., Lee, T. P., and Greengard, P.: *J. Biol. Chem.*, 247, 16, 1972
8) 丁　宗鉄，岡田秀親：免疫系実験操作法B，1183，1978，日本免疫学会編
9) Szentivanyi, A.: *J. Allergy*, 40, 203, 1968
10) Chin Chang,: *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 54, 20, 1974
11) Matsumura, Y. and Vaughan, J. H.: *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 58, 395, 1976
12) Goldstein, E., Peek, N. F., and Tarkington, B.: *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 115, 403, 1977
13) Goldberg, N. D., Haddox, M. K., and Estensen, R.: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 5, 307, 1974, Raven Press, New York

14) Yokoyama, E.: *Bull. Inst. Public Health*, 17, 337, 1968
15) Freeman, G. and Stephens, R. J.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 98, 429, 1968
16) Davidson, J. T. and Wasserman, K.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 92, 790, 1967
17) Beil, M. and Ulmer, W. T.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 38, 31, 1976
18) Orehek, J., Massari, J. P., and Charpin, J.: *J. Clin. Inves.*, 57, 301, 1976
19) 無江季次：臨床医, 3, 64, 1977
20) 貫文三郎：臨床薬理学大系, 6, 337, 1969
21) Vassallo, C. L. and Bill, M. D.: *Arch. Environ. Health*, 26, 270, 1973
22) Arnold, W. P. and Murad, F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 3203, 1977
23) Kaliner, M. and Austen, K. F.: *J. Exp. Med.*, 136, 556, 1973
24) Braun, W. and Parker, C. W.: *Cyclic AMP, Cell Growth, and the Immune Response*, 1974, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
25) 林 謙治：日本公衛誌, 6, 325, 1975
26) Coffin, D. L. and Blommer, E. J.: *Environ. Health Perspect.*, 13, 11, 1976
27) Kanoh, F. and Cyong, J.: in preparation

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 206-209, 1979

大気汚染物質の雨によるウォッシュアウト効率と溶解度との関係

多田宇宏*, 太田与洋*, 溝口 勲*

The Relation between Washout Efficiency and Solubility of Air Pollutants to Water

TAKAHIRO TADA*, TOMOHIRO OHTA* and ISAO MIZOGUCHI*

In order to determine the relation between the solubility to water and the washout efficiency by raindrops for some air pollutants, the concentrations depending on chronological changes of hexane, benzene, toluene, xylene and ethylalcohol were measured in a small glass tube tower simulated to actual raining. The half-lives for hexane, benzene, toluene, xylene and ethylalcohol were respectively 744.5, 11.5, 12.8, 14.8 and 5.8 minutes. From the results obtained, it is concluded that the washout efficiency is substantially proportional to the solubility for such air pollutants as hydrocarbon and alcohol.

Keywords : washout, solubility, air pollutants

緒　言

大気中汚染物質濃度の減少については，拡散，雨による洗浄，大気化学反応などがよく知られている．雨による洗浄の顕著な例としては，大気中の SO_2, NO_2 などの酸性ガスを雨滴が吸収し酸性雨となるといわれていることがある．この酸性雨が近年，大気汚染との関連で社会問題化した．雨による洗浄機構，すなわち一個の雨滴とガスとの相互作用を考察することにより理論式を導いた報告[1-3]もしばしばみられる．しかし，実際面の立場からの観察，すなわちフィールドでのウォッシュアウトの観察はあまりみられず著者らが1975年に行なった大気中のハロゲン化炭化水素（トリクロルエタン，四塩化炭素，トリクロルエチレン，パークロルエチレン）の7週間の連続測定において，我々は，我々が一時的に定義したウォッシュアウト効率と溶解度との関係を指摘[4]した．今回，大気汚染物質であるヘキサン，ベンゼン，トルエン，キシレン，エチルアルコールを用いて，ウォッシュアウトの簡単な実験装置を作製し，水による洗浄によってこれらの物質の濃度がどの程度変化するかを求めた．

分析法

今回の実験を行なうために，外径178mm，内径171mmのパイレックスガラス管を加工し Fig. 1 のような簡単なウォッシュアウト装置を作製した．容器上部から100 mm のところにアクリル板に 10mm 間隔で 0.5mm の穴を多数あけたしきりをつけ，容器内には約 5mm の粒径の水滴を降らせるようにした．実験をはじめる前に容器内を真空にし周囲を熱して焼き出しを行なった後，容器内にヘキサン 30μl，ベンゼン 50μl，トルエン 50μl，キシレン 100μl を入れ気化させた後，室温まで温度を

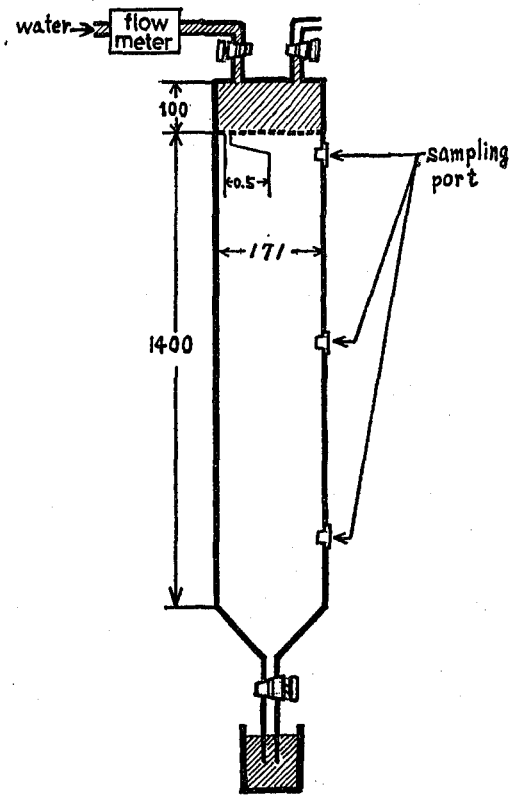


Fig. 1. The Glass Tube used for the Experiment unit : mm

* 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. Concentrations on Each Measurement

time (min)	flow (l)	concentrations (ppm)			
		hexane	benzene	toluene	xylene
0	0	198.5	74.8	23.5	9.20
3.5	3	190.9	59.5	18.7	7.08
10	8	191.6	43.6	14.4	6.30
15	13	191.6	29.3	9.6	3.86
21	18	——	21.0	7.4	3.17
27	23	——	15.2	5.7	2.69
32	28	——	10.5	4.2	2.14
38	33	——	7.5	3.0	1.56

さげ窒素ガスを充てんして大気圧にしたのち上部に水を入れ容器内のガス濃度が均一になるまで数十分放置し，水を約 850ml/min（これは約 220mm/hour で台風時の豪雨以上の雨量に相当する）の割合で連続して流し，約5分毎に容器内ガス 100μl をガスタイトシリンジにより採取し，水素炎イオン化検出器（FID）付ガスクロマトグラフ（島津 GC-4A）を使用して測定を行なった．同様に無限に水に溶解するエチルアルコールについても行なった．

測定条件 カラム；ガラスカラム 3×1000mm 充てん剤；Bentone 34+DNP, 5+5%, Chromosorb W-AW, DMCS カラム温度；100℃ 検出器；FID 感度；10^3 レンジ；1.6～0.8 キャリヤーガス；N_2（圧力 0.6kg/cm²) 気温；24℃ 水温；23℃

結果および考察

各物質についての測定結果は，Table 1 に示し，経過

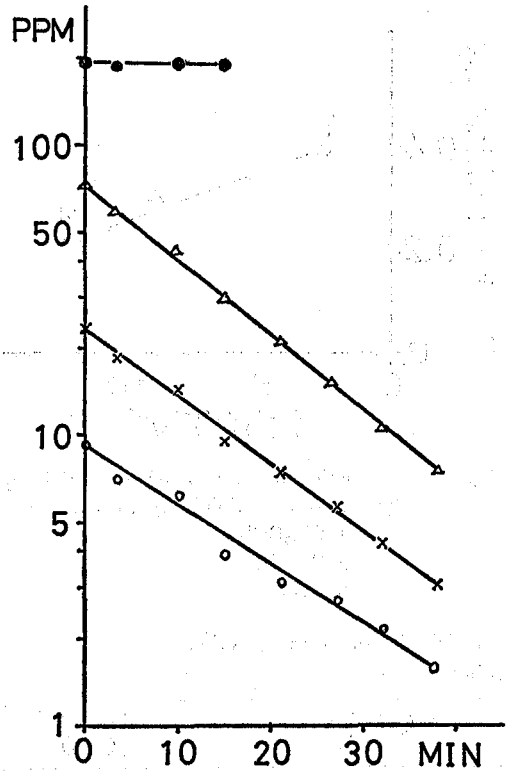


Fig. 2. The Profile of the Concentrations vs. Time

●——● hexane
△——△ benzene
×——× toluene
○——○ xylene

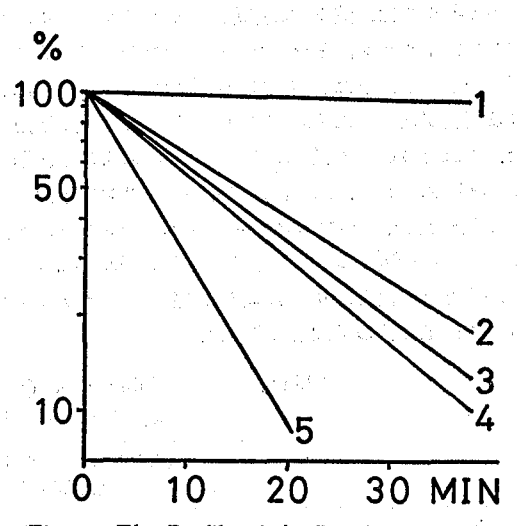


Fig. 3. The Profile of the Residual Percent vs. Time

1 hexane
2 xylene
3 toluene
4 benzene
5 ethyl alcohol

時間による各物質の濃度を Fig. 2 に示し，これらの物質およびエチルアルコールについての減少率を Fig. 3 に示した．

今回の実験におけるガスの初期濃度を A_o，t 時間後のガスの濃度をA，t 時間後の水の濃度をR，ウォッシュアウト速度定数をkとすると，(1)式のように表わすことができると仮定する．

$$\frac{dA}{dt} = -k\,[A]\,[R] \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(1)$$

(1)式中のRは実験中水が常に補充されるのでt時間後も濃度が一定であると見なし $k[R]=k'$ とおける．すると(1)式は(2)式のように書き換えられる．

$$\frac{dA}{dt} = -k'\,[A] \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(2)$$

(2)式を積分すると(3)式のようになる．

$$A = A_o e^{-k't} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(3)$$

(3)式は(4)式のように書き換えられる．

$$\ln A = -k't + \ln A_o \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(4)$$

濃度の対数をたて軸に，時間を横軸にとった Fig. 2 の直線の傾きは，(4)式の $-k'$ に相当し，この仮説の正しいことが Fig. 2 に示したように，とくにベンゼン，トルエン，キシレンが指数関数的に減少することで確認できる．また半減期 $t_{0.5}$ は(5)式のように表わすことができる．

$$t_{0.5} = \frac{\ln 2}{k'} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(5)$$

Fig. 3 からは，減少する速度がエチルアルコール，ベンゼン，トルエン，キシレン，ヘキサンの順であることが認められる．また各物質の溶解度の比較を，23℃における資料がなかったため，15℃，1気圧の資料を用いた．これと今回の実験で求められた k' および半減期を Table 2 に示した．水に溶けにくいヘキサンは半減期が744.5分と長く，ベンゼン，トルエン，キシレンなど溶解度が近い物質については半減期も 11.5分，12.8分，14.8分と近い値となり，水に無限に溶解するエチルアルコールは5.8分の半減期であった．

さきに我々が報告[4]したフィールド実験でのトリクロルエタン，四塩化炭素，トリクロルエチレンにおいて，ウォッシュアウト効率を仮に(6)式の様に

$$\text{ウォッシュアウト効率} = 1 - \frac{\text{雨の日の平均濃度}}{\text{曇の日の平均濃度}} \quad \cdots\cdots(6)$$

と定義すると，ウォッシュアウト効率と各物質の溶解度の逆数とが Fig. 4 に示したような直線関係になることが認められた．今回の実験では，Fig. 3 に示されるように溶解度の大きい順に減少する速度が大きくなることが認められたが，Fig. 4 に示したような関係は認められなかった．

過去の報告[3]では，ウォッシュアウトについて半径 r の水滴が Vs の速度で降下しているとき単位時間に水滴に取り込まれるガス量Cは一般に(7)式で表わされる．

$$C = 4\pi r D_g x\,(1 + \beta R_e^{\frac{1}{2}} S_c^{\frac{1}{3}}) \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(7)$$

ただし，D_g はガス分子の拡散係数，$R_e = 2V_s r/\nu$，$S_c = \nu/D_g$，(ν は空気の動粘性係数)，β は実験によって求ま

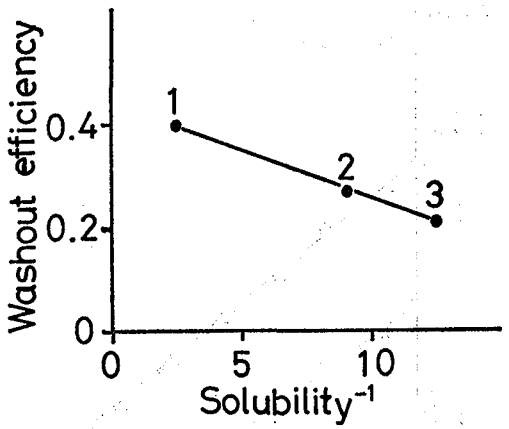


Fig. 4. The Relation between Washout Efficiency and Reciprocal of Solubility to Water[4]
1 CH_3CCl_3
2 C_2HCl_3
3 CCl_4

Table 2. The Solubility, k' (see text) and Half-life of Hexane, Xylene, Toluene, Benzene and Ethylalcohol

	solubility (15°C latm) (g/100g)	k' (=k (R)) (min^{-1})	half-life (min)
hexane	3.2×10^{-6}	9.31×10^{-4}	744.5
xylene	1.4×10^{-2}	4.67×10^{-2}	14.8
toluene	3.9×10^{-2}	5.42×10^{-2}	12.8
benzene	4.2×10^{-2}	6.05×10^{-2}	11.5
ethyl alcohol	∞	1.20×10^{-1}	5.8

る係数で≈0.3である．しかし(7)式中には溶解度に関係する変数は含まれていない．今回の実験により溶解度の大きな物質が，大きなウォッシュアウト効率があり，速く減少することから，ウォッシュアウト効率と溶解度との間に密接な関係が存在するものと思われる．

さきの報告[4]と今回の実験から，溶解度の大きな大気汚染物質で，反応性の小さな物質は拡散や大気化学反応などによる減少よりもウォッシュアウトによる減少が大きな比重をしめると推測される．また溶解度が小さく，大気化学反応性も小さなヘキサンのようなものは拡散のみによって減少すると考えられるので長い間大気中に存在するものと推測される．また，CO, NO, CO_2 の溶解度は 3.13×10^{-3}, 6.79×10^{-3}, 1.97×10^{-1} g/100g でありそれに反して SO_2 の溶解度は 13.54g/100g で雨に取り込まれる速度はかなり速く酸性雨の主要な原因となると考えられる．

（本研究は昭和53年度当研究所調査研究課題「大気中有機化合物の総分析」の一部として実施したものである．）

文　献

1) Okita, T.: 公衆衛生院研究報告, 21, 9, 1972
2) Hales, J. M.: *Atmospheric Environment*, 6, 635, 1972
3) Fuchs, N. A.: *Evaporation and Droplet Growth in Gaseous Media, Chapter II*, 1959, Pergamon Press
4) Ohta, T., Morita, M., Mizoguchi, I., and Tada, T.: *Atmospheric Environment*, 11, 985, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 210-213, 1979

t-ブチルパーオキシナイトレートの汚染大気中の挙動

太田与洋*, ジャック・ジー・カルヴァート**

The Fate of *t*-Butyl Peroxy Nitrate in NOx-Hydrocarbon Polluted Atmosphere

TOMOHIRO OHTA* and JACK G. CALVERT**

t-Butyl peroxy nitrate was prepared through the photolysis of 2-methyl-2-nitrosopropane in red light in dilute air mixtures (700 torr., 23C) and identified through FTIR spectroscopy. The formation and de-composition rates of the compound were determined from the kinetic treatment of the data. The fate of the compound in polluted urban atmosphere is discussed. The results suggest that the compound may only as a short term reservoir for *t*-butyl radicals in commonly encountered urban conditions. Only at high $(NO_2)/(NO)$ ratios and lower temperatures may *t*-butyl peroxy nitrate build up in the polluted atmosphere.

Keywords : *t*-butyl peroxy nitrate, FTIR spectroscopy, decomposition rate

緒　　言

空気で希釈された車の排気ガスが強い太陽の紫外線にさらされたときにオゾンと他のオキシダントと総称される化合物が生産されることはよく知られている事実である．いわゆるオキシダントとは水溶したヨー素イオンを酸化するものを総称しており，ただ単にそのうちのオゾンとパーオキシナイトレート (PAN) が同定されているに過ぎない．

一方，Heuss ら[1]は，25種の炭化水素を各々大気中で NOx との共存下で光照射し，オゾン，ホルムアルデヒドと PAN の濃度を測定しつつ，眼の刺激の度合を調べたが，両者には相関が認められなかった．また，大気についてヨー素イオン酸化により測定されたオキシダント量と，ケミルミ法により測定されたオゾン量との間には差がある．これらのことは，いまだ認知し得ていない眼刺激物質が，大気光化学反応で生成することを示唆している．

近来この未知物質のひとつとして，パーオキシアルキルナイトレート (RO_2NO_2) がスモッグチャンバーの中で生成することが，長光路フーリエ変換型赤外分光器 (FTIR) で確認されており，多くの大気化学者の注目を集めるにいたっている[2]．とりわけ夏期に都市大気中に大量に存在するパーヒドロキシルラジカル (HO_2) と二酸化窒素 (NO_2) との結合により生成するパーオキシナイトリックアシッド (HO_2NO_2) についてはその性質はよく調べられている[3]．この化合物自体はかなり早い時期から知られている反応性に富んだ酸化剤であり比較的安定な物質として知られている[3]．

今回，我々は HO_2 と同様に大気中に安定に存在しやすいとされている *tert*-ブチルラジカル (*t*-Bu) と NO_2 により生成されると予想される *t*-BuO_2NO_2 について大気化学的な知見を得，実際の大気中での挙動を推察することができたので，これを報告する．

実　　験

1. 実験装置

t-Bu あるいはパーオキシ *t*-ブチルラジカル (*t*-BuO_2) は2-メチル-2-ナイトロソプロパン (*t*-BuNO) から生成された．この化合物は 5500Å より長い領域の光を吸収し，*t*-Bu と一酸化窒素 (NO) に解離することが知られている[4]．従って光源は赤色光が用いられた．このことにより NO_2 の光解離及びオゾンの生成を防ぐことができた．大気化学的に物質を観察するためには実際の大気環境によくあわせた条件のもとで行なう必要があり，多重反射を用いて光路長を 170m にしたスモッグチャンバーに赤外分光器を付置した長光路のガスセルが用いられた．この手法では濃度は約 0.1ppm 程度まで測定することが可能であり，1回のスキャンの所要時間は秒程度であり，比較的早い反応も観測でき大気中での小さな極性物質の観察には現在最適のものである．

2. 標準物質の合成あるいは精製と検量線[5]

* 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
**The Ohio State University
140 W. 18th Ave. Columbus Ohio 43210, U. S. A.

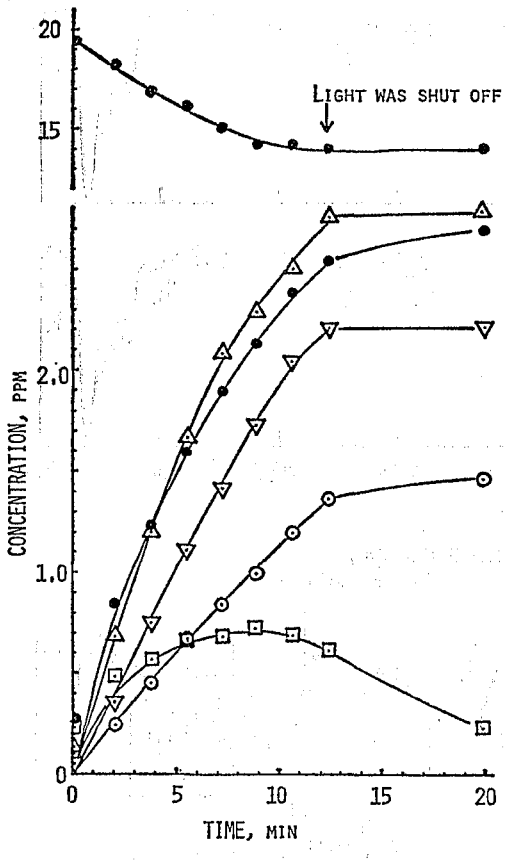


Fig. 1. Concentration vs. Time Profile for the Photolysis of 2-Methyl-2-Nitrosopropane Closed circles (top), *t*-BuNO; closed circles (low), NO_2; triangles, acetone; inverted triangles, *t*-$BuONO_2$; open circles, *t*-$BuNO_2$; squares, *t*-BuO_2NO_2.

t-BuNO は2量体が市販されており，これを使用した．*t*-ブチルナイトライト (*t*-BuONO) と *t*-ブチルナイトレート (*t*-$BuONO_2$) は *t*-ブチルアルコール (*t*-BuOH) を出発物質として合成した．2-メチル2-ニトロプロパン (*t*-$BuNO_2$) は気相で *t*-BuNO をオゾンにより酸化することにより得た．NO_2 とアセトンはマチソン社製のものを精製して用いた．これらの化合物の吸光係数は検量線から求めた．

3. 光照射実験

あらかじめ真空にひかれたスモッグチャンバーに約20 ppm の *t*-BuNO を導入し，そのあと窒素を 600torr，さらに酸素 100torr を入れて光源を点灯した．実験例のうち代表的なものを濃度をたて軸に時間を横軸にプロットしたものが Fig. 1 に示してある．この場合 *t*-BuNO の初期濃度は 19.6ppm であった．

Table 1. Reaction Scheme Used the Steady State Approximation

t-BuNO+hν→t-Bu+NO	(1)
t-Bu+O_2→t-BuO_2	(2)
t-BuO_2+NO→t-BuO+NO_2	(3)
t-BuO_2+NO_2→t-BuO_2NO_2	(4)
t-BuO_2NO_2→t-BuO_2+NO_2	(−4)
t-BuO_2+t-BuNO→t-BuO+t-$BuNO_2$	(5)
t-BuO+NO_2→t-$BuONO_2$	(6)
t-BuO+NO→tBuONO	(7)
t-BuO→$(CH_3)_2CO$+CH_3	(8)
CH_3+O_2+(M)→CH_3O_2+(M)	(9)
CH_3O_2+NO→CH_3O+NO_2	(10)
CH_3O+O_2→CH_2O+HO_2	(13)
CH_3O+NO_2→CH_3ONO_2	(14)
CH_3O+NO→CH_3ONO	(15)
t-BuO_2NO_2+(wall)→products	(16)

結果及び考察

1. 生成物の同定

照射前と照射後のスペクトルの比較 (Fig. 2) 及び生成スペクトルからの各プロダクトのコンピュータを用いた引き算の結果 (Fig. 3) から確認同定された生成物は，*t*-$BuONO_2$, アセトン，NO_2, NO, *t*-$BuNO_2$, *t*-BuO_2NO_2 とホルムアルデヒドである．Table 1 のメカニズムがこれらの生成を合理的に説明することができる．

2. *t*-BuO_2NO_2 の生成速度の決定

生成速度 k_2 を推定するために，k_3 と k_4 の比が求められた．

t-BuO_2+NO⟶*t*-BuO+NO_2 (3)

t-BuO_2+NO_2⟶*t*-BuO_2NO_2 (4)

比較的大量の *t*-BuNO (約40ppm) が92.8ppmのNO_2 と 2.06ppm の NO とともに合成空気の中に混ぜられ，赤色光を照射した．照射前のスペクトルと照射開始50秒後のスペクトルを比較することにより，1.22ppm の *t*-$BuONO_2$ と 0.11ppm の *t*-BuO_2NO_2 のみが生成し，他にアセトン，*t*-$BuNO_2$ とか *t*-BuONO などは検出限界以上は生成しないことがわかった．すなわち反応(3)で生成した *t*-BuO のほとんどが，*t*-$BuONO_2$ になると考えられる．(4)の逆反応 (−4) を無視してみると反応 (3), (4), (5)が主要な反応ステップになる．

t-BuO+NO_2⟶*t*-$BuONO_2$ (5)

ここで，

$R_3=k_3$ (*t*-BuO_2) (NO)$=R_{t\text{-}BuONO_2}$

$R_4=k_4$ (*t*-BuO_2) (NO_2)$=R_{t\text{-}BuO_2NO_2}$

比をとると，

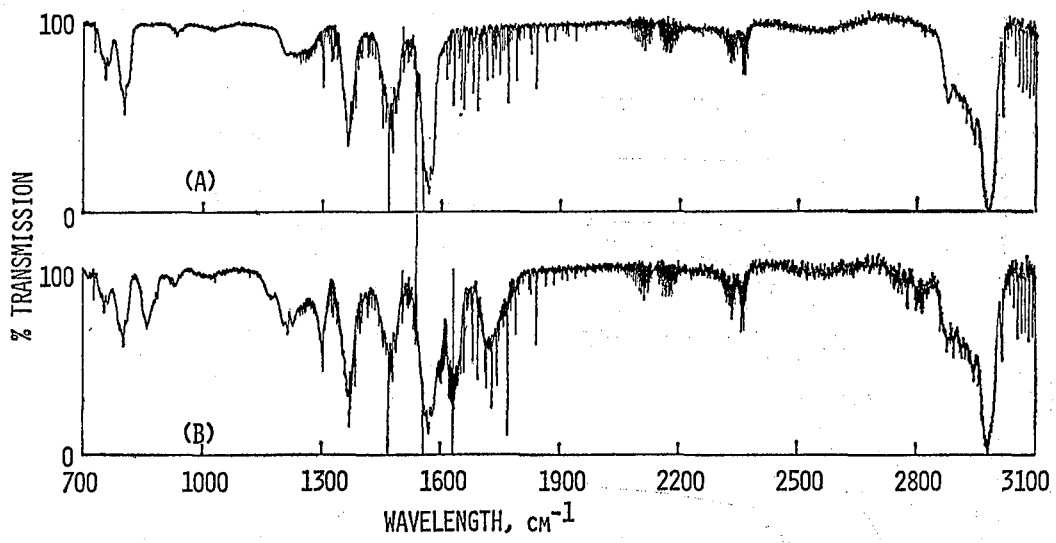


Fig. 2. Spectrum Before Irradiation (A)
Spectrum After 10.23 min Irradiation (B)

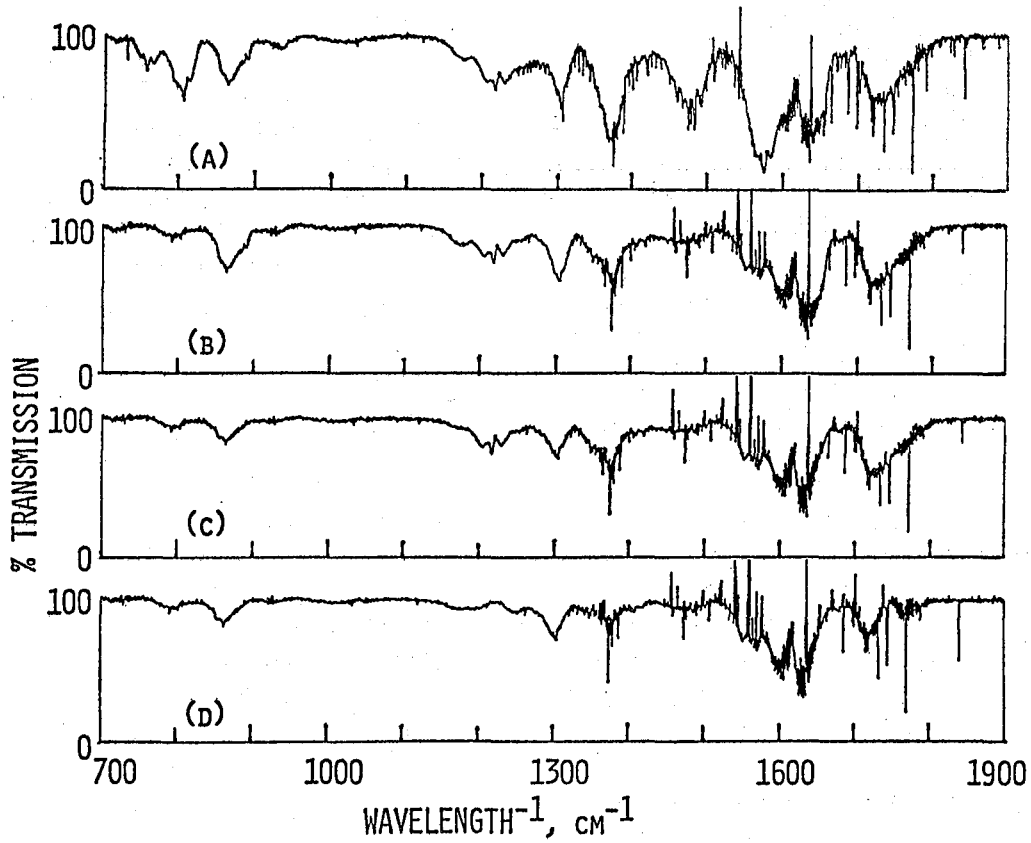


Fig. 3. An Example of Computer Subtraction
(a) =products spectrum,
(b) = (a) −(2-Methyl-2-Nitrosopropane)
(c) = (b) −(*t*-Butyl Nitrate)
(d) = (c) −(Acetone)

$$\frac{k_3}{k_4}=\frac{(NO_2)R_3}{(NO)R_4}$$

この式に，NO と NO_2 の初期濃度と t-$BuONO_2$ と t-BuO_2NO_2 の平均生成速度を代入してやると，

$$\frac{k_3}{k_4}=\frac{92.8\times1.22}{2.06\times0.11}=5.0\times10^2$$

を得る．

もし，k_3 を衝突限界速度に近い値 1×10^4 ppm^{-1} min^{-1} と仮定してみると，k_4 は 20ppm^{-1}min^{-1} となり比較的遅い反応であることを示唆している．

3. t-BuO_2NO_2 の分解速度の決定

定常状態法を反応スキーム中の t-Bu，t-BuO_2，CH_3，CH_3O_2 と NO について仮定すると以下の式を得る．

$$\frac{d(t\text{-Bu})}{dt}=k_1(t\text{-BuNO})-k_2(t\text{-Bu})(O_2)=0$$

$$\frac{d(t\text{-BuO}_2)}{dt}=k_2(t\text{-Bu})(O_2)-k_3(t\text{-BuO}_2)(NO)-k_4(t\text{-BuO}_2)(NO_2)+k_{-4}(t\text{-BuO}_2NO_2)-k_5(t\text{-BuO}_2)(t\text{-BuNO})=0$$

$$\frac{d(CH_3)}{dt}=k_8(t\text{-BuO})-k_9(CH_3)(O_2)=0$$

$$\frac{d(CH_3O_2)}{dt}=k_9(CH_3)(O_2)-k_{10}(CH_3O_2)(NO)=0$$

$$\frac{d(NO)}{dt}=k_1(t\text{-BuNO})-k_3(t\text{-BuO}_2)(NO)-k_{10}(CH_3O_2)(NO)=0$$

これらをもとに式を変型すると

$$\frac{d(t\text{-BuNO}_2)}{dt}=\frac{k_5(t\text{-BuNO})}{k_4(NO_2)}\left[\frac{d(CH_3)_2(O)}{dt}+k_{-4}(t\text{-BuO}_2NO_2)-\frac{d(t\text{-BuNO}_2)}{dt}\right]$$

k_4，k_{-4}，k_5 を除いて，すべての項は実験的に求めることができ，

$$\frac{k_5}{k_4}=0.0034\pm0.0005$$

$$\frac{k_5k_{-4}}{k_4}=0.013\pm0.002\text{min}^{-1}$$

これより $k_{-4}=3.8\text{min}^{-1}$ が得られる．

4. t-BuO_2NO_2 の NOx- 炭化水素に汚染された大気中での半減期の推察

次の3つの反応ステップが現実の汚染大気の中でのこの化合物の挙動を知る上で重要であると考える．

t-$BuO_2NO_2\longrightarrow t$-$BuO_2+NO_2$（－4）

t-$BuO_2+NO_2\longrightarrow t$-$BuO_2NO_2$（4）

t-$BuO_2+NO\longrightarrow t$-$BuO+NO_2$（3）

t-BuO_2 に関して定常状態法を適用すると，

$$\frac{d(t\text{-BuO}_2)}{dt}=-k_{-4}(t\text{-BuO}_2NO_2)-k_4(t\text{-BuO}_2)(NO_2)-k_3(t\text{-BuO}_2)(NO)=0$$

これを用いて

$$\frac{-d(t\text{-BuO}_2NO_2)}{dt}=(t\text{-BuO}_2NO_2)\frac{k_{-4}k_3(NO)}{k_4(NO_2)+k_3(NO)}$$

ここで，NOと NO_2 の濃度を一定と考えると，

$$(t\text{-BuO}_2NO_2)=(t\text{-BuO}_2NO_2)_0\exp\left(-\frac{k_{-4}k_3(NO)}{k_4(NO_2)+k_3(NO)}\right)$$

$$t\ (\text{half life})=\ln 2\left/\left(\frac{\frac{k_4}{k_3}\left(\frac{NO_2}{NO}\right)+1}{k_{-4}}\right.\right)$$

$\frac{k_3}{k_4}=500$ で $\frac{NO_2}{NO}$ がかなり小さいならば

$$t=\frac{\ln 2}{k_{-4}}$$

$$=0.18\text{ min}$$

すなわち，この化合物は汚染大気中では，23℃付近では安定であるとは考えられず，この化合物の主たる機能は NO_2 と t-BuO_2 の一時的なリザーバであり NO を NO_2 に酸化するのに貢献するということがわかる．

文　献

1) Heuss J. M. and Glasson W. A.: *Environmental sci. and Tech.*, 2, 1109, 1968

2) Niki, H., Maker, P. D., Savage, C. M., and Breitenbach, L. P.: *Chem. Phys. Letters*, 45, 564, 1977: ibid., 55, 298, 1978

3) Uselman, W. M., Levine, S. Z., Chan, W. H., Calvert, J. G., and Shaw J. H.: in "Nitrogenous Air Pollutants", Ed. D. Grosjean, Ann Arbor Science, 1979

4) Calvert, J. G. and Pitts J. N.: *Photochemistry*, John Wiley and Sons, 1966

5) to be published elsewhere.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 214-219, 1979

母親と新生児における水銀の蓄積と相互関係（第2報）
母親静脈血と臍帯動静脈血の血球及び血漿

二島太一郎*, 池田真悟*, 長嶋親治*, 藤谷和正*
溝口 勲*, 野牛 弘*, 森本敬三**, 香山英一***

Mercury Content Levels in Mother and Newborn and Their Interaction (II)
Cell and Plasma of Maternal and Umbilical Cord Blood

TAICHIRO NISHIMA*, SHINGO IKEDA*, CHIKAHARU NAGASHIMA*,
KAZUMASA FUJITANI*, ISAO MIZOGUCHI*, HIROSHI YAGYU*,
KEIZO MORIMOTO** and EIICHI KAYAMA***

Total mercury (T) and methylmercury (MM) contents of red blood cells (RBC) and plasma (PL) in maternal blood (MB) and both arterial (UA) and venous blood (UV) of umbilical cord were examined.

Results are summarized as follows: 1) T contents of RBC in UA and UV were significantly higher than in MB, 2) MM contents of RBC in UA was significantly higher than in MB, but the difference of MM between MB and UV was not significant, 3) T contents of PL in MB, UA and UV were not significantly different from each other, 4) ratios of T of RBC to T of the whole blood in MB, UA and UV were 85.7% (MB), 92.0% (UA) and 91.3% (UV) respectively, 5) T contents of RBC in MB, UA and UV had highly significant correlation among each other, 6) T contents of PL in MB, UA and UV had highly significant correlation among each other.

It was concluded that T and MM of RBC in UA was accumulated in fetul body, but T in PL of UA was considered not to be taken up by the fetus.

Keywords : mercury, maternal blood, umbilical cord blood, blood cell, blood plasma

はじめに

われわれは前報[1]において，自然分娩した満期産成熟ヒト新生児の臍帯血液の水銀量を測定し，メチル水銀（以下MMと略記），無機水銀（以下 In-Hg と略記）が母親静脈血液（以下母静血と略記）より有意に高いことを報告した．

ヒト胎児へは母体より胎盤を介して種々の物質が移送されている．胎児蛋白質合成のための主な素材は，移送される母体血漿遊離アミノ酸そのものであるとされ，その出納については，アラニンを取り込み，グルタミン酸を放出していると推定されている[2]．しかし，ヒト胎児がいかなる水銀出納を営んでいるかについては，その詳細は明らかにされていない．

今回は，ヒト新生児の臍帯動脈血液（以下児動血と略記）と臍帯静脈血液（以下児静血と略記），その母親の母静血について，血球（以下 RBC と略記）と血漿（以下 Pl と略記）に分離し，これらにおける総水銀（以下Tと略記），MMの分布とその相互関係，あわせて胎児における水銀の出納について検討した．

実験方法

1. 調査対象者　都内病院で正常分娩した22～36才の産婦50名と，妊娠10カ月後半で出生した生下時体重2,580～4,030g の満期新生児50名である．

2. 調査期間　昭和52年12月～昭和53年1月

3. 試料と前処理　母静血は分娩後ヘパリン添加採血管に 10m*l* あて採取した．児動静脈血は分娩直後臍帯の両端をコッヘルではさみ，臍静脈より児動血を，臍動脈より児静血を，ガラス製注射器で 2～10m*l* を陰圧を加えることなくヘパリン添加採血管に採取した．室温での放置を避けてただちに 4°，3,000rpm，10分間遠沈し，血球成分の混入を厳重に避けて RBC と Pl に分離し，それぞれを−20°に保存し用時分析に供した．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24–1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 都立荏原病院産婦人科
***河野臨床医学研究所

Table 1. Mercury Concentration in Samples of Mother and Child

	Sample	No.	Mercury	Range	Mean±SD	CV (%)
Mother	Red Blood Cell (μg/100g)	49	T	1.4— 9.0	3.5± 1.5	43.1
		49	MM	0.3— 3.5	1.5± 0.8	52.4
		49	M/T(%)	6.7—94.7	43.2±16.2	37.5
	Plasma (μg/100g)	49	T	0.8— 1.3	0.5± 0.2	49.0
Child	Arterial Red Blood Cell(μg/100g)	49	T	2.2—12.8	5.5± 2.5	45.8
		49	MM	0.4— 8.2	2.7± 1.6	59.8
		49	M/T(%)	16.7—80.5	47.7±11.9	24.9
	Arterial Plasma (μg/100g)	49	T	0.2— 1.0	0.4± 0.2	44.2
	Venous Red Blood Cell(μg/100g)	46	T	1.7—13.9	5.3± 2.6	50.0
		34	MM	0.3— 4.4	1.9± 1.0	53.6
		34	M/T(%)	17.6—60.0	40.6± 9.3	23.0
	Venous Plasma (μg/100g)	40	T	0.2— 1.3	0.5± 0.2	48.9

T : Total Mercury MM : Methylmercury M/T : Percentage of Methylmercury to Total Mercury

4. 測定方法 TおよびMMの測定は前報[1]と同じである．ヘマトクリット値（以下 Ht と略記）は毛細管法（11,000rpm, 5分間）で測定した．

結果と考察

表1は母静血とその母親から出生した新生児の児動血および児静血の RBC, Pl 中のそれぞれのT，MMおよびTにしめるMMの割合（以下M/Tと略記）を示したものである．

児動血は胎盤より流出して胎児に向う血液で，児静血は胎児から流出して胎盤に向う血液である．したがって児動血と児静血の濃度差が＋であれば，胎児体内に水銀が取り込まれていることを，また－であれば胎児体内で利用されずに体外へ水銀を排泄していることを示すと考えられる．

RBC 中のTは，母静血より，児動血，児静血に約1.6倍高い．この結果は中野ら[3]の報告（臍帯血と比較）と一致していた．児動血Tと児静血Tの濃度差は＋0.2μg/100g となり，有機無機水銀が胎児体内に取り込まれていることを示している．

RBC 中MMは，母静血に対して児動血は1.8倍，児静血1.3倍で，児動血と児静血の差は ＋0.8μg/100g と，In-Hg の差＋0.1μg/100g よりも約8倍胎児体内にMMが取り込まれていることを示している．しかし，RBC 中の M/T は母静血と児動血，児静血および児動血と児静血間に有意の差が認められず，その割合は約45%前後であったので，逆に In-Hg のTにしめる割合は約55%前後とM/Tより高くなる．

過去の動物実験結果[4-6]は，MMは胎盤を透過しやすく，In-Hg は透過しにくいとされている．したがって，ヒト胎児血液中に In-Hg が多いことは，これらの実験結果と一見矛盾するように思えるが，種によって胎盤構造に大きな相違がある．例えば胎盤膜はヒツジ5枚，ヒト3枚，ウサギでは3枚以下の組織からなり，したがって，酸素の拡散容量なども違ってくるといわれているので[7]，動物実験の結果をそのままヒトの水銀胎盤透過にあてはめて言及することは出来ないが，胎児体内に取り込まれたMMの一部が分解されて In-Hg になり，RBC 中に取り込まれた結果であるとする考え方が，より実証的であろう．

Pl 中Tは母静血と児動，児静血間および児動血と児静血間に有意の差が認められなかった．この点に関して三谷ら[8]は，Pl 中Tは母体血1.0±0.56μg/100g，臍帯血 1.8±1.32μg/100g，M/Tは母体血40.5±18.9%，臍帯血 44.9±23.2%，中野ら[3]は母体血 0.31±0.39μg/100g，臍帯血 0.34±1.72μg/100g，In-Hg/T は母体血45.4±12.5%，臍帯血49.9±19.0%であったと述べている．今回のわれわれの結果と大きく異なる点は，Pl 中のMM量で，表には示していないが，多量の Pl を用いての測定結果では，母静血で0.06μg/100g，児動血0.07μg/100g，そのM/Tは母静血で12%，児動血で18%と先の結果と比較してかなり低いものであった．この点に関しては，水銀化合物のヒト胎盤透過機構を考察する上で，RBCおよび Pl 中の水銀がどのような動態をとるのかが重要となるので，引き続き検討したい．なお児動血と児静血のPl 中Tの濃度差は－0.1μg/100gとなり，Pl中Tは胎児体内に取り込まれにくい可能性を示唆している．

Table 2. Mercury Concentration in Whole Blood, Red Blood Cell and Plasma of Mother and Child (Converted by Haematocrit Values)

	Sample	No.	Mercury	Range	Mean±SD	CV (%)
Mother	Whole Blood (μg/100g)	48	T	0.5— 3.2	1.4± 0.6	43.5
			T	0.4— 3.1	1.2± 0.6	46.3
	Red Blood Cell (μg/100g)	49	MM	0.1— 1.3	0.5± 0.3	53.8
			M/T(%)	6.5—83.0	44.4±17.3	38.9
	Plasma (μg/100g)	49	T	0.1— 0.5	0.2± 0.1	58.8
	Haematocrit (%)	50		28 —44	34.7± 3.7	10.7
Child	Arterial Whole Blood (μg/100g)	40	T	1.0— 5.5	2.5± 1.1	42.9
			T	0.9— 5.2	2.3± 1.0	43.9
	Arterial Red Blood Cell(μg/100g)	40	MM	0.4— 3.0	1.1± 0.7	57.0
			M/T(%)	28.6—78.9	48.5±10.6	21.8
	Arterial Plasma (μg/100g)	40	T	0.1— 0.5	0.2± 0.1	52.9
	Haematocrit (%)	41		37 —53	41.8± 4.1	9.7
	Venous Whole Blood (μg/100g)	29	T	1.0— 4.4	2.3± 0.9	39.6
		32	T	0.9— 4.1	2.1± 0.8	39.7
	Venous Red Blood Cell(μg/100g)	25	MM	0.3— 1.7	0.8± 0.4	45.1
		25	M/T(%)	22.7—63.6	42.2± 8.2	19.3
	Venous Plasma (μg/100g)	30	T	0.1— 0.6	0.2± 0.1	61.1
	Haematocrit (%)	33		34 —48	41.7± 3.7	8.9

Tの RBC/Pl 比を表1の平均値より算出すると，母静血7，児動血14，児静血11となり，児動血中 RBC には母静血 RBC の2倍量の水銀が取り込まれていることを，児動血に比較して児静血の比率が低いことは，児動血 RBC 中の水銀が胎児体内に取り込まれたことを示しているであろうと考える．

表2は母静血，児動血および児静血のそれぞれについて Ht 値を測定し，表1で得られた値について Ht 補正値を算出したものを示してある．

妊娠第12週頃から母体血は Pl 量が増加するので血液の希釈が起るといわれているが[9]，今回のわれわれの測定結果も，母静血に対して児動血，児静血の Ht 値が有意に高かったが，児動血と児静血間には有意の差が認められなかった．

母静血の Ht 値に対して，児動静血の Ht 値は 1.2 倍で，母静血と児動血，母静血と児静血の RBC 中T濃度比は，それぞれ1：1.92，1：1.75となり，Ht 値の差からでは胎児血液 RBC 中の水銀量が多いことを説明出来ないとする三谷ら[8]の報告を支持する結果を得た．またヘモグロビン（以下 Hb と略記）と水銀の親和性の差に起因しているとも考えられているが，Tejning[10] は Hb-A より Hb-F が親和性大であるとし，White[11] は差がなかったとの両説がある．さらに Hb-A，Hb-F の1モルあたりの -SH 基の含量の差，これらの高次構造を考えても，RBC 中水銀濃度差を説明することはできないと報告[12]されているが，事実 RBC 中 Hb 量に対して結合している水銀量は微々たるものであろうから，別の観点からこれらの解析を試みる必要がある．われわれは，さらに血液成分と水銀量の関係を解析しているので，その詳細は次報にゆずる．

表2より全血にしめる RBC 中のT，MMおよび Pl 中のT量の割合をそれぞれ求めると，RBC T/全血Tは母静血85.7%，児動血92.0%，児静血91.3%となり，母体血より胎盤を透過した水銀のほとんどが，RBC 中に取り込まれていることを示している．RBC MM/全血Tは母静血44.4%，児動血48.5%，児静血42.2%で，児動血と児静血差は+6.3%となる．したがって，児動血全血中に存在するT中の6.3%（血液100gあたり0.07μgのMM量に相当する）のMM量が胎児体内に取り込まれていることになる．同様に Pl T/全血Tを求めると母静血14.3%，児動血8.0%，児静血9.0%で，児動血と児静血の差は−1.0%となり，表1の結果で述べたとおり，児動血 Pl 中に取り込まれたTは，胎児体内に取り込まれたT量と同じ量だけ排出されるのか，あるいはほとんど取り込まれずに排出されるのか，いずれにしても明らかではないが，母静血，児動血および児静血の Pl 中T

Table 3. Correlation of Mercury Concentration in Blood between Mother and Child

	Mother			Child					
				Arterial Blood			Venous Blood		
	Red Blood Cell		Plasma	Red Blood Cell		Plasma	Red Blood Cell		Plasma
	T	MM	T	T	MM	T	T	MM	T
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A		0.582	0.442	0.556	0.595	0.342	0.503	0.527	0.307
B	**		0.583	0.873	0.877	0.663	0.820	0.925	0.555
C	**	**		0.611	0.613	0.682	0.608	0.589	0.711
D	**	**	**		0.914	0.595	0.926	0.896	0.575
E	**	**	**	**		0.613	0.880	0.980	0.559
F		**	**	**	**		0.549	0.595	0.515
G	**	**	**	**	**	**		0.938	0.569
H	**	**	**	**	**	**	**		0.671
I		**	**	**	**	**	**	**	

**$P < 0.01$

量は，これらの間においてHt値で補正してみても生のデーターと同様に有意の差を示していない．

母静血と児動血および児静血のRBC，Pl中水銀量の相互関係を知るために，それぞれの間の相関係数（以下rと略記）を求めて表3に示した．なお主なものについては図1－6に相関図を示した．

われわれは前報[1]において，母静血と臍帯血の間にT，MMおよびIn-Hgは極めて高い正相関関係が成立することを述べてきたが，今回得られた結果は，母静血RBCのTと児動血および児静血Pl中Tとの間には有意の相関関係が認められなかった他は，すべて有意の正相関関係が成立した．

RBC中T，MMは母静血と児動血および児静血，児動血と児静血間に有意の正相関が認められた．図1－4に示した相関図で明らかなように，T，MMとも母静血RBC中水銀量に比例して，児動血および児静血RBC中水銀量は増大している．特に図3の母静血RBCと児動血RBC MMの回帰直線勾配から明らかなように，MMの児動血RBCへの取り込み量が，母静血RBC中のMM量を上回っている．このことは，すでに述べてきたように，母静血から胎盤を介して移送されたMMが，児動血RBC中に濃縮蓄積されることを明らかにしている．また図3と図4を比較してみると，児動血と児静血RBC中MMの出納に関して先に述べてきた胎児体内へのMMの取り込みが生じていることを，これら両図の回帰直線の差が明らかにしている．

Pl中Tは母静血と児動血および児静血，児動血と児静血間にそれぞれ有意の正相関が認められた．図5，6に示した相関図で明らかなように，母静血Pl中水銀量に比例して，児動血および児静血Pl中水銀量は増大している．しかしRBCの場合とは異なり，母静血と児動血の回帰直線から明らかなように，比例的直線関係にはあるが児動血中Pl水銀量は母静血のそれを上回っていない．先に表1，表2に示したとおり，母静血，児動血および児静血Pl中T量の算術平均値はほぼ同じであるところから，それぞれは平衡関係にあるようにみえるが，胎盤組織がこれらの間に介在しているので，単に可逆的な水銀移送が行われているとは考えにくい．事実胎盤組織中のIn-Hg量は母体血，臍帯血に比較して非常に高いといわれているところから[8]，In-Hgは胎盤にいったん捕捉された後なんらかの透過機序例えば物理的拡散によって児動血へ移送されるのであろうか．なぜMMは透過しやすく，In-Hgは阻止されるのかmetalothionein like protein合成との関連も含めて，今後の興味ある検討課題である．

さらに水銀化合物のヒト胎盤透過機序を考察してみると，脳血液関門における物質移送は胎盤における移送とにているといわれている[12]．脳に蓄積するMM量は，Pl中水銀量に比例するとする報告[13]がある．このことは，Hbと結合したMMは脳血液関門をそのままでは透過しないので，一度それから離脱しなければならないし，離脱したCH_3Hg^+はシスティンプールのシスティン（以下Cysと略記）と結合して，液状成分の血清から脳実質へ移送されると解釈できることを示唆している．三谷ら[8]は，MMにCysを結合させてラットに投与すると，MM単独投与の時よりも胎児により多く蓄積された

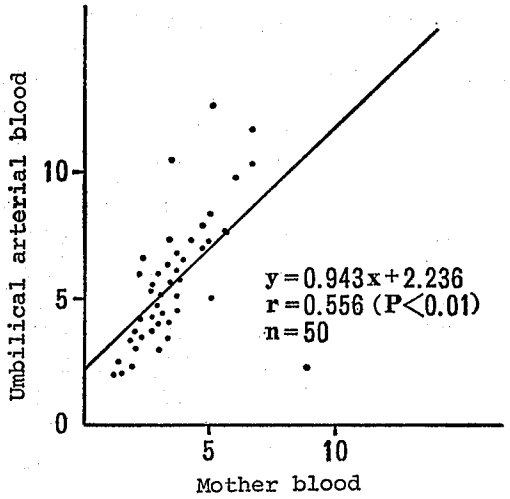


Fig. 1. Total Mercury in Red Blood Cell (μg/100g)

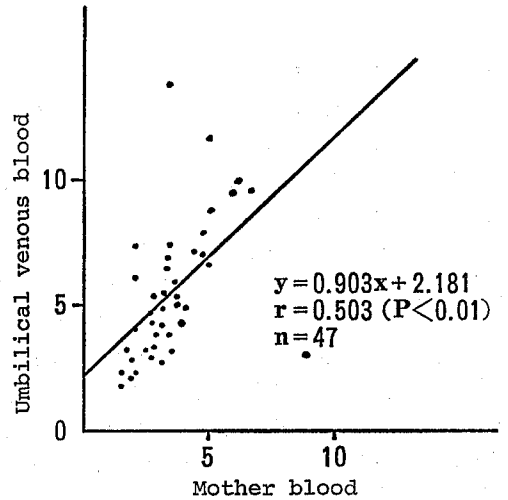


Fig. 2. Total Mercury in Red Blood Cell (μg/100g)

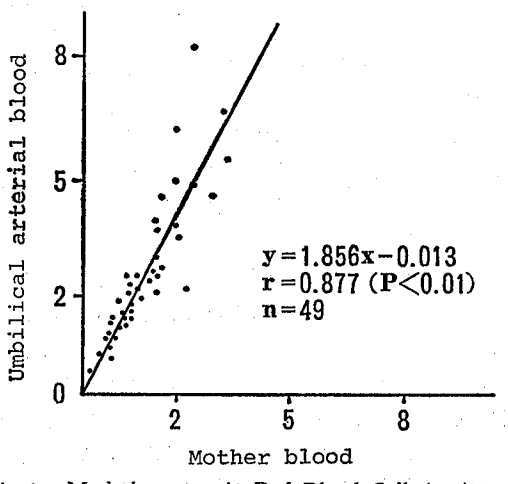


Fig. 3. Methylmercury in Red Blood Cell (μg/100g)

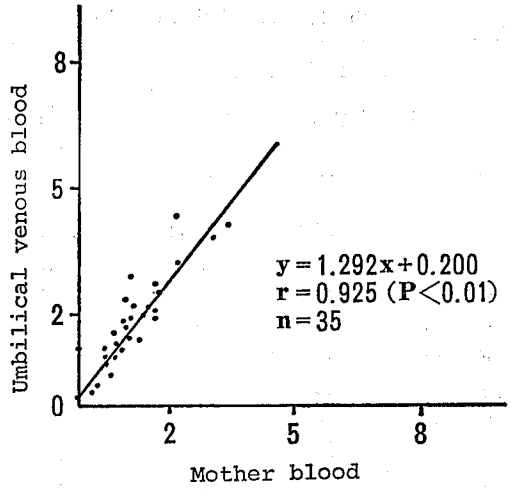


Fig. 4. Methylmercury in Red Blood Cell (μg/100g)

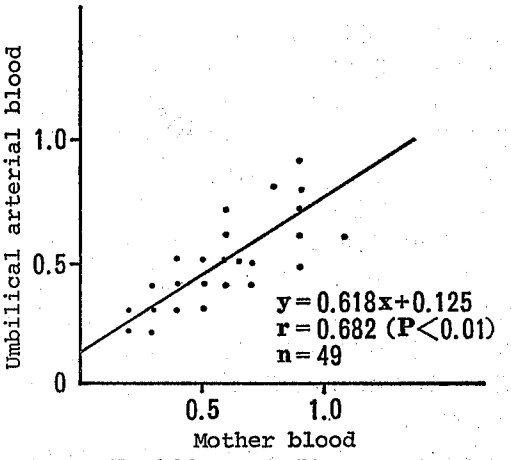


Fig. 5. Total Mercury in Plasma (μg/100g)

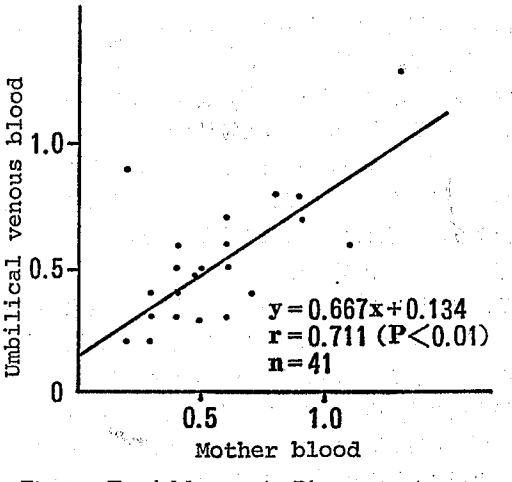


Fig. 6. Total Mercury in Plasma (μg/100g)

と報告し，この結果よりMMの胎盤移送には，アミノ酸の胎盤における能動輸送が関与している可能性を述べている．

しかし一方では，MMは脂質のような疎水性物質に高い親和性を示すため，Pl 中脂質と結合して脳へはいるとする説もあるが[14]，これに対して，先に述べたようにMMが Cys と結合して脳実質内へ導くと考えたほうが，より実証的であるとする報告[15]もある．これらのことから，いずれにおいても，MMの移送には Pl が重要な役割をはたしていることは明らかである．今後の解明を待ちたい．

まとめ

1. RBC 中T量は，母静血より児動血，児静血に有意に高かった．

2. RBC 中MM量は，母静血より児動血に有意に高かったが，母静血と児静血の間には有意差を認めなかった．

3. Pl 中T量は，母静血，児動血および児静血間に有意の差が認められなかった．

4. Tの RBC/Pl 比は，母静血7，児動血14，児静血11で，母静血より胎盤を介して児動血の RBC 中に水銀が取り込まれていることを示唆している．

5. Ht 値は，母静血より児動血，児静血が有意に高く，児動血と児静血間には有意の差が認められなかった．

6. 全血にしめる RBC 中のT，MM の比は，母静血85.7%，35.7%，児動血92.0%，44.0%，児静血91.3%，34.8%で，胎児血液中に存在する水銀の90%以上は RBC 中にあり，その約40%前後はMMであった．

7. RBC 中T，MMは，ともに母静血と児動血および児静血，児動血と児静血間の高い正相関があった．

8. Pl 中Tは，ともに母静血と児動血および児静血，児動血と児静血間に高い正相関があった．

9. 児動血 RBC 中T，MMは胎児体内に取り込まれて蓄積するが，Pl 中Tは胎児体内に取り込まれず排出される傾向を認めた．

（本研究の概要は第37回日本公衆衛生学会1978年10月で発表した．）

文献

1) 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，28-1，215，1977
2) 林 進，城戸国利，山田順常，渡辺扶美子，真田恵子，浜野宣子：医学のあゆみ，99，555，1976
3) 中野篤浩，高野敦子，脇阪一郎：第37回日本公衆衛生学会講演集，307，1978
4) 浮田忠之進：科学，41，557，1971
5) 浮田忠之進，武田 寧，佐藤善重，高橋忠男：*RADIOISOTOPES*，16，31，439，1967
6) 三谷一憲，中田利一，小瀬洋喜：衛生化学，24，246，1978
7) 細谷憲政，高柳正夫：医学のあゆみ，64，767，1968
8) 三谷一憲，星野道雄，児玉京子，近藤正人，小瀬洋喜：衛生化学，22，333，1976
9) 高木健太郎，岡本彰祐：生理学大系Ⅱ，301，1968，医学書院，東京
10) Mendel Friedman: *Protein-Metal Interactions*, 475, 1974, Plenum press, New York
11) White, J. F. and Rothstein A.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 26, 370, 1973
12) 石原信夫：医学のあゆみ，90，127，1974
13) Gage, J. C.: *J. Indust. Med.*, 21, 197, 1964
14) 鈴木継美，和田 攻：重金属中毒，43，1978，医歯薬出版，東京
15) 武内忠男：環境保健レポート，22，15，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 220-223, 1979

週令によるラットのメチル水銀毒性に対する感受性の差（第1報）

関　比呂伸*, 蓑輪佳子*, 鈴木　昇*, 大井　玄**

Age Factor in the Development of Methylmercury Poisoning in Rats (I)

HIRONOBU SEKI*, KEIKO MINOWA*, NOBORU SUZUKI* and GEN OHI**

We observed the influence of age factor in the development of neuro- and somatic-toxic manifestations of methylmercury poisoning in rats.

Five groups of rats of different ages (3, 5, 7, 9, 11 weeks old respectively) were fed diet containing 20 ppmHg methylmercury. Advanced age generally shortened the latent period between the development of toxic signs and this was most regularly observed regarding the period before the animals began losing their weight. The effect of age factor was more pronounced in delaying "the late manifestation": such as crossing and paralysis of hind legs and death than in "the early neurological sign"—the tail rotation.

It appears that the younger a rat is, the more resistant he is to the toxicity of subacutely administered methylmercury.

Keywords : methylmercury toxicity, age, neurological sign

緒　言

薬物の毒性を評価するための動物実験を行なう時，考慮しなければならないことは，種々の因子により基礎的な実験成績が異なりうるということである．大別すると遺伝要因と環境要因の2つがあげられる．遺伝要因とは，種・属の違いによる差，品種・系統の違いによる差，突然変異遺伝子による差，性および年令による差である[1]．環境要因とは，生物的要因として同種・異種生物間の因子，非生物的要因として栄養的・気象的・物理的・化学的・住居的因子である[2]．

このような因子による影響は，重金属毒性についても調べられているが，報告例は少ない[3-11]．

我々のいくつかのメチル水銀毒性実験において，神経症状の発現日が週令により差異があるように認められた．

Lin 等によれば，ラットにおけるメチル水銀の LD_{50} 値は，週令の上昇（もしくは体重の増加）とともに，減少していたと報告している[7]．

我々の実験の目的は，亜急性メチル水銀投与実験において動物の年令因子による毒性発現への影響を観察するものである．すなわち，初発および後発症状，その他の指標症状発現にいたる所要日数が，メチル水銀投与開始時における動物の週令によりいかに変化するかを観た．

方法・材料

ウィスター系雄性ラット70匹を，3，5，7，9，11週令，コントロールの6群に分け，1群11～12匹とした．各々の週令に達した時，ラットは塩化メチル水銀20 ppmHgを含む飼料を飽食できるように与えられた．各々の週令に達するまで残りのラットは，体重変化を比較するコントロールとした．実験は，全匹死亡するまで行なわれた．

実験期間中，週2回の体重測定，週3回の神経症状発現の観察，毎日朝・夕方の死亡を確認した．神経症状には，尾の旋回[12]，後肢の交差・マヒ[13]を指標とした．週1回飼料・水の摂取量を計った．

実験飼料の調整：セレンがメチル水銀の毒性を修飾するということは，すでに数多く報告されている．普通飼育用飼料中には，セレンが約 4ppm 存在するので[14]，セレン濃度を低下させるため，小麦・フスマ・魚粉をカゼイン（20%）とトウモロコシ（27.5%）とにおきかえた．塩化メチル水銀は，アセトンに溶かして，粉末飼料と混合し，自然乾燥後ペレットにした．

結果と考察

図1でみられるように，各群の体重の増減曲線において，週令の若いラットほど鋭い上昇を示しており，増加曲線が平衡状態に達し，減少していくのにより長い期日を要していた．これは，表1の平均 B. W. Plateau の項目に示したごとく，週令が高くなるほど Plateau への期日が短くなっていることから理解される．体重減少の始まった時の飼料総摂取量は，3週令群 695.8g，5週

* 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
**東京大学医学部衛生学教室

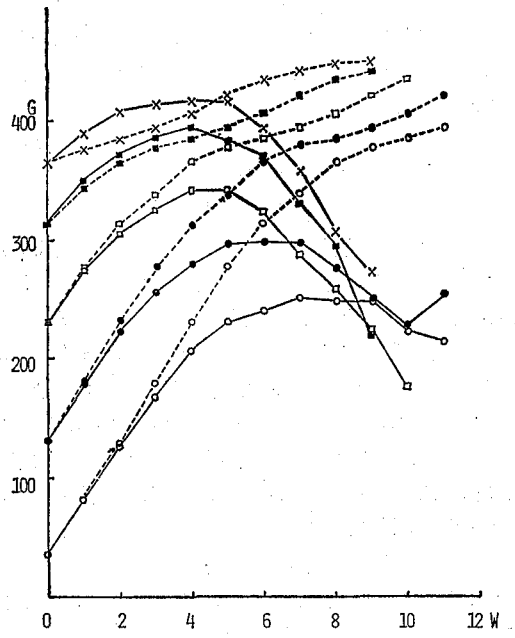


Fig. 1. Change of Body Weight
—○—: 3 Weeks-old, Broken line : Control groups
—●—: 5 〃
—□—: 7 〃
—■—: 9 〃
—×—: 11 〃

令群 674.8g，7週令群 583.8g，9週令群 605.4g，11週令群 602.7g であり，体重当りのメチル水銀摂取量として換算すると，3週令群 55.6mg/kg，5週令群 45.0 mg/kg，7週令群 34.1mg/kg，9週令群 30.8mg/kg，11週令群 28.9mg/kg となり，高い週令になるほど少ないメチル水銀摂取量で体重減少が現われた．

メチル水銀中毒の神経症状としての尾の旋回現象は（図2），発現率100%において5，7，9週令群が，3，

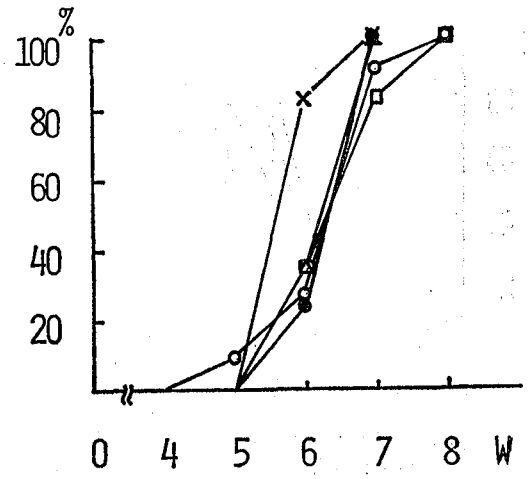


Fig. 2. Change of Tail Rotation
—○—: 3 Weeks-old
—●—: 5 〃
—×—: 7 〃
—△—: 9 〃
—□—: 11 〃

11週令群より1週間早いことを示していた．しかし，表1に示したように，平均発症日数や TR50（50%発症日数）では差が認められなかった．TR50 での体重当りのメチル水銀摂取量は，3週令群 55.6mg/kg，5週令群 54.1mg/kg，7週令群 43.6mg/kg，9週令群46.9mg/kg，11週令群 41.8mg/kgであった．

後肢の交差・マヒ症状は（図3），9，7，11，5，3週令群の順に遅れて発現した．平均発症日数において，7，9，11週令群と3，5週令群との間に有意の差が認められた（$P<0.05\sim0.001$）．

これら2つの神経症状の発現における平均発症日の間隔は，週令の増加とともに短縮することが認められた．追加実験で行なった27週令の場合では，その間隔は 4.5

Table 1.

Weeks-old	Tail Rotation	TR50 [1]	Cross & Paralysis	CP50 [2]	CP-TR	Death	B. W. Plateau
3	45.5±5.6*	46*	58.0±9.4*	56*	12.5*	74.1±10.7*	50.5±10.1*
5	44.6±2.9	45	56.2±4.9	54	11.6	72.4± 3.4	43.3± 5.8
7	42.7±2.4	40.5	49.2±3.2	48	6.5	62.1± 3.8	32.3± 3.2
9	43.9±2.9	43	49.5±2.3	47.5	5.6	61.3± 3.6	29.7± 3.2
11	45.8±4.3	44	50.9±4.0	49.5	5.1	63.3± 3.7	30.8± 3.8

1 : 50% cummulative incidence of Tail Rotation
2 : 50% cummulative incidence of Cross & Paralysis
* : days (Mean±S.D.)

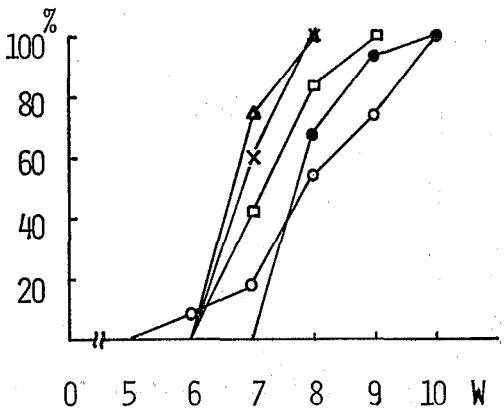


Fig. 3. Change of Cross & Paralysis
—○—: 3 Weeks-old
—●—: 5 〃
—×—: 7 〃
—△—: 9 〃
—□—: 11 〃

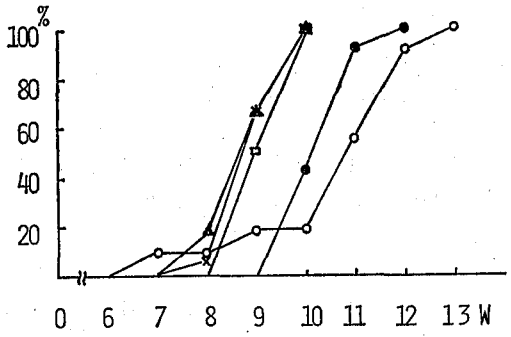


Fig. 4. Change of Mortality
—○—: 3 Weeks-old
—●—: 5 〃
—×—: 7 〃
—△—: 9 〃
—□—: 11 〃

日と短くなっていることが観察された.

死亡率は（図4），7，9，11週令群が10週間目で100％に達しており，5週令群はそれより2週間，3週令群は3週間遅れていた．平均死亡日数において，3，5週令群と他の3群との間に有意の差が認められた($P<0.01$～0.0001).

これら3つのパラメーターにおいて，メチル水銀の毒性影響が，尾の旋回，後肢の交差・マヒ，死亡と進むにつれ，3，5週令群と他の3群との差が明らかになり，メチル水銀毒性に対して3，5週令群はより強い抵抗性を示していた.

Lin 等の報告によれば，週令が増加するにつれ LD_{50} 値は低下することを観察した．彼等は，週令の高いラットほど血液を介して標的臓器へメチル水銀が多く移行することを示唆した[7].

我々の実験結果は，Lin 等の観察と類似しているが，週令の違いによる差は，明確に認められなかった．これは，彼等といくつかの実験条件が異なるためと思われる．まず第1に，投与方法は我々の場合飼料に含ませたメチル水銀を毎日飽食させたが，彼等は1回のみの経口投与を行なった．第2に，投与量は 0.8～2mg/kg（1日平均飼料摂取量より換算した場合）と 25mg/kg，第3に，観察に用いたラットの週令の幅は3～11週令の8週間と8～24.5週令の16.5週間と異なっている．第4に，我々のとったパラメーターは神経症状，体重，死亡率であり彼等は LD_{50} 値を用いており，これらの違いによるためと考えられる.

要　約

ラットのメチル水銀中毒において，中毒症状発現に対する年令因子の影響を観察した．異なる週令の5群のラット（3，5，7，9，11週令）に 20 ppmHg のメチル水銀を含む飼料を投与した．週令が高くなるにつれ中毒症状発現にいたる期間が短縮される傾向にあり，この傾向は，体重減少にいたる期間において最もはっきりと認められた.

年令因子の影響は，後肢の交差・マヒや致死といった“後発症状”を遅延させる点で尾の旋回現象といった“初発症状”よりも顕著であった.

ラットの週令が，低ければ低いほどメチル水銀亜急性中毒実験において抵抗力を示すものと思われる.

（本研究は昭和53年度当研究所調査研究課題「重金属汚染の生体影響に関する研究」として実施したものである.）

文　献

1) 江崎孝三郎：化学と生物，7，108，1969
2) 山内忠平：同上，7，235，1969
3) Garber, Brad and Wei Eddie: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 9, 80, 1973
4) Rehwoldt Robert, et al.: *ibid.*, 8, 91, 1972
5) Momcilovic, B. and Kostial, Krista: *Environ. Res.*, 8, 214, 1974
6) Miller, V. L. and Csonka, Elizabeth: *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 13, 207, 1968
7) Lin, F. M. et al.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 14, 140, 1975

8) 遠藤　克，高木勝典，西川滇八：第50回日本産業衛生学会講演集，426，1977
9) 遠藤　克，高木勝典，西川滇八：第51回日本産業衛生学会講演集，648，1978
10) 野見山一生，松井寛二，野見山紘子：日本衛生学雑誌，33，141，1978
11) 野見山一生，松井寛二，野見山紘子：同上，34，193，1979
12) Ohi, G. et al.: *Environ. Res.*, 16, 353, 1978
13) 武内忠男　等：熊本医学会雑誌，36，713，1962
14) Ohi, G. et al.: *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 32, 527, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 224-226, 1979

水中の 1, 3, 5-トリクロル-2-(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン（CNP）と1,3-ジクロル-2-(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン（NIP）

高橋保雄*, 森田昌敏*, 土屋悦輝*

Residues of 1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy)benzene (CNP) and 1, 3-Dichloro-2-(4-nitrophenoxy)benzene (NIP) in Water

YASUO TAKAHASHI*, MASATOSHI MORITA* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords: 1, 3, 5-トリクロル-2-(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン 1, 3, 5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene, 1, 3-ジクロル-2-(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン 1, 3-dichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene, 残留 residue, 水道原水 raw water, 水道水 tap water

緒　言

1, 3, 5-トリクロル-2-(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン（以下 CNP と略す）および 1, 3-ジクロル-2-(4-ニトロフェノキシ)ベンゼン（以下 NIP と略す）は除草剤として，1965年頃から日本において使用され始めた．当時は，ペンタクロルフェノール（以下 PCP と略す）が除草剤として大量に使用されていたが，魚介類に大きな被害を与えて問題になったことから，1970年に水質汚濁性農薬と指定された．それ以来，PCP に比較して魚介類および哺乳動物に対して毒性が低いとされている CNP，NIP[1] などのジフェニルエーテル系除草剤やカーバメート系の除草剤が大量に使われ始めた．その内，CNP は現在（1972年）5,000 t 程度使われている．また，NIP は CNP の 1/7 程度使われているが，漸次減少傾向にある．

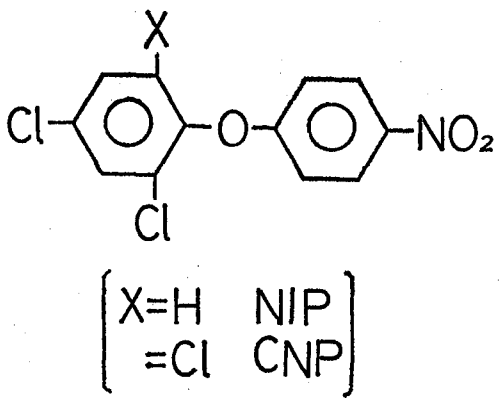


図 1.　CNP, NIP の構造式

最近，山岸ら[2] は東京湾で採取した魚介類に CNP が残留することを見出し，また，立川ら[3]，山田ら[4] は CNP，NIP およびそれらのアミノ誘導体が水田土壌中に強く残留することを報告している．このように CNP，NIP による環境汚染を再考する必要が生じている．しかし，水系汚染（環境汚染）に関する報告[5] は極めて少ない．筆者らは水系（飲料水）が CNP，NIP によりどの程度汚染されているか調査したので，ここに報告する．

実　験

Ⅰ試薬　n-ヘキサン：Mallin Krodt nanograde，エーテル：和光純薬残留試験用，無水硫酸ナトリウム：和光純薬残留試験用，フロリジル：Floridin 社 100–200 mesh を 650° 8時間焼成し活性化して使用，CNP，NIP：市販製剤より抽出，精製したものを標準物質とする．（CNP mp 107° NIP mp 72°）

Ⅱ機器　ガスクロマトグラフィー（以下GCと略す）は島津 GC6A．使用条件 カラム：2% OV-17 on Gas ChromQ (80–100mesh) 2m×3mmϕ，カラム温度：210°，デテクター温度：235°，検出器：ECD (^{63}Ni)，キャリヤーガス：N_2 50m*l*/min

ガスクロマトグラフィーマススペクトロメーター（以下 GC-MS と略す）は島津 LKB 9000．使用条件 カラム：2% OV-17 on Gas ChromQ (80–100mesh) 2m×3mmϕ，カラム温度：210°，セパレーター温度：270°，サンプル温度：235°，検出器：全イオン検出器(TIC)，キャリヤーガス：He 30m*l*/min，イオン電圧：70eV，1次スリット：0.1mm，2次スリット：0.1mm

Ⅲ試料　水道原水，水道水は東京都の朝霞，金町，小作浄水場のものである．東京湾沿岸の水は金沢，川崎，

* 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

三枚洲，京浜島，千葉中央港の5カ所で採水したものである．東京都立衛生研究所の蛇口水についても行った．

Ⅳ分析方法　検体 1.7*l* にヘキサン 60m*l* を加えての抽出を2回繰返す．この抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し，K.D 濃縮器，更に，窒素パージで約 500*μl* に濃縮する．これを11.2g詰めたフロリジルカラム(φ 1cm ×h 30cm のカラム)につけて，4 v/v%エーテル—ヘキサン 50m*l* で展開させる．ポリ塩化ビフェニール，クロルベンゼン類などはこのフラクションに流れ出す．更に，25v/v% エーテル—ヘキサン 120m*l* で展開するとCNP，続いて NIP が溶出する．図2に CNP，NIP の溶出曲線を示した．筆者らは 25v/v% エーテル—ヘキサン120 m*l* で展開させた部分を集めて，これを K.D 濃縮器，窒素パージで正確に濃縮し，GCに注入し，CNP, NIP を測定した．本分析法の回収率は 50ng の CNP，NIP を蒸留水 1.7*l* に添加して測定した時，3回平均 CNP 80%，NIP 78%であった．検出限界は CNP で 0.3ppt，NIP で 0.2ppt である．

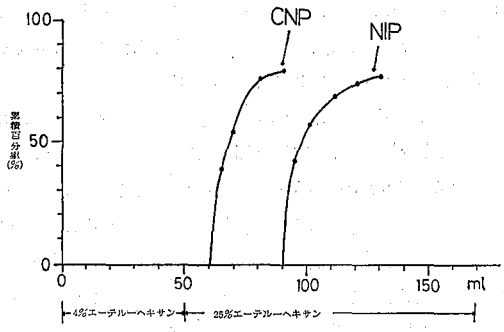


図 2.　フロリジルカラムによるCNP，NIPの溶出曲線

Ⅴ GC-MS 分析法　1977年7月当研究所の蛇口水 25*l* を上記の分析法で行った．ただし，最終の濃縮液は約 50*μl* 迄濃縮し，その内，10*μl* を GC–MS にかけた．

結果と考察

図3に水道原水中の CNP，NIP のガスクロマトグラムを示す．

図4は1977年7月当研究所の蛇口水から検出した CNP のマススペクトラムである．これは標準物質のマススペクトラムともよく一致している．m/e 317, 319, 321 Mの親イオンとその同位体ピークであり，強度比（3：3：1）は塩素原子3個の存在を示す．そのほかに，m/e 287, 289, 291 (M–NO), m/e 236, 238, 240 (M–NO_2Cl) が特徴的である．NIP の場合は m/e 283 親イオン，285 が認められる．

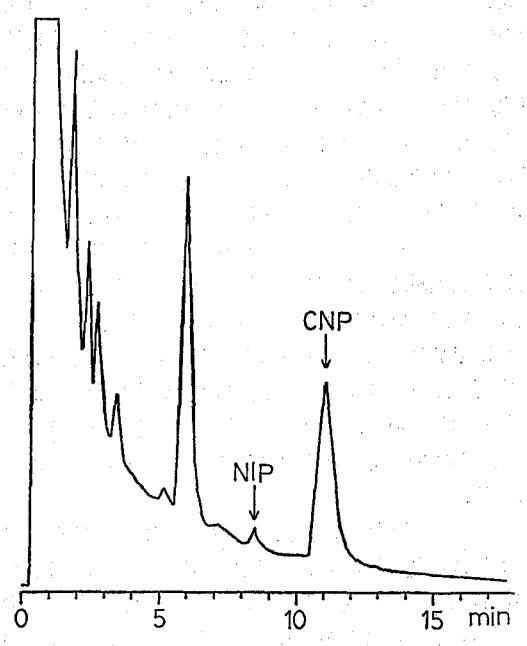


図 3.　水道原水の CNP, NIP の ECD–ガスクロマトグラム

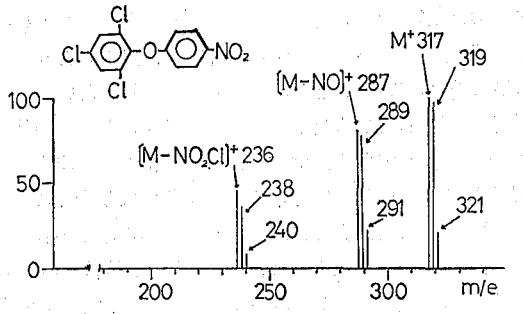


図 4.　当研究所蛇口水のCNPのマススペクトラム

表 1. 浄水場，東京湾の NIP 及び CNP

		試料数	NIP(ppt)	CNP(ppt)
1976年9月 浄水場	水道原水	3	0.2～1.2	ND～0.3
	水道水	3	ND	ND
1977年4月 浄水場	水道原水	3	ND～1.5	ND
	水道水	3	ND	ND
1977年7月 浄水場	水道原水	1	1.8	48
	水道水	1	2.0	60
1977年3月	研究所蛇口水	1	—	6.4
1977年6月	研究所蛇口水	1	2.0	23
1977年9月	東京湾	5	—	1.8～7.9

表1に浄水場の水道原水（河川水），水道水，当研究所の蛇口水，東京湾沿岸の試料水の CNP，NIP 分析結果を示した．この表から明らかなように，東京都の水道原水，水道水において，CNP は不検出から数十ppt の値を，また，NIP は不検出から数 ppt の値を示した．鈴木ら[5]は北九州地帯での河川水を分析し，CNP 値として不検出から数百 ppt の値を報告している．この値は筆者らのデータと比較すると高い．これは鈴木らの分析した北九州地帯における CNP の使用量（正確には出荷量）が多いことによるものと推定される．

1977年7月浄水場の水道原水，水道水，1977年6月当研究所の蛇口水は他の月に比較して，CNP，NIP が高い値を示している．これは農薬散布の時期（5～7月）を反映しているものと推定されるが，今後の検討が必要である．

NIP は土壌中では散布後急速に大部分 NIP-アミノ誘導体になり，NIP 自体が減少する．しかし，土壌中の複雑な変化により，NIP-アミノ誘導体が NIP に舞い戻ったりすることがある[6]．CNP は散布後，大部分 CNP-アミノ誘導体になり，途中の経路は不明であるが，CNP-アミノ誘導体から塩素1原子が水素原子に置換され，NIP に変化する可能性が指摘されている[7]．農薬散布時期でない1976年9月，1977年4月の水道水から NIP が検出されていることは単に，NIP が土壌中に変化を受けないで残留する以外にも，以上のような事柄が関与していることを示しているかも知れない．

水道原水および水道水における CNP，NIP の値はほとんど同じである．このように非常に低い濃度での CNP，NIP の除去は通常の浄水過程で取り除くことが困難であることが表1に示したデータから考えられる．

表1から明らかなように，東京湾沿岸の試料水のCNPは低濃度（数 ppt）であるのに，山岸ら[2]は東京湾の湾岸から採取したムラサキイガイから，CNP を約 1ppm で検出している．ムラサキイガイ中での CNP の濃縮が観察されていることから，環境汚染物質としての調査も今後続ける必要性が生じている．

謝辞 本調査を行なうに当り，計画や実験を御指導して下さった当研究所三村秀一参事研究員，秋山和幸博士，山岸達典博士に，また，水道原水，水道水を供与して下さった水質センターの鶴岡課長に深謝いたします．

（本研究は昭和53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，その概要は日本公衆衛生学会第37回東京大会1978年10月で発表した．）

文　献

1) 荒井正雄：雑草研究，**5**，90，1966
古谷勝司，荒井正雄：雑草研究，**5**，99，1966
福永一夫編：農薬ハンドブック（1972年）日本植物防疫協会

2) Yamagishi, T., Akiyama, K., Morita, M., Takahashi, R., and Murakami, H.: *J. Environ. Sci. Health*, **B 13(4)**, 417, 1978
Yamagishi, T., Akiyama, K., Morita, M., Takahashi, R., Miyazki, T., and Kaneko, S.: *Bull. Environ. Contam. toxicol.*, **23**, 1, 1979
山岸達典，秋山和幸，金子誠二，堀井昭三，宮崎奉之，森田昌敏：東京衛研年報，**30-1**，123，1979
山岸達典，秋山和幸，金子誠二，堀井昭三，宮崎奉之，森田昌敏：東京衛研年報，**30-1**，127，1979

3) 立川　涼，楠　憲一：日本土壌肥料学会第19回講演要旨集，155，1973
立川　涼，楠　憲一：日本農芸化学会第48回講演要旨集，36，1973

4) 山田忠男：雑草研究，**20**，1，1975

5) Suzuki, M., Yamato, Y., and Akiyama, T.: *Water Res.*, **12**, 777, 1978
遠山輝彦，玉川重雄：農薬科学，**3**，178，1976
漆原久幸：雑草研究，**6**，21，1967

6) 山田忠男，中村　拓：日本雑草防除研究会第12回講演要旨集，111，1973
山田忠男：日本農芸化学会第49回講演要旨集，44，1974

7) 保坂　洋，石塚皓造：日本雑草防除研究会第12回講演要旨集，76，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 227-237, 1979

下水道未整備地域における水質汚濁について（第3報）　秋川の水質とその汚濁状況

中村　弘*, 押田裕子*, 栃本　博*, 菊地洋子*, 池島伸至*, 友成正臣*

Studies of Water Pollution in the Area without Sewer Systems (III) Water Qualities and Pollution Loadings in the Akikawa River, Tokyo

HIROSHI NAKAMURA*, HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO*, YOKO KIKUCHI*, NOBUYUKI IKEJIMA* and MASAOMI TOMONARI*

Keywords: 秋川 the Akikawa River, 水質汚濁 water pollution, 自然汚濁 natural water pollution, 人為汚濁 artificial water pollution

緒　論

生活排水，産業排水などの流入による公共水域の汚濁化は昭和40年代の高度経済成長期に急激に表面化し，水質汚濁防止法などの立法化を促した．以来，汚濁水域の水質に良化の兆がみられるところもあるが，一旦，汚濁化した水域をもとの清水に回復させることは非常に困難なことである．

東京多摩地区を貫流する多摩川の一支川である秋川は清流として知られ，都民の格好なレクリエーションの場として，釣り，水泳，ハイキング，キャンプ場などに利用されている．だが，この流域の中，下流部では昭和40年ごろより人口が増加し，特に，下流部の秋川市は東京都心の通勤圏に入るため，その増加には著しいものがある．幸にして，本川流域では生活排水などの河川放流は原則として禁止されているため，河川の汚濁化はあまり進行していない．しかし，近年，人口増加と生活様式の近代化に伴い，生活排水の一部が河川に放流されるようになり，水域の汚濁が心配されるようになった．

近時，中小河川の水質調査，汚濁解析などに関する報告[1-16]が多数みられるようになったが，汚濁河川の報告例が主で，汚濁のあまり進行していない河川の報告例は少ない．著者らは後者の河川の一例として，秋川を取り上げ，その水質と汚濁状況，特に，自然汚濁と人為汚濁について検討したので報告する．

河川流況と汚濁要因

秋川はその源流を東京都と山梨県境にある三頭山（1,528m）に発し，北秋川（長さ10.4km，流域面積45.8km²）および養沢川（長さ7.3km，流域面積18.9km²）などの支川と合流し，多摩川に流入する全長33.6km，全流域面積166km²の河川で，檜原村，五日市町，秋川市の三つの行政区を流れる．上流部は1,000～1,500m級の山あいを流れる平均こう配30/1,000の急流～渓流で，この流域には戸数20～60の部落が点在する．中流部は平均こう配13/1,000の渓流で，途中，人口1万9千人の五日市町の中心的市街地を通過する．また，上流部から中流部にかけては秋川渓谷として知られる観光地ともなっている．下流部は平均こう配8/1,000で秋川丘陵（加住丘陵）と秋留盆地を南北にしてその間を流れるが，この河川水の一部は秋留盆地の地下水を涵養しているといわれる[17]．また，下流部の人口増加は著しく，宅地化が急速に進みつつある．

これら河川水の汚濁要因として，人口，人口密度，排水の処理方法などについて**表1**に示す．また，この河川流域の土地利用状況を**表2**に示す．

調査方法

1. 調査地点および調査回数　調査地点を**図1**に示す．調査は昭和53年5月から1年間にわたり隔月に計6回行なった．調査月日と天候は次の通りである．

第1回　53. 5.24　晴（前日晴，前々日晴）
第2回　53. 7.19　晴（前日晴，前々日晴）
第3回　53. 9.20　曇のち晴（前日小雨のち晴，前々日晴）
第4回　53.11.15　晴（前日晴，前々日雨）
第5回　54. 1.24　晴（前日晴，前々日晴）
第6回　54. 3.22　晴（前日曇，前々日曇）

2. 測定項目および測定方法　主な測定項目および測定方法は次の通りである．

濁度（比色法），pH（比色法），アンモニア性窒素（ネ

* 東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町 3—16—25
* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16–25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

表 1. 秋川流域における河川汚濁要因

	檜原村	五日市町	秋川市
人口（人）54.4.1	4,442	19,776	42,005 (22,900)*
人口密度（人／km²）	42.3	388	1,897 (2,340)*
水道平均給水量（l/人／日）注1)	309	254	249
水道普及率（%）	61	96.9	99.9
し尿処理注2)	くみ取り式	同左	同左
し尿浄化槽設置届出数注3)	18	382	1,040
合併浄化槽設置数注4)	—	2	6
家庭雑排水注5)	吸込み処理	同左	同左
家畜飼育頭数注6)	牛16，豚 0	牛127，豚316	牛1,031，豚1,558
畜舎排水処理	農地還元	農地還元，肥料化	肥料化，一部農地還元
観光人口（五日市町調べ）	昭和50年100万人，昭和51年114万人，昭和52年108万人，昭和53年150万人		
工場数（従業員数）注7)	26 (203)	83 (1,302)	133 (1,814)
事業所数（従業員数）注7)	238 (1,065)	819 (4,601)	1,123 (6,906)

* ( ) 内は秋川流域のみの人口と人口密度.
注1) 昭和53年度平均給水量 注2) 流域外処理が行なわれている 注3) 昭和53年12月現在，原則としてくみ取り式浄化槽のみが許可されているが，一部で吸込み処理が行われている 注4) 昭和54年3月現在，排水を河川放流する場合は三次処理を行ないBODを5mg/l以下とする 注5) 一部に道路側溝を通じ河川放流が行われている 注6) 昭和54年3月現在 注7) 工場数は52年，事業所数は50年現在，特に規模の大きいところはないが，排水を河川放流する場合はBODを5mg/l以下とする.

表 2. 秋川流域における土地利用状況
(54.1.1.現在，単位ha)

	檜原村	五日市町	秋川市	合計
総面積	10,491.4	5,096.0	979.5*	16,566.9
宅地	44.1 (0.4%)	212.0 (4.2%)	182.8 (18.7%)	438.9 (2.6%)
田	0.4 (0.0%)	21.7 (0.4%)	50.5 (5.2%)	94.7 (0.6%)
畑	246.9 (2.4%)	303.2 (5.9%)	201.4 (20.6%)	998.4 (6.0%)
山林	5,257.8 (50.1%)	2,808.0 (55.1%)	175.9 (18.0%)	8,241.7 (49.7%)
原野	631.5 (6.0%)	383.0 (7.5%)	18.3 (1.9%)	1,032.8 (6.2%)
道路	13.2 (0.1%)	74.1 (1.5%)	37.8 (3.9%)	125.1 (0.8%)
その他	4,297.5 (41.0%)	1,293.0 (25.4%)	312.7 (31.9%)	5,903.2 (35.6%)

* 秋川流域のみ，ただし，秋川全市の資料より比例配分した.

スラー法)，亜硝酸性窒素（α-ナフチルアミン・スルファニル酸法)，硝酸性窒素（サリチル酸ナトリウム法)，BOD（ウインクラー法)，COD（$KMnO_4$直火5分法)，リン酸イオン（モリブデン酸アンモニウム法)，硫酸イオン（クロム酸バリウム法)，溶性ケイ酸（モリブデン酸アンモニウム法)，総硬度，カルシウム硬度（EDTA法)，ナトリウム，カリウム（原子吸光法)，鉄（オルトフェナンロリン法)，マンガン(過硫酸アンモニウム法)，大腸菌群数（デスオキシコレート培地法)

流量 各測定点において，水質調査と同時に0.5～1.0m間隔に水深および流速（プロペラ式流速計による）を測定し，河川横断面積と流速より流量を算出した.

結果と考察

1. **流量** 各調査地点における流量（l/s）および比流量（l/km²/s）を**図2**に示す．流量は夏期に多く冬期に少ないが，今回の測定では7月に最大値を，1月に最小値を示し，その差は3～5倍であった．そして，春と秋（5月と11月）はほぼ同じ流量を示し，その値は平均値に近似した．また St.4 と St.8 では流量の減少が認められ，一部伏流しているものと考えられる.

比流量は各調査地点により12.7～18.4l/km²/s の平均値を示し，およそ 5～30l/km²/s の範囲内にあった.

2. **水質とその特徴** 各調査地点における水質の測定結果を**表3**に示す．本川の中・下流部における生活環境に係る環境基準の類型はA（**表4**）であるが，全調査地点において BOD，SS，DO はこの基準を満足している．しかし，大腸菌群数は St.1 を除く全地点で基準の1,000MPN/100ml を超えることがあり，また，pH も下流部の St.7 と St.8 で春と秋に基準を超えている.

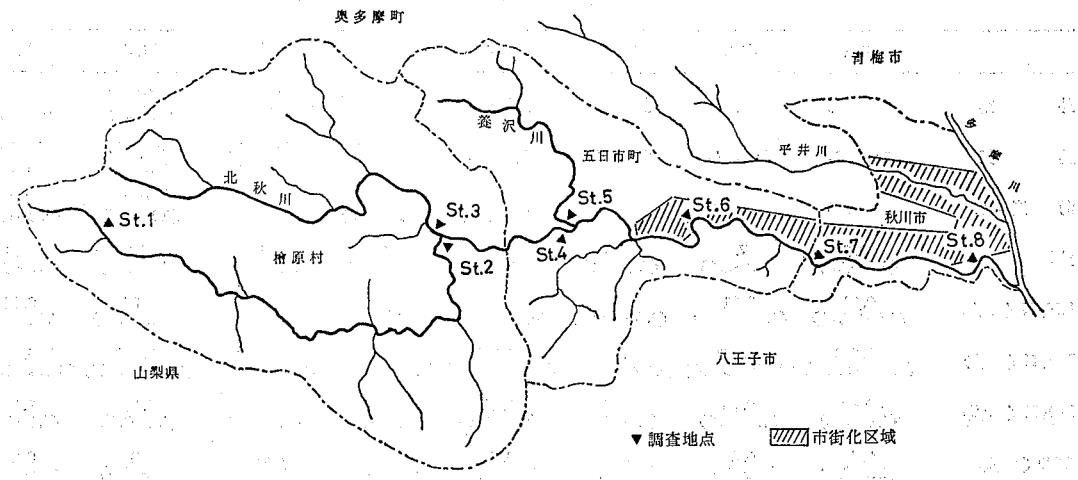


図 1. 秋川流域略図

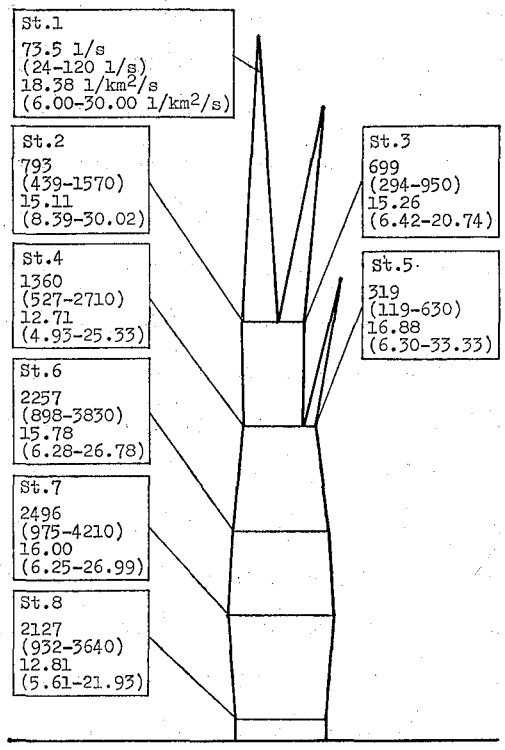


図 2. 流量と比流量

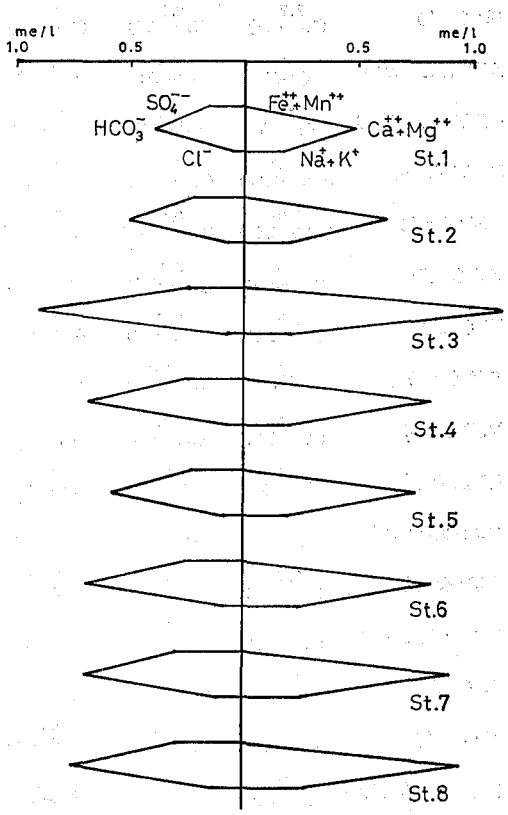


図 3. 各調査地点におけるヘキサダイヤグラム

すなわち，本川の水質は理化学的には比較的良好であるが，細菌学的には汚染が進行しているものと考えられる．

秋川流域は前報[18]で報告した平井川流域と同じく石灰岩地帯であるため，**図3**のヘキサダイヤグラムに示すように，本川の水質は Ca^{2+} と HCO_3^- を主成分とする $Ca(HCO_3)_2$ 型の水質型を示す．特に，St. 3 (北秋川) においては露出石灰岩の影響を受けているため，他の調

表3. 水 質 測 定 結 果

	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	St.6	St.7	St.8
外観	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明～ 殆無色透明	無色透明 ～微白濁	無色透明 ～微白濁	無色透明 ～微白濁
臭気	な し	な し	な し	な し	な し ～微藻臭	な し ～藻 臭	な し ～藻 臭	微藻臭 ～下水臭
濁度 (度)	0	0	0	0.1 (0.0—0.3)	0.1 (0.0—0.5)	0.7 (0.0—3.0)	0.9 (0.1—2.5)	3.3 (1.0—9.0)
pH	7.3 (6.8—7.6)	7.5 (6.9—8.0)	7.8 (7.4—8.2)	7.9 (7.2—8.4)	8.0 (7.6—8.4)	7.9 (7.2—8.4)	8.3 (7.8—8.9)	8.4 (8.0—9.1)
NH_3-N (mg/*l*)	0.01 (0.00—0.02)	0.01 (0.00—0.02)	0.03 (0.01—0.04)	0.01 (0.00—0.04)	0.02 (0.00—0.07)	0.04 (0.02—0.06)	0.04 (0.02—0.05)	0.04 (0.02—0.05)
NO_2-N (mg/*l*)	0.000 (0.000—0.001)	0.001 (0.000—0.003)	0.003 (0.000—0.007)	0.001 (0.000—0.003)	0.004 (0.002—0.007)	0.004 (0.003—0.006)	0.006 (0.004—0.010)	0.011 (0.007—0.018)
NO_3-N (mg/*l*)	0.52 (0.4—0.6)	0.78 (0.6—1.2)	0.94 (0.7—1.4)	0.95 (0.8—1.4)	0.92 (0.8—1.4)	0.97 (0.8—1.4)	1.05 (0.8—1.5)	1.09 (0.9—1.4)
COD (mg/*l*)	0.4 (0.2—0.5)	0.5 (0.4—0.6)	0.4 (0.2—0.6)	0.6 (0.3—1.1)	0.5 (0.4—0.6)	0.6 (0.5—0.8)	0.8 (0.6—1.3)	0.8 (0.6—1.0)
BOD (mg/*l*)	0.3 (0.1—0.6)	0.3 (0.1—0.4)	0.2 (0.0—0.5)	0.4 (0.1—0.6)	0.4 (0.0—0.7)	0.5 (0.1—1.5)	0.8 (0.4—1.3)	0.8 (0.4—1.5)
Cl^- (mg/*l*)	1.7 (1.4—2.1)	2.6 (1.9—2.9)	2.9 (2.1—3.6)	2.8 (2.1—3.9)	3.1 (2.6—3.9)	3.6 (3.1—4.9)	4.2 (3.5—5.3)	4.6 (3.9—6.3)
大腸菌群数 (個/m*l*)	0 (0—2)	18 (2—60)	24 (12—50)	18 (9—25)	22 (4—59)	60 (22—200)	55 (19—110)	25 (4—80)
一般細菌数 (個/m*l*)	14 (0—51)	162 (52—340)	249 (82—550)	228 (110—450)	342 (130—740)	1202 (350—3600)	1175 (260—2300)	644 (62—1500)
MBAS (mg/*l*)	0.00 (0.00—0.02)	0.01 (0.00—0.03)	0.01 (0.00—0.02)	0.01 (0.00—0.02)	0.01 (0.00—0.04)	0.02 (0.00—0.06)	0.03 (0.00—0.08)	0.02 (0.00—0.05)
PO_4^{3-} (mg/*l*)	0.02 (0.01—0.04)	0.05 (0.03—0.08)	0.07 (0.04—0.09)	0.06 (0.04—0.09)	0.07 (0.04—0.09)	0.09 (0.06—0.15)	0.12 (0.06—0.23)	0.10 (0.05—0.13)
Na^+ (mg/*l*)	3.5 (2.9—3.9)	4.1 (3.7—4.4)	4.2 (3.9—4.6)	4.2 (3.9—4.5)	3.8 (3.5—4.0)	5.0 (4.4—5.4)	5.4 (4.9—5.8)	5.6 (5.1—5.9)
K^+ (mg/*l*)	0.5 (0.4—0.6)	0.7 (0.5—0.8)	0.8 (0.5—1.1)	0.7 (0.5—0.8)	0.6 (0.5—0.8)	0.9 (0.6—1.0)	1.0 (0.7—1.1)	1.1 (1.0—1.2)
Ca^{2+} (mg/*l*)	8.1 (6.8—9.2)	10.5 (8.8—12.4)	13.4 (16.4—21.6)	13.7 (12.0—15.2)	12.5 (10.8—14.0)	13.9 (12.4—15.6)	14.9 (12.8—17.2)	15.5 (14.0—16.8)
Mg^{2+} (mg/*l*)	1.0 (0.5—1.5)	1.2 (0.2—1.9)	2.4 (1.2—4.4)	1.7 (1.0—2.7)	1.6 (1.2—2.4)	1.6 (1.2—1.9)	1.9 (1.2—2.7)	2.1 (1.7—2.7)
総硬度 (mg/*l*)	24 (23—25)	31 (28—33)	56 (49—66)	42 (37—44)	38 (35—40)	41 (36—44)	45 (39—48)	48 (42—51)
アルカリ度 (mg/*l*)	20 (18—23)	25 (21—27)	45 (40—47)	34 (28—36)	29 (26—31)	34 (28—40)	35 (29—38)	37 (31—39)
SO_4^{2-} (mg/*l*)	7.7 (6.2—9.0)	10.7 (8.5—12.0)	12.0 (7.6—14.5)	11.7 (10.0—13.5)	10.9 (6.6—13.0)	12.6 (10.5—14.0)	14.2 (11.5—15.5)	14.6 (12.0—16.0)
溶性ケイ酸 (mg/*l*)	9.9 (7.3—13.2)	10.4 (7.8—13.7)	8.4 (6.6—10.9)	9.5 (7.1—13.6)	7.8 (6.5—9.3)	9.1 (6.9—11.7)	8.9 (6.6—11.3)	8.5 (6.3—10.2)
Fe (mg/*l*)	0.04 (0.01—0.05)	0.02 (0.00—0.04)	0.03 (0.01—0.05)	0.01 (0.00—0.04)	0.02 (0.00—0.04)	0.05 (0.01—0.11)	0.07 (0.03—0.13)	0.14 (0.04—0.22)
Mn (mg/*l*)	0.00 (0.00—0.01)	0.00 (0.00—0.01)	0.00 (0.00—0.01)	0.00 (0.00—0.01)	0.00 (0.00—0.01)	0.00 (0.00—0.01)	0.01 (0.00—0.02)	0.01 (0.00—0.02)
蒸発残留物 (mg/*l*)	54 (36—70)	70 (53—88)	92 (70—119)	82 (69—101)	75 (54—100)	82 (75—94)	90 (78—99)	92 (86—99)
導電率 ($\mu\sigma$/cm)	71 (65—75)	90 (83—95)	137 (127—145)	112 (98—120)	105 (95—110)	118 (103—127)	127 (111—136)	135 (123—145)
DO (mg/*l*)*	9.9 (80%)	10.3 (87%)	10.5 (91%)	9.9 (87%)	11.3 (101%)	9.7 (95%)	9.9 (95%)	10.0 (98%)

平均値，（ ）内は最小値—最大値

＊DOは第6回調査時（54.3.22）のみ測定した。

査地点に比べ，主成分量が高い．しかし，本川流域では平井川流域でみられたような砕石場やセメント工場は少なく，これらの排水の影響をほとんど受けていないため，全体的には溶存成分量はかなり少ない．

表 4. 環境基準

生活環境に係る環境基準（類型A）	
pH	6.5～8.5
BOD	2ppm以下
SS	25ppm以下
DO	7.5ppm以上
大腸菌群数	1,000MPN/100ml以下

3. 流入排水量と汚濁負荷量 表1に示した汚濁要因の中で直接河川水に影響を及ぼすものは浄化槽排水，事業所排水，家庭雑排水の一部である．今，仮に，流域人口1人1日当りの平均給水量から，排水量を250l/人/日とし，各調査地点におけるこれら排水量の河川流量に対する割合を算出すると，上流部のSt. 2～St. 5では0.5～1.0%，下流部のSt. 6～St. 8では2～6%となる．しかし，実際には，これら排水の大部分は吸込み処理あるいは流域外処理が行なわれているため，直接河川水に影響を与える量はこの10分の1以下と思われる．汚濁河川における排水流入量が河川流量の20%以上を占めること[6]

表 5. 各調査地点における汚濁負荷量（平均値）

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8
BOD	1.83	20.55	11.56	47.00	11.02	97.50	137.5	126.5
COD	2.52	34.26	23.12	70.50	13.78	117.0	185.9	148.2
NH_3-N	0.04	0.69	1.73	1.18	0.55	7.80	7.38	6.59
NO_2-N	0.003	0.07	0.17	0.12	0.11	0.78	1.30	1.87
NO_3-N	3.22	53.44	54.33	111.6	25.36	189.2	238.2	202.5
Cl^-	10.74	178.1	167.6	329.0	85.44	702.0	849.3	796.6
Na^+	22.54	280.9	242.8	493.5	104.7	975.0	1,146	1,008
Ca^{2+}	50.82	719.4	1,064	1,610	344.5	2,711	3,090	2,789
PO_4^{3-}	0.12	3.43	4.05	7.05	1.93	17.55	23.51	17.03
MBAS	0.007	0.69	0.58	1.18	0.28	3.90	3.40	2.78
大腸菌群数*	0.35	120	140	210	61	1,200	1,200	380
一般細菌数*	13.1	1,100	1,400	2,700	940	23,000	27,000	16,000

単位 kg/day，*印は$\times 10^{10}$個/day

表 6. 単位面積当りの汚濁負荷量（平均値）

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 2 + St. 3	St. 4	St. 5	St. 4 + St. 5	St. 6	St. 7	St. 8
BOD	0.46	0.39	0.25	0.33	0.44	0.58	0.46	0.68	0.88	0.76
COD	0.63	0.65	0.50	0.58	0.66	0.73	0.67	0.82	1.19	0.89
NH_3-N	0.010	0.013	0.038	0.025	0.011	0.029	0.014	0.055	0.047	0.040
NO_2-N	0.001	0.001	0.004	0.002	0.001	0.006	0.002	0.005	0.008	0.011
NO_3-N	0.81	1.02	1.19	1.10	1.04	1.34	1.09	1.32	1.53	1.22
Cl^-	2.69	3.39	3.66	3.52	3.07	4.25	3.29	4.91	5.44	4.80
Na^+	5.64	5.35	5.30	5.33	4.61	5.54	4.75	6.82	7.35	6.07
Ca^{2+}	12.7	13.7	23.2	18.1	15.1	18.2	15.5	19.0	19.8	16.8
PO_4^{3-}	0.03	0.07	0.09	0.08	0.07	0.10	0.07	0.12	0.15	0.10
MBAS	0.002	0.013	0.013	0.013	0.011	0.015	0.012	0.027	0.022	0.017
大腸菌群数*	0.09	2.29	3.06	2.64	1.96	3.23	2.15	8.4	7.7	2.3
一般細菌数*	3.3	21	31	25	25	50	29	161	173	96

単位 kg/km²/day，*印は$\times 10^{10}$個/km²/day

表 7. 各調査地点における単位面積当りの負荷量と比流量の相関係数

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8	AVE.
Na^+	0.98**	0.99**	1.00**	1.00**	1.00**	0.99**	0.99**	1.00**	0.994**
Ca^{2+}	0.98**	0.97**	0.99**	0.98**	0.99**	1.00**	0.98**	0.99**	0.985**
K^+	0.97**	0.97**	0.94**	0.99**	0.98**	0.99**	0.99**	1.00**	0.979**
蒸発残留物	0.96**	0.98**	0.95**	0.99**	0.98**	0.98**	0.99**	1.00**	0.979**
SO_4^{2-}	0.96**	0.95**	0.87*	0.99**	0.97**	0.98**	0.96**	0.97**	0.956**
COD	0.96**	0.98**	0.96**	0.93**	0.98**	0.98**	0.91*	0.95**	0.956**
Cl^-	0.92**	0.97**	0.82*	0.97**	0.98**	0.98**	0.97**	0.98**	0.949**
アルカリ度	0.96**	0.98**	0.99**	0.97**	0.63	0.95**	0.97**	0.97**	0.928**
溶性ケイ酸	0.85*	0.92**	0.91*	0.92**	0.95**	0.92**	0.93**	0.93**	0.916*
NO_3-N	0.91*	0.80	0.80	0.93**	0.94**	0.92**	0.92**	0.94**	0.895*
Mg^{2+}	0.70	0.84*	0.67	0.94**	0.96**	0.84*	0.90*	0.91*	0.849*
PO_4^{3-}	0.72	0.82*	0.68	0.93**	0.96**	0.72	0.59	0.79	0.776
一般細菌数	0.85*	0.98**	0.81	0.74	0.93**	0.32	0.63	0.89*	0.769
NO_2-N	0.34	−0.11	0.57	0.83*	0.74	0.92**	0.67	0.64	0.575
Fe	0.82*	0.90*	0.78	−0.41	−0.19	0.55	0.83*	0.79	0.509
NH_3-N	−0.46	−0.39	0.77	0.25	0.70	0.86*	0.78	0.79	0.413
大腸菌群数	0.69	0.14	0.12	0.85*	0.74	−0.18	0.54	0.32	0.403
BOD	−0.02	0.03	0.06	−0.30	0.43	−0.06	0.29	0.56	0.124
MBAS	−0.73	−0.32	−0.21	−0.19	−0.68	−0.21	−0.47	−0.28	−0.386

n=6, ** $p<0.01$, * $p<0.05$

が多いことを考慮すると，本川の河川流量に対する排水量の割合はきわめて少ないといえる．

また，河川水に影響を与える汚濁物質には上記流入排水による場合の他に，間接的な汚濁要因として，吸込み処理された雑排水およびし尿浄化槽排水，農地に施された肥料などがある．**表5**に各調査地点における汚濁負荷量を，**表6**に単位面積当りの汚濁負荷量を示したが，人為汚濁の少ない St. 1～St. 5 に比べ，五日市町の市街地を通過する St. 6 より下流でこれら負荷量は急激に増加している．たとえば，St. 4 と St. 5 の負荷量合量に比べ，St. 6 の負荷量は一般細菌数 6.3 倍，大腸菌群数4.9倍，NH_3-N 4.5倍，NO_2-N 3.4倍，MBAS 2.7倍，PO_4^{3-} 2.5倍，BOD 1.7倍など大幅な増加がみられる．同様に，単位面積当りの負荷量では一般細菌数 5.6 倍，大腸菌群数 3.9倍，NH_3-N 3.9倍，NO_2-N 2.5倍，MBAS 2.3倍，PO_4^{3-} 1.7倍，BOD 1.5倍となっている．

4. 自然汚濁と人為汚濁 本川のように比較的清浄な河川の汚濁状況を把握するためには，自然汚濁と人為汚濁の両面を考慮しなければならない．**表7**に各調査地点ごとの単位面積当りの負荷量と比流量の相関係数を示した．先に述べたように，この河川における生活排水の流入量は極めて少ない．従って，この相関係数の高い成分は人為汚濁を含めた土壌起源によるものと考えられ，逆に，相関性が低いか負相関を示す成分は排水などの流入による人為汚濁の強い成分と考えられる．前者にはNa^+，Ca^{2+}，K^+，蒸発残留物，SO_4^{2-}，アルカリ度，溶性ケイ酸などがあるが，人為汚濁の指標とされる COD，Cl^-，NO_3-N，PO_4^{3-}，一般細菌数にも相関性が認められる．また，後者の例としては MBAS，BOD，大腸菌群数，NH_3-N，NO_2-N などがある．

前者の相関性の高い成分については，単位面積当りの負荷量と比流量の回帰直線を求め**表8**に示した．これらの成分の中で溶性ケイ酸のみは St. 1 から St. 8 までの全地点で比流量に対する単位面積当りの負荷量は近似し，人為汚濁による影響は認められていない．しかし，この他の成分では比流量に対する負荷量は流下と共に増大し，明らかに人為汚濁による影響が認められている（**図4**）．そして Ca^{2+}，アルカリ度などのように地殻影響が強く，St. 3（北秋川）における負荷量が高い成分以外は St. 1 における回帰直線を本川の自然汚濁負荷量とすることが可能と思われる．Na^+，Cl^-，NO_3-N，COD，PO_4^{3-} について，St. 1 における回帰直線を自然汚濁負荷量として，本川下流部（St. 6–St. 8）の人為汚濁による負荷量の割合を求めると Na^+ は約30%，Cl^- と NO_3-N は約

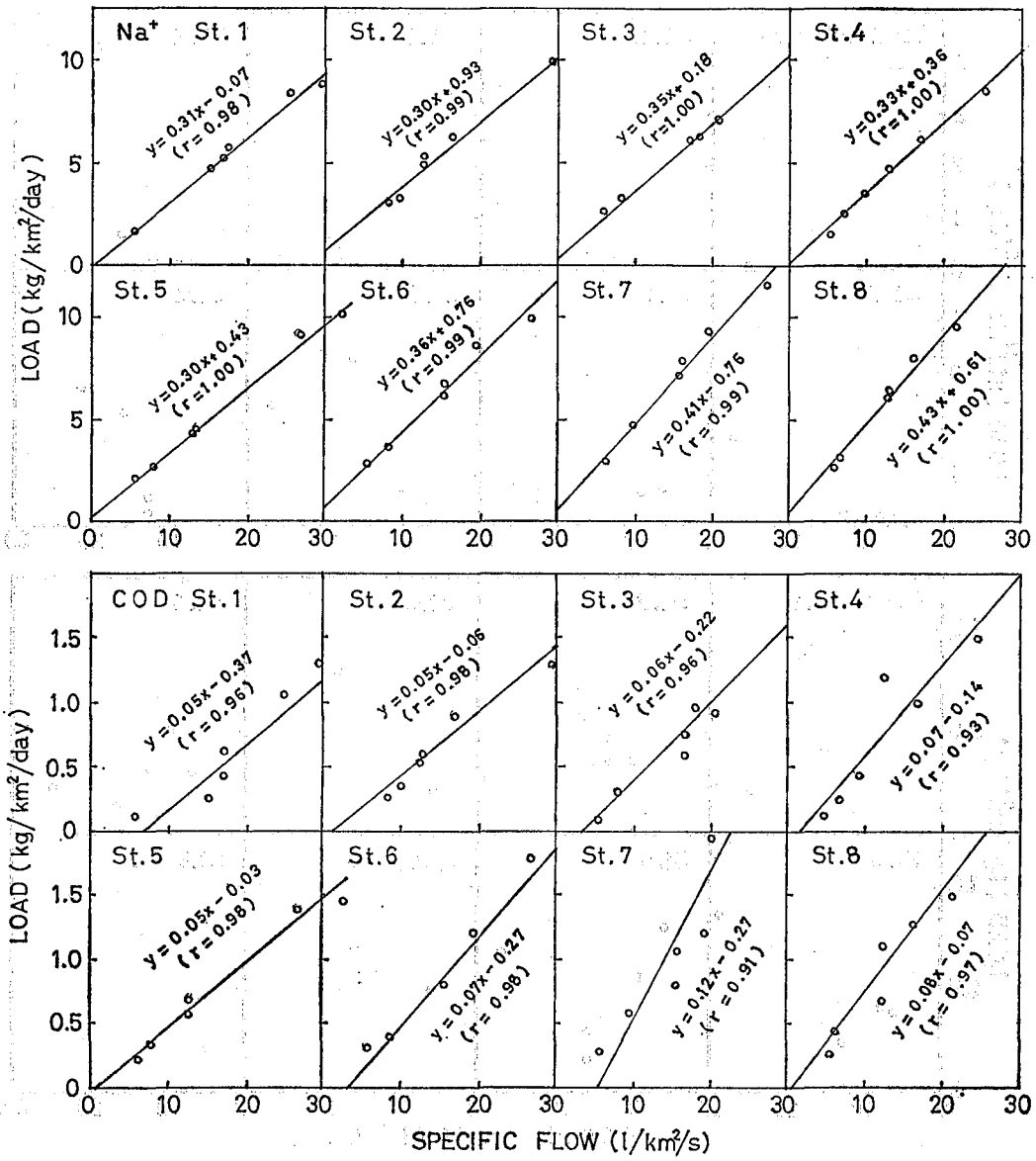


図 4. 比流量と負荷量の相関図(1)

50%，COD は約60%，PO_4^{3-} は約70%となる．また，一般細菌数については St. 1，St. 2，St. 5 および St. 8 で比流量と負荷量の間に相関性が認められ，St. 1 における回帰直線 $L=0.55Q_A-6.82$ が自然汚濁による負荷量（L，$\times 10^{10}$個 /km²/day）と考えられる（但し，Q_A は比流量，l/km²/s）．しかし，この値は**図 5** 一上に示されるように，他の調査地点に比べかなり小さな値であるため，他の調査地点で検出される一般細菌数の大部分は人為汚濁によるものと思われる．

次に，後者の相関性の認められない成分の中で，MBAS，大腸菌群数，NH_3-N，NO_2-N は St. 1 における測定値が定量限界以下の場合が多く，自然汚濁による負荷はほとんどないものと考えられる．しかし，BOD については St. 1 における負荷量が認められ，自然汚濁による負荷があるものと思われる．洞沢[14]，芦部ら[15]，安田[16]は BOD の自然汚濁負荷量は比流量と相関し，それぞ

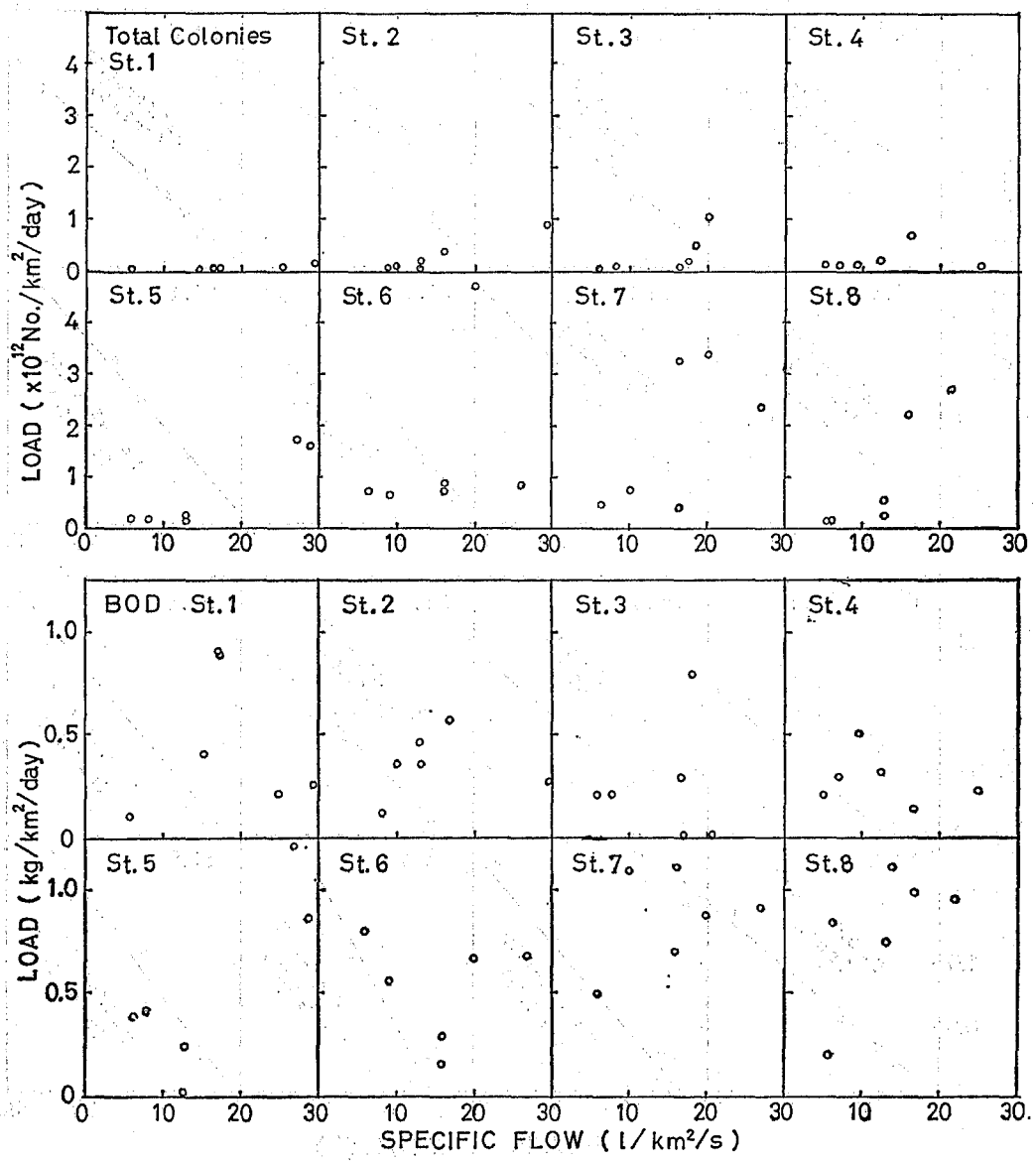


図 5. 比流量と負荷量の相関図(2)

れ，L=0.06Q_A（山形県諸河川上流部），L=0.0718Q_A−0.1354（千葉県印旛沼，手賀沼流域），L=0.064Q_A−0.2（兵庫県六甲山水系）を与えているが，本川のSt.1における BOD 負荷量は比流量との相関が認められなかった（図5一下）．これはおそらく，彼らが自然汚濁による平常流量時の BOD 濃度はそれぞれの場所により 0.44～0.8mg/l としているのに対し，本川の上流部の BOD 濃度は 0.2～0.3mg/l でこの値が小さく，定量限界以下の場合が多いことおよび n (n=6) が小さいためと考えられる．よって，本川の BOD 負荷量の人為汚濁による割合を求めるため，表6に示した単位面積当りの平均負荷量を用いた．すなわち，比流量の平均値は調査地点により 13～18l/km²/s とやや開きがあるが，St.1における単位面積当りの平均負荷量を自然汚濁による負荷量とすると，上流部の St.2，St.3，St.4 では人為汚濁による負荷量は認められず，St.5（養沢川）と下流部の St.6，St.7，St.8 でそれぞれ 2.27kg/day，31.5kg/day，65.5kg/day，49.8kg/day の人為汚濁による負荷

表 8.　各調査地点における単位面積当りの負荷量と比流量の回帰直線

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6	St. 7	St. 8
Na^+	y=0.31x−0.07	y=0.30x+0.93	y=0.35x+0.18	y=0.33x+0.36	y=0.30x+0.43	y=0.36x+0.76	y=0.41x−0.76	y=0.43x+0.61
Ca^{2+}	y=0.71x−0.37	y=0.72x+2.37	y=1.33x+3.10	y=1.01x+1.74	y=1.01x+0.86	y=0.98x+2.53	y=1.03x+3.32	y=1.17x+1.79
K^+	y=0.04x−0.03	y=0.06x−0.04	y=0.09x−0.25	y=0.07x−0.11	y=0.06x+0.01	y=0.08x−0.14	y=0.10x−0.16	y=0.11x−0.11
蒸発残留物	y=5.85x−16.9	y=7.20x−14.8	y=9.05x−13.0	y=9.45x+2.40	y=9.15x−21.2	y=7.30x−5.01	y=8.81x−14.2	y=8.80x−7.48
SO_4^{2-}	y=0.59x−1.20	y=0.63x+3.83	y=0.80x+2.77	y=0.81x+1.95	y=0.95x−0.36	y=0.84x+2.91	y=0.94x+3.83	y=0.99x+2.88
COD	y=0.05x−0.37	y=0.05x−0.06	y=0.06x−0.22	y=0.07x−0.14	y=0.05x−0.03	y=0.07x−0.27	y=0.12x−0.72	y=0.08x−0.07
Cl^-	y=0.14x+0.13	y=0.24x−0.33	y=0.23x+0.25	y=0.18x+0.54	y=0.27x+0.05	y=0.25x+0.60	y=0.27x+1.18	y=0.29x+1.05
アルカリ度	y=1.67x+0.95	y=1.62x+6.79	y=3.52x+4.49	y=2.36x+5.93	y=2.28x+3.18	y=2.36x+8.29	y=2.46x+6.96	y=2.69x+5.72
溶性ケイ酸	y=0.66x+3.41	y=0.55x+4.47	y=0.65x+1.12	y=0.57x+2.62	y=0.63x+0.67	y=0.64x+1.90	y=0.66x+1.65	y=0.66x+0.98
NO_3-N	y=0.04x+0.13	y=0.05x−0.21	y=0.09x−0.06	y=0.09x−0.06	y=0.09x−0.13	y=0.09x−0.15	y=0.11x−0.29	y=0.10x−0.04
Mg^{2+}	y=0.07x+0.24	y=0.11x−0.07	y=0.13x+0.97	y=0.16x	y=0.12x+0.26	y=0.10x+0.44	y=0.16x+0.17	y=0.14x+0.44
PO_4^{3-}	y=0.0018x+0.003	y=0.0023x+0.02	y=0.0042x+0.02	y=0.0037x+0.02	y=0.0058x+0.004	y=0.0044x+0.04	y=0.0055x+0.06	y=0.0065x+0.002
一般細菌数*	y=0.55x−6.82	y=4.08x−34.8	—	—	y=6.57x−45.8	—	—	y=16.5x−117

y：単位面積当りの負荷量（kg/km²/day，＊一般細菌数は×10^{10}個/km²/day），x：比流量（l/km²/s）

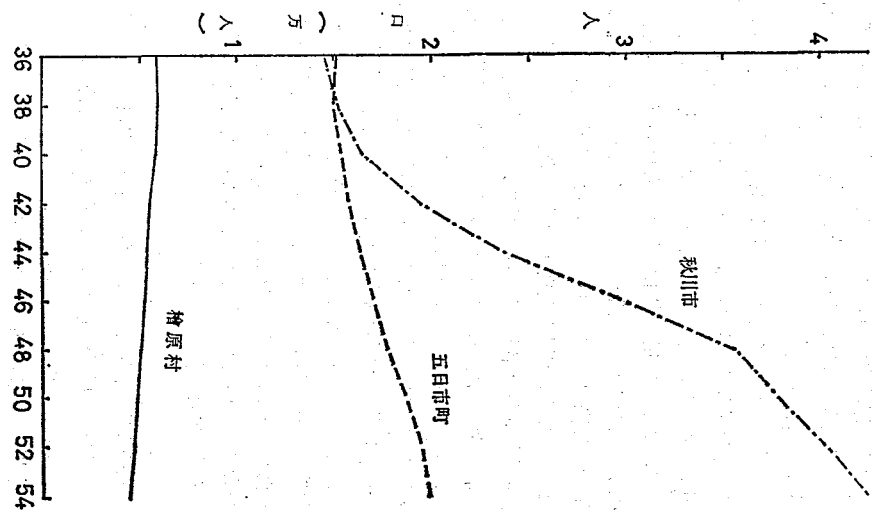


図 6.　秋川流域における人口の推移

量が認められた．これはBOD負荷量のそれぞれ20.5%，32.3%，47.6%，39.4%に相当する．

5. 将来予測と対策　秋川流域の三市町村の人口は図6に示すように，檜原村では過疎化の傾向があるのに対し，五日市町および秋川市で昭和40年代から増加が認められ，特に，秋川市ではその増加が著しい．また，この河川の上・中流部は秋川渓谷として知られる観光地であり，最上流部には有料観光道路もあるため，観光客の増加にも著しいものがある．東京都の流域下水道計画によると，五日市町および秋川市には昭和60年代に下水道が完備する予定であるが，その間の確固たる対策が必要と思われる．現在のところ，東京都および流域市町村などの指導により，生活排水の河川放流は原則として禁止されており，合併式浄化槽排水，事業所排水などは三次処理を行ない BOD 値として 5mg/l 以下としなければ，直接河川放流は許可されていない．このため，秋川の水質は現在のところ比較的良好に保持されている．しか

し，近時，流域住民のし尿は汲み取り式から次第に浄化槽式（汲み取り式浄化槽のみが許可されているが，一部吸込み処理が行なわれている）に変りつつあること，団地，事業所，福祉施設などの建設に伴う合併式浄化槽の増加，家庭雑排水の道路側溝を通じての河川放流など，河川水に対する汚濁負荷要因は増大する一方である．ちなみに，同じ多摩川の支川であり，人口30万人を超える八王子市内を流れ，生活排水，産業排水の流入する汚濁河川である浅川，谷地川，大栗川の BOD 負荷量[19]をもとに，八王子市民1人当りの年間負荷量を算出すると，3.31kg/人/年となるが，秋川では，自然汚濁負荷量を除いた人為汚濁による BOD 負荷量は 1.19kg/人/年となり，前者の約3分の1に相当する．

和田[20]は人口集積が進むほど汚濁物質の発生は大となり，それに伴う汚濁の流出量も大となることを指摘している．今後，この河川流域の人口増加と共に汚濁負荷量は急速に増加するものと予測される．故に，本川の汚濁化を防止するためには，少なくとも，現在の汚濁負荷量を増大させないよう現在実行されている汚濁防止対策の完全な実施が必要と思われる．

結　論

東京の多摩地区を貫流する多摩川の一支川であり，清流として知られる秋川について，その水質と汚濁状況について調査し，以下の結論を得た．

(1)本川の水質は理化学的には良好で，BOD，COD，NH_3-N，MBAS などは全調査地点で比較的低い値を示す．しかし，大腸菌群数は多くの地点で本川の生活環境に係る環境基準（類型A）を超え，細菌学的には汚染が進行しているものと思われる．

(2)本川の上流部は石灰岩地帯であるため，河川水の主成分は Ca^{2+} と HCO_3^- であり，$Ca(HCO_3)_2$ 型の水質型を示す．

(3)本川の上流部から中流部にかけては山岳地帯であり，人口密度も50人/km^2 以下であるので，汚濁負荷量のほとんどは自然汚濁によるものと考えられる．しかし，中流部から下流部にかけては人口密度も高くなり，人為汚濁による負荷量の割合は次第に高くなっている．

(4)本川下流部（St. 6，St. 7，St. 8）の汚濁負荷量で人為汚濁による割合は Na^+，Cl^-，NO_3-N，COD，PO_4^{3-} でそれぞれおよそ30%，50%，50%，60%，70%であった．

(5)本川における BOD の自然汚濁による平常流量時の濃度は 0.2～0.3mg/l と考えられ，上流部（St. 2，St. 3，St. 4）においては人為汚濁による負荷は認められない．しかし，下流部（St. 6，St. 7，St. 8）では BOD 負荷量の20～50%が人為汚濁によるものと考えられる．

(6)本川の自然汚濁による負荷量の回帰直線は次式によって与えられる．

Na^+	$L=0.31Q_A-0.07$
K^+	$L=0.04Q_A-0.03$
COD	$L=0.05Q_A-0.37$
Cl^-	$L=0.14Q_A+0.13$
NO_3-N	$L=0.04Q_A+0.13$
PO_4^{3-}	$L=0.0018Q_A+0.003$

但し，L：自然汚濁負荷量(kg/km^2/day)

Q_A：比流量 (l/km^2/s)

(7)本川下流部の流域住民の河川水に及ぼす BOD 負荷量は 1.19kg/人/年であるが，これは附近の人口30万都市内を流れる汚濁河川流域住民の BOD 負荷量の約3分の1に相当する．

今後，本川流域人口の増加と生活様式の近代化に伴い，本川に対する汚濁負荷量は急速に増加するものと予測される．本川の汚濁化防止のためには，現在の汚濁負荷量を増大させないよう，生活排水の直接放流の禁止など現在実行されている関係機関の汚濁防止対策を完全に実施することが必要と思われる．

謝辞　本調査にあたり，多数の資料を提供して下さいました檜原村役場，五日市役場，秋川市役所および東京都多摩公害事務所の方々に深謝いたします．

参考文献

1) 和田安彦：第13回水質汚濁研究会年次学術講演集，73，1979
2) 金井待二，渋谷和美，若狭喜作：第13回水質汚濁研究会年次学術講演集，43，1979
3) 田中良春，大輪日出夫，上原秀夫，小倉紀雄：水処理技術，19，43，1978
4) 長沢幹雄：水，10，81，1978
5) 小林節子，鎌田　巧，小倉久子，中島　淳，三好洋：公害と対策，14，46，1979
6) 小林節子，鎌田　巧，小倉久子，中島　淳，三好洋：公害と対策，14，203，1979
7) 小倉紀雄：第11回水質汚濁に関するシンポジウム講演集，27，1977
8) 木全　務，賀田野守夫：用水と廃水，19，103，1977
9) 那須義和：第8回水質汚濁に関するシンポジウム講演集，31，1974
10) 植木　肇，太田原幸人：水処理技術，19，335，1978
11) 海老瀬潜一，宗宮　功，大楽尚史：第12回水質汚濁に関するシンポジウム講演集，111，1978
12) 和田安彦，中山不二雄，児島　猛：用水と廃水，

18, 179, 1976
13) 和田安彦，中山不二雄，児島 猛：用水と廃水，18, 312, 1976
14) 洞沢 勇：用水と廃水，15, 1327, 1973
15) 芦部良生 他：第12回下水道研究発表会講演集，1975
16) 和田安彦：用水と廃水，20, 438, 1978
17) 山本荘毅：水，16 (6), 28, 1974
18) 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：東京衛研年報，29-1, 374, 1978
19) 八王子市環境部公害対策課：八王子市公害の概要，33, 1977
20) 和田安彦：下水道協会誌，13 (144), 2, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **30**-1, 238-242, 1979

多摩地区浅層地下水の動向（第4報）　小平市における定点調査

矢口久美子*, 大橋則雄*, 藤沢正吉*, 友成正臣*

Qualitative Evaluation on Well Waters Collected in Tama District of Tokyo (IV) Monitor Research in Kodaira City

KUMIKO YAGUCHI*, NORIO OHASHI*, MASAYOSHI FUJISAWA* and MASAOMI TOMONARI*

Keywords: 多摩 Tama, 地下水汚染 groundwater contamination

まえがき

生活廃水による地下水の汚染は，古くから知られている．多摩地区においても1965年前後の都市化の波を境にして急速に人口増加が進み，それに伴って地下水汚染も進んできた．

我々は，汚染の実体を把握し情報を提供することは，水行政上必要なことと考え，1968年より井水の水質試験依頼検体による調査結果を報告してきた．1報において当地区の地形とそれより推察される浅層地下水の形態を示し，その水質は地形，地質よりも供給源に依存し，人間の生活廃水が変遷の主な原因であることを報告した[1]．2報では汚染の拡散と規模にふれ[2]，3報で若干の数的処理を行った[3]．

しかし，近年上水道の普及に伴って検査の依頼に地域差が生じ，依頼検体だけでは適正な解析ができなくなってきた．そこで，多摩地区において最も普遍的な武蔵野礫層に帯水層をもつ小平市に定点を設け，1973年より定期的な調査を行ったので報告する．

地　形

小平市は多摩地区武蔵野面のほぼ中央に位置し，地形的には青梅街道を境として北側は東北方面に，南側は東南方向に傾斜し，平均勾配はそれぞれ1/200，1/270で[4]，地下水の流れもほぼこれに沿うものと思われる．また，全域の地下水位はほとんど10±2mぐらいである[5]．

調査方法および項目

小平市全域にわたって，民間井戸67井を定点とした．季節要因による変動をできるだけ避けるために，冬期を調査時期とし，1973年より1978年にかけて年に1回継続調査を行った．

調査項目は既報との比較のため，飲料適否試験項目を行ったが，生活廃水による汚染を最も特徴的に表わす因子として塩素イオン[6]を，これに伴う二次的なものとして総硬度を指標とした．塩素イオンは上水試験方法（1970年版）の硝酸銀法，総硬度はEDTA法により測定した．

結果および考察

1. 経年変化

調査期間中，年度による水質の差があるかどうかを検定するために，塩素イオンと総硬度について分散分析を行った．塩素イオンの分散比は20.90，総硬度は32.77であった．塩素イオン，総硬度の両方について，有意水準1％以下で有意差を認めた．その差がどのように表われているかを知るために，各年度におけるそれぞれの平均値と平均の95％信頼区間とを図1に示す．

1973年から1978年にかけて，塩素イオンの平均値は24.3mg/*l* から 32.0mg/*l* に，総硬度は 89mg/*l* から103mg/*l* に増加している．これを73年度を100とする指数で表わすと，それぞれ131.7，115.7になる．次に，さらに長期間の変遷をみるために前報における測定値[3]と比較してみた．73年度の定点として選んだ井水と，依頼検体の平均値とを比較した．依頼検体の塩素イオンの平均値は 23.5mg/*l*，総硬度は 89mg/*l* である．どちらの成分も定点観測の平均値の95％信頼区間の中に依頼検体の平均値が含まれる．これにより依頼検体も定点観測の井水も同じ集団に属しているとみなした．そこで前報における測定値[3]より，1968年から1973年までの増加率を求めてみた．1968年を100とした指数で表わす．塩素イオンの平均値は17.3mg/*l*から23.5mg/*l* に増加し，その指数は135.8である．総硬度は 70mg/*l* から 89mg/*l* に増え，指数は127.9である．73年を境とした前後6年間の増加率はほぼ等しい値を示す．10年という長時間の単位で汚染の進行をみると，汚染は一次直線の型で進んで

* 東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町 3—16—25
* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

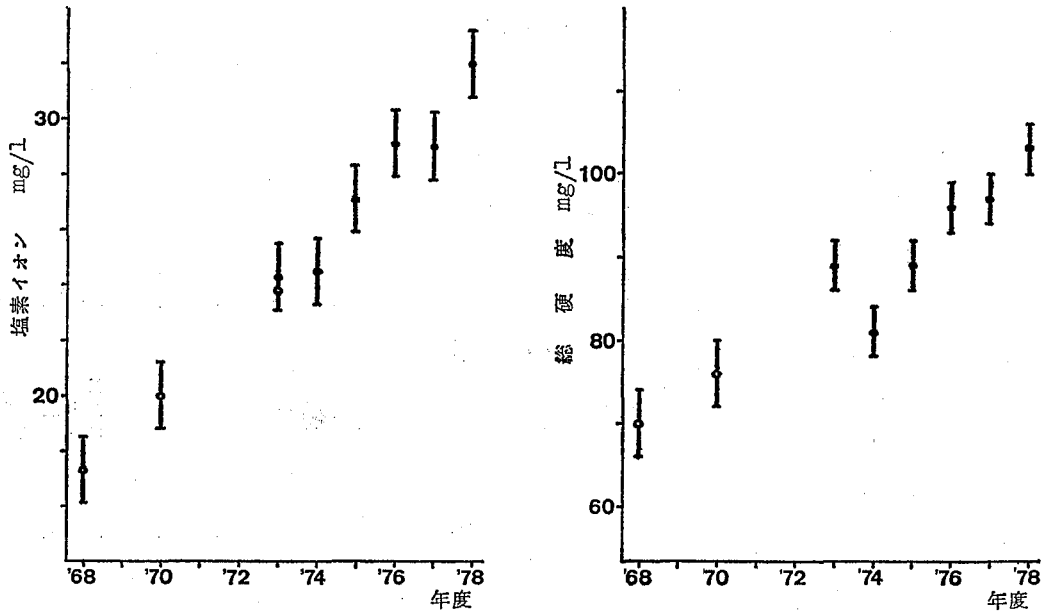


図 1.　塩素イオンと総硬度の年度別平均値と平均値の95%信頼区間
○：依頼検体より得た平均値
●：定点より得た平均値

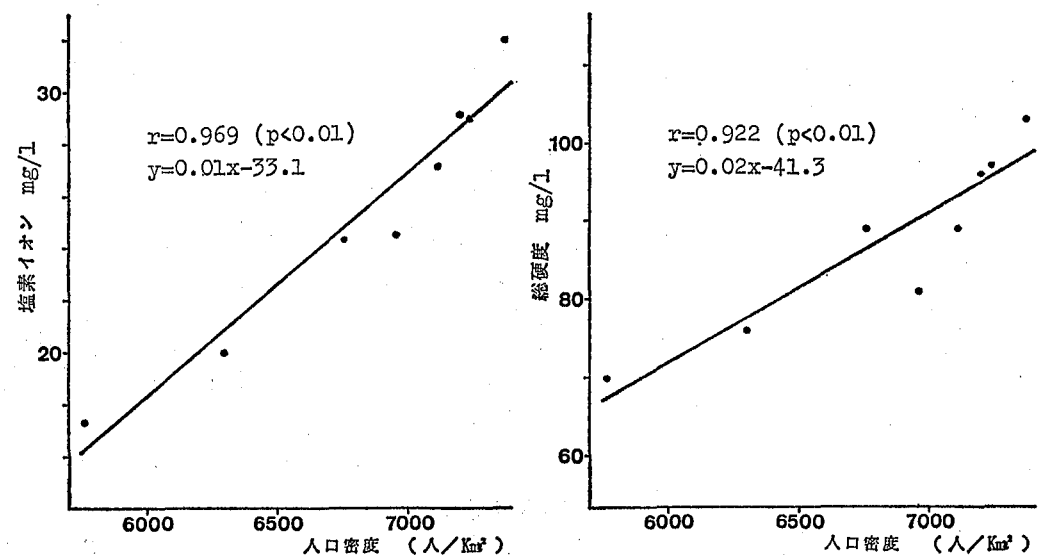


図 2.　塩素イオンおよび総硬度と人口密度との関係

表 1.　年度別塩素イオンと総硬度の相関

年度	1973	1974	1975	1976	1977	1978
相関係数	0.20	0.47**	0.65**	0.66**	0.87**	0.67**

**：$p<0.01$

いるようである．

2.　人口増加と汚染との関連

当地区には，ブリジストンタイヤ工場と日立武蔵工場がある．ブリジストンの工場および生活廃水は処理され，専用の水路を通って黒目川に放流されている．日立

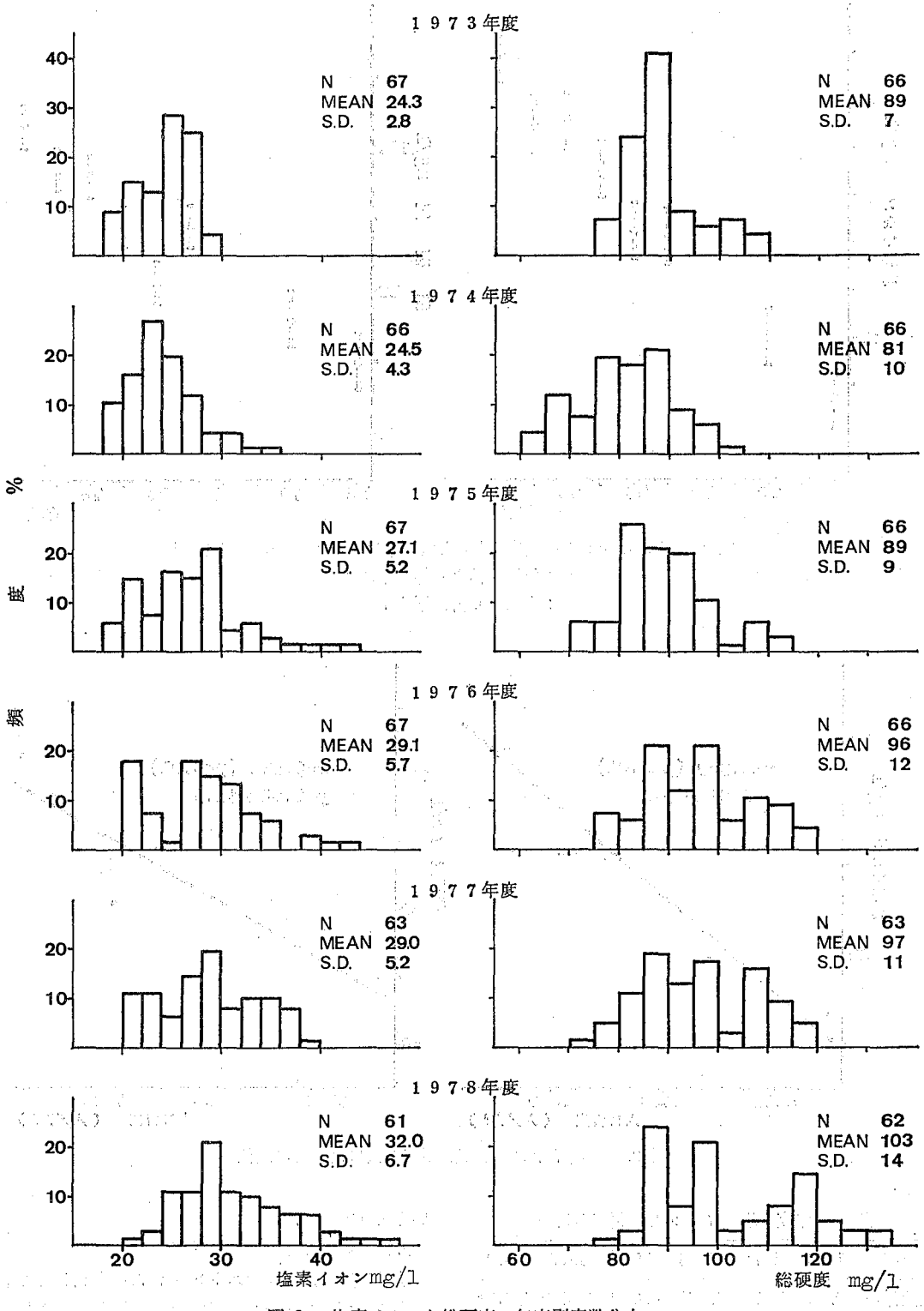


図 3. 塩素イオンと総硬度の年度別度数分布

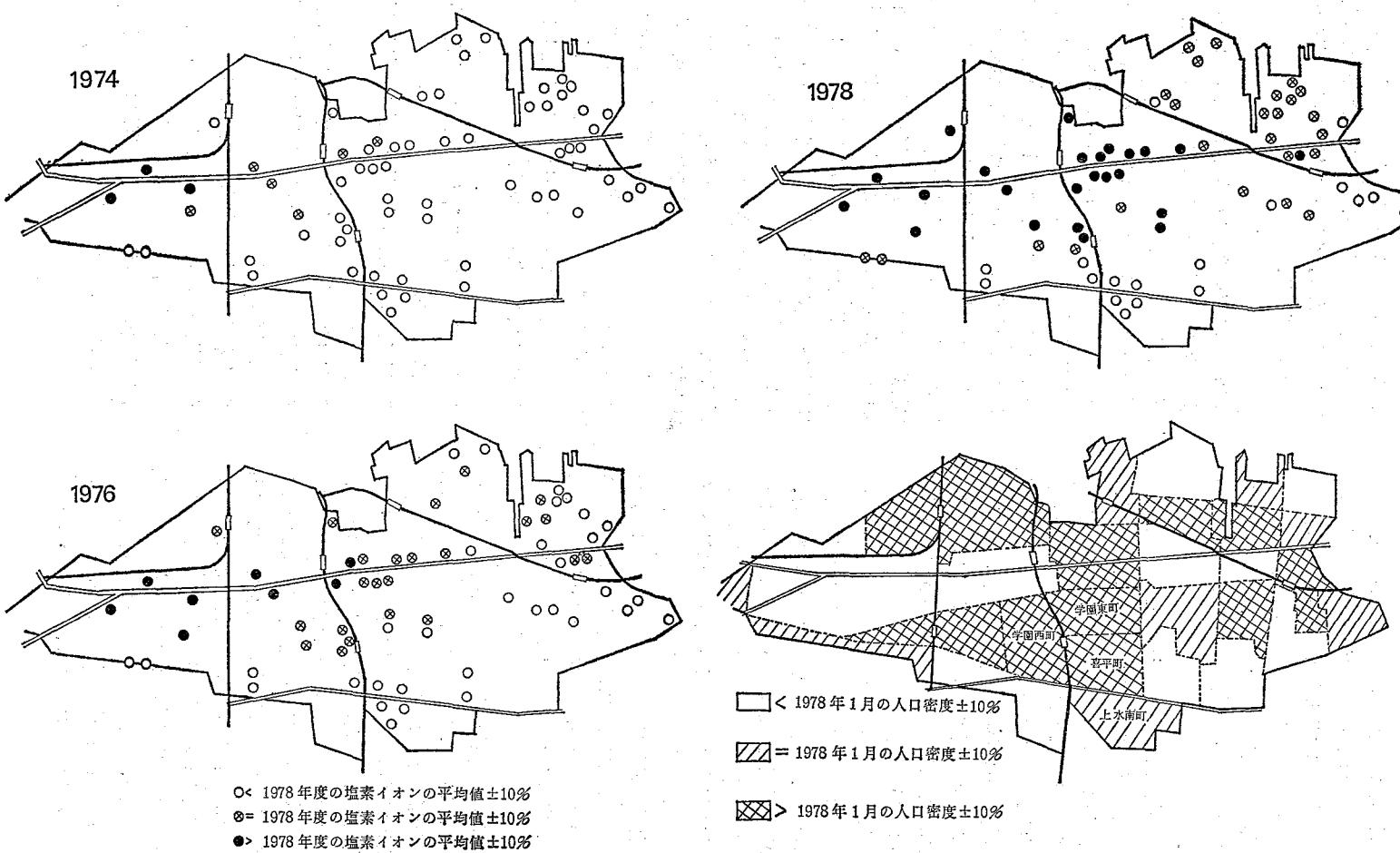


図 4. 塩素イオン濃度の推移図と町名別人口密度

の廃水も同様に処理され国分寺市の野川に放流されており，工場からの汚染は現在のところ認めていない．今回の調査項目の塩素イオン，総硬度の増加は単純な人口増による生活廃水の増加によると考えられる．人口密度と2つの成分についての関係を知るために相関関係を調べ，最小二乗法による回帰直線を求めた．結果を図2に示す．人口密度と塩素イオン，総硬度とはよい相関関係を示している．

次に，年度別の塩素イオンと総硬度の相関を表1に示す．相関関係は年を経るに従って高くなる傾向にある．一般に，生活廃水による汚染を受けると廃水中の有機物が分解して発生する炭酸ガスにより，土質中の成分が溶出するといわれる．しかし土壌中に塩素イオンと総硬度成分が相関関係をもって存在するとはあまり考えられない．それで，これらの成分の相関係数が大きくなっているということは，やはり当地区では生活廃水による汚染が進行しているといえよう．

3. 汚染の拡散様式

図3に塩素イオン，総硬度の百分率で頻度を表わしたヒストグラムを示す．各年度による形の変遷をみると，塩素イオンの場合①正規分布に近い形からピークを2つ持った形に移行し，再び正規分布の形にもどっている．②バラツキは次第に大きくなっている．それに伴い分布の形は鋭角なものから鈍角なものに移ってきている．これらのことは汚染の進行が全市にわたって均一に進んでいるのではなく，地域によって進行速度が異なっているのではないかと考えられる．総硬度についても同様のことがいえるが，塩素イオンよりもヒストグラムが不整である．

次に，塩素イオン濃度の推移図と1976年1月現在の町別人口密度を図4に示す．78年度の平均値を基準にして，平均値±10%，それより濃度の大のもの，小のものの3段階に分けてプロットした．人口密度についても同様に，1978年1月1日現在の市全体の人口密度±10%，およびそれより大のもの，小のものに分けた．1974年，76年，78年についてそれぞれ調べたが，その分布はほとんど同じであったので，中間の年の76年分を示す．これらの図によると市の中央部，および青梅街道の北部は人口密度が高く塩素イオン濃度も年々増えている．市の南部の方は，人口密度が低く塩素イオン濃度も増加が少ない．学園西町，東町，喜平町，上水南町では人口密度は高いのに塩素イオン濃度が低い地域である．この地域は1976年頃より下水道が完備しており，そのために塩素イオン濃度の増加が少ないのではないかと考えられる．市の西部で青梅街道に沿って，すでに1974年から塩素イオン濃度の高い地域がある．この地域は市内でも人口密度が低い地域であり，生活廃水以外の要因が考えられるが原因は不明である．

ま と め

①小平市の浅層地下水の水質の悪化は人口増加による生活廃水の増加が主であるが，西部地区の汚染は他の原因もありそうである．

②同市の水道普及率は99.0%であり，井戸水だけで生活している家庭はごくわずかである．しかし，今回観測に使用した井戸は市の災害時の緊急用井戸に指定されているように，飲用に使用する場合もあり得る．また一度汚染された井水はなかなか元にもどらない．我々の経験では，1976年12月に狛江市でメッキ工場からクロムが流出する事件[7]が生じたが，当時6価クロム濃度が1.7mg/lに汚染された井水は，2年後の1979年3月においても，0.009mg/lの6価クロムを検出している．そしてこの濃度で平衡状態を保っているらしく，最近の濃度の変動は少ない．このような例からも井水は極力よごさないように努めなければならない．一方，1978年11月現在の同市のし尿処理方法は，汲取りが35.3%，単独し尿浄化槽が47.0%，このうち浄化した水を地中に吸い込ませていると考えられる未届けの浄化槽がほぼ70%を占めている．公共下水が17.6%である．下水道のある地域は人口密度が高いにもかかわらず，塩素イオン濃度は低い．下水道の完備が地下水の汚染を防ぐのに一番有効である．

謝辞 本調査にあたり資料を提供された小平市役所防災課の方々に深謝いたします．

文 献

1) 藤沢正吉，斎藤節子，鈴木 静：東京衛研年報，21，165，1970
2) 藤沢正吉，押田裕子，鈴木 静：東京衛研年報，23，395，1971
3) 矢口久美子，藤沢正吉：日本公衛誌，21，374，1974
4) 木村康雄，三村秀一，藤沢正吉：東京衛研年報，19，141，1967
5) 土木研究所報告 付図3－1，1967
6) 半谷高久：水質調査法，第2版，p. 39，p. 228，1971，丸善，東京
7) 門馬康彦，藤沢正吉，大橋則雄：東京都衛生局学会雑誌，59，86，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 243-245, 1979

東京及び東京近辺の湖沼，池，濠において採集された *Microcystis aeruginosa* の毒性

渡辺真利代[*1]，大石真之[*2]，松本浩一[*1]

Toxicity of *Microcystis aeruginosa* Collected from Lakes, Ponds and Moats in Tokyo and its Vicinity

MARIYO F. WATANABE[*1], SHINSHI OISHI[*2] and KOICHI MATSUMOTO[*1]

Keywords: 藍藻 blue-green algae, 毒性 toxicity, 水の華 water-bloom, *Microcystis*

緒　言

都内の公園池や濠をはじめとして，富栄養化の進行した湖沼や貯水池では，春から夏，秋にいたるまで表面水が黄緑色に呈色するいわゆる“水の華”現象がしばしばみられる．これは大部分藍藻と呼ばれる一群の藻類によって引き起こされるものであり，この藍藻のなかに家畜や水鳥に対して有毒となる物質を含むものがあることは，古くから数多く報告されている[1-4]．日本においては水の華状態となった藍藻を含む水を摂取したため，家畜や水鳥などが死亡したという例はみられないようである．しかしながら，近年水界の急速な富栄養化の進行とともに，人の飲料水源となる貯水池においても毒を有すると報告されているものと同種の藍藻が出現している[5,6]．1977年度に我々が行った5か所の水域における調査でも毒性のみられたものがあった[7]．更に水域を拡げた1978年度の調査結果について報告する．

材料と方法

藻体は表層水を直接又はプランクトンネットを用いて採取した．実験室にもち帰り，メスシリンダーに移ししばらく放置後，表面に浮上したものを再採取した．この藻体を凍結乾燥した後，生物試験に用いるまで −20° で保存した．生物試験に際しては，凍結乾燥試料を一定量とり蒸留水を加え，ホモジナイザー(ポリトロン)で磨砕し，一晩5°に置いた後，遠心分離 (3,000r. p. m., 20′) した．その上清液を 0.2m*l* ずつ，マウス (ICR系，体重25～30g) に腹腔内注射した．またこの上清液に含まれる蛋白量とフィコシアニン量を測定した[8,9]．

結果及び考察

藍藻の水の華のなかで，*Microcystis* によるものは各地の湖沼や池などでしばしばまた長期間みられるものである．この *Microcystis* が優占している水の華より藻体を採取しマウスに腹腔内投与した結果を表1に示す．ここでは参考のため1977年の結果もあわせてのせてある．表に示してある重さ(乾重量)の藻体を 1m*l* の蒸留水中で磨砕し遠心分離後得られた上清液を 0.2m*l* ずつ投与した．したがって，例えば，50mg/m*l* であらわされているものは1匹あたり 10mg を投与したことになる．諏訪湖では1978年に5回の藻体採取を行ったが，いずれも1977年と等濃度では毒性が認められなかった．少し高濃度 (67mg/m*l*) では，10匹中7匹の死亡がみられた時期もあった．津久井湖及び相模湖の試料では，50mg/m*l* の濃度で投与した10匹全部が死亡した．生存時間は大部分のものが1時間前後であった．しかし，相模湖から採取した藻体を投与したものでは，3回の時期とも5～21時間であった．Gorham[10] によれば，この生存時間が1～2時間として効くものを fast-death factor，数時間～1日で効くものを slow-death factor とし，後者を細菌由来のものとして報告しており，相模湖からのものは原因物質が違う可能性も考えられるであろう．また Hughes ら[11]によって述べられている convulsive jump とか dragging of hind legs のような症状はみられず，あまり特徴のないまま動きがにぶくなり死亡している．前報[7] で報告したように1977年の諏訪湖の試料では50mg/m*l* の 1/2 濃度でマウスの死亡はなく，50mg/m*l* を毒性のみられる最低濃度とするとこれはおよそ 330～400 mg/kg に相当する．Konst ら[12]は培養した *M. aeruginosa* で 160mg/kg がマウスを死亡させるのに必要な量としており，我々がここで得られたものよりは毒性が少し強いようである．

表1で用いた試料はいずれも *M. aeruginosa* が優占種であり，藻体として95～99%はこれによる．一方，諏訪湖の試料の例では，時期により毒性の強さは異ってい

[*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]同毒性部薬理研究科
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Toxicity of *M. aeruginosa* colleted from Lakes, Ponds and Moats in Tokyo and its Vicinity

Source of bloom	Date	Concentration mg/ml	Mortality
Lake Suwa	21. 7. 77	50	9/10
	19. 6. 78	50	0/ 5
		67	0/10
	24. 7. 78	50	0/ 5
		67	0/10
	11. 8. 78	50	0/ 5
		67	7/10
	25. 8. 78	50	0/ 5
		67	0/10
	19. 9. 78	50	0/ 5
		67	0/10
Lake Kasumi	26. 7. 78	50	0/ 5
		100	0/10
Lake Tega	14. 8. 78	50	0/ 5
		100	0/10
Lake Inba	14. 8. 78	75	0/ 5
Lake Tsukui	3. 7. 78	50	10/10
	26. 9. 78	50	10/10
Lake Sagami	3. 7. 78	50	10/10
	11. 8. 78	50	10/10
	27. 8. 78	50	10/10
Pond Senzoku	16. 6. 78	50	9/10
Pond Shinobazu	22. 6. 78	50	2/ 4
Pond Himonya	9. 6. 78	50	0/ 5
		100	0/10
	7. 78	50	0/ 5
		71	0/10
Moats around Imperial Palace			
Ushigafuchi	23. 8. 77	50	0/10
Chidori	23. 8. 77	50	0/10
Hibiya	23. 8. 77	50	0/10
Hirakawa	18. 8. 78	43	0/ 5
		100	0/ 5
Tenjin	18. 8. 78	43	0/ 5
Chlorella		50	0/10
Distilled water			0/10

Table 2. The Amounts of Protein and Phycocyanin in Water Extracts of *M. aeruginosa* collected from Lakes, Ponds and Moats

Source of bloom	Date	Protein mg/g d. w.	Phycocyanin mg/g d. w.	Toxicity
Lake Suwa	21. 7. 77	133	18. 5	○
	19. 6. 78	263	37. 4	△
	24. 7. 78	215	39. 9	△
	11. 8. 78	201	37. 2	△
	25. 8. 78	186	23. 9	
	19. 9. 78	180	29. 7	
Lake Tega	14. 8. 78	186	43. 2	
Lake Tsukui	3. 7. 78	116	21. 0	○
Lake Sagami	3. 7. 78	142	14. 3	○
	11. 8. 78	113	19. 1	○
	27. 8. 78	179	24. 8	○
Pond Senzoku	16. 6. 78	87. 2	33. 2	○
Pond Himonya	9. 6. 78	41. 9	8. 1	
	7. 78	127	15. 8	
Moats around Imperial Palace				
Hirakawa	18. 8. 78	132	2. 2	
Tenjin	18. 8. 78	163	4. 2	

る．またある水域から同時期分離された *M. aeruginosa* でも株によって毒性のあるものとないものがあることが報告されている[10]．そこでまず毒性の有無と藻体の生理的状態との関連を調べるため，水抽出液の蛋白量と水溶性の光合成色素であるフィコシアニン量を測定した（表2）．フィコシアニン量は培養条件下で，細胞の活性が高い時期に多く含まれると報告[13]されているものである．各々の値はもとの乾重量あたりに換算してある．またこの表では，50mg/ml の濃度で毒性が確認されたものには○を，更に高濃度にした場合に毒性がみられたものには△をつけてある．諏訪湖から採取したものでは，一般に蛋白量及びフィコシアニン量とも多く，活性の良い状態にあるものと思われるが，特にここで測定した2つの量と毒性の有無に関して直接的関係は認められなかった．

現在までのところ，東京都内と近辺の10余りの水域から採取した *Microcystis* の毒性を検討したにすぎないが，そのなかでも約半分の水域からのものに毒性がみられた．しかしながら，諏訪湖と津久井湖からのものを腹腔内注射したのと等量を経口投与したものでは，マウスの死亡はみられなかった．ここで示されたような毒性をもった藻類を直接人体にとりこむことはないと思われるが，今後，周囲の水に対して特に分解時においてどれだけ溶出するかが問題として残るであろう．更には，この種の藻類の異常増殖がおこらないような水域環境を現出させることが最も必要なことと考える．

謝辞 本研究を実施するにあたり，いろいろと御便宜をはかっていただいた信州大学理学部付属諏訪臨湖実験

所沖野外輝男助教授，千葉県水道局柏井浄水場常泉裕氏，神奈川県企業庁水道局谷ヶ原浄水場斎藤昭二氏，国立公害研究所相崎守弘氏に謝意を表します．

参考文献

1) Olson, T. A.: *Water & Sewage Works*, **99**, 75, 1952
2) Gorham, P. R.: *Algae and Man*, 307, 1964, Plenum Press, New York
3) Schwimmer, M. and Schwimmer, D.: *Algae, Man and Envionments*, 279, 1968, Syracuse, New York
4) Moore, R. E.: *Bioscience*, **27**, 797, 1977
5) 橋本徳蔵：水道協会雑誌，**439**, 10, 1971
6) 津田松苗，生田美和子：霞ヶ浦生物調査報告書，1974，建設省関東地方建設局霞ヶ浦工事事務所
7) 渡辺真利代，大石真之，松本浩一：東京衛研年報，**29-1**, 389, 1978
8) Lowry, O. H., Rowerbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951
9) Hattori, A. and Fujita, Y.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **46**, 903, 1958
10) Gorham, P. R.: *Can. Vet. Jour.*, **1**, 235, 1960
11) Hughes, E. O., Gorham, P. R., and Zehnder, A.: *Can. J. Microbiol.*, **4**, 225, 1958
12) Konst, H., McKercher, P. D., Gorham, P. R., Robertson, A., and Howell, J.: *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, **29**, 221, 1965
13) Allen, M. M. and Smith, A. J.: *Arch. Mikrobiol.*, **60**, 114, 1969

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 246-249, 1979

皇居内濠群の水質（第2報）　植物プランクトン量と懸濁態有機炭素量の変動

渡辺真利代*, 松本浩一*

Water Qualities of Inner Moats around the Imperial Palace (II) Variations of the Amounts of Phytoplankton and Particulate Organic Carbon

MARIYO F. WATANABE* and KOICHI MATSUMOTO*

Keywords: 濠 moat, 富栄養化 eutrophication, 植物プランクトン phytoplankton, 懸濁態有機炭素 particulate organic carbon

緒　言

近年の水界の急速な富栄養化現象は濠においても例外でない．特に濠は都市の中央に位置しまた水深が浅く面積も比較的小さいという点から，富栄養化は急速に進むものと考えられる．倉茂[1]によるとすでに1930年代に *Microcystis aeruginosa* が皇居濠においても出現しているが，細胞数は少なく当時は水草も繁茂していた．しかしその後の草魚の放魚やそれに伴った水草の減少・消滅により藍藻の水の華が毎年4月末からみられるようになってしまっている．濠水は景観上良好な水質が望まれるだけでなく，地震等の緊急時に際し飲料水としても使用可能な水質であることが望ましい．

皇居の濠のなかで，外濠については69年度から当研究所により継続調査がなされている[2]が，内濠については，昨年我々が行った調査のみ[3]である．更に引き続いて行った1978年度の調査結果をあわせ，植物プランクトン量と有機態炭素量について検討した．

調査時期及び地点

調査は1977年5月26日，8月24日，11月24日，1978年2月24日，5月26日，8月18日，11月24日，1979年2月14日に行った．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)，蓮池濠(St. 5)，乾濠(St. 6)，平川濠(St. 7)，天神濠(St. 8)，二ノ丸池(St. 9)であり，調査地点の概略図は前報[3]に報告した．

調査方法

採水は各濠の中央部付近で表面水について行った．実験室にもち帰った後，試水をグラスファイバーろ紙でろ別し，Strickland & Parsons の方法[4]によりクロロフィルa量を定量した．また試水をあらかじめ500°で焼いたグラスファイバーろ紙でろ別後，ろ紙上のものを懸濁態有機炭素とし CHN コーダー（柳本 Co.）で定量した．

結果及び考察

植物プランクトンの現存量をあらわすものとして測定したクロロフィルa量（以下 chl. a とする）の変化を図1に示す．いずれの濠とも8月に *Microcystis aeruginosa* が出現しており，この時期に chl. a 量が多くなる濠が多い．しかし，*M. aeruginosa* は1978年の8月の調査時で比較すると，St. 7 では 4.8×10^4/m*l*，St. 8 では 6.8×10^4/m*l* の細胞数であるが，St. 1 では 2×10^3/m*l*，St. 3 では 4.3×10^2/m*l*，St. 5 では 4.2×10^2/m*l*，St. 9 で 1.4×10^2/m*l*，その他は 50 以下/m*l* と大きな差がみられた．St. 2 及び4は年間を通じて水深が 20～40cm と浅く，ハスが繁茂している濠である．特に St. 2 ではハスの繁茂の著しい時期に植物プランクトン量が少なくなっているが，ハスが枯死した後に，著しく高い chl. a 量が測定された．ハスの繁茂は植物プランクトンの増殖に不可欠な光をさえぎるのみではなく，植物プランクトンの増殖を阻害する物質をだしている可能性もある[5]．しかし枯死に際しては，周囲水界に逆に栄養塩を放出し，更には空気中の二酸化炭素より作った多量の有機物を濠の底に蓄積することになるので，ハスは適当に間引きしてやらねばならないだろう．St. 6 においても，一部にはハスの進入がみられるが，水深が 1m 以上あるためヒシやサンショウモもみられ，それゆえ植物プランクトン量も少ないと考えられる．この St. 6 と同程度の chl. a 量の変化を示しているのが St. 5 と St. 7 であり，両濠とも水深が 1m 以上あることが効いていると思われる．

次に植物プランクトン量と懸濁態有機炭素量（以下 POC とする）との関係をみたのが図2である．POC 及び chl. a 量とも変動の少ないのは St. 5 であり，次に St. 6, St. 9 の順となっている．逆に変動の大きい濠としては St. 2 と St. 8 が挙げられるであろう．この両濠とも水

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

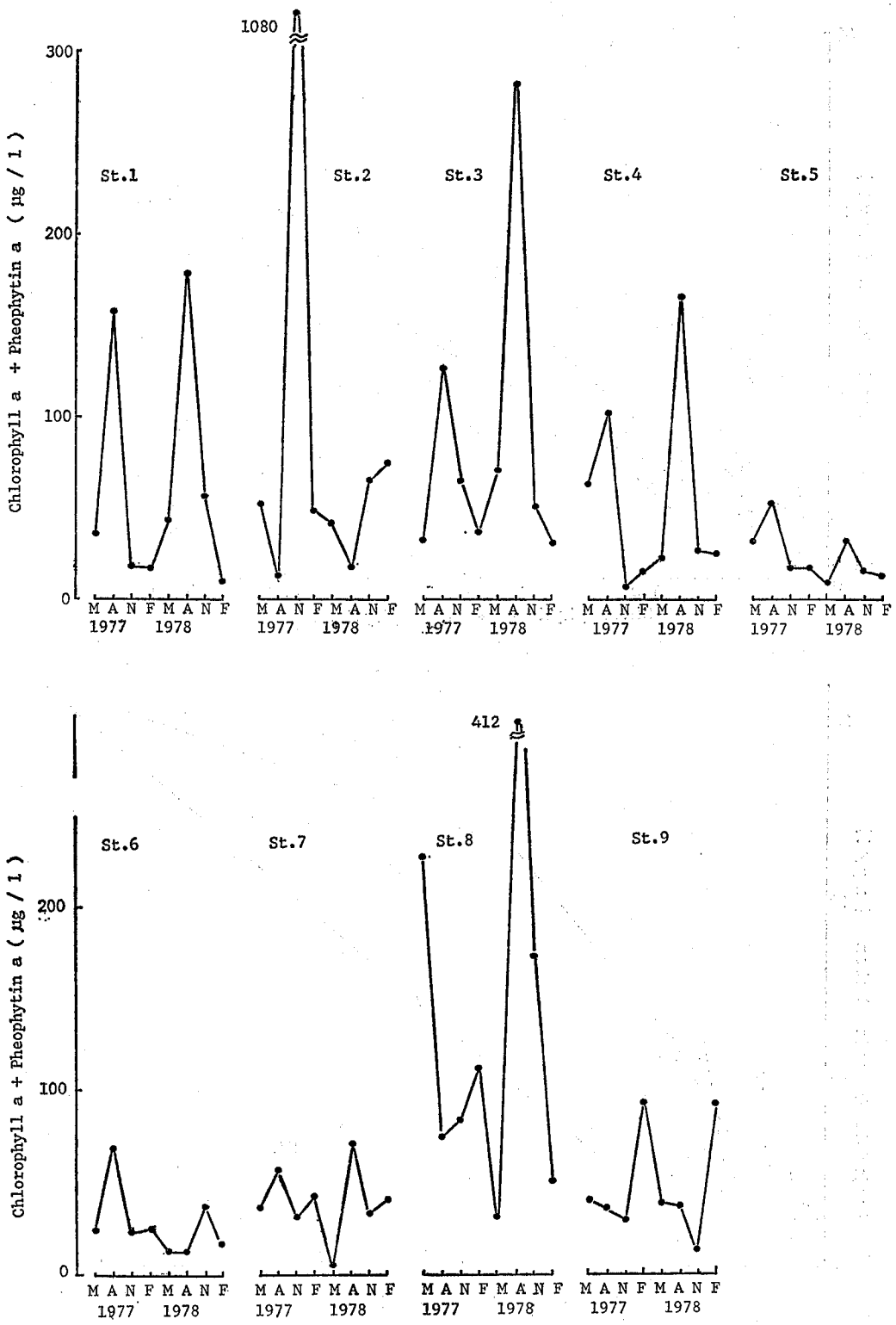


Fig. 1. Seasonal Changes in the Amounts of Chlorophyll a in the Moats around Imperial Palace

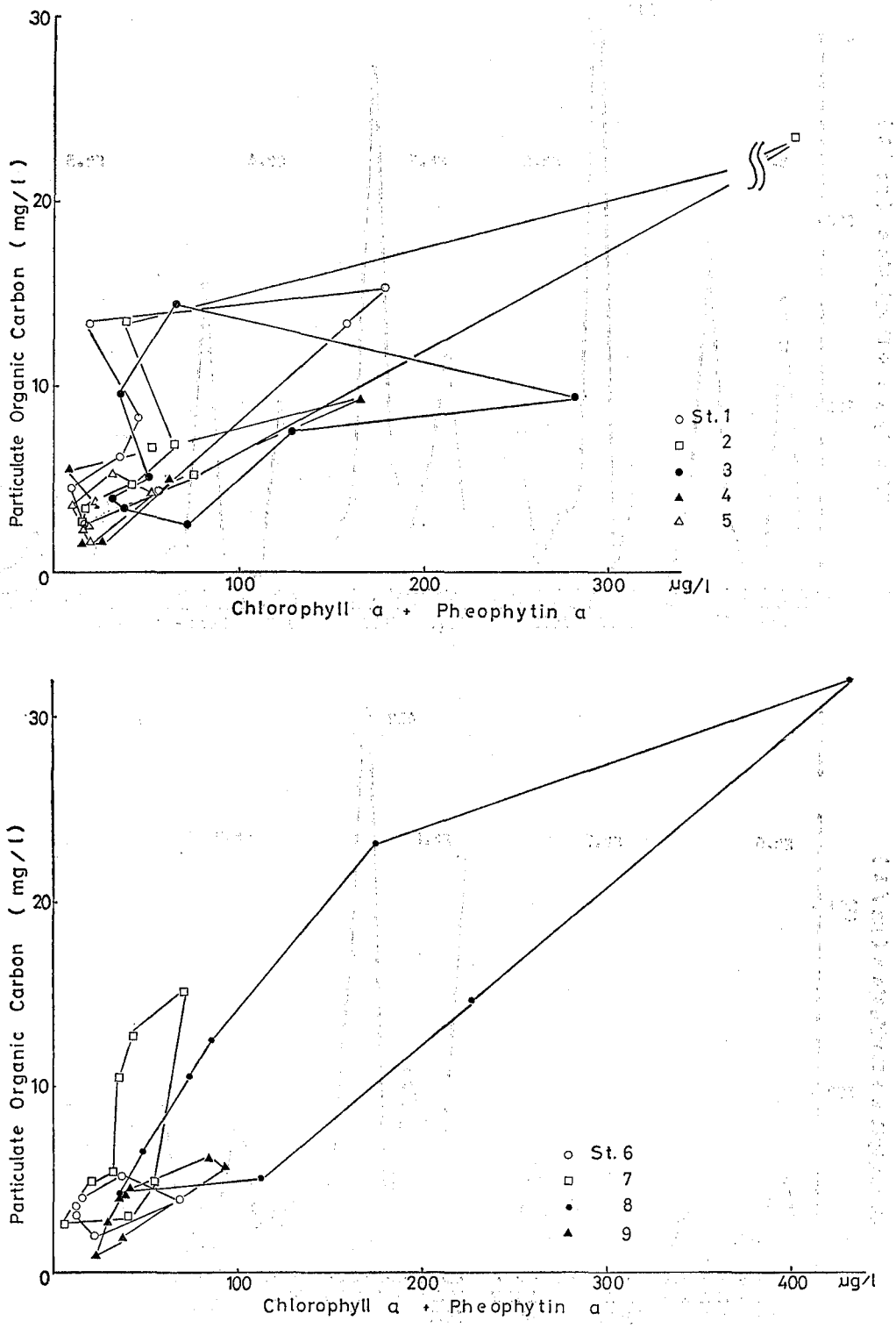


Fig. 2. Relation between the Amounts of Chlorophyll a and Those of Particulate Organic Carbon

深が非常に浅いことが，変動の大きい原因として考られる．また St. 7 では図1において示されたように chl. a 量の変動が小さい濠だが，これに比較して POC 量の変動はずっと大きく，植物プランクトン由来以外の POC の占める割合が高いと考えられる．

ここでは chl. a 量及び POC 量からみた各濠の富栄養化の現状について検討した．得られた chl. a 量を坂本の報告[6]している湖沼型にてらしあわせてみると，典型的な富栄養湖といわれる霞ケ浦や諏訪湖とほぼ同じ値を示していた．また内濠で測定された chl. a 量の最高値の範囲は 32.7～1,080$\mu g/l$ であったが，これは松本城の濠[7]の 124～424$\mu g/l$ や皇居外濠の 45～175$\mu g/l$ に比べると，変動の範囲は大きいものといえる．すなわち内濠のなかには，比較的富栄養化の進んでいない濠から，非常に進んでいる濠とがあり，その間の差は他の濠群に比較して大きいということである．また内濠の POC 量は，やはり諏訪湖[8]や霞ケ浦[9]と同程度かもしくはそれ以上というところであった．内濠のなかでは，蓮池濠(St. 5)や乾濠 (St. 6) のような深度があり，またヒシのような浮葉植物が生育している濠は，当面現状のままで良いと思われるが，問題は浅い上道濠濠 (St. 2)，下道濠濠 (St. 4)，天神濠 (St. 8) であろう．天神濠は平川濠の漏水防止工事の完成に伴い，1979年の5月には水深が 1m 以上になってきているが，ハスの繁茂している上・下両道濠濠については，深さの確保ができないとすると何らかの形でハスを除去することを考えねばならないだろう．確かにハスの繁茂している時期には，水質そのものは良好に保たれているのだが，枯死する時期にはその植物体の炭素や窒素・燐などが濠水に負荷としてかかってくる．従って枯死体をまずは除去してやることが必要であろう．更には，望ましい濠の状態としては，ヨシやオギなどの抽水植物が進入できないような一定の深度があり，ガガブタ・ヒシのような浮葉植物やフサモ・クロモといった沈水植物が存在できる水質ではないだろうか．

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：10, 475, 1932
2) 山崎洋子，松本浩一：東京衛研年報，26-1, 336, 1975
3) 渡辺真利代，松本浩一：東京衛研年報，29-1, 382, 1978
4) Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R.: *A Practical Handbook of Sea Water Analysis*, 1968, Fish. Res. Bd. Canada
5) 宝月欣二，岡西良治，菅原久枝：陸水学雑誌，21, 124, 1960
6) Sakamoto, M.: *Arch. Hydrobiol.*, 62, 1, 1966
7) 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実験所報告，1978
8) 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
9) 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

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 250-255, 1979

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第10報）
善福寺川に生息する2種のユスリカ幼虫の低濃度溶存酸素に対する耐性

大野正彦*, 松本浩一*, 藤野 尚**

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (X)
Studies on the Tolerances of Two Species of Chironomids Larvae to Low Dissolved Oxygen

MASAHIKO OHNO*, KOICHI MATSUMOTO* and TAKASHI FUJINO**

Keywords: ユスリカ chironomid, 耐性 tolerance, 呼吸 respiration, 溶存酸素 dissolved oxygen

緒　言

神田川水系善福寺川の中流部と下流部では，ユスリカの優占種が異なっていた[1]．中流部の春日橋附近の水域ではセスジユスリカ *Ch. yoshimatsui* Martin & Sublette が高密度に生息し，大宮橋附近の流域ではツヤユスリカ類 *Cricotopus bicinctus* Meigen, *Eucricotopus* (*Isocladius*) *sylvestris* group などが優占していた．ユスリカ類の分布に夜間の溶存酸素（以下DOと称す）濃度の減少が大きな影響を及ぼしていると考えられたが，実験的に証明していない．ユスリカ2種，*Ch. yoshimatsui* 及び *Cr. bicinctus* の低濃度溶存酸素に対する耐性を調べ，呼吸量（酸素消費量）を測定し，善福寺川における両種の分布と夜間のDO濃度の減少程度について検討を行なったので報告する．また，参考として，水質汚濁域や止水に多く生息するミズムシ *Asellus hilgendorfii* Bovallius と，水質が比較的清冽な流域に生息するウルマーシマトビケラ *Hydropsyche ulmeri* Tsuda の呼吸量も測定したので併せて述べる．

採　集

Ch. yoshimatsui は善福寺川春日橋附近，石神井川向屋敷橋附近の水域で，*Cr. bicinctus* は大宮橋附近で1978年夏期に採集したものを実験に用いた．*Asellus hilgendorfii* は77年10—11月に春日橋，*Hydropsyche ulmeri* は77年11月に秋川秋留橋附近で採集したものを用いた．

これらの底生動物を現地の水とともに持ち帰り，流水式飼育槽で1—2日間，20° で順化（acclimation）させ，実験に用いた．原則として採集してから7日以上経過したものは実験に用いなかった．

1. DO低濃度に対する耐性実験

1) 実験1　300ml 容の SPC(Super Precise Coating) 三角フラスコに5—6段階の異なったDO濃度の試水とユスリカ幼虫各10個体ほどを入れる．三角フラスコに SPC 攪拌シールを結合させ，フラスコを恒温槽に浸した．シール上部をジャーテスターに結び，下部に付けたプロペラを1分間に60回転させ（流速 5—10mm/sec 程度）暗条件下，20° に保った（Fig. 1）．実験は8時間行

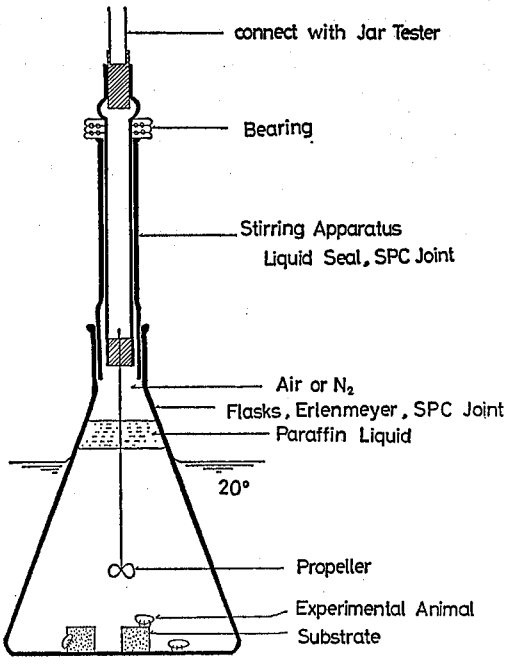


Fig. 1. Respiratory Vessel

* 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
**日本大学農獣医学部水産学科

Table 1. Activities of Two Species of Chironomids Larvae at Various Dissolved Oxygen Concentrations in Water

Ch. yoshimatsui

D.O. Concentration at the Beginning of the Experiment	D.O. Concentration at the End of the Experiment	Exposure Time (Hour) 1 hr	2 hrs	3 hrs	8 hrs	*Recovery of *Ch. yoshimatsui* after the Experiment	No. of Experimental Animal
7.50 mg/*l*	7.68 mg/*l*	all AC	all AC	all AC	all AC	all AL, 2 pupae	10
2.75	3.33	all AC	all AC	all AC	all AC	all AL, 1 pupa	10
1.15	0.84	all AC	all AC	all AC	all AC, 1 larva pupated	all AL, 1 pupa	10
0.64	0.78	all UN	all UN	all UN	all UN	all AL, 1 pupa	10
0.24	0.46	all UN	all UN	all UN	all UN	all AL, 2 pupae	10

Cr. bicinctus

D.O. Concentration at the Beginning	D.O. Concentration at the End	Exposure Time (Hour) 1 hr	2 hrs	4 hrs	8 hrs	**Recovery of *Cr. bicinctus*	No. of Animal
8.87 mg/*l*	8.87 mg/*l*	all AC	all AC, 2 larvae built nests	all AC 2 nests	all AC, 8 larvae built nests, 1 pupa	all AL, 1 pupa	9
3.49	2.88	all AC	all AC	all AC	all AC 2 nests, 1 pupa	all AL, 2 pupae	9
2.97	2.59	active, crawling	active, crawling	active or stillness	1 nest, 1 pupa	all AL, 1 pupa	10
1.61	1.66	active, crawling	all UN	all UN	all UN vigorously	all AL, 2 pupae	9
0.99	0.99	all SL	all SL	1 larva, IN the other, SL	3 larvae, IN the other, SL	all AL, 4 pupae	9
0.38	0.63	9 larvae, IN 2 larvae, UN	9 larvae, IN 2 larvae, UN	1 larva, SL the other, IN	all IN	1 larva, found dead 1 was moribund the other, active	11
0.16	0.65	8 larvae, IN 2 larvae, UN	all IN	all IN	all IN	1 larva, moribund the other, active	10

Note. AC : fully active, UN : undulating, SL : sluggish, IN : inactive (motionless), AL : alive

* : observations after 12 hours since the end of the experiments

** : observations after 18 hours

Table 2. Effects of Low Dissolved Oxygen on Activities of Two Species of Chironomids Larvae

Ch. yoshimatsui

D.O. concentration at the beginning of the experiment was 0.2 mg/*l*

Exposure Time (Hour)	Remarks
1	All larvae were crawling.
2	All were sluggish. Air bubbles formed on their bodies.
3	Sluggish. Almost larvae rose due to the bubbles.
6	Sluggish. Some of them stirred after violent shaking the flasks.
8	4 larvae (13%) were inactive among 30 individuals. The other were sluggish. D.O. concentration was 0.07 mg/*l*. All larvae recovered, when dissolved oxygen was saturated by bubbling the water.
23	D.O. concentration was 0.03 mg/*l*.
28	18 larvae (90%) were alive and 16 (80%) built nests among 20 individuals, when dissolved oxygen was saturated by bubbling the water.

Cr. bicinctus

D.O. concentration at the beginning of the experiment was 0.1 mg/*l*

Exposure Time (Hour)	Remarks
1	All were inactive, lay on the bottom.
3	All were inactive, lay on the bottom.
6	Inactive. 3 larvae (15%) rose due to the bubbles among 20 individuals.
8	Inactive. D.O. concentration was 0.09mg/*l*.
15	2 larvae (15%) built nests, 3 (23%) were moribund, 8 (62%) showing no sign of life, when dissolved oxygen was saturated by bubbling.
21	No sign of life evident in any of larvae.

ない，経時的に実験個体の活動を観察した．実験終了後，空気を通してDO濃度を回復させ，泥を与え，その2時間後に巣を造る個体数を調べた．

2) 実験2 DO濃度が極めて低い (0.1, 0.2mg/*l*) 河川水を 100m*l* 容DOビンに実験個体とともに入れ，密閉し，恒温槽に浸し，前述の実験1と同様に経時的に活動を観察し，DO濃度を測定した．長時間低濃度にさらしたものについて濃度を回復させ，その生存率，巣を造る個体の数（割合）を調べた．

2. 呼吸量の測定

前述の三角フラスコに攪拌シールを結合させたものを呼吸室とした (Fig. 1)．実験を次のように行なった．

i) 酸素が充分含まれている水 250m*l* とユスリカ，泥及び付着材（減圧煮沸して間隙の気泡を取り去りよくあくを出させた1片が1cm程度のセメントでできた立方体）を3ないし4個を三角フラスコに入れ，攪拌シールを結合させ，1時間，20°, 暗条件下でプロペラを1分間に60回転させ，巣を造らせる．*Asellus* の実験もほぼ同じような操作を行なった．*Hydropsyche* では泥を入れず，プロペラを1分間に100回転（流速 10—15mm/sec）させ，巣を造らせた．

ii) サイホンで水を取り出し，窒素ガスで 7, 4, 1, 0.5, 0.25mg/*l* 程度のDO濃度にした河川水を入れる．1分間にプロペラを60回転 (*Hydropsyche* では100回転) させる．実験個体の入れていない三角フラスコも同様な処置を行なった．

iii) 1時間後に水を取り出し，ii) とDOがほぼ同濃度の水，265m*l* を入れ，窒素ガスで酸素を取り除いた流動パラフィンを重層し，プロペラを回し，20° 暗条件下で2—5時間，実験を行なった．実験個体，泥の入っていない三角フラスコも同様の処置を行なった．これをブランクとした．

iv) 別に泥などの酸素消費量を求めておく．

v) 所定の実験時間後，三角フラスコの試水をサイホンで 100m*l* 容のDOビンに移し，ウインクラー法（アジ化ナトリウム変法）でDOを求めた．

vi) 実験個体及び泥の入っているものとブランクとのDOの差を求め，実験個体，泥の酸素消費とみなす．泥の酸素消費を補正し，ユスリカ類など実験個体の乾重 (80°, 24時間) 1g 1時間当りの酸素消費量 (mgO_2/d. w./hr，以下，呼吸量と称す) を求めた．

実験開始時と終了時のDO濃度の中間の値を実験個体が呼吸している時のDO濃度（実験時のDO濃度）とした．低濃度の実験においては呼吸室に空気の侵入があり，開始時と終了時のDO濃度はあまりかわらなかった．

実験に用いた *Ch. yoshimatsui*, *Cr. bicinctus* は終令幼虫で，体長，1個体の平均乾重は各々 12mm 4×10^{-4}g, 4mm 9×10^{-5}g であった．*Asellus hilgendorfii*, *Hydropsyche ulmeri* の1個体の平均乾重は 3×10^{-3}, 4×10^{-3}g であった．

結　果

1. DO 低濃度に対する耐性実験 実験1の各DO濃度におけるユスリカの活動状態は Table 1 に示した．*Ch. yoshimatsui* はDO濃度が 1.15—0.84mg/*l* でも 7.5mg/*l* の時と同じような活動を示し，ゆっくり這い回り，時には体を左右に動かし (Table 1 で，この状態を fully active と表現した)，中には蛹になるものさえいた．0.64—0.78, 0.24—0.46mg/*l* では盛んに体を波状に動かす波動運動 (undulation) が観察された．実験2で低濃度 (0.2mg/*l*) の試水に入れた *Ch. yoshimatsui* は，実験を始めてから2時間ほど経過すると，動作が緩慢になり，体に気泡が付き始め，大部分が浮き上がるようになった (Table 2)．しかし，溶血 (Hämolymphe-verlust)[2] せず，鮮かな赤紅色のままであった．実験を始めてから8時間後 (0.07mg/*l*)，空気を通し，DO濃度を飽和状態にさせると，すべてが活動し始め，巣を造った．23時間後にはDO濃度が 0.03mg/*l* になり，28時間後に空気を通しDO濃度を高めると，巣をつくるものは総数の90%であった．

実験1において *Cr. bicinctus* はDO濃度が 1.6mg/*l* で激しく波動した．1mg/*l* で動きが緩慢に，0.38—0.63, 0.16—0.65mg/*l* では動かず，正しい姿態を保てず，底部に体を横たえた．DO濃度を回復させても，低濃度においた個体の一部に死んだり動かないものがみられた．また，実験2で低濃度のDOビン中に15時間入れたものはDO濃度を高め飽和状態にさせても，13個体中2個体 (15%) しか巣を造らず，21時間おいたものはすべて死亡した．

2. 呼吸量 *Cr. bicinctus* の乾重1g 1時間当りの酸素消費量（呼吸量）は *Ch. yoshimatsui* の2倍であった．DO濃度が大きい時の *Ch. yoshimatsui*, *Cr. bicinctus* の呼吸量は Konstantinov[3] が報告している，それぞれの近縁種，*Ch. dorsalis*, *Cr.* gr. *sylvestris* のそれとほぼ等しかった．DO濃度が減少するにつれての両種の呼吸量の減少程度は類似していた．DO濃度が 7mg/*l* の時の呼吸量を 100 とすれば，4, 1.5, 0.7, 0.2mg/*l* で 75, 50, 25, 8 であった．この曲線の形態は Walshe[4] の報告している止水 (stagnant ditch) に生息するユスリカの溶存酸素—呼吸量曲線の型と，流水 (stream) に

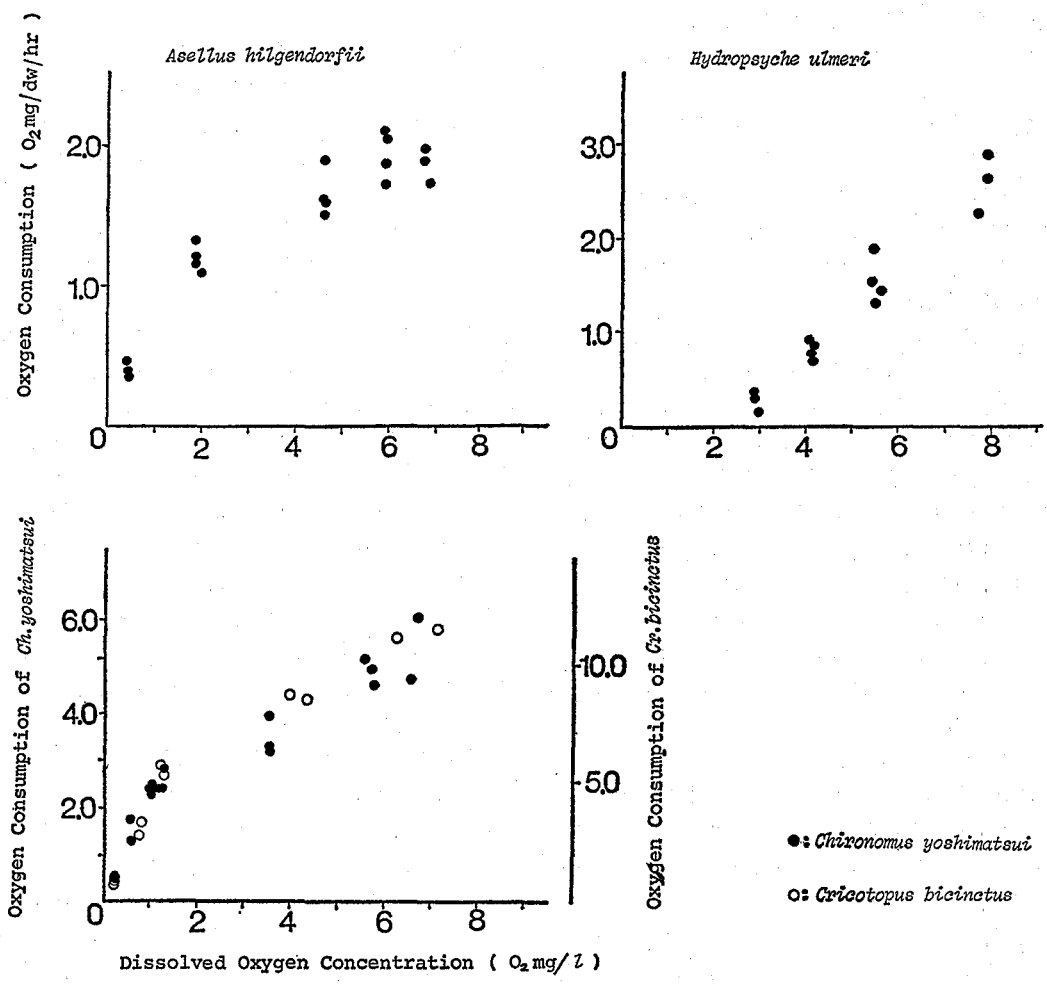


Fig. 2. Oxygen Consumptions at 20° of Macroinvertebrates at Various Oxygen Concentrations

生息するユスリカの曲線の型の中間であった．また，この曲線は，Konstantinov[3] の測定した *Ch. dorsalis*（広範な環境の水域に生息し，汚濁水域によく出現する[5]）のものと似ていた．(Fig. 2)

しかし，DO濃度が低下するにつれての両種の呼吸量の減少程度は似ているにもかかわらず，そのDO低濃度に対する耐性にちがいがあった．*Ch. yoshimatsui* は 1mg/*l* 以下で盛んに波動運動を行なっていたが，*Cr. bicinctus* はその濃度でほとんど動かず，三角フラスコの底部に弛緩した状態で横たわっていた．

Asellus hilgendorfii の呼吸量はDO濃度が減少しても急激に落ちず，independent type[6] であった．*Hydropsyche ulmeri* は直線的に低下し，dependent type[6] であった．

考　察

DO濃度が減少するにつれ，ユスリカ幼虫の活動状態は以下のように変化すると思われる．DO濃度が高い時にはゆっくり這い回り，中には泳いだり体を左右に動かしているが，酸素が欠乏しはじめると，波動運動をするようになる．そしてより低濃度になると，動きが緩慢になる．最後には動かなくなり，付着材（substrate）につかまることができず，側面を下にして底部に横たわるようになる．動きが緩慢になる時の濃度をユスリカの酸素欠乏に耐えられる限界の濃度と考えると，*Cr. bicinctus* では 1mg/*l* であろう．*Ch. yoshimatsui* は0.24—0.46 mg/*l* でも波動運動を行ない，耐えられる限界のDO濃度はそれ以下にあるものと思われる．

春日橋附近の水域では夜間に水草，付着物，底泥など

の酸素消費によるDOの急激な減少が見られた．1977年9月の春日橋でDO濃度が 1mg/*l*，0.5mg/*l* 以下の状態が各々10，9時間ほど続いた．また，同年10月の春日橋では22：00に 1mg/*l* 以下になった．しかし，同時に調査した大宮橋では 21：00に 6mg/*l*，24：00に 3mg/*l* であった[1]．低濃度の試水に入れた *Cr. bicinctus* の実験個体にDO濃度を飽和状態に回復させても動かず巣を造らないものが見られたことから，春日橋あたりの水域はこの種にとってあまり好適といえないように思われる．また，大宮橋の流域の夜間のDO濃度は *Cr. bicinctus* の活動にあまり影響を及ぼさないように思われる．野外の調査結果とこれらの実験から，善福寺川におけるユスリカ類の分布にDO濃度が大きく関与していると確認できた．

Ch. yoshimatsui はDO低濃度時に体に気泡を付け，浮き上がるものが多かった．DO濃度が高い水表面へ移行でき，DO低濃度に耐性があるばかりでなく，このようなしくみで，酸素の欠乏しやすい環境に適応しているように思われた．

以上述べてきたように，2種のユスリカにDO低濃度に対する耐性にちがいがあった．しかし，DO濃度が低下するにつれての両種の呼吸量の変化はほぼ等しかった．これは，呼吸量の低下とその種の低濃度に対する耐性を直接に結びつけられるものではないことを物語る．その理由の1つには，種による生理的な特性のちがい，すなわち，呼吸以外の代謝経路（嫌気的な反応など）を用いる種や，呼吸機能，活性を低下させ，酸素の欠乏しやすい環境に適応している種の存在が考えられることである．また，2つには，種により生命維持に必要な酸素要求量が異なることがあげられる．*Ch. yoshimatsui* は酸素要求量が少ないか，または何らかの形で呼吸量の減少をうめあわせて活性を保ち，*Cr. bicinctus* には，その能力が不足していると思われた．

摘　要

1. セスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui* Martin & Sublette とツヤユスリカの一種 *Cricotopus bicinctus* Meigen の低濃度溶存酸素に対する耐性とその呼吸量について調べた．

2. *Ch. yoshimatsui* は溶存酸素の欠乏に強い．DO濃度が 0.1mg/*l* で体に気泡がつき始め，浮き上がりやすくなり，水表面近くへ移行できる．酸素が欠乏しやすい環境に適応していると思われる．

Cr. bicinctus はDO濃度が 1mg/*l* で動きが緩慢になる．0.38—0.63，0.16—0.65mg/*l* で動かなくなり，付着材（substrate）につかまれず，底部に横たわり，この濃度では酸素欠乏に耐えられないと思われた．

3. 夜間の溶存酸素濃度の減少が善福寺川のユスリカ類の分布に大きく関与している事が確認できた．

4. 溶存酸素濃度が低下するにつれての呼吸量の減少の程度は両種に差がなかった．

5. 低濃度溶存酸素に対するユスリカの耐性と呼吸量の関係について考察を行なった．

謝辞　ユスリカが巣を造るか否かで溶存酸素低濃度に対する耐性を判定する方法を教えて下さった国立公害研究所佐々学所長，呼吸量の測定方法について助言を賜った国立公害研究所計測技術部森田昌敏博士に深謝いたします．

文　献

1) 大野正彦，松本浩一：東京衛研年報，29-1，405，1978
2) Scharf, B. M.: *Arch. Hydrobiol.*, 72, 225, 1973
3) Konstantinov, A. S.: *Limnologica* (*Berlin*), 8, 127, 1971
4) Walshe, B. M.: *J. Exp. Biol.*, 25, 35, 1948
5) Thienemann, A.: *Die Binnengewässer*, Bd. 20, 1954
6) Mann, K. H.: *Verh. int. Verein. theor. angew. Limnol.*, 14, 1009, 1961

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 256-259, 1979

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第11報）
善福寺川に生息するセスジユスリカの年間の世代数の算定

大野正彦*, 松本浩一*

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (XI)
Number of Generations per Year of *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae) in the River Zempukuji

MASAHIKO OHNO* and KOICHI MATSUMOTO*

Keywords：生活史 life history, 世代 generation, 有効積算温度（有効温量）thermal constant, 発育限界温度 threshold of development, ユスリカ chironomid

緒　言

セスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui* Martin & Sublette の大量発生防除のため，78年に総計55 t 程度の薬剤が神田川水系に頻繁に散布されている．しかし，薬剤の適正な量及び散布頻度についてほとんどわかっていないのが現状である．薬剤散布を効果的に行なうためにはセスジユスリカの生態，特に生活史を調べる必要があると思われる．前報[1]にひき続き，善福寺川に生息するセスジユスリカの生態について調査を行ない，その産卵時期，年間の世代数について若干の知見が得られたので報告する．

調査地点・調査方法

調査地点として善福寺川中流部の大宮橋附近の水域を選んだ．護岸は水面に対して傾斜しているが（Fig. 1. A）一部に長さ 5m 位の垂直な護岸（Fig. 1. B）があり，その水際にユスリカの集中的な産卵がみられた．1976年9月から77年12月まで3—4日の間隔で主に18時ごろ，“垂直な護岸”の幅 50cm に産みつけられたユスリカ類の卵塊を削ぎ落とし，セスジユスリカの卵塊を数えた．常に同一の護岸部を調査した．

結果及び考察

'76年には9，10，11月の各上旬に産卵のピークがあった．'77年の調査では3月中旬から12月上旬まで産卵があり，降雨のため調査不能であった夏期を除き，ほぼ1ヶ月ごとに産卵のピークがあった（Fig. 2）．この産卵のピークは各世代が多量に羽化したことによることが以下の3つの事柄から考察できる．

1. セスジユスリカの雌の成虫は羽化2—3日後に交尾して，1世代1回の産卵で1卵塊を産出する．

2. 1976年9月の台風によって善福寺川のユスリカの個体群は壊滅的な被害を受け，それ以降，個体数の急激な増加がみられ，世代が重複していなかった．

3. 他のユスリカ，主に Orthocladiinae の産卵状況がセスジユスリカと異なり（Fig. 3），天候がセスジユスリカの産卵周期に大きく影響しているとは思われなかった．

このピークの数から世代数が算定できるように思われた．

代田[2]の資料から，セスジユスリカの成長と温度との関係のグラフを作った（Fig. 4）．成長速度は温度（水温）と一次関数の関係（直線関係）にあり，$r=0.952$ で相関が大である．発育限界温度を求めると2.5°であった．なお，この種の成長と温度についての田中[3]の報文から発育限界温度を求めると−2.5°となり，そこで述べられている測定値は信頼性に乏しかった．また，ユスリカ及びその他の水生昆虫の生長に関する報告[4-6]は，その多くの発育限界温度が4—6°であると述べている．

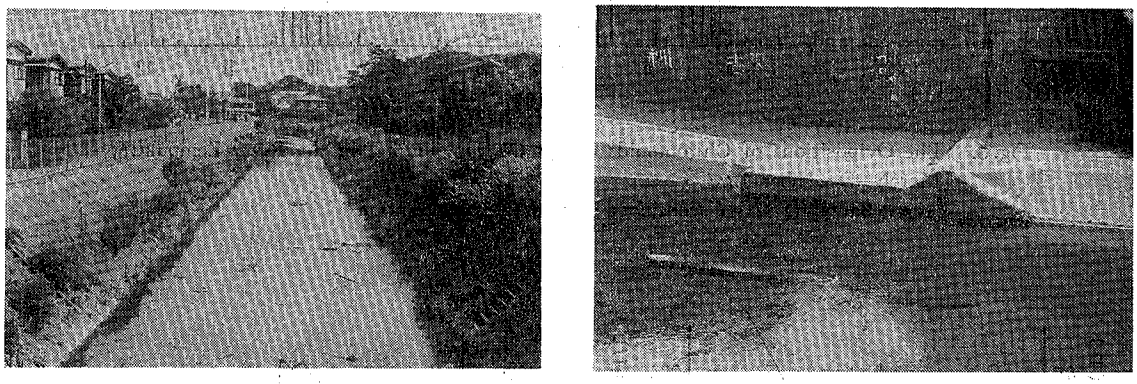
以上のことから，セスジユスリカの発育限界温度を2.5°及び4°とし，77年の，産卵の始まる時期から次のピークの始まる時までの有効積算温度（有効温量）を大宮橋附近の午前11時の水温（水温の日変動の調査結果[7]から，平均水温と考えた）から算定するとほぼ590，530日度（Fig. 5，6）であった．これは Fig. 4 のKの値と近似していた．調査不能であった夏期の有効積算温度は，それぞれ1,330，1,190日度であった．

夏期に2世代分の温量があると考えると，善福寺川に生息するセスジユスリカは年8世代と算定できる．1世代を完了するのに必要な温量は500—600日度であった．

* 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

年8世代という値は森谷[8]が個体数の変動から解析した鎌倉市砂押川のセスジユスリカのそれと等しかった．田中[3]は京都で飼育実験により年7世代と報告している．また，代田[2]はサイズ解析法を用い，仙台市附近の下水溝に生息するセスジユスリカの世代数を調べ，越冬幼虫に体長の異なる2群があり，互いに重複し，1群は6世代，他群は5世代と報じている．このようにセスジユスリカの年間の世代数は生息する場所によって変化するものと思われる．

多くのユスリカ類は年1—3世代であるといわれてい



A　　B

Fig. 1.　Sampling Station

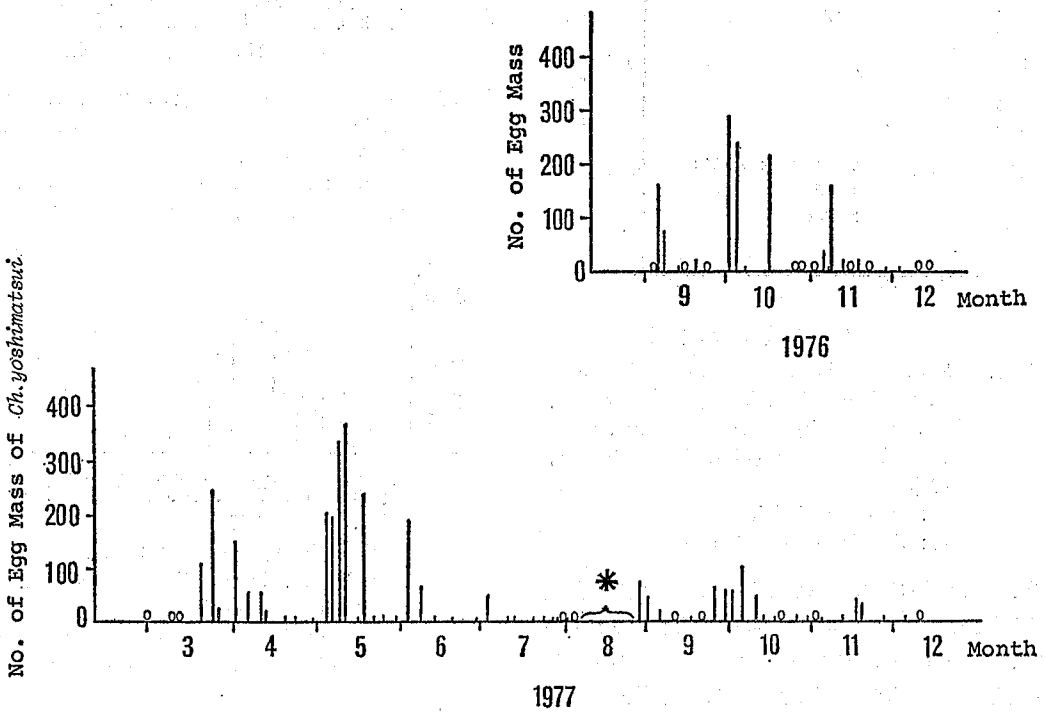


Fig. 2.　The Ovipositions of *Ch. yoshimatsui* at the Omiya Br. in the River Zempukuji, September 1976—December 1977
＊ : Sampling was discontinued due to the precipitation

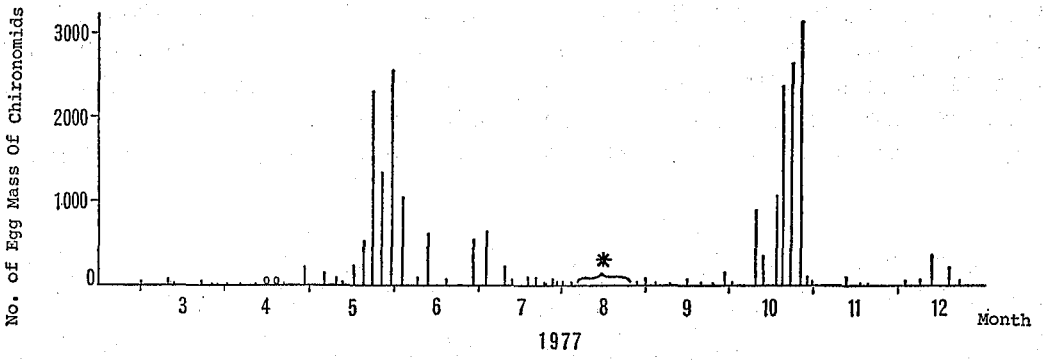


Fig. 3. The Ovipositions of Chironomids except *Ch. yoshimatsui* in the River Zempukuji, March—December 1977
* : Sampling was discontinued due to the precipitation

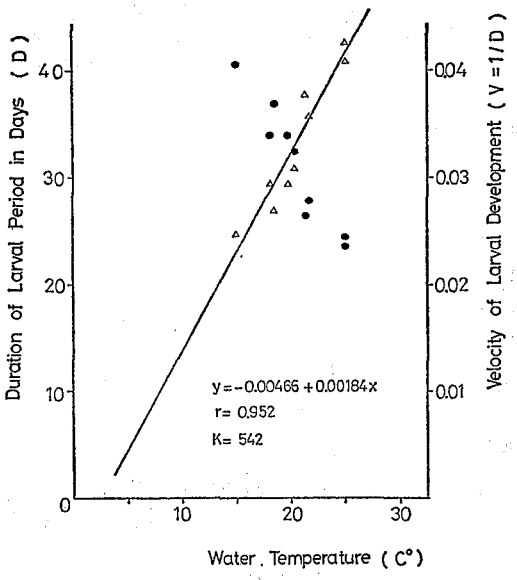


Fig. 4. Correlations between Larval Period of *Ch. yoshimatsui* and Water Temperature, between Velocity of Development and Water Temperature (plotted from Shirota, 1975)
● : Larval Period in Days
△ : Velocity of Development

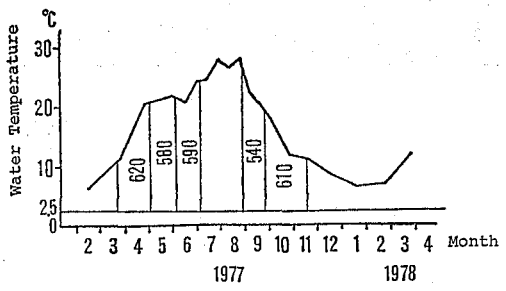


Fig. 5. Water Temperature (11 : 00 A. M.) at the Omiya Br. in the River Zempukuji, February 1977—March 1978
Figure : Thermal Constant (Temperature of 2. 5° for the Developmental Zero)

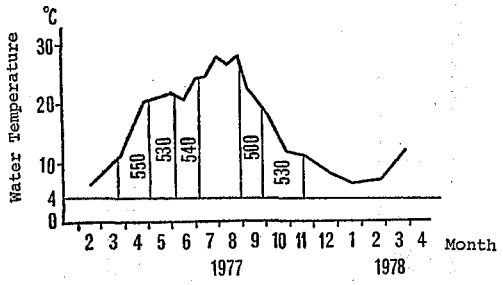


Fig. 6. Water Temperature (11:00 A. M.) at the Omiya Br. in the River Zempukuji, February 1977—March 1978
Figure : Thermal Constant (Temperature of 4. 0° for the Developmental Zero)

る[9-15]．また貯水池に生息するものは1世代の有効積算温度（有効温量）が1, 000—2, 000日度と報告されている[9-11]．年中産卵し，卵から成虫まで13—14日であるという熱帯地方のもの[16]を除き，現在，世代数や生長期間の知られているユスリカ類の中では，セスジユスリカは，1世代に必要な温量が小さく，年間の世代数の多いものの1つであろう．

セスジユスリカの大量発生を防ぐには東京近辺ではほぼ1ヶ月の間隔で薬剤を散布すればよいと思われる．成虫が大量に羽化していない時期などを狙うようにして散

布を効果的に行なう必要があると思われる．また，抵抗性の増大にも注意しなければならない．

以上述べてきたように，この産卵時期を調べる方法により，善福寺川のセスジユスリカの世代数を比較的明瞭に算定できた．ユスリカの生活史の調査で現在よく用いられている令期解析による方法，ライトトラップ，エマーゼントラップによる方法，個体数の動態を解析する方法などと併用することにより，より明確に年間の世代数を算定できよう．また，日長の影響[17]も考慮に入れなければならず，セスジユスリカの生活史を明らかにしていくためには，詳細な観察，精密な実験が必要と思われる．

摘　要

1. 善福寺川のセスジユスリカの産卵時期を1976年9月から77年12月まで調査した．

2. 77年には3月中旬から12月初旬まで産卵がみられ，ほぼ1ヶ月の間隔で産卵のピークがあった．

3. 産卵のピークから善福寺川のセスジユスリカは年8世代であると算定できた．

4. 発育限界温度を2.5°，4°とすると，1世代に必要な有効積算温度（有効温量）はそれぞれ590，530日度であった．

5. 薬剤散布は1ヶ月の間隔が適当と思われた．

（本研究の概要は日本陸水学会第43回大会1978年7月に発表した．）

文　献

1) 大野正彦，松本浩一：東京衛研年報，29-1，405，1978
2) 代田昭彦：アカムシの研究，1975，恒星社厚生閣
3) 田中淳雄：関西昆虫学会会報，9，19，1939
4) Mackey, A. P.: *Oikos*, 28, 270, 1977
5) 北川礼澄：陸水雑，30，59，1969
6) 御勢久右衛門：陸水雑，31，96，1970
7) 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
8) 森谷清樹：衛生動物，28，63，1977
9) Mundie, J. H.: *Trans. R. Ent. Soc. Lond.*, 109, 149, 1957
10) Potter, D. W. B. and Learner, M. A.: *Arch. Hydrobiol.*, 74, 186, 1974
11) Sokolova, N. Y.: *Limnologica (Berlin)*, 8, 151, 1971
12) Yamagishi, H. and Fukuhara, H.: *Oecologia*, 7, 309, 1971
13) Smith, G. E. and Young, J. O.: *Arch. Hydrobiol.*, 72, 333, 1973
14) Rosenberg, D. M., Wiens, A. P., and Saether, O. A.: *J. Fish. Res. Board. Can.*, 34, 247, 1977
15) Ringe, F.: *Arch. Hydrobiol. suppl.*, 45, 212, 1974
16) 水野寿彦：熱帯アジアの自然をさぐる，1974，築地書館
17) Englemann, W. and Shappirio, D. G.: *Nature*, 207, 548, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 30-1, 260-264, 1979

キャピラリーカラムによるPCDFの分析

中川順一*, 森田昌敏*, 樋口育子*

Analysis of Polychlorinated Dibenzofurans by Gas Chromatography using Glass Capillary Columns

JUNICHI NAKAGAWA*, MASATOSHI MORITA* and YASUKO HIGUCHI*

Keywords: ポリ塩化ジベンゾフラン polychlorinated dibenzofurans, キャピラリーカラム capillary columns, PCBの熱分解 PCB pyrolysis, PCDFの生成 PCDF formation

はじめに

ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)は，ポリ塩化ジベンゾジオキシン(PCDD)とともに強毒性を有する化学的に安定な物質である．これらの強毒性物質はペンタクロロフェノール (PCP) などの塩素系農薬，除草剤のなかにby-productとして存在する．またPCDFは商品PCB中にも存在し[1-4]カネミ油症を起こしたライスオイル中[5,6]，さらには油症患者の肝臓中からも検出されている．我々は商品PCBの加熱からPCDFが生成し，またその生成には酸素が必要であり，銅金属が触媒作用をもつことを報告した[7]．またRappeら[8]は，燃焼炉から排出されるfly ash中にPCDF，PCDDを検出し，熱処理に対する問題を報告している．PCDFの毒性については，ニワトリの胚肝臓をもちいてAryl Hydrocarbon Hydrogenase (AHH) 誘導能が検討され，その毒性は著しい構造依存性をもっていることが解明された．つまりPCDFの毒性を評価する場合は，個々の異性体の組成が問題になってくる．しかしPCDFは，全部で135個の異性体が存在し，この多数のPCDF異性体を分離するためには非常に分離の良いカラムが必要になってくる．我々は今回ガラスキャピラリーカラムをもちい，PCDF異性体を分離し，そのRefractive Index[9] (RI) 及びDDEに対する相対保持時間を測定し，PCDF異性体のガスクロマトグラフィーによる同定を試みた．また実際の応用としてPCB異性体の加熱によって生成するPCDF異性体のいくつかの同定を試みた．

実験の部

1. PCDFのキャピラリーカラムクロマトグラフィー

1—1) 標準物質 PCDF標準物質は，ロチェスター大学のProf. Kende, NIHのDr. Mckinny, Umeá大学のProf. Rappe, 大阪府公害監視センターの奥村氏より供与されたPCDF標準品と，我々が合成したPCDF標準品を合わせ23個のPCDF異性体をガスクロマトグラフィー用標準品として用いた．

1—2) 装置 GCは島津 4BMを使用した．キャピラリーカラムをECDに接続し，ECDのVentとFIDのInjection Portを直結した．すなわちキャリアーガスはカラムからECD，FIDへと流れる．流路図は，Fig. 1に示すとおりである．キャピラリーカラムは，OV-17 (0.28mm × 30m) をもちい，injection temp. 250°, column temp. 215° で分析した．

1—3) Refractive Indexの測定 GC分析上，PCDFはECDに，炭化水素はFIDに鋭敏であるので，PCDF異性体と炭化水素を混合して，GCに注入し，ECD，FIDの信号を同時に記録した．計算はコンピューターHitac 10Ⅱを使って行ない，プログラムはLESQ 1. 17. 1を使用した．

2. PCB異性体からのPCDFの加熱生成

2—1) 試料の作成 PCB異性体 (2, 3, 2′, 3′-, 2, 4, 2′, 4′-, 2, 5, 2′, 5′-, 3, 5, 3′, 5′-, 2, 4, 5, 2′, 4′, 5′-, 2, 4, 6, 2′, 4′, 6′-) の各々を100mgずつ，内径8mm，長さ200mmのパイレックスガラス封入管に入れ，O_2ガスとともに封管し300°の恒温そう中で1週間加熱した．加熱後，封入管の上端を切断しn-ヘキサン10mlに溶解し，つぎに粒状の水酸化ナトリウムで激しく振ったのちN_2ガスを吹きつけ1mlに濃縮したものをアルミナカラムクロマトグラフィー用試料とした．

2—2) 分析方法 アルミナカラムは，前回まで湿式充てんしていたが多くの試料をあつかう場合時間がかかるため，乾式法によるカラムの検討を行ない乾式充てんしたカラムで十分PCDFが分離できることがわかったので今回は乾式充てんしたカラムを用いてクロマトグラフィーを行なった．試料溶液をアルミナ (Merck社製，中性，活性度Ⅰ) 20gを乾式充てんしたガラスカラム (10

* 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

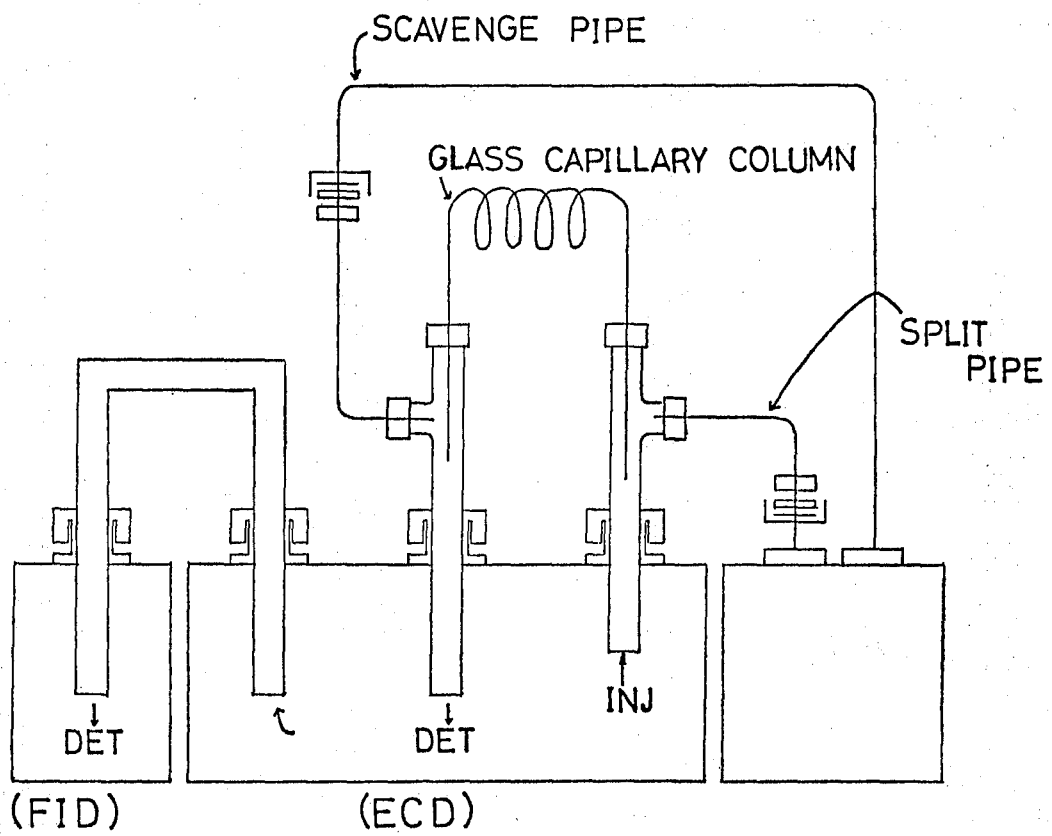


Fig. 1. Flow Diagram of Gas Chromatograghy

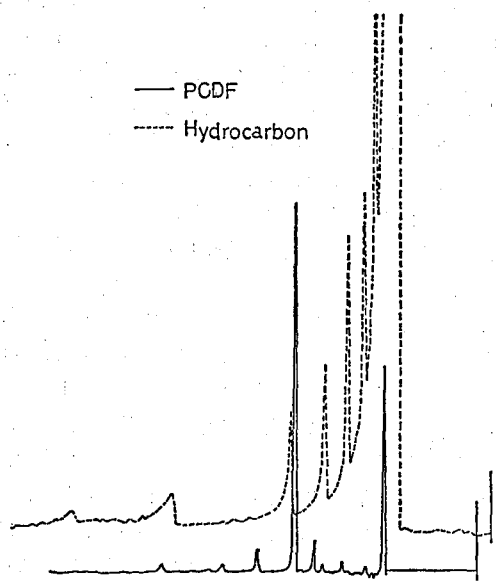


Fig. 2. Gaschromatogram of PCDFs and Hydrocarbons

Table 1. Retention Time of Hydrocarbons

炭化水素の保持時間	炭素数
4.41	16.0
4.82	17.0
5.41	18.0
6.28	19.0
7.53	20.0
9.45	21.0
12.01	22.0
15.83	23.0
21.27	24.0

mm×300mm）の上部に流入し，ジクロルメタン—ヘキサン（5：95）200m*l* で展開し，つづいてジクロルメタン—ヘキサン（20：80）200m*l* を流したのち，最後のフラクションをKD濃縮器で5m*l* に濃縮した．つぎに N_2 ガスを吹きつけ500μl に濃縮したものをガスクロマトグラフィーで分析した．

Table 2. Refractive Indices of Various PCDF Isomers

PCDF異性体	RI
Monochlorodibenzofuran	
2—	18.83
3—	18.75
4—	18.90
Dichlorodibenzofuran	
1,6—	19.52
2,6—	19.52
2,7—	19.44
2,8—	19.50
Trichlorodibenzofuran	
2,4,6—	20.45
2,3,8—	19.53
1,2,6—	20.42
1,3,8—	19.52
1,3,6—	20.15
Tetrachlorodibenzofuran	
1,3,6,7—	20.52
2,3,6,8—	22.18
2,4,6,8—	21.80
1,2,4,6—	21.90
1,3,6,8—	21.61
Pentachlorodibenzofuran	
2,3,4,7,8—	24.29
1,3,4,7,8—	23.59
1,2,4,6,8—	23.62

Table 3. Relative Retention Time of PCDF Isomers

PCDF異性体	相対保持時間 (PCDF/DDE)	
	OV—101	OV—17
2—	0.266	0.276
3—	0.266	0.276
4—	0.265	0.276
1,6—	0.540	0.459
2,6—	0.468	0.459
2,7—	0.429	0.409
2,8—	0.433	0.421
1,2,6—	0.749	0.782
2,3,8—	0.824	0.860
2,4,6—	0.749	0.780
2,3,6,8—	1.404	1.522
1,3,6,7—	1.294	1.321
1,3,6,8—	1.137	1.094
2,3,7,8—	——	1.739
2,4,6,8—	1.213	1.283
1,2,4,6—	1.268	1.377
3,4,6,7—	——	1.845
2,3,4,7,8—	2.818	3.576
1,3,4,7,8—	2.371	2.552
1,2,4,6,8—	2.385	2.557
1,2,4,7,8—	2.367	2.602
2,3,4,6,8,9—	4.694	5.597
1,2,3,4,6,7,8,9—	7.590	9.708

結果及び考察

炭化水素とPCDF異性体のガスクロマトグラムをFig. 2に示した．また炭化水素とPCDF異性体の保持時間をTable 1に示した．炭化水素の炭素数と保持時間の関係からPCDF異性体の保持時間に相当する炭化水素の数値を求めたRefractive Index (RI)をTable 2に示した．PCBの異性体において，そのRIは片方ずつの置換ベンゼン環のRIの和として表わすことができることが知られている．しかしPCDFの場合，得られたRIと塩素位置の間には一定の関係をみいだすことはできずRIを使ってPCDF異性体の保持時間を決定することはできなかった．その理由としては，PCBのように2つの環が自由に回転できる構造のものとは異なってPCDFのような対称性の低い構造のものには応用できないと思われる．DDEを内部標準として23個のPCDF異性体の相対保持時間を測定した結果をTable 3に示した．またPCB異性体から熱生成するPCDF異性体のDDEに対する相対保持時間をTable 4に示し，またFig. 3にPCB異性体の加熱から生成するPCDF異性体のガスクロマトグラムを示した．これらの多くは標品PCDFの保持時間と一致せず同定できないものが多かった．2, 4, 5, 2′, 4′, 5′-PCBからの生成物は2,3,7,8-CDF, 2, 3, 4, 7, 8-CDF, 1, 3, 4, 7, 8-CDFと推定された．この反応メカニズムについては，つぎのような可能性が考えられる．2, 4, 5, 2′, 4′, 5′-PCBから，加熱によって生成するPCDF異性体の反応メカニズムをFig. 4に示した．

第一の経路は，オルト位の塩素が1つ脱離し酸素が入り閉環し，1, 3, 4, 7, 8-CDFが生成すると考えられる．第二の経路は，オルト位の塩素が1つ脱離し酸素が入り閉環すると同時に1位の塩素が2の位置へ転位し，2, 3, 4, 7, 8-CDFが生成し，つぎに4の位置の塩素が脱離し，2, 3, 7, 8-CDFが生成すると考えられる．これらのことについては，今後さらに検討する．現在まで塩素系農薬中のPCDF，PCDDは多く分析されているが焼却炉などでの高温処理によるPCDF，PCDDは余り報告がなく問題にされてこなかった．しかし今後ゴミ

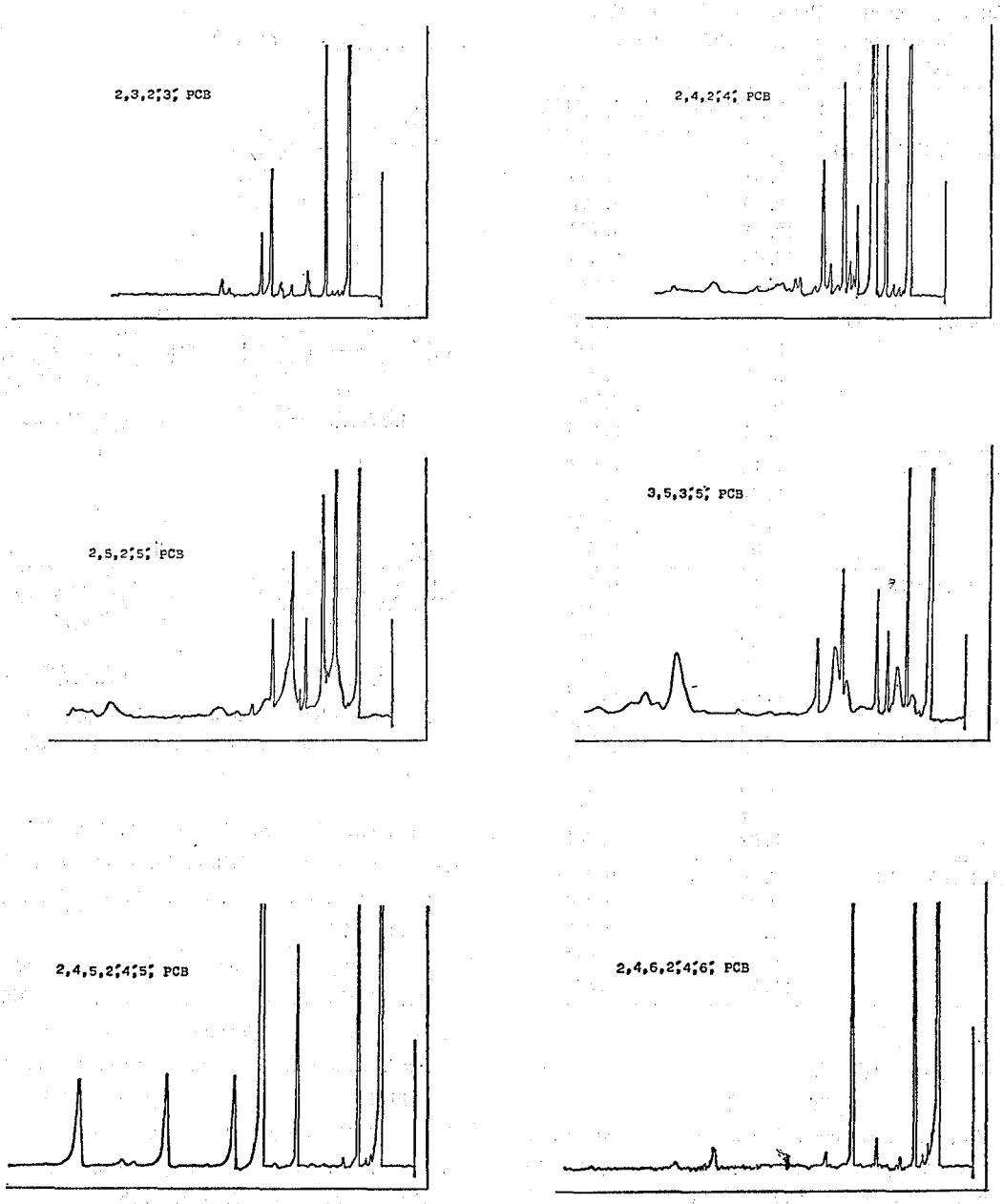


Fig. 3. Gas Chromatogram of PCDF Isomers Separated from PCB Isomers by Glass Capillary Column (OV-1)

処理焼却場などでの高温処理によりアロマティックな塩素系化合物から生成する未知の毒性物質による環境汚染が進行している可能性が十分にあるので，今後，未知物質の同定，またその毒性を検討していく必要がある．

謝辞 本研究を実施するにあたり御指導下さった当研究所秋山和幸主任研究員，ならびに三村秀一参事研究員に深謝する．

（本研究は，当所研究課題「環境汚染物質の点検」の一環として実施し，その一部は第37回日本公衆衛生学会総

Table 4. Relative Retention Time of PCDFs Formed by Heating of PCB Isomers (Column : OV-17)

	PCDF保持時間	相対保持時間
2, 4, 5, 2′, 4′, 5′-PCB	2. 04	0. 278
	3. 34	0. 456
	10. 46	1. 427
	12. 81	1. 748
	18. 68	2. 548
	26. 20	3. 574
2, 4, 6, 2′, 4′, 6′-PCB	2. 05	0. 278
	3. 37	0. 457
	5. 35	0. 726
	9. 64	1. 308
	19. 28	2. 616
2, 3, 2′, 3′-PCB	2. 18	0. 276
	3. 79	0. 469
	4. 84	0. 622
	7. 03	0. 892
2, 5, 2′, 5′-PCB	2. 14	0. 275
	3. 14	0. 411
	3. 29	0. 423
	4. 80	0. 618
	6. 02	0. 775
2, 4, 2′, 4′-PCB	2. 18	0. 280
	3. 23	0. 415
	3. 48	0. 447
	4. 77	0. 613
	5. 92	0. 761
3, 5, 3′, 5′-PCB	2. 19	0. 274
	3. 88	0. 486
	4. 85	0. 608
	10. 15	1. 272
	22. 73	2. 848

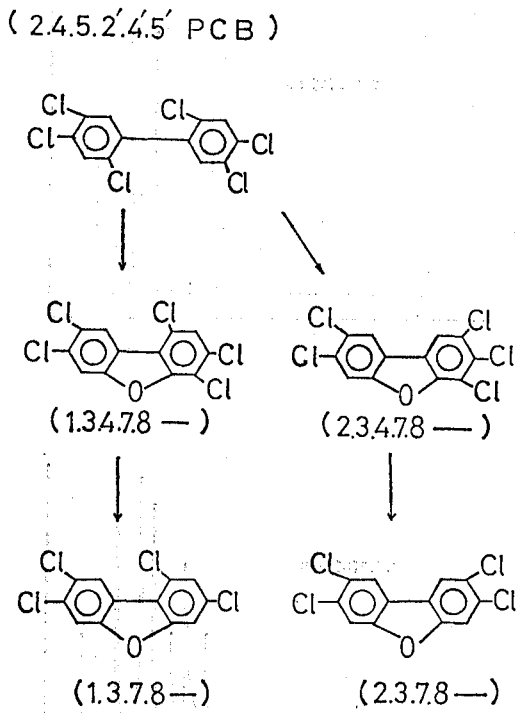


Fig. 4. Postulated Reaction Mechanism for PCDF Formation from 2, 4, 5, 2′, 4′, 5′- PCB

会1978年10月で発表した.)

文　献

1) Vos, J. G., Koeman, J. H., Van der Maas, H. L., Ten Noever de Braun, M. C., and Vos, R. H.: *Food Cosmet. Toxicol.*, 8, 625, 1973
2) Bowers, G. W., Simoneit, B. R., Burlingame, A. L., de Lappe, B. W., and Risebrough, R. W.: *Environ. Health Perspec.*, 5, 191, 1973
3) Roach, J. G. and Pomerantz, L. H.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 338, 1974
4) Bowes, G. W., Mulvihill, M. J., Decamp, M. R., and Kende, A. S.: *J. Agr. Food Chem.*, 23, 1222, 1975
5) Nagayama, J., Kuratsune, M., and Yamaguchi, A.: *Environ. Health Perspect.*, 1, 119, 1972
6) Nagayama, J., Kuratsune, M., and Masuda, Y.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 9, 1976
7) 中川順一，森田昌敏，秋山和幸，樋口育子，三村秀一：東京衛研年報，28-1, 260, 1978
8) Buser, H. R., Bosshardt, H.-P., and Rappe, C.: *Chemosphere*, 2, 165, 1978
9) Arbro, P. W., Haseman, J. K., Clemmer, T. A., and Corbett, B. J.: *J. Chromatogr.*, 136, 147, 1977

他 誌 発 表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1978. 7—1979. 6)

れ，各氏から出された意見を集録した．

毒素原性大腸菌

大橋　誠：医人薬人，28 (4)，11，1979

毒素原性大腸菌は下痢症の病原として，とくにコレラとの鑑別において大変重要な存在である．しかし，検査室診断の技術が煩雑で一般的でないため，現在これによる下痢症の全貌を知るには，やや資料不足の観がある．公衆衛生的にも臨床的にも，あまり注目を集めていない．そして，集団食中毒の形で認知されない限り，本症は予防行政的措置の対象とならないのが現状である．

激烈な伝染病が猖厥を極めた時代は終ったとはいえ，感染症がすべて過去のものとなったわけではない．広く感染症全体に対して，よりきめ細かく対策が見直されてしかるべきである．本菌による下痢についても，正確な診断がなされることは，コレラとの鑑別という意味からも大変有益である．

「コレラ菌検査の手引き」解説

大橋　誠：モダンメディア，25 (5)，386，1979

1979年2月19日付で発行された「コレラ菌検査の手引き」の作成に関与したものの一人として，多少の解説を加えることを依頼された．以下作成にあたっての基本的な考え方，早期診断と増菌培養時間の問題，同定のための検査項目と結果報告の時期，培地および診断用血清，検査室と行政機関との連携などの五項目に分けて，手引きの内容を紹介しながら，内容の補足説明を行なった．

既知病原菌が検出されない集団食中毒の細菌学的検討

坂井千三，伊藤　武，丸山　務，柳川義勢，斎藤香彦，稲葉美佐子，甲斐明美：厚生省研究報告書（昭和53年度）1979

1978年1月から12月までに東京都内に発生または関係があった食中毒事例数は135件，患者数3,646名であった．そのうち病因物質が細菌性のものは92事例，患者数2,760名である．このうち，1例は既知病原大腸菌に含まれない大腸菌による事例，2例は Bacillus cereus が原因菌と推定された事例であり，その疫学的，細菌学的成績について報告した．

市販食品におけるサルモネラの増殖態度

坂井千三，伊藤　武，斎藤香彦：厚生省研究報告書（昭和53年度）1979

サルモネラ食中毒予防の細菌学的基礎資料を得るために，今回は本菌食中毒の原因食品として重要な玉子焼とサラダ中におけるサルモネラの増殖態度について検討した成績を報告した．

表皮ブドウ球菌の同定と生物型

潮田　弘：検査と技術，6 (9)，730，1978

化学療法剤の普及，発達あるいは免疫抑制剤の使用など宿主側の抵抗力の減弱を来たすような種々の要因によって感染症が著しく変貌してきている．Staphylococcus epidermidis は一般に菌力が低く，起病性が Staphylococcus aureus に比して弱いと考えられ，それだけに軽視されがちである．しかしながら，近年，各種臨床材料からの本菌の検出率が上昇傾向にあり，Opportunistic infection の原因菌として注目されてきている．

S. epidermidis の実態を知るには，正確な同定が必要である．本菌と S. aureus との判別は比較的容易であるが，Micrococcus との判別が非常に紛らわしい．そこで，S. epidermidis を中心に Micrococcus との鑑別，簡易で正確な S. epidermidis の同定法について述べた．

食中毒におけるブドウ球菌の検査

寺山　武：メディヤサークル，23 (10)，269，1978

ブドウ球菌食中毒の細菌学的検査法および検出菌の型別法について述べた．また実際の食中毒事例の細菌学的検査結果を例示し，食中毒事件の汚染源の推定と原因決定の根拠について述べた．

臨床材料および健康人由来表皮ブドウ球菌の生残におよぼす RH（相対湿度）などの影響

潮田　弘，辻　明良，小川正俊，五島瑳智子，寺山武，坂井千三：臨床と細菌，6 (1)，110，1979

近年，臨床材料から高率に検出される Staphylococcus epidermidis が注目されている．私どもは各種臨床材料および健康人由来株の生残におよぼす乾燥，RH（相対湿度）条件ならびにウサギ，ヒト血清中での増殖態度について検討した成績について述べた．

新しいブドウ球菌食中毒の検査法

寺山　武：*Medical Technology*，7 (2)，115，1979

これまでの食中毒原因の決定のための検査は原因食品と推定される食品および患者の吐物やふん便などからの病原菌の検出によっていた．ブドウ球菌食中毒は毒素型食中毒であり，エンテロトキシンによる中毒症であるから，原因食品から直接本毒素を検出することが理想的な検査法であるといえる．本報では，最近著者らによって開発された逆受身赤血球凝集反応（RPHA）によるエ

ンテロトキシン検出法の概略を述べた.

Purification of staphylocoagulase by affinity chromatography

Igarashi, H., Morita, T. and Iwanaga, S. : *JAPAN. J. MED. SCI. BIOL.*, 32 (2), 90, 1979

Staphylocoagulase is an extracellular protein produced by *Staphylococcus aureus*. The role of staphylocoagulase in staphylococcal infection is not yet clear.

This protein exerts clotting effect on plasmas derived from several animal species. Several authors (Duthie and Haughton, 1958; Murray and Gohdes, 1960; Zolli and San Clemente, 1963; Bas, Muller and Hemker, 1975) have reported on the purification of staphylocoagulase but none of them described a procedure yielding a product of sufficient purity. Complete biochemical or biophysical characteristics of staphylocoagulase has not yet been performed.

This paper deals with an affinity chromatography method for the purification of staphylocoagulase. The outstanding characteristic of this method is that staphylocoagulase is isolated in highly purified and concentrated state by one step of affinity chromatography without much loss of activity. The affinity column was prepared by covalently linking purified bovine prothrombin to commercially available activated Sepharose 4B.

野鳥のボツリヌスC型中毒に関する研究
—特にC型毒素の産生とカモに対する毒素の感受性—

伊藤　武, 斎藤香彦, 坂井千三, 田淵　清 : *Bull. Azabu Vet. Coll.*, 3 (1), 75, 1978

カモのボツリヌス中毒の際に検出された Clostridium botulinum type C の各種の温度域における発育と毒素の産生能および本毒素のカルガモとカーキー・キャンベルに対する感受性を検討した.

1. 15～43℃の温度域における本菌の発育と毒素産生を東の修正クックドミート培地で検討した結果, 至適発育温度は35～37℃, 至適毒素産生温度は30～32℃であった. なお, 15℃培養では培養3日より発育が認められ, 毒素も培養4日でみられた.

2. 4℃培養では毒素の産生は認められなかったが, 10℃培養では供試したC型菌6株中1株が培養30日で5×10MLD/m*l* 毒素を産生した.

3. C型毒素のカルガモに対する LD_{50}/kg は 1.9×10^5 マウス LD_{50}, カーキー・キャンベルでは 5.7×10^5 マウス LD_{50} であった.

4. 投与毒素量と血液に吸収される毒素量および症状の発現状況とは密接な関連が認められた.

5. カルガモおよびカーキー・キャンベルともに血液中の毒素量が40マウス MLD/m*l* 以上の場合は, 典型的な神経症状が発現し, 斃死した.

Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from Apparently Healthy Dogs and Cats

Y. Yanagawa, T. Maruyama and S. Sakai : *Microbiol. Immunol.*, 22(10), 643, 1978

The authors reported previously the distribution of *Yersinia enterocolitica* in healthy humans, livestock, foodstaff and natural environment.

In the present survey, distribution of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in dogs and cats, which have close relations to humans as pet animal, was investigated to obtain more extensive ecological informations of the organism. A total of 704 stray or unwanted adult dogs and unwanted adult cats were submitted the survey.

Y. enteroclitica was isolated from 42 (6.0%) of dogs and 11 (2.9%) of 373 cats. Serotypes of 59 strains of *Y. enterocolitica* isolated from dogs, 43 were identified as O-group 3, 13, as O-group 5B. As for *Y. pseudotuberculosis*, 13 (1.8%) dogs and 12 (3.2%) cats were found to be positive. There was a tendency that the recovery rate of *Y. enterocolitica* was a little high in autumn and winter in both animals.

ミニテック

伊藤　武 : *Medical Technology*, 7 (3), 216, 1979

各種の臨床材料などから検出した病原菌を同定する場合, つねに正確性と迅速性が要求される. 最近, その目的にそった検査手法がいくつか開発され, 検査室で広く利用されつつある. 本稿では主として腸内細菌を対象とした Minitek 法を紹介し, その長所および欠点などについて私見を述べた.

長所としては, 腸内細菌の同定には生化学的性状がコード化されており, 解析表によって初心者でも容易に同定することができることや, 試験管法と比較してもその得られる成績の信頼性は高いなどがあげられる. 一方短所としては, 判定までの時間が1日あるいは2日間必要

であり，迅速性にかけることや，専用の器具器材が必要であり，また準備に多少時間がかかることなどがあげられた．

輸入感染性腸炎の実態とその検査

工藤泰雄：臨床と細菌，6 (1)，46，1979

最近，わが国における海外旅行者の増加には著しいものがあり，それに伴いまだ各種伝染症が常在している開発途上国などから旅行者が持ち帰る“いわゆる輸入感染性腸炎”が新らたに大きな問題となってきている．

ここでは，こうした輸入感染性腸炎の現況について，私共の成績を中心に概説し，病原との関連から考察を加えた．併せて，その検査のあり方について述べた．

空中真菌相

一言　広：マイコトキシン，5-6号，14，1977

各種の食品における汚染真菌の汚染源の一つとして空中浮遊真菌の重要性を指摘した．空中浮遊真菌のうち優先菌属としては*Aspergillus*,*Penicillium*,*Cladosporium*および*Alternaria*の4菌属で，これらの菌属の優先性は諸外国における場合にも共通している．これらの4菌属中優先菌種とみられたものは，*C. cladosporioides*, *C. cucumerinum*, *C. sphaerospermum*, *A. versicolor*, *A. niger*, *P. frequentans*, *P. funiculosum*, *P. variabile*および*Al. alternata*などであった．

検出真菌中のカビ毒産生菌としては aflatoxin 産生性*A. flavus*が全検出菌の0.1%を占め，sterigmatocystin 産生性 *A. versicolor* は 0.8%，さらに ochratoxin A 産生性 *A. ochraceus* は0.1%をそれぞれ占めている．これらのカビ毒産生性菌株の検出率は，各種の食品の検出率に比べてやや低い値である．これらの検出率は空中浮遊菌の場合は空気の採取法によっても相違するが，試料採取の地理的相違もかなり認められる．

Mycotoxin Production of Fungi on Commercial Foods

H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and H. Kurata: *Mycotoxins in Human and Animal Health*, 479, 1977

Mycotoxin production was investigated in 27 kinds of commercial foods artificially inoculated with following representative toxigenic fungi, i. e., aflatoxin-producing strain of *Aspergillus parasiticus* NRRL-3000, sterigmatocystin-producig strain of *A. versicolor* I-20-b, ochratoxin A-producing strain of *A. ochraceus* 10-21-N, and *Fusarium* toxin-producing strain of *Fusarium solani* F-135.

It was observed that among vegetable and food products tested, dried sweet potato and salami sausage were favorable substrates for the production of several kinds of mycotoxins and dried persimon was favorable for sterigmatocystin production. Pepper, roasted coffee bean and cinnamon bark were not susceptible to mycotoxin contamination under the moistened condition.

Substances contained in a chloroform extract of cinnamon and pepper inhibited the growth of the four toxigenic fungi. These results indicate that cinnamon and pepper might contain inhibitory materials.

シナモン成分中の新抗真菌物質について

諸角　聖：真菌と真菌症，19(2)，172，1978

シナモン粉末から抗真菌活性物質の単離を試み，強い抗真菌活性を有する orthomethoxycinnamaldehyde を得た．本物質は $C_{10}H_{10}O_2$，分子量162，熱に安定，水に難溶で多くの有機溶媒に易溶な淡黄色薄片状結晶である．また，本物質は供試した4菌種の mycotoxin 産生菌の発育を 100～200μg/ml の濃度で完全に阻止し，各菌の毒素産生を 6.25～50μg/ml で90%以上阻害した．さらにこの物質は Microsporum canis を始めとする5種の皮膚糸状菌に対して強い抗菌活性（MIC;3.12～6.25μg/ml）を示した．しかし抗細菌作用は 50μg/ml の濃度でも発現しなかった．

Inhibitory Effects of Condiments and Herbal Drugs on the Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi

H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and I. Ueno: *Mycopathologia*, 66 (3), 161, 1978

The effects of thirteen kinds of powdered herbal drugs and seven kinds of commercial dry condiments on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, and *A. versicolor* were observed by introducing these substances into culture media for mycotoxin production.

Of the twenty samples tested, cinnamon bark completely inhibited the fungal growth, while the other only inhibited the toxin production.

The inhibitors were easily extracted from the samples with solvents such as hot water, chloroform,

or ethanol.

The extracts from coptis, philodendron bark, mustard, green tea leaves, and zanthoxylum completely inhibited the aflatoxin production of *A. parasiticus*, however, they had little or on inhibitory effect against *A. flavus*.

Fungal Contamination and Mycotoxin Detection of Powdered Herbal Drugs

H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and H. Kurata: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36 (2), 252, 1978

Forty-nine powdered herbal drugs were analyzed for their mold profile and for the potential presence of three mycotoxins (aflatoxin, sterigmatocystin, ochratoxin A). *Aspergillus* and *Penicillium* species were predominant, but *Rhizopus*, *Mucor*, *Cladosporium*, and *Aureobasidium spp.* were also found in a few samples. Mycotoxins were not detected in any samples, and only one isolated culture was found to be a mycotoxin producer on laboratory media.

Isolation, Purification, and Antibiotic Activity of o-Methoxycinnamaldehyde from Cinnamon

S. Morozumi: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36 (4), 577, 1978

o-Methoxycinnamaldehyde has been isolated and purified from powdered cinnamon. The compound inhibits the growth and toxin production of mycotoxin-producing fungi. The substance completely inhibited the growth of *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus* at 100μg/m*l* and *A. ochraceus* and *A. versicolor* at 200μg/m*l*. It inhibited the production of aflatoxin B_1 by over 90% at 6.25μg/m*l*, ochratoxin A at 25μg/m*l*, and sterigmatocystin at 50μg/m*l*. The substance also displayed a strong inhibitory effect on the growth of five dermatophytoses species, e. g., *Microsporum canis* (minimum inhibitory concentration, 3.12 to 6.25μg/m*l*). However, no antibacterial effect was observed at concentrations as high as 50μg/m*l*.

A群溶連菌の疫学

大久保暢夫：MEDICO 9, (10), 3, 1978

A群溶連菌について，学童における保菌率，菌型およびその抗生物質感受性等の最近の調査成績を述べた．

下水からのウイルス分離

岩崎謙二，藪内　清，矢野一好，柴田タツ美：臨床とウイルス，6 (3), 55, 1978

都内の定地点において定期的に逐月採取した下水検体について行なった1967年8月～77年12月までのウイルス検索成績に基づいて，過去12カ年間に都民の間で発生したエンテロ，アデノ，レオ諸ウイルス感染流行の年次推移および季節消長を解析するとともに，住民個人検体からのウイルス検出状況との対比を行なって下水ウイルスの疫学的意義を究明した．

下水から検出されるウイルス種類は非常に多種多様であるが，高頻度に検出されるウイルス種類はほとんど毎年変ぼうした．総括的にみるとコクサッキーB群およびエコーの各型ウイルスの感染主流行は単年次で終息し，5～7年の間隔をおいて同型ウイルスの主流行は再び発生し，またアデノ，レオの各型ウイルスの主流行は次年にわたって発生する傾向があった．

コクサッキーB群およびエコー各型ウイルスの感染は夏季に多く発生し，アデノ，レオ各型ウイルスの感染は四季を通じて発生することも明らかにできた．

下水検体から検出されるウイルス種類およびその季節消長パターンは同時併行して実施した住民とくに幼児からのウイルス検出状況とよく一致することから，住民における腸管系ウイルス感染実態は下水の中のウイルス分布に密接に反映していることが推察できた．

腸管系諸ウイルスの感染は不顕性の経過で終ってしまうことが多いため，全体の感染実態をは握するには，健康住民の検体をも含めた広汎な検索が必要である．下水はそのような目的の調査にはもっとも適した検体である．

エンテロウイルスの検査法

岩崎謙二：臨床とウイルス，7 (1), 71, 1979

エンテロウイルスの諸検査は現在非常に一般化した技術となっており，検査目的ばかりでなく研究目的にも広く利用されている．近年のエンテロウイルス検査法は技術の面でもまた応用分野の面でも多くの改良発表をみている．本誌ではそれらの概要を解説紹介した．

Protein A Affinity Chromatography 分屑と血清反応

武士俣邦雄，堀　幹郎，大久保暢夫：VD, 59, 21, 1978

現在用いられている梅毒の各検査法は，その特異的な反応原理を異にしているため，同一試料でもおのおのの

検査成績が一致しないことがあるうえ，Cardiolipin を抗原とする反応ではBFPを呈する場合もある．そこで，これらの原因を解明し，より精度の高い検査法に改良する目的で，各検査の反応に関与する血清成分の研究を行なうことにした．その第一段階としてIgGの1，2および4の各サブクラスなどがProtein Aに結合されるという性質を利用し，梅毒血清のAffinity Chromatographyを行ない，各分層の検査成績について検討をした．

まず，ヒト血清のProtein A-Sepharose CL-4Bを担体としたChromatographyでは，未結合部分，0.5M酢酸で溶離されるIgGなどを含んだ結合部分，さらには0.5M酢酸溶出に続いて溶出液をPBSに変換すると溶出される部分を光学的に確認した．次にこれらの各分画液をCentriflow Membrane CF-25を用いて濃縮し，使用血清容量に調整して各検査を行なった．その結果，全血清における抗体価が，VDRL 1：2，CF 1：32，TPHA 1：320およびIgG-FTA 1：320であったのに対し，Protein A未結合部分および0.5M酢酸溶出後にPBSで溶出される部分では，いずれの検査方法でも抗体価は認められなかった．しかし，0.5M酢酸溶出部分ではTPHA法だけではあるが1：80の抗体価を認めた．そこで，0.5M酢酸で溶出される部分のTPHA抗体価について調べたところ，全血清で1：1,280のものが陰性となったり，陰性であったものが1：1,280になるような特殊な現象も観察された．これらの問題点についてさらに検討を行なう．

医薬品等の安全性に関する調査研究

粉末生薬における汚染カビ

西川洋一，瀬戸隆子，安田一郎，一言　広，諸角　聖，坂井千三：生薬学雑誌，32 (3)，15，1978

生薬の汚染カビおよびmycotoxin汚染の危険性を把握するため，1975年東京市場品の日本薬局方生薬粉末（500g包装）13種49検体についてその実態を調査した結果，aflatoxin，ochratoxin Aおよびsterigmatocystinによる汚染は認められなかったが，オウレン末などの10種には多数の糸状菌が認められ，カンゾウ末の1検体より分離した*Aspergillus flavus*にaflatoxin B_1およびB_2産生性が認められた．一方ケイヒ末，サンショウ末およびキキョウ末においては汚染カビ数が比較的少なかった．なお汚染カビ中高頻度に見いだされた菌属は*Penicillium*（49.6%）および*Aspergillus*（49.0%）で*Aspergillus*中*A. niger*菌群が52.4%を占め最も高頻度に検出された．これら菌属および菌群の分布は生薬の種類により著しい差は認めなかった．以上の結果から，生薬がカビ汚染により変質または変敗，場合によってはmycotoxin汚染の危険性のあることが示唆された．

食品等の安全性に関する調査研究

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

五十嵐英夫，山田澄夫，寺山　武：モダンメディア，24 (10)，519，1978

ブドウ球菌食中毒は本菌が食品中で増殖し，産生した毒素を含んだ食品をヒトが喫食することによっておこる急性胃腸炎である．その最もよい診断法は推定原因食品からエンテロトキシンを直接証明することである．そのため，多くの研究者がエンテロトキシンの種々の検出法を考案してきた．著者らは，逆受身赤血球凝集反応（RPHA法）を再検討して，特異性と検出感度の高い，簡易迅速化のできるRPHA法を確立し，エンテロトキシンA～Eの検出のための日常検査に応用し，好結果を得ていることを述べた．

カルシウム，リンおよびマグネシウム出納におよぼす縮合メタリン酸塩の影響

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

飼料中の正リン酸塩類を縮合メタリン酸カリウムに置換してラットに投与してCa，Pおよび Mg出納におよぼす影響を観察した．それらの結果を要約すると次のとおりである．

1) 体重増加：実験群のラット体重は対照群のそれと比較して増加する傾向を示した．

2) Ca，Pおよび Mg出納：実験群のCa吸収率は，対照群のそれと差はなかったが尿中排泄量が少ないため，体内保留率は対照群より実験群のほうが高く，Mg吸収率は実験群のほうが低いが尿中排泄が少ないため体内保留率は対照群より多い．またPの吸収率，体内保留率も実験群のほうが高く，Ca，Pおよび Mgともに対照群との間に有意な差が認められた．

3) 屍体のCa，Pおよび Mg量：屍体のCa，Pおよび Mg量は，実験開始時，終了時いずれの時期も対照群と実験群との間に有意な差が認められなかった．ただし開始時と終了時ではいずれの群もCa，P量は増加したが，Mg量は逆に低下した．

サリノマイシンおよびモネンシンの生物学的検査法の検討

松本昌雄，神崎政子，村上　一：昭和53年度食品衛生調査報告書 1979

昭和53年9月の「飼料及び飼料添加物の成分規格に関する省令」の一部改正にともなって，サリノマイシンとモネンシンの抗コクシジウム剤2種が新たに使用許可されるに至った．そこで，鶏の組織中に残留する両抗コクシジウム剤の検査法を確立する目的で，すでに報告されている残留検査法について追試検討を行って，それぞれの微生物学的検査法を作成した．

アンピシリンおよびエリスロマイシンの生物学的検査法の検討

松本昌雄，神崎政子，村上　一：昭和53年度食品衛生調査報告書 1979

近年，アンピシリン並びにエリスロマイシンが，動物治療薬として広汎に使用されるに至り，それらの食肉への移行残留が懸念され，食品衛生上それらの残留検査法の確立が望まれている．そこで，食肉中に残留する両抗菌性物質について基礎的実験検討を行って，それぞれの微生物学的簡易検査法を作成した．

食品中のマイコトキシンに関する研究（第8報）　穀類中のトリコテセン系マイコトキシン試験法

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：食衛誌，19 (5)，443，1978

赤カビ（*Fusarium* 属菌）による穀類の汚染がしばしば発生しており，その有毒代謝産物であるトリコテセン系マイコトキシン（以後トキシンとする）によると考えられる中毒が発生している．自然汚染穀類から分離した各種の *Fusarium* 属菌は培養によりいずれも複数のトキシンを産生することが報告されている．

そこで我々は，数種のトキシンによる複合汚染を考え，6種類のトキシン（Deoxynivalenol，Nivalenol，Fusarenon-X，Diacetoxyscirpenol，Neosolaniol および T-2 toxin）の同時分析を試み，試験法を検討した．

抽出は，粉砕した試料にメタノールを加え振とう抽出を行った．抽出後の精製操作では有効なカラムクロマトグラフィ用担体の検討が従来から望まれていたが，アンバーライト XAD-2 カラムとフロリジルカラムを使用することにより，この問題を解決することができた．クリーンアップした後のトキシンの TMS 誘導体は，2％OV-17を用いたガスクロマトグラフィーにより分離，安定性および感度のいずれの点においても良好な結果が得られた．

小麦粉，大麦，コーンおよび精白米にトキシンを添加し，本法を適用したところ，Neosolaniol 付近に妨害ピークが現れ，定量値に影響を与えたが，他については特に妨害がみられず，回収率は68～101％であった．

市販穀類およびそれらの製品42検体について本法を適用したところ，いずれからもトキシンは検出されなかった．

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

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：*Proc. Jap. Assoc. Mycotoxicol.*, 8, 14, 1978

最近，我が国産麦から，赤カビの代謝産物であるトリコテセン系マイコトキシン（以後トキシンとする）のうちで Deoxynivalenol および Nivalenol の自然汚染例が報告され，その汚染実態が明らかになってきた．

そこで我々は，穀類および小麦粉などの食品原料が汚染された場合，それら原料を用いて調理または食品加工した際，熱あるいは食品添加物などによりトキシンが分解するかどうかモデル実験を行い検討した．

調理加工では「焼く」「煮る」「揚げる」などの処理をする場合が多い．そこでそれらの代表的な食品としてパン，インスタントラーメン，うどんを選び，原料に6種類のトキシン(Deoxynivalenol, Nivalenol, Fusarenon-X, Diacetoxyscirpenol, Neosolaniol および T-2 toxin) を添加した後，パンは210°で20分間オーブン中で焼いた．インスタントラーメンは140°の油中で2分間揚げた．うどんは沸とう水中で10分間ゆでた．

それぞれの食品を作製した場合のトキシンの残存率はパンでは40～67％程度が残存した．インスタントラーメンは Deoxynivalenol が28％程度，Nivalenol が32％程度残存するが他のトキシンは検出されなかった．うどんは41～68％程度が残存することが判明した．

食品中のマイコトキシンに関する研究（第9報）　乳製品中の Aflatoxin 分析法および汚染実態調査

斉藤和夫，西島基弘，上村　尚，井部明広，落合節子，直井家壽太：食衛誌，20 (1)，27，1979

Aflatoxin B_1 および B_2 に汚染された飼料をウシが摂取した場合，aflatoxin M_1 および M_2 に代謝され一部乳に移行することから，乳製品が aflatoxin に汚染されている可能性が十分考えられる．

そこで著者らは市販調製粉乳 113 検体，脱脂粉乳16検

体，コンデンスミルク56検体，生クリーム13検体およびチーズ83検体についてaflatoxinの汚染実態調査を行った．その結果輸入ナチュラルチーズ17検体より M_1 が0.2～1.3ppbの範囲で検出された．

チーズのaflatoxin汚染はその製法また由来などを考えた場合，部分汚染でなく製造ロットごとに均一に汚染されていることが考えられる．またチーズはすべての部分が可食部であること，また近年消費が増大していることなどから，たとえ低濃度汚染であっても検出されたことは M_1 が強力な発ガン物質であることから食品衛生上特に留意する必要がある．

クロレラの衛生学的研究（第1報）　クロレラ錠摂取による光過敏性皮膚炎の原因物質とその生成過程について

田村行弘，真木俊夫，嶋村保洋，西垣　進，直井家壽太：食衛誌，20 (3)，173，1979

昭和52年4月，クロレラ錠服用者間で顔や手の甲を主とする皮膚炎が続発し，東京近郊に23名の患者が発見されたので原因究明を行った．生物試験と化学試験の結果，この皮膚炎は光過敏症であり，当該クロレラ錠に多量含まれたchlorophyll分解物の関与により起きたことを明らかにした．またchlorophyll分解物の主体は，pheophorbide aとそのエステル類であり，乾燥クロレラ原末中のchlorophyllaseによるchlorophyllの分解が，顆粒製造に使われた含水エタノールにより促進されて生じたことをつきとめた．

生活環境保全に関する調査研究

Isolation and Identification of 1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy)benzene (CNP) in Shellfish

Tatsunori Yamagishi, Kazuyuki Akiyama, Masatoshi Morita, Rieko Takahashi and Hajime Murakami: *J. Environ. Health*, B13 (4), 417, 1978

1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (CNP), a widely used herbicide in Japan, has been identified in environmental biota for the first time. CNP was isolated from mussel collected in Tokyo Bay and confirmed by GC-MS, IR and UV spectra. The residual levels of CNP in the shucked samples was approximately 1ppm on wet basis.

ブタのポルフィリン尿症に関する研究（第1報）　一時尿中の δ-ALA および Cp の濃度について

武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，道口正雄，三宅　勉，山下千恵，斎藤公志，島崎秀雄，小林幸三，吉岡良雄，三木　博：東京都衛生局学会誌，62，256，1979

最近，多摩食肉衛生検査所において，と殺ブタの臨床病理所見から，ポルフィリン症を疑わせる異常症例が観察され，その診断と病因の究明が要望された．

現在，ブタ肉は庶民の動物性のタンパク質および脂質の供給源でもあり，ヒトに及ぼす二次的影響を考えると，栄養食品としての品質の確保は衛生行政上からも重要なことである．そこで著者らは，その異常症例ブタについて血清を用いた臨床生化学的定量検査を行なうとともに，尿中に排泄されるデルタ・アミノレブリン酸（δ-ALA）およびコプロポルフィリン（Cp）をも定量的に分析した．

この異常ブタの臨床生化学的定量値を総合的に判定したところ，溶血性でない強度の貧血を伴なっているうえ，心臓および骨あるいは腎臓の異常が疑われたが，主因については明らかにできなかった．

また，臨床所見的に正常であったブタ（n=51）の尿中 δ-ALA および Cp の推測統計的平均を求めたところ，δ-ALA：3.71±1.78mg/l（CV=0.4799，n=49）および Cp：92.5±22.9μg/l（CV=0.2480，n=50）であり，この時の棄却限界上限値は，δ-ALA：8.59mg/l および Cp：155.3μg/l であった．

これらの成績にくらべ，異常を認めたブタの尿中 δ-ALA の濃度 35.0mg/l は正常なブタの棄却限界上限値の4倍強であり，Cp の濃度 8996.5μg/l も正常ブタの棄却限界上限値の57.9倍にも達しており，このブタは原因不明の広義のポルフィリン尿症として診断された．

ブタのポルフィリン尿症に関する研究（第2報）　ふん便および胆汁中のポルフィリン体について

武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，道口正雄，三宅　勉，山下千恵，斎藤公志，島崎秀雄，小林幸三，吉岡良雄，三木　博：東京都衛生局学会誌，62，258，1979

前報において，正常なブタの一時尿中 δ-ALA および Cp の濃度水準を推測統計的に求め，臨床所見に異常があったブタが広義のポルフィリン尿症であったことを述べた．

一般に，ポルフィリン尿症の検索には，ふん便中に排泄されるポルフィリン体（ポ体）の検査も，診断上の意義が認められている．そこで著者らは，飼育中のブタのふん便を拾収して各種のポ体を分画定量するとともに，ふん便中にポ体をもたらす胆汁についてもと殺ブタの胆のうから採取して同様な定量を行なった．

1) ふん便中の Cp 量(n=39)のF分布の危険率1％水準における棄却検定後の平均値は27.5±13.8μg/wet 100g (CV=0.5023) であり，その棄却限界上限値は65.9μg/100g であった．また，危険率5％水準における棄却後の平均値は21.9±6.7μg/100g (CV=0.3019) となり，この時には棄却限界上限値35.9μg/100g よりも高値であった7例が棄却された．なお，プロト，ペンプトおよびデュテロの各ポルフィリン体はきわめて微量であった．

2) 正常ブタの胆汁中 Cp 濃度の変動率は19.49％であり，その平均値は53.6±10.5μg/dl であった．これに対し，異常ブタ5例の Cp 濃度は4,460～10,469 μg/dl に及ぶ高濃度を示した．この異常ブタの中には前報で広義のポルフィリン尿症として診断したものもあり，他の4例も同症として診断される．さらに，正常ブタのウロおよびプロトの各ポ体は低濃度であったが，異常ブタのそれらは1,000倍以上にも達する濃度であった．

ブタのポルフィリン尿症に関する研究（第3報） 臨床および病理組織学的所見について

山下千恵，島崎秀雄，斎藤公志，三宅 勉，小林幸三，吉岡良雄，三木 博，武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原 公，道口正雄：東京都衛生局学会誌，62，260，1979

前二報において，臨床所見に異常を認めたと殺ブタが，臨床生化学的検査にもとづいた成績によって，広義のポルフィリン尿症として診断されたことについて述べたが，本報においては，その外観および病理組織学的観察などについて報告する．

このような異常ブタは，1978年6月から1979年1月までの期間に14頭が確認され，各ブタは発育の遅れ，高度の貧血，ブドウ酒色調尿などが認められ，血液塗抹標本では赤血球の大小不同，変形赤血球，多染性赤血球および赤芽球の出現が顕著であった．しかし，ポルフィリン症特有の光線過敏症性病変は患畜が生後6ケ月前後であることや，飼育畜舎が直射日光をしゃへいする構造であるため，著明な症状を示したものは1頭のみであった．

また，これらのブタについて組織病理的に観察したところ，いずれの例も骨髄および肝，脾，腎，肺の各臓器ならびに各リンパ節髄質，副腎皮質，下垂体前葉などの細網内皮系細胞，腎の尿細管上皮細胞，管腔内絮片，骨梁にいたるあらゆる組織がカッ色に着色しており，明らかなポルフィリン顆粒の沈着を示す特有の赤色けい光を発した．なお，この他には，貧血に伴なう変化が主体である各種の病理組織の異常が観察された．

以上三報にわたってブタにおける広義のポルフィリン尿症について述べたところであるが，消費者に安全で品質のよいブタ肉を供給するためにも，こんごその原因について究明する必要があると考える．

ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅶ） コプロポルフィリンの標準物質と回収試験

武士俣邦雄：衛生検査，27 (9)，1065，1978

尿中に排泄されるコプロポルフィリンの検査は，ポルフィリン症や鉛中毒などのスクリーニングに際して行なわれる．この尿中コプロポルフィリンの定量分析については，分光光度計あるいはけい光光度計を用いて，特異波長における吸収強度または発現するけい光の強さを計測して，定量値を求めている．しかし，いずれの方法も，その分離精製操作の繁雑さや分析再現性が乏しいこと，さらには回収率が低いことなどのために，分析値の信頼性が問題になっている．そこで著者は，すでに報告した尿中コプロポルフィリンの定量分析法にもとづいて，標準物質の適性と使用方法に関する吟味および定量分析の精度を評価する分析再現性と回収試験の方法などについて検討したので報告する．

1) 吸光度法で尿中コプロポルフィリンの定量分析を行なう場合には，標準液を用いずに Allen の補正による吸光度から係数法で定量値を算出することが望ましい．

2) 抽出溶媒としてエチルエーテルを用いる方法においては，その抽出前にヨードによる酸化処理を行なった方が分析再現性はよい結果であった．

3) ヒトのふん便から調製した標準物質を使用した場合の平均回収率は42.28±17.41％という低い結果であった．

4) ウマ血球から調製した標準物質を使用した場合の平均回収率は26.09±8.21％と極めて悪い結果であった．

5) 分析再現性が98.98％であった尿を，別の10人の尿と等量混合した場合の回収試験では，その平均回収率は99.55±2.01％というほぼ完璧な回収結果であった．

Tail Rotation, An Early Neurological Sign of Methylmercury Poisoning in the Rat

Gen Ohi, Susumu Nishigaki, Hironobu Seki, Yukihiro Tamura, Isao Mizoguchi, Hiroshi Yagyu and Kazuo Nagashima : *Environmental Research*, 16, 353, 1978

All of 95 Wistar rats on a diet containing 20ppm of methylmercury and 0.1ppm of selenium displayed "tail rotation" namely, sustained vigorous circling movement of the tail when held up by the trunk, for 2 to 3 weeks prior to the onset of weight loss and of crossing and/or ataxia of the hind legs. With the onset of tail rotation morphological changes in the nervous system involved only the peripheral sensory nerves and their terminal corpuscles: mercury levels in the brain were two-thirds as high as those associated with crossing and ataxia of the hind legs. Ablation of visual and ear function did not seem to affect its directionality or velocity. This sign appears to be an earlier manifestation of peripheral sensory neuropathy induced by methylmercury.

Mite and Insect Fauna in Dusts of Theaters in Tokyo I. Taxa and Seasonal Distribution

II. Analysis by Dendrogram Method and Principal Component Analysis

(付記：デンドログラム分析法の説明，コンピューターのプログラムと実例)

Eikichi NAKADA: *Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health*, 33, 34p., 1978, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

I. Dust samples were collected with a vacuum sweeper from seats and floors of twelve theaters in Tokyo in summer and winter. Mites and small insects in dusts were separated by the floatation method of saturated sodium chloride solution. More than 64 species belonging to 32 families of mites were identified. The most collected mites were *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* of Pyroglyphidae which being found in the living state were especially numerous at the summer collection. A number of the tropical rat mite, *Ornithonyssus bacoti*, was recovered. The pyroglyphid mites were significantly more collected from the seats than from the floors and they were more numerous in summer than in winter. Also they were more numerous on felt or cloth seats than on vinyl seats. Mostly dead Psocoptera insects were collected more from the floors than from the seats.

II. Mite and insect fauna in dusts was analyzed by the method of numerical taxonomy of Sokal and Sneath (1963). From both dendrograms (Q-type) of correlation- and distance-coefficient, it was considered that mite and insect faunas on two seats (in show-hall and lobby) or the faunas on three floors (in lobby, food-stand and show-hall) have some correlation and the faunas of some theaters have some similarity. At R-type (the converse of ordinary Q-type), *D. farinae* and *D. pteronyssinus* were grouped to show some ecological relationship, and they seemed to correspond to the characteristic of some theaters' grouping of Q-type. The results of principal component analysis inclined to correspond to those of the dendrograms. These analyses give a help for understanding of theaters' sanitary states.

医学的見地より見た NO_2 環境基準

溝口 勲：人間と環境，4 (2)，11–18，1978

1978年3月，中公審の「二酸化窒素に係る判定条件等についての専門委員会」報告にひき続き，7月環境庁はそれまでの環境基準を一挙3倍以上もゆるめる環境基準の改定を告示した．この環境基準改定の意味するものを医学的，公衆衛生学的見地から検討した．健康の概念を幅広く理解することの必要性から入り，判定条件から環境基準設定のための必須のステップとして安全率の欠落を指摘した．また判定条件そのものの解析上の不備として発癌に関連する論文の不備，オキシダント発生要因としての見方の欠落を述べた．さらに疫学調査批判論に対する反論として一方での疫学方法上の改善と同時にデータによらないいくつかの批判を再批判した．

藍藻 Oscillatoria splendida によるカビ臭物質 geosmin の産生

松本淳彦，土屋悦輝：日本水処理生物学会誌，14 (2)，12，1978

水道水源のカビ臭発生は全国的な現象として問題となっている．湖沼や貯水池では40%以上がカビ臭問題をこうむっており，それぞれの浄水場では処理法で苦慮している．カビ臭発生原因は放線菌，藍藻によることがほとんどであるが，後者については文献が少なく，発生機構も未知なことが多い．

本文では，藍藻の一種 Oscillatoria splendida を単一分離培養し，その増殖量と臭気物質量との関係を論じた．照度 1,000lx, 25° 培養下では4週後で最大増殖に達し，5週間後に最大2.3mg/l の geosmin を産生し，臭気濃度は10,000に達した．

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1978. 7—1979. 6)

Makoto Ohashi : **Problems in methodology of antibiotic sensitivity testing**
The SEAMIC Conference/Seminar(Tokyo) (1978. 11)

Makoto Ohashi : **Problem of food-borne infections and bacterial food poisoning in Tokyo**
The 43rd Academic Meeting of Korean Society for Microbiology (1979. 4)

五十嵐英夫，森田隆司，岩永貞昭：**アフィニティ・クロマトグラフィによるブドウ球菌コアグラーゼの精製とその性状について**
第25回毒素シンポジウム（1978. 7）

潮田　弘，辻　明良，小川正俊，五島瑳智子，寺山　武，坂井千三：**臨床材料および健康人由来表皮ブドウ球菌の生残におよぼすRH（相対湿度）などの影響**
昭和53年度ブドウ球菌研究会（1978. 9）

天野祐次，小野川尊，市瀬正之，平石　浩，善養寺浩，寺山　武：**東京都内住民からのサルモネラの検出と分離菌株の菌型および薬剤感受性について**
第27回日本感染症学会東日本地方会総会（1978. 10）

市瀬正之，小野川尊，天野祐次，平石　浩，善養寺浩，寺山　武：**1976，77年の2年間に都内健康者から分離されたサルモネラのR因子について**
第27回日本感染症学会東日本地方会総会（1978. 10）

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）産生におよぼすショ糖の影響**
第36回日本食品衛生学会（1978. 12）

潮田　弘，辻　明良，小川正俊，五島瑳智子，坂井千三，寺山　武：**各種臨床材料および健康人由来 Staphylococcus epidermidis の生物型ならびに両由来株の生残におよぼすRH（相対湿度）および動物血清の影響**
第52回日本細菌学会総会（1979. 4）

五十嵐英夫，高橋正樹，岩永貞昭，森田隆司：**発色性合成基質を用いたブドウ球菌コアグラーゼの定量法の検討**
第52回日本細菌学会総会（1979. 4）

五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，潮田　弘，寺山　武，岡村奈緒美：**ブドウ球菌コアグラーゼの免疫学的特異性の検討—特にコアグラーゼII型とIII型について**
第52回日本細菌学会総会（1979. 4）

五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，潮田　弘，寺山　武，坂井千三：**食品中での黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン（A～E）産生—カスタードクリームのショ糖の影響—**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

五十嵐英夫，森田隆司，岩永貞昭：**アフィニティ・クロマトグラフィによるブドウ球菌コアグラーゼの精製とその性状**
第51回日本生化学会（1978. 10）

Terayama, T., Igarashi, H., Yamada, S. and Shingaki, M. : **Detection of staphylococcal enterotoxins in incriminated food of food poisoning outbreaks by reversed passive hemagglutination**
U. S.-Japan Intersociety Microbiology Congress (1979. 5)

伊藤　武，斉藤香彦，稲葉美佐子，坂井千三：**ウェルシュ菌下痢症の毒素学的迅速診断法に関する研究**
第9回嫌気性菌感染研究会（1979. 2）

伊藤　武，斉藤香彦，稲葉美佐子，坂井千三：**ボツリヌス菌の生態学的研究2．東京都内の土壌における本菌の分布**
第87回日本獣医学会（1979. 4）

伊藤　武，斉藤香彦，稲葉美佐子，坂井千三：***Clostridium perfringens* のエンテロトキシン産生用培地に関する検討**
第52回日本細菌学会総会（1979. 4）

伊藤　武，柳川義勢，丸山　務，斉藤香彦，稲葉美佐子，甲斐明美，坂井千三：**1967年から1978年までに東京都内で発生した細菌性食中毒の起因菌の動向について**
第53回日本感染症学会総会（1979. 4）

Takeshi Itoh, Kahiko Saito, Misako Inaba and Senzo Sakai : **Detection of *Clostridium perfringens* Enterotoxin from Feces of Food Poisoning Cases**
The 14th Joint Conference, U. S.-Japan Cooperative

Medical Science Program, Cholera Panel (1978. 9)

Sakai, S., Itoh, T., Saito, K., Inaba, M., Ohashi, M., Takahashi, M. and Yamamoto, I. :**Experimental Gastroenteritis due to Clostridium perfringens in Cynomolgus Monkeys : Histopathology and Enterotoxin Study**

U. S.-Japan Intersociety Microbiology Congress (1979. 5)

Kudoh, Y., Yamada, S., Matsushita, S., Ohta, K., Tsuno, M. and Ohashi, M. : **Detection of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* by reversed passive hemagglutination test with apecific immunoglobulin against cholera toxin**

The 14th Joint Conference, U. S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1978. 9)

Kudoh, Y. :**Comparative studies on procedure for antibiotic sensitivity testing**

The SEAMIC Conference/Seminar 1978 (1978. 11)

工藤泰雄，松下　秀，山田澄夫，津野正朗，太田建爾，甲斐明美，坂井千三，大橋　誠：**大腸菌エンテロトキシンに関する研究（6）　海外旅行者下痢症分離株の毒素産生性**

第52回日本細菌学会総会（1979. 4）

工藤泰雄，山田澄夫，津野正朗，太田建爾，松下　秀，坂井千三，大橋　誠：**東京都における輸入感染性腸炎の細菌学的検討（1978年）**

第53回日本感染症学会総会（1979. 4）

工藤泰雄，松下　秀，山田澄夫，甲斐明美，丸山　務，坂井千三，大橋　誠：**毒素原性大腸菌による下痢症—1967～1977年の11年間に遭遇した集団発生例について—**

第53回日本感染症学会総会（1979. 4）

Kudoh, Y., Ohta, K., Tsuno, M., Matsushita, S., Sakai, S. and Ohashi, M. : **Serologic and biological characterization of Vibrio parahaemolyticus isolates in Tokyo, especially enteropathogenic toxin (Kanagawa hemolysin) production of them estimated by a microquantitative technique**

U. S.-Japan Intersociety Microbiology Congress (1979. 5)

諸角　聖，一言　広，和宇慶朝昭，坂井千三，上野芳夫：**シナモン成分中の新抗真菌物質について**

第8回マイコトキシン研究会（1978. 7）

一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三：**国産および輸入雑豆のカビ汚染について**

第37回食品衛生学会学術講演会（1979. 6）

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の R plasmid**

第7回薬剤耐性菌シンポジウム（1978. 8）

Takako Kanoh, Takeshi Yokota, Tatsuo Yamamoto and Shogo Kuwahara: **Two Conjugative R Plasmids Obtained from *Vibrio cholerae* (Biotype *Eltor*) Isolated in Nigeria, 1977**

The 14th Joint Conference, the United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1978. 9)

Takeshi Yokota, Reiko Sekiguchi, Tatsuo Yamamoto, Teruyo Ito, Takako Kanoh and Shogo Kuwahara : **Enterotoxin Plasmids Genetically Labeled with a Drug-Resistance Gene (Transposon) and Its Application to Adenylate Cyclase-Less Mutants of *Escherichia coli***

The 14th Joint Conference, the United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1978. 9)

加納堯子，横田　健：**コレラ菌由来 R-Plasmid pJT-17の伝達頻度**

第52回日本細菌学会総会（1979. 4）

大久保暢夫，堀　幹郎，武士俣邦雄：**Affinity Chromatography 分屑と血清反応**

第13回トレポネマトーゼ研究会（1978. 8）

飯塚純子，柴田　実，浅香治美，大久保暢夫：**先天性代謝異常症のマススクリーニングについて**

第62回東京都衛生局学会（1979. 5）

Nobuo Ohkubo : **Recent Advance of Syphilis-**

serology. As to Concerning TPHA.
The 12th International Congress of Microbiology (1978. 9)

Nobuo Ohkubo: **Serodiagnose und Chemotherapie der Syphilis**
Hygiene Institut-Seminar der Universität Köln (1978. 9)

村田以和夫，大久保暢夫，山田　満，金井日出夫，林滋生：**東京築地市場に入荷した日本近海産サクラマスにおける広節裂頭条虫 Plerocercoid の検索**
第38回日本寄生虫学会東日本大会（1978. 10）

岩崎謙二：**インフルエンザウイルス交差ＨＩ試験におけるＨＩ価決定機作に関する理論的試行**
第26回日本ウイルス学会総会（1978. 10）

坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：**1977年4月～78年2月のインフルエンザ流行における病因検索とインフルエンザウイルス分離株の抗原分析**
第26回日本ウイルス学会総会（1978. 10）

薩田清明，小林由美子，平井和人，吉川　泉，山地幸雄，福生吉裕，山中正信，岩崎謙二，坂井冨士子，伊藤忠彦，武内安恵：**タイ国住民のインフルエンザウイルスに対する血清疫学的研究**
第26回日本ウイルス学会総会（1978. 10）

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：**ＢＫウイルスに関する研究，抗核抗体価とＢＫウイルスＨＩ価の相関**
第26回日本ウイルス学会総会（1978. 10）

浦野純子，[河野弘子，渡辺悌吉，岩崎謙二，藪内清，矢野一好：**急性気道感染症に関する調査成績（第2報）**
第9回小児ウイルス病研究会（1978. 11）

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，今川八束：**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（1978年）**
第53回日本感染症学会総会（1979. 4）

岩崎謙二，藪内　清，吉田靖子，関根整治：**東京都下飼育ブタ間における日脳ウイルス感染流行の年次推移**
第53回日本感染症学会総会（1979. 4）

安田一郎，瀬戸隆子，西川洋一：**中国産山椒の品質について**
日本生薬学会第25回年会（1978. 10）

鎌田国広，原田裕文：**カーボンブラック中の3，4-ベンズピレンについて**
第37回日本公衆衛生学会（1978. 10）

鎌田国広，山野辺秀夫，鈴木助治，原田裕文：**ガスクロマトグラフィーによるヨウ素の定量法について**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

竹内正博，水石和子，原田裕文：**熱エネルギー分析器による化粧品中のN-ニトロソジエタノールアミンの分析**
第40回分析化学討論会（1979. 6）

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：**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**
昭和53年度東京獣医畜産学会（1978. 8）

庭山邦子：***Bacillus cereus* の産生する血管透過性因子について**
第52回日本細菌学会総会（1979. 4）

松井政友，菊池俊六，鈴木雅夫，塩見久章，高島利幸，梅木富士郎：**犬管理事務所職員のトキソプラズマ抗体保有状況について**
第62回衛生局学会（1979. 5）

三浦まち子，黒崎峯生，可児利郎，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）

中里光男，冠　政光，有賀孝成，藤沼賢司，直井家壽太：**酸化防止剤に関する研究（第2報）　酸化防止剤の系統分析法**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

藤沼賢司，冠　政光，中里光男，有賀孝成，直井家壽太：**かんきつ類中のクマロンインデン樹脂の試験法**
第37回日本食品衛生学会（1979. 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8回マイコトキシン研究会（1978. 7）

直井家壽太，西島基弘，井部明広，木村康夫：**海洋汚染実態値の紹介**
第15回全国衛生化学技術協議会年会（1978. 9）

上村　尚，西島基弘，永山敏廣，斉藤和夫，安田和男，井部明広，牛山博文，直井家壽太：**チェリーおよび穀類中の臭化メチル分析法および残留性**
第36回日本食品衛生学会（1978. 12）

上村　尚，西島基弘，斉藤和夫，安田和男，井部明広，永山敏廣，牛山博文，直井家壽太：**食品中のマイコトキシンに関する研究–XVI　食品添加物によるトリコテセン系マイコトキシンの消長**
第36回日本食品衛生学会（1978. 12）

斉藤和夫，西島基弘，安田和男，上村　尚，井部明広，永山敏廣，牛山博文，直井家壽太：**食品中のマイコトキシンに関する研究–XVII　製あん原料豆のアフラトキシン汚染**
第36回日本食品衛生学会（1978. 12）

上村　尚，西島基弘，永山敏廣，斉藤和夫，安田和男，井部明広，牛山博文，直井家壽太：**食品中の臭素分析法**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

西島基弘，井部明広，牛山博文，斉藤和夫，安田和男，上村　尚，永山敏廣，直井家壽太：**東京湾産アサリの石油汚染実態調査ならびに汚染物質のとり込みについて**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

上村　尚，西島基弘，永山敏廣，斉藤和夫，安田和男，井部明広，牛山博文，直井家壽太：**臭化メチル燻蒸後の残留性および実態調査**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

井部明広，西島基弘，斉藤和夫，安田和男，上村　尚，永山敏廣，牛山博文，直井家壽太：**食用花粉の衛生学的調査**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

斉藤和夫，西島基弘，安田和男，上村　尚，井部明広，永山敏廣，牛山博文，直井家壽太：**食品中のマイコトキシンに関する研究–XVIII　チーズのアフラトキシン汚染（2）**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

真木俊夫，田村行弘，嶋村保洋，西垣　進，直井家壽太：**N–ニトロソ化合物に関する衛生学的研究—I　市販食品中の各種ニトロソアミン含有量の現状について**
第36回日本食品衛生学会（1978. 12）

田村行弘，真木俊夫，嶋村保洋，西垣　進，直井家壽太：**クロレラ中クロロフィルの変化について**
第36回日本食品衛生学会（1978. 12）

嶋村保洋，田村行弘，真木俊夫，小関正道，西垣　進，直井家壽太：**黒皮カジキ肉中水銀の化学形態について**
第37回日本食品衛生学会（1979. 5）

広門雅子，溝入　茂，宇佐美博幸，中嶋　厳，遠藤英美：**天然着色料の品質に関する研究　カラメル中の4–メチルイミダゾールの分析**
第36回日本食品衛生学会（1978. 12）

渡辺悠二，佐藤憲一，吉田令子，遠藤英美：**プラスチック中の酸化防止剤の試験法**
第15回全国衛生化学技術協議会年会（1978. 9）

武士俣邦雄，堀　幹郎，大久保暢夫：**プロテインAアフィニティークロマト分屑と梅毒血清反応**
第13回トレポネマトーゼ研究会（1978. 8）

武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，道口正雄，三宅　勉，山下千恵，斎藤公志，島崎秀雄，小林幸三，吉岡良雄，三木　博：**ブタのポルフィリン尿症に関する研究（第1報）　一時尿中の δ-ALA および Cp の濃度について**
第62回東京都衛生局学会（1979. 5）

武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，道口正雄，三宅　勉，山下千恵，斎藤公志，島崎秀雄，小林幸三，吉岡良雄，三木　博：**ブタのポルフィリン尿症に関する研究（第2報）　ふん便および胆汁中のポルフィリン体について**
第62回東京都衛生局学会（1979. 5）

山下千恵，島崎秀雄，斎藤公志，三宅　勉，小林幸三，吉岡良雄，三木　博，武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原　公，道口正雄：**ブタのポルフィリン尿症に関する研究（第3報）　臨床および病理組織学的所見について**
第62回東京都衛生局学会（1979. 5）

溝口　勲，多田宇宏，野牛　弘，長崎　譲：**東京都民の食品からのクロム一日摂取量について**
第48回日本衛生学会（1978. 5）

佐藤泰仁，溝口　勲：**ブレーキドラム内粉塵中のアスベスト**
第19回大気汚染学会（1978. 9）

佐藤泰仁，溝口　勲，野牛　弘：**走行中の自動車空気汚染のモデル調査**
第37回日本公衆衛生学会（1978. 10）

池田真悟，二島太一郎，長嶋親治，藤谷和正，溝口　勲，野牛　弘，森本敬三，香山英一：**母親と新生児における水銀の蓄積と相互関係（第3報）　母親静脈血と臍帯動静脈血の血球および血漿**
第37回日本公衆衛生学会（1978. 11）

二島太一郎，池田真悟，溝口　勲，野牛　弘，藤田紘一郎，杉山雅俊，菊池正一：**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2報）**
第37回日本公衆衛生学会（1978. 11）

長嶋親治，二島太一郎，野牛　弘，寺井　稔，西田五郎：**新生児の毛髪中の微量成分の放射化分析**
第37回日本公衆衛生学会（1978. 11）

寺井　稔，橋本敬祐，松本道男，二島太一郎，野牛弘：**人体臓器中の微量成分の分布と相関々係について**
第37回日本公衆衛生学会（1978. 11）

森本敬三，宮入毅匡，羽里幸彦，香山英一，鈴木覚義，川島正道，小松崎　尚，池田真悟，二島太一郎：**母体より胎児への水銀移行動態（第5報）**
第62回東京都衛生局学会（1979. 5）

狩野文雄，大澤誠喜，福田雅夫，溝口　勲：**大気汚染質による角膜上皮変化の観察**
第19回大気汚染学会（1978. 9）

牧野国義，溝口　勲：**大気汚染物質年平均濃度分布の推定**
第19回大気汚染学会（1978. 9）

狩野文雄，福田雅夫，溝口　勲，丁　宗鉄，梁　哲宗，英　清道：**窒素酸化物の in vitro 暴露によるリンパ球内 Cyclic Nucleotides 量の変動**
第62回東京都衛生局学会（1979. 5）

大野正彦，松本浩一：**善福寺川のセスジユスリカ　I　年間の世代数について**
第43回日本陸水学会（1978. 7）

高橋保雄，森田昌敏，三村秀一，秋山和幸，山岸達典：**水中の 2，4，6-トリクロルフェニル-4'-ニトロフェニルエーテル（CNP）と 2，4-ジクロルフェニル-4'-ニトロフェニルエーテル（NIP）**
第37回日本公衆衛生学会（1978. 10）

渡辺真利代，大石真之：**藍藻 Microcystis の毒性**
第37回日本公衆衛生学会（1978. 10）

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37回日本公衆衛生学会（1978. 10）

大野正彦，松本浩一：**善福寺川のユスリカの種類相**
第15回日本水処理生物学会（1978. 11）

渡辺真利代，大石真之，中尾順子，松本浩一：**Microcystis の毒性について II**
第44回日本陸水学会（1979. 5）

栃本　博，菊地洋子，押田裕子，中村　弘，笹野英雄，岸　仁，原田裕文，友成正臣：**河川の重金属汚染指標としての水生昆虫（第一報）　ヒゲナガカワトビケラの重金属含有量について**

第37回日本公衆衛生学会（1978. 10）

楠　淳，西條頼廣，図師栄子，友成正臣，竹田恒夫，武部　実，柴田健次：**昭和53年度夏季保菌者検索により検出されたサルモネラ菌の血清型と薬剤耐性について**

第62回東京都衛生局学会（1979. 5）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

三　村　秀　一（委員長）
山　下　　孝
寺　山　　武
藪　内　　清
下　平　彰　男
原　田　裕　文
村　上　　一
直　井　家壽太
石　川　隆　章
中　尾　順　子

昭和54年12月1日　発行

規格表　第2類
印刷番号（54）793
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第30-1号

編集発行：東京都立衛生研究所
〒160 東京都新宿区百人町3—24—1
電話 03（363）3231（代）

印刷所：大東印刷工業株式会社
〒130 東京都墨田区向島3—33—5
電話 03（625）7481（代）