図書室受
55.12.24
東京都立衛生研究所

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

15

31-1

1980

4

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

序

80年代という新しい年代に入り，私達をとりまく社会情勢は大きく変化しております．過去20年にわたる高度成長による科学の発展は，ややもすると人間社会に対し思いもよらぬ影響を与えております．健康を障害する要因は多様化，複雑化の様相を呈し，環境衛生，食品衛生，それに大気汚染関連問題等日毎に増しております．このため当研究所としてもその内容の質的な変化が要求され，これに充分対応出来る機能を整備し近代的研究設備を十二分に活用し，各分野の試験検査と各種の調査研究を行うと共に，都民の健康保持について今日的問題ばかりでなく10年先，さらに将来の問題を考えながら研究に取り組んでおります．

さてここに昭和54年度の当研究所の研究成果を研究年報第31号として集録刊行することが出来ました．ここに掲載された各課題は，当所研究員の苦労の結晶であります．特に試験検査にかかわる研究成果，あるいは行政指導に関連のある調査研究が多いと思います．各地方衛生研究所，また都区の試験検査，行政指導にも活用願えれば幸いと存じます．

昭和55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

Campylobacter jejuni 分離菌株の保存に関する研究……斎藤　香彦，丸山　　務，坂井　千三…… 1

Yersinia enterocolitica のイヌへの実験的感染……柳川　義勢，丸山　　務，坂井　千三…… 8

Yersinia enterocolitica のマウスへの実験的感染
……丸山　　務，甲斐　明美，柳川　義勢，坂井　千三，深井　孝治…… 12

都内小児のジフテリア・百日咳抗体保有状況について（1975～79年）
……柴田　　実，飯塚　純子，安部　昭子，大久保暢夫…… 18

A群溶連菌に対するＳＴ合剤の感受性と測定用培地の検討……柏木　義勝，柴田　　実，大久保暢夫…… 26

1979年東京都における日本脳炎疫学調査
……吉田　靖子，関根　整治，岩崎　謙二，斎藤　正度，松本　栄一…… 29

下水から分離されるウイルスを指標とした都内における腸管系ウイルスの感染流行実態（1979年）
……藪内　　清，矢野　一好，柴田タツ美，林　　志直，岩崎　謙二…… 36

急性呼吸器疾患患児から分離されるウイルスを指標とした都内における呼吸器系ウイルスの感染流行実態
（1979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…… 40

カートリッジフィルターを用いたウイルスの吸着および溶出条件の実験的検討
……矢野　一好，林　　志直，柴田タツ美，藪内　　清，岩崎　謙二…… 46

急性胃腸炎患児ふん便からの Rotavirus の検出(1)
……藪内　　清，関根　整治，矢野　一好，岩崎　謙二，鈴木雄次郎，
中川　　進，吉岡　勇雄，浦野　純子，河野　弘子，渡辺　悌吉…… 51

カーボン支持膜を用いた生物試料の電子顕微鏡観察……前木　吾市，友成　正臣…… 55

幼稚園児および成人の尿中 γ-GTP 活性値に関する検討……武士俣邦雄，霜田さと子…… 61

幼稚園児および成人の尿中馬尿酸について……武士俣邦雄，霜田さと子…… 66

報文 II　医薬品等の安全性に関する調査研究

医薬品製剤中の *dl*-塩酸メチルエフェドリンの定量法……中山　京子，高橋美佐子，下平　彰男…… 71

有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究（第５報）
繊維製品中の有機塩素系防虫加工剤の定量法（Ⅱ）
……萩原　輝彦，寺島　　潔，吉原　武俊，下平　彰男…… 77

生薬の品質評価に関する研究（第６報）　市場品山椒の品質
……安田　一郎，瀬戸　隆子，下平　彰男，田窪　栄一…… 82

ガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の N-ニトロソジエタノール
アミンの分析
……竹内　正博，水石　和子，原田　裕文…… 86

化粧品の特殊成分分析法に関する研究（第10報）
HPLC による化粧品中の防腐殺菌剤の分離定量法……風間　成孔，中村　義昭，原田　裕文…… 91

家庭用品の衛生化学的研究（第6報）
ガスクロマトグラフィーによるエアゾール噴射剤の分析法について
……植田　忠彦，森　謙一郎，鈴木　助治，原田　裕文…… 97

報文 III　食品等の安全性に関する調査研究

市販食品中におけるサルモネラの増殖態度
……斎藤　香彦，伊藤　武，柳川　義勢，丸山　務，坂井　千三……103

市販食品における *Bacillus cereus* 汚染の実態と分離菌株の生物型および血清型
……潮田　弘，五十嵐英夫，高橋　正樹，新垣　正夫，寺山　武，坂井　千三……109

生乳からの *Staphylococcus aureus* の検出と分離菌株の性状，エンテロトキシン産生性およびコアグラーゼ型の検討
……寺山　武，新垣　正夫，五十嵐英夫，潮田　弘，高橋　正樹，
坂井　千三，山田　満，美藤　克幸，茂木　利夫，山口　安夫……115

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……122

冷凍食品から分離した黄色ブドウ球菌の性状について
……庭山　邦子，村上　一，五十嵐英夫，篠原　楷，山岸　宏，加藤　喜市……127

保温惣菜の温度管理と細菌の増殖について
……新井　輝義，池島　伸至，入倉　善久，神　真知子，古幡　幸子，松本　昌雄……132

ガスクロマトグラフィーによる食品中のヨウ素の定量法について
……山野辺秀夫，鎌田　国広，鈴木　助治，原田　裕文……137

都内搬入米におけるカドミウム含有量について……伊藤　弘一，原田　裕文……142

東京都におけるＰＣＢ汚染の実態について（第8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……149

東京都における水銀汚染の実態について（第7報）
魚介類中の水銀含有量調査
……雨宮　敬，竹内　正博，原田　裕文……153

東京湾のアサリと底質中の重金属分布（1978～1979）
……堀井　昭三，山岸　達典，宮崎　奉之，金子　誠二，村上　一……156

魚介類中のクロルデンとその近縁化合物の分離同定と定量法
……宮崎　奉之，秋山　和幸，金子　誠二，堀井　昭三，山岸　達典，村上　一……161

牛乳中の無機ヨウ素の定量……竹葉　和江，松本　昌雄，村上　一……166

野菜，果実中の TPN，キャプタン，ダイアジノン，キノメチオネートの残留について
……小関　正道，嶋村　保洋，真木　俊夫，田村　行弘，直井家壽太……170

魚介類中の微量元素に関する基礎的研究（第5報）
カレイ，ボラ，コノシロの重金属およびヒ素
……勝木　康隆，石井　晴代，伊東　昭子，直井家壽太，木村　康夫……174

天然甘味料の実態調査（第2報）
市販天然甘味料製剤中のステビア成分の分析
……中嶋　巌，広門　雅子，中島　和雄，溝入　茂，遠藤　英美……180

東京湾産アサリ貝殻中の微量元素について（第2報）
……安野　哲子，荻野　周三，小野　綾子，大畠　敏子，遠藤　英美……185

ＡＳ樹脂製器具および容器からのアクリロニトリルモノマーの移行
……吉田　令子，渡辺　悠二，佐藤　憲一，遠藤　英美……190

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬による過酸化水素およびホルムアルデヒドの定量
……渡辺　悠二，佐藤　憲一，吉田　令子，遠藤　英美……195

市販果実飲料の化学的鑑定……牛尾　房雄，西田　甲子，深野　駿一，関　博麿，道口　正雄……199

高速液体クロマトグラフィーによる魚体中のビタミンDの定量
……井口　正雄，菊谷　典久，友松　俊夫，道口　正雄……204

報文 IV　生活環境保全に関する調査研究

野生カラスおよびハト中の PCT，PCB，有機塩素系農薬残留量
……牛尾　房雄，道口　正雄，深野　駿一，阿部　学……209

地下駐車場における環境調査……佐藤　泰仁，多田　宇宏，青木　実，溝口　勲……212

ラットの肺および肝中の酵素に対する NO_2 曝露の影響
……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……219

NO_2 長期暴露によるラットの網状赤血球数の変動……福田　雅夫，狩野　文雄，寺田　伸枝，溝口　勲……226

持続性せき・たんの有訴率に関連する因子の検討……牧野　国義，溝口　勲……229

空気中のクロラールの光酸化反応……太田　与洋，溝口　勲……238

カドミウム・銅カラム還元法による水中の硝酸性窒素定量法の検討
……笹野　英雄，斎藤　庄次，高橋　正博，小輪瀬　勉……244

某福祉センターの細菌汚染について……佐藤　泰仁……249

ツメダニの一種による掻痒性皮疹について……吉川　翠……253

神田川水系のセスジユスリカ終令幼虫の，２種の有機リン系殺虫剤に対する感受性
……大野　正彦，岡本　寛……261

皇居内濠群の水質（第３報）……渡辺真利代……265

藍藻 Microcystis aeruginosa の毒性　——1979年の結果——……渡辺真利代，大石　真之……273

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第12報）
三宅島新澪の水質およびプランクトンの周年変化……松本　淳彦，土屋　悦輝……275

他　誌　発　表

感染症等に関する調査研究……283
医薬品等の安全性に関する調査研究……289
食品等の安全性に関する調査研究……289
生活環境保全に関する調査研究……293

学　会　発　表……295

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Study on Preservation of *Campylobacter jejuni*
.....K. Saito, T. Maruyama and S. Sakai..... 1

Experimental Infection of *Yersinia enterocolitica* in Dogs
.....Y. Yanagawa, T. Maruyama and S. Sakai..... 8

Experimental Infection of *Yersinia enterocolitica* in Mice
.....T. Maruyama, A. Kai, Y. Yanagawa, S. Sakai and K. Fukai..... 12

Incidence of Antibodies against Diphtheria and Pertussis among Healthy Children in Tokyo (1975—1979)
.....M. Shibata, J. Iizuka, A. Abe and N. Ohkubo..... 18

Studies on the Susceptibility of ST-drug against Group-A *Streptococci*
.....Y. Kashiwagi, M. Shibata and N. Ohkubo..... 26

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1979
.....Y. Yoshida, S. Sekine, K. Iwasaki, M. Saito and E. Matsumoto..... 29

Incidence of Enteroviruses in Sewage taken from Nine Sewage Treatment Plants in Tokyo (1979)
.....K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, Y. Hayashi and K. Iwasaki..... 36

Virological Survey of Acute Respiratory Infection among Infants in Tokyo (1979)
.....K. Yabuuchi, K. Yano, T. Shibata, Y. Hayashi, K. Iwasaki, J. Urano, H. Kohno and T. Watanabe..... 40

Effect of Pleated Membrane Filter for Concentrating Viruses in Water
.....K. Yano, Y. Hayashi, T. Shibata, K. Yabuuchi and K. Iwasaki..... 46

Detection of Rotaviruses in Faeces taken from Infants with Acute Gastroenteritis(1)
.....K. Yabuuchi, S. Sekine, K. Yano, K. Iwasaki, Y. Suzuki, S. Nakagawa, I. Yoshioka, J. Urano, H. Kohno and T. Watanabe..... 51

Electron Microscopy of Biological Specimens placed on Thin Carbon Monolayer Support Film
.....G. Maeki and M. Tomonari..... 55

γ-Glutamyltranspeptidase Activity in Urine of Kindergartener and Adult Human
.....K. Bushimata and S. Shimoda..... 61

Statistical Analyses on the Urinary Hippuric Acid of Kindergartener and Adult Human
.....K. Bushimata and S. Shimoda..... 66

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Determination of *dl*-Methylephedrine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations
.....K. Nakayama, M. Takahashi and A. Shimohira..... 71

Studies on Examination Method of Household-Necessities Containing Poisonous Chemical Substances (V) Determination of Organochlorine Mothproofing Agents from Wool Fabrics (11)
.....T. Hagiwara, K. Terashima, T. Yoshihara and A. Shimohira..... 77

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (VI) Quality of Zanthoxyli Fructus on the Market
.....I. Yasuda, T. Seto, A. Shimohira and E. Takubo..... 82

Analysis of N-Nitrosodiethanolamine in Cosmetics by Gas Chromatography and High Performance Liquid Chromatography
.....M. Takeuchi, K. Mizuishi and H. Harada..... 86

Studies on Analytical Method of Specific Materials in Cosmetics (X)
High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Germicides in Cosmetic Products
.....M. Kazama, Y. Nakamura and H. Harada..... 91

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (VI)
Analysis of Propellants in Household Aerosol Products by Gas Chromatography
.....T. Ueta, K. Mori, S. Suzuki and H. Harada..... 97

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Effect of Temperature on Growth of *Salmonellae* in Commercial Foods
.....K. Saitoh, T. Itoh, Y. Yanagawa, T. Maruyama and S. Sakai.....103

Survey for Contamination of *Bacillus cereus* in Commercial Foods, and Biotypes and Serotypes of the Isolates
.....H. Ushioda, H. Igarashi, M. Takahashi, M. Shingaki, T. Terayama and S. Sakai.....109

Incidence of *Staphylococcus aureus* in Bovine Raw Milk and some Characteristics, Enterotoxin Producibility and Coagulase Types of the Isolates
.....T. Terayama, M. Shingaki, H. Igarashi, H. Ushioda, M. Takahashi, S. Sakai M. Yamada, K. Mito, T. Motegi and Y. Yamaguchi.....115

Effect of Sucrose on the Growth of *Staphylococcus aureus* on the Production of Their Enterotoxin A–E in Custard Cream
.....H. Igarashi, M. Shingaki, M. Takahashi, H. Ushioda, T. Terayama and S. Sakai.....122

Characterization of Staphylococcus aureus Isolated from Frozen Egg Products socalled "Kinshi tamago"
.....K. Niwayama, H. Murakami, H. Igarashi, T. Shinohara, H. Yamagishi and K. Kato.....127

Actual Storage Conditions of Warmed Delicatessens in the Market and Their Bacteriological Qualities
.....T. Arai, N. Ikejima, Y. Irikura, M. Jin, Y. Furuhata and M. Matsumoto.....132

Gas-Liquid Chromatographic Determination of Total Iodine in Food
.....H. Yamanobe, K. Kamata, S. Suzuki and H. Harada.....137

Contents of Cadmium in Brown Rice sent in Tokyo
.....K. Ito and H. Harada.....142

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (VIII)
Polychlorinated Biphenyl Concentrations of Foods
.....K. Yamazaki, H. Yamanobe, S. Suzuki and H. Harada.....149

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (VII) Mercury Content of Fish and Shellfish
.....T. Amemiya, M. Takeuchi and H. Harada.....153

Distribution of Trace Amounts of Heavy Metals in Short-Necked Clam and Sludge in Tokyo Bay (1978—1979)
.....S. Horii, T. Yamagishi, T. Miyazaki, S. Kaneko and H. Murakami.....156

Identification and Determination of Chlordanes and Their Related Compounds in Fish and Shellfish
.....T. Miyazaki, K. Akiyama, S. Kaneko, S. Horii, T. Yamagishi and H. Murakami.....161

Determination of Inorganic Iodine in Cow's Milk
.....K. Takeba, M. Matsumoto and H. Murakami.....166

Residues of TPN, Captan, Diazinon, Chinomethionat in Vegetables and Fruits
.....M. Koseki, Y. Shimamura, T. Maki, Y. Tamura and Y. Naoi.....170

Study on Amounts of Trace Elements in Marine Fishes (V)
Distribution of Heavy Metals and Arsenic in Flatfish, Graymullet and Gizzard-shad Tissue
.....Y. Katsuki, H. Ishii, A. Itoh, Y. Naoi and Y. Kimura.....174

Survey of Natural Sweeteners (II)
Analysis of Stevia Components in Commercial Natural Sweetener Products
.....I. Nakajima, M. Hirokado, K. Nakajima, S. Mizoiri and F. Endo.....180

Contents of Trace Elements in Shells of Short-Necked Clam in Tokyo Bay (II)
.....T. Yasuno, S. Ogino, A. Ono, T. Ohata and F. Endo.....185

Migration of Acrylonitrile Monomer from AS Resin Food Container
.....R. Yoshida, Y. Watanabe, K. Sato and F. Endo.....190

Quantitative Analysis of Hydrogen Peroxide and Formaldehyde by the 2, 4–Dinitrophenylhydrazine Method
.....Y. Watanabe, K. Sato, R. Yoshida and F. Endo.....195

Chemical Evaluation of Fruit Juice in Commercial Soft Drinks
.....F. Ushio, K. Nishida, S. Fukano, H. Seki and M. Doguchi.....199

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Natural Occurring Vitamin D in Fish Tissue
.....M. Iguchi, N. Kikutani, T. Tomomatsu and M. Doguchi.....204

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

PCT, PCB and Organochlorine Pesticide Residues in Wild Crows and Pigeons
.....F. Ushio, M. Doguchi, S. Fukano and M. Abe.....209

Investigation of Air Environment in Underground Parking Lots
.....Y. Sato, T. Tada, M. Aoki and I. Mizoguchi.....212

Effect of NO_2 Exposure on Enzyme Activities in Lung and Liver of Rats
.....T. Suzuki, M. Ohsawa, F. Kanoh, M. Fukuda, T. Kasahara, N. Terada and I. Mizoguchi.....219

Effects of Long-Term NO_2 Exposure on Reticulocytes of Rats
.....M. Fukuda, F. Kanoh, N. Terada and I. Mizoguchi.....226

A Study of Factors related to Prevalence Rates of Persistent Cough and Phlegm
.....K. Makino and I. Mizoguchi.....229

Photooxidation of Chloral in Air.....T. Ohta and I. Mizoguchi.....238

Study on Determination of Nitrate Nitrogen in Water by Cadmium-Cupper Reduction
.....H. Sasano, S. Saito, M. Takahashi and T. Kowase.....244

Contamination of Bacteria in the Air of a Welfare Office.....Y. Sato.....249

Epidemic of Dermatitis due to a Cheyletid Mite, *Chelacaropsis* sp., in Tatami Rooms (I)
.....M. Yoshikawa.....253

Test on the Susceptibility of the Last Instar Larvae of *Chironomus yoshimatsui* Martin et Sublette (Diptera, Chironomidae) collected at the Kanda River to Two Organophosphorus Insecticides
.....M. Ohno and H. Okamoto.....261

Water Qualities of Inner Moats around the Imperial Palace (III) .....M. F. Watanabe.....265

Toxicity of *Microcystis aeruginosa* ——Results in 1979——.....M. F. Watanabe and S. Oishi.....273

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (XII)
Monthly Changes of Water Quality and Plankton of the Meromictic Lake Shinmyo, Miyake Island
.....A. Matsumoto and Y. Tsuchiya.....275

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

I Papers Concerning on Infectious Diseases and Others.....283
II Papers Concerning on Pharmaceutical Hygiene.....289
III Papers Concerning on Food Hygiene 289
IV Papers Concerning on Environmental Hygiene 293

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 295

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.*, 31-1, 1-7, 1980

Campylobacter jejuni 分離菌株の保存に関する研究

斎藤香彦*, 丸山 務**, 坂井千三*

Study on Preservation of *Campylobacter jejuni*

KAHIKO SAITO,* TSUTOMU MARUYAMA** and SENZO SAKAI*

Keywords: キャンピロバクタージェジュニ *Campylobacter jejuni*, 培地 media, 増殖 growth, 保存 preservation

緒　言

Campylobacter jejuni（以下 *C. jejuni* と略）はヒトの下痢症の起因菌であると指摘されながらも[1]，ふん便からの本菌の分離が極めて困難であったことから，本菌による下痢症の実態は，長い間ベールにつつまれていた．Dekeyser ら[2] はメンブランフィルター（Pore size 0.65μm）を用いて下痢便をろ過し，そのろ液を抗生物質添加分離培地に培養することによってはじめてふん便からの *C. jejuni* の分離に成功した．その後，Skirrow[3]は，各種抗生物質を添加した本菌の分離培地を検討し，ふん便材料をメンブランフィルターによるろ過を行わずに，直接分離培養する方法によって効率よく本菌を分離できるすぐれた培地を発表した．Skirrow[3] の分離培地が報告されて以来，アメリカ合衆国[4,5]，ヨーロッパ諸国[6,7]，オーストラリア[8]など世界各国から次々に本菌による腸炎が報告されてきた．本邦においても本菌による散発例[9]や，著者ら[10]が日本で初めての集団発生例を報告して以来，今や，サルモネラと同等，もしくはそれ以上に重要な腸炎起因菌として認識されるにいたった．

C. jejuni は通常の酸素分圧の条件下の培養では発育せず，酸素濃度5～15%で発育する微好気性菌である．さらに本菌は増殖した培地中でも極めて死滅しやすいことが指摘されている．しかるに，本菌の保存性についてはほとんど検討されていないのが現状である．そこで，本菌を安定した状態で保存することが，本菌を扱う上で極めて急務であることから，本菌の各種培地における発育とその培地中での生残性，さらに本菌を凍結および凍結真空乾燥した場合の保存効果を検討したので報告する．

材料および方法

1. 供試菌株

実験に供した *C. jejuni* は本菌による集団下痢症患者由来株 CF-1, CF-24, CF-28, CF-30, CF-55, CF-60, CF-88, 散発下痢症由来株 CF-41, CF-49, CF-54, CF-72, 健康保菌者由来株 CF-51, Butzler 博士より分与された患者血液由来株 CF-16 の計13株である．

2. 使用培地

使用培地は Table 1 に示す液体培地3種類，半流動寒天培地9種類，固型培地7種類の計19種類である．

3. 培養方法

a) 各種培地への菌の接種

供試菌株を，まず血液寒天平板に塗抹し，微好気条件下で37C 3日間培養後，スムース集落を釣菌し，血液寒天平板に再塗抹して37C 3日間微好気培養した純培養菌を各培地に接種した．

b) 培養条件

液体培地および半流動寒天培地の場合は，好気性の条件下で37C 3日間培養した．

斜面および平板培地は，すべて嫌気培養ビンに入れ，ビン内の空気を混合ガス（酸素5%，炭酸ガス10%，窒素ガス85%）で置換し，37C 3日間培養した．

4. 各種培地における接種菌の増殖の観察と保存条件

上記条件で培養後，液体培地では培地の混濁，半流動寒天培地では，培地表層部より2～3mm 深部における帯状の混濁，固型培地では寒天表面における明瞭な菌苔形成が肉眼的に認められたものを発育陽性とした．各種培地で，*C. jejuni* の発育が認められたものについては，その培地における供試菌の生残を検討するために，下記の条件で保存した．

a) 液体培地および半流動寒天培地

培養時に使用したプラスチック製通気キャップ（PPキャップ）で室温（20～30C）に保存した．

b) 固型培地

寒天斜面培地の場合はPPキャップとゴム栓をした2

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

Table 1. Growth of *Campylobacter jejuni* in Broth, Semi-solid Agar and Agar Media

Media	Isolates				
	CF-1	CF-16	CF-41	CF-51	CF-60
Brucella Broth (Pfizer)	−	+	−	−	−
Brucella Broth (Gibco)	−	+	−	−	−
GAM Broth	−	−	−	−	−
Brucella Broth Semi-solid Agar (Pfizer)	+	+	+	+	+
Brucella Broth Semi-solid Agar (Gibco)	+	+	+	+	+
Thioglycollate Medium	+	+	+	+	+
Thioglycollate Medium without Indicater	+	+	+	+	+
Nutrient Semi-solid Agar	+	+	+	+	+
GAM Semi-solid Agar	+	+	+	+	+
Brain Heart Infusion Semi-solid Agar	+	+	+	+	+
CTA Medium	+	+	+	+	+
Thiol Medium	+	+	+	+	+
Nutrient Agar Slant Medium	+	+	+	+	+
Dorset Egg Medium	+	+	+	+	+
Blood Agar Slant Medium	+	+	+	+	+
Improved Media of George*et al	+	+	+	+	+
Chocolate Agar Slant Medium	+	+	+	+	+
Blood Agar Plate	+	+	+	+	+
Chocolate Agar Plate	+	+	+	+	+

* Brucella agar supplemented 0.025% $FeSO_4$: $7H_2O$, sodium metabisulfite and sodium pyruvate

種類を1組としてそれぞれ4C，室温，37Cおよび42Cの温度条件のもとで保存した．

c) 凍結

供試菌株を血液寒天平板全面に塗抹し，微好気性条件下で37C，3日間培養後，菌苔をかきとり，1平板の全菌量を10% Skim Milk (Difco) 溶液1 m*l* に浮遊させた．この菌浮遊液を，スクリューキャップ付バイアルビンに移し，−20Cと−80Cに保存した．

d) 凍結真空乾燥

前述の凍結保存の場合と同様に培養した2枚の血液寒天平板培養菌を，Brain Heart Infusion Broth (Difco, BHI ブイヨン) 加仔牛血清に浮遊させ，アンプルに分注し，凍結真空乾燥を行った．

5. 各種培地に培養後の接種菌の生存期間の判定

液体および半流動寒天培地に保存した場合は，3～4日間隔で明らかに発育とみられる混濁部分を1白金耳量とり，固型培地の場合は，寒天斜面の菌苔より白金耳で釣菌し血液寒天平板に塗抹し37C 3日間微好気培養を行い発育の有無により生死を判定した．凍結保存したものについては，150日後に凍結を急速に溶解後，その1白金耳量を，また，凍結真空乾燥保存した場合は，BHI ブイヨン0.5m*l* を加えて溶解後，その1白金耳量をそれぞれ血液寒天平板に塗抹し，前述の液体培地の場合と同様に，微好気培養を行い発育の有無により生死を判定し

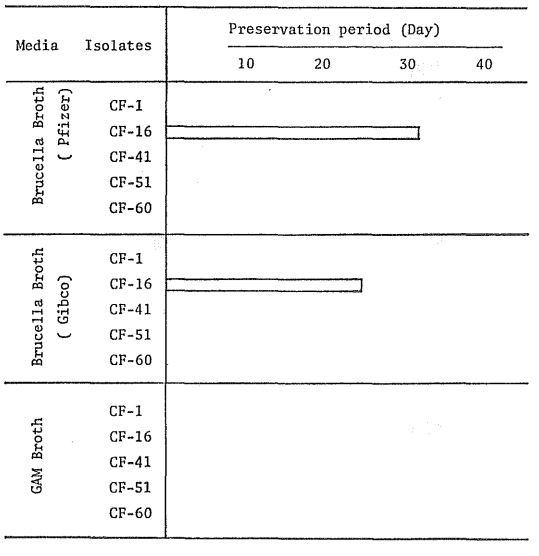


Fig. 1. Preservation of *Campylobacter jejuni* in Liquid Media

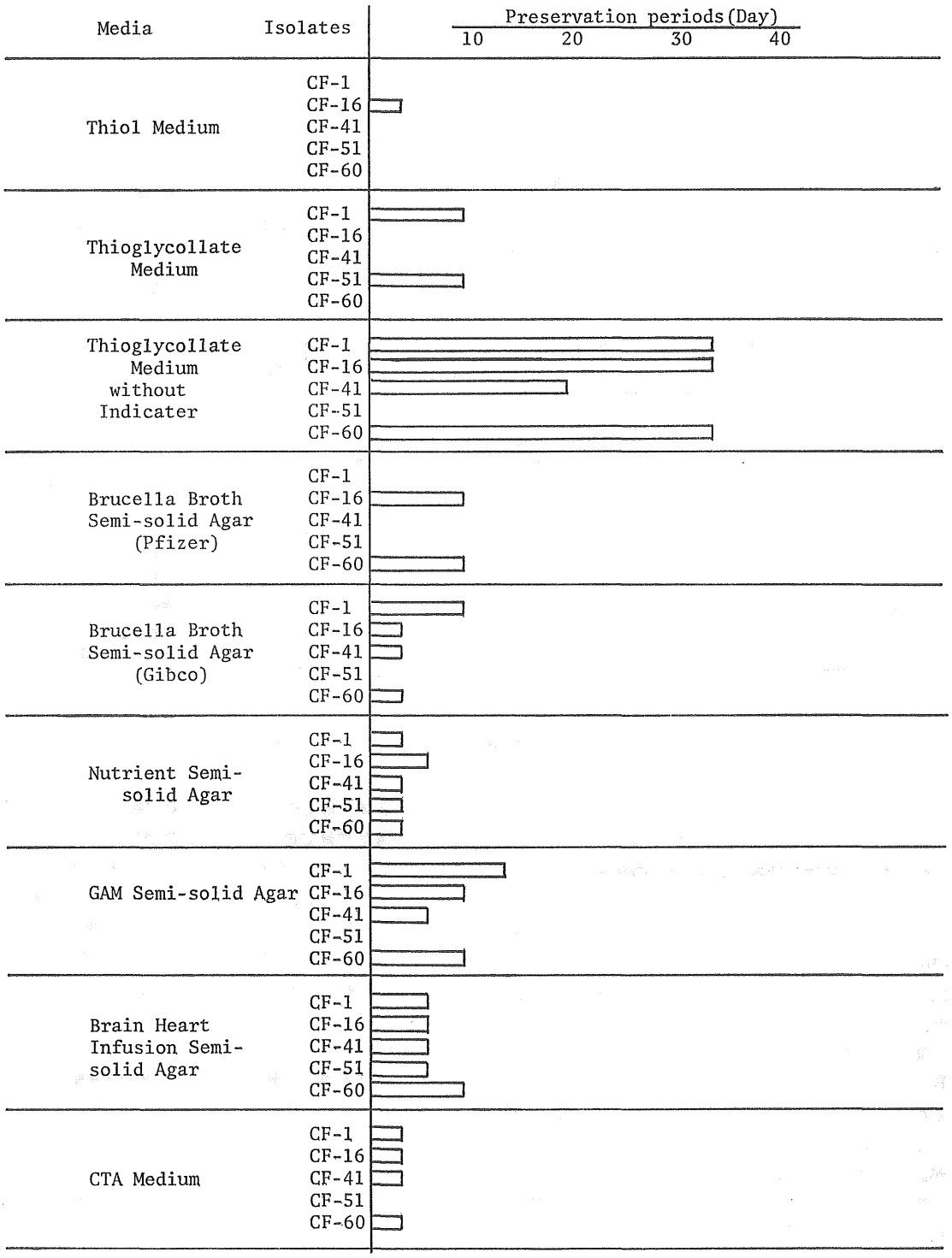


Fig. 2. Preservation of *Campylobacter jejuni* in Semi-solid Agar Media

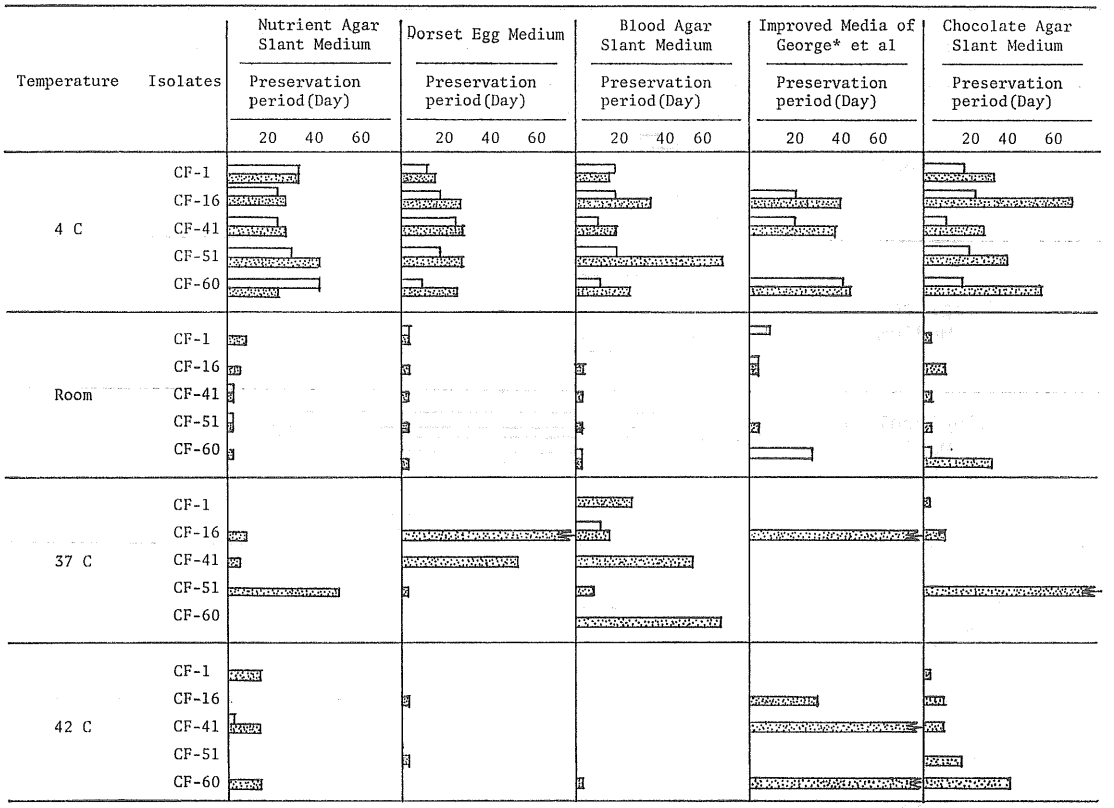


Fig. 3. Preservation of *Campylobacter jejuni* Grown on Agar Slant Media

た.

成　績

1. 各種培地における *C. jejuni* の発育

液体培地3種類，半流動寒天培地9種類および固形培地7種類の計19種類の培地に，供試菌株のうちCF-1, CF-16, CF-41, CF-51, CF-60 の5菌株を接種した場合における発育の有無を検討した成績を Table 1 に示した.

液体培地：Pfizer 社製および Gibco 社製の Brucella Broth では供試菌株のうち，CF-16 株のみが発育し，その他の菌株では発育が認められなかった．また GAM ブイヨンの場合はすべての供試菌株とも，まったく発育が認められなかった.

半流動寒天培地：実験に使用した9種類の半流動寒天培地では供試菌全株とも明瞭な発育が認められた.

固形培地：実験に使用した7種類の培地では，供試菌の全菌株とも発育を認めた.

2. 各種培地での *C. jejuni* の保存性

a) 液体培地での *C. jejuni* の消長

液体培地に *C. jejuni* を接種し，好気性の条件下で37 C，3日間培養し，発育した菌株については，培養時に使用した PP キャップのまま，室温（20～30 C）に保存して3日ないし4日間隔で本菌の生残の有無を検討した．その成績は Fig. 1 に示すごとく，Pfizer 社の Brucella Broth では33日間生存し，Gibco 社の Brucella Broth では29日間まで生存が認められた.

b) 半流動寒天培地での *C. jejuni* の消長

半流動寒天培地においても，前記の液体培地の場合と同様に供試菌のうち増殖の認められた菌株についてのみ室温に保存し，本菌の消長を検討した（Fig. 2）.

供試した9種類の培地のうち，変法 TGC 培地では CF-1, CF-16 および CF-60 株の3菌株は30日後まで生残したが，CF-41 および CF-51 の2菌株は20日以内に死滅した.

その他の8種の培地では，菌株によって生残日数は異

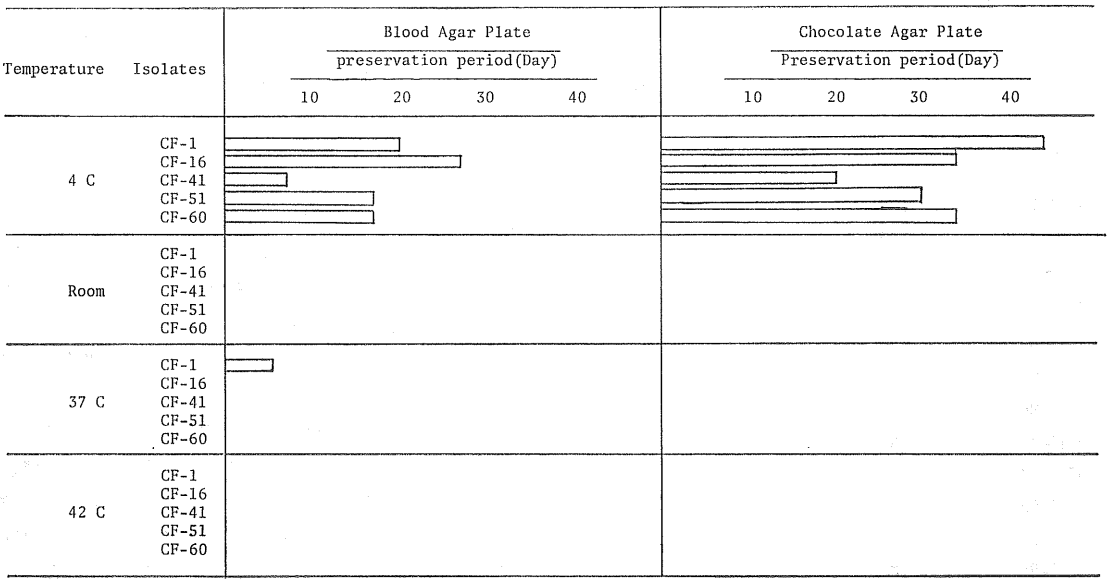


Fig. 4. Preservation of *Campylobacter jejuni* on Agar Plate

なるが，20日以内にすべての供試菌株が死滅し，これらの培地は本菌の保存に適さないことが判明した．

3. 固型培地での *C. jejuni* の消長

a) 寒天斜面培地

供試菌株である5菌株を各種寒天斜面培地に，37C，3日間微好気培養し，培養時に使用したPPキャップをそのまま用いた状態と，PPキャップをゴムキャップに代えて密栓した場合を1組としてそれぞれ4C，室温（20～30C），37C，42Cの温度条件で保存した．これらの条件のもとで保存した時の供試菌株の生残性について検討した成績をFig. 3に示した．

これらの培地での保存効果は，培地の種類，保存温度および供試菌株によって大きなバラツキが認められ，本菌の保存には適さないことが明らかになった．

b) 寒天平板培地

血液寒天平板およびチョコレート寒天平板に供試菌株を画線培養し，平板のまま4C，室温，37Cおよび42Cの各温度条件下に保存した時の本菌の消長をFig. 4に示した．

血液寒天平板培地およびチョコレート寒天平板培地ともに4C保存の方が室温，37Cおよび42Cに保存した場合よりも比較的長く生存した．しかし，4Cにおいても菌株によって生残日数が異なり，血液寒天平板培地では30日以内，チョコレート寒天平板培地では50日以内にすべての供試菌株が死滅した．

4. *C. jejuni* の10% Skim Milk 凍結保存

各種培地での増殖とその培地での保存性を検討したCF-1, CF-16, CF-41, CF-51, CF-60の5株と，さらに本試験に新たに加えたCF-24, CF-28, CF-30, CF-49, CF-54, CF-55, CF-72, CF-88の8株，計13菌株を10% Skim Milkに濃厚浮遊させ，−20Cと−80Cに凍結保存した場合の各菌株における生存日数の成績をTable 2に示した．

観察期間は現在150日までであるが，−20C，−80Cともに供試した全菌株の生残が確認されている．

5. 凍結真空乾燥保存

CF-1およびCF-16株については，凍結真空乾燥を行い保存効果を検討した．この2菌株の凍結乾燥アンプルを1年1カ月後に開封して，BHIブイヨンに浮遊させ，血液寒天平板に直接塗布し37C，3日間微好気培養して生残の有無を確認した．その結果，両菌株ともに生残が認められた．

考　察

C. jejuni はヒトの腸炎起因菌として極めて重要な位置を占めている．本菌の分離用培地としてSkirrow[3]は選択性の高い培地を開発し，本培地は一般に広く応用されている．しかしながら．本菌の生化学的性状検査用培地および保存法等については未だ十分な検討がなされていない．そこで，本研究ではそれらの点を検討する目的で，まず通常使用されている培地における本菌の増殖態度，および各種条件下での本菌の生存性を検討した．

Table 2. Preservation of *Campylobacter jejuni* Suspended in Skim Milk

Isolates	Preservation periods	Temperatures	
		−20 C	−80 C
CF- 1	150	+	+
CF-16	150	+	+
CF-41	150	+	+
CF-51	150	+	+
CF-60	150	+	+
CF-24	150	+	+
CF-28	150	+	+
CF-30	150	+	+
CF-49	150	+	+
CF-54	150	+	+
CF-55	150	+	+
CF-72	150	+	+
CF-88	150	+	+

本実験の成績では，供試した *C. jejuni* の大部分の菌株は好気条件下の液体培地で増殖が認められなかった．その要因として，使用した液体培地では本菌の主要な発育条件である微好気性の環境が得られないことが考えられる．

半流動培地では，使用した9種類の培地に全供試菌株とも発育した．しかしながら接種菌が少量の場合，しばしば増殖が認められないこともあった．したがって本菌の生化学的性状試験を行う際に，その基礎培地として Thiol medium あるいは Brucella Broth が用いられているが[1,2]，両培地を使用する場合，十分な菌量を接種する必要性がある．

Huddleson[11]は Thiol medium に発育した *C. jejuni* を室温（約26C）に保存した場合，150日間生存したと報告している．しかし山県[12]は *C. fetus* を Thiol medium に培養し室温で暗所保存し継代する場合，約20日ごとに継代することが必要であると報告している．今回の我々の実験では，Thiol medium 培養菌を室温（20C～30C）に保存した場合，3日間，あるいはそれ以内に死滅し，本培地は *C. jejuni* の長期間の継代保存には不適当な結果が示された．

斜面培養菌を種々の温度条件でPPキャップとゴム栓をした場合との保存効果を検討した結果では，供試菌株および培地の種類によって差異が認められるが，概してゴム栓での4C保存の場合に，生残日数の延長が観察された．しかしこれらの培地での本菌の保存は的確な方法とはいえない．

本菌を長期保存する場合には，10% Skim Milk 中に濃厚に菌を浮遊させ，−20Cおよび−80Cで保存するのがもっとも効果的であることが今回の実験において確認された．山県[12]はウサギ脱線維血に本菌を懸濁して，−80C～−85Cに凍結保存した場合，1年半以上も生存したという成績を報告している．

また仲西は Brucella Broth に DMSO (Dimethyl Sulfoxide) と馬血清を各々10%に加えた培地に本菌を懸濁し，−80Cに保存した場合，4カ月でも菌数がほとんど減少することなく保存できることから，菌株保存としてすぐれていることを述べている[13]．

一方，Proom ら[14]は凍結真空乾燥法で本菌が数年間生存することを報告しているが Frobisher ら[15]の成績は不良であった．著者らが CF-1 および CF-16 の2菌株について凍結乾燥保存を検討した結果では，1年余月経た現在，2菌株とも生存しており，本法は *C. jejuni* の安定した保存方法と考える．しかし菌株による差異も考慮した場合，本菌の保存には，前述の凍結保存と凍結真空乾燥保存の両者を併用することが最も確実であるといえよう．

結　論

各種培地における *C. jejuni* の増殖および種々の条件下での保存性を検討した結果，次の成績が得られた．

本実験に使用した3種の液体培地，9種の半流動寒天培地，5種の斜面培地および2種の寒天平板培地における *C. jejuni* の増殖態度は菌株によって差異が認められた．それらの培地での培養菌は培地の種類，保存温度および菌株によって生残期間が異なり，本菌の保存には困難である．

C. jejuni の保存方法として10% Skim Milk に本菌を濃厚に浮遊させ，−80Cでの凍結もしくは凍結真空乾燥が最も秀れていることを認めた．

文　献

1) King,E. O.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 98, 700, 1962
2) Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P., and Sternon, J: *J. Infect. Dis.*, 125, 390, 1972
3) Skirrow, M. B.: *Brit. Med. J.*, 2, 9, 1977
4) C. D. C.: *Morb. Mortal. Wkley. Rep.*, 27, 207, 1978
5) C. D. C.: *Morb. Mortal. Wkley. Rep.*, 27, 226, 1978
6) Bruce, D., Zochowski, W., and Ferguson, I. R.: *Brit. Med. J.* 5, 1219, 1977
7) Brunton, W. A. T., and Heggie, D.: *Brit. Med.*

J. 3, 956, 1977
8) Steele, T. W., and McDermott, S.: *Med. J. Aust.*, 2, 404, 1978
9) 吉崎悦郎，神木照雄，坂崎利一，田村和満：日感染学誌，54, 17, 1980
10) 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：東京衛研年報，30-1, 1, 1979
11) Huddleson, I. F.: *J. Bact.*, 56, 508, 1948
12) 山懸 宏：メディアサークル，10, 219, 1965
13) 中西寿男：私信，1980
14) Proom, H., and Hemmons, L. H.: *Cited from Disease transmitted from animals to man*, 5*th ed*, 173, 1963
15) Frobisher, J. R., Parsons, J. J., Pai, S. E., and Hakins, S.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 32, 1008, 1947

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 8-11, 1980

Yersinia enterocolitica のイヌへの実験的感染

柳川義勢*, 丸山 務**, 坂井千三*

Experimental Infection of *Yersinia enterocolitica* in Dogs

YOSHITOKI YANAGAWA*, TSUTOMU MARUYAMA** and SENZO SAKAI*

Experimental infection of *Yersinia enterocolitica* Te1409 (serovar O:3) strain in dog was performed. In the experiment, 10^3-10^9 organisms cultured at 25C for 40 hours and suspended in milk were administered to 13 puppies each weighing about 1 kg. Two to three animals were sacrificed on 7th, 14th, 21st and 30th day respectively after administration, and bacteriological and pathological examinations were conducted. The rest of the animals were observed to excrete organisms in stools for about 60 days following administration. No conspicuous pathological change was seen in organs of these dogs. However, the specific antibody response was observed with the highest value at 1:640 on 14th and 21st days after administration.

Throughout the experiment, none of the animals developed any visible clinical symptoms except for loose stool containing organisms.

Keywords : experimental infection, *Yersinia enterocolitica*, dog

緒　言

著者らは *Yersinia enterocolitica* の生態学的研究の一環として，種々の動物および自然環境における *Y. enterocolitica* の分布を調査し報告してきた[1-3]．その中で，ペットとしてヒトと接触する機会の多いイヌの本菌保有率が約6％と高率であり，しかもその分離菌型がヒトの *Y. enterocolitica* 感染症の主要原因菌と同一血清型がほとんどであることから，ヒトにおける本菌感染症の感染源としてのイヌの重要性を指摘した．しかしながら，調査対象としたイヌは，本菌がその腸内容から分離された例でも下痢など特に注目される臨床症状はなく，解剖時における肉眼的所見でも異常は認められなかった．したがってイヌにおける *Y. enterocolitica* の高率な保菌は，一時的な通過菌なのか，常在菌なのか，また本菌がイヌに対して病原性を有するのかなどの疑問が残された．そこでイヌに対して本菌の投与実験を試み，本菌のイヌに対する病原性および腸管への定着性について検討を行った．

材料および方法

1. 供試菌株　著者らがイヌの腸間膜リンパ節より分離した *Y. enterocolitica* O抗原型3，生物型4の Te 1409株を用いた．

2. 実験動物　*Y. enterocolitica* およびその他の腸管系病原菌が陰性であることを確認した生後約1ヶ月の雑種犬を，パーベンダゾールを投与して腸管内寄生虫を駆虫したのち実験に供した．

3. 投与方法　供試菌株の普通寒天平板培地25C 40時間培養菌の10^9個，10^5個および10^3個をそれぞれ市販の乳児用ミルク5 m*l* に浮遊させ，胃カテーテルを用いて直接イヌの胃内へ投与した．

4. 観察　*Y. enterocolitica* を投与後の動物は，各個体ごとに別々のケージに収容して，臨床症状発現の有無，排泄便の性状および投与菌の排菌状況を経日的に観察した．

Y. enterocolitica 10^9 個投与群10頭のうち，菌投与後7日後に2頭，14日後に2頭，21日後に3頭，30日後に2頭をそれぞれ殺処分し，各種臓器を採取して細菌学的および病理学的検討を行った．

10^9個投与群のうち1頭と10^5個投与の1頭および10^3個投与の2頭については，投与菌が排泄便中から検出されなくなるまでその排菌量を経日的に観察した．

5. 投与菌の検出と菌数測定　排泄便および殺処分したイヌの腸内容物は，滅菌生理食塩液で10倍浮遊液としたものを，また各臓器はガラスホモジナイザーを用いて滅菌生理食塩液で10倍乳剤としたものをそれぞれ菌検査の材料とした．

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

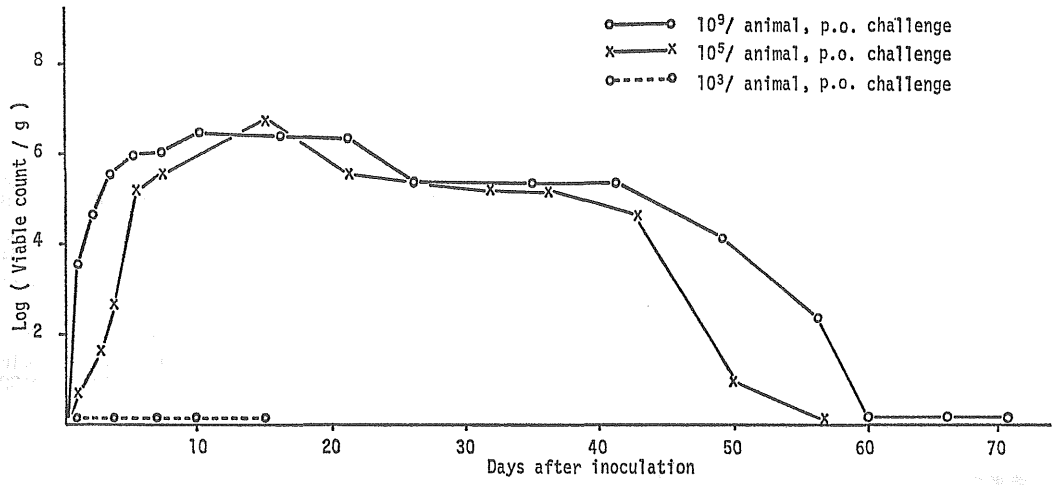


Fig. 1. Recovery of *Yersinia enterocolitica* from Faeces of Infected Animals

解剖時に採取した心血および胆汁についても投与菌の検出を試みた.

排泄便および腸内容物での投与菌の菌数測定は, それぞれの滅菌生理食塩液で10倍浮遊液としたものを, 滅菌生理食塩液で10倍希釈列を作り, SS 寒天平板を用いて行った.

Y. enterocolitica の分離同定は Zen-Yoji and Maruyama[4]の記載にしたがった. 分離菌の血清型は著者らが作製したウサギ免疫血清を用いて試験した.

6. 血中抗体価の測定 解剖時に採取した各個体からの血清について, 投与菌のO抗原に対する凝集素価を Winblad ら[5]の方法によって測定した.

7. 病理学的検討 解剖時に肉眼的検査を行うと同時に, 各種臓器をホルマリン固定し, パラフィン切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理組織学的な検査を行った.

成　　績

1. *Y. enterocolitica* 投与後のイヌの臨床的所見 *Y. enterocolitica* を投与したイヌの健康状態および臨床症状を観察した結果, 10^9 個投与した10例中8例において, 菌投与後2日目ぐらいから軟便が観察され, 平均10日間続き, その後正常便に回復した. また軟便を認めた8例のうち菌投与後7日目に2例, 9日目に1例の合計3例に軽度の下痢便を認めた.

10^5個投与した1例では, 菌投与後7日目から3日間軟便が見られたが 10^3 個投与した2例では菌投与後便性状の変化は認められなかった.

下痢や軟便を認めた動物を含め, すべての動物に食欲不振, 嘔吐といった症状は見られなかった.

2. 排泄便中における *Y. enterocolitica* の排菌量および排菌持続期間 菌投与後の排泄便中における排菌量の経日的推移を Fig. 1 に示した.

10^9 個投与して殺処分しなかった1頭のイヌについて検討した結果, 菌投与後3日目ですでに排泄便1g中10^5個の排菌がみられ, 42日間にわたってその排菌量の減少は認められなかった. 菌投与後50日目以後に排菌量の減少がみられたが, 57日間排菌の持続があった. この長期間にわたる多量の排菌持続傾向は, 投与菌量 10^5個の1例についてもほぼ同様の傾向を示した. しかしながら, 10^3個投与の2例では, いずれの例でもその排泄便中から投与菌を検出することはできなかった.

3. 各臓器および腸管内における投与菌の分布 *Y. enterocolitica* 10^9個投与群のうち9例の各臓器および腸内容物における菌検査の成績を Table 1 に示した.

と殺時すでに排菌のみられなかった2例 (No.5, No.6) を除いて十二指腸以下の腸内容から各々投与菌が検出された. しかしながら, 肝臓, 脾臓, 腸間膜リンパ節からは, 14日目にと殺した1例 (No.3) にその腸間膜リンパ節から投与菌が検出された以外には, いずれからも *Y. enterocolitica* は検出されなかった. また, 心血, 胆汁からはいずれの例でも *Y. enterocolitica* は検出されなかった.

4. 血中抗体価の検査成績 と殺時に採取した血清中の投与菌に対するO凝集素価は, 菌投与後7日目で160倍, 14日目で320倍から640倍と明らかな抗体価の上昇が認められた(Table 1).

Table 1. Recovery of *Yersinia enterocolitica* from Organs and Intestinal Contents and O-agglutinin Titer in the Sera of Infected Animals at Sacrifice

Day of sacrifice after the inoculation	Animal No.	Recovery of the organism from									O-agglutinin titer
		Liver	Spleen	Mesen. Lymph Node	Stomach	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Rectum (Viable count/g)	
7 th	1	−	−	−	−	−	−	−	+	+ (2.0×10^4)	×160
	2	−	−	−	−	+	+	+	+	+ (3.9×10^7)	×160
14 th	3	−	−	+	−	+	+	+	+	+ (2.2×10^8)	×320
	4	−	−	−	−	−	−	−	+	+ (2.5×10^4)	×640
21 st	5	−	−	−	−	−	−	−	−	− (Not find)	×160
	6	−	−	−	−	−	−	−	−	− (Not find)	×160
	7	−	−	−	−	+	+	+	+	+ (5.7×10^5)	×640
30 th	8	−	−	−	−	−	−	−	+	+ (1.3×10^5)	×160
	9	−	−	−	−	−	−	−	+	+ (3.1×10^5)	×320

5. 病理学的所見 *Y. enterocolitica* 10^9個投与群の解剖時における肉眼的所見では，肝臓，脾臓などの臓器になんら病変は認められず，また，腸間膜リンパ節の腫大，腸管各部位の充血，出血などの変化もみられなかった．

病理組織学的観察でも，肝臓，脾臓および腸間膜リンパ節においては，腸間膜リンパ節から投与菌が検出された例を含めて全例に，病理組織学的変化は認められなかった．腸管各部位では，回腸部および盲腸部を中心として，その粘膜固有層に菌集落を認めた例もあるが，炎症性細胞の浸潤は少なく，軽度のカタール性変化を認めたに過ぎない．

考　察

ヒトの *Y. enterocolitica* 感染症の原因菌型は，O抗原型3，5B，8，9の4菌型が主要なものである．Maruyamaら[6]はマウスおよび培養細胞を用いて実験を行い，本菌の病原性の有無はそのO抗原型によって異なり，由来による差は認められないことを報告している．

イヌに *Y. enterocolitica* が高率に保菌されており，しかもその分離菌型がヒトの本菌感染症の原因菌型と同一抗原型が大部分であることは多くの研究者によって報告されている[7-13]．著者らも前報[8]において，ヒトの本菌感染症の感染源としてイヌの重要性を指摘してきた．事実，イヌが感染源として疑われるヒトの本菌感染症例の報告もされている[14,15]．

Farstadら[16]は慢性の下痢がみられたイヌから本菌を分離し，イヌの本菌感染症があることを報告している．今回のイヌへの投与実験では，長期間にわたって多量の排菌持続が認められ，また，投与菌に対する血中抗体価の上昇など感染の成立を示す成績を得たが，典型的な下痢症状や病理変化は認められなかった．

Y. enterocolitica のイヌへの病原性は，すでに報告されているサル[17]やマウス[6,18-21]に対するものよりは弱いものと思われる．しかしながら，10^5個以上の本菌投与によって腸管内で定着，増殖し，健康保菌動物として多量の *Y. enterocolitica* を長期間排菌するという事実から，ヒトの本菌感染症の感染源としてイヌの重要性がさらに強く示唆された．

結　論

イヌに *Y. enterocolitica* O抗原型3を経口的に投与することにより，本菌の腸管内定着，増殖および投与菌に対する血中抗体価の上昇など，感染の成立を示す成績が得られた．しかしながら本菌のイヌに対する病原性は比較的弱く，臓器や腸管において，肉眼的にも病理組織学的にも顕著な変化はみられず，臨床所見でも激しい下痢や嘔吐を示した例は認められなかった．

イヌに *Y. enterocolitica* を10^5個以上投与した場合に，約60日間にもおよぶ長期間の排菌持続が認められたことは，イヌが本菌の感染を受ければ健康保菌状態となり，ヒトの本菌感染症の重要な感染源となり得ることが示唆された．

謝辞　本研究において，病理学的な御教示，御協力をいただいた杏林大学深井孝治教授に心から感謝いたします．

文　献

1) Zen-Yoji, H., Sakai, S., Maruyama, T., and Yanagawa, Y.: *Japan. J. Microbiol.*, 18, 103, 1974
2) 善養寺　浩，坂井千三，丸山　務，柳川義勢：東京衛研年報，25, 1, 1974
3) Yanagawa, Y., Maruyama, T., and Sakai, S.: *Microbiol. Immunol.*, 22, 643, 1978
4) Zen-Yoji, H., and Maruyama, T.: *Japan. J. Microbiol.*, 16, 493, 1972

5) Winblad, S., Nilehn, B., and Sternby, N. H.: *Brit. Ned. J.*, 2, 1363, 1966
6) Maruyama, T., Une, T.,and Zen-Yoji, H.: *Contribution to Microbiology and Immunology*, 5, 317, 1979, Kargar Basel
7) Ahvonen, P., Thal, E., and Vasenius, H.: *Contribution to Microbiology and Immunology*, 2, 135, 1973, Kargar Basel
8) 滝沢金次郎，浅井良夫，実方 剛ら：神奈川県衛生研究所年報，24, 49, 1974
9) Tsubokura, M., Fukuda, T., Otsuki, K., Kubota, M., and Itagaki, K.: *Jap. J. Vet. Sci.*, 37, 213, 1975
10) Pedersen, K. B.: *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 84, 317, 1976
11) Szita, J., and Svidro, A.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 23, 191, 1976
12) Kaneko, K., Hamada, S., and Kato, E.: *Jap. J. Vet. Sci.*, 39, 407, 1977
13) Pedersen, K. B., and Winblad, S.: *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 87, 137, 1979
14) Gutman, L. T., Ottesen, E. A., Quan, T. J., Noce, P. S., and Katz, S. L.: *N. Engl. J. Med.*, 28, 1372, 1973
15) Wilson, H. D., McCormick, J. B., and Feeley, J. C.: *J. Pediat.*, 89, 767, 1976
16) Farstad, L., Landsverk, T., and Lassen, J.: *Acta Vet. Scand.*, 17, 261, 1976
17) 丸山 務：日細誌，28, 413, 1973
18) Carter, P. B.: *Infect. Immuni.*, 11, 164, 1975
19) Carter, P. B.: *American J. Path.*, 81, 703, 1975
20) Alonso, J. M., Bercovier, H., Destombes, P., and Mollaret, H. H.: *Ann. Microbiol, (Inst. Pasteur)*, 126B, 187, 1975
21) Bercovier, H., Alonso, J. M., Destombes, P., and Mollaret, H. H.: *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 127A, 493, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 12-17, 1980

Yersinia enterocolitica のマウスへの実験的感染

丸山 務*, 甲斐明美**, 柳川義勢**, 坂井千三**,
深井孝治***

Experimental Infection of *Yersinia enterocolitica* in Mice

TSUTOMU MARUYAMA*, AKEMI KAI**, YOSHITOKI YANAGAWA**,
SENZO SAKAI** and KOHJI FUKAI***

An experimental infection of *Yersinia enterocolitica* in mice was made in order to clarify the individual pathogenicity of respective strains originally obtained from different sources. In the experiment, both Te 4 (serovar 0 : 3) and Te 591 (serovar 0 : 9) strains obtained from human enteritis, WA (NCTC 10938, serovar 0 : 8) strain derived from human septicemia, and Te 1285 (serovar 0 : 6) strain originally obtained from the content of rat intestine were used. Four groups of 4 week-old mice each consisting of 60 mice were inoculated intravenously with above mentioned 4 strains. Inoculated animals were sacrificed at regular intervals (5 at one time) until the 60th day, and examined both bacteriologically and histopathologically.

Until about 40 days, both Te 4 and Te 591 strains were recovered from the lung, spleen, liver, mesenteric lymph node, jejunum and ileum; but 10^5 -10^9 cells/g of organisms were recovered from the caecum, colon and excreted stools even at 60th day after the inoculation. With regard to WA strain, the organisms multiplied rapidly in the lung, spleen and liver, and 10^4 cells/m*l* of the organisms were recovered from blood, and all of the animals were killed within 14 days after the inoculation. As for Te 1285 strain, a rapid decrease of the inoculated organisms in mice was observed. And the organisms inoculated were no longer detectable in the stools at 10th day after the inoculation.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, pathogenicity, experimental infection

*Yersinia enterocolitica*は自然界に広く分布しており，各種動物ばかりでなく，自然環境からさまざまな血清型菌を分離することができる[1]．一方，下痢症，敗血症などヒトの疾病から分離される本菌は自然環境由来株とは異なり特定の血清型に限られ，血清型と病原性との相関性が経験的に知られている[2]．

我々は本菌の病原性を明らかにする目的で，各種動物に実験的感染を試み[3,4]，特に病原性と血清型との関連については，マウスへの経口投与および静脈内接種で投与菌の排菌期間が患者由来株と自然環境由来株に差異のあることを見出し，排菌期間の長短が病原性判定の基準となり得ることを明らかにした[5]．このことは感染動物の病理組織学的検討[6]，さらには培養細胞への侵入性[7]によっても確認され，ヒト患者由来株の多くである血清型O群3，5B，8および9のみが病原株であると理解された．

今回はマウスへの静脈内接種による長期排菌の機序を投与菌の生体内における動態から追求し，血清型および病原性の異なる菌株を用いた場合，投与菌の臓器内分布の差異について細菌学的，病理学的に検討を行なった．

実験材料および方法

供試菌株：ヒト剖検例由来の血清型O群3である Te 4株[8]，下痢症患者ふん便由来でO群9のTe 591株，敗血症患者血液由来でO群8の WA 株 (NCTC No. 10938)[9]およびネズミ腸管由来でO群6の Te 1285株の計4株である．Te 4, Te 591 および WA の3菌株はいずれもマウスへの静脈内接種で長期排菌が認められ，また細胞侵入性が確認された病原株である．一方，Te 1285株はマウスおよび細胞感染で非病原性とされた対照株である．

実験動物：生後4週令の ddY 系マウスを用いた．

菌の投与方法：供試菌株は普通寒天培地に25C，30時

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科
*** 杏林大学医学部

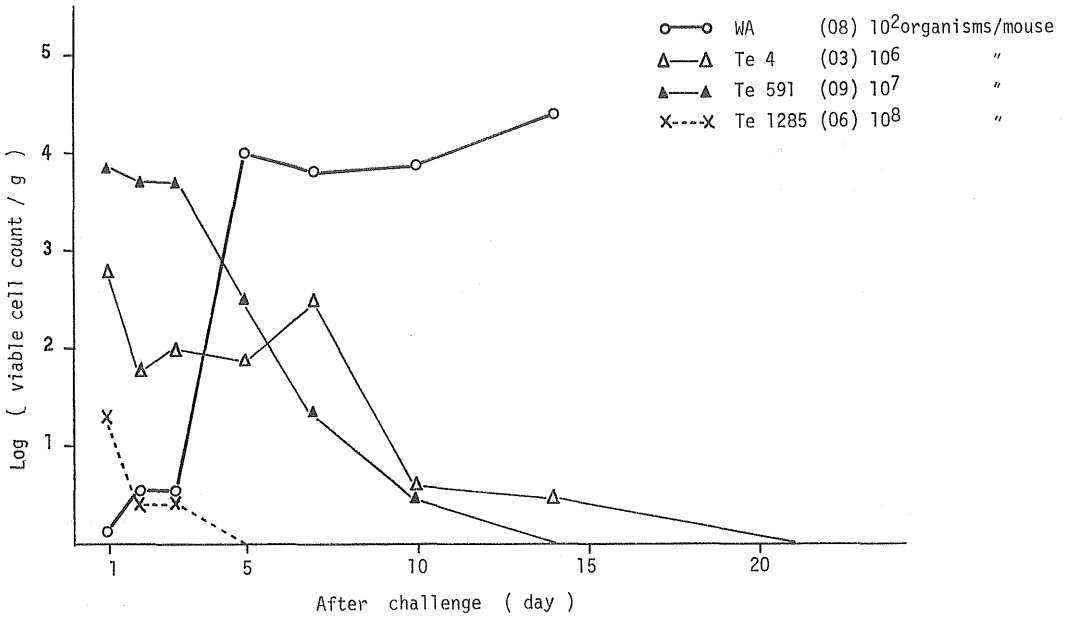


Fig. 1. Recovery of *Y. enterocolitica* from the Blood of Infected Mice(i. v. challenge)

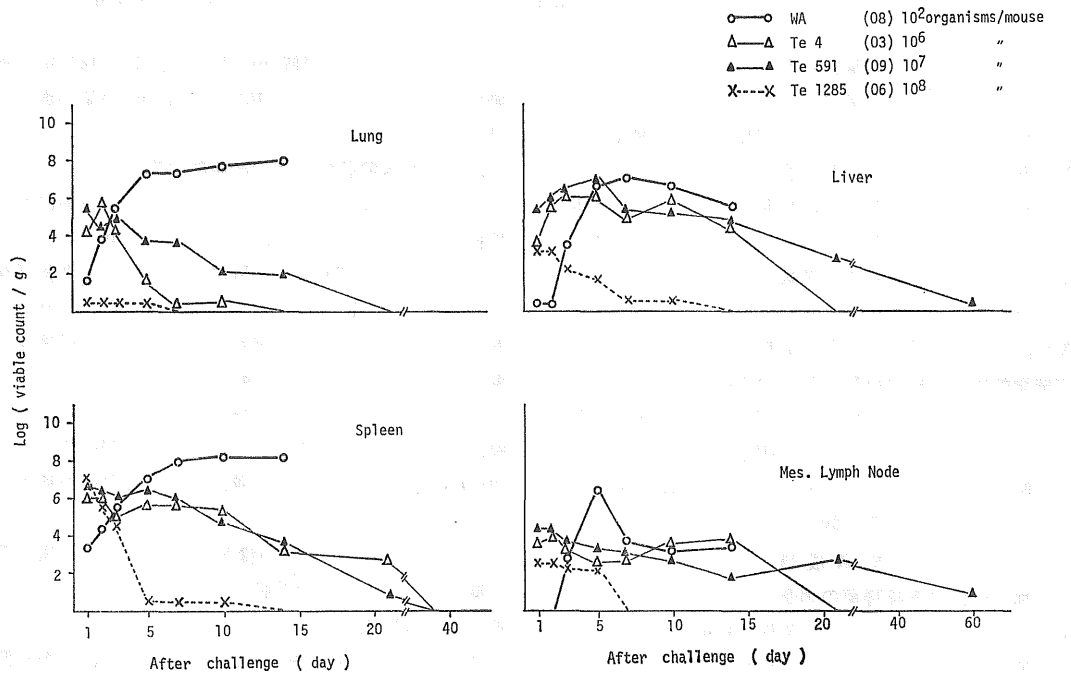


Fig. 2. Distribution of *Y. enterocolitica* in the Organs of Infected Mice (i. v. challenge)

間培養後，滅菌生理食塩水で3回洗浄し，その一定量をマウス尾静脈内に接種した．接種菌量は供試菌株のマウスに対するLD_{50}値[4]から換算して，マウスあたり，WA株は10^2個，Te 4株は10^6個，Te 591株は10^7個，Te 1285株では10^8個であった．

投与菌の回収：菌接種後1，2，3，5，7，10，14，21，28，42および60日目にそれぞれの菌株接種群で5匹づつ殺処分し，心血，肺，脾，肝，腸間膜リンパ節を無菌的

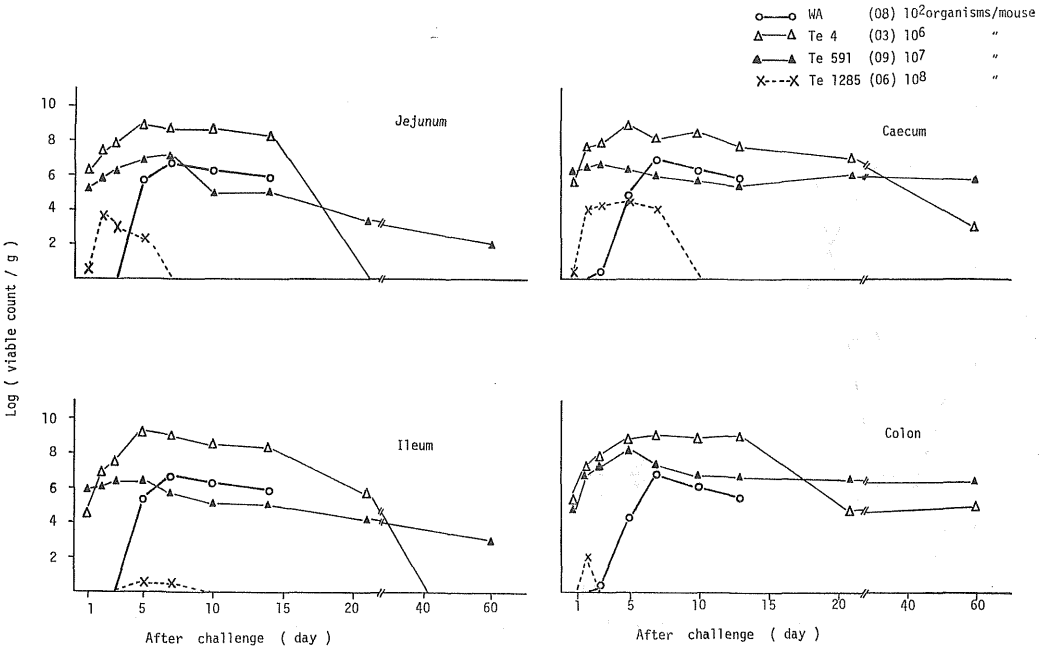


Fig. 3. Distribution of *Y. enterocolitica* in the Intestine of Infected Mice (i. v. challenge)

に，また空腸，回腸，盲腸，結腸および排泄便も同時に採取した．それぞれの臓器は5匹をプールして細坐し，その一定量を SS 寒天平板を用いて投与菌を分離した．腸管各部については腸内容物を含めてホモジナイズしたものを材料とした．分離菌株は自製の診断用抗血清を用いて投与菌と同一血清型菌であることを確認し，菌数を定量的に算出した．材料中に菌数が少ないと思われた場合には BHI broth (Difco) または PBS を用いて増菌培養を試み，定性的に投与菌の有無を記録した．

病理学的検討：感染動物は殺処分後直ちに解剖し，肉眼的観察を行なった後，投与菌の回収用に採取した各臓器の一部を型のごとくホルマリン固定し，パラフィン切片を作製してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行ないその組織学的変化を観察した．

実験成績

1. 血中における接種菌の消長

Te 4, Te 591, Te 1285 の3菌株は接種後1日で血中から急速にその数を減少し，いずれも21日以内に消失した．特に Te 1285株では2日後にはすでに10個/m*l* 以下となり，5日以降は増菌培養によっても投与菌を検出することはできなかった．これら3菌株の感染動物群では一度消失した菌が一定期間の後，再び血中から投与菌が検出されることはなかった．

WA 株では接種後3日目までは10個/m*l* 以下であったが，5日目には 10^4個/m*l* となり，以後14日後に感染動物が全例死亡するまで 10^4～10^5個/m*l* の値が継続した (Fig. 1)．

2. 接種菌の各臓器への経時的分布

感染動物の肺，脾，肝および腸間膜リンパ節における接種菌を定量的に測定し，その消長を Fig. 2 に示した．

Te 4 株は肺，肝および腸間膜リンパ節で，菌接種後5日以内にわずかに菌数の増加がみられるが，これらの臓器内では 10^6個/g 以上の菌数になることなく以後徐々に減少し，脾も含めてすべて40日以内に消失した．

Te 591 株は Te 4 株とほぼ同様の態度を示したが，一般に菌消失までの期間が長く，肝および腸間膜リンパ節では60日後でもなお増菌培養によって投与菌を検出することができた．

Te1285 株ではいずれの臓器も5日以内に急激に菌数を減少し，肺および腸間膜リンパ節では7日，肝および脾では14日以内に消失した．

WA 株はいずれの臓器内でも5日以内に菌数を激増させ，特に肺，脾では5日目で10^7～10^8個/g となり，この菌量は減少することなく約2週間後の死亡時まで継続した．

空腸，回腸，盲腸，結腸などの腸管における Te 4 株，Te 591 株および WA 株の3菌株はほぼ同様の態度を示した(Fig. 3)．すなわち，Te 4, Te 591 の両株では菌接種

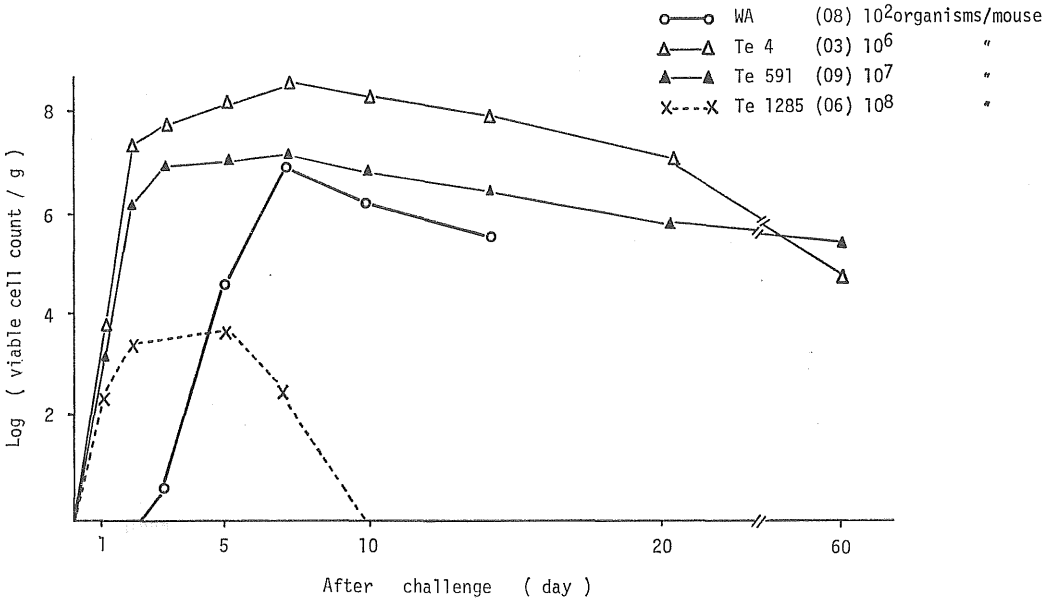


Fig. 4. Recovery of *Y. enterocolitica* from the Stool of Infected Mice (i. v. challenge)

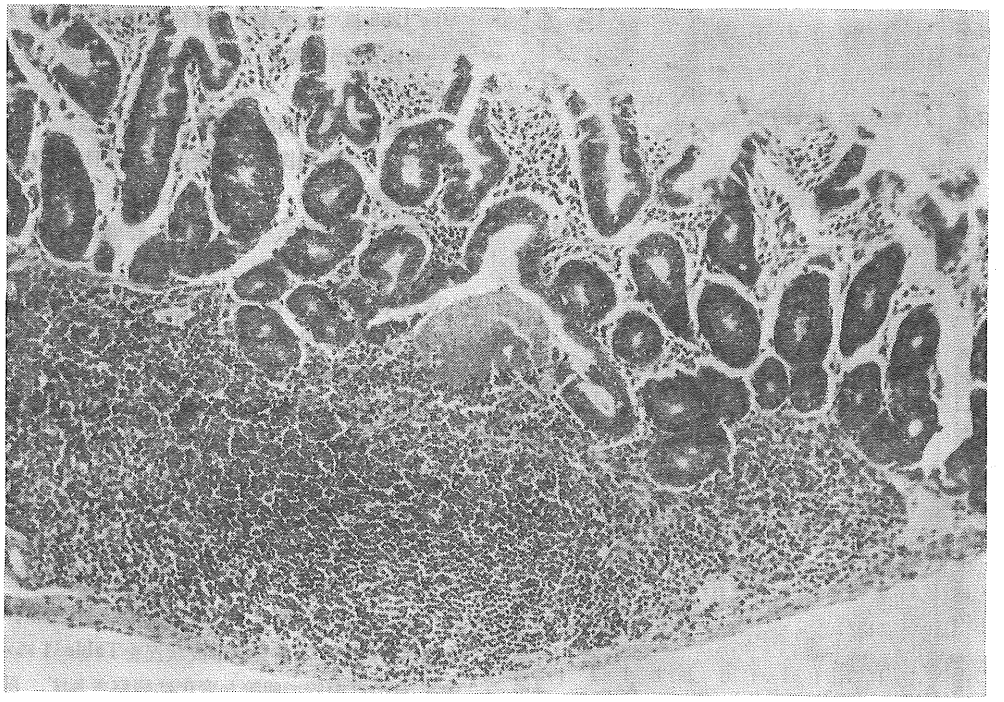


Fig. 5. Formation of a bacterial colony accompanied by accumulation of inflammatory cells and erosion of the mucus membrane on the Peyer's patch. The ileum of a mouse 5 days after i. v. challenge.

Table 1. Histopathological Findings of Bacterial Colonies in the Organs of Infected Mice (10^2-10^8/mouse i. v. challenge)

Days after challenge	Te 4 (0:3) Lung	Spleen	Liver	M.L.N.*	Ileum	WA (0:8) Lung	Spleen	Liver	M.L.N.	Ileum	Te 1285 (0:6) Lung	Spleen	Liver	M.L.N.	Ileum
1	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
3	−	−	−	−	+	±	±	±	−	−	−	−	−	−	−
5	−	−	+	−	±	±	±	±	−	−	−	−	−	−	−
7	−	−	−	−	±	±	±	±	−	−	−	−	−	−	−
10	−	±	−	−	±	±	±	±	−	−	−	−	−	−	−
14	−	−	−	−	±	±	±	±	−	−	−	−	−	−	−
21	−	−	−	−	+	.....	.....	.....	.....	.....	−	−	−	−	−
28	−	−	−	−	+						−	−	−	−	−
35	−	−	−	−	−						−	−	−	−	−
42	−	−	−	−	−						−	−	−	−	−
60	−	−	−	−	−						−	−	−	−	−

* M. L. N.: Mesenteric lymph node

後5日以内に10^7～10^8個/gの菌数となり，この値が長期間にわたって持続した．ただし，2週間後には徐々に減少し，Te 4 接種群の回腸，空腸では42日以内で消失した．WA 株接種群の腸管で菌数の急激な上昇がみられるのは3～7日後であり，7日目で10^6～10^7個/gに達した値が死亡時まで継続した．

Te1285株では他の3菌株のような急激な菌数の増加がみられず，盲腸部分で2～7日後に10^4個/gを最高値としていずれの部位でも10日以内に消失し，以後増菌培養によっても本菌を検出することはできなかった．

3. 排菌状況

供試4菌株の経日的排菌状況は，それぞれの感染動物における結腸部分の菌数の動態とほぼ完全に一致した(Fig. 4)．すなわち，Te 4 および Te 591 両株では菌接種後1日目に排泄便中の菌数は10^4～10^5個/gが5日目には両株とも10^8個/g となり，2～3週間後にやや減少はするが10^5～10^6個/gの値が60日以上にわたって継続した．

WA 株では3日後にはじめて排菌がみられ，その菌数は経日的に増加はするが，7日目の10^6個/g を境として徐々に減少傾向を示した．

Te 1285 株でも接種後1日目に排菌は認められるが，3～5日目の10^3個/g を最高値として減少し，10日以内に消失した．

4. 感染動物の肉眼的剖検所見

Te 4, Te 591 両株では感染後3～21日の間に著明な脾および腸間膜リンパ節の腫大，および5～7日目に肝に結節様壊死巣が認められた．また感染初期に腸管上部の脆弱化が観察された．

WA 株では5日目以降すべての臓器に巨大な壊死巣が形成され，全身感染の様相が明らかであった．この壊死巣は2週間以内に消退傾向はみられなかった．

5. 感染動物体内における接種菌の集落形成

Te 4, Te 591, WA株接種群の各種臓器中に，明らかに接種菌によると思われる菌集落が組織学的に観察された．この集落形成はTe 4株では肝で5日目，脾で10日目にみられたが，腸管各部でより明瞭で，3～28日の間に確認された (Fig. 5)．Te 4, WA, Te 1285株の肺，脾，肝，腸間膜リンパ節および全腸管中最も特徴的であった回腸部分における菌集落形成状況をTable 1に示した．WA 株では腸管で明瞭な変化は観察されず，肺，脾，肝の実質臓器中に巨大な菌集落が認められた．Te 1285株ではいずれの臓器にもこれらの変化を確認することはできなかった，

考　察

従来から指摘されているように，*Y. enterocolitica* は

実験動物に対して感受性は低く[10]，特殊な菌株を除いて患者由来株であってもマウスへの感染を成立させるためにはLD_{50}値に近い大量菌を投与する必要がある[5]．このことは本菌の病原性を判定するには致死毒性は指標となり得ず，感染の成否あるいは投与菌の定着の可否を基準としなければならないことを表わしている．したがって，動物を用いた場合には我々が開発した[5]マウスへの静脈内接種によって長期排菌を観察する実験系が病原性判定基準として最もすぐれた方法といえよう．

静脈内接種によって大量投与された菌が各種臓器内に長期間生存することは，*Y. enterocolitica* のマウスに対する病原性の弱さを表明しているものと解されるが，本実験でも病原株は時として脾，肝に結節様病変を形成するが多くの場合，動物に対し何ら傷害作用を及ぼすことなくこれら臓器内に長期間定着していた．一方非病原株は比較的長期間マウス体内で生存するが病原株との差は歴然としており，病原株と非病原株との差異が投与菌の生体内生存性からも証明された．

静脈内接種によって投与された菌がふん便中に長期間にわたって大量排菌されることは投与菌が体内臓器に定着し，菌の focus をつくり，腸管腔に常時排出されていると推定され[5]，感染動物の病理組織学的検討からその可能性も示唆されていた[6]．今回の実験で排菌と投与菌の経時的臓器内分布およびそれら臓器における病理組織学的検討という総合的観察から上記推論の正当性が支持され，さらに病原株の多くは腸管組織で最も長期間生存することも証明された．

病原株のうちTe 4, Te 591 の両株が腸管に親和性をもつ成績であったのに対し，WA 株ではマウスに対して全身感染と極めて高い致死毒性を示すことが確認された．WA 株は接種菌量が少ないために各種臓器における菌数の上昇が2～3日後にはじまるが，腸間膜リンパ節を除いていずれの臓器においても菌数の減少はみられず，特に血液および肺，脾では他の病原株と異なり，極めて急激な菌数の増加が特徴的であった．血中における菌数の増加は肺，脾など実質臓器に形成される病巣の出現に平行するが，菌接種マウスが2週間以内に全例死亡することはこれら全身感染の結果としての敗血症死であろう．

ヒトにおける *Y. enterocolitica* 感染症ではその病像と起因菌の血清型に密接な相関性のあることが知られている[11,12]．今回の我々の実験的感染の成績からも敗血症由来O群8の WA 株は全身感染を，腸炎由来O群3の Te 4とO群9の Te 591 両株は局所，しかも腸管に限局した感染像であることが明らかにされ，実際の感染像をよく表現していた．しかし他のO群8の菌株も WA 株同様の病原性を発揮するのか，またO群9は通常，関節炎との関連が重要であるとされている[13]が，こうした症例由来の株では実験動物での再現が可能であるのか否かは今後の課題である．さらに本菌の病原性をめぐる問題として，培養温度による病原性の差異[14]，*Yersinia*腸炎における大腸菌様エンテロトキシンの役割[15]など今後十分に検討する必要があろう．

結　論

Y. enterocolitica をマウスに静脈内接種を行ない，接種菌の臓器内分布および排菌を経時的に観察した．また感染動物の病変を病理学的に検索した．

腸炎由来であるO群3の Te 4およびO群9の Te 591 の2株は感染動物の各種臓器に長期間生存し，特に腸管組織への高い親和性が認められた．

敗血症由来であるO群8の WA 株はマウスに対して極めて高い致死毒性を示し，腸管よりむしろ肺，脾，肝への親和性が強く，全身感染の病像を呈した．

病原株接種動物の長期大量排菌の主体は腸管粘膜固有層から粘膜上皮にかけて形成された投与菌の集落に由来するものと推察された．

文　献

1) 善養寺　浩，坂井千三，丸山　務，柳川義勢：東京衛研年報，25, 1, 1974
2) Winblad, S.: *Contr. Microbiol. Immunol.*, vol. 2 77, Karger, Basel, 1973
3) 丸山　務：日細菌誌，28, 413, 1973
4) 丸山　務：モダンメディア，24, 315, 1978
5) Maruyama, T., Une, T., and Zen-Yoji, H.: *Contr. Microbiol. Immunol.*, vol. 5, 317, Karger Basel, 1979
6) Fukai, K., and Maruyama, T.: *Contr. Microbiol. Immunol.*,vol. 5, 110, Karger Basel, 1979
7) Une, T., Zen-Yoji, H., Maruyama, T., and Yanagawa, Y.: *Microbiol. Immunol.*, 21, 727, 1977
8) Zen-Yoji, H., and Maruyama, T.: *Japan. J. Microbiol.*, 16, 493, 1972
9) Carter, P. B. et al.: *Appl. Microbiol.*, 26, 1016, 1973
10) Knapp, W., and Thal, E.: *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org.* A223, 28, 1963
11) Wauters, G.: *Contribution a l'étude de Yersinia enterocolitica.* Univ. Cathol. de Louvain, Vander, Louvain, 1970
12) Mollaret, H. H.: *Path-Biol.*, 19, 189, 1971
13) Niléhn, B.: *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.*, 206, 1, 1969
14) Carter, P. B., and Collins, F. M.: *Infect. Immunity*, 9, 851, 1974
15) Feeley, J. C. et al.: *Contr. Microbiol. Immunol.*, vol. 5, 329, Karger Basel, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 18-25, 1980

都内小児のジフテリア・百日咳抗体保有状況について（1975～79年）

柴田　実*, 飯塚純子*, 安部昭子*, 大久保暢夫*

Incidence of Antibodies against Diphtheria and Pertussis among Healthy Children in Tokyo (1975～1979)

MINORU SHIBATA*, JUNKO IIZUKA*, AKIKO ABE* and NOBUO OHKUBO*

Keywords: 疫学調査 epidemiological survey, ジフテリア Diphtheria, 百日咳 Whooping cough, 抗体 Antibody

緒　言

各種感染症の流行予測事業の一環として，厚生省はジフテリア・百日咳の抗体保有状況を広域的に調査してきた．ジフテリアに関しては，1974年まではシック反応が行なわれていたが，1975年以降は培養細胞を用いた血清抗毒素価の定量法が行なわれるようになり，さらに同年から新たに百日咳の抗体調査も開始された．

過去に猛威を振ったこれらの疾患も，1960年頃から患者数の減少がみられ，また菌の検出率も低下し，特に百日咳は我国から絶滅したとまで言われるようになった．しかし1973年頃から再び患者発生数に増加傾向がみられるようになり，1977年には届出数だけでも5,420名に達するようになった[1]．この間，予防接種の副作用が社会的に問題となり，予防接種法の一部改正を余儀無くされている．この影響は幼小児に抗体保有率の低下として現われ，さらに最近の散発的な患者の発生状況からみても，今後も全国的な免疫状況調査が必要であると考えられている．

東京都においても，国の委託によって，1975年から都内の幼小児の血清についてジフテリア・百日咳の抗体保有状況の調査を行なってきた．今回は1975～79年までの5カ年間の成績を集計したので報告する．

材料および方法

1. 調査対象　衛生局指定の調査地域から採血収集し，抗体価測定に供した調査対象児の年令および検体数は表1のごとくである．なお本調査にあたっての協力保健所は，中央区日本橋，目黒区目黒・碑文谷，港区芝，世田谷区梅ヶ丘，渋谷区渋谷，大田区大森・雪谷・蒲田，新宿区牛込・四谷，千代田区神田・麹町の各保健所である．

2. ジフテリア抗毒素価　ジフテリア毒素は，培養VERO細胞に変性効果を示すことが知られている．この原理を応用し，毒素の微量定量を行なうカラーチェンジ法によってジフテリア抗毒素価を測定した．測定に用いた毒素・抗毒素は予研から配布されたものである．

表1.　調査対象数

上段：ジフテリア　下段：百日せき

年度＼年令	合計	0～2歳	3～5歳	6～10歳	11～14歳	不明
1975年	182	34	55	39	54	—
	182	35	54	51	42	—
1976年	157	—	36	67	54	—
	156	—	36	66	54	—
1977年	188	41	72	49	26	—
	189	41	73	49	26	—
1978年	167	60	30	39	35	3
	153	62	31	36	32	2
1979年	160	61	50	43	6	—
	160	60	51	43	6	—
合　計	854	196	243	237	175	3
	850	198	245	245	160	2

3. 百日咳凝集素価　予研から配布された標準抗血清と，ワクチン株（前野・東浜株）および新鮮分離株（山口・小林株）を抗原として，定量凝集反応によってその抗体価を測定した．

成績と考察

ジフテリア抗毒素価

1) 年令群別抗体保有状況　各年令群における抗体価を年度別に分け，累積抗体保有率で現わしたものを図1—1～5に示す．

0～2歳児ではいずれの年度においても抗体保有率は低く，年令群が高くなるにしたがって抗体価およびその保有率も高くなっている．特に0～2歳児では最近になるにしたがって，その保有率の低下がみられている．こ

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

ジフテリア年令群別抗体保有状況

図1—1.

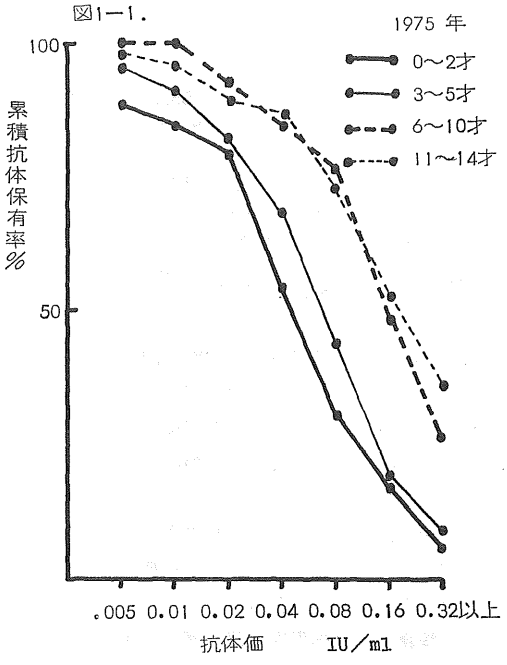


図1—2.

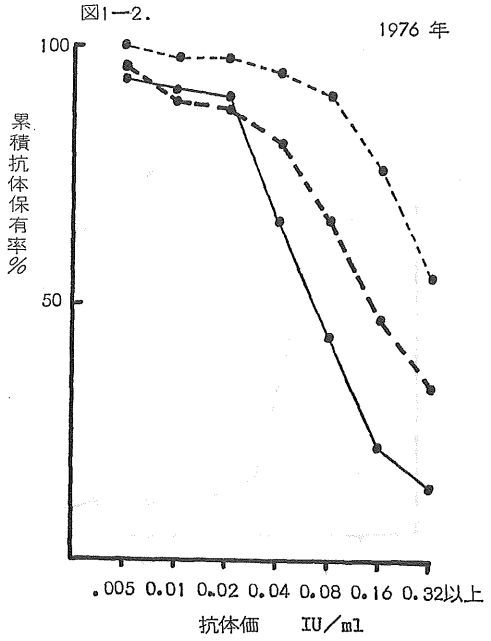


図1—3.

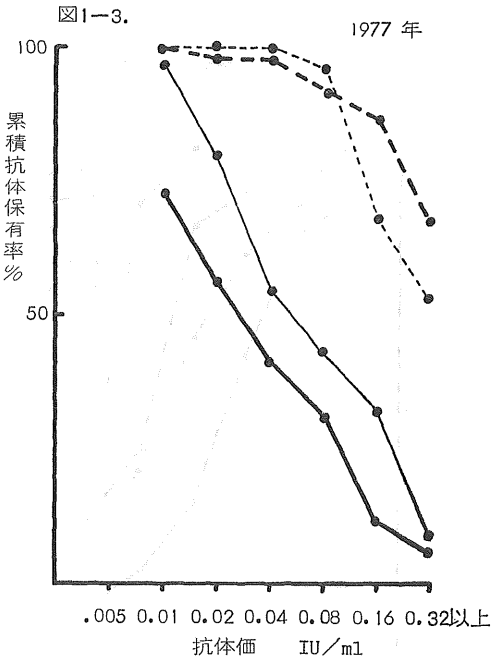


図1—4.

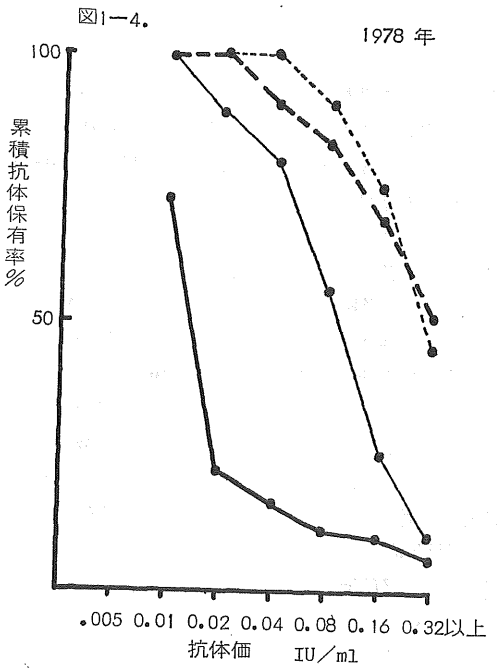
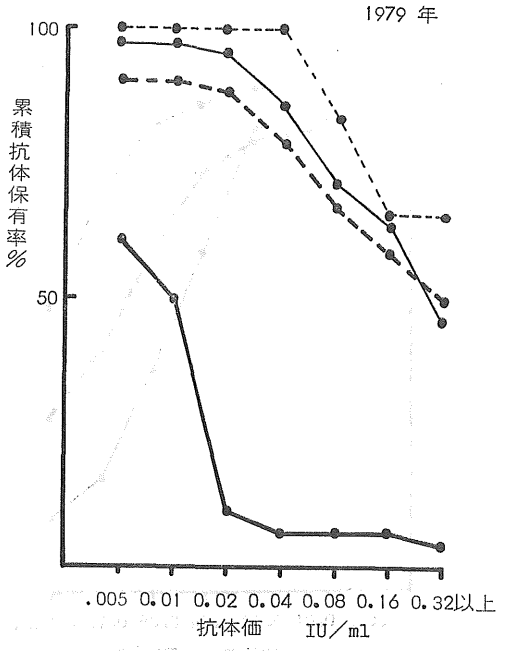


図1－5.



の年令群では陽性 schick level に相当する 0.01IU/ml 以上の抗体価保有率は5年間に約35%低下し，1979年に50%となり，更に0.02IU/ml 以上の保有率は約70%低下し11.4% となっている．この傾向は1978年から顕著にみとめられている．これは1975年の予防接種法の改正によって，第1期接種の時期が延長されたためと考えられる．事実表2のごとく1978，1979年度の接種率はそれぞれ1.7%，8.2%にしかすぎず，その結果として0～2歳児の抗体保有率は3～5歳児のそれを大きくしたまわっている．このことから都内の乳幼児特に0～2歳児ではジフテリアに罹患する可能性が非常に大きいものと考えられる[2]．さらに単純な感染症にも，各種抗菌性物質が乱用されている現況から，不顕性感染による免疫の獲得が期待できないことを考えると，低抗体保有率を示す0～2歳児の感染の危険性における意義はきわめて大きいものと考えられる．しかしこれらの成績を全国の調査成績と比較すると，東京都の成績は他府県にくらべ0～2歳児ではその抗体保有率はかなり高く，特に低抗体価（0.01～0.04IU/ml）を示すものの保有率は約2倍である．高抗体価（0.08IU/ml 以上）を示すものでは特に差がみられていない．

3～5歳児では，各年度とも0～2歳児ほど差はないが，1979年度では0.16IU/ml 以上の抗体価をもつ者が特に多く，6～10歳児を上回る抗体価および保有率を示している．0.01IU/ml 以上の保有率も，5年間ともほぼ100%近い保有率を示し，全国の成績と比較してもやはり都内3～5歳児は，0～2歳児と同様に高い保有率を示している．この傾向は，人口密度の高い都市にみられる特徴であると考えられる[3]．

表 2. 0～2歳児の予防接種歴別数

年度＼接種歴	合計	無	不明	1期	1～2期	1～3期	1～4期
1975年	34 (100.0)	3 (8.8)	— —	19 (55.9)	12 (35.3)	— —	— —
1976年	対象者無し						
1977年	41 (100.0)	31 (75.6)	4 (9.8)	5 (12.2)	1 (2.4)	— —	— —
1978年	60 (100.0)	39 (65.0)	20 (33.3)	1 (1.7)	— —	— —	— —
1979年	61 (100.0)	54 (88.5)	2 (3.3)	5 (8.2)	— —	— —	— —

6～10歳，11～14歳児では共に高い抗体価およびその保有率を示している．これは予防接種法改正前の接種効果によるものと考えられる．

2） **接種歴別抗体保有状況** 図2－1～5は予防接種歴別に抗体保有状況を示したもので，いずれの年度においてもワクチンの接種群と未接種群との差は明らかで，接種回数に比例して，抗体価およびその保有率の上昇が認められている．1975年度を例に取ると，感染防御抗毒素

ジフテリア接種歴別抗体保有状況

図2－1.

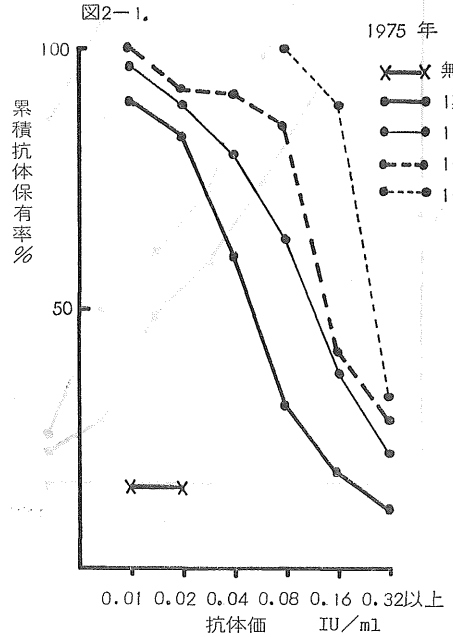


図2—2.

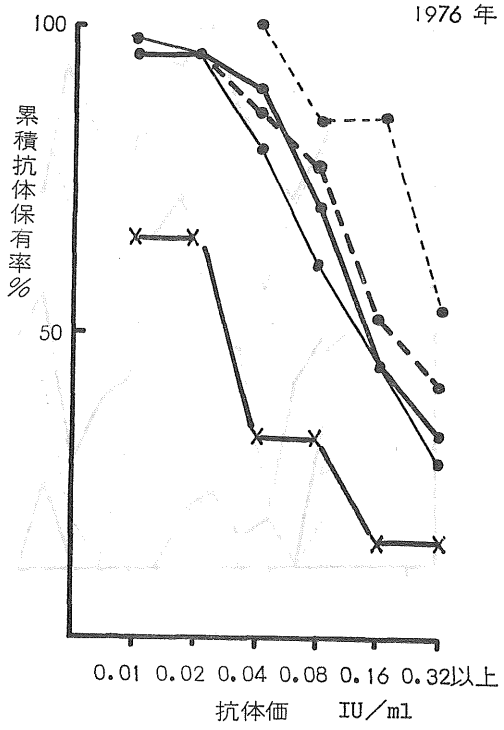


図2—3.

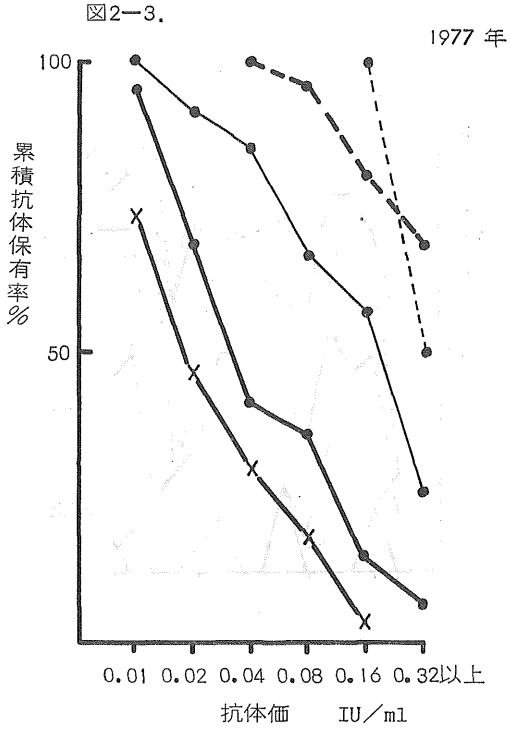


図2—4.

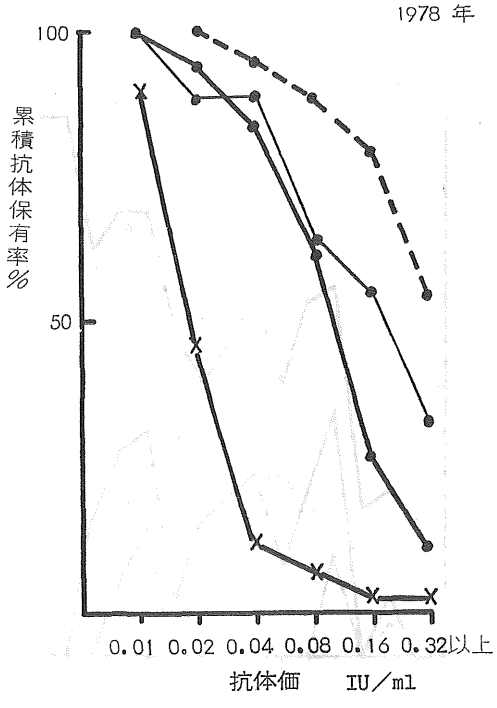
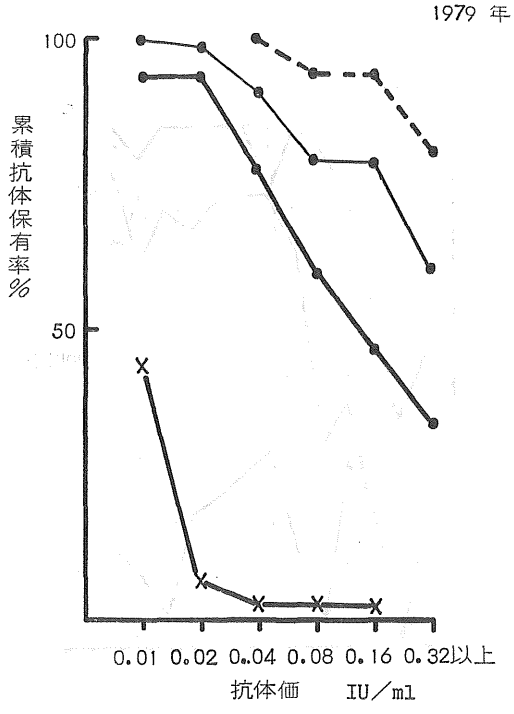


図2—5.



百日咳抗体保有状況

図3—1.

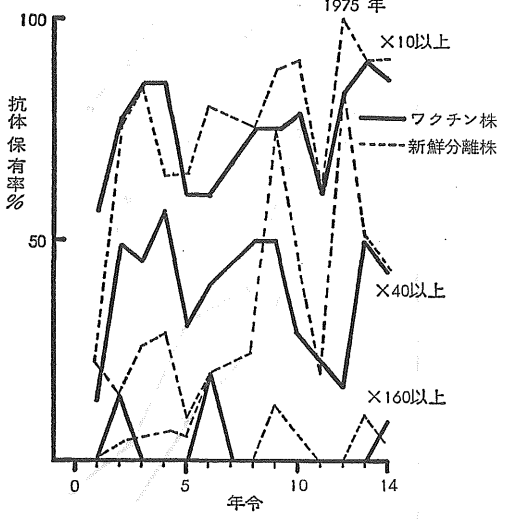


図3—2.

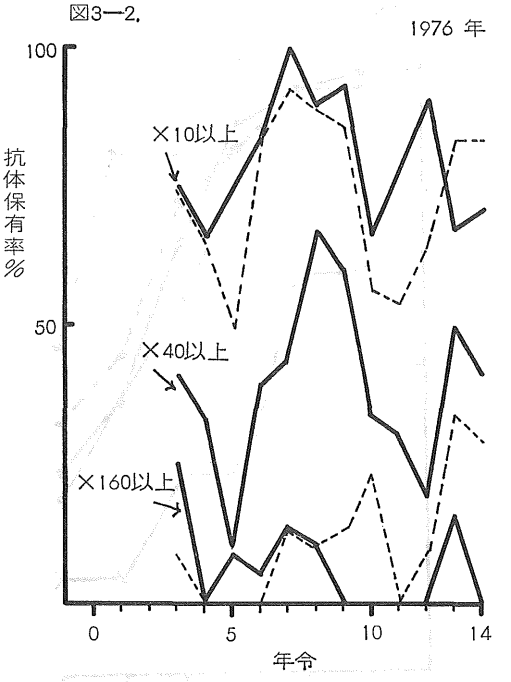


図3—3.

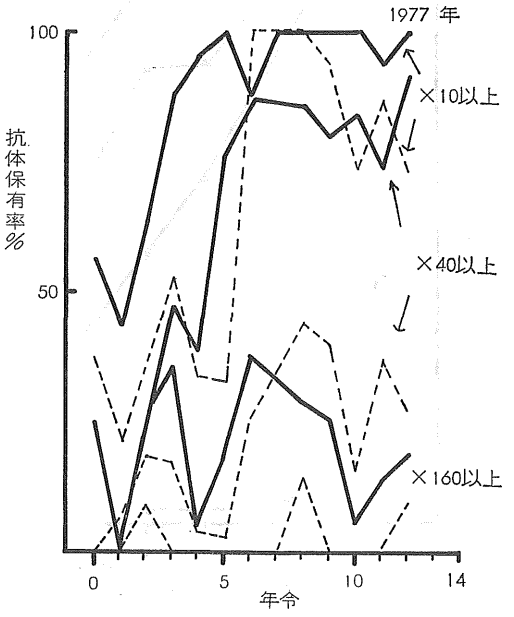


図3—4.

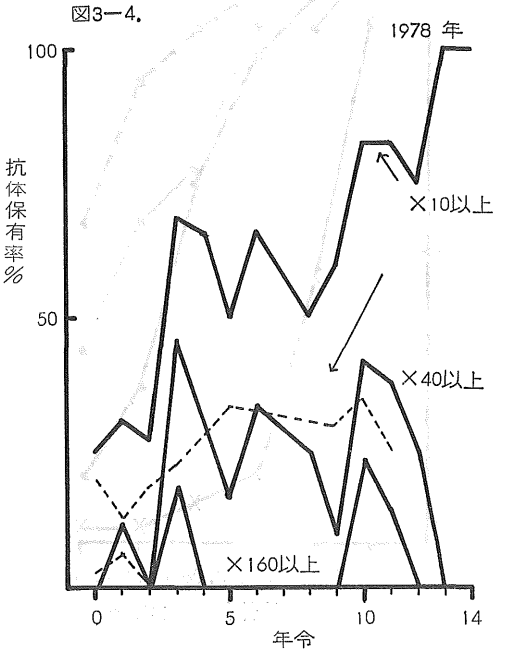
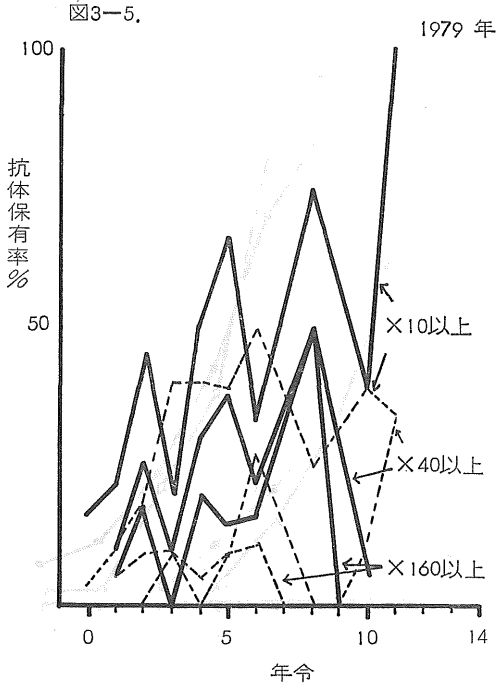


図3—5.



価である0.01IU/ml以上の抗体価をもつ者は接種1期のみでは90.8%，第2期接種では98.1%で，3期まで完了した者は全員0.01IU/mlの抗体価を保有していることになる．この成績は各年度もほぼ同様で，免疫獲得における追加接種の意義が大きいことがあらためて確認された．以上今回の調査でも明らかなように，東京都で予防接種が円滑におこなわれるかぎり，ジフテリアによる大流行の恐れは大変少ないものと思われるが，図1—1～5の如く0～2歳児に0.005IU/mlの抗毒素価を示すものが60%もある現況では，この年令群における感染発症の危険性は否定できないと考えられる．

百日咳凝集素価

1) **年令別凝集抗体保有状況**　各年令群における抗体保有率を，抗体価3群（×10≦，×40≦，×160≦）に分けて図3—1～5に示した．

ワクチン株で凝集素価を測定した場合，10倍以上の抗体保有率は2～3歳児まで高く，その後低下し，増減をくり返しながら少しずつその保有率が高くなっていることが明らかである．しかし各年令群の10倍以上の抗体保有率は年度別にかなり差がみられ，1975年では4歳児で85.7%に達しているが，1976年では66.7%，1977年では95.2%，1978年では66.7%，1979年では50%とバラツキがみられる．特に0～1歳児では抗体保有率が低いが2～3歳毎にその上昇がみられている．40倍以上の抗体保有率曲線は10倍以上のそれとほぼ平行しているが，最近の1978，1979年では年令が高くなるにしたがって10倍以上の抗体保有率曲線と離れ，40倍以上の抗体価を保有する者が減少していることが明らかとなる．又160倍以上の抗体価をもつ者は少なく，12～14歳頃でも各年度とも15%前後の保有率を示すにしかすぎない．

新鮮分離株で血中凝集価を測定すると，上述の3群の抗体価はワクチン株に比較してその保有率は低く，特に1978，1979年は前3年間にくらべ著しく低い．さらに40倍以上の抗体保有曲線ではその差は特に大きい．160倍以上の抗体保有率は1976，1978年はほとんどみられなかった．百日咳の完全発症を100%防御する抗体レベルをSako[4]の報告どおり320倍以上とすると，これらの抗体保有状況から相当大きな流行が発生する可能性があるといえる．しかしこれは家族内の濃厚な感染機会の場合であって，同報告にも10倍以上の抗体価があれば75%は感染防御があるとされている．しかし10倍以上の抗体保有率の低下や10倍以下の抗体価を示す者の増加は，流行発生の可能性を示唆するものと考えられる．0～1歳児のまだ予防接種歴のない年令に高い抗体価を示すものがあることは，百日咳の不顕性感染があったことを示唆するものであるが，乳児では百日咳は典型的な臨床症状を示

百日咳接種歴別抗体保有状況

図4—1.

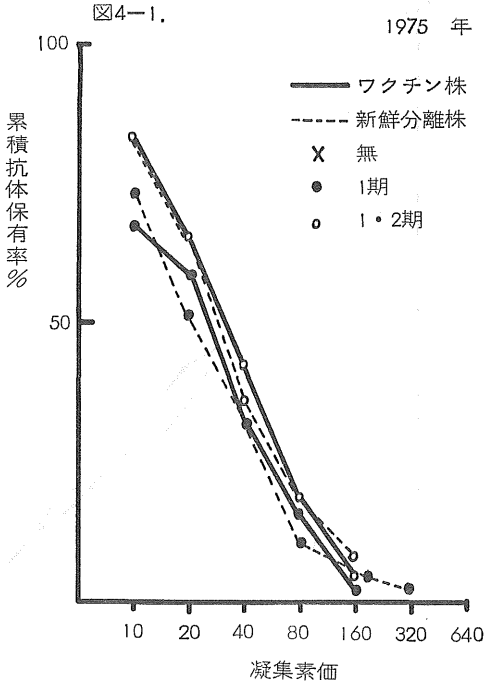


図4—2.

1976 年

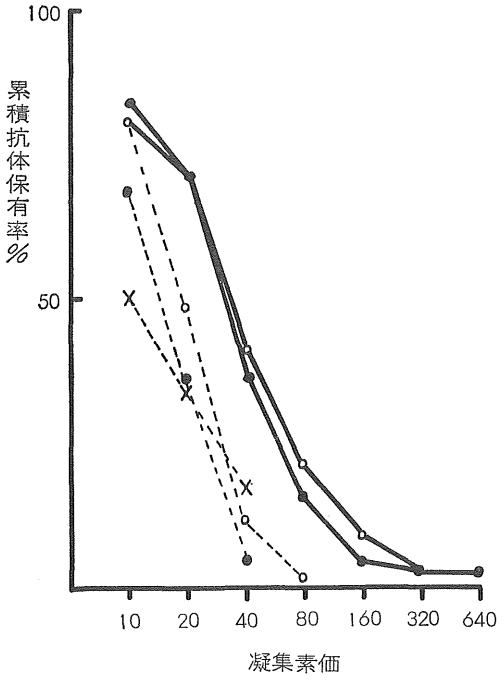


図4—3.

1977 年

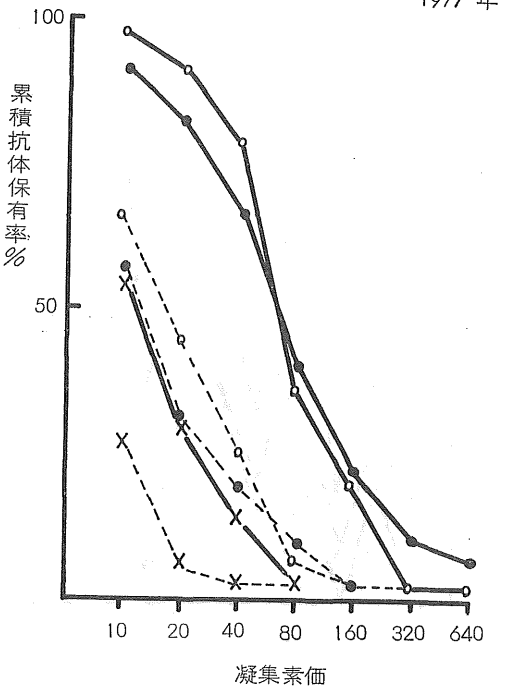


図4—4.

1978 年

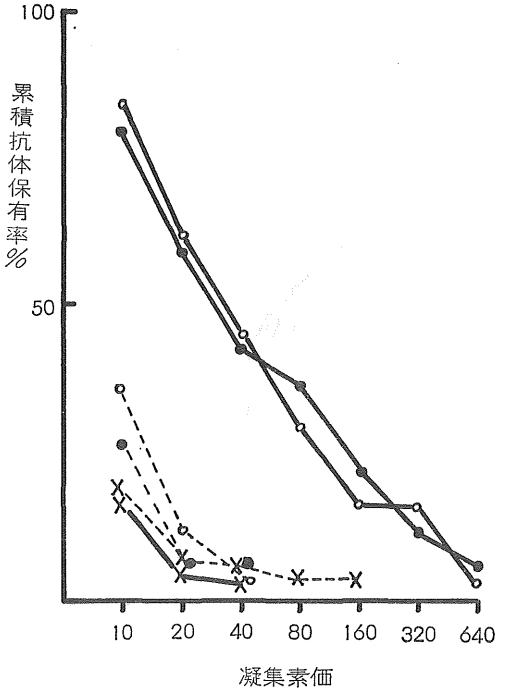
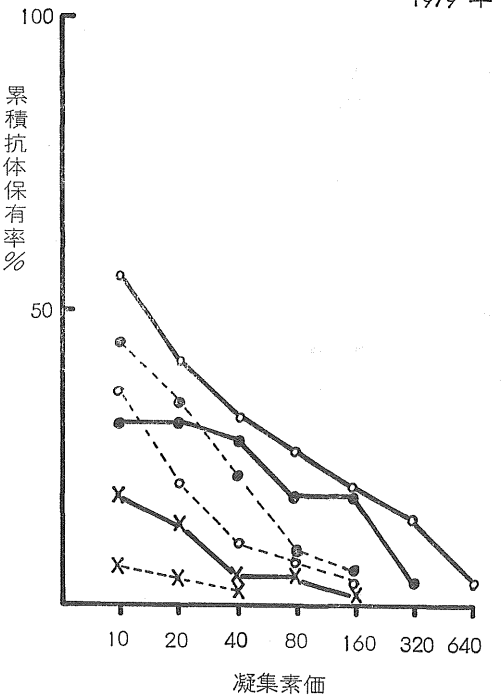


図4—5.

1979 年



さず，突如として急性肺炎の臨床像を示し，重篤な経過をとることが多いので，きわめて危険であるといえる．低年令群における今後の予防接種の在り方と，継続した免疫学的な監視が必要であると考えられる．

2) 予防接種歴別抗体保有状況

図4－1～5に予防接種歴別抗体保有率を示した．

ワクチン接種効果は明瞭で1・2期とも接種を完了し，10倍以上の抗体価を示すものは1975年84%，1976年80.5%，1977年97.8%，1978年83.8%，1979年56.2%であるのに対して，未接種者群では1975年0%，1976年33.4%，1977年54.1%，1978年16.7%，1979年19%と低率であった．接種者群中でも1期のみと2期以上とで免疫応答に差が現われるのは当然であるが[5]，各年度とも10倍の抗体価では平均約15%程度の差が認められるが，20倍以上ではその差は明らかではなかった．ワクチン株でなく，新鮮分離株で測定した成績では，1975, 1976, 1978年は未接種群と接種群との差はなく，抗体保有率は低いが，ワクチン株と同様の曲線を示している．又ワクチン株に対する抗体保有曲線が新鮮分離株のそれよりも各年度とも高い値を示しているが，最近分離される百日咳菌の80%は血清因子1，3型株であり，ワクチン株が1，2型であるからである．これら血清因子型と感染防御能との関係は明らかではないが，現状では自然感染の動態を把握する目的で2種類の抗原が用いられている．したがってこれらの成績から，ワクチンの接種によって新鮮株に対する応答性も比較的良く保たれていることが明らかである．このことからワクチン接種によって10倍以上の抗体価を獲得すれば，因子型の異なる菌株の感染があっても，発症の阻止ないしはその臨床症状を軽減することができるものと考えられる．

結　論

1975～79年の5年間に都内居住の小児（0～14歳）から採取した血清について，ジフテリア抗毒素価および百日咳凝集素価を測定し，次の結論を得た．

1. 5年間の調査成績では，ジフテリアおよび百日咳ともにその抗体保有率は0～2歳児で低く，年令が高くなるにしたがって高率になる傾向がみられた．

2. ジフテリア・百日咳ともワクチン接種歴の有無およびその回数によって抗体保有率に差がみられ，予防接種の効果は明らかに認められた．

3. 全国の抗体保有率と比較すると，東京都のそれは他府県よりも高かった．これは人口密度の高い都市部における特徴であると考えられた．

4. 百日咳の抗体保有率は最近になるにしたがって，低くなる傾向が見られ，今後患者が多発する可能性があるものと考えられた．

文　献

1) 金子義徳，村田篤司：モダンメディア，25(3)，50，1979
2) 水原春郎：感染症学雑誌，51,(2) 47，1977
3) 東京都衛生局公衆衛生部防疫課：伝染病流行予測調査報告書，1978
4) Wallace, Sako, M. D.: *J. pediat.*, 30, 29, 1947
5) 船橋　満：感染症学雑誌，49,(8)326，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 26-28, 1980

A群溶連菌に対するST合剤の感受性と測定用培地の検討

柏木義勝*, 柴田　実*, 大久保暢夫*

Studies on the Susceptibility of ST-drug against Group-A *Streptococci*

YOSHIKATSU KASHIWAGI*, MINORU SHIBATA* and NOBUO OHKUBO*

Keywords: ST合剤 Sulfamethoxazole-Trimethoprim, 感受性 Susceptibility, 感受性培地 Sensitivity test media, 化膿性レンサ球菌 *streptococcus pyogenes*

緒　言

ST合剤は，わが国で開発された持続性サルファ剤Sulfamethoxazole (SMX) とアミノピリミジン系誘導体であるTrimethoprim (TMP) を5：1の割合に配合した内服用の化学療法剤である．これは細菌の核酸合成阻害作用をもつ，これら2種類の薬剤を組み合わせることによって，相乗的抗菌力を期待したものである．

今回，私どもはA群溶連菌に対するSMX，TMPおよびST合剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し，同時に感受性測定に用いる培地の適性について，若干の検討を加えたので報告する．

材料ならびに方法

1) 供試菌株

全国各地から収集したA群溶連菌の中から1977年分離の156株を供試した．

2) 供試薬剤

Sulfamethoxazole, Trimethoprim およびST合剤の3剤である．これらはすべて重量単位で供試した．

3) 感受性測定用培地

基礎培地として tryptosoy agar (以下TSと略す), sensitivity test agar (以下STと略す), Mueller Hinton agar (以下MHと略す) の栄研製の3種を用い，さらにこれらの各々に溶血ウマ血液を5％に加えたもの計6種の培地を使用した．

4) 抗菌力測定法

化学療法学会標準法[1]に準じた寒天平板希釈法を用い，最小発育阻止濃度を感受性として記載した．

成績および考察

1) 感受性測定用培地の検討

Tableに示す如く，サルファ剤の抗菌活性に拮抗する物質を含むペプトンが培地に入っているTSを用いた場合，当然ながら供試菌株のすべてが，SMXに対して，200μg/ml以上のMICを示した．この現象はTMPに対してもみられ，TSではSMX同様に高いMICを示した．

サルファ剤のMICを測定する場合には，溶血ウマ血液を添加し，培地中の拮抗物質を中和することによって正しいMICが得られることがHarperら[2]によって報告されている．また，その添加濃度は5～7.5％が最も適正であると藤井ら[3]は報告している．

本実験にあたって，私どもは，これらの報告をもとに溶血ウマ血液を5％の割合に各基礎培地に添加した．

基礎培地をTSとし，溶血ウマ血液を加えた場合，SMXではすべての菌株が25μg/ml以上のMICを示し，その拮抗作用はほとんど中和されなかった．TMPでは著明に抗菌活性が上昇し，すべての菌株が0.1～3.13μg/mlのMICを示した．ST合剤の場合も同様で，供試菌株のMICは0.78～1.56μg/mlであった．

このことから，溶血ウマ血液は，培地基材中のサルファ剤拮抗物質の中和は，それ程でもなく，むしろTMP拮抗物質に対する中和もしくは吸着作用がかなり大きいものであることが明らかとなった．

ST培地は窒素源としてペプトンの代りにカザミノ酸を用いており，拮抗物質の最も少ない培地の1つとして，MHと同等に扱われているが，今回の成績では，供試した3剤に対するMICは，菌株間に差は認められないが，TSよりやや低いMICを示すに過ぎない．すなわち，SMXに対するMICは12.5μg/ml以上であるが，供試菌株の95.5％は200μg/ml以上のMICを示し，TMPには0.2μg/ml，ST合剤には0.39μg/mlのMICを示す菌株があるとはいえ，供試菌株の70％以上はそれぞれの薬剤に対して200μg/ml以上のMICを示した．したがってST培地には，SMX，TMPに対する拮抗物質の含有量が，それ程小さいものではないと考えられ

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

Table Distribution of MICs of SMX, TMP and ST-drug calculated on *Streptococcus pyogenes*

Drugs	SMX	SMX	SMX	SMX	SMX	SMX	TMP	TMP	TMP	TMP	TMP	TMP	ST-drug	ST-drug	ST-drug	ST-drug	ST-drug
Media	TS	ST-A	MH	TS+HB	ST-A+HB	MH+HB	TS	ST-A	MH	TS+HB	ST-A+HB	MH+HB	ST-A	MH	TS+HB	ST-A+HB	MH+HB
No. of strains	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)	156 (100)
MIC μg/ml																	
≧ 200	156 (100)	149 (95.5)	89 (57.1)	89 (57.1)	105 (67.2)	1 (0.6)	156 (100)	112 (71.8)					116 (74.4)				
100		2 (1.3)	13 (8.3)	26 (16.7)	15 (9.6)	2 (1.3)		11 (7.1)					13 (8.3)				
50		1 (0.6)	8 (5.1)	35 (22.4)	11 (7.1)			4 (2.6)					2 (1.3)				
25			16 (10.3)	6 (3.8)	11 (7.1)	3 (1.9)		7 (4.5)									
12.5		4 (2.6)	19 (12.2)		10 (6.4)	17 (10.9)		2 (1.3)					8 (5.1)				
6.25			11 (7.1)		4 (2.6)	33 (21.2)											
3.13						60 (38.5)		2 (1.3)		2 (1.3)			1 (0.6)				
1.56						23 (14.7)		4 (2.6)	1 (0.6)		1 (0.6)	2 (1.3)	2 (1.3)		99 (63.5)	1 (0.6)	
0.78						12 (7.7)		5 (3.2)	20 (12.8)	7 (4.5)	41 (26.3)	1 (0.6)	2 (1.3)	56 (35.9)	57 (36.5)	86 (55.1)	9 (5.8)
0.39						5 (3.2)		8 (5.1)	99 (63.5)	74 (47.4)	81 (52.0)	62 (39.7)	12 (7.7)	84 (53.8)		65 (41.7)	115 (73.7)
0.2								1 (0.6)	36 (23.1)	69 (44.2)	32 (20.5)	83 (53.3)		16 (10.3)		4 (2.6)	32 (20.5)
0.1										4 (2.6)	1 (0.6)	8 (5.1)					

TS : Tryptosoy Agar
ST-A : Sensitivity Test Agar
MH : Mueller Hinton Agar
+HB : with 5%lyzed hemolyzed horse blood

SMX : sulfamethoxazole
TMP : trimethoprim
ST-drug : SMX (5–weight) + TMP (1–weight)

る．さらにこの培地に溶血ウマ血液を加えた場合でも，SMX に対する MIC は，それ程改善されず，TS の場合と同様，TMP，ＳＴ合剤に対してのみ低い MIC を示すことが認められた．

藤井ら[3]は培地のロット差によって，MIC が著しく変動することを経験している．したがって，今回供試したＳＴ培地のロットに拮抗物質が比較的多く含まれていたとも考えられるが，このようにロット差が大きく，得られる MIC が常に変動する培地での抗菌力の測定は，決して好ましいものではないと考えられる．

MH は供試した3種の基礎培地の中では，MIC が最も小さく，さらに本培地に溶血ウマ血液を加えたものは，他と比較して，さらにその MIC が低く，拮抗物質の作用は，ほぼ中和されたものと考えられた．

以上の成績から，サルファ剤の MIC の測定には，窒素源としては，拮抗物質の含有量の少ないカザミノ酸の方が良いが，それ程絶対的なものではなく，それよりはむしろMHに含まれるデンプンや溶血ウマ血液による有害因子の吸着作用の方が，感受性値に与える影響が大きいものと考えられた．

2) 薬剤感受性

上記の如く，サルファ剤の感受性測定用培地として，溶血ウマ血液添加 MH が最も適当であることが明らかとなったので，本培地を使用して得た成績についてのみ述べることにする．すなわち，SMX に対するA群溶連菌の感受性は MIC ≧200～0.39μg/ml であり，耐性菌から感受性菌まで広範囲に分布している．

TMP に対する MIC は 1.56～0.1μg/ml の範囲にあり，供試したすべての菌が感受性値を示した．

ＳＴ合剤に対しては，供試したすべての菌が MIC 0.78～0.2μg/ml の狭い範囲に分布しており，TMPと同程度の感受性を示した．

以上の成績から，A群溶連菌に関しては，TMPとＳＴ合剤は，ほぼ同等の抗菌力を示しており，ＳＴ合剤の相加作用もしくは相乗作用を認めるまでには至らなかった．

結　論

ＳＴ合剤およびその配合剤である SMX，TMP のA群溶連菌に対する抗菌作用を検討し，且つその感受性測定用培地の適性試験を行い，次の結論を得た．

1) SMX，TMP およびＳＴ合剤の抗菌力測定用培地としては，今回検討したものの中では，5％溶血ウマ血液添加 Mueller Hinton agar が最も適していた．

2) SMXに対するA群溶連菌の MIC は ≧200～0.39 μg/ml であって，菌株間の差の大きいことが認められた．

3) TMP およびＳＴ合剤はA群溶連菌に対し，ほぼ同等の抗菌力を示し，ＳＴ合剤の相加もしくは相乗作用は認められなかった．

文　献

1) ＭＩＣ測定法改定委員会：CHEMOTHERAPY，22（6），1126，1974

2) Harper, G. J., and Cawston, W. C.: *J. Path. Bact.*, 57, 59, 1945

3) ＳＴ合剤研究会，ＭＩＣ測定法のための小委員会，代表　藤井良知：CHEMOTHERAPY，21（2），67，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 29-35, 1980

1979年東京都における日本脳炎疫学調査

吉田靖子*, 関根整治*, 岩崎謙二*, 斎藤正度**,
松本栄一**

Epidemiological Survey of Japanese Encephalitis in Tokyo in 1979

YASUKO YOSHIDA*, SEIJI SEKINE*, KENJI IWASAKI*, MASANORI SAITO** and
EIICHI MATSUMOTO**

Keywords: 疫学 epidemiology, 日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus, ブタ swine, コガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus mosquitoes*

緒　　言

わが国において1967年までは日本脳炎（以下日脳と略す）の流行が猛威をふるっていたが，最近はその日脳感染流行様相が変わってきた．

従来行ってきたと場ブタのＨＩ抗体獲得率調査，主媒介蚊の雌コガタアカイエカの出現消長とウイルス分離試験および一般都民の感受性調査の長期間にわたる観測成績[1-13]と，感染流行拡大様式の設定および集団における抗体保有分析に回帰線法を導入して，日脳感染流行様相の変化の要因を分析し報告する．

実験材料および方法

都内飼育ブタ血清　1979年１～12月都下多摩地区で飼育したブタ（６～８か月令）から，と殺時に採取した血清1228件である．

健康都民血清　供試血清は1979年５月21日～７月25日の間に，都内居住一般住民370名から採取した血清である．検索対象者の年令は３～84歳であった．

HI 試験　常法に準じてマイクロタイター法により実施した[1-11]．抗原は市販品の JaGAr 01株，中山株抗原を使用した．

中和試験　プラック減少法を応用して実施した[14]．中和抗体価は50％プラック減少率値から算定した．

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[1-11]．捕集後氷室内にて捕集地区別に雌コガタアカイエカの吸血蚊と未吸血蚊に分類し，群別の蚊プール乳剤を作成しウイルス分離試験を行った．

検索成績および考察

都内飼育ブタの日脳ＨＩ抗体獲得状況　1979年１～12月の間に計25回にわたって都下多摩地区での飼育ブタから採取した血清1228件について，日脳ＨＩ抗体価を測定した．採血月日別に整理した検査成績を表１に示した．

８月13日以前の調査で観察された抗体陽性ブタは，２ＭＥ感受性抗体試験の結果，陽性を示すものがなかったことからおそらく1978年の流行時の反映であるとみなすことができる．1979年は９月５日以降，ＨＩ価の高いブタが出現し，なお２ＭＥ感受性陽性ブタも確認されるようになったことから，日脳ウイルス散布状況が盛んになったのは８月下旬からと推定した．また，９月19日採血のＨＩ抗体陰性ブタ血清から日脳ウイルス１株（JaTan 1/79)を分離した．79年次の最高抗体獲得率値は10月17日採血検体の調査で得られたが，前後の抗体獲得率値との対比から同値は偶然に得られたと解すべきであろう．ほとんどの抗体獲得率値が０～８％の範囲を低迷し続けたことから，79年の日脳ウイルス散布はきわめて低度にとどまったことが考えられた．

79年に採取した都内飼育ブタ血清1228件についてＨＩ価≧10を示した抗体陽性の比率をみると，JaGAr 01 株は67件(5.5％)，中山株では51件(4.2％)であり，JaGAr 01株抗原が若干高率であった．また同一血清の両株抗原に対するＨＩ価を対比すると $r=0.958$ の強い正の相関が観察された．

厚生省保健情報課の全国日本脳炎情報をみると，79年のブタ間の日脳ウイルス汚染は78年同様各地に広がり，秋田・福島県を含む２府30県がブタのＨＩ抗体獲得率から日脳ウイルスの汚染地区と推定された．また関東地区１都6県では，ブタのＨＩ抗体獲得率上昇に明らかな差がみられた．神奈川・千葉両県では９月11～17日に採血したブタ血清のＨＩ抗体獲得率が50％を上回ったことから，日脳ウイルスの汚染地区と推定された．近畿以西地区と比較すると汚染推定日は１か月～１か月半遅れていた．

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

表 1. 1979年都内飼育ブタ血清の日本脳炎HI抗体獲得状況

採血年月日	検査数	HI抗体価 (JaGAr01株) 10×2^n のn値										陽性率 (n≧0)	2ME[2*]感受性抗体保有率	ウイルス[3*]分離
		(−)[1*]	0	1	2	3	4	5	6	7	8			
79. 1.24	50	38		1	3	3	2	1	1	1		24%	0%	0/38
2.21	50	46	1			1	2					8	0	0/46
3.28	50	47				1	2					6	0	0/47
4.18	50	49								1		2	0	0/49
5.23	50	48	1					1				4	0	0/48
6.20	50	47	2	1								6		0/47
7. 4	50	49	1									2		0/49
7.11	50	47	2				1					6	0	0/47
7.18	50	49		1								2		0/49
7.25	28	28										0		0/28
8. 1	50	50										0		0/50
8. 8	50	49	1									2		0/49
8.13	50	46	3	1								8		0/46
8.22	50	50										0		0/50
8.29	50	49	1									2		0/49
9. 5	50	47			1			1		1		6	2	0/47
9.12	50	50										0		0/50
9.19	50	49			1							2	2	1[4*]/49
9.26	50	50										0		0/50
10. 3	50	49	1									2		0/49
10.12	50	46	2						1	1		8	0	0/46
10.17	50	36	1					2	6	3	2	28	6	0/36
10.24	50	46						2		1	1	8	2	0/46
11.21	50	50										0		0/50
12.12	50	46					1	1	2			8	0	0/46

1* (−)=HI価<10
2* ヨードアセトアミド透析法　(%)=(2ME感受性陽性数／全検査数)×100
3* HI価<10のブタ血清について，乳のみマウスを用いて行った．
4* JaTan 1/79

ブタ間での日脳ウイルス感染流行拡大経過の数理論解析を計画するとき，系列各時点の新しい感染ブタ数は集団内の感受性個体数，感染源個体数およびウイルスの伝達係数の3者の積として解することができるはずである[15]．集団内の感受性個体数と感染源個体数は流行経過の進行に応じて次から次へと変化していくことになる．

関東7地区におけるブタの観測HI抗体獲得率値と理論計算上の対応値をグラフ紙上にプロットして対比すると図1のようになる．

図1には，感染開始時の感染源の大きさを一定（V＝0.1；感染源個体数を集団個体数の0.1%）にして，ウイルスの伝達係数値を変化させて求めた理論累積曲線を示した．図に示した流行経過の単位時間は1/2週とした．図に示していない4県は，東京都の場合とほとんど変わりがなかった．

理論累積曲線との対比から，日脳ウイルス感染流行拡大様式のウイルス伝達係数値が一番大きかった千葉県では，流行期間が約1か月，次いで神奈川県の1か月半であったのに対して，伝達係数の低値であった1都4県では3か月間にわたった．ウイルス伝達係数値が大になるほど感染流行は，短期間に終息することを明らかにできた．

コガタアカイエカの出現消長およびウイルス分離試験

1979年6月25日～10月19日にかけて，都心某地区と都衛研鶏舎の2点に一定日数の間隔でライトトラップを設置して蚊を捕集し，蚊の出現消長を解析するとともに雌コガタアカイエカについては日脳ウイルスの分離試験を行った．同期間中捕集した雌コガタアカイエカの出現

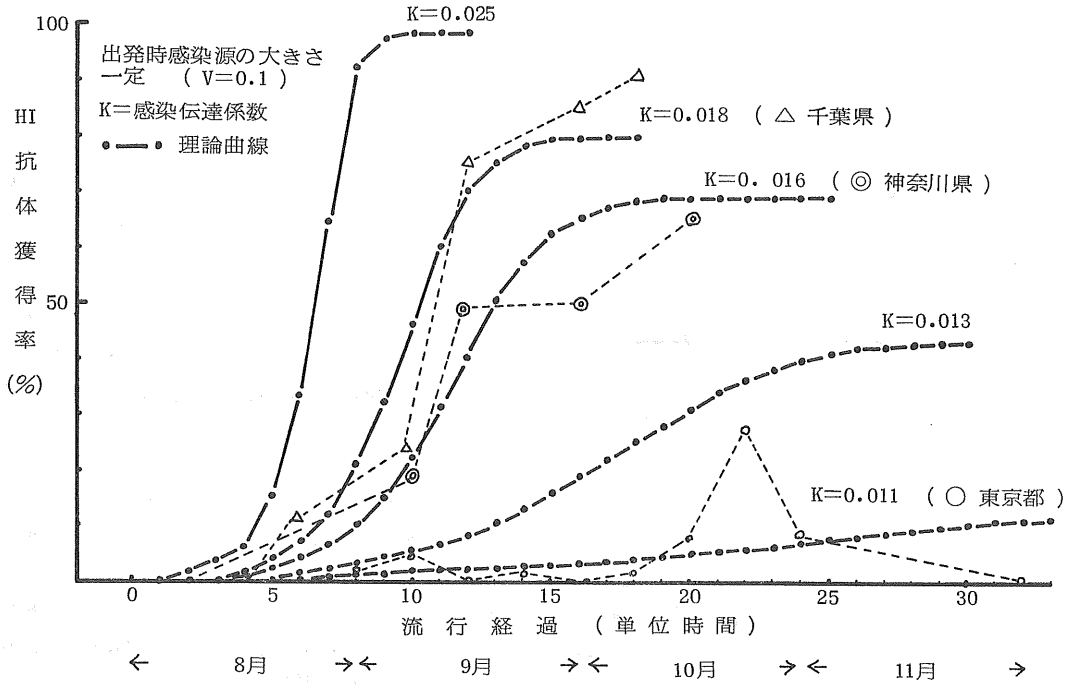


図 1.　関東地区におけるブタの日脳ＨＩ抗体獲得率と感染伝達率別の累積感染率曲線

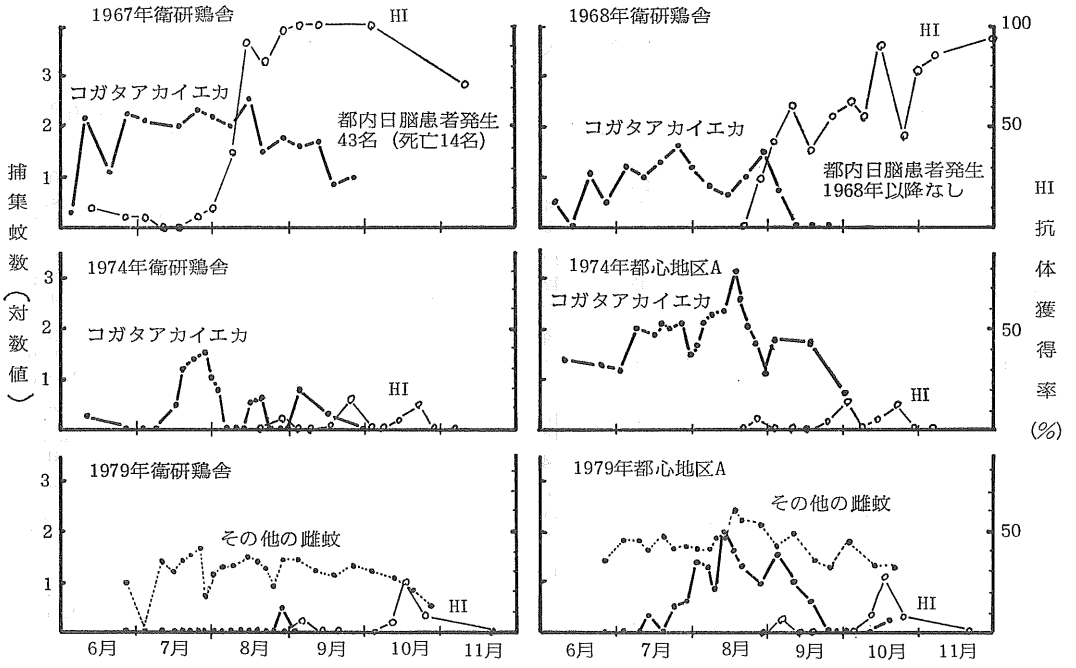
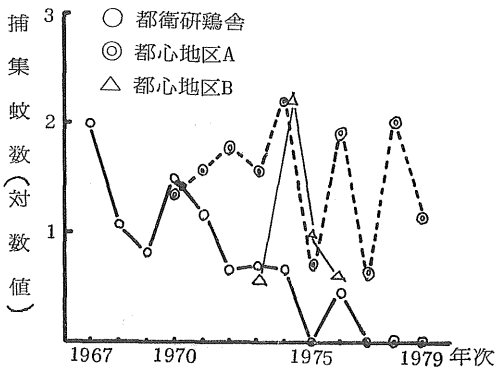


図 2.　雌コガタアカイエカの出現消長とブタの日脳ＨＩ抗体獲得率



捕集蚊数＝（総捕集蚊数／捕集回数）

図 3. 捕集雌コガタアカイエカ数の年次推移

消長は図2に示した.

都心某地区で捕集した雌コガタアカイエカの吸血蚊215匹，未吸血蚊88匹，その他の雌蚊1501匹，衛研鶏舎では雌コガタアカイエカは未吸血蚊の6匹，その他の雌蚊が428匹であった．2捕集地区での雌コガタアカイエカ数には顕著な差がみられた．コガタアカイエカ以外の雌蚊については2地区での捕集数のパターンにはほとんど差がみられなかった.

79年のブタの日時経過におけるHI抗体獲得率と捕集雌コガタアカイエカ数を比較すると，捕集雌コガタアカイエカ数のピーク時はブタでの日脳感染ピーク時より2か月早期にあった.

図3に示したように年次別・捕集地区別の雌コガタアカイエカの出現消長をみると，最近衛研鶏舎では捕集数の減少が顕著であった[1-11]．他の調査地点であり特殊環境となっている都心地区では，捕集雌コガタアカイエカ数の変動が年次によって大であった.

調査期間中，気温（最高・最低温度），湿度を調査したが，おおよそ最低気温25°以上になったときに雌コガタアカイエカの出現がみられた点以外は，明らかな関連性を見いだすことができなかった.

雌コガタアカイエカの吸血蚊・未吸血蚊を捕集日・捕集地区別に48プールにわけ，蚊乳剤を作成し乳のみマウス脳内接種によって，ウイルス分離を試みたが全例陰性成績であった.

衛研鶏舎内に5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，6月19日～10月23日の調査期間内に抗体は検出されなかった.

一般健康都民血清における日脳抗体保有調査成績 1979年5月21日～7月25日の間に都内居住の一般健康人

表 2. 1979年東京都民の日本脳炎抗体保有状況

年令階層（歳）	検査数	検査項目[1*]	抗体価（10×2^n のn値） (−)[2*]	0	1	2	3	4	5	6	抗体保有率（n≧0）
≦5	48	N	24	2	4	8	5	7			50.0%
		J	22	4	1	1	5	8	7		54.2
		NT		2	12	6	12	8	5	3	100.0
6～12	130	N	67	42	9	8	3	1			48.5
		J	43	42	22	8	10	3	2		66.9
		NT	8	6	40	35	17	12	10	2	94.6
13～16	12	N	8	3		1					33.3
		J	6	3	1	1	1				50.0
		NT			1	7	2	1	1		100.0
17～30	61	N	51	10							16.4
		J	42	12	7						31.1
		NT	6	4	26	17	5	2	1		90.2
31～59	61	N	47	9	5						23.0
		J	38	11	5	5	2				37.7
		NT	4	2	16	19	11	6	1	2	93.4
≧60	58	N	28	15	9	3	2	1			51.7
		J	14	13	11	7	9	3	1		75.9
		NT	3	2	8	9	7	17	10	2	100.0

1* N＝中山株抗原に対するHI抗体保有状況
J＝JaGAr 01 株抗原に対するHI抗体保有状況
NT＝JaGAr 01 株抗原に対する中和抗体保有状況
2* (−)＝抗体価＜10

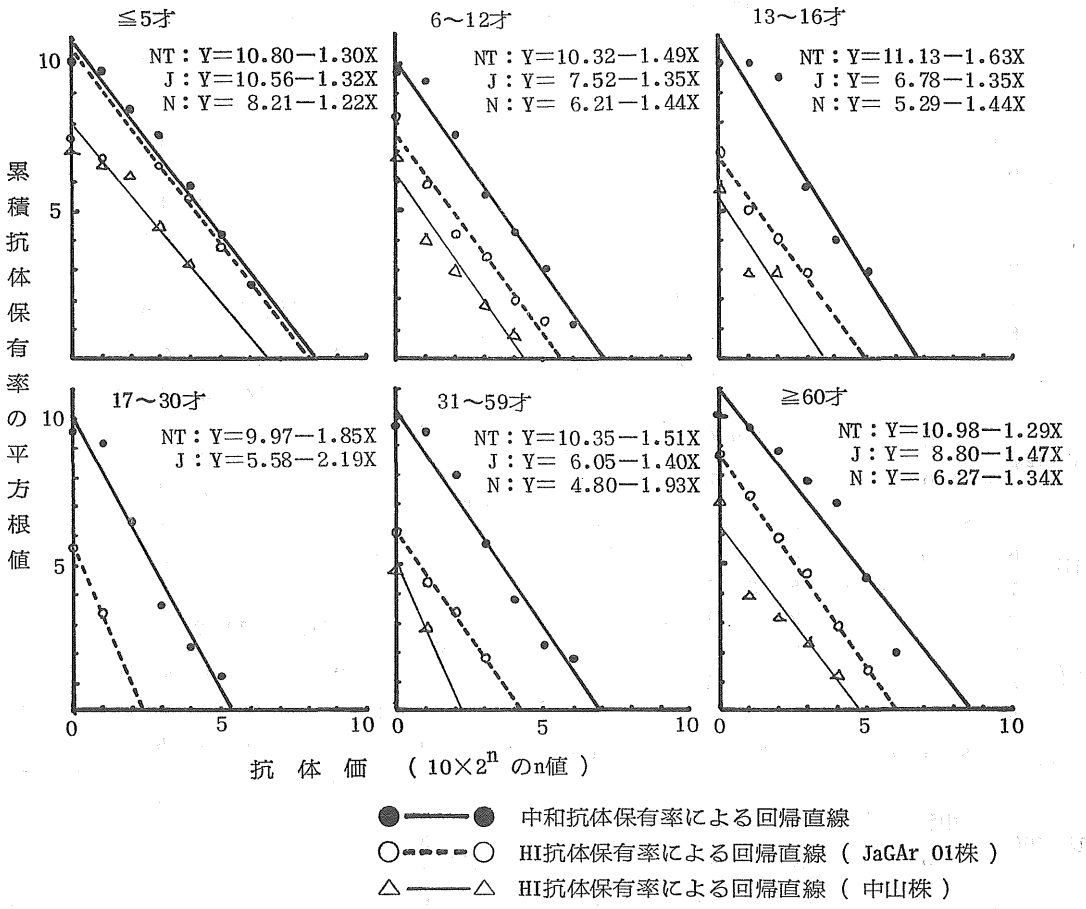


図 4.　1979年東京都民における日脳抗体保有率の回帰直線

370名から採血を行い，日脳ウイルス JaGAr 01 株・中山株抗原に対するＨＩ抗体価と JaGAr 01 株に対する中和抗体価を測定し表２に結果を示した．

年令階層別によって日脳ウイルスＨＩ抗体保有内容に差がみられ，ＨＩ価10以上の抗体保有率では17～30歳を底とした中だるみ的年令推移傾向がみられた．最近の都内での日脳ウイルス低汚染の影響を反映しているのは17～30歳，31～59歳の青壮年層であることが推測できた．

中和抗体価10以上の年令階層別抗体保有率を比較すると，年令階層間の差異は明らかに縮小し，ＨＩ抗体保有率でみられた年令推移変化の中だるみ現象は大幅に軽減された．

各年令階層別の日脳抗体保有状況を回帰分析法によって解析検討した[16,17]．

図４に示した回帰直線は年令階層別抗体分布の累積陽性率実測値から算出した．

HI 価よりも高率であった中和抗体保有率値の回帰直線はグラフの上方に位置し，年令階層間の差は著明でなかったが，ＨＩ抗体保有率の回帰直線は年令階層によって上下の位置的変化が著明であった．ＨＩ価10以上の抗体保有率が一番高かった≧60歳は，Ｙ軸上の交点が一番上方にあり，また高いＨＩ価の検体を含んでいた≦５歳ではＸ軸上の交点が一番右に移動していた．17～30歳を除くとその回帰直線の傾きにはほとんど差がなかった．

各年令階層において中山株より検出感度のよいJaGAr 01株に対する回帰直線が上方にあり，両直線はほぼ平行関係にあり強い正の相関（相関係数ｒ＝0.84～0.99）が観察された．

同一人血清について中山株・JaGAr 01 株両抗原に対するＨＩ価を対比させると，強い正の相関(相関係数ｒ＝0.84～0.97)がみられたが，JaGAr 01株抗原に対するHI価と中和抗体価の相関は，年令階層によって顕著な差がみられ相関係数ｒ＝0.35～0.79の範囲であった(表３)．

表 3. 1979年東京都民の年令階層別日本脳炎ウイルスのＨＩ価・中和抗体価の相関

≦5歳	中和抗体価[1*](10×2ⁿのｎ値) (−)[3*]	0	1	2	3	4	5	6	計
HI[2*]価(ｎ値)	(−)	2	9	4	7				22
	0		2	1	1				4
	1			1					1
	2		1						1
	3				2	3			5
	4				1	3	3	1	8
	5				1	2	2	2	7
計		2	12	6	12	8	5	3	r[4*]=0.793

6～12歳	中和抗体価 (10×2ⁿのｎ値) (−)	0	1	2	3	4	5	6	計
HI価(ｎ値)	(−)	8	5	16	9	2	3			43
	0		1	20	13	6	1	1		42
	1			4	10	5	2	1		22
	2				2	2	2	1	1	8
	3				1	2	2	4	1	10
	4						2	1		3
	5							2		2
計		8	6	40	35	17	12	10	2	r=0.676

13～16歳	中和抗体価 (10×2ⁿのｎ値) (−)	0	1	2	3	4	5	6	計
HI価(ｎ値)	(−)			1	4	1				6
	0				2		1			3
	1					1				1
	2				1					1
	3							1		1
計				1	7	2	1	1		r=0.620

17～30歳	中和抗体価 (10×2ⁿのｎ値) (−)	0	1	2	3	4	5	6	計
HI価(ｎ値)	(−)	6	3	21	9	2	1			42
	0		1	3	5	3				12
	1			2	3		1	1		7
計		6	4	26	17	5	2	1		r=0.352

31～59歳	中和抗体価 (10×2ⁿのｎ値) (−)	0	1	2	3	4	5	6	計
HI価(ｎ値)	(−)	4	2	13	14	3	1	1		38
	0			2	5	4				11
	1			1		2	2			5
	2					1	2		2	5
	3					1	1			2
計		4	2	16	19	11	6	1	2	r=0.605

≧60歳	中和抗体価 (10×2ⁿのｎ値) (−)	0	1	2	3	4	5	6	計
HI価(ｎ値)	(−)	3	1	5	4		1			14
	0			1	1	6	5			13
	1		1		1		5	3	1	11
	2				1		2	4		7
	3			2			4	3		9
	4				2	1				3
	5								1	1
計		3	2	8	9	7	17	10	2	r=0.483

1* JaGAr 01 株抗原に対する中和抗体保有状況
2* JaGAr 01 株抗原に対するＨＩ抗体保有状況
3* (−)＝抗体価<10
4* r＝相関係数

結　　果

1979年東京都内での日脳の疫学調査を行い次の結論を得た.

1) 1979年1～12月に実施した都内飼育ブタでのHI抗体獲得調査成績から,9月5日以降ＨＩ抗体獲得率の上昇,２ＭＥ感受性抗体保有ブタの出現，ブタ血清からの日脳ウイルス分離 (JaTan 1/79)がみとめられ，ブタ間での日脳ウイルス伝播が存在していたことが明らかであった．しかしブタのＨＩ抗体獲得率が低値であったことから,日脳ウイルスの散布状況は低度であったと推測した.

2) 捕集雌コガタアカイエカ数は，調査地区また調査年次によって顕著な差がみられた．コガタアカイエカ以外の蚊の捕集数は調査地区によってそれほど大きな変動はなかった.

3) 一般健康都民の日脳ＨＩ抗体保有状況は，年令階層別によって差がみられた．特に青壮年層が最近の都内での日脳ウイルス低汚染の影響を反映し低率化していることが明らかとなった．しかし，日脳中和抗体保有状況はＨＩ抗体保有状況にみられた中だるみ的年令推移傾向が顕著でなかった.

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) 岩崎謙二，藪内　清，柳澤靖子，矢野一好：東京衛研年報，24, 61, 1973
13) 岩崎謙二：東京衛研年報，26-1, 81, 1975
14) 大谷　明：微生物検査必携ウイルス・リケッチア検査，249, 1978, 日本公衆衛生協会，東京
15) 岩崎謙二，吉田靖子，関根整治：東京衛研年報，30-1, 43, 1979
16) 岩崎謙二：東京衛研年報，26-1, 81, 1975
17) 岩崎謙二：東京衛研年報，30-1, 52, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 36-39, 1980

下水から分離されるウイルスを指標とした都内における腸管系ウイルスの感染流行実態（1979年）

藪内 清*, 矢野一好*, 柴田タツ美*, 林 志直*
岩崎謙二*

Incidence of Enteroviruses in Sewage taken from Nine Sewage Treatment Plants in Tokyo (1979)

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

Keywords: エンテロウイルス enterovirus, 下水 sewage, 疫学調査 epidemiological survey

緒　言

下水中のウイルス出現消長を定期的に追求し，その調査結果より下水排出地域住民間に発生した腸管系ウイルスの感染流行実態を知る目的で，都内3か所多摩地区6か所の下水処理場から採取した下水検体について，ウイルス分離試験を行った．

本報では，1979年1～12月の調査成績およびその解析について述べる．調査期間中高率に検出されたコクサッキーB群（CB）ウイルスについては，健康都民（小児）の中和抗体保有状況を調査検討したので，併せて報告する．

実験材料と方法

下水検体　都内3か所の下水処理場と多摩地区の団地排水専用処理場6か所を定点とし，毎月1回定期的に採取した下水検体184件を供試した．採取した下水検体は主として沈殿汚泥と二次処理水である．検体処理および保存方法は既報の通りである[1,2]．

被検血清　1977年5～6月（266件），1979年5～7月（190件）に採取した3～15歳の都内居住健康小児血清，合計456件を供試した．

ウイルス分離同定法　使用した培養細胞はFL，HEp2，Vero♯462，BGMの4種類で培養法は既報に準じた[3]．分離ウイルスは既知抗血清を用いた中和試験によって同定した[4]．

中和抗体価の測定　被検血清は生理食塩水で，1：8に希釈し56°30分の非動化処理を行い実験に供試した．

使用したウイルスは，CBウイルス1～6型（1型Conn-5，2型Ohio-1，3型Nancy，4型JVB，5型Faulkner，6型Schmitt各株）で，実施は被検血清0.05 mlに100 $TCID_{50}$/0.05ml量のウイルス液を添加混和し，37°炭酸ガスふらん器内で3時間反応させた．さらに室温に1晩放置した後培養したVero♯462細胞に接種した．CPEを指標に1週間観察し各被検血清の中和抗体（≧1：8）の有無を測定した．

実験成績と考察

検出ウイルスの種類　各下水処理場からのウイルス分離成績を整理して表1に示した．定点とした下水処理場9か所から採取した下水検体184件のウイルス分離培養を行い総計65株のウイルスを分離した．ウイルス種類別の検出株数はPolioウイルス18株，CBウイルス25株，ECHOウイルス6株，Adenoウイルス16株でCBウイルスが最も多かった．

検出ウイルス各型の月別消長は表2に示した．Polioウイルスは例年どおり乳児への春秋季の生ワクチン一斉投与に対応して1，2，3型が分離された．CBウイルスは夏季を中心に1，4，5型が高率に検出された．同ウイルス1型の高頻度検出は1969年以来10年ぶりのことであり，今次流行に先がけて1978年11月に単発的検出があった[1]．下水からのウイルス検出は，その時点ですでに当該地域における同ウイルスの感染がある程度の規模で発生していることを推定させるが，CB各型ウイルスの単発的検出は，しばしば後続の大きな流行の先ぶれ現象になっているので，大規模流行予測の一助として注目できるであろう．ECHOウイルスでは秋季に6，7型を分離した．同ウイルス6型は，我々の経験では1967年下水ウイルス検索開始以来始めての分離であり，また7型は1970年以来9年ぶりの検出である．Adenoウイルスは冬季と初夏に1，2，5，6型が分離され，春秋季には

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

表 1. 下水検体からの月別ウイルス分離状況（1979年）

処理場＼月		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
O	沈殿汚泥			—			CB4			CB1	E6, CB5	E7	AD2, P1
S	K系沈殿汚泥			—			CB1				P2		AD1
	S系沈殿汚泥			—			CB1•4						
	S系2次処理水			—			CB4						
M	沈殿汚泥			—		CB4	P2				E7	P2	E6
団地A	2次処理水			—				CB4					
	沈殿汚泥	AD2, P3		—	P1			CB4					
B	2次処理水			—	P2								
	沈殿汚泥			—	P2		AD5				P2•3	E6, CB4	AD5
C	2次処理水			—									
	沈殿汚泥		CB4	—				CB5	CB4•5		P1		AD5
D	2次処理水			—									
	沈殿汚泥		AD2•5, P3	—			—	—	—	—	—	—	—
E	2次処理水			—									
	沈殿汚泥		P3	—	P2		AD1		CB5			E6, AD5	
F	生下水		AD2•5	—	P1•2	P1, AD5			CB4	CB1	CB5	CB5	AD6
	2次処理水			—	P2			CB4					
	沈殿汚泥	AD1		—		CB1		CB1	CB1		CB5		AD6

—：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　E6：エコーウイルス6型

表 2. 下水検体からの月別ウイルス分離株数（1979年）

ウイルス		1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	計
Polio	1型				2	1	1				1		1	6
	2				5						2	1		8
	3	1	2								1			4
Cox. B	1					1	2	1	1	2				7
	4		1			1	3	3	2			1		11
	5							1	2		3	1		7
ECHO	6										1	2	1	4
	7										1	1		2
Adeno	1	1					1						1	3
	2	1	2										1	4
	5		2			1	1					1	2	7
	6												2	2
計		3	7		7	4	8	5	5	2	9	7	8	65
件数		18	18	ND	18	18	16	16	16	16	16	16	16	184

ND：検査せず

表 3. 年次別コクサッキーB群ウイルスの中和抗体保有率（≧1：8）

型	年次	年齢区分		
		3～5歳	6～10	11～15
1	1977	7.7%	21.4	33.9
	79	10.6	11.5	50.8
2	77	43.6	52.7	36.5
	79	53.1	59.0	56.9
3	77	56.4	51.8	64.3
	79	48.9	47.4	41.5
4	77	46.2	47.3	52.2
	79	55.3	38.5	56.9
5	77	64.1	39.3	60.9
	79	70.2	60.3	70.8
6	77	5.1	14.3	21.7
	79	19.1	14.1	20.0
検査例数	77	39	112	115
	79	47	78	65

検出されなかった．この現象を招いた真の原因はまだ解明できないが，Adeno ウイルスと他種ウイルスの宿主生体および培養細胞における競合を考えることもできるだろう．

以上の調査結果から，1979年都内において自然流行した主なウイルスの種類はＣＢ１，４，５型，ECHO６型および Adeno２，５型であったと推察した．

CB ウイルス中和抗体保有状況　1977年と79年に採取した健康小児血清のＣＢウイルスに対する中和抗体保有調査成績（中和抗体価≧１：８）を表３に示した．1974年以来高率に検出されている２～５型では，各年齢層を通じて両年次とも50%前後の高い抗体保有率を示していた．

一方，1978年６月に分離された６型，1979年に分離された1型は特に５歳以下の年齢階層において低率であり，加齢に伴う上昇と年次間の差も認められた．

このことから，本年高率に検出された1型ウイルスは，主として５歳以下の幼児における感染流行を反映したものと考えた．

下水検体別ウイルス分離状況　下水検体の種類別ウイルス分離率を処理場別に算出し図１に示した．沈殿汚泥と処理水からのウイルス分離率を比較すると，一般家庭の生活排水のみが流入するＡ～ＦおよびＯ処理場では，汚泥が25.0～54.5%（平均40.6%）と高率であるのに対して，処理水では０～18.2%（平均6.1%）と低率になった．一方，多量の工場排水が流入するＳ処理場では，汚泥からの分離率も低率（9.1%）であり，処理水との差も認められなかった．

これらのことから，活性汚泥による下水処理過程で，通常大部分のウイルスは汚泥に吸着され処理水中のウイルス量は減少するが，流入水の水質的条件によっては，活性汚泥のウイルス吸着効率に大きな変化のあることが推察できた．

培養細胞別ウイルス分離率　使用した培養細胞別のウイルス分離率を対比して表４に示した．Polio ウイルスおよびＣＢ ウイルスは使用した各細胞系で分離できたが，最も検出率がよかったのは BGM 細胞であった．

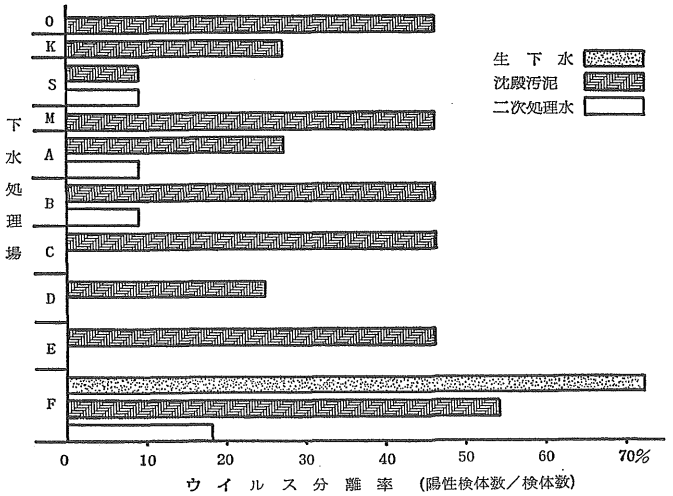


図 1. 下水処理場別検体種類別ウイルス分離陽性率（陽性検体数/検体数）

表 4. 培養細胞別ウイルス分離状況（1979年）

		FL	HEp2	Vero#462	BGM	計
Polio	1型	3	1	2	1	7
	2	2	1	1	8	12
	3			1	3	4
Cox. B	1		3		5	8
	4			3	8	11
	5	3	2	1	3	9
ECHO	6	4				4
	7	2				2
Adeno	1	1	2			3
	2		5			5
	5	2	5	1		8
	6		2			2
計		17	21	9	28	75

ECHO ウイルスはＦＬ細胞でのみ，Adeno ウイルスは HEp2 細胞で高率に分離できた．

実際のウイルス分離に際しては，ウイルス種類と培養細胞種類の親和性を固定概念でとらえることなく，多くの種類の培養細胞系を分離培養に用いることが，ウイルス検出率を高めるためには必要であろう．

結　論

1) 都内９か所の定点において，1979年１～12月まで毎月定期的に採取した下水検体184件から65株のウイルスを分離同定した．検出ウイルスは Polio ウイルス18株（27.7%），CB ウイルス25株（38.5%），ECHO ウイルス６株（9.2%），Adeno ウイルス16株（24.6%）であった．

2) ウイルス種類と検出季節との間にかなり明確な関連性がみられた．すなわち，Polio ウイルスは春秋季に，ＣＢウイルスは夏季に，ECHO ウイルスは初秋に，Adeno ウイルスは冬季と初夏に主として検出された．

3) 1977年および79年における，都内居住健康小児のＣＢ各型ウイルスに対する血中中和抗体保有率は，１型と６型が特に低年齢層で低率（5.1～19.1%）であった．また，加齢に伴う保有率の上昇がみられた．２～５型の抗体保有率では平均54.8%程度で年齢差，年次差ともに大きな変動はなかった．

4) 下水検体別ウイルス分離率は，住宅地域の汚泥から25.0～54.5%，処理水から０～18.2%，工場地域の汚泥と処理水からは，ともに9.1%であった．

5) 検出ウイルス65株について培養細胞別の分離率を対比すると，Polio と CB ウイルスは BGM 細胞で，Adeno ウイルスは HEp2 細胞で特に高率であったが，ECHO ウイルスは FL 細胞のみで検出された．

文　献

1) 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
2) 矢野一好，藪内　清，柴田タツ美，岩崎謙二：日感染学誌，52，472，1978
3) 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：東京衛研年報，30-1，24，1979
4) 微生物検査必携，第２版，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.*, 31-1, 40-45, 1980

急性呼吸器疾患患児から分離されるウイルスを指標とした都内における呼吸器系ウイルスの感染流行実態（1979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**

Virological Survey of Acute Respiratory Infection among Infants in Tokyo (1979)

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

During the period from January to December in 1979, throat swab specimens taken from 813 infants clinically diagnosed as having acute infectious diseases were tested for isolation and identification of viruses.

For detection of respiratory viruses, all specimens were inoculated into FL, Hep 2, MDCK, Vero 355 and HEL cell lines. In addition to these tissue cultures, the specimens taken from patients with Herpangina and HFMD were also inoculated into suckling mice for detection of Coxsackie A viruses.

171 strains (21.0%) of viruses were isolated from 813 specimens. The viruses detected were mainly Adeno type 1–4, Rhino, Influenza type A(H1N1), Coxsackie A type 10, 16, Coxsackie B type 1 and ECHO type 7. These results in 1979 were different from those on which we reported in 1978.

Of 16 strains in which Coxsackie A type 10 virus was detected, 14 (87.5%) were isolated from specimens of Herpangina patients and out of 14 strains in which Coxsackie A type 16 was detected, 10 (71.4%) were from HFMD patients.

All of the Coxsackie A viruses were detected in suckling mice, while none of them was detected in tissue cultures.

In URI cases, Adeno type 1, 2, Rhino, Coxsackie A type 10 and ECHO type 7 viruses were mainly isolated from 0–3 age group, but Adeno type 3, 4, Influenza type A (H1N1) and Coxsackie B type 1 viruses were mainly isolated from 4–15 age group.

Keywords: virological survey, acute respiratory infection, infants

緒　言

一般には急性呼吸器疾患の80～90%は感染症であり，ウイルスが重要な役割を演じていると考えられている．患者から検出されるウイルスの種類によっては，特有な臨床像から病因との関連が明確にされているものもあるが，腸管系のウイルスは様々な臨床像の患者から，また無症状の小児から検出されることがあり病因性の不確定なものが多い．しかし多数の症例検索，また疫学的調査の成績およびその解析の集積により病因の実態が明らかになっていくと思われる．

本稿では都内定点病院において採取した小児科受診患児の咽頭ぬぐい液からウイルス分離を行い，ウイルス検出成績の解析結果から都内における呼吸器系ウイルスの流行実態を推定するとともに，熱性上気道炎（URI）患児からの検出ウイルスについて分離率を指標に臨床的，疫学的特色を考察したのであわせて報告する．

材料と方法

患児咽頭ぬぐい液　1979年1月から12月の間に，東京逓信病院小児科を受診した急性期患児813名から咽頭ぬぐい液を採取しウイルス分離を行った．検体採取および処理方法は既報[1]に準じて行った．症例別の患児検体数はURI 495件，下気道炎（LRI）142件，手足口病

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

表 1. 組織培養による症例別ウイルス分離状況（1979年）

		URI	LRI	発疹 HFMD	発疹 その他	発熱	下痢	その他	合計
Adeno	1	8	1		1				10
	2	12							12
	3	13							13
	4	12			1				13
	5	3				2	1		6
	6	3	1				1		5
	?	1							1
Rhino		15	2		1				18
Inf. AH1		7							7
Cox. B 1		11		1				1	13
	4	4					1		5
	5	2	1						3
ECHO	3	1							1
	6	1							1
	7	7	1	1					9
	11	1							1
Polio	2	1							1
Herpes		2							2
Mumps		1						3	4
合計		105	6	2	3	2	3	4	125
件数		495	142	28	60	12	25	51	813
分離率		21.2%	4.2	7.1	5.0	16.7	12.0	7.8	15.4

(HFMD) 28件，発疹症60件，発熱12件，下痢その他76件であった．年齢階層別の検体数は0～3才403件，4～6才254件，7～15才156件であった．

ウイルス分離試験 患児咽頭ぬぐい液からのウイルス分離培養は FL, Hep 2, Vero 355, MDCK, HEL の各細胞系を用いて CPE または HA の出現を指標に判定した．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，中和試験[2]により行った．ウイルス分離および同定の詳細は既報[1]に準じて行った．

ヘルパンギーナ，HFMD 症状を呈した患児検体はさらにサックリングマウスにも接種してウイルス分離を試みた．検体はダイフロン処理を行い生後4日以内のサックリングマウスの皮下，腹腔内に 0.02ml ずつ接種し20日間観察した．発症した個体の四肢筋肉乳剤を調整し既知抗血清を用いた CF 反応，中和試験により分離ウイルスの同定を行った．

結果と考察

患児咽頭ぬぐい液からのウイルス分離試験成績

1） **組織培養によるウイルス分離状況** 1979年1月から12月にかけて採取した小児科受診患児の咽頭ぬぐい液について，組織培養によるウイルス分離を行い結果を症例別に整理して表1に示した．総検体813件から125株(15.4%) のウイルスを分離した．URI 症例 495 件からは 102 株 (21.2%) のウイルスを分離した．URI 症例から高ひん度に検出されたウイルスの型別は，アデノ1～4型，ライノ（型別未同定），インフルエンザA (H1N1) 型，コクサッキーB群1型，エコー7型であった．LRI 症例 142 件からは計6株 (4.2%) のウイルスを分離したのみであった．またコクサッキーA群ウイルスはどの症例からも検出されなかった．

URI 症例に比べて LRI 症例でのウイルス分離率は著しく低かったが，ウイルス分離率は感染後の経過日数に

より大きく変動する．一般的にみて疾患の性質上 URI に比べて LRI の検体採取は，感染からの日数が多くなりがちであるため前述のようにウイルス分離率が低下したものと思われる．

2) サックリングマウスによるウイルス分離状況 ヘルパンギーナおよび HFMD 症状を呈した患児検体は，細胞を用いた分離培養と同時にサックリングマウスにも接種してウイルス分離を行い，結果を症例別に整理して表2に示した．ヘルパンギーナ患児検体からは 48.1%，HFMD からは 72.7% と高率にウイルスを検出した．コクサッキーA群10型は主としてヘルパンギーナ患児から，また同16型は HFMD 患児から分離された．このよ

表 2. 乳のみマウスによる症例別ウイルス分離状況

		herpangina	LRI	発疹 HFMD	発疹 その他	下痢・その他	合計
Cox. A	2	1					1
	5	5					5
	10	14			2		16
	16	3	1	10			14
未同定		3		6	1		10
合計		26	1	16	3	0	46
件数		54	7	22	22	7	112
分離率		48.1%	14.3	72.7	13.6	0	41.1

表 3. 小児科受診患児からの月別ウイルス分離状況（1979年）

		1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
Adeno	1	1	1	2		2						2	2	10
	2			2	1	3	1			1		4		12
	3	2	3	1	1	2	1	1	2					13
	4		1	1	1	1	2		3	2	2			13
	5		1			1	1	1					2	6
	6						2			1			2	5
	?		1											1
Rhino		1	4	1	1	5	5		1					18
Inf. AH1			1	5		1								7
Cox. A	2								1					1
	5							5						5
	10						5	3	5		1	1	1	16
	16							5	1	1	3	2	2	14
B	1							11	2					13
	4						2		1	2				5
	5						1		2					3
ECHO	3									1				1
	6								1					1
	7							1	4	2	1	1		9
	11											1		1
Polio	2						1							1
Herpes				1				1						2
Mumps		1							1	1	1			4
未同定								4		2	2	1	1	10
合計		5	12	13	4	15	21	32	24	13	10	12	10	171
件数		26	62	40	41	76	68	111	69	74	78	69	99	813
分離率		19.2	19.4	32.5	9.8	19.7	30.9	28.8	34.8	17.6	12.8	17.4	10.1	21.0%

表4. 同時分離例

月	症例	年齢	検出ウイルス
1	URI	3	AD 1 Rhino
2	発熱	8	AD 5 Rhino
3	URI	5	AD 2 Inf. AH1
5	URI	2	AD 5 Rhino
5	URI	6	AD 3 Rhino
6	URI	0	P 2 Rhino
6	URI	2	AD 2 Rhino
6	URI	6	AD 6 Rhino
6	URI	1	CA10 CB 4
7	URI	2	CA16 CB 1
7	HFMD	7	CA16 CB 1
7	HFMD	6	CA16 E 7

うに呼吸器疾患患者の咽頭には組織培養では検出され難いコクサッキーA群ウイルスが存在することもあるので，ウイルス検索をする場合サックリングマウスを併用することが望ましい．

3) **月別ウイルス分離状況** 組織培養およびサックリングマウスによるウイルス分離成績を総括し，月別に整理して表3に示した．総検体813件から171株(21.0%)のウイルスを分離した．検出ウイルス種類はアデノ60株(1型10株，2型12株，3型13株，4型13株，5型6株，6型5株，1～6型以外1株)，ライノ(型別未同定)18株，インフルエンザA (H1N1) 型7株，コクサッキーA群36株(2型1株，5型5株，10型16株，16型14株)，同B群21株(1型13株，4型5株，5型3株)，エコー12株(3型1株，6型1株，7型9株，11型1株)，ポリオ2型1株，ヘルペス2株，ムンプス4株，未同定10株であった．1978年にはアデノ2，3型，コクサッキーB群4，5型，エンテロ71型を中心として検出されたが[3]，1979年にはアデノ1～4型，コクサッキーA群10，16型，B群1型，エコー7型が主に検出され主流行ウイルスの変化がみられた．検出ウイルスの種類別季節消長をみるとインフルエンザは冬季に，ライノはインフルエンザ流行前後に多く分離された．コクサッキー，エコーは夏季に，アデノは年間を通じて検出された．このようにそれぞれのウイルス感染流行に特有な季節消長が現われる原因は，まだ充分の説明はされていない．しかし冬季に流行するインフルエンザウイルスと，夏季に流行するポリオウイルスの生存期間に自然環境因子としての湿度の差が影響するという報告[4]や，流行疫学的にある種のウイルス間には干渉現象が成立するという報告[5]もある．これらはわれわれの観察した検出ウイルスの季節消長出現の原因となるかもしれない．

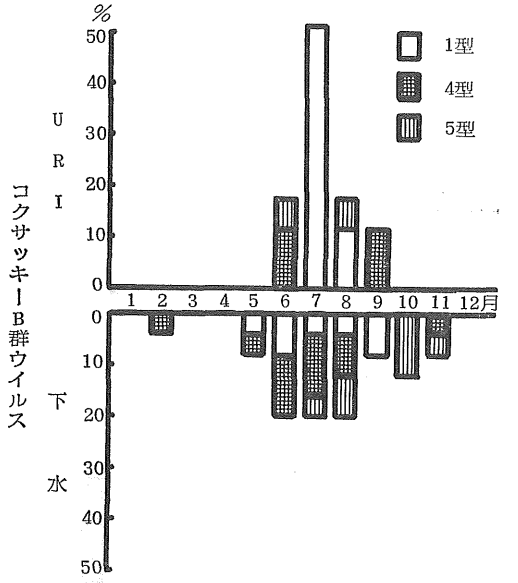


図 1. URI 患児と下水からのウイルス分離状況の対比

4) **同時分離例** 同一患児検体から異なった2種のウイルスが検出された同時分離例は，検査例813件中12例(1.5%)，ウイルス分離陽性例159件との対比では7.5%にみられた(表4)．検出ウイルス種類の組合せはライノとアデノ，コクサッキーA群とB群が多かった．前回までの報告[1,3]と比較して今回の同時分離例がかなり高率を示したのは，サックリングマウスによる分離培養を併用したためであり，このように分離試験方法を多様化すれば同時分離例はさらに増加すると思われる．様々な臨床像の患者検体から分離され特定疾患との病因関連がとかく不確定であるエンテロウイルスの場合，同時分離例が増加すれば病因の解明はさらに複雑なものになる．

URI 患児と下水からのウイルス分離状況の対比 われわれは1967年以来下水からのウイルス検索を行ってきた．それらの成績解析[6]によると下水から検出されるウイルスは主として，下水流入域に居住する不顕性感染者からのウイルス排出状況を反映していると思われる．そこで URI 患児からのウイルス分離状況と下水からのウイルス分離状況[7]を対比させて図1～3に示した．図はウイルス種類別の年間分離株総数に対する各月分離株数の百分率値が示してある．コクサッキーB群(図1)では，両者からのウイルス検出は夏季を中心としてほぼ一致した．しかし血清型別の分離状況には差があり，特に7月の1型検出率が URI 患児において非常に高率であった．エコーウイルス(図2)では URI 患児と下水か

らのウイルス検出時期にずれがあり下水からの検出が遅れていた．血清型別には URI 患児から夏季に7型，下水から晩秋に6型が主として検出されたのがめだった．アデノウイルスは図3のように両者からの検出状況に差があった．URI 患児から毎月検出され血清型別も 1～6型と変化に富んでいたのに対して，下水検体からの検出時期は冬季と初夏に限られ3型と4型のウイルス検出がみられなかった．

URI とその他の症例からのウイルス分離状況の対比

次に患児検体を URI 群とその他の症例群に分けて対比を行い，結果を表5に示した．その他の症例に比べて URI 患児検体からはアデノ1～4型，ライノ，インフルエンザ A (H1N1) 型，コクサッキーA群5型，10型，同B群1型，エコー7型の検出率が高かった．逆にコクサッキーA群16型はその他の症例からの検出率の方が高かった．また URI 患児検体からのウイルス検出状況は年齢階層により特色がみられた．アデノ1型，2型，ライノ，コクサッキーA群10型，エコー7型は低年齢層から，アデノ3型，4型，インフルエンザ A (H1N1) 型，コクサッキーB群1型は高年齢児層から主として検出された．

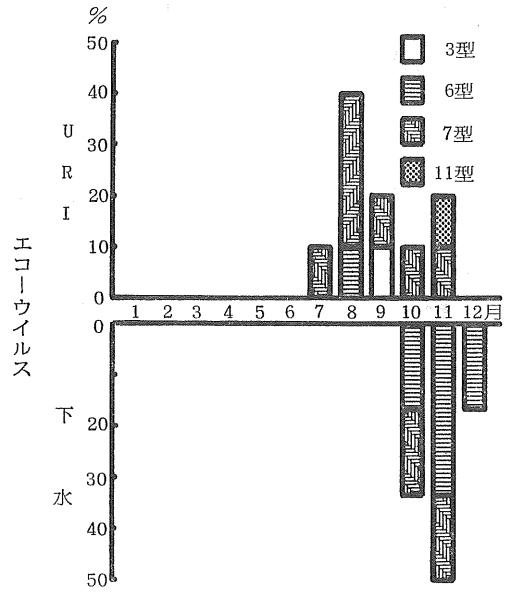


図 2. URI 患児と下水からのウイルス分離状況の対比

結　論

1979年1月から12月に採取した小児科受診患児の咽頭ぬぐい液からウイルス分離を行い以下の結論を得た．

1) 患児検体 813 件より 171 株 (21.0%) のウイルスを分離した．検出したウイルスはアデノ1型 (10株)，2型 (12株)，3型 (13株)，4型 (13株)，5型 (6株)，6型 (5株)，1～6型以外 (1株)，ライノ (型別未同定 18株)，インフルエンザ A (H1N1) 型 (7株)，コクサッキーA群2型 (1株)，5型 (5株)，10型 (16株)，16型 (14株)，同B群1型 (13株)，4型 (5株)，5型 (3株)，エコー3型 (1株)，6型 (1株)，7型 (9株)，11型 (1株)，ポリオ2型 (1株)，ヘルペス (2株)，ムンプス (4株)，未同定 (10株) であった．

2) ヘルパンギーナおよび HFMD 症状を呈した患児検体はサックリングマウスにも接種し，112件から46株 (41.1%) のウイルスを検出した．54名のヘルパンギーナ患児から14株 (25.9%) のコクサッキーA群10型ウイルスを，22名の HFMD 患児から10株 (45.5%) のコクサッキーA群16型ウイルスを検出した．組織培養系ではコクサッキーA群ウイルスの検出はなかった．

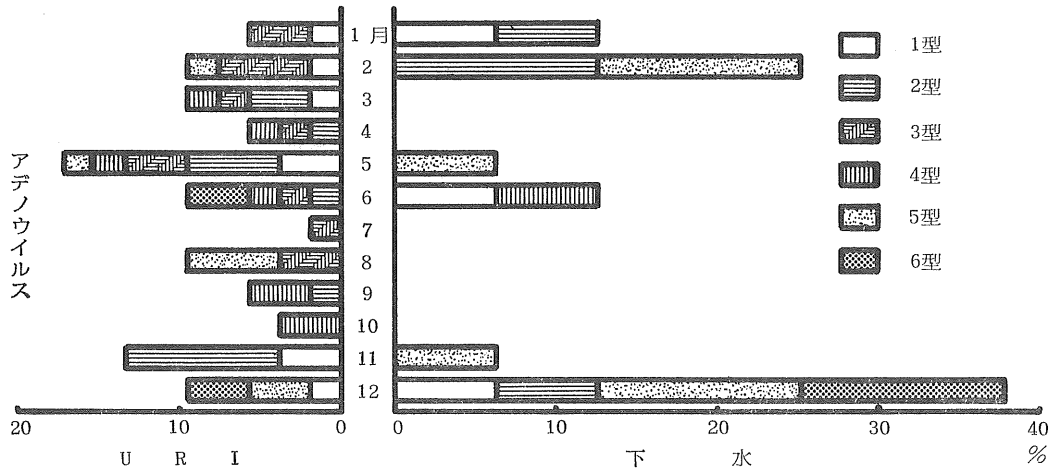


図 3. URI 患児と下水からのウイルス分離状況の対比

表 5. URI とその他の症例からのウイルス分離状況の対比

症例	年齢	件数	アデノ 1	2	3	4	5	6	ライノ	Inf. AHl	Cox. A 2	5	10	16	Cox. B 1	4	5	エコー 3	6	7	11
			%																		
URI	0～3	230	3.1	3.1	1.7	0.4	0.9	1.3	3.5	0.7	0.4	1.7	5.2	0.9	1.3	0.9			0.4	1.7	0.4
	4～6	175	0.6	2.3	3.4	2.9	0.6	0.6	4.0	2.3			1.1	0.6	2.9	1.1	1.1	0.6		1.1	
	7～15	90		1.1	3.3	6.7				1.1		1.1			3.3					1.1	
	0～15	495	1.6	2.4	2.6	2.4	0.6	0.8	3.0	1.4	0.2	1.0	2.8	0.6	2.2	0.8	0.4	0.2	0.2	1.4	0.2
その他	0～3	173	0.6				0.6		1.1				1.1	3.4		0.6	0.6				
	4～6	79	1.3				1.3	1.3	1.3					3.8	1.3					1.3	
	7～15	66				1.5	1.5		1.5					3.0	1.5					1.5	
	0～15	318	0.6			0.3	0.9	0.3	0.9				0.6	3.4	0.6	0.3	0.3			0.6	

3) 同時分離例は 813 件中 12 例 (1.5%) にみられた. ウイルス分離陽性検体 159 件との対比では 7.5% を占めた. 検出ウイルス種類の組合せはライノとアデノ, コクサッキーA群とB群が多かった.

4) URI 患児検体からのウイルス分離状況をその他の症例および下水検体からのウイルス分離状況と対比解析した. URI 患児検体からは低年齢層でアデノ1型, 2型, ライノ, コクサッキーA群10型, エコー7型, 高年齢児層ではアデノ3型, 4型, インフルエンザ A (H1N1) 型, コクサッキーB群1型が高率に検出され主流行ウイルスであることがわかった.

(本研究の概要は日本感染症学会第 54 回総会 1980 年 5 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, 浦野純子, 河野弘子, 渡辺悌吉：東京衛研年報, 29—1, 49, 1978

2) 厚生省：微生物検査必携, 第2版, 65, 1978, 日本公衆衛生協会, 東京

3) 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：東京衛研年報, 30—1, 24, 1979

4) Hemmes, J. H., Winkler, K. C., and Kool, S. M.: *Nature*, 188, 430, 1960

5) Martin, A. J., Gardner, P. S., and McQuillin, J.: *Lancet*, 2, 1035, 1978

6) 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

7) 藪内 清, 矢野一好, 柴田タツ美, 林 志直, 岩崎謙二：東京衛研年報, 31—1, 36, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 46-50, 1980

カートリッジフィルターを用いたウイルスの吸着および溶出条件の実験的検討

矢野一好*, 林志直*, 柴田タツ美*, 藪内清*
岩崎謙二*

Effect of Pleated Membrane Filter for Concentrating Viruses in Water

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

Keywords: ポリオウイルス poliovirus, ウイルス濃縮 virus concentration, カートリッジフィルター pleated membrane filter

緒　言

河川に主な水資源を求めてきた都市の水行政は，流域の都市化および人口の稠密化によって，需要に応じる新しい水資源の確保がますます困難となり，使用後水の再利用も採り上げざるを得なくなってきた．また，流域上流の都市化が進めば，都市排水ないしその処理水は河川に流入することになる．かかる背景が考慮されて，処理水，再生水のウイルス学的監視は重視されるようになってきた．

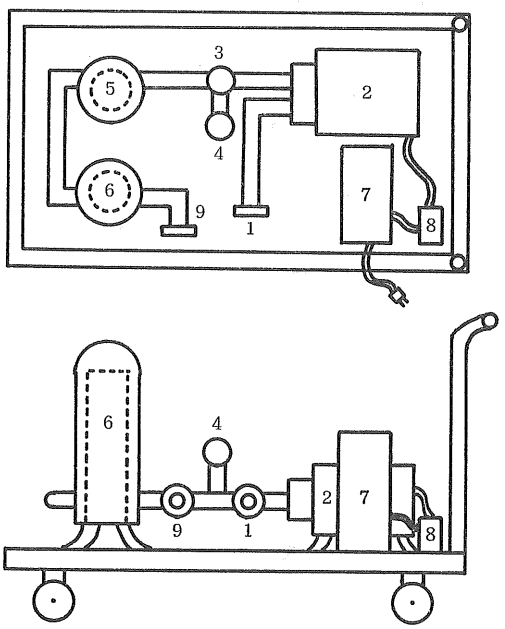
処理水中のウイルス濃度は，通常低値であるため，ウイルス分離には，ウイルス濃縮過程を欠くことができない．この目的のために，セルロースフィルター，ガラス粉，滑石，PE60等の担体を用いた吸着，溶出方法が検討されてきた[1-8]．

我々は，実用への応用を考慮して，大量の水から比較的能率よくウイルスの検出ができるとされているカートリッジフィルターを用いたポリオウイルスの吸着，溶出法の基礎的諸条件を検討した．実験構成としては，ウイルス吸着と，溶出の機作を分けて考えた．

材料と方法

カートリッジフィルター　耐酸，耐アルカリで再使用可能なホーミックカートリッジフィルターHC-40, 0.45 μm（野村マイクロサイエンス製）を用いた．フィルターホルダーは，トーセル用ステンレスハウジング（東洋科学産業）を用いた．基礎実験は，フィルターのろ過面を25mmϕに切り抜き，注射器用ホルダー（ミリポア製）にセットして行った．フィルターの前処理は，1%牛血清アルブミン（BSA）10mlをあらかじめろ過することにより行った．

ウイルス　ポリオウイルスI型弱毒株（Lsc, 2ab株）



1. 吸水口　2. ロータリーポンプ
3. 圧力計　4. 過圧防止装置
5,6. フイルター　7. コードリール
8. スイッチ　9. 排水口

図 1.　カートリッジフィルターによる水中ウイルス濃縮装置

を BGM 細胞で培養し，3,000rpm 20分間遠心した上清を実験用ウイルス原液とした．原液中のウイルス量は，約1.5×10^{8}PFU/mlであった．

ウイルス量の測定　供試水中のウイルス量は，BGM細胞を用いたプラック形成法によって行い，PFU/mlで表示した[9]．

* 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1-1). カートリッジフィルターへのウイルス吸着実験

要因	ウイルス量	水質	添加剤
水準	A1)40m*l*/20*l**	B1)水道水	C1)無
	A2)4m*l*	B2)中水	C2)塩化アルミニウム
	A3)0.4m*l*	B3)三次処理水	C3)凝集剤T896

* 1.5×10^8PFU/m*l*, MEM 浮遊液

表1-2). 実験構成と結果

No.	A	B	C	ウイルス量 PFU/m*l*	ろ液PFU/m*l*	吸着率(%)
1	1	1	1	72000	43000	40.3
2	1	2	2	64000	178	99.7
3	1	3	3	55000	50500	8.2
4	2	1	3	10150	5500	45.8
5	2	2	1	4450	1900	57.3
6	2	3	2	2250	280	87.6
7	3	1	2	935	142	86.4
8	3	2	3	520	510	1.9
9	3	3	1	166	131	21.1

吸着条件の検討 1) 図1に示したカートリッジフィルターによる水中ウイルス濃縮装置を組んで実験した. 被検水 20*l* にウイルス原液を添加し, 水温20°, 加圧約1kg/cm², ろ過時間約90秒でろ過した. 吸着率は, 添加ウイルスの PFU/m*l* と, ろ液の PFU/m*l* との比率で算出した.

2) 詳細な実験条件の検討には, カートリッジを解体しろ過面を25mmϕ に切り抜き, フィルターホルダーにセットし, ウイルス液50m*l* を注射筒で加圧ろ過した. 吸着率は, 前者と同様にして算出した.

溶出条件の検討 ウイルス溶出条件の検討は, すべて25mmϕ フィルターの実験系で行った. ウイルスを吸着させたフィルターを, 各種溶出液5 m*l* に浸し室温で20分間振とうさせ溶出した. 外液は1N塩酸で中和した後, 抗生物質を添加して総量7.5m*l* (6.7倍濃縮) にして, ウイルス量を測定した. 溶出率は, 溶出液中のウイルス量を濃縮倍数で割り, 吸着ウイルス量との比率をとって算出した.

結果と考察

1. フィルターへのウイルス吸着実験

1) ラテン方格法による要因分析 20*l* 容量の実験系では, カートリッジフィルターへのウイルス吸着要因の中から, ウイルス量, 水質, 添加剤の3者を選出し, 3元

表1-3). 吸着率の実験値と計算値の相関

No.	計算値	実験値
1	46.8%	40.3%
2	94.0	99.7
3	7.4	8.2
4	40.1	45.8
5	56.5	57.3
6	94.1	87.6
7	85.6	86.4
8	8.4	1.9
9	15.4	21.1

相関係数 $r=0.989$

表1-4). 吸着条件の要因分析表

要因	自由度	変動	不偏分散	分散比
A	2	1102.4	551.2	4.819*
B	2	560.0	280.0	2.448
C	2	8378.4	4189.2	36.627**
誤差	2	228.7	114.4	
計	8	10269.5		

*5%水準で有意 **1%水準で有意

3水準の組合わせ実験を計画した. 各要因の水準は, 表1—1) に示した. ウイルス量の3水準は, 被検水 20*l* にウイルス原液をそれぞれ40m*l*, 4 m*l*, 0.4m*l* 添加して作成した. 水質要因の3水準には, チオ硫酸ナトリウムで塩素の効果を中和した水道水, 中水 (pH6.8, COD3.5 mg/*l*, BOD1.1mg/*l*, TOC11mg/*l*), および三次処理水 (pH6.4, COD4.8mg/*l*, TOC9mg/*l*) を選んだ. 添加剤の水準としては, 無処理, 塩化アルミニウム (0.0015 M), カチオン系凝集剤 (市川毛織製アイケイフロック T896, 0.002%) を用いた.

各要因の組合わせで交互作用がない想定で実験構造式を組み, 実験結果を表1—2)に示した. 各構成によって, ウイルス吸着率には1.9～99.7%と大きな差がみられた.

交互作用はないという想定での実験構造式であったので, この想定が適当であったかどうかの検討をするため吸着率の実測値と算出された理論値を対比させ表1—3) に示した. 実測値と理論対応値はよく近似していることから, 上記の想定は肯定してよいと思う. しかし, 我々が今回取上げなかった要因の組合わせでの交互作用までを否定するものではない. 要因種類とその組合わせによっては, 交互作用が現われても不思議はない.

実測データーについて, 分散分析を行った結果を表

表 2. ウイルス吸着に及ぼす塩化アルミニウムの影響

No.	塩化アルミニウム濃度	フィルター BSA処理*	ろ液 PFU/ml	吸着率 (%)
1	0.015M	無	370	81.2
2	0.0015	無	1292	73.3
3	0.00015	無	2400	51.8
4	0.015	有	4533	<0
5	0.0015	有	4300	11.0
6	0.00015	有	2950	40.7
7	V.C**蒸留水		5233	
8	V.C 0.015M		3966	
9	V.C 0.0015		4833	
10	V.C 0.00015		4975	

* BSA: 牛血清アルブミン ** V.C: ウイルス対照

1—4) に示した．算出された分散比の大きさから，設定した3種の水質的差異には有意差が認められず，ウイルス濃度差は5％の危険率で，また添加剤の差は1％の危険率で有意差が認められた．

2) **フィルターの前処理と塩化アルミニウム濃度** 前の実験結果から，ウイルス吸着条件に関与する最大要因と考えられた添加剤について，25mmϕ のフィルターを使用し，50ml 容量の実験系で検討した．実験構成は，塩化アルミニウム濃度とフィルターの BSA 前処理で組んだ（表2）．添加ウイルス量は，5.2×10^3PFU/ml(蒸留水)と一定にした．しかし，添加する塩化アルミニウムは，ウイルス感染価に影響があり，塩化アルミニウム濃度ごとにウイルス対照に感染価の差が認められた($3.9\sim4.9\times10^3$PFU/ml)．Roger らの報告した，ポリオウイルスは pH6 以下の緩衝液中で凝集が起こり，2～3log のプラック減少が認められる，ということから，塩化アルミニウム添加により pH が低下しウイルス凝集が起こったものと考えた[10]．

ウイルス吸着率は，添加塩化アルミニウム濃度別のウイルス対照の感染価を基に算出し，表2に示した．ウイルス吸着率は，無処理フィルターで51.8～81.2%，BSA 処理フィルターで0～40.7%であった．無処理フィルターでのウイルス吸着率は，塩化アルミニウムの濃度上昇と共に上昇した．しかし，実用面から考えると，0.0015M程度が有効であると考えた．一方，BSA 処理フィルターでは，逆に塩化アルミニウム濃度が低下するとウイルス吸着率は上昇した．

2. フィルターからのウイルス溶出実験

1) **ラテン方格法による要因分析** フィルター吸着ウイルスの溶出条件に関与する要因の中から，溶出液の種類，pH，塩濃度について検討した．各要因の水準は，表3—1) に示した通りで，溶出液として0.1M グリシン緩衝液，3％ビーフエキストラクト (DIFCO, 0126-01)，0.1Mリン酸緩衝液の3種を用いた．pH は7，9，11の3段階，なお塩濃度は，各緩衝液に塩化ナトリウムを0％，1％，5％に添加して調製した．

表3-1). フィルターからのウイルス溶出実験

要因	溶出液	pH	塩濃度
水準	A1) 0.1Mグリシン緩衝液	B1) 7	C1) 0％
	A2) 3％ビーフエキストラクト	B2) 9	C2) 1
	A3) 0.1Mリン酸緩衝液	B3) 11	C3) 5

表3-2). 実験構成と結果

No.	A	B	C	PFU/ml	溶出率(%)
1	1	1	1	50	0.2
2	1	1	2	155	0.7
3	1	1	3	128	0.6
4	1	2	1	440	2.0
5	1	2	2	135	0.6
6	1	2	3	2033	9.3
7	1	3	1	2150	9.8
8	1	3	2	1340	6.1
9	1	3	3	2268	10.4
10	2	1	1	1566	7.2
11	2	1	2	3333	15.3
12	2	1	3	4900	22.4
13	2	2	1	2900	13.3
14	2	2	2	3050	14.0
15	2	2	3	7466	34.2
16	2	3	1	4000	18.3
17	2	3	2	3300	15.1
18	2	3	3	5900	27.0
19	3	1	1	94	0.4
20	3	1	2	1074	4.9
21	3	1	3	1700	7.8
22	3	2	1	833	3.8
23	3	2	2	1730	7.9
24	3	2	3	2133	9.8
25	3	3	1	810	3.7
26	3	3	2	1056	4.8
27	3	3	3	1046	4.8

添加ウイルス量 3.7×10^8PFU/ml
ろ液ウイルス量 5.1×10^2PFU/ml

表3-3). 分散分析表

要因	自由度	変動	不偏分散	分散比
A	2	1124.4	562.2	123.67**
B	2	108.1	54.1	11.89**
C	2	293.4	146.7	32.27**
AB	4	68.0	17.0	3.74*
AC	4	168.7	42.2	9.28**
BC	4	76.9	19.2	4.23**
誤差	8	36.4	4.5	
計	26	1875.9		

*5%水準で有意　**1%水準で有意

ウイルス溶出に当って，あらかじめ各要因間の交互作用が想定されたので，実験構成は表3—2）に示した通りに組んで実験した．ウイルス溶出率は，グリシン緩衝液，pH7，塩濃度0%の組合わせ条件で最も低率（0.2%）であり，3%ビーフエキストラクト，pH9，塩濃度5%が最も高率であった（34.2%）．無機系緩衝液よりも有機系溶液で，塩濃度およびpHを上昇させた場合に効率の上がることがわかった．この結果は，溶出にビーフエキストラクトの有効性を論じた Edward らの報告とも一致した[11]．

各要因とその交互作用の分散分析結果を表3—3）に示した．各要因の分散比をみると，緩衝液の種類(A)が，123.67と最も大きく，ついで塩濃度（C)32.27，pH(B)11.89の順であり，いづれも1%以下の危険率で有意性が認められた．緩衝液と塩濃度の交互作用は，最も顕著であった．これらの要因分析結果から，ウイルス溶出条件は吸着条件と異って，非常に複雑であることがわかった．

2) ウイルス溶出に及ぼすフィルター前処理の影響

① 無処理フィルターからのウイルス溶出 25mmφのフィルターに3.5×10^8PFU/mlのウイルス液50mlを吸着させ，表4—1）に示した実験構成でウイルス溶出実験を行った．

溶出率は，1%ビーフエキストラクト，1%塩化ナトリウム，pH9の最低9.3%から，2%ビーフエキストラクト，5%塩化ナトリウム，pH9の最高26.4%の範囲で変化した．実測値について分散分析を行い，各要因の影響力を検討したところ，塩濃度の影響力が最も大きいことがわかった．つまり，5%に塩化ナトリウムを添加し，イオン強度を上昇させると溶出率は上昇した．しかし，最大溶出率でも26.4%であることから，より高い溶出率を得るには，緩衝液を変えるか，フィルターへのウイルス吸着力をコントロールする必要があると考えた．

表4-1). 無処理フィルターからのウイルス溶出

実験No.	ビーフエキス(%)	塩化ナトリウム(%)	pH	溶出ウイルス量 PFU/ml	溶出率(%)
1	3	1	9	3100	13.1
2	3	1	11	3450	14.5
3	3	5	9	4666	19.7
4	3	5	11	5325	22.4
5	2	1	9	3100	13.1
6	2	1	11	3775	16.0
7	2	5	9	6275	26.4
8	2	5	11	4950	20.9
9	1	1	9	2200	9.3
10	1	1	11	4050	17.1
11	1	5	9	4000	16.9
12	1	5	11	4650	19.6

吸着ウイルス量　4833−1292=3541PFU/ml

表4-2). BSA処理フィルターからのウイルス溶出

実験No.	ビーフエキス(%)	塩化ナトリウム(%)	pH	溶出ウイルス量 PFU/ml	溶出率(%)
1	3	1	9	1300	36.4
2	3	1	11	2350	65.8
3	3	5	9	3733	104.5
4	3	5	11	3300	92.4
5	2	1	9	1050	29.4
6	2	1	11	2100	58.8
7	2	5	9	3175	88.9
8	2	5	11	3000	84.0
9	1	1	9	1450	40.6
10	1	1	11	2300	64.4
11	1	5	9	2750	77.0
12	1	5	11	2800	78.4

吸着ウイルス量　4833−4300=533PFU/ml

② BSA 前処理フィルターからのウイルス溶出 フィルターをBSAで前処理すれば，ウイルスの吸着力が弱くなり溶出が容易になるのではないか，という想定で表4—2）に示した実験構成を組んで，ウイルス溶出実験を行った．

実験結果をみると，ウイルス吸着率は，8.9%と低率ではあったが，ウイルス溶出率の最大値が104.5%であった．最大溶出の認められた溶出液の組合わせは，3%ビーフエキストラクト，5%塩化ナトリウム，pH9であった．

BSA 前処理フィルターを実用化するには，ウイルス溶出率ばかりでなく，ウイルス吸着率の向上を含め，添加ウイルス量からみたウイルス回収率を上昇させることにポイントをおいた検討が必要である．

以上の実験結果から，ウイルス浮遊液のイオン強度，pH 等を調整すれば，ウイルス粒子の凝集力，および表面荷電に変化が生じ，フィルターへのウイルス吸着に影響がでると考えられた．

吸着ウイルスの溶出率を上昇させるには，フィルターを前処理し，フィルターにおけるウイルス吸着部位，ないし吸着力をコントロールすることが重要である．つまり，フィルター表面を荷電処理し，ウイルス吸着，溶出効果を上昇させることも一つの実用的方法であると考えた．

結　論

カートリッジフィルターによる吸着溶出を利用した水中ウイルスの濃縮条件を解析検討した．

1) フィルターへのポリオウイルス吸着に関与する諸要因の中から，ウイルス量 (3.0×10^5, 3.0×10^4, 3.0×10^3PFU/ml)，水質（水道水，中水，三次処理水），添加剤（塩化アルミニウム，凝集剤）の組合わせ実験を行い，実験結果について統計学的分析を行った．添加剤の差異に1％以下の危険率で有意差が認められたのみで，各要因間の交互作用は，認められなかった．

2) ウイルス吸着率は，ウイルス液中の塩化アルミニウム濃度の上昇にともなって増加した．ウイルス量 6.4×10^4PFU/ml の水道水 20l に0.0015M 塩化アルミニウムを添加してろ過すると，ウイルス吸着率は99.7％であった．

3) フィルターからのウイルス溶出に関しては，溶出液の種類（グリシン，ビーフエキストラクト，リン酸），pH（7，9，11），塩濃度（0，1，5％）の3要因を取り上げ，その組合わせ実験を行った．統計分析の結果，各要因間の交互作用と各水準間の有意差が認められた．無処理フィルターからの最も効率のよい溶出液の組合わせは，2％ビーフエキストラクト，pH9，5％塩化ナトリウムであった（溶出率26.4％）．1％牛血清アルブミン前処理したフィルターでは，ウイルス吸着率は低下したが3％ビーフエキストラクト，pH9，5％塩化ナトリウムの組合わせで104.5％と高い溶出率が認められた．

文　献

1) Belfort, G., Rotem, Y., and Katzenelson, E.: *Water Research*, 9, 79, 1974
2) Samuel, R. F., Charles, P. G., Craig, W., and Melnick, J. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 221, 1976
3) Payment, C. P., Gerba, C., Wallis, and Melnick, J. L.: *Water Research*, 10, 893, 1976
4) Syed, A. S., and Westwood, J. C.: *Can. J. Microbiol.*, 22, 1620, 1976
5) Sarrette, B. A., Danglot, C. D., and Vilagines, R.: *Water Research*, 33, 355, 1976
6) Eliyahu, K., Badrl, F., and Tova, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 638, 1976
7) Hazlett, D. T. G.: *Can. J. Microbiol.*, 23, 1052, 1977
8) Raymond, L. L., and Charles, P. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 93, 1979
9) Daniel, R. D., and Gerald, B.: *Health Laboratory Science*, 11, 275, 1974
10) Roger, F., and Sharp, D. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 395, 1979
11) Edward, F. L., James, M. V., Mcharrell, Z. T., and Thomas, J. V.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 544, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 51-54, 1980

急性胃腸炎患児ふん便からの Rotavirus の検出(1)

藪内 清*, 関根整治*, 矢野一好*, 岩崎謙二*
鈴木雄次郎**, 中川 進**, 吉岡勇雄**
浦野純子***, 河野弘子***, 渡辺悌吉***

Detection of Rotaviruses in Faeces taken from Infants with Acute Gastroenteritis (1)

KIYOSHI YABUUCHI*, SEIJI SEKINE*, KAZUYOSHI YANO*, KENJI IWASAKI*,
YUJIRO SUZUKI**, SUSUMU NAKAGAWA**, ISAO YOSHIOKA**,
JUNKO URANO***, HIROKO KOHNO*** and TEIKICHI WATANABE***

Keywords: 急性胃腸炎 acute gastroenteritis, ロタウイルス rotavirus, 逆受身赤血球凝集反応 reversed passive hemagglutination

緒 言

1973年 Bishop ら[1,2]によって報告された Human rotavirus (以下 HRV と略す) は, その後世界各地の急性胃腸炎患児ふん便から検出され, わが国においても冬季における乳幼児の非細菌性急性胃腸炎の病因として本ウイルスが高率に関与していることが明らかにされた.

この HRV は現在までのところ, 一般的には培養に成功していないため, その検出はもっぱら電子顕微鏡による形態学的検査に頼っているので, 設備的, 技術的な障害のために, 検査の必要性は認めながらもいまだ一般化されるまでには至っていない.

一方, Flewett ら[3]によって, 培養可能な Nebraska calf diarrhea virus (以下 NCDV と略す) が HRV と共通抗原を有することが報告され, NCDV を用いた各種検査法が開発されている[4-7].

われわれは, 急性胃腸炎患児ふん便について, 通常の組織培養によるウイルス分離試験および細菌培養試験に加えて, 電子顕微鏡および逆受身赤血球凝集反応 (reversed passive hemagglutination: 以下 RPHA と略す) によるウイルス検出の検討を試みたので, その概要を報告する.

材料と方法

供試ふん便 患者ふん便は1979年11月から1980年3月に東京逓信病院小児科を受診した生後5カ月から12才の急性胃腸炎患児42名から, 健康児ふん便は生後8カ月から11カ月の乳幼児20名からそれぞれ採取した. 採取後直ちに −20° に凍結保存した.

ふん便処理法 リン酸緩衝液で10% 乳剤とし, 3,000 rpm 20分遠心沈殿後その上清を二分し, 一方は組織培養用培養液 (Eagle MEM) を等量加え, 凍結融解後 3,000 rpm 10分遠心沈殿し, 上清に抗生物質を加えてウイルス分離培養用検体とした. 他方は5% ヒツジ固定赤血球液を1/2量加え37° 30分作用させ, ふん便乳剤上清中のヒツジ赤血球に対する凝集素を吸着後遠心沈殿し, その上清を RPHA に用いた.

電子顕微鏡検査法 患者ふん便に約10倍量の精製水を加えてかくはんした後, 3,000 rpm 10分遠心沈殿し, 上清をさらに 8,000 rpm 30分遠心沈殿してきよう雑物を除去した. この上清を30%ショ糖液上に重層し, 35,000 rpm 90分遠心沈殿した. 得られた沈渣を少量の精製水に浮遊させ 4° に一夜放置後 3,000 rpm 20分遠心沈殿し, 上清を電子顕微鏡用試料とした. 標本はネガティブ染色してから鏡検した.

ウイルス NCDV (Lincoln株) を MA 104 細胞で増殖させ, 凍結融解後 3,000 rpm 10分遠心沈殿して細胞を除去し, 透析チューブで約1/100量に減圧濃縮したものを精製出発材料とし, フロロカーボン処理後ショ糖密度こう配法により精製した.

抗 NCDV 血清 精製 NCDV に Freund's complete adjuvant を等量加え, モルモットの大腿部に筋肉内接種し, 3週間後腹腔内に追加免疫をおこない, さらに1週間後に全採血し血清を分離した.

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

表 1. 急性胃腸炎患児ふん便からの rotavirus の検索成績

No. (80)	氏名	年齢(才)	病日	検査成績 電顕	R PHA	ウイルス培養	細菌培養	No. (80)	氏名	年齢(才)	病日	検査成績 電顕	R PHA	ウイルス培養	細菌培養
148	H・M	1	3	+	8	−	−	534	E・O	1	4	+	8	−	−
149	K・I	11/12	5	+	4	−	−	535	R・M	2	12	−	8	−	
151	A・N	7/12	1	+	4	−	−	536	K・T	9/12	1	+	<2	−	−
153	H・M	8	3	−	<2	−	−	537	U・Y	10/12	3	+	8	−	−
154	H・K	9/12	3	−	<2	−	−	539	F・N	1	6	+	16	−	−
155	K・Y	1	5	+*	<2	−	−	817	Y・I	1	13	−	<2	−	−
156	S・S	10	3	−	<2	−	−	818	K・K	12	3	−	<2	−	
158	R・K	1	3	−	<2	−	−	819	M・A	11/12	2	+		−	−
159	D・O	4	2	−	<2	−	−	820	M・Y	1	3	−	<2	−	−
160	M・S	1	2	+	16	−	−	822	H・S	2	2	+	32	−	−
161	T・I	3	6	−	<2	−		823	M・S	11/12	5	−	8	−	
162	Y・I	5	2	−	<2	−	−	824	H・S	4	3	−	<2	−	
163	S・U	2	5	+	4	−		825	M・K	2	6	+		−	
164	U・K	1	2	+		−	−	826	M・T	1	3	+	32	−	
165	K・A	1	3	+		−		827	H・S	5/12	6	−	<2	−	−
528	N・A	9/12	5	+	<2	−	−	828	T・U	1	6	+		−	
529	S・U	1	5	+	<2	−	−	829	S・Y	9/12	1	−	16	−	
530	Y・K	2	4	+	64	−	−	830	H・N	6/12	1	−	<2	−	
531	H・H	3	2	−	<2	−		831	A・Y	1	2	−	8	−	
532	A・K	8/12	2	+		−	−	832	M・K	1	3	−	8	−	−
533	N・S	7/12	5	+	8	−		833	M・T	1	3	+	8	−	−

* 直径30nm の小型粒子

NCDV特異抗体 精製 NCDV をリガンドとした臭化シアン活性化セファロースカラムを用い，アフィニティークロマトグラフィー法によって抗 NCDV モルモット血清から精製した．

NCDV特異抗体感作ヒツジ赤血球 RPHA の担体として用いる固定ヒツジ赤血球はセルゲン (Cellgen 日本バイオテスト研究所製) を使用した．希釈液で2.5% 浮遊液とし，これに蛋白濃度40μg/ml に調整した NCDV 特異抗体を等量加えて37° 30分間かくはんして感作した．使用時希釈液で1%浮遊液とした．

希釈液 0.15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) に Tween 80 を0.1%，アラビアゴムを0.01%に加えたものを使用した．

RPHA V型プレートを用いたマイクロタイター法によった．1検体につき 0.025 ml の2倍階段希釈列を2列作り，一方には希釈液を，他方には抗 NCDV 血清をそれぞれ 0.025 ml づつ加え，37° 60分感作させた後，0.025 ml の1% NCDV 特異抗体感作ヒツジ固定赤血球液をそれぞれ加えて振とうし，室温60分静置して凝集像を観察した．

ウイルス培養検査 ウイルス分離試験は FL, HEp 2, Vero #462, BGM の4種継代細胞を用いて常法[8]に従っておこなった．

細菌培養検査 患者ふん便について，マッコンキー寒天培地，ドリガルスキー改良寒天培地，BTB ティポール寒天培地，フェニールエチルアルコール加血液寒天培地，セレナイト増菌培地および3%食塩加ペプトン水を使用して，常法[9]に従って主として赤痢菌，サルモネラ，腸炎ビブリオおよび病原大腸菌を対象に培養検査をおこなった．

結果と考察

1979年11月から1980年3月にかけて東京逓信病院小児科を受診した，生後5カ月から12才の急性胃腸炎患児42名のふん便についての病因検索成績を表1にしめした．

電子顕微鏡検査（以下電顕法と略す）により42例中23例（55%）にウイルス粒子をみとめた．このうち22例の検出粒子は直径60nmで，形態学的にもHRVと一致したが，他の1例は直径約30nmの小型粒子であった．直径30nm前後の粒子で下痢症の病因と考えられるウイルスには，Norwalkvirus, Astrovirus, Calicivirus など

表 2. 電顕法と RPHA 法の比較

RPHA / 電顕法	抗原価 <2	2	4	8	16	32	64
＋	4		3	5	2	2	1
－	14			4	1		

があるが，今回検出された小型粒子は形態が不明りようのためいずれとも判定できなかった．

次に同一検体を NCDV 特異抗体感作ヒツジ赤血球を用いた RPHA によって検索したところ，36例中18例（50%）の陽性（抗原価 ≧1：4）をみとめた．これらの陽性例については抗 NCDV モルモット血清により特異的に凝集が阻止されることを確認した．

電顕法と RPHA の両法を実施した36例についての成績を対比整理すると表2のとおりになる．すなわち，電顕法，RPHA 両法共陽性のもの13例，両法共陰性のもの14例であった．しかし，電顕法陽性 RPHA 陰性4例，電顕法陰性 RPHA 陽性5例の不一致例をみとめた．電顕法陽性 RPHA 陰性の4例のうち1例については，電顕法で検出したウイルス粒子が小型粒子であるため，NCDV との抗原性の相違のためとも考えられたが，他の3例についてはその不一致の原因を明らかにすることはできなかった．電顕法陰性 RPHA 陽性の5例については，同検体中のウイルス粒子が少量のためか，あるいは抗原性は維持されているものの粒子の破壊によって形態学的には電子顕微鏡でとらえられなかったものと思われる．電顕法での陽性率は47%（17/36），RPHA での陽性率は50%（18/36）で両法共ほぼ同率をしめしたが，不一致例があるので両法を併用した場合には61%（22/36）の陽性率となった．

HRV による乳幼児の下痢症は生後6カ月から1才の離乳期に集積発生し，2才以降では急激に減少するといわれているが[10]，今回検索した42例中，電顕法あるいは RPHA で陽性となった28例はすべて2才以下の乳幼児であり，3才から12才の8例は全例陰性であった．

なお，全例について組織培養によるウイルス分離試験を実施したが，既知の病原ウイルスは分離できなかった．また細菌培養試験を実施し得た検体についても，赤痢菌，サルモネラ，腸炎ビブリオおよび病原大腸菌は検出されなかった．

健康乳児ふん便については全例 RPHA 陰性であった．

冬期の乳幼児下痢症の病因として大きな役割りを演じている HRV についての検索は現在のところ一般化されていない．1980年 Wyatt ら[11]は HRV 2型 Wa 株を newborn gnotobiotic piglet に連続11代継代したのち，更に初代アフリカミドリザルじん細胞に14代継代することにより増殖させることができたと報告し，HRV の培養の可能性がみられるようにはなったが，現状では HRV の培養は不可能であって，抗原の大量培養，精製等に技術的な困難がともなうことが最大の原因である．

そこで，従来の電顕法にかわる簡便な方法でいずれの検査室でも実施可能な検査法の開発が望まれ，既にウイルス粒子の検出法や血清学的検査法などいくつかの方法が発表されている．われわれは，HRV による下痢症患者が主として2才以下の乳幼児であること，主訴が下痢であることなどから，血清学的試験よりも検査材料採取技術上患児ふん便中のウイルス抗原の検出が当面最も実施容易であると考え，患児ふん便を検体として，HRV と共通抗原を有する NCDV を用いた RPHA を試みた．その結果，電顕法と RPHA との間にある程度の不一致例がみとめられた．従って現時点では当然のことながら両法の併用が望ましい．今後この不一致例の原因を追究して改善し，精度を高め技術的に熟練すれば，RPHA はその簡便さの点で従来の電顕法に代る方法の一つとして期待できるものと考える．

なお，電顕法あるいは RPHA でウイルス抗原を証明しても，乳幼児の腸内正常ウイルス叢が全く判っていない現在では，臨床症状や他の病因との関連で診断すべきであり，通常のウイルス分離試験および細菌培養試験も必ず同時に実施すべきであろう．

結　論

1979年11月から1980年3月にかけて東京逓信病院小児科を受診した，生後5カ月から12才の急性胃腸炎患児42名のふん便について，電顕法および NCDV 特異抗体感作ヒツジ赤血球による RPHA により HRV の検出を試み次の結果を得た．

1. 電顕法により42例中23例（55%）にウイルス粒子をみとめた．このうち22例は形態学的に HRV とみられたが1例は同定できなかった．

2. 電顕法と RPHA の両法を実施した36例の陽性率は電顕法で47%（17/36），RPHA で50%（18/36）であり，両法を併用した場合には61%（22/36）であった．

3. 電顕法陽性 RPHA 陰性4例，電顕法陰性 RPHA 陽性5例の不一致例がみとめられたので，現時点では両法を併用することが望ましいが，今後 RPHA の精度を高め技術的に習熟すれば，RPHA はその簡便さから電顕法に代る方法の一つとして期待できる．

謝辞　NCDV および MA 104 細胞を分与され，かつ

RPHA について貴重なご教示を賜った，神奈川県衛生研究所実方剛技師に深甚の謝意を表する．

文　献

1) Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., and Ruck, B. J.: *Lancet*, 2, 1281, 1973
2) Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., and Ruck, B. J.: *Lancet*, 1, 149, 1974
3) Flewett, T. H., Bryden, A. S., Woode, G. N., and Bridger, J. C.: *Lancet*, 2, 61, 1974
4) Matsuno, S., Inouye, S., and Kono, R.: *Infect. Immun.*, 17, 661, 1977
5) 実方　剛，吉田芳哉，斎藤　譲：第26回日本ウイルス学会総会演説抄録，368，1978
6) 実方　剛，吉田芳哉，小田和正：第27回日本ウイルス学会総会演説抄録，321，1979
7) 斎藤　譲，実方　剛，吉田芳哉：感染症学雑誌，53，597，1979
8) 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：東京衛研年報，30—1，24，1979
9) 日本公衆衛生協会：微生物検査必携細菌真菌検査，第2版，195，1978
10) 浦沢正三，秋葉澄伯：臨床とウイルス，7，339，1979
11) Wyatt R. G., James, W. D., Bohl, E. H. et al.: *Science*, 207(11), 189, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 55-60, 1980

カーボン支持膜を用いた生物試料の電子顕微鏡観察

前木吾市*, 友成正臣*

Electron Microscopy of Biological Specimens placed on Thin Carbon Monolayer Support Film

GOICHI MAEKI* and MASAOMI TOMONARI*

Thin carbon monolayer support film about 60 A of their thickness was prepared by the vaccum evaporation technique with the use of mica plate. The correction of astigmatism of JEM-100B type electron microscope was made at its maximum magnification of 100,000-170,000, using fine structure of the carbon monolayer support film.

High resolution of the electron micrographs of their final magnification of 400,000 times (with their direct magnifications 100,000-170,000 times) were obtained on Pili of Escherichia coli, a bacteriophage obtained from Vibrio cholerae and an influenza virus particle.

Keywords: pili, flagella, bacteriophage, virus, negative staining, electron microscopy

緒　言

細菌, ウイルス等の微生物を電子顕微鏡観察する場合, 支持膜の基本的なものにコロジオン膜があり, 既報[1]でネガティブ染色においてコロジオン膜が耐え得る限界を, 直接撮影倍率2万倍（引伸最高倍率10万倍）と結論した. しかしネガティブ染色試料の高解像撮影を実用化するには, コロジオン膜は強度に不安が残り, マイクログリッド（MGと略す）で膜補強を行うか, カーボン支持膜[2]を導入するかの選択を迫られる. MG 補強のコロジオン支持膜は, これまでの経験ではMGのネットが二重膜を構成し, 像の解像度を低下させたり, ネットの穴径が小さすぎて視野の妨げになるなど課題を残している. 一方, カーボン膜は電子ビーム照射に対して強靱で理想に近いが, 機械的ショックに弱く, 作製時に水面上で細かく劈開する欠点があり, これまでルーチンに使用することが困難であった. 近年, 再びカーボン膜作製に踏み切り, 実用できる見通しを得るまでに至った. これを用い生物試料のネガティブ染色に応用したところ, 好結果を得たので報告する.

実験材料

供試材料は細菌では大腸菌 IAM-1239 株を, ウイルスとしてインフルエンザ・ウイルス（1980年当初に当所微生物部ウイルス研究科で患者より分離したA香港型, Aソ連型）およびコレラ菌バクテリオ・ファージを用いた. 大腸菌は 0.3% 普通寒天培地を, インフルエンザ・ウイルスは孵化鶏卵漿尿液を未精製のまま, ファージは寒天培地上のプラックより直接採取し, ネガティブ染色に供した.

実験方法

カーボン支持膜作製法[2,3]

1) 良質雲母板（2×5 cm）をカミソリ刃で剥離し, 表面を IB-I 型イオンクリーナで叩き, 蒸着装置(JEE-4C) 内に置く. ガラス板上に一度に3枚分置く.

2) あらかじめ蒸着装置内の電極にカーボン棒（市販 5 mmϕ）をセットしておく. 一方の端をカーボン心削り機と紙ヤスリを用いてできるだけ鋭く尖らせ, 他端の平面にスプリングで押し当てる.

3) 雲母板とカーボン棒の距離は約 10cm で, 蒸発量を知る目安に白色タイルを置く. 真空度10^{-5}以上になったら蒸着を開始する. 液体窒素も利用して真空度を維持する. 白熱したカーボン尖端の損耗の度合いをベルジャーを透して観察し, 火花が飛ばないよう時間をかけて蒸着する.

4) タイルの黒化度を, 市販の標準カーボン膜厚セットと比較し, 60A程度になるまで蒸着する. 一回の蒸着量で不足の際は2～3回と繰返し多重蒸着し加減する.

5) 蒸着済み雲母板の周囲1mm に枠付けを行う. コロジオン1～2%液を用いろ紙片などで掃引しながら薄く塗布し, カーボン膜の劈開を防ぐ.

6) コロジオン膜張器に満した水中へ雲母板を斜めに

* 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

沈めてゆき，カーボン膜を剥離させる．ピンセットでつまんだ400メッシュのグリッドでカーボン膜を下から掬い取り，ろ紙上で水分を除き乾燥させる．メッシュ面はあらかじめ粘着剤処理を施しておく．以上の操作を最大限の注意を払って行う．

ネガティブ染色法[4-8]

染色剤として常用の2％PTA（pH6.0）の外，新たに2％モリブデン酸アンモン(pH7.0)を用いた．染色法の手技としては，メッシュ上で染色液と試料とを載積する方法によった．すなわち

1） メッシュ専用ピンセットで，カーボン膜張り済みのメッシュを挟み固定する．

2） あらかじめメッシュ上に2％PTA染色液を一白金耳載せておく．

3） 試料から釣菌した白金線の先端を，PTA液に軽くタッチする．

4） 1～2分間放置した後，余液をろ紙で除き乾燥させる．

染色済みメッシュの乾燥は大部分エア・ドライによったが，ファージ試料では一部，準フリーズ・ドライ法[1]によった．

高倍率電顕観察法

電顕は日本電子 KK 製 JEM-100B，サイドエントリー方式で，メッシュの固定は試料ホルダーの先端部で2枚の開孔カーボン板で挟む式で，分析電顕用と共通になっている．加速電圧100KV，電子電流は40μA前後で使用した．10万倍以上の高倍率つまみのレンジは10，13，17万倍（最高倍率）の三段階なので，これらを平均に用い比較を行った．倍率の較正は行っていない．対物絞りは最大径の120μmを用いた．撮影使用フイルムはフジFGで，現像にはコダック D-19 およびカテコール表面現像液[9]を用いた．

観察結果

カーボン膜は推定60Aと薄目に作製したので像は明るく，電子ビーム照射に対し安定で，各種試料の微細構造の見え方も比較的良好と判断された．膜の表面における染色剤の親和性は，イオン放電処理の有無にかかわらず良好であった．ただしネガティブ染色剤の偏り（大きな試料へのつきすぎ）は，コロジオン膜の場合と同様に，カーボン膜上にあっても解消されたわけでなく，依然として像コントラストが強すぎる傾向が観察された．

ここで今回の実験結果の代表として掲載写真について順次説明する．

写真1，2はカーボン膜上に存在する独得のモザイク様構造を高倍率で示した像である．この像は超高倍率観察の際は支持膜ノイズとして敬遠されるが，それ以下の分野では撮影の焦点合せや非点収差補正に有効に利用されている．写真1は直接17万倍で，写真2は直接13万倍で共に高倍率撮影で有効な第4番目の焦点合せ用つまみを1step ずつ動かし，不足焦点から過焦点にかけて撮影した．焦点調節のつまみは course→fine まで5段階あり，4，5番の微調整つまみは22step ある．第4つまみ1stepの与える変化量（対物レンズの焦点距離の変化量）は17万倍のところで $\Delta f = 2,950$A である．写真1の系列は引伸して100万倍として粒状構造を強調し，写真2では50万倍として掲載写真との比較に便ならしめた．その結果直接17万倍撮影では正焦点のフラット像の位置より，1step アンダー側に optimum focus（解像力とコントラストのバランスのとれた，電顕像の最も好ましい焦点位置．肉眼でキャッチできず，また試料作製法で変動がある）があり，直接13万倍撮影では1～2stepアンダー側あたりにあることが推定される．また写真1の直接17万倍撮影では非点収差等による像の流れが目立ち，写真2の直接13万倍撮影ではかなり補正済みなことが明瞭に認められる．以上の実験で電顕の解像度，高倍率撮影における倍率と焦点調節量の目安および非点収差補正の状況を客観的に知ることができた．

写真3はカーボン膜上の大腸菌線毛のPTAネガティブ染色像である．直接撮影倍率は10万倍で，2倍引伸して20万倍とした．左上隅の白い部分は菌体で，短ざく状に二十数本の線毛が数えられる．線毛のねじれた状態のものが1カ所見られるが，他にもしばしば観察された．下側の白く太いラインはべん毛である．大，小の白い斑点は菌体に付随した培地食塩成分の残渣である．この写真は菌体からの線毛の脱落が少ないネガティブ染色の特色を如実に示している．シャドウイング法では食塩除去のため試料乾燥後に菌体を蒸溜水で洗うので，線毛等の脱落，切断が目立ってくる．またこの写真は，コントラストの強すぎる菌体と，弱すぎる線毛両者のバランスのとれた階調表現を意図し，カテコール表面現像液で仕上げた作例であるが，あまり効果が出ていない．

写真4，5，6は大腸菌をモリブデン酸アンモンにより染色した像で，同一視野について10，13，17万倍の順で撮影したネガからの引伸写真である．倍率切替えに伴いoptimum focusは夫々変動するので，その都度，焦点合せを繰返し撮影した．各ネガを×3，×3.1，×2.94引伸し，総合倍率を30，40，50万倍に整えたもので，これら3枚の比較から，線毛のサイズ，解像，コントラストの良否，引伸し限度，optimum focus のバラツキおよび非点収差の傾向などが判断できた．

写真7はカーボン膜上でPTA染色したコレラ菌のバクテリオ・ファージで，aは直接10万倍撮影ネガからの30万倍像，bは直接13万倍撮影ネガからの40万倍拡大像である．この写真の試料メッシュはPTA染色後，たまたま液体窒素を用い蒸着装置中で凍結乾燥処理を試みたものである．2匹のファージ共DNA[10]が存在し，頭部の輪廓が六角形を示し，尾部の横縞が不明瞭ながら撮れている．エア・ドライのファージでは頭部の構造が不定形を示すものが多かった．

写真8はインフルエンザ・ウイルス香港型のPTA染色像で，直接13万倍撮影ネガから引伸した40万倍拡大像である．写真では多数のスパイク（40A）が粒子の表面に認められる．中央の2個の顆粒は付着した塩類の残渣と思われる．その周囲に散在する白い斑点は，垂直方向のスパイクの像である．この写真は非点収差による像の流れも目立たず，焦点も比較的良好である．

考　察

以前から課題であった真空蒸着によるカーボン支持膜の作製と，これを用いてのネガティブ染色の実用化実験にようやく好成績を得た．カーボン膜作製で新たに留意したことは，①良質の雲母板の使用，②液体窒素を用い安定した高い真空度（10^{-5}Torr 以上）で蒸着するようにしたこと，③蒸着時，時間をかけて根気よく蒸着し火花を出さぬこと．以上により緻密丈夫なカーボン膜の形成に努めた．また水面上でカーボン膜の劈開する欠点を防ぐ枠付けを慎重に検討した．

一般にネガティブ染色剤は粒子が極めて微細で，拡大倍率の限度は考える必要はないが，カーボン支持膜では表面の粒子構造のために10Aまでが限度とされている．10Aは写真1の100万倍写真で1mmの距離に相当するが，今回自製のカーボン膜を写真1bで当ってみると，ほぼ実用可能の線に到達していることが判明した．写真2では撮影後に非点収差の残存が判ったので，今後の撮影では見逃さないよう注意したい．

写真3は，拡大が大きすぎて菌体がはみ出してしまった．このようなパターンでは，菌体上に載っている部分の線毛の像がシャープな時は，菌体外の線毛の像もまた最良の焦点を示す．このことはネガやプリントを判断する際の好指針となる．この写真は稍過焦点のようで像が甘い．実際のネガティブ染色では，菌体直近の部分は染色剤の堆積で黒々とつぶれ，この写真のように菌体内外の線毛が接続して認められるケースは極めて少ない．

写真4，5，6では初使用のモリブデン酸アンモン溶液が，線毛，べん毛のネガティブ染色用として有用なことを示した．PTAに比較して稍軟調な染色効果が認められた．30，40，50万倍の同一視野の写真から判断して，引伸し写真の限度は40万倍程度と認められる．直接撮影10，13，17万倍の比較では，13万倍撮影によるときが，平均してoptimum focusに近いものが撮れ易いことが判ってきた．これは第4番目の焦点合せつまみの変化量Δfと密接な関係があるものと推察される．

写真7では凍結乾燥[11]処理のファージが選び出されたが，一般にネガティブ染色試料の乾燥時には，染色液の強い表面張力が試料に加わり，試料扁平化が問題となってきた．高真空と，より低温処理が効果的という．今後の課題である．

写真8では未精製材料からの直接ネガティブ染色にもかかわらず，ウイルスのスパイクが比較的よく表現できたのは予想外の収穫である．ネガティブ染色は，染色剤の種類により生物試料の構成成分を選択的に染色する効果があるようである．以前，同じウイルスの精製材料についてPTA染色した実験では，スパイクが凝集したような不可解な像しか得られなかった．今後の課題である．

ま と め

1）雲母板の劈開面を利用し，真空蒸着による薄いカーボン支持膜（約60A）を作製し，ネガティブ染色に実用し得る見通しを得た．

2）カーボン膜表面の粒状性構造を目印として，JEM-100B電顕（サイドエントリー式）の最高倍率17万倍までの撮影を行い，撮影法と非点収差補正の要領を確立した．

3）カーボン支持膜を用い大腸菌の線毛，コレラ菌のバクテリオ・ファージおよび分離直後のインフルエンザ・ウイルス（香港型，ソ連型）についてネガティブ染色を行い，微細構造を撮影した．

以上の結果，直接倍率13万倍，引伸し総合倍率40万倍の高倍率写真をそれぞれの試料について掲載した．

謝　辞　本研究にあたり御指導を賜った秋田大学医学部医学博士天野保二氏に深謝致します．

文　献

1）前木吾市：東京衛研年報，30-1，69，1979
2）深見　章，四本晴夫：電子顕微鏡，4，166，1956
3）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
4）川田十三夫ら：第31回日本電顕学会抄録集，153，1975
5）天野保二：第31回電顕学会抄録集，144，1975
6）平野　正：第31回電顕学会抄録集，156，1975
7）深井孝之助，保坂康弘，西村昭子：*J. Electron Mi-*

crosc., 21(4), 331, 1972
8) 松本　明：電子顕微鏡的研究の実際，57，1979，近代出版
9) 前木吾市：東京衛研年報，22，63，1970
10) 藤吉好則，椙崎弘幸，小林隆史，植田　夏：第36回日本電顕学会予稿集，262，1980
11) 細井　純：日本電子ニュース，19(4)，1，1979

写真説明

Explanation of Figures

1：カーボン膜表面の焦点ズレによって現れたノイズ．(×1,000,000)．直接撮影倍率17万倍．焦点ズレの Δf 間隔は各2,450Å．a, b：不足焦点，c：正焦点，d：過焦点．Structure of carbon monolayer support film.

2：カーボン膜表面の焦点ズレによって現れたノイズ．(×500,000)．直接撮影倍率13万倍．焦点ズレの Δf 間隔は各2,950Å．a, b, c：不足焦点，d：正焦点，e：過焦点，Structure of carbon monolayer support film.

3：大腸菌線毛のPTAネガティブ染色像(×200,000)．PTA negative staining image of pili of *E. coli*.

4：大腸菌線毛のモリブデン酸アンモン・ネガティブ染色像．直接10万倍撮影ネガより引伸し．(×300,000)．Ammonium molybdate negative staining image of pili and flagella of *E. coli*.

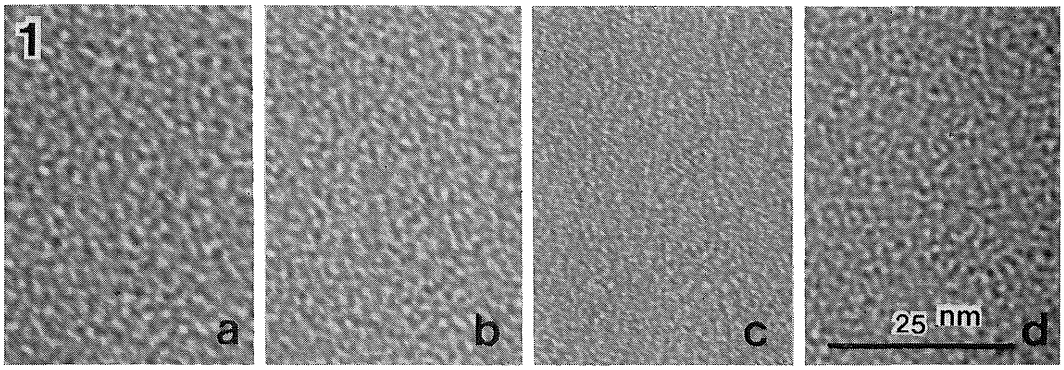
5：4に同じ，ただし直接13万倍撮影ネガより引伸し．(×400,000)．

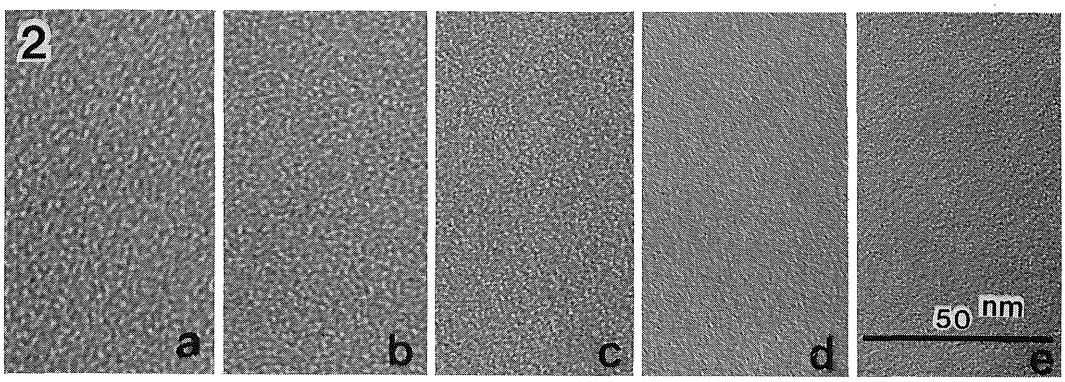
6：4に同じ，ただし直接17万倍撮影ネガより引伸し．(×500,000)．

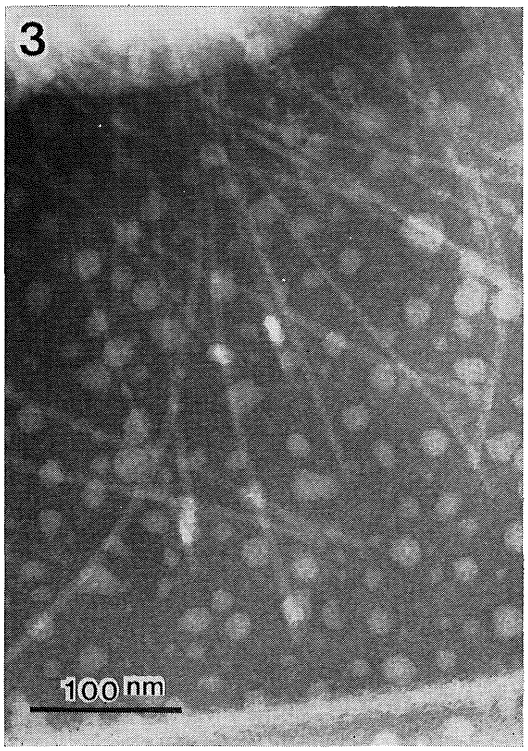
7a：寒天平板プラックより釣菌したコレラ菌バクテリオ・ファージのPTAネガティブ染色像．凍結乾燥処理を施す．直接10万倍撮影ネガより引伸し．(×300,000)．PTA negative staining image of bactriophage of *Viblio cholerae*.

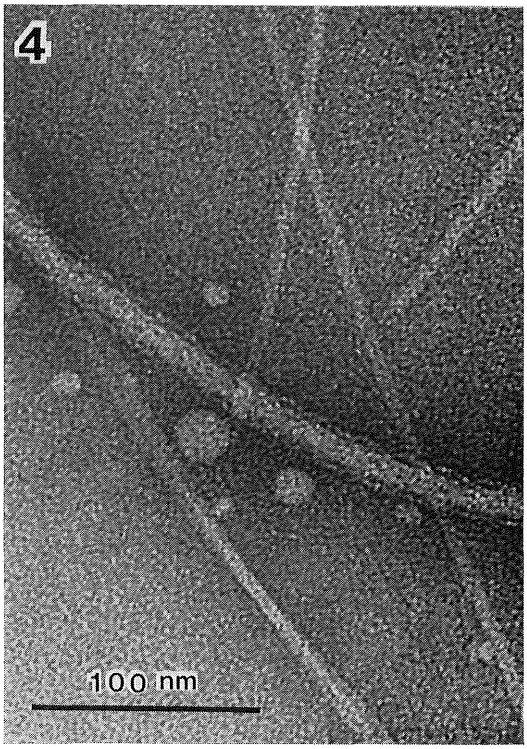
7b：7aに同じ，ただし直接13万倍撮影より．(×400,000)．

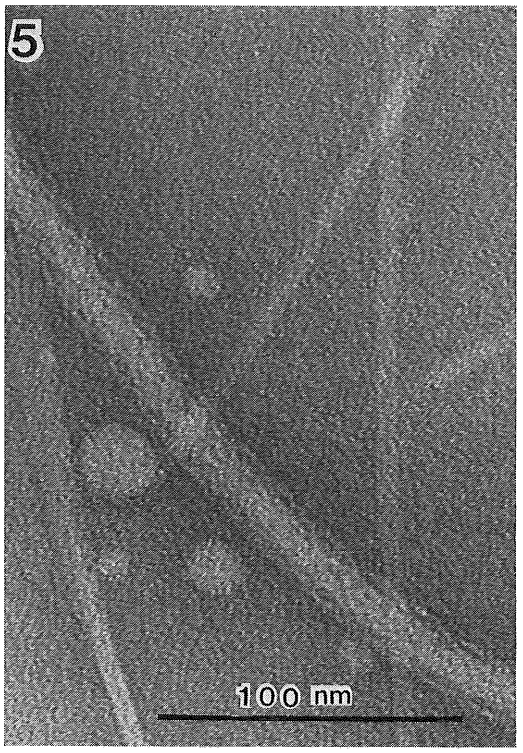
8：'80当初，分離直後のインフルエンザ・ウイルス（A香港型）のPTAネガティブ染色像．未精製の孵化鶏卵培養漿尿液より直接13万倍撮影したもの．(×400,000)．PTA negative staining image of A2 Hong Kong Influenza virus.

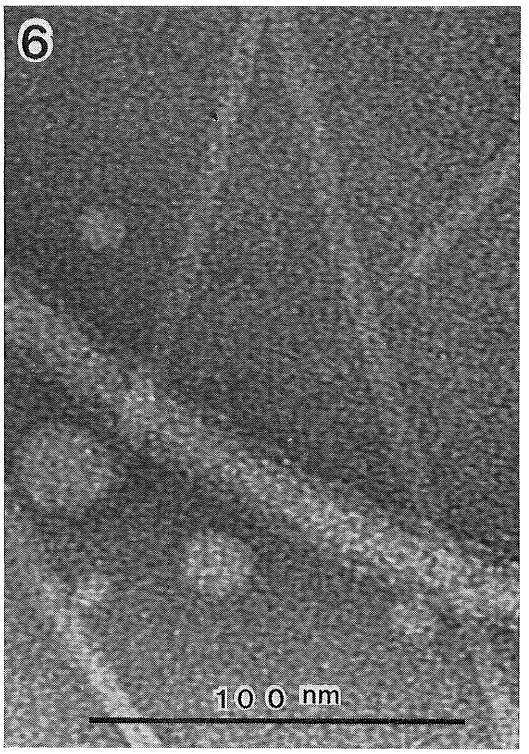

1
a
b
c
25 nm
d

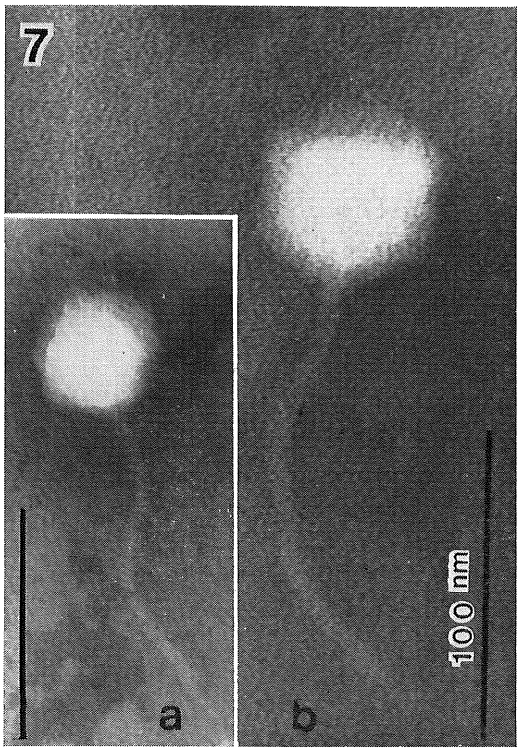

2
a
b
c
d
50 nm
e

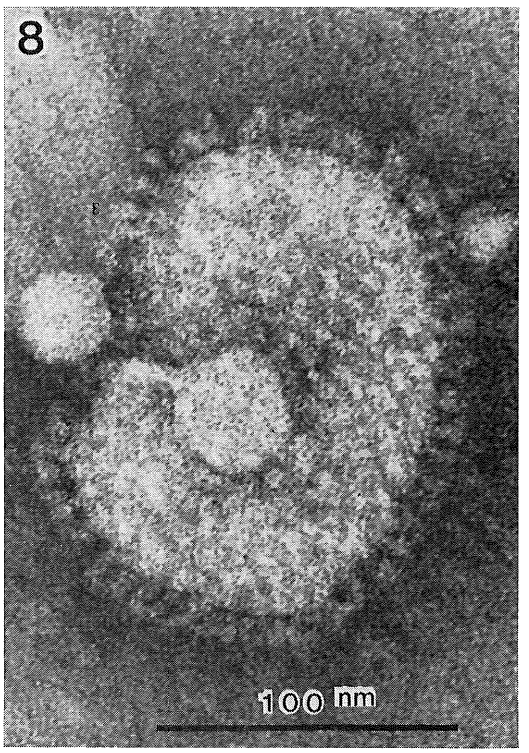

3
100 nm


4
100 nm


5
100 nm


6
100 nm


7
a
b
100 nm


8
100 nm

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 61-65, 1980

幼稚園児および成人の尿中 γ-GTP 活性値に関する検討

武士俣 邦 雄*, 霜 田 さと子*

γ-Glutamyltranspeptidase Activity in Urine of Kindergartener and Adult Human

KUNIO BUSHIMATA* and SATOKO SHIMODA*

Keywords : γ-GTP activity, 一時尿 temporally urine, 幼稚園児および成人 kindergartener and adult human

γ-glutamyl peptide を水解し，γ-glutamyl 基の転移を行なう *γ-glutamyl transpeptidase*（以下 γ-GTP と記す）は，肝臓や腎臓などに分布するため，その活性度はそれらの臓器の疾患の診断に用いられている．

γ-GTP の尿中異常出現は，肝障害による血液中増加でも影響をうけることが少なく，とくに腎臓においては近位尿細管にきわめて豊富かつ局在的に存在していることから，尿中 γ-GTP 活性度の測定は各種腎疾患および抗生物質などの薬物による腎障害の病態は握のパラメーターとして，その測定意義が最近とくに注目されるようになった[1]．

一般に尿中タンパクの検索は，腎障害の有無の指標として用いられており，定性試験による陽性率が年々増加する傾向にあることが認められている．しかし，尿中タンパクの出現が，腎糸球体の機能障害に基因しているのか，あるいはカドミウム中毒の場合にみられるような腎尿細管における再吸収障害のためなのかについての区別は明らかにされていない．

このことから著者らは，都民の腎障害の動向をは握する調査研究の一環として，幼稚園児および成人の一時尿について γ-GTP の活性度を測定し，経年観察調査の資料としても現状における平均活性水準を明らかにするために，推測統計的に検討したので報告をする．

調査対象および調査時期

本調査は，昭和54年11月22日に東京都江東区の私立双葉幼稚園園児76名（男児32名，女児44名）および同年11月30日に都下日野市立第二幼稚園園児89名（男児49名，女児40名）の計 165 名の幼児ならびに同年12月 4 日に東京都の荒川区役所職員91名（男性52名，女性39名）と都下の日野市役所職員77名（男性45名，女性32名）の計168名の成人を対象とした．

検査材料および検査種目

前述の調査対象者に早朝一時尿の採取を依頼し，その後当研究所に集収搬入されたものを材料として用い，後述する方法にもとづいて γ-GTP およびウロビリノーゲンの定量分析を行なった．

定量検査方法

1. γ-GTP の活性度測定：日立二波長自記分光光度計356型に恒温セルホルダーを取り付け，HAAKE 社の FK 型低温サーキュレーターを用いて，恒温セルホルダー槽を25℃に保ち，ベーリンガーマンハイム社が Szasz[2]の報告にもとづいて調製した基質液を使用し，rate assay 法で吸光度の変化を自記記録して活性を測定した．また，尿中 γ-GTP は凍結保存の 5 日後には約90％の活性低下が認められるが，4℃においては10日間，さらに室温では 5 日間ほぼ安定であるという報告[3]にもとづき，著者らは材料採取後 4℃に冷蔵保存するとともに，4 日以内に検査を終了させた．

2. ウロビリノーゲンの定量分析：採尿当日に還元処理操作を行ない[4]，約14時間後に沪過し，沪液をエールリッヒのアルデヒド反応にもとづいて発色[5]させ，佐藤法[6]による対照にしたがって比色を行なって定量値を算出した．

結果および考察

幼稚園児および成人の早朝一時尿について得られた γ-GTP の活性測定値を，つぎのように推測統計的に処理した．すなわち，棄却限界法の危険率 1％水準における棄却検定にしたがって，異常活性値を全く含まなくなるまでくり返して演算を行ない，その99％信頼範囲内の活性測定値のみを対象にして算出した推測統計数値を Table 1 に示す．

Table 1 に示した幼稚園児および成人の一時尿中 γ-GTP の平均活性値について，Welch の検定方法にもとづいて性差の検定を試みたところ，幼稚園児においては有意性が認められなかったが，成人では，男性の平均活性値 25.88±12.92U/*l* に比較して女性の平均活性値 21.93±9.81U/*l* は，危険率 5％という比較的高い危険水準ではあるが有意に低いと判定された．このことは，

* 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 Analyses on the γ-GTP Activity in Temporally Urine from Kindergartener and Adult Human

	Kindergartener		Adult Human	
Sex	Boy	Girl	Man	Woman
Subject Number	79	84	97	71
Rejected Number	4	2	1	6
Mean Value(unit/l)	22.25	23.17	25.88	21.93
Standard Deviation(unit/l)	8.23	7.87	12.92	9.81
Coefficient Variation	0.3700	0.3398	0.4991	0.4471
upper Rejection Limit(unit/l)	44.31	44.19	60.20	48.37

佐野ら[3]が健康成人の一日尿における γ-GTP の平均活性値(男性：27.6±18.1U/day，n=23および女性：23.0±14.1U/day，n=11) について，性差は認められなかったと報告していることと多少異なった結果であった．このような尿中 γ-GTP 平均活性値の性差異の関係については，一時尿と一日尿という検査材料の違いによることも考えられるが，著者らが求めた平均活性値において，幼稚園児では性差が認められていないこと，さらには成人における性差値3.95U/lが佐野ら[3]における性差値4.6 U/day よりも少差であったことと合せて検討したところ，佐野らは例数が少ないために推測統計的に有意差が認められなかったものであることが判明した．

また，Szasz[7]は，尿中の 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，著者らが求めた成人の一時尿における γ-GTP の平均活性値では 18.01% だけ男性が高い程度であるとともに，幼稚園児では逆に3.97%だけ女児の方が高い結果であった．さらには，著者ら[8]がすでに報告した小中学生の一時尿中 γ-GTP の平均活性値でも0.77%という微差ではあるが，やはり女子生徒が高い実態であった．このように，本調査の成人においてのみ一時尿中 γ-GTP の平均活性値に有意性差が認められたことは，活動や嗜好の違いなども考慮する必要があろう．

次に，幼稚園児と成人について一時尿中 γ-GTP の平均活性値を比較したところ，成人男性の平均活性値25.88±12.92U/l は，幼稚園男児の平均活性値 22.25±8.23 U/l よりも，危険率5%以下の水準で有意に高かったが，成人女性と幼稚園女児との間に有意差は認められなかった．しかし，著者ら[8]がすでに報告した小中学校の女子生徒の一時尿中 γ-GTP の平均活性値 25.9±11.66 U/lは，成人女性の平均活性値21.93±9.81U/l よりも，危険率2%以下の水準で有意に高いと判定されたが，そのほかの同性間においては有意差が認められなかった．

なお，この幼稚園児および成人の一時尿における活性測定値の，危険率1%水準における棄却検定のくり返し演算において，異常に高い活性測定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した活性測定値の例数は Table 1 に示した通りであるが，その全体としての棄却率は，幼稚園児3.68%および成人4.17%であった．

すでに，成人および幼稚園児ならびに義務教育期の生徒の一時尿中 γ-GTP 活性値水準について比較検討を行なってきたが，年齢層がきわめて広範囲にわたっている成人について，加齢との関係を明らかにするために，それぞれの年齢に対する γ-GTP の活性測定値水準を性別にプロットした分布図を，Fig. 1 に示す．

Fig. 1 のプロットの分散状態で明らかなように，高い活性測定値のプロットは20歳代の前半に多く見うけられ，年令が増すにつれて性にはかかわりなく漸次に低下する傾向にあることが認められた．このことは，尿中 γ-GTP の活性度を腎障害の指標として意義づけるためには，少くとも各年齢層別にそれぞれ正常範囲を設定する必要があることを示唆している．

血清中の γ-GTP は，肝炎や肝硬変あるいは閉塞性黄疸ならびに肝癌などによって上昇する[9]が，尿中 γ-GTP は腎機能が正常であるならば血清中の γ-GTP に影響されることが少ないといわれている[10]．そこで著者らは，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 活性測定値との関連性について検討するために，それぞれの検査値を相関的にプロットしたものを幼稚園児については Fig. 2 に，また成人については Fig. 3 に示す．

Fig. 2 に示したように，幼稚園児の一時尿中のウロビリノーゲン定量値と γ-GTP 活性測定値との相関性は，相関係数 $r=0.3146$ ($p<0.001$) の大きさとプロットの分散でも明らかなように，きわめて低いことがうかがわ

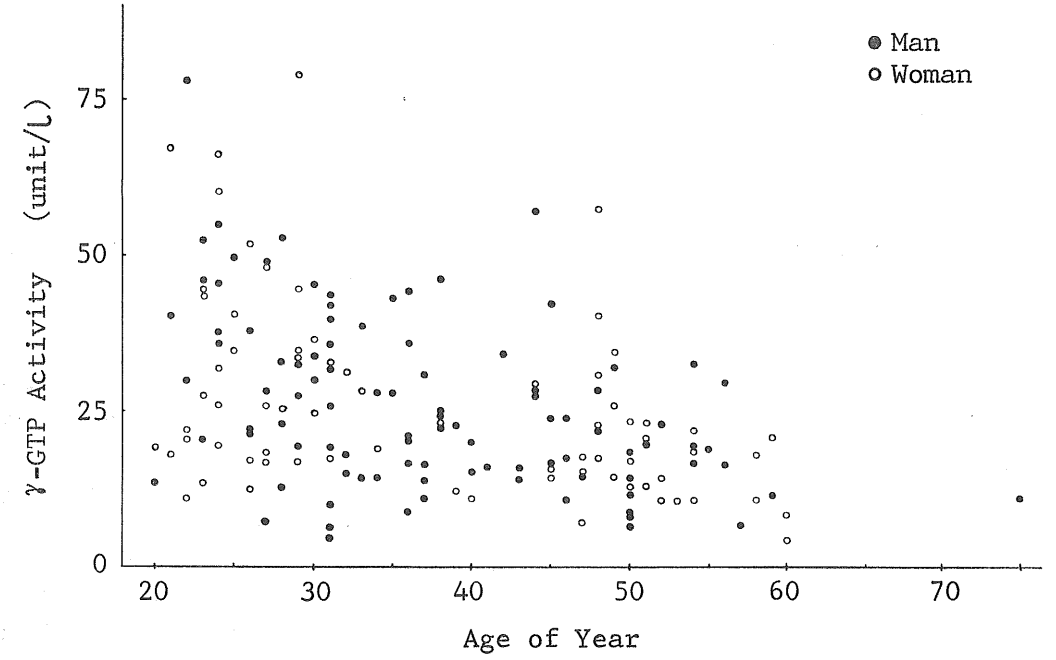


Fig. 1. Urinary Levels of γ-GTP Activity Plotted against Age of Adult Human

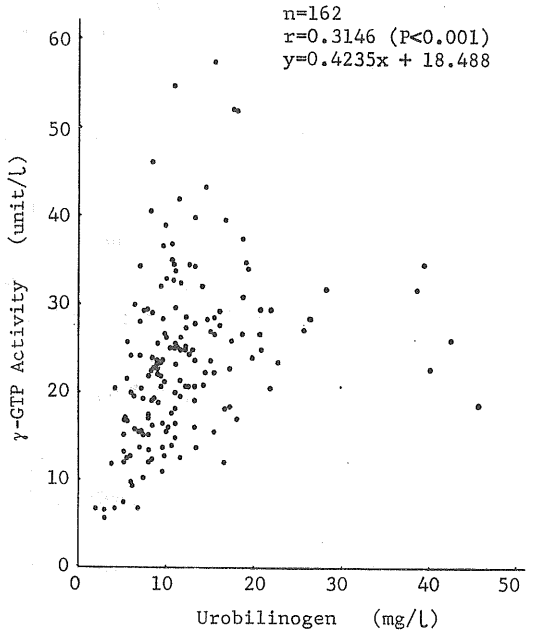


Fig. 2. Correlation between Activity of γ-GTP and Concentration of Urobilinogen in Temporally Urine from Kindergartener

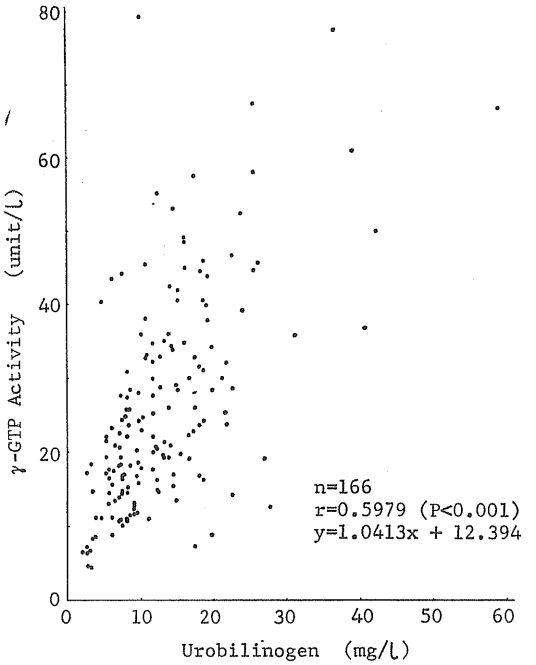


Fig. 3. Correlation between Activity of γ-GTP and Concentration of Urobilinogen in Temporally Urine from Adult Human

れた．なお，この幼稚園児の一時尿中ウロビリノーゲンの推測統計的平均濃度[11]（男児：10.73±4.10mg/lおよび女児：10.93±4.35mg/l）には性差が認められず，棄却限界上限値（男児：21.7mg/lおよび女児：22.6mg/l）よりも高濃度であった定量値が8例あり，その全体としての出現率は4.94%であった．

また，幼稚園児の一時尿中γ-GTP活性測定値のうち棄却限界上限値（男児：44.3U/lおよび女児：44.19U/l）よりも高い活性測定値が5例認められ，その全体としての出現率は3.09%であった．しかし，Fig. 2のプロットの分散で明らかなように，幼稚園児の一時尿中のウロビリノーゲン濃度およびγ-GTP活性測定値の両方で棄却される区分には，各検査値のプロットが全く存在していない．このように，それぞれの検査棄却値が各検査種目軸側に偏在していることは，この幼稚園児の一時尿中のウロビリノーゲン濃度とγ-GTP活性測定値が共通の機能障害から発生したものでないことを示している．すなわち，肝機能の障害性を尿中ウロビリノーゲン濃度で判定する限り，尿中γ-GTPは肝障害による影響をうけていないものと考えられる．このことは，一日尿中γ-GTPと血清中γ-GTPのそれぞれの活性値に相関性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．

さらに，Fig. 3に示した成人の一時尿中のウロビリノーゲン濃度とγ-GTP活性測定値を相関的にプロットした散布図について検討を行なうと，すでに述べた幼稚園児の場合とは異なって，各プロットがそれぞれの検査種目軸側に偏在することなく，全面に分散していることがうかがわれる．このことは，成人の一時尿中ウロビリノーゲン濃度の棄却限界上限値[11]（男性：27.9mg/lおよび女性：26.7mg/l）よりも高濃度を示した7例（4.17%）のうち4例が，すでに述べた成人の一時尿中γ-GTPの活性測定値の7例の棄却値と同じ被検試料のものであることからも明確である．このために，成人における一時尿中のウロビリノーゲン濃度とγ-GTP活性測定値との相関係数 $r=0.5957$（$p<0.001$）が，すでに述べた幼稚園児の相関係数 $r=0.3146$（$p<0.001$）よりも大きくなり，その相関性を高める機能障害の条件は加齢によって増すことが示唆された．

以上のことを，長ら[10]が“腎糸球体基底膜より多量の血清タンパクが漏出する場合には血中γ-GTPも尿中に漏出する可能性がある”と報告していることと合せて検討すると，成人は幼稚園児よりも血中γ-GTPの影響をうけやすい腎機能状態になる傾向を示しているように考えられる．また，一般的に尿中ウロビリノーゲンは飲酒によって増加するし，血清中γ-GTPは非飲酒者に比べて飲酒者は有意に高値である[9,12]ことから，血清中γ-GTPの活性測定はアルコール性肝障害の指標としても検査されている．したがって，この成人における一時尿中のウロビリノーゲン濃度とγ-GTP活性測定値の相関性の実態が，血清中γ-GTPの漏出によるものとして推察するよりも，アルコールが腎尿細管を刺激したためにγ-GTPの漏出が増加している可能性も疑われるので，こんごさらに検討してゆきたい．

ま と め

幼稚園児および成人の早期一時尿を用いて，γ-GTPの活性度およびウロビリノーゲンの濃度を定量的に検査し，得られたそれぞれの検査値について推測統計的に検討を行なった．

1. 幼稚園児の早朝一時尿中γ-GTPの推測統計的平均活性値は，男児：22.25±8.23U/lおよび女児：23.17±7.87U/lであり，両者の間に有意差は認められなかった．また，幼稚園児の早朝一時尿中γ-GTPの推測統計的棄却限界上限活性値（男児：44.31U/lおよび女児：44.19U/l）よりも高い活性測定値であるために，平均活性値を算出する対象から除外された検査値は，男児4/79例および女児2/84例であった．

さらに，幼稚園児の早朝一時尿中のγ-GTP活性測定値とウロビリノーゲン濃度との相関係数 $r=0.3146$は，危険率0.1%以下で有意であり，このときの回帰直線は $y=0.4235x+18.488$であった．

2. 成人の早朝一時尿中γ-GTPの推測統計的平均活性値は，男性：25.88±12.92U/lおよび女性：21.93±9.81U/lであり，この両者について Welch の差の検定を試みたところ，危険率5%以下の水準で男性の方が有意に高値であると判定された．また，成人の早朝一時尿中の推測統計的棄却限界上限活性値（男性：60.20U/lおよび女性：48.37U/l）よりも高い活性測定値であるために，平均活性値を算出する対象から除外された検査値は男性1/97例および女性6/71例であった．

さらに，成人の早朝一時尿中のγ-GTP活性測定値とウロビリノーゲン濃度との相関係数 $r=0.5979$は，危険率0.1%以下の水準で有意であった．

3. 幼稚園児の早朝一時尿中γ-GTPの推測統計的平均活性値と成人の早朝一時尿中γ-GTPの推測統計的平均活性値を比較したところ，幼稚園の男女児ともに危険率5%以下の水準で成人の男性よりも低値であったが，成人の女性との間に有意差は認められなかった．

4. 成人における早朝一時尿中γ-GTPの活性測定値は，加齢にともなって漸次に減少する傾向がうかがわれ

た.

文　献

1) 加納健一：臨床医, 5, 110, 1979
2) Szasz, G. : *Clinical Chemistry*, 15, 124, 1969
3) 佐野紀代子, 長　裕子, 青木フサ子, 保崎清人：臨床病理, 23, 819, 1973
4) 陳　敏馨：臨床検査, 6, 497, 1962
5) Schwartz, S., Sborov, V., and Watson, C. J. : *Am. J. Clin. Path.*, 14, 598, 1944
6) 佐藤徳郎：医学と生物学, 11, 229, 1947
7) Szasz, G. : *Zschr. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, 8, 1, 1970
8) 武士俣邦雄, 霜田さと子：東京衛研年報, 30-1, 75, 1979
9) 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
10) 長　裕子, 佐野紀代子, 保崎清人：臨床病理, 25, 921, 1977
11) 武士俣邦雄, 霜田さと子：東京衛研年報, 31-1, 66, 1980
12) 近藤東郎, 橋田　学, 百渓　浩：産業医学, 18, 95, 1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 66-70, 1980

幼稚園児および成人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 Kindergartener and Adult Human

KUNIO BUSHIMATA* and SATOKO SHIMODA*

Keywords: 尿中馬尿酸 urinary hippuric acid, 推計学的解析 statistical analyses, 幼稚園児および成人 kindergartener and adult human

馬尿酸は，グリシンのベンゼン誘導体であり，生体内では主に必須アミノ酸のフェニールアラニンの代謝終末産物あるいは体内に摂取されたベンゼン環の解毒産物として存在し，そのほとんどが腎臓を介して体外に排泄される．馬尿酸の生合成は，肝臓のミトコンドリアに存在する *glycine acyltransferase* によって，ベンゼン環のグリシン抱合解毒反応が促進されることによって生じるものであり，この合成能は肝実質障害の有無を調べる臨床生化学的検査法[1]として確立されている．

また，労働衛生の分野においては，有機溶剤のほとんどが有毒的に作用する[2]ことから，ベンゼン環を含んだ有機溶剤を生産あるいは使用する労働者の健康管理の一環として，尿中に排泄される馬尿酸量を暴露の指標にしようとする試みが盛んに行なわれている[3-15]．

さらには，近年とくに若年者のシンナー系溶剤による幻覚遊びが社会問題化しているとともに，加鉛ガソリンの使用禁止以来トルエンを主とした有機溶剤を，ガソリンのオクタン価を上げる目的で添加していることも認められている[7,16]．これらのことから，こんごますます有機溶剤系の物質によって大気が汚染されてゆく可能性のあることが示唆されるうえ，それによって住民の健康が侵害される危険性も予想される．

したがって，現時点における尿中馬尿酸濃度の実態を調査しておくことは，こんごの比較資料としてきわめて重要なことと考えるので，幼稚園児および成人の早朝一時尿中馬尿酸の測定を行ない，その排泄実態について推測統計的に検討したので報告する．

調査対象および調査時期

本調査は，幼稚園保育期年令児および成人について実施し，その内訳は，昭和54年11月22日に東京都江東区の私立双葉幼稚園園児76名（男児32名および女児44名）および同年11月30日に都下日野市立第二幼稚園園児90名（男児49名および女児41名）の計166名ならびに同年12月4日に東京都の荒川区役所職員91名（男性52名および女性39名）と都下の日野市役所職員77名（男性45名および女性32名）の計168名を対象とした．

検査材料および検査種目

前述した調査対象者が採取した早朝一時尿を収集したのち，当研究所に搬入された尿を検査材料として用い，馬尿酸およびウロビリノーゲンの定量分析を行なった．

定量分析方法

1. 尿中馬尿酸：Ogata et al.[17] の方法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.[18]の方法にしたがって発色させ，その呈色液を比色して定量値を求めた．

2. 尿中ウロビリノーゲン：採尿当日に還元処理操作を行ない[19]，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[20]させ，佐藤法[21]による対照にしたがって比色して定量値を算出した．

結果および考察

すでに述べた被検一時尿試料を，前項に記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，棄却限界法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．

Table 1 に示した幼稚園児および成人の一時尿中馬尿酸濃度に関する推測統計的な数値の差異について，性別および年令層別ならびに地域別に比較検討を行なった．

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

Table 1. Results of Statistical Analyses on the Hippuirc Acid and Urobilinogen Concentration in Temporary Urine

	Sex	Hippuric Acid (mg/ml)						Urobilinogen (mg/l)					
		S. No.	R. No.	Mean	S. D.	C. V.	u. R. L.	S. No.	R. No.	Mean	S. D.	C. V.	u. R. L.
Hino M. O.	Man	45	1	0. 376	0. 224	0. 5960	0. 993	45	1	11. 41	5. 96	0. 5222	27. 81
	Woman	32	2	0. 404	0. 189	0. 4678	0. 942	32	3	10. 24	4. 84	0. 4721	24. 07
Arakawa M. O.	Man	52	2	0. 46	0. 227	0. 4936	1. 08	52	2	12. 48	6.	0. 4802	28. 87
	Woman	39	3	0. 445	0. 188	0. 4216	0. 970	39	4	11. 41	4. 78	0. 4194	24. 83
Hino M. D. K. C.	Boy	49	1	0. 382	0. 151	0. 3942	0. 795	49	2	11. 22	4. 29	0. 3823	22. 98
	Girl	41	1	0. 399	0. 176	0. 4419	0. 887	41	2	10. 51	3. 88	0. 3695	21. 31
Futaba K. C.	Boy	31	0	0. 377	0. 170	0. 4514	0. 860	32	1	10. 42	4. 17	0. 4006	22. 27
	Girl	41	1	0. 42	0. 205	0. 4880	0. 989	44	2	11. 65	5. 11	0. 4383	25. 78
Adult Human	Man	97	3	0. 421	0. 229	0. 5453	1. 031	97	3	11. 98	6. 00	0. 5009	27. 93
	Woman	71	6	0. 418	0. 178	0. 4256	0. 897	71	4	11. 54	5. 63	0. 4877	26. 69
Kindergartener	Boy	80	2	0. 375	0. 152	0. 4055	0. 781	80	4	10. 73	4. 1	0. 3818	21. 70
	Girl	82	6	0. 381	0. 149	0. 3915	0. 78	84	5	10. 93	4. 35	0. 3982	22. 57

Note : Hino M. O. : Municipal Officials of Hino City, Arakawa M. O. : Municipal Officials of Arakawa-ku, Hino M. D. K. C. : Children in Hino Municipal Dai-ni Kindergarten, Futaba K. C. : Children in Futaba Kindergarten in Koto-ku, S. No. : Subject Number, R. No. : Rejected Number, Mean : Mean Value, S. D. : Standard Deviation, C. V. : Coefficient Variation, u. R. L. : upper Rejection Limit Value

まず，この一時尿中馬尿酸の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，幼稚園児層および成人層ともに性別による有意差は認められなかった．さらに，各調査地域ごとに一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度の性差についても比較を行なったが，いずれの地域においても有意差は認められなかった．また，それぞれの一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度を，各調査地域の同性間で比べた場合においても，その地域による差異は認められなかった．

なお，推測統計的に異常高値であると判定されたために，幼稚園児の男児2例（2.5%）および女児6例（7.32%）の計8例（4.94%）ならびに成人の男性3例（3.09%）および女性6例（8.45%）の計9例（5.36%）の各検査値が，一時尿中馬尿酸の性別の平均排泄濃度を算出する対象から除外された．すなわち，一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度には性差が認められなかったけれども，推測統計的に異常に高値であると判定された検査例数は，幼稚園児および成人ともに女性が男性の2倍強の出現率であった．このことは，すでに著者ら[22]が報告した小学生および高校生の早朝一時尿中馬尿酸の薬却値出現率が，女性は男性のほぼ2倍であったことと同じ関係であった．

一般的に，尿中に排泄される馬尿酸は，フェニールアラニン[23]あるいは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[24]から，生体内代謝によって生合成されたものである．したがって，今までに調査した一時尿中馬尿酸濃度の薬却値出現率が，幼稚園児，小学生，高校生および成人の全ての層において女性に高率であったのは，女性は男性にくらべてフェニールアラニンの代謝利用度が低くなりやすいために，その代謝産物である馬尿酸の生合成が盛んになっていることも考えられる．

また，Table 1 に示した薬却限界上限値までが普遍的な食生活者の一時尿中馬尿酸濃度の範囲を示しているものとするならば，異常高値として薬却された検査値の被検者は安息香酸ナトリウムを含有する食料品を摂取する機会が多いためではないかということも想定されるが，真の原因についてはこんご探究する必要がある．

つぎに，幼稚園児の一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度（男児：0.375±0.152mg/ml，n=78および女児：0.381±0.149 mg/ml，n=76）は，成人の平均排泄濃度（男性：0.421±0.229 mg/ml，n=94および女性：0.418±0.178 mg/ml，n=65）よりも低値であったが，両者の間に有意差は認められなかった．しかし，成人よりも低い幼稚園児の一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度でさえが，

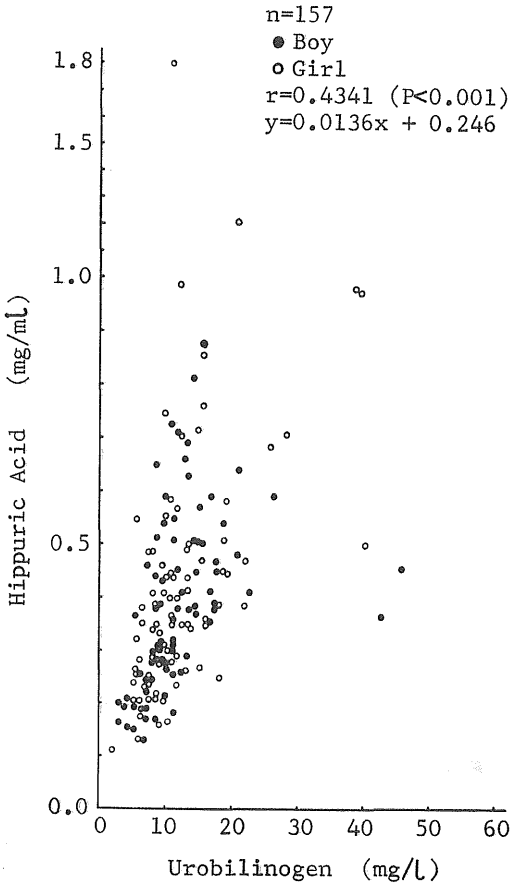


Fig. 1. Correlation between Concentration of Hippuric Acid and Urobilinogen in Temporally Urine from Kindergartener

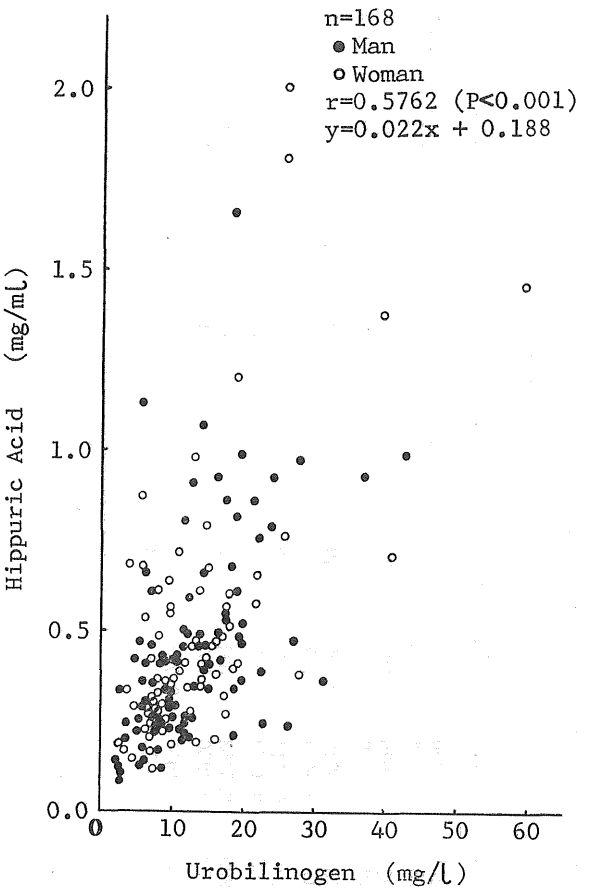


Fig. 2. Correlation between Concentration of Hippuric Acid and Urobilinogen in Temporally Urine from Adult Human

すでに著者ら[22]が報告した高校生の早朝一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度（男子：0.280±0.096 mg/ml, n=123 および女子：0.284±0.109 mg/ml, n=111）よりも，危険率0.1% 以下の水準で有意に高い値であった．

また，すでに述べた成人の一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度と，著者ら[22]がすでに報告した小学生の早朝一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度（男子：0.449±0.176 mg/ml, n=93 および女子：0.438±0.178 mg/ml, n=73）との間に有意差は認められなかった．しかし，幼稚園児の一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度と小学生の一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度を，同性間で比較検討したところ，男子は危険率1%以下の水準で，また女子は5%以下の危険率で有意に小学生の方が高い平均値であった．

なお，幼稚園児および成人のこれらの一時尿中馬尿酸の平均排泄濃度を，友国ら[25]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)と比較検討したところ，幼稚園児および成人の性別にかかわらず，有意差を認めるような排泄濃度ではなかった．

つづいて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った．まず，幼稚園児および成人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，幼稚園児層（男児：10.73±4.1 mg/l, n=76 および女児：10.93±4.35 mg/l, n=79）および成人層（男性：11.98±6.00 mg/l, n=94 および女性：11.54±5.63 mg/l, n=67）ならびに各調査地域ごとの男女間に有意な性差は認められなかった．また，この幼稚園児および成人の一時尿中ウロビリノーゲンの平均排泄濃度を，それぞれの調査地域間で性にかかわりなく比較検討したところ，地域による有意差は認められなかった．

しかし，すでに述べた幼稚園児および成人の一時尿中ウロビリノーゲンの平均排泄濃度を，著者ら[22]がすでに

報告した高校生の一時尿中ウロビリノーゲンの平均排泄濃度（男子：14.26±5.09 mg/l, n=117 および女子：15.52±6.68 mg/l, n=113）の同性間で比較したところ，成人男性は1％以下の危険率で，またその他は 0.1％以下の危険率の各水準で有意に高校生が高い平均値であった．

すでに述べたように，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によって生合成されたものであり，この合成能は肝実質障害の有無を調べる臨床生化学的検査として確立されている[1]．

そこで，肝機能の目安であるウロビリノーゲンとベンゼン環の解毒産物である馬尿酸の一時尿中濃度の相互関係について検討するために，それぞれの検査値を相関的にプロットした散布図を，幼稚園児については Fig. 1 に，また成人については Fig. 2 に示す．

まず，Fig. 1 に示した幼稚園児における一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸の相関図について検討を行なったところ，この男女児全体の一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸の相関係数 r=0.4341 は，危険率 0.1% 以下の水準で有意であった．なお，相関度を性別に検討した結果，男児の相関係数 r=0.3891 (P<0.001) とその回帰直線 $y=0.0093x+0.2790$ に対し，女児の相関係数 r=0.4719 (P<0.001) と回帰直線 $y=0.0172x+0.2210$ の式が示すように，女児は男児よりも相関性が高かった．このことは，すでに著者ら[22]が報告した小学生および高校生の早朝一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸における性的関係で，男子の相関性が高かったことと逆の結果であった．

また，Fig. 1 のプロットの散布状態でも明らかなように，Table 1 に示した幼稚園児の棄却限界上限値よりも高い検査値は，ウロビリノーゲンに9例および馬尿酸に8例が認められ，そのうち両方の検査種目で異常高値であるために棄却された検査値は女児の2例のみであった．

さらに，Fig. 2 に示した成人における一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸の相関図について検討を行なった．この成人全体の一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸の相関係数 r=0.5762 は，危険率 0.1% 以下の水準で有意であるとともに，すでに述べた幼稚園児における相関係数よりも大きかった．なお，幼稚園児の場合と同様に，相関度を性別に検討したところ，男性における相関係数 r=0.5265 (P<0.001) とその回帰直線 $y=0.0197x+0.1967$ に比べ，女性の相関係数 r=0.6170 (P<0.001) とその回帰直線 $y=0.0238x+0.1935$ の式が示すように，女性が男性より高い相関性を示した．このことは，すでに述べた幼稚園児の場合と同じであったが，著者ら[22]がすでに報告した小学生および高校生の早朝一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸における性的な相関性の関係とは逆の結果であった．

また，Fig. 2 のプロットの散布状態でも明らかなように，Table 1 に示した成人の棄却限界上限値よりも高い検査値はウロビリノーゲンに7例および馬尿酸に9例あることが認められ，そのうち両方の検査種目で異常高値であるために棄却された検査値は幼稚園児の場合と同じように女性の2例のみであったが，その関連性については不明である．

以上述べてきたように，一時尿中のウロビリノーゲンと馬尿酸の両方で棄却された検査値は幼稚園児および成人に2例ずつ認められているが，肝機能状態を尿中ウロビリノーゲン濃度で判定する限りにおいては，肝機能が減退すると馬尿酸の生合成量が減少することをうかがわせる尿中排泄実態であった．したがって，こんごは肝機能障害をともなった場合のフェニールアラニンの代謝およびベンゼン環の解毒反応が，主にどのような代謝経路をたどるのかについて追究してみる必要がある．

ま と め

幼稚園児 166 名（東京都江東区の私立双葉幼稚園園児 76 名および都下日野市立第二幼稚園園児 90 名）および成人 168 名（東京都荒川区役所職員 91 名および都下日野市役所職員 77 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，その排泄実態を推測統計的に検討した．

1. 幼稚園児の早朝一時尿中馬尿酸の推測統計的平均値を性別に検討したところ，男児の平均値 0.375±0.152 mg/ml (n=78) と女児の平均値 0.381±0.149 mg/ml (n=76) との間に有意差は認められなかった．また，調査地域ごとの男女児のそれぞれの推測統計的平均値について，性別および地域別に比較検討を行なったが，いずれの組合せにおいても有意差は認められなかった．なお，幼稚園児の早朝一時尿中馬尿酸濃度の推測統計的棄却限界上限値（男児：0.781 mg/ml および女児：0.780 mg/ml）よりも高濃度であるために，平均濃度を算出する対象から除外された検査値は，男児2/80例および女児6/82例であった．

2. 成人の早朝一時尿中馬尿酸の推測統計的平均値を性別に検討したところ，男性の平均値 0.421±0.229 mg/ml (n=94) と女性の平均値 0.418±0.178 mg/ml (n=65) との間に有意差は認められなかった．また，調査地域ごとの男女性のそれぞれの推測統計的平均値につい

て，性別および地域別に検討を行なってみたが，いずれの組合せにおいても有意差は認められなかった．なお，成人の早朝一時尿中馬尿酸濃度の推測統計的棄却限界上限値（男性：1.031 mg/ml および女性：0.897 mg/ml）よりも高濃度であるために，平均濃度を算出する対象から除外された検査値は，男性 3/97 例および女性 6/71 例であった．

3. 幼稚園児および成人の早朝一時尿中馬尿酸濃度の推測統計的平均値について比較検討を行なってみたが，いずれの組合せにおいても有意差は認められなかった．

4. 幼稚園児および成人の早朝一時尿中ウロビリノーゲンの推測統計的平均値について比較検討を行なってみたが，幼稚園児層と成人層および性別ならびに調査地域別のいかなる組合せにおいてもその有意差は認められなかった．

5. 幼稚園児の早朝一時尿中の馬尿酸濃度とウロビリノーゲン濃度との相関性について検討したところ，男女児全体の相関係数 $r=0.4341$ は，危険率 0.1% 以下の水準で有意であった．なお，幼稚園児の早朝一時尿中の馬尿酸とウロビリノーゲンの両方の推測統計的棄却限界上限値よりも共通して高濃度であった検査値は，女児のみに 2 例が認められた．

6. 成人の早朝一時尿中の馬尿酸濃度とウロビリノーゲン濃度との相関性について検討したところ，男女性全体の相関係数 $r=0.5762$ は，危険率 0.1% 以下の水準で有意であった．なお，成人の早朝一時尿中の馬尿酸とウロビリノーゲンの両方の推測統計的棄却限界上限値よりも共通して高濃度であった検査値は，女性のみに 2 例が認められた．

文　献

1) 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
2) 池田正之：労働の科学，25，14，1970
3) El Masry, A. M., Smith, J. N., and Williams, R. T.: *Biochemical J.*, 64, 50, 1956
4) Ikeda, M., and Ohtsuji, H.: *Brit. J. industr. Med.*, 26, 162, 1969
5) Ikeda, M., and Ohtsuji, H.: *Brit. J. industr. Med.*, 26, 244, 1969
6) Ogata, M., Tomokuni, K., and Takatsuka, Y.: *Brit. J. industr. Med.*, 27, 43, 1970
7) 野見山一生，小松富三男：産業医学，12，6，1970
8) Ohtsuji, H., and Ikeda, M.: *Brit. J. industr. Med.*, 27, 150, 1970
9) Ohtsuji, H. and Ikeda, M.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 18, 321, 1971
10) 友国勝麿，緒方正名：産業医学，14，24，1972
11) 佐藤章夫，藤原幸子：産業医学，14，32，1972
12) 堀口俊一，寺本敬子，清田郁子，円藤吟史：産業医学，16，228，1974
13) Sollenberg, J., and Baldesten, A.: *Journal of Chromatography*, 132, 467, 1977
14) Kira, S.: *Brit. J. industr. Med.*, 34, 305, 1977
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) Ogata, M., Tomokuni, K., and Takatsuka, Y.: *Brit. J. industr. Med.*, 26, 330, 1969
18) Umberger, C. J., and Fiorese, F. F.: *Clin. Chem.*, 9, 91, 1963
19) 陳　敏馨：臨床検査，6，497，1962
20) Schwartz, S., Sborov, V., and Watson, C. J.: *Am. J. Clin. Path.*, 14, 598, 1944
21) 佐藤徳郎：医学と生物学，11，229，1947
22) 武士俣邦雄，霜田さと子：東京衛研年報，30—1，79，1979
23) 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
24) 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
25) 友国勝麿：産業医学，14，103，1972

報　　文 Ⅱ

医薬品等の安全性に関する調査研究

REPORTS II

PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 71-76, 1980

医薬品製剤中の *dl*-塩酸メチルエフェドリンの定量法

中山京子*, 高橋美佐子*, 下平彰男*

Determination of *dl*-Methylephedrine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations

KYOKO NAKAYAMA*, MISAKO TAKAHASHI* and AKIO SHIMOHIRA*

Keywords: *dl*-塩酸メチルエフェドリン *dl*-methylephedrine hydrochloride, 医薬品製剤 pharmaceutical preparations, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 高速液体クロマトグラフィー highperformance liquid chromatography, 比色定量法 colorimetric determination

はじめに

一般医薬品の鎮咳剤，かぜ薬の大部分に *dl*-塩酸メチルエフェドリン（以下MEと略す）が配合されている．これはMEが，塩酸エフェドリンと類似の薬理作用を示し，副作用は臨床的に応用したとき，塩酸エフェドリンにみられる心悸亢進，不眠，興奮，頭痛の起ることも少なく，また脈拍，血圧および瞳孔にもほとんど影響しないことも認められているためである．総合感冒剤は多種多様であり，成分も数種以上の混合製剤が多い．その中でMEは，他成分に比べて配合量も少ないので定量に試料を多く必要とする．そのためMEの抽出操作はきわめて繁雑で製剤の多くはイオン交換樹脂クロマトグラフ法により分離したり，アルカリ性で水蒸気蒸留を行ったりして長時間を要する．そこで著者らは抽出操作も簡便なガスクロマトグラフィー（GC）による定量法を確立したので，医薬品製剤について従来の試験法の中で比較的選択性のある方法として多く用いられている 2，4 ジニトロフェニルヒドラジン法（以下 DNP 法と略す）と比較検討した結果，良好の成績が得られたので報告する．また高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による方法も検討したので，あわせて報告する．

実験の部

Ⅰ．**使用機器**　GC：日立163型ガスクロマトグラフ，積算機：島津クロマトパック C-R1A，UV モニター：島津ポジュロム分光光度計スペクトロニック70UV，HPLC：日立635型（可変波長）

Ⅱ．**標準品**　日局九MEを105°で3時間乾燥して用いた．

Ⅲ．**試料**　医薬品製剤は行政検体として薬務より送付されたMEを含む総合感冒剤，鎮咳剤を用いた．その剤型が錠剤，カプセル剤(内容物のみ)，分包剤（内容物のみ）の場合，それぞれ10ケ以上をとりその平均重量を算出し，乳鉢中でよく研和して均質な粉末とし，これを試料とした．注射剤，シロップ剤はそのまま，あるいは水で希釈して試料とした．

Ⅳ．**試薬，試液**　特に本文に記載のないものは，日局九により調製したものおよび和光純薬試薬特級を用いた．

Ⅴ．**試験方法**

1．**GC による定量法（カラム A）**[1]

1）**内部標準溶液の調製**　ジフェニルを酢酸エチルに溶かして 2 mg/m*l* の溶液とした．

2）**標準溶液の調製**　ME標準品約100mgを精密に量り水を加えて溶かし正確に100m*l*とした．この液10m*l*を正確に分液ロートにとり水 10m*l* を加える．さらに水酸化ナトリウム試液1.0m*l* を加え pH11～12 に調整した後エーテル 20m*l* ずつ3回抽出し，抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウムで脱水，これに酢酸1滴を加えて蒸発乾固する．残留物に内部標準溶液 2 m*l* を正確に加え振り混ぜて溶かし標準溶液とした．

3）**試料溶液の調製**　ME約 20mg に対応する試料をメスフラスコに精密に量り水を加えて振り混ぜた後，水で正確に 50m*l* とした．この液をろ過し，初めのろ液 10 m*l* を捨て，あとのろ液 20m*l* を正確に分液ロートにとる．これに水酸化ナトリウム試液1.0m*l* を加え…以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とした．

4）**測定**　標準溶液および試料溶液それぞれ 1 μ*l* をとり，日局九[2] 一般試験法第4項「ガスクロマトグラフ法」の内部標準法およびピーク面積法に従い次の条件により測定した．カラム：ガラス製，内径 3 mm，長さ 2.0 m，シラン処理したクロモソルブG（80～100メッシュ）に 2％PEG20M＋5％KOH をコーティングしたもの，検出器：水素炎イオン化検出器，温度：カラム分離管 180°，注入口230°，N_2：40m*l*/min.

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

2. GC による定量法（カラム B）

1) 内部標準溶液の調製　ベンゾフェノンを乳鉢で砕き50mgを量り無水エタノールを加えて溶かし100mlとした．

2) 標準溶液の調製　ME標準品約50mgを精密に量り水を加えて溶かし正確に100mlとした．この液5mlを正確に共栓遠心沈殿管に入れ水5ml，水酸化ナトリウム溶液（1→10）5mlを加え振り混ぜた後，酢酸エチル25mlを正確に加え10分間激しく振り混ぜた後，2分間遠沈し，上澄液15mlを正確にナス型フラスコにとり，ロータリエバポレーターを用いて溶媒を留去する．残留物に内部標準溶液5mlを正確に加えて溶かし標準溶液とした．

3) 試料溶液の調製　ME約2.5mgに対応する試料を精密に量り共栓遠心沈殿管に入れ水5ml，水酸化ナトリウム溶液（1→10）5mlを加え…以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とした．

4) 測定　標準溶液および試料溶液をそれぞれ2μlとり日局九一般試験法第4項「ガスクロマトグラフ法」の内部標準法およびピーク面積法に従い次の条件により測定した．カラム：ガラス製，内径3mm，長さ1.0m，ガスクロムQ（80～100メッシュ）に5％シリコンSF－96＋0.2％ベルサマイド900をコーティングしたもの，検出器：水素炎イオン検出器，温度：カラム分離管150°，注入口210°，N_2：40ml/min.

3. DNP 法（比色定量法）[3]

1) 試薬，試液　2,4ジニトロフェニルヒドラジンのベンゼン溶液（1→5000）：2,4ジニトロフェニルヒドラジン0.02gをとり，トリクロル酢酸ベンゼン溶液（1→20）に溶かして100mlとし，ろ過した(用時調製)．

2) 標準溶液の調製　ME標準品約70mgを精密に量り水を加えて溶かし，水で正確に100mlとした．この10mlを正確にとり，0.1N塩酸を加えて正確に50mlとし，これを標準溶液とした．

3) 試料溶液の調製　ME約7mgに対応する試料を精密に量り水15mlおよび四塩化炭素30mlを加えて振り混ぜ水層を分取し，さらに同様の操作を2回行い全水層を合わせ，水層にアンモニア試液5mlを加え，クロロホルム30mlで3回，15mlで1回抽出した．全クロロホルム抽出液を合わせ，水15mlで洗いさらに0.1N塩酸25mlおよび10mlで2回抽出した。全水層を合わせ，0.1N塩酸を加えて正確に50mlとし，これを試料溶液とした．

4) 吸光度測定　標準溶液および試料溶液のそれぞれ2mlを正確にとり，炭酸ナトリウム溶液（1→10）1mlおよびフェリシアン化カリウム溶液(3→100)2mlを加え30°で20分間放置する．急冷後n-ヘキサン10mlを正確に加えて抽出し，ヘキサン層の2mlを正確にとり，2,4ジニトロフェニルヒドラジンのベンゼン溶液（1→5000）2mlを加え，30°で20分間放置する．これにメタノール10mlおよび水酸化カリウムのメタノール溶液（1→10）を加えて正確に25mlとし混和して10分間放置後，461nmにおける吸光度を測定した．n-ヘキサン2mlをとり同様に操作した液を対照とする．

MEの量（mg）

$$\text{ME標準品の量（mg）} \times \frac{\text{ME試料溶液の吸光度}}{\text{ME標準溶液の吸光度}} \times \frac{1}{10}$$

4. HPLC による定量法

1) 標準溶液の調製　ME標準品約10mgを精密に量りケルダールフラスコに入れ水20mlおよび水酸化ナトリウム試液10mlを加え日局の窒素定量装置を用い，受器にあらかじめ水10mlを入れ留速1分間で10ml水蒸気蒸留を行った．留液約140mlとなったとき蒸留をやめ，水を加えて正確に200mlとし標準溶液とした．

2) 試料溶液の調製　ME約10mgに対応する試料を精密に量りケルダールフラスコに入れ…以下標準溶液と同様に操作し試料溶液とした．

3) 測定　標準溶液および試料溶液それぞれ3μlをとり次の条件で測定した．(ピーク高さ法)検出器はHPLC本体に組み込まれてあるUV検出器を用いる．カラム：ステンレス製，長さ50cm，内径2.6mm，日立ゲル3011，

移動相：メタノール：水(975：25)にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン300mgを溶かした液，検出波長：226nm，流速：0.4ml/min.，カラム温度：室温，AUFS：0.16，カラム入口圧：100kg/cm²，チャートスピード：10mm/min.

実験結果および考察

I. GC法（カラムA）の結果に対する検討

1. カラム温度について　試料注入口の温度は230°に固定しカラム温度を140°から190°まで変化させME標準溶液と内部標準物質との保持時間を検討し結果をFig. 1に示した．ここでみられるようにカラム温度とそれぞれの保持時間との間に直線関係が認められ，温度を高くすると内部標準物質とのピークの分離が悪くなり，温度を低くすると保持時間が長くなり分析に時間がかかった．そこで短時間でかつ良好な分離が得られる温度条件について検討したところカラム温度180°において満足な結果が得られた．

2. ME以外の医薬品製剤中の成分の影響について　製剤中に含まれるME以外の成分としてアミノピリン，アンチピリン，ブセチン，アセトアミノフェン，フェナセチンの標準品についてMEと同様に抽出，測定したが

何らのピークも示さなかった．さらに市販の製剤について試験した結果も同じであった．この結果，製剤中のMEのみを目的とした定性，定量試験にはGC法（カラムA）は有用だと思われる．比較のために同一条件で抽出した試料につき充てん剤をSE30にした場合と両方のガスクロマトグラムをFig. 2に示す．SE30の場合はいくつかの他成分のピークが現われた．

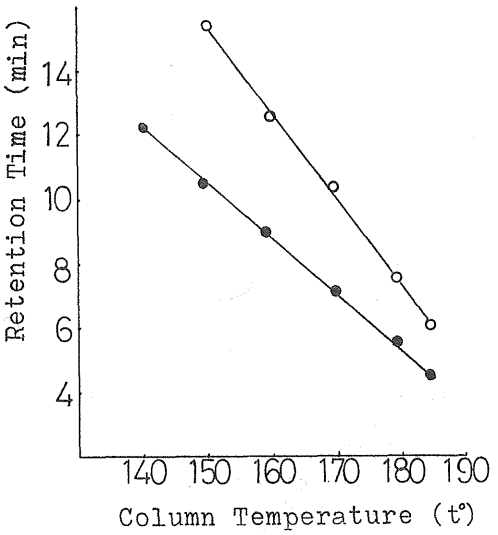


Fig. 1. Relation between Column Temperature and Retention Time
○——○ ME
●——● Diphenyl (I. S.)

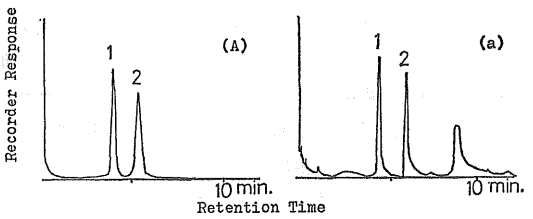


Fig. 2. Gaschromatogram of ME in Pharmaceutical Preparation
Peak 1 : Diphenyl, 2 : ME
Column(A) : 2%PEG+5% KOH Chromosorb G (AM-DMCS)
(a) : 1%SE30-Gaschrom Z

3. 検量線および再現性 ME標準品5, 10, 15mg/mlの濃度の標準溶液系列を作り前記測定操作法に従って操作を行い内部標準物質とのピーク面積比を求めて検量線を作製するとき，原点を通る直線性を示した (Fig. 3)．Table 1 は短時間内における同一試料の5回の定量値と標準偏差を示した．これらの結果から再現精度は良好と思われる．

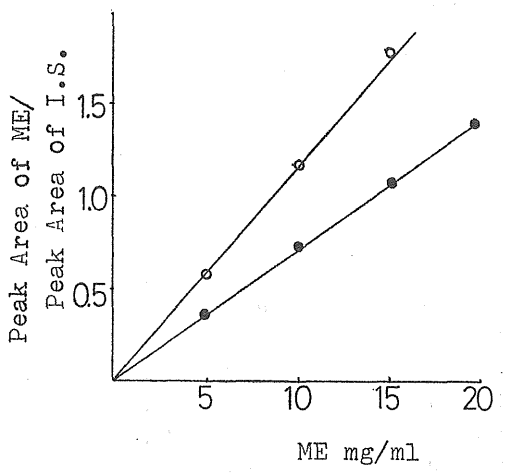


Fig. 3. Calibration Curve of ME
○——○ GC (Column A)
●——● GC (Column B)

Table 1. Determination of ME in Pharmaceutical Preparations

Run	Sample		
	1	2	3
No. 1	100.7	98.6	99.4
No. 2	99.7	99.0	100.3
No. 3	99.3	97.5	100.8
No. 4	100.3	98.4	100.2
No. 5	100.5	98.6	100.7
Means	100.1	98.4	100.3
Standard Deviation	0.52	0.50	0.50

4. 製剤中のMEの定量 MEを含有する市販製剤は錠剤，顆粒剤，散剤，注射剤，シロップ剤等がありいずれも混合製剤である．今回はこれらの5種の剤型についてGC法（カラムA）に従いME量を測定した．各試料の表示量に対するMEの含有率（%）は次式により求めた．定量結果はTable 2に示す．

製剤中のMEの表示量に対する含有率（%）

$$\text{ME標準品量 (mg)} \times \frac{\text{試料溶液MEのピーク面積}}{\text{試料溶液ISのピーク面積}} \times \frac{1}{K} \times \frac{\text{1錠(包)の平均重量(g)}}{\text{1錠(包)中のMEの表示量(mg)} \times \text{試料秤取量(g)}} \times \frac{100}{4}$$

ただし $K=\frac{\text{標準溶液MEのピーク面積}}{\text{標準溶液ISのピーク面積}}$

IS……内部標準物質

Table 2. Comparison of Three Methods for Determining ME in Pharmaceutical Preparations

Sample	Recovery (%)		
	Method A	B	C
1 Sugar Coated Tablet	96.3	82.4	95.9
2 〃	100.5	93.5	103.9
3 〃	97.5	95.3	—
4 Tablet	95.2	93.7	99.3
5 〃	102.9	88.8	94.6
6 Capsule	101.6	99.4	—
7 Powder	99.4	93.6	—
8 Syrup	98.8	97.8	—

Method A: GC (Column A)
B: DNP
C: DNP (Extraction Method by Steam Distillation)

5. GC法（カラムA）とDNP法との比較検討 GC法（カラムA）と同時に同一試料をDNP法により定量を行った結果をTable 2に示す．この結果DNP法の方が若干低い値を示した．GC法（カラムA）は最終試料溶液が全量2m*l*と少量で揮発性溶液のため，やや高い値を示す傾向があると思われるが，DNP法と同様，製剤中のME含有量規格定量試験として十分信頼できる精度があると考えられる．

Ⅱ．GC法（カラムB）の結果に対する検討

1. 検量線 ME標準品1，5，10，15，20mg/m*l*の濃度の標準溶液系列を作り，前記測定操作法に従って操作を行い，内部標準物質とのピーク面積比を求めて検量線を作製するとき，原点を通る直線性を示した（Fig. 3）．

2. 製剤中のMEの定量結果に対する検討 製剤中のMEの定量結果は，GC法（カラムA）と同様に良好な結果が得られた．またこのカラムBの充てん剤は一緒に配合されている他の成分のピークも現われるので同時定量が可能である．しかし，成分により配合量の差が大きく，同時定量には試料の調製が難かしい．またGC分析のそれぞれの成分の最適温度が同一でないため，昇温分析の必要があると思われるので，1個の試料に長時間を要する場合がある．一斉収去などで大量を試験する場合には適当な方法ではないと考えられる．Fig. 4は市販の総合感冒剤を分析したガスクロマトグラムの1例である（カラム温度を150°～210°まで3°/min．で昇温分析したもの）．

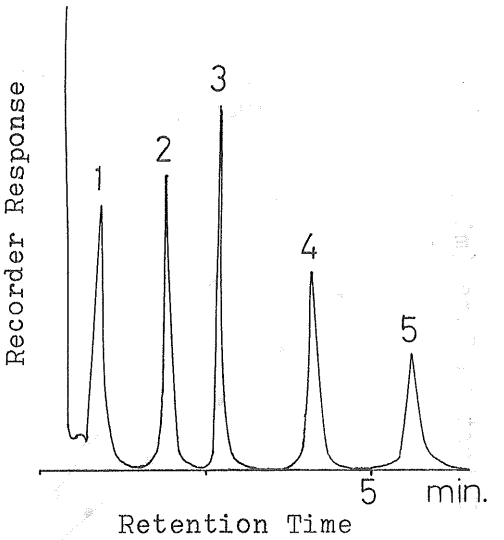


Fig. 4. Gaschromatogram of Pharmaceutical Preparation
Peak 1 : ME
2 : Benzophenone (I. S.)
3 : Glycerylguaiacolether
4 : Coffeine Anhydrate
5 : Dextromethorphan Hydrobromide

Ⅲ．DNP法についての検討 DNP法は選択性のある反応だが，混合製剤の場合はやはりいくつかの前処理をした後定量する．始めにアミノピリン，イソプロピルアンチピリン，ノスカピンが共存する場合，四塩化炭素で抽出除去し，次にアンモニアアルカリ性でMEおよび他の塩基性物質（塩酸ジフエンヒドラミン等）をクロロホルム抽出する．抽出したMEに塩酸を加えて塩酸塩として抽出した．このME抽出液をアルカリ性としてフェリシアン化カリウムで酸化するとベンズアルデヒド，アセトアルデヒドおよびジメチルアミンとなる．30°で20分間放置する発色条件ではベンズアルデヒドのみが呈色試薬（DNP）と反応し，ヒドラゾンを生成する．ただし酸化剤共存ではヒドラゾン生成を阻害すると考えられるので生成したベンズアルデヒドを*n*-ヘキサンで抽出した後，DNPと反応させる[4]．さらに水酸化カリウム・メタノール溶液を加えてキノイド化させ赤色の呈色液を波長461nmで吸光度を測定し定量した．この呈色過程をChart 1に示した．試験を行うにあたって注意を要する点はトリクロル酢酸を含むDNPベンゼン溶液が不安定なため用時調製し，ただちに使用することである．ま

た溶媒類は無アルデヒドのものを用いた．DNP 溶液自身も測定波長域に若干の吸収があるので必ず試薬ブランクを対照にして吸光度を測定した．

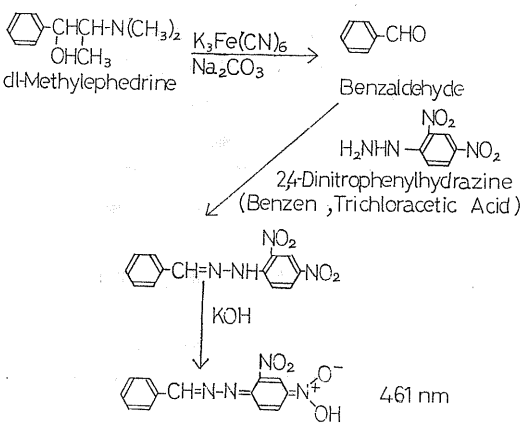


Chart 1.

Ⅳ．HPLC 法の結果に対する検討　製剤中のME定量分析を行うとき剤型により次のように前処理をした．

液剤：直接カラムに注入するかあるいは希釈，濃縮をして試料液を調製した．素錠，顆粒剤：乳鉢で粉末とし，水あるいは有機溶媒で抽出した．糖衣錠剤：糖衣の部分に被覆剤として白糖，アラビアゴム末等の多くの成分が，また着色剤としてタール色素等が使われている．これらはMEの抽出，分析に影響を与え，充てん剤の寿命を短くすると考えられるので，あらかじめ水で洗い落とした後，素錠と同様に操作した．製剤中には賦形剤のデンプン，崩壊剤としてカルボキシメチルセルロースカルシウム，湿潤剤のラウリル硫酸ナトリウム等の影響で抽出が不完全なことがあるので次の6種類の抽出方法により市販製剤を検体として検討を行った．

1.　**水蒸気蒸留法**　HPLC 法の定量操作法に従って試験した．顆粒剤，カプセル剤，注射剤，一部の糖衣錠についてはピークの分離も良く良好な結果が得られた．問題点としては蒸留に時間がかかることと留液が多量で，しかもMEの製剤中の配合量が比較的少量のため大量の検体が必要であった(特に小児用製剤)．

2.　**エーテル抽出法**　GC法（カラムA）の定量操作法に従って試験した．同時に抽出された他成分のピークがいくつか現われ重なるので分離定量は困難と思われる．今後充てん剤や測定条件等を変えて他成分と同時に定量できるように検討したい．

3.　**イオン交換樹脂法**　ME約12.5mgに対応する試料を精密に量り水40m*l*を加え15分間激しく振り混ぜたのち，さらに水を加えて正確に50m*l*とした．この液を遠心分離した後上澄液20m*l*を正確に量り，調製した弱酸性イオン交換樹脂CG50をつめたカラムに流速1分間2～3 m*l*で通し水100m*l*を流したのち，0.1N塩酸90m*l*で溶出する．

この液に水を加え正確に100m*l*とし，この5 m*l*を正確にとり10%フエリシアン化カリウム1 m*l*と10%炭酸ナトリウム1m*l*を加えてベンズアルデヒドとしたもの5μ*l*をHPLCに注入した．分離の初期約4分間に10%フエリシアン化カリウムと10%炭酸ナトリウムのピークが現われたが，これは，標準溶液ではほとんど支障がなかった．顆粒剤，粉末剤の一部の製剤では良好な結果が得られたが他の製剤では妨害となって現われた．

4.　***n*-ヘキサンとクロロホルムによる抽出**　ME約3mgに対応する試料を精密に量り0.1N塩酸試液40m*l*を加えて10分間振り混ぜた後0.1N塩酸試液を加えて正確に50m*l*とし，ろ過した．ろ液20m*l*を正確に量り，アンモニア試液5 m*l*を加えてヘキサン20m*l*ずつで4回抽出し各ヘキサン抽出液は順次，水10m*l*で洗う（洗液はとりかえない）．次に全ヘキサン抽出液を0.1N塩酸試液20m*l*ずつで3回抽出し，各0.1N塩酸試液抽出液を合わせ，アンモニア試液10m*l*を加えてクロロホルム40m*l*ずつで3回抽出し各クロロホルム抽出液を合わせ無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後クロロホルムを水浴上で留去し残留物にメタノール6 m*l*を正確に加えて溶かした．この液5μ*l*をHPLCに注入した．製剤の定量ではほぼ良好な結果が得られたが，操作が繁雑であった．

5.　**クロロホルムによる抽出**　ME約3 mgに対応する試料を精密に量り，0.1N塩酸試液40m*l*を加えて10分間振り混ぜた後0.1N塩酸試液を加えて正確に50m*l*としろ過した．

ろ液20m*l*を正確に量り，アンモニア試液5 m*l*を加えてクロロホルム20m*l*ずつで3回抽出した試料溶液についてHPLCを行った結果，抽出された成分のピークがブロードになり分離が悪く，この抽出方法による試験は満足のいく結果が得られなかった．

6.　**水蒸気蒸留した後エーテル抽出**　水蒸気蒸留法で抽出した溶液の適量をとりGC法（カラムA）の定量操作法に従いエーテルで抽出した．この方法ではほとんどの製剤について定量可能で良好な結果が得られた．試料溶液の濃度も調節できるのでMEの配合量の多少に関係なく満足な結果が得られた．しかし操作に長時間を要する．

以上の結果，抽出方法の1．3．4．6の定量分析結果は良好であったが，シロップ剤，糖衣錠等の一部の製剤

については再現性その他において信頼度が低いものがあった．HPLC を使用した製剤中のME定量試験には水蒸気蒸留法による抽出が再現性も良く適していると思われる．

ま と め

医薬品製剤中のMEの定量法として従来 DNP 法の他に同じ比色法としてブロムクレゾールグリーン法[5]も医薬品製造指針に収載されている．この方法は水蒸気蒸留でMEを抽出後，妨害成分を弱酸性イオン交換カラムで除去し，呈色結合体を生成させて吸光度を測定する方法である．溶液の pH による影響が大きいので緩衝液で正確に調整して試験を行う必要があった．DNP 法とブロムクレゾールグリーン法の2法とGC法（カラムA）とを比較検討した結果，比色法は分離定量に多くの時間を要したが，GC法（カラムA）はアルカリ性でMEをエーテル抽出し，エーテル留去後ジフェニルを内部標準物質とする溶液で溶解しGCに注入，分析するという方法で短時間で定量が可能であった．精度も Table 1 に示したとおり良好な結果が得られた．現在，著者らはMEの定量を目的とした一斉試験はGC法（カラムA）も合わせて採用している．今後はさらに製剤中の数種の成分を同時に定量する目的でGC法（カラムB）を，また，抽出，検出方法に重点をおいて HPLC 法が広く適用できるように研究を行いたいと考えている．

文 献

1) 丹羽瀬 鑒：衛生化学，22，181，1976
2) 日本公定書協会：第九改正日本薬局方解説書，第1版，1976，広川書店
3) 日本公定書協会：医薬品製造指針，第1版，494，1975，薬業時報社
4) 井上哲男，立沢政義：医薬品研究，3(1)，87，1972
5) 日本公定書協会：医薬品製造指針，追補，159，1971 薬業時報社

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 77-81, 1980

有害物質を含有する家庭用品の試験法に関する研究（第5報）
繊維製品中の有機塩素系防虫加工剤の定量法（II）

萩原輝彦*, 寺島　潔*, 吉原武俊*, 下平彰男*

Studies on Examination Method of Household-Necessities Containing Poisonous Chemical Substances (V)
Determination of Organochlorine Mothproofing Agents from Wool Fabrics (II)

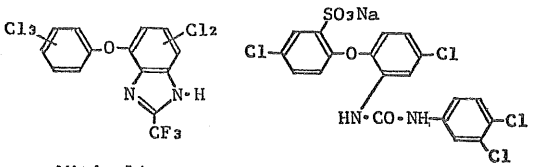
TERUHIKO HAGIWARA*, KIYOSHI TERASHIMA*, TAKETOSHI YOSHIHARA* and AKIO SHIMOHIRA*

A simple and simultaneous high performance liquid chromatographic assay was developed for Mitin FF and Mitin LA in wool fabrics, which are used as the mothproofing agent. The wool fabrics were dissolved in 10% sodium hydroxide solution, and Mitin FF in the solution under reflux was hydrolyzed to give 3, 4-dichloraniline (3, 4-DCA), but Mitin LA was stable with the alkaline hydrolysis. Then, Mitin LA and 3, 4-DCA in the solution were extracted with ether and dissolved in methanol after evaporation of ether. Conditions of HPLC were as follows : column ; LiChrospher SI 100, 5 μm (MERCK), 4 mm i. d. ×250 mm, mobile phase: hexane:methanol (500 : 3), flow rate:2.0 m*l*/min., detection: 240 nm. Upon examination of 50 specimens collected from wool products available commercially, Mitin FF was detected in 3 samples ranged from 1170 to 4740 μg/g and Mitin LA was not detected at all in accordance with this method. The limit of determination was 30 μg/g for Mitin LA and 50 μg/g for Mitin FF.

Keywords: Mitin FF, Mitin LA, wool fabrics, mothproofing agent, high performance liquid chromatography

緒　言

羊毛防虫加工剤として繁用されていたディルドリンは，昭和52年厚生省令第40号によって繊維製品への使用が禁止されたが，現在，有機塩素系化合物であるミチンFF，ミチンLAおよびオイランU-33などが主に防虫加工剤として使用されている[1,2]．しかし，これらに関する報告は少なく，分析法および使用実態については，鹿庭ら[3]の電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ（以下ECD-GCと略す）による定量法が，また毒性については，ミチンFFのラットに対する経口毒性がみられるに過ぎない[4]．著者らは高速液体クロマトグラフ（以下HPLCと略す）を用い，防虫加工された羊毛繊維中のミチンFFおよびミチンLA（Chart 1）についてより簡易な同時定量法の開発を目的として，全多孔性球状シリカゲルカラムによる定量法を検討し，若干の市販羊毛製品の調査を行なった．またR. A. Bredewegら[5]のHPLC用カラムの再活性法を応用し，良好な結果を得たので併せて報告する．



Mitin LA (by Ciba Geigy)　　Mitin FF (by Ciba Geigy)

Chart 1. Mothproofing Agent

実験の部

器具および装置　振とう機；イワキ製作所製．微量融点測定器；Mettler製，FP-1型．HPLC；日立製作所製，635型．分光光度計；日立製作所製，EPS-3T型．GC；島津製作所製，4 CM-PFE型（^{63}Ni-検出器付き）．GC-MS；島津製作所製，LKB-9, 000型．

試薬　溶媒および無水硫酸ナトリウム；残留農薬試験用．1-メチル-3-P-トリルトリアゼン（以下Methyl-Tと略す）；東京化成特殊用途用．2, 2-ジメトキシプロパン（以下DMPと略す）；東京化成規格特級．3, 4-ジクロ

* 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

ルアニリン（以下3,4-DCA と略す）；試薬特級をヘキサンから再結晶したもの，無色針状晶，mp. 71.5° なお，移動層用溶媒およびその他の試薬はことわりのない限り試薬特級を用いた．

羊毛防虫加工剤 ミチンＬＡ・コンクおよびミチンＦＦ・ハイコンク；CIBA-GEIGY 製．

標準物質 ディルドリン；残留農薬試験用．ミチンＬＡ，ミチンＦＦおよびオイランU-33；鹿庭ら[3]の方法で精製した．融点および性状は次のとおりであった．ミチンLA；mp. 155-156° 無色粒状晶．ミチンFF；mp. 230-231°，無色針状晶．オイランU-33；かっ色油性．

実験加工布 ニット（毛，100%，関東染工製，未加工品）約30gを3lのビーカーに入れ，羊毛防虫加工剤の希釈水溶液を加え，浴比を整え，ビーカー上部を磁製皿で覆い，徐々に昇温して沸とうさせ，さらに2時間加熱を継続した．加熱終了後，放冷しビーカーから取り出し，水洗ののち3日間風乾し，36%硫酸デシケータ中に保存した．なお羊毛防虫加工剤の加工条件は，メーカーが，ミチンＬＡおよびミチンＦＦのパンフレットで指定する条件に準拠し，それぞれ実験加工布を作製した．

市販製品 昭和53～54年度行政検体（ディルドリン定量試験用）から，ウール使用の表示のある製品を試料とした．

操作法（試料溶液の調製） 細切した試料約 1.0g を精秤して50ml ナス型フラスコに入れ10%水酸化ナトリウム溶液20mlを加え3時間放置して溶解させ，還流冷却器を付け直火で2時間加熱する．加熱後，還流冷却器を少量の水で洗い加熱液にあわせる．冷後 200ml 分液漏斗に加熱液をエーテル 40ml で洗い込み，振とう機で5分間振とうし，静置後，エーテル層を分取する．さらにエーテル 40ml ずつ3回同様の操作を行ないエーテル層をあわせ，無水硫酸ナトリウムで乾燥する．エーテルを留去し，ここに得た残留物に一定量のメタノールを加えて溶解し試料溶液とした．

標準溶液と検量線の作製 ミチンＬＡ標準物質および3,4-DCA をメタノールに溶解し，それぞれ 0.16～1.6 mg/ml，0.055～1.1mg/ml の標準溶液を調製した．各濃度の標準溶液 1.0μl を HPLC に注入し，ミチン LA は濃度とピーク面積から検量線を作製した (Fig. 1 a)．3,4-DCA は濃度とピーク高から検量線を作製した(Fig. 1 b)．

ミチン LA およびミチン FF の定量 試料溶液 1.0～～3.0μl を HPLC に注入し，ミチン LA は検量線よりそのピーク面積に相当するミチンＬＡ量を求めた．ミチンＦＦについては，検量線よりそのピーク高に相当する

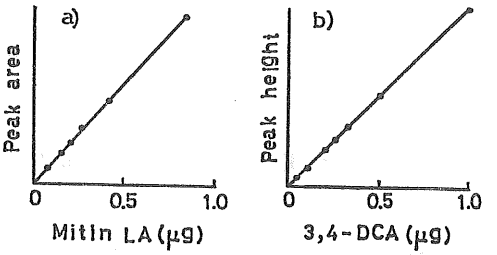


Fig. 1a. Calibration Curve of Mitin LA
Fig. 1b. Calibration Curve of 3,4-DCA

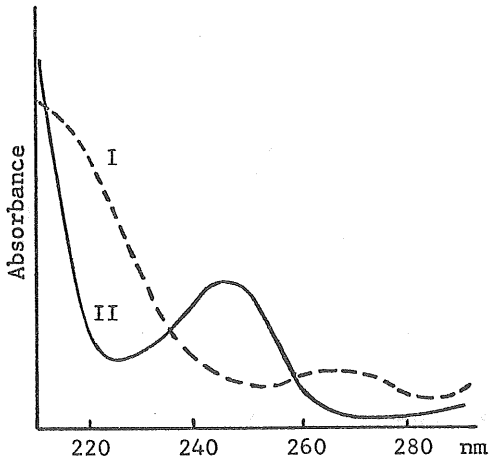


Fig. 2. UV Absorption Spectra of Mitin LA (I) and 3,4-DCA(II) in Mobile Phase

3,4-DCA 量を求めた後，ミチン FF 量に換算した．ミチン FF 量 C_{MFF}(μg/g) の計算式は次のとおりである．

$$C_{MFF}=3.03\times[C_{3,4\text{-DCA}}]\times[m]^{-1}$$

$C_{3,4\text{-DCA}}$; 3,4-DCA 量(μg)，m；試料量(g)．

実験結果および考察

1. **HPLC の測定波長** ミチンLAを操作法に従い処理し，移動層に溶解した溶液および3,4-DCA を移動層に溶解した溶液の紫外部吸収スペクトルを示した (Fig. 2)．なお同時定量を目的としたので，HPLC の測定波長は 240nm を用いた．

2. **共存物質のクロマトグラムへの影響** ディルドリン，オイラン U-33，ミチンＬＡおよびミチンＦＦの標準物質をそれぞれ，1.04mg，1.02mg，0.53mg および 1.01mg を量り，操作法に従い処理し，メタノール 1.0 ml に溶解し，その 1.0μl を HPLC に注入した時のクロマトグラムを示す (Fig. 3a)．また実際の羊毛製品を分析したときのクロマトグラムを示す (Fig. 3b)．3,4-DCA およびミチン LA は他の防虫剤および羊毛繊維中

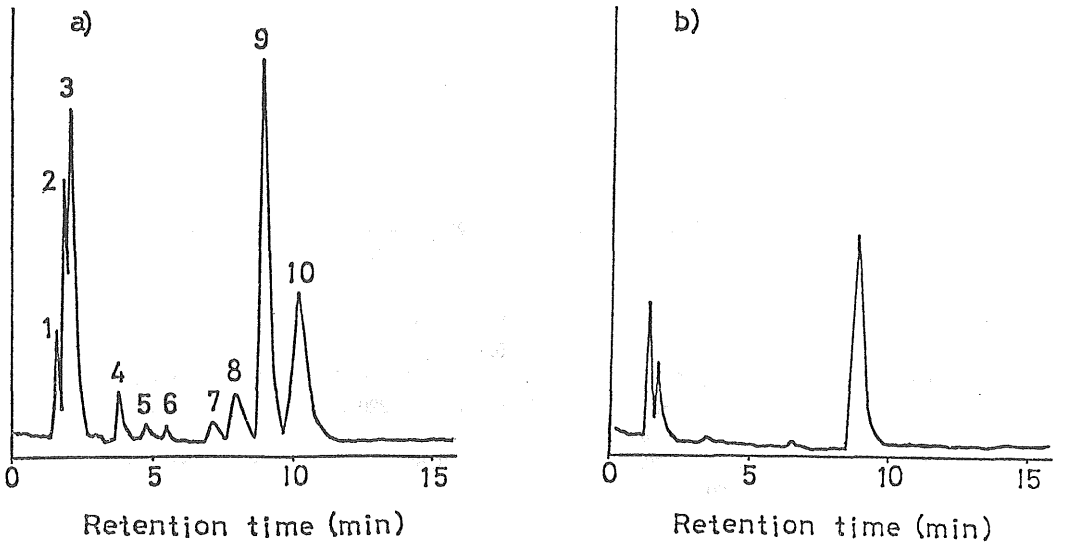


Fig. 3a. HPLC Chromatogram of Mothproofing Agents. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ; Eulan U-33 2 ; Dieldrin 9 ; 3, 4-DCA 10 ; Mitin LA

Fig. 3b. The Example of Chromatogram of the Commercial Sample

condition: column; LiChrospher SI 100 5μm (25cm×4mm I. D.), mobile phase ; hexane–methanol (500 : 3), flow rate; 2. 0ml/min, detection ; 240nm, column temp. ; room temp.

extracted MitinLA
↓
react with 0.5 % Methyl-T ether solution
for 5 min under reflux on a water bath
↓
add 1 ml of 1N HCl
↓
dry ether layer over Na_2SO_4
↓
evaporate
↓
adjust the volume with hexane
↓
inject to GC

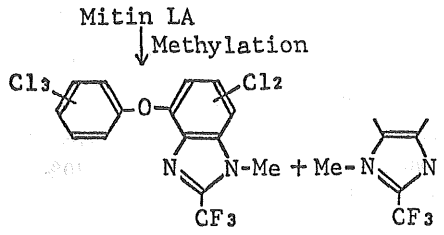


Chart 2. Methylation of Mitin LA

に存在する夾雑物から分離できたが，ディルドリンおよびオイラン U-33は分離が不十分であり，今後検討する予定である．

3. **ミチン LA のアルカリ加水分解による影響** ミチンＬＡを操作法に従いアルカリ加水分解を行ない，エーテル抽出後，Chart 2 に示した条件でメチル化し，GC-MS に注入した．得られた EI-MS スペクトルを示す (Fig. 4). m/z 462, 464, 466, 468, 470 は M^+ とその同位体ピークであり，強度比は塩素５個の存在を示す．そのほかに，m/z 427, 429, 431 (M^+–Cl), m/z 392, 394, 396 (M^+–2Cl) が特徴的であり，これらはミチン LA 標準品のメチル化体の EI-MS スペクトルと一致した．10%水酸化ナトリウム溶液中２時間直火加熱で，ミチンＬＡに変化はみられなかった．

4. **エーテルの抽出回数による回収率** ミチンＬＡの標準物質0. 28mgおよび3, 4-DCA 0. 41mg を操作法に従ってエーテル40mlで1～4回抽出したところ，3, 4-DCA は２回の抽出で，ミチンLA は３回の抽出で約90%以上の回収率を示した．４回の抽出ではともに約95%以上の良好な回収率を示した．

5. **ミチン FF の加水分解** ミチン FF の標準物質0. 96mg を用い，20ml の 10% 水酸化ナトリウム溶液中で，還流冷却器を付けて直火で，60～150分間加熱した．冷後エーテル 40ml で４回抽出し，定量したところ，加

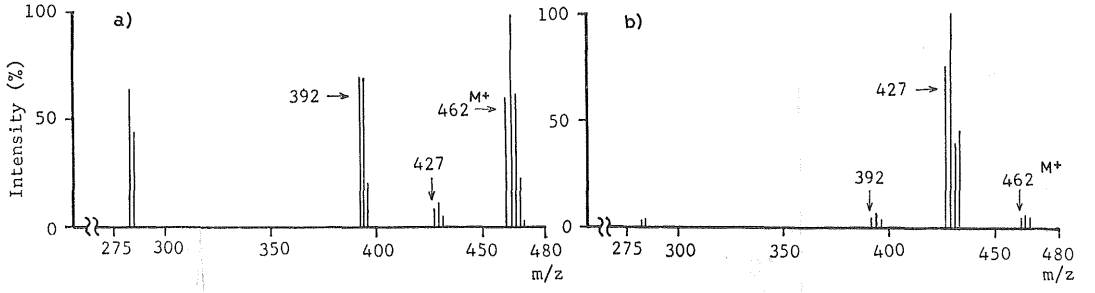


Fig. 4. Mass spectra of N-Methyl Derivatives of Mitin LA
(a): peak 1, t_R ; 4.9min (b): peak 2, t_R ; 5.7min
GC condition : column ; 1% OV-17 on Chromosorb W AW-DMCS 60-80 mesh, 2.0m glass column of 3mm i.d., column temp. ; 220-260° (6°/min), injection temp. 270°, carrier gas (He) 30m*l*/min
MS condition: ioniz. volt. 70ev, accelerat. volt. 3.5kv, ioniz. chamber temp. 310°, ioniz. curr. 60μA

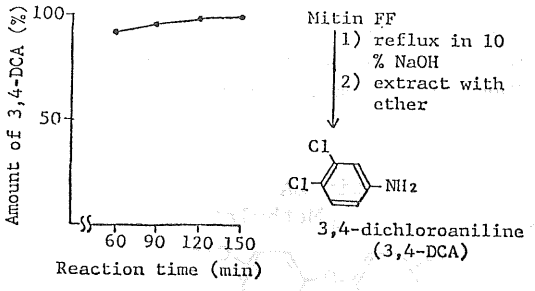


Fig. 5. Effect of Reaction Time on Hydrolysis of 0.96mg Mitin FF with 20m*l* of 10% NaOH under Reflux

熱60分間で約95%のミチンFFが加水分解された (Fig. 5).

6. 定量限界 HPLC の検出器 Range 0.08AUFS, 試料注入量3.0μl とするとき, ミチンLAおよびミチンFFの定量限界は, それぞれ30 μg/g, 50 μg/g であった.

7. 実験加工布からの回収率 実験加工布約 1.0g を精秤し, 操作法に従い定量した値と, 理論上の加工量から求めた本定量操作法の回収率を示した (Table 1). なお加工布の理論値は鹿庭ら[3] の方法に準拠して求めた.

8. 市販羊毛製品中の加工量 本定量法を用いて市販羊毛製品50種を分析した結果を示した(Table 2). 羊毛製品3検体からミチンFFが検出されたが, ミチンLAは検出されなかった.

9. シリカゲルカラムの再活性 順層吸着型のシリカゲルカラムでしばしば問題となるのは, 水分含量の変化によって起こるカラム選択性の変化である[6]. 無水溶媒を使用する方法も考えられるが, 溶媒精製, 保存管理は煩雑である. 著者らは HPLC 装置にカラムを接続したままの状態でシリカゲルカラムの再活性を試みた[7-8]水:メタノール (1:1) の溶液を 10μl, HPLC に注入し, 移動層を流速 20m*l*/min で30分間送液したときのクロマトグラム (Fig. 6a) および, つづいて, 再活性用溶媒, ジクロルメタン:氷酢酸:DMP (90:2:2) を流速3.0 m*l*/min で15分間, さらにジクロルメタンを20分間送液したのち, 移動層を流速 2.0m*l*/min で 20分間送液したのちのクロマトグラムを示す (Fig. 6b). 著者らの実験室では本操作を HPLC 使用時に行うことにより, カラムの分離能を2カ月以上一定に保つことが可能であっ

Table 1. Recoveries of the Mothproofing Agents from the Processed Fabrics

	Added(μg/g)	Found(μg/g)	Recovery(%)
Mitin LA	226	205	90.7
Mitin FF	4046	4260	104.9

Table 2. Analytical Data of Mothproofing Agents from Various Wool Fabrics

Sample	Mitin FF (μg/g)	Mitin LA (μg/g)
Hat Men's	1170	—a)
Glove Men's	2410	—
Waistcloth Ladie's	4740	—

a) —; not determined

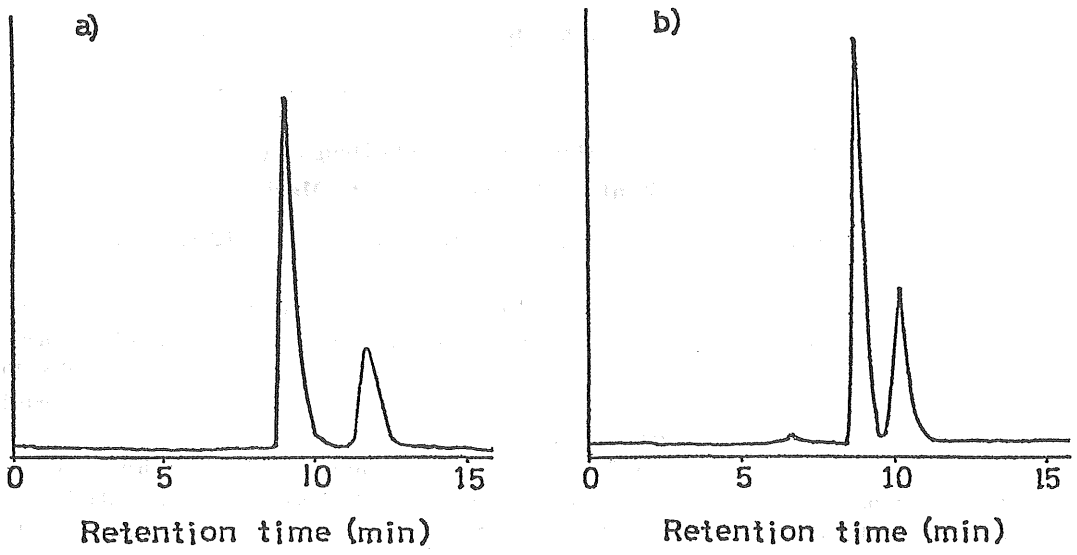


Fig. 6. Chromatogram of Mitin LA and 3, 4-DCA
(a) Deactivated Column (b) Reactivated Column

た.

本定量法の定量限界は，鹿庭ら[3]の ECD-GC を使用した場合に比べ著しく低い．しかし防虫加工剤の通常の加工量はメーカにより指定されており，その繊維重量あたり，ミチンLA；250μg/g，ミチンFF；10,000μg/g とされている．従って防虫加工処理が行なわれた羊毛繊維中のミチンLA およびミチンFF の定量は，本定量法で可能であると考えられる．

ま と め

羊毛繊維中に防虫加工剤として含有するミチンLAおよびミチンFF の定量法について検討し，つぎの結果を得た．

1) ミチンLA は 10% 水酸化ナトリウム溶液中，2時間直火還流によっても加水分解されず，エーテルで定量的に抽出された．

2) HPLC を使用することにより，ミチン LA および 3, 4-DCA は羊毛繊維中の夾雑物から分離され，同時定量を行うことができた．なお，LiChrospher SI 100, 5 μm を充填したカラム (25cm×4mm i. d.) を使用し，移動層には，ヘキサン：メタノール (500：3) を使用した．定量限界は試料1.0g を用いた場合，ミチンLA; 30 μg/g，ミチンFF; 50μg/g であった．

3) HPLC 装置に接続したカラムに，ジクロルメタン：氷酢酸：DMP (90：2：2)の溶媒を流速3.0ml/min で15分間，つづいて，ジクロルメタンを20分間送液することによりカラムが再活性された．

4) 市販羊毛製品50種のうち3検体よりミチンFF が検出され，含有量は1,170～4,740μg/g であった．

謝辞 本研究にあたり防虫加工剤を供与された，日本チバガイギー株式会社，およびバイエルジャパン株式会社，また種々のご助言を下さった国立衛生試験所家庭用品第一室長中村晃忠先生はじめ室員の皆様に深謝いたします．

文 献

1) 厚生省環境衛生局企画課家庭用品安全対策室編：家庭用品規制関係実務便覧，2045の44，1977，第一法規出版，東京
2) 柴田 豊：繊維製品消費科学，17，7，1976
3) 鹿庭正昭，小嶋茂雄，中村晃忠，佐藤洋子：衛生化学，25，2，1979
4) 米国国立職業安全衛生研究所編，化学物質毒性データ総覧，第7版，Vol. II，1979，日本メディカルセンター，東京
5) Bredeweg, R. A., Rothman, L. D., and Pfeiffer, C. D.: *Anal. Chem.*, 51, 2061, 1979
6) Snyder, L. R.: *Principles of Adsorption Chromatography*, 1968, Marcel Dekker. New York
7) Erley, D. S.: *Anal. chem.*, 29, 1564, 1957
8) Critchfield, F. E., and Bishop, E. T.: *Anal. Chem.*, 33, 1034, 1961

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 82-85, 1980

生薬の品質評価に関する研究（第6報） 市場品山椒の品質

安田一郎*, 瀬戸隆子*, 下平彰男*, 田窪栄一*

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (VI) Ouality of Zanthoxyli Fructus on the Market

ICHIRO YASUDA*, TAKAKO SETO*, AKIO SHIMOHIRA* and EIICHI TAKUBO*

Tests on 17 Zanthoxyli Fructus of Japanese Pharmacopoeia available on the market revealed that only 2 samples were in conformity with the requirements of Japanese Pharmacopoeia. Five samples came from Chinese origin whose plants are not prescribed in Japanese Pharmacopoeia, the other 10 samples did not conform to the requirements of the seed content of the purity test and the essential oil content specified in Japanese Pharmacopoeia.

As regards the essential oil content of Zanthoxyli Fructus, the present study found that an average content of 2.9 m*l* of essential oil contained in 30 g of the Zanthoxyli Fructus directly after the harvest time declined to 1.8 m*l* after storage for 3 years at 10–35°, although it is generally said that the essential oil content would decrease to the level below 1.0 m*l*, which is the requirement of Japanese Pharmacopoeia, after 2 to 3 years of storage.

Keywords : evaluation, crude drugs, *Zanthoxyli Fructus*, on the market, Japanese Pharmacopoeia, essential oil, purity test

緒 言

山椒 *Zanthoxyli Fructus* はミカン科 (Rutaceae) サンショウ *Zanthoxylum piperitum* DC. の成熟乾燥果皮で，大建中湯，屠蘇散などに配合し用いるほか，芳香性健胃薬あるいは香辛料として用いる生薬である[1]．

山椒は種子，枝などの混入が少なく，芳香に富み，辛味が強く，新鮮なものが良品として取扱われている．従来，日本薬局方では混入の予想される種子，果柄などの許容量はゆるく規定されていたが，第9改正日本薬局方になりその基準はいくらか厳しくされた[2,3]（表1）．

山椒は主に和歌山，奈良，群馬などの各県で生産されているが，近年青果物として未熟果実の山椒の需要が高まり，相対的に生薬山椒の生産量が減少している．一方，香辛料としての山椒の需要は年々増える傾向にあり，その結果品質の悪い山椒が医薬品に用いられている懸念があり，今回市場品山椒の品質を調査することとした．

実験の部

1. 実験材料

標品 奈良県西吉野村栽培品（アサクラザンショウ *Z. piperitum* DC. f. *inerme* Makino, 1977年8月17日），群馬県赤城山栽培品（サンショウ，1978年9月10日），茨城県筑波山野生品（サンショウ，1977年9月1日），東京都大田区栽培品（サンショウ，1978年8月27日）の果実を採取，それぞれ約10日間日陰にて乾燥させた後調製，本邦産標品とした．

輸入標品としては，韓国産（1977年10月釜山出荷，神戸入荷品），中国産1級品（1977年4月1日横浜入荷品）および中国産2級品（1977年8月30日横浜入荷品）を用いた（表2）．

市場品 試験した市場品山椒は1976年4検体，1977年3検体，1978年3検体および1979年7検体合計17検体である（表3）．これらは薬事監視員が都内販売業より収去したもの，あるいは著者らが独自に購入したもので，いずれも500 g 単位に包装されたものである．

2. 試料の調製および純度試験

市場品約 500g を円錐4分法により平均化した後その約100gを試料とした．1976年の4検体は日局8に従い，1977年以降の13検体は日局9に従い純度試験を行ない，その後種子，果柄，枝およびその他の異物を再び合わせ，小型粉砕器（協立理工 K·K· 製，SK-M2型，1万回転/分，15秒間2回）にて粉末とし，灰分，酸不溶性灰分および精油含量測定のための試料とした．

* 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

表 1. 日局8および9に規定された山椒の基準比較

	日局 8	日局 9
純度試験	異物 本品は種子，果柄，枝およびその他の異物30.0%以上を含まない．	(1) 種子 本品は種子20.0%以上を含まない． (2) 果柄および枝 本品は果柄および枝5.0%以上を含まない． (3) 異物 本品は種子，果柄および枝以外の異物1.0%以上を含まない．
灰分	5.5% 以下	6.0% 以下
酸不溶性灰分	2.5% 以下	1.5% 以下
精油含量	1.0ml 以上 (30.0g中)	1.0ml 以上 (30.0g中)

標品は乾燥後，果皮，種子，果柄および枝に分け，それぞれを小型粉砕器（条件前出と同じ）にて粉末とし，試料とした．また奈良県西吉野村栽培品アサクラザンショウ果皮約3kgは精油含量の経時変化を調べるため，ガラス気密容器中10～35°にて約3年間保存した．

3. 灰分，酸不溶性灰分および精油含量

灰分，酸不溶性灰分および精油含量は日局8または9に従い定量した．なお精油含量は試料を新たに粉末とした後直ちに測定した．

結果および考察

1. 標品について

本邦産山椒 本品は偏球形の果皮で，開裂した径4～6mm，厚さ0.4～0.7mmの2心皮からなり，1果柄に2～3個合着する．外面は黄かっ色～暗赤かっ色で，多数のくぼんだ小点があり，内面は淡黄色である．植物分類学上サンショウは枝に刺のないもの—アサクラザンショウ，短刺が少数あるもの—ヤマアサクラザンショウ *Z. piperitum* DC. f. *brevispinosum* Makino，刺のあるもの—サンショウに分類され[4,5]，アサクラザンショウおよびヤマアサクラザンショウの果皮はサンショウの果皮にくらべ，大型で退色が少なく，良品であるといわれる[2,3]が，本邦産標品およびヤマアサクラザンショウ（1977年7月20日東京都御前山野生品，1978年7月23日福井県下打波野生品など）の果皮を形態的に比較したところ，各々に差異は認めなかった．しかし山椒の収穫・調製の良否によっては，色，つや，形に優劣を認め，また野生品は栽培品にくらべ，一般に果皮は薄く，果実の着数も少ないものであった．

韓国産山椒 韓国産山椒は本邦産山椒にくらべ，果皮および種子につやがなく，芳香，辛味に乏しく，果皮は薄いが，形態的には本邦産山椒とよく一致した．また多量の種子を混入するが，果柄および枝の混入は少なく，枝には5～7mmの刺が存在した．韓国産山椒はサンショウの野生品の果実を収穫し，ほとんど種子を除くことなしに出荷しているものと推定される．

中国産山椒 中国産山椒は中国交易会において少なくとも1級品，2級品と等級をつけられた2種類のものが日本に輸入されている．外面は1級品はやや明るい紫紅色を呈するものが多く，2級品はかっ色～暗紫色を呈するものが多い．両者ともイボ状の小突起が果皮表面に多数あり，径3～5mmの偏球形の開裂果皮である．内面は両者とも淡黄白色で，内果皮が剥離しているものが多い．味は共に辛く，それぞれ本邦産山椒とは異なった特

表 2. 山椒標品の試験成績*

	産地	部位	精油含量 (ml)	灰分 (%)	酸不溶性灰分 (%)
本邦産標品	奈良 (栽培品)	果皮	2.9	5.6	0.4
		種子	0	5.5	0.3
		果柄および枝	—	6.9	0.1
	群馬 (栽培品)	果皮	2.4	5.8	0.2
	茨城 (野生品)	果皮	1.9	6.0	0.7
		種子	0	5.4	0.2
	東京 (栽培品)	果皮	2.8	7.5	0.5
		種子	0	5.5	0.2
輸入標品	韓国産	果皮	1.8	5.4	0.3
	中国産1級	果皮	1.3	7.0	1.1
	中国産2級	果皮	1.7	6.8	0.6

*日局9による

表3. 市場品山椒の試験成績

市場品*			精油含量 (ml)	純度試験 (%)** 果皮	異物	(種子	果柄・枝	その他)
1976年	1	J	0.7	62.5	37.5	(—	—	—)
	2	J	0.5	53.4	46.6	(—	—	—)
	3	J	0.6	57.1	42.9	(—	—	—)
	4	J	0.8	93.1	6.9	(—	—	—)
1977年	1	J	0.5	37.2	62.8	(56.9	4.4	1.5)
	2	J	1.3	49.9	50.1	(41.1	4.6	4.4)
	3	C	1.5	88.5	11.5	(11.2	0.2	0.1)
1978年	1	J	0.8	32.3	67.7	(64.9	2.6	0.2)
	2	J	2.1	76.6	23.4	(18.1	4.4	0.9)
	3	C	0.7	84.3	15.7	(9.0	5.9	0.8)
1979年	1	J	1.1	93.8	6.2	(1.8	4.2	0.2)
	2	J	0.6	45.6	54.4	(49.4	4.4	0.6)
	3	J	1.0	58.9	41.1	(34.8	5.7	0.6)
	4	J	0.9	54.2	45.8	(40.5	3.6	1.7)
	5	C	1.2	95.9	4.1	(3.1	0.9	0.1)
	6	C	1.1	90.8	9.2	(8.8	0.4	0.0)
	7	C	1.9	86.9	13.1	(10.6	1.8	0.7)

* Jは本邦産山椒，Cは中国産山椒
** 1976年は日局8，1977年以降は日局9による

異な芳香を持ち，種子などの異物の混入は本邦産市場品にくらべると明らかに少ないものであった．外部形態的に観察すると両者とも花椒の性状[6]とよく一致する．

灰分，酸不溶性灰分および精油含量 標品の灰分，酸不溶性灰分および精油含量試験を行なうに際し，異物とくに種子の混入の多少によって各々の結果が大きく左右されると予想されたので，異物を除いて行なった．その結果は表2に示したように，本邦産山椒果皮の灰分は5.6～7.5%であり，植物個体によりやや異なっていた．灰分は種子および果柄の混入が多いと高くなるといわれる[2,3]が，今回行なった限りでは，果柄および枝の灰分はやや果皮より高い傾向にあるものの，種子は必ずしも高いものとはいえなかった．本邦産山椒果皮の精油含量は1.9～2.9ml，輸入品山椒果皮の精油含量は1.3～1.8mlで，種子には日局に定める精油は認めなかった．

2. 市場品について

性状を検討したところ17検体中5検体が日局に規定されていない基原植物の果皮であり，うち3検体が中国産1級品，2検体が中国産2級品と思われた．なお17検体中には韓国産と思われる山椒は認めなかった．

純度試験を行なったところ表3に示したように，種子をはじめとする異物の混入が多く，1976年の4検体中3検体，1977年以降の本邦産市場品8検体中6検体が日局8および9の基準を越えるものであった．

また精油含量は本邦産市場品12検体中8検体が日局の基準値1.0ml以下であった．

以上まとめると，1976～1979年の東京市場品17検体中15検体は日局山椒の基準に適合しないものであった．

3. 精油含量の経時変化

山椒の精油は揮散しやすいといわれている[7]ので，含有される精油の経時変化について検討した．成熟果皮を約3年間ガラスの気密容器に入れ，室内に保存して，3ヶ月ごとにその精油含量を測定したところ，図1に示すように収穫直後2.9mlあったものが1年後2.7ml，2年後2.4ml，約3年後1.8mlとゆるやかに減少したが，日局の基準値1.0ml以下には至らなかった．この結果は著者らが1977年3月～同年9月にかけ市場品3検体について，それぞれ紙袋，ビニール袋に分け，保存し検討したところ，いずれも大きく精油含量の減少が認められなかった結果ともよく一致している．

近年，医薬品の薬効再評価，GMP（医薬品の製造および品質管理に関する規範）実施などに関連して，生薬あるいは生薬製剤の品質評価が問題にされはじめてい

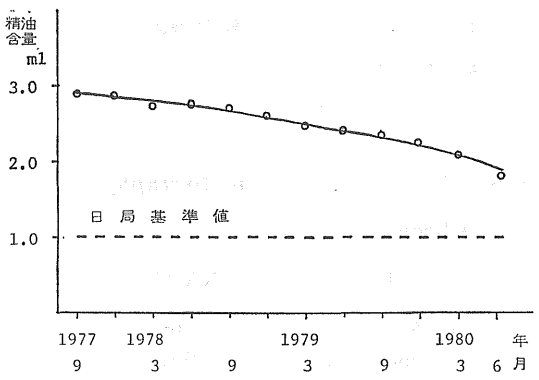


図 1. 山椒中の精油含量の経時変化

る．とくに，52年度厚生科学研究報告は揮発性成分含有生薬の品質を確保する目的から，「揮発性成分含有生薬の保存中の経時変化に関する研究」と題し，適切な流通，保存，生産条件の設定を行なっている．その揮発性成分含有生薬の1つである山椒について，今回の調査により市場品を検討したところ，次の問題があった．

まずサンショウを基原植物としない中国産山椒が山椒として国内市場に流通していた．我国の農業事情あるいは生薬流通事情によって，山椒の供給が充分にその需要を満たすことができなければ，その代用品として中国産山椒など輸入品を考えていかなければならないと思うが，輸入品に山椒の名称を用いる場合には，本邦産山椒と同様の成分薬効があることを証明しておく必要がある．また輸入山椒，とくに中国産山椒はその基原植物が定まらず[6,8]，取扱いに際し混乱をきたしているので，早急に基原植物名を明らかにしなくてはならない．

さらにサンショウを基原植物とする市場品山椒は，そのほとんどが種子などの異物を多量に含んでいた．種子は椒目と称し，利尿作用が強く，各種の浮腫あるいは白内障の治療など，別の用途に用いる[9]ものであり，かつ，多くの油脂を含んでいるので，果皮をよごし，芳香，味を著しく損ねるものであるから，すみやかに分別しておかなければならないものである．

また市場品山椒の精油含量の低いのは経年変化によるものだとする報告[7]もあるが，今回行なった限りでは，それほど顕著な減少は認められず，むしろ日局の基準以下のものは収穫後かなりの年月を経るか，あるいは相当過酷な条件で保存された生薬と思われる．

結　論

市場品山椒の品質を調査したところ，日本薬局方に規定されていない基原植物の中国輸入品が流通していることが判明した．また流通している本邦産市場品はそのほとんどに種子の混入量が高く，精油含量も日本薬局方の基準に合致しないものが多かった．市場品山椒は今後の品質の向上が望まれる生薬の1つである．

謝辞　本研究にあたり市場品山椒の収去にあたられた薬務部薬事監視員の方々，終始御指導いただいた当研究所元理化学部長西川洋一博士，東京薬科大学糸川秀治教授，津村研究所佐々木一郎氏ならびに標品の提供に御尽力下さった方々に深謝いたします．

文　献

1) 東京生薬協会：新常用和漢薬集，53，1973，南江堂，東京
2) 日本公定書協会：第8改正日本薬局方第二部解説書，289，1971，広川書店，東京
3) 日本公定書協会：第9改正日本薬局方解説書，D-365，1976，広川書店，東京
4) 下村　孟：薬学雑誌，63，427，1943
5) 大井次三郎：日本植物誌，顕花篇，826，1975，至文堂，東京
6) 南京葯学院：葯材学，858，1961，人民衛生出版社，北京
7) 尾隠山彰，北野　潔：昭和52年度厚生科学研究報告，15，1978
8) 中国科学院北京植物研究所：中国高等植物図鑑，第二冊，539，1972，科学出版社，北京
9) 木島正夫，沢田徳之助，奏　清之：生薬学，123，1978，朝倉書店，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 86-90, 1980

ガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中のN-ニトロソジエタノールアミンの分析

竹内正博*, 水石和子*, 原田裕文*

Analysis of N-Nitrosodiethanolamine in Cosmetics by Gas Chromatography and High Performance Liquid Chromatography

MASAHIRO TAKEUCHI*, KAZUKO MIZUISHI* and HIROFUMI HARADA*

Methods for the analysis of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics were studied by gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (LC) using a thermal energy analyzer (TEA), an electron capture detector (ECD), a UV detector (UV) or a mass spectrometer (MS).

Pretreatment of cosmetic samples was carried out as follows: To a sample was added ammonium sulphamate and acetonitrile, and the mixture was stirred. After adding anhydrous sodium sulfate, the mixture was filtered, concentrated, and cleaned up with a silica gel column. The effluent from the column was concentrated and submitted to the test solution for LC. Then, the half volume of the solution was withdrawn and concentrated. After adding acetic anhydride and pyridine for acetylation of NDELA, the benzene extract from the solution was submitted to the test solution for GC. The detection limits of TEA-GC, TEA-LC, UV-LC, ECD-GC, GC-EI-Mass fragmentography and GC-CI-Mass fragmentography were 1 ng, 1 ng, 5 ng, 0.1 ng, 3 ng, and 5 ng, respectively.

Keywords: N-nitrosodiethanolamine, thermal energy analyzer, UV absorption detector, electron capture detector, mass spectrometer, high performance liquid chromatography, gas chromatography, cosmetics

緒　言

発がん性物質であるN-ニトロソジエタノールアミン（以下 NDELA と略す）が化粧品から検出されたことが，1977年春のアメリカ化学会においてFineら[1,2]によって発表され，それが今日の NDELA 問題の発端となった．その後わが国においても西岡[3,4]による調査結果が国会で取り上げられ[5]，化粧品中の NDELA 問題への対応が急がれることになった．

N-ニトロソ化合物の分析は現在のところ，熱エネルギー分析器（Thermal Energy Analyzer；TEA）を用いて行なう方法が最も信頼性が高いと評価されている[6]．しかし，TEA は新しい装置であり用途も特殊で高価なため，必ずしも一般的でなく，また改良すべき点も残されている．とくに最近，N-ニトロソ化合物以外にも高感度を示す物質があることが確認され[7,8]，TEAを用いる場合でもクロマトグラムの保持値のみで同定することの危険性が指摘されている．著者ら[9]はこれまで化粧品中の NDELA の分析を，主としてTEAを用いる高速液体クロマトグラフィー（TEA-LC）で行なってきたが，確実性を期すために，TEA を用いるガスクロマトグラフィー（TEA-GC），UV 検出器を用いる高速液体クロマトグラフィー（UV-LC），電子捕獲検出器を用いるガスクロマトグラフィー（ECD-GC）およびガスクロマトグラフィー—質量分析法（GC-MS）についても検討したので，これまでに得られた知見を報告する．

実　験

1. 装置

1) TEA-LC，TEA-GC および UV-LC：Thermo Electron 製 TEA-502 に島津製 LC-2（UV 検出器付き）および GC-6A を連結したシステムを使用した．

2) ECD-GC：島津製 GC-7A に 10mCi ^{63}Ni を線源とする定電流型 ECD を取り付けたものを使用した．

3) GC-MS：日本電子製 MS D-300 と Hewllett Packard 製 GC-5710A を直結したシステムを使用した．

2. 試薬

1) NDELA 標準溶液：東京化成製 NDELA を精製してから，前報[9]と同様に調製した．

2) 溶媒類および無水硫酸ナトリウム：和光純薬製残

* 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

留農薬分析用を使用した.

3) ワコーゲルC-100：130℃で3時間活性化してから使用した.

4) 無水酢酸およびピリジン：特級試薬を再蒸留して使用した.

3. 前処理法

クリーム，ローションおよびシャンプー等の化粧品試料5gをビーカーにとり，スルファミン酸アンモニウム250mgおよびアセトニトリル30m*l*を加え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分間撹拌してからろ別した．残査をアセトニトリル10m*l*ずつで2回洗い，ろ液と合せてから分液ロートに移し，n-ヘキサン20m*l*を加え振り混ぜた．アセトニトリル層をナス型フラスコにとり，ロータリーエバポレーターを用いて溶媒がほとんどなくなるまで，30℃以下で減圧濃縮した．ただし，濃縮の進行にともなって発泡する場合は，その都度酢酸エチル10m*l*を加えてからさらに濃縮した．濃縮後，n-ヘキサン：酢酸エチル（1：1）5m*l*を加え，この溶液をシリカゲルカラムによってクリーンアップした．すなわち，n-ヘキサン：酢酸エチル（1：1）に懸濁させたワコーゲルC-100 3gおよびその上部に無水硫酸ナトリウム2gを充てんした内径1cm，長さ30cmのガラスカラムに先の溶液を流し入れ，はじめn-ヘキサン：酢酸エチル(1：1) 50m*l*，ついで酢酸エチル50m*l*を流した．捕集は酢酸エチル部分について行ない，30℃以下に保ちながらロータリーエバポレーターで減圧濃縮したのち，酢酸エチルで1m*l*に調製し，TEA-LCおよびUV-LC用の試験溶液とした．つぎに，この試験溶液0.5m*l*をとり窒素気流中で溶媒をとばしてから，無水酢酸およびピリジン各0.25m*l*を加え60℃で30分または室温で一夜放置後，これをTEA-GC，ECD-GCおよびGC-MS用の試験溶液とした.

結果および考察

1. TEA-LCについて

シャンプー5gに標準のNDELA 1.0μgを添加したものを試料とした場合について，得られたTEA-LCクロマトグラムをFig. 1(a)に示す.

このクロマトグラムにおいて，S/N＝2に相当する信号を与えるNDELAの絶対量を検出限界とすると，1ng程度になり，この値を試料中のNDELAの定量限界濃度に換算すると40ppbとなる．このようにTEA-LCによれば，化粧品中のNDELAをかなり低濃度まで定量することが可能であるが，前報[9]で報告したように，TEA-LC系を感度よく安定に作動させるためには，多量の移動相を効率よく捕集することが重要であり，そのためのコールドトラップの条件の確立が不可欠である．したがって，分析に先だち十分に検討する必要のあるところであるが，装置的にも問題点が多く改良が望まれるところでもある.

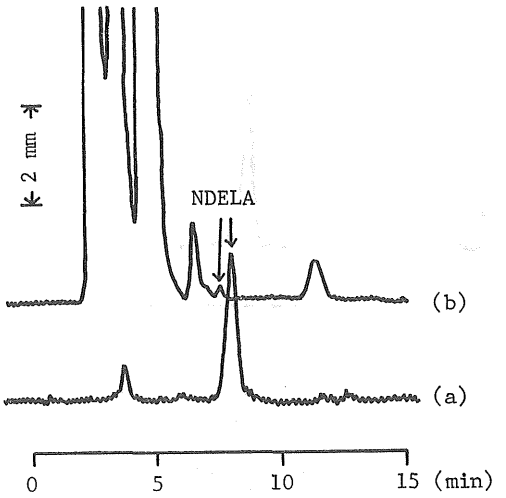


Fig. 1. TEA-LC and UV-LC Chromatograms (a)：TEA-LC, (b)：UV-LC (254nm) Sample：5g of shampoo containing 1.0μg of standard NDELA, Column：Zorbax CN, 25cm × 4.6mm, Mobile phase：Dichloromethane, Flow-rate：1.0m*l*/min, Sample size：5μ*l*.

2. TEA-GCについて

NDELAは不揮発性であり，そのままではGCによる分析に適さないので，次に示すようにアセチル誘導体にしてからTEA-GCで分析した.

$$ONN\,(C_2H_4OH)_2 \xrightarrow[Pyridine]{Ac_2O} ONN\,(C_2H_4OCOCH_3)_2$$

得られたクロマトグラムをFig. 2に示す．TEA-GCはTEA-LCに比べて，捕集しなければならない溶媒の量が少ないのでシステムを安定に作動させることができたが，感度はほとんど同じか，むしろ若干低下した．これはNDELAをアセチル誘導体にしたため分子量が大きくなり，その結果分子に占めるNOの割合が低くなったためと考えられる.

3. UV-LCについて

Fig. 1(b)にUV (254nm)でモニターしたクロマトグラムを示す．この場合のNDELAの検出限界は5ng程度であり，これを試料中の濃度に換算すると200 ppbになる．したがって，UV (254nm)の感度はTEAよりかなり低い．また，選択性の面でもTEA-LCに比べるとかなり劣っており，試料中に共存する他成分のピーク

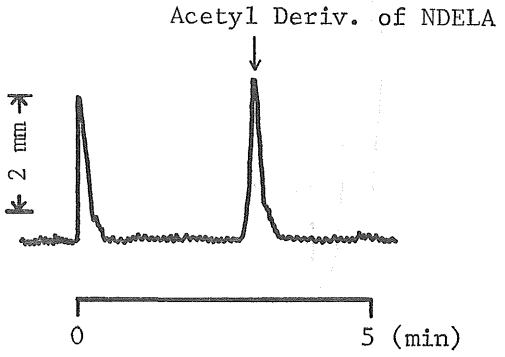


Fig. 2. TEA-GC Chromatogram
Sample : 5g of shampoo containing 1.0μg of standard NDELA, Column : 1.5% Silicon OV-17+1.95% Silicon DC QF-1, 1.1m×3.2mm 180°C, Sample size : 5μl.

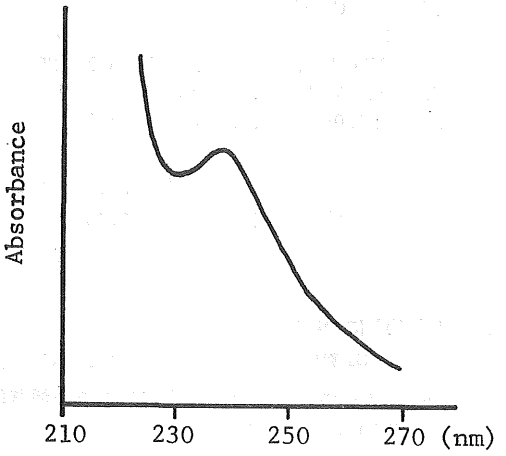


Fig. 3. UV Absorption Spectrum of NDELA

が随所に見られ，場合によってはそれらのピークを NDELA と誤認する危険性が存在する．しかし，前処理法を工夫し，さらに Fig. 3 に示した極大吸収波長(237nm)を用いることによって，スクリーニング法としての有用性が期待される．

4. ECD-GC について

クリーム 5g に標準の NDELA 1.0μg を添加したものを試料とした場合について，得られた ECD-GC クロマトグラムを Fig. 4 (a) および (b) に示す．ここで，(a)は極性の低いカラムを用いた場合，(b)は極性の高いカラムを用いた場合である．これらのクロマトグラムから，NDELA のアセチル誘導体は ECD に対してかなり高感度を示すことがわかる．すなわち，検出限界量は 100pg 程度であり，これを試料中の NDELA の定量限界濃度に換算すると約10ppb になる．しかし，化粧品中

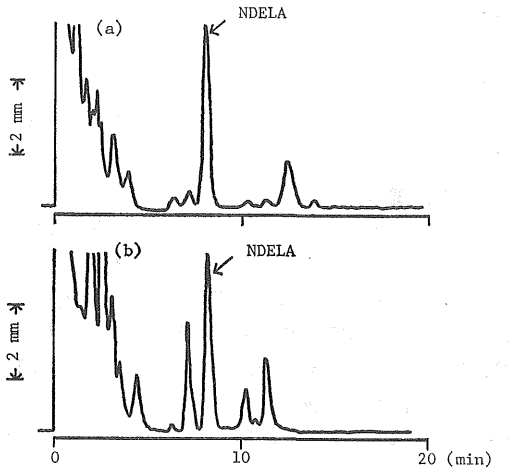


Fig. 4. ECD-GC Chromatograms
Sample : 5g of cream sample containing 1.0μg of standard NDELA, Column : (a) 1.5% Silicon OV-17+1.95% Silicon DC QF-1, 1.1m×3.2mm, 160℃, (b) : Silicon OV-275, 2.1m×3.2mm, 200℃, Sample size : 2μl.

には ECD に感応する種々の成分が多量に存在するので，それらの影響により実際の定量限界濃度はこれより高くなる場合が多い．また場合によっては，他成分が NDELA のアセチル誘導体と同一の保持値を示すこともあり，プラスの結果に対しては常に誤認の危険性が存在する．したがって誤認の危険率をできるだけ下げるために，2種類以上の極性の異なるカラムを用いて分析する必要がある．このような手順によって得られた結果はかなり信頼性の高いものと考えられるが，ECD-GC 法はあくまでスクリーニング法と評価されるべきものであるので，プラスの結果に対しては別の手段による確認が必要である．

5. GC-MS について

1) EI-および CI-MS

Fig. 5(a)～(d) に EI-および CI-MS スペクトルを示す．(a)には分子イオンピーク (m/e 218) が出現しておらず，CH_3CO がとれた m/e 175 および CH_3CO と NO がとれた m/e 145がスペクトルを特徴づけている．(b) は m/e 236がベースピークとなっているが，これは $(M+18)^+$ に由来するもので，反応ガスとしてアンモニアを使用する CI-MS に特有のピークである．(c)および(d)には $(M+1)^+$ に相当するピークが出現しており，このピークによってスペクトルが特徴づけられている．

GC-MS は主として NDELA の確認を目的とするものであり，試料中に多量の NDELA が存在する場合は，EI-および CI-MS のどちらによっても同定することができる．しかし，実際の試料中には存在するにしても極

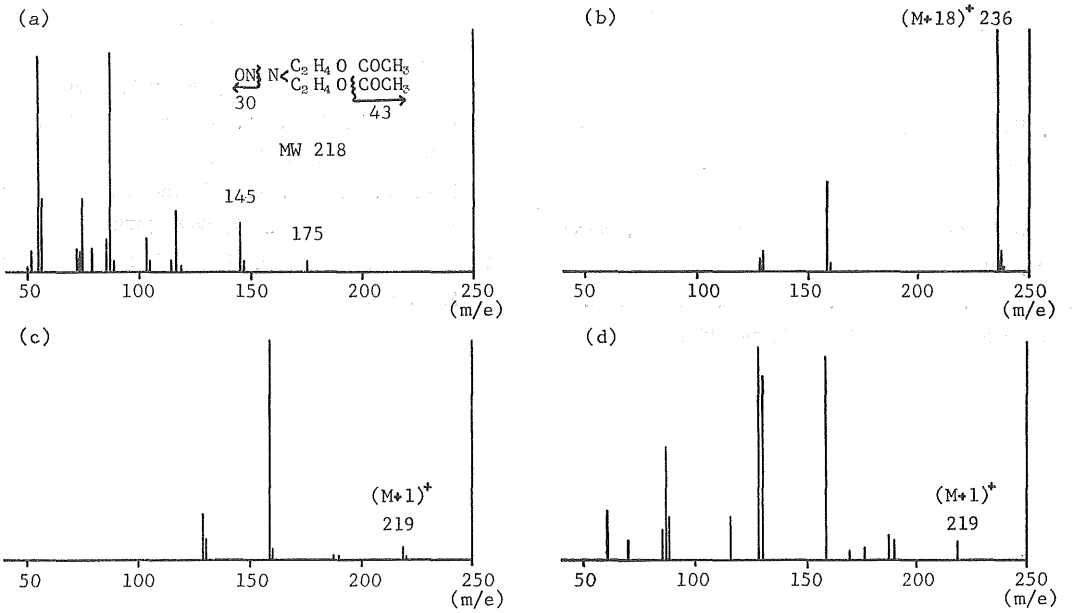


Fig. 5. EI-and CI-MS Spectra of Acetyl Derivative of NDELA (a) : EI, (b) : CI (NH_3), (c) : CI (C_4H_{10}), (d) : CI (CH_4)

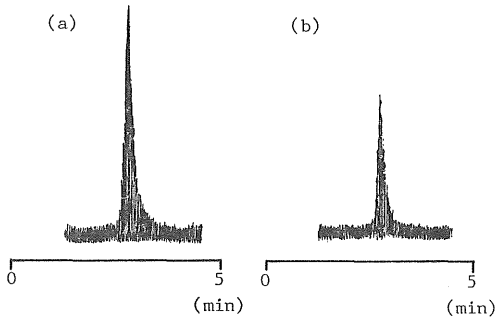


Fig. 6. EI- and CI-Mass Fragmentograms (a) : EI, m/e 145, (b) : CI (NH_3), m/e 236 Column : 2% Silicon OV-17, Sample size: 50 ng

めて微量であり，また濃縮にも限界があるので，次に述べるマスフラグメントグラフィー（MF）による同定が有効となる．

2) EI-および CI-MF

GC-MS スペクトル (Fig. 5) から適当なフラグメントを選んで MF による NDELA の分析を行なった．

Fig. 6(a)は m/e を145に設定した場合の EI-MF のクロマトグラム，(b) は反応ガスとしてアンモニアを用い，m/e を 236 に設定した場合の CI-MF のクロマトグラムである．EI-および CI-MF はいずれも微量の NDELA の同定を目的として行ったが，当然 NDELA の定量法としても有効である．この場合の検出限界は，EI-MF が 3 ng 程度，CI-MF が 5ng 程度であり，これまで行なったかぎりではルーチン分析法として採用するには若干感度不足であった．しかし，分析法としては非常に信頼性の高い方法であり，特に CI-MF の場合は EI-MF の場合と異なり未解裂の分子イオンピークを捉えることができるので最も確実な方法である．

結　　言

以上の結果を総合して，著者らは確実かつ効率的な化粧品中の NDELA の分析プロセスを次のように設定した．

1. ECD-GC によりスクリーニング試験を行なう．マイナスの結果に対しては，定量限界以下と評価する．

2. 1においてプラスの結果が得られた場合は，TEA-LC または TEA-GC で定量する．この場合の定量限界濃度は 40ppb 程度である．

3. 2において定量限界以上の値が得られた場合は，GC-MS (主として GC-CI-MF) によって確認する．

ついで，上記分析プロセスに従って，市販のクリーム30，ローション25，ファンデーション6，ヘヤーリキッド5，パック2およびシャンプー1計70検体，および標準の NDELA を添加した試料10検体について分析したところ，NDELA 無添加の場合はほとんどの試料がECD-

GC によるスクリーニング試験の段階でマイナスの結果を与えた．二三の試料についてはプラスの結果を与えたので，TEA-LC および TEA-GC で定量したところ，定量限界以下であった．NDELA 添加試料に対しては，ECD-GC，TEA-LC および TEA-GC のいずれにおいても80～90%の回収率を示した．

文　献

1) *The Boston Herald Americans*: Thursday, March 24, 1977
2) Fan, T. Y., Goff, U., Song, L., Fine, D. H., *et al.* : *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 15, 423, 1977
3) 西岡　一：フレグランス　ジャーナル, 29, 1, 1978
4) 西岡　一：科学朝日, No. 10, 73, 1979
5) 毎日新聞：1978年3月3日
6) 河端俊治：食品衛生研究, 26, 205, 1976
7) Fan, T. Y., Vita, R., and Fine, D. H.: *Toxicolgy Letters*, 2, 5, 1978
8) Fan, T. Y., Ross, R., and Fine, D. H.: *Environ. Sci. and Technol.*, 12, 692, 1978
9) 竹内正博，水石和子，原田裕文：東京衛研年報, 30-1, 98, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 91-96, 1980

化粧品の特殊成分分析法に関する研究（第10報）
HPLC による化粧品中の防腐殺菌剤の分離定量法

風間成孔*, 中村義昭*, 原田裕文*

Studies on Analytical Method of Specific Materials in Cosmetics (X)
High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Germicides in Cosmetic Products

MASAYOSHI KAZAMA*, YOSHIAKI NAKAMURA* and HIROFUMI HARADA*

A simple, rapid, accurate and selective method for the quantitative analysis of germicides, such as hexachlorophene, Irgasan CF_3 (halocarban), Irgasan DP-300 and trichlorocarbanilide, by high performance liquid chromatography (HPLC) in cosmetic products was studied. The HPLC conditions were as follows; column: Hitachi Gel 3011 (2.6mm i.d. × 500mm), detector: UV spectrophotometer (265nm), eluent: methanol-28% ammonia water (99.9: 0.1), flow rate: 1.0m*l*/min.

Determination of these germicides was successfully carried out by using benzylbenzoate (5mg/m*l*) incorporated into the examined cosmetics as internal standard. The plots of peak height ratio *vs.* amount ratio in the pair of trichlorocarbanilide and benzylbenzoate were linear in the range of 0.1-1.5 ppm of trichlorocarbanilide. The average recoveries from bar soaps and emulsion type cosmetics were 98.0 and 93.5% and the coefficients of variation were 2.60 and 3.32%, respectively. This method can be applied for the routine analyses of germicides in cosmetic products.

Keywords: germicide, hexachlorophene, Irgasan CF-3 (halocarban), Irgasan DP-300, trichlorocarbanilide, cosmetic, quasi-drug, high performance liquid chromatography

緒　言

化粧品（医薬部外品を含む）中の防腐殺菌剤の分析法として著者ら[1]は，薄層クロマトならびにガスクロマトグラフィーによる分離定量法についてすでに発表した．しかし，この方法で未検討のもので，その後繁用されているものについて，新たに試験法を設定する必要が生じた．防腐殺菌剤の定量法としては，紫外部吸収法[2-4]，ガスクロマトグラフ法[5-11]，HPLC 法[12-17]が報告されているが，このうち HPLC 法が簡易さ，精度などの点ですぐれており，その有用性が高いことで知られている．そこで今回，化粧品および部外品の石けん，シャンプー，デオドラント製品に繁用されるヘキサクロロフェン，ハロカルバン，イルガサン DP-300 およびトリクロロカルバニリドの相互分離と定量試験法の確立を目的として，HPLC 法による分析条件を検討し，市販品についての調査を行なったので報告する．

実験方法

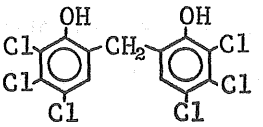
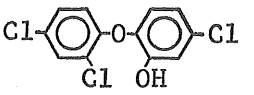
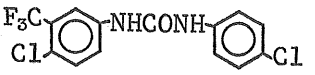
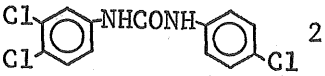
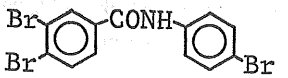
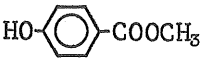
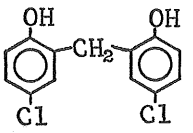
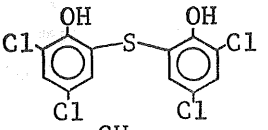
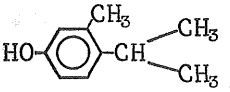
1. **試料**　Table 1に示す9種の防腐殺菌剤を用いた．表中，各名称の下に記したカッコ内はその化合物の略称として，以下，本文中に使用した．このうち，TBS, BIT および G4 は現在使用禁止となっているが，輸入化粧品など外国産の製品に使用されるおそれがあるため，試験検討の対象とした．なお，各化合物の紫外部最大吸収波長（nm），化粧品に含まれる通常の添加量を%，また化粧品品質基準[18]に規定の最大配合許容量を%で記し参考とした．

2. **試薬**　1) 内部標準溶液：安息香酸ベンジル（特級）1gを精秤し，メタノール（以下 MeOH と略）200m*l* に混和する．2) ポリアミド FM プレート（和光純薬），3) Silica Gel 60 F_{254} (Merck)，他の試薬はすべて特級を用いた．

3. **装置および器具**　高速液体クロマトグラフ（以下 HPLC と略）：日立635形に同社製波長可変紫外可視モニターを装着して使用した．HPLC 充てん剤：日立ゲル3011，同3010，同3011-0　ロータリーエバポレーター：石井式　メンブランフィルター：ポアサイズ 0.45μm TM-2（東洋ろ紙）フィルターホルダー：ハリオガラス製（柴田化学）マイクロシリンジ：(株)テルモ製10μl用

* 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. Structural Formulas of Germicides and the Limited Amount Allowed in Cosmetics

Compound	Structure	λmax. (nm)	Used Amount(%)	Max. Limit Amount(%)
1. Hexachlorophene (G 11)		297	0.01-0.1	0.1
2. Irgasan DP-300 (DP-300)		280	0.05-0.3	—
3. Halocarban (CF_3)		266	0.01-0.3	0.3
4. Trichlorocarbanilide (TCC)		265	0.2-1.2	0.3
5. Tribromsalan (TBS)		280	0.05-0.1	forbidden as of Jan. in 1976
6. Methyl Paraben (PHBA-Me)		257	0.01-0.5	1.0
7. Dichlorophene (G 4)		285	2-3	forbidden as of Jan. in 1972
8. Bithionol (BIT)		308	2-3	forbidden as of April in 1970
9. Isopropylmethylphenol (Biosol)		279	0.05-0.1	0.1

4. 操作法

4—1 試料溶液の調製 1) 石けん：0.5gを精秤し，アセトン50m*l* を加え，スターラーで30分間撹拌する．これをガラスフィルター（G 4）でろ過し，ろ液を別の容器にとる．残渣を再びアセトン50m*l* で抽出し，これをろ過し，ろ液を先のろ液と合した後，ロータリーエバポレーターでアセトンを減圧留去する．蒸発乾固した残留物に内部標準溶液10m*l* を加えて溶かし，試料溶液とする．このとき，TCC 含有の場合は，溶解度が劣るため，ジメチルホルムアミド(DMF)を用い，還流冷却器をつけて水浴上で30分間加熱還流し，冷後ろ過して試料溶液とする．2) 乳化物または懸濁液（クリーム，乳液，シャンプーなど）：試料10gを精秤し，50m*l* の共栓三角フラスコ中で10%硫酸2～3滴を加え酸性とし，MeOH（または DMF）30m*l* を加え，還流冷却器をつけ，水浴上加温し，エマルジョンを破壊したのち，スターラーで10分間撹拌する．さらに MeOH 30m*l* で2回抽出をくり返したのち，MeOH を減圧留去して濃縮する．この液をガラスフィルターでろ過するか，または，遠心分離して上澄液を分取し，MeOH で一定量にメスアップする．この液の適当量をとり，内部標準溶液を加え，安息香酸ベンジルとして 5mg/m*l* となるように MeOH で希

釈し，試料溶液とする．3) エアゾール剤（デオドラント製品など）：エアゾール剤1缶を精密に秤り，ドライアイス・メタノール混合液中に缶の肩まで浸し，充分冷却する．冷却した缶の上部に小穴をあけ，徐々に液化ガス（噴射剤）を放出させる．このとき，室温が高いと，液化ガスが沸騰し，噴きこぼれるので注意して行なう．大部分のガスが放出された後，缶の上部を切り開き，約40°の水浴上で30分間加温して，残留液化ガスを注意して気化放出させる．残留液をビーカーに移し，缶の内部をMeOH 100m*l* で洗浄し，洗液を先のビーカーに合わせる．缶は乾燥したのち．その重量を精密にはかり，先にはかった重量より，缶の重量を引いたものを試料量とする．ビーカーを水浴上で加温し，約30m*l* に濃縮する．この操作により香料などの揮発性妨害物質を除去する．この液を遠沈管に移し，毎分3,000回転で5分間遠心分離し，上澄液を分取する．この操作を3回くり返し，集めた上澄液を水浴上で加温して，ロータリーエバポレーターで70m*l* に濃縮する．冷後，MeOHおよび内部標準溶液を加え一定量とし，試料溶液とする．

4—2 薄層クロマトグラフィー

けい光剤入りの Silica Gel 60 F_{254} プレートを用い展開溶媒は Wilson[19] のクロロホルム ($CHCl_3$)–MeOH (9：1) の展開溶媒で展開したのち，紫外線検出器でスポットを確認する．また，パラベン類相互の分離確認には，ポリアミドFMプレートを用い，展開溶媒ベンゼン–MeOH–HAc (20：0.2：0.5) で室温で20分間展開する．スポットを紫外線検出器で確認する．

4—3 高速液体のクロマトグラフィー 試料溶液および標準溶液を以下の条件において HPLC による定性および定量を行なう．充てん剤：ポリスチレン・ジビニルベンゼン系多孔性樹脂（平均粒子径約 10μm で市販の Hitachi Gel 3011が相当）分離カラム：充てん剤をつめた内径2.6mm，長さ50cm のステンレス製パイプを用いる．充てん法は，充てん剤約2gをビーカーに入れ，約5倍量の MeOH を加え，よく振り，スラリー状とし，約1時間静置し，膨潤させたのち，樹脂を充てん用パッカーに入れ，3m*l*/min の流速で MeOH を20～30分間送液し，充てんする．ただし，圧力が150kg/cm^2 を超える場合は，流量を調節し，それ以下で充てんする．移動相：MeOH–28% アンモニア水 (99.9：0.1) 流速：1.0m*l*/min 検出器：紫外検出器，波長265nm，サンプル注入量：5μl.

4—4 定性および定量 定性：試料溶液および標準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から，試料の保持時間と内部標準物質との相対保持時間を求め，標準溶液のそれと比較して定性を行なう．定量：前記条件で試料溶液および検量線用標準溶液（各殺菌剤3～5段階希釈液，内部標準添加）のそれぞれ 5μl ずつをカラムに注入し，波長265nm における吸光度を記録し，クロマトグラムの試料溶液および標準溶液それぞれの内部標準物質に対するピーク高比を求め，検量線から試料溶液中の防腐殺菌剤の濃度を算出する．

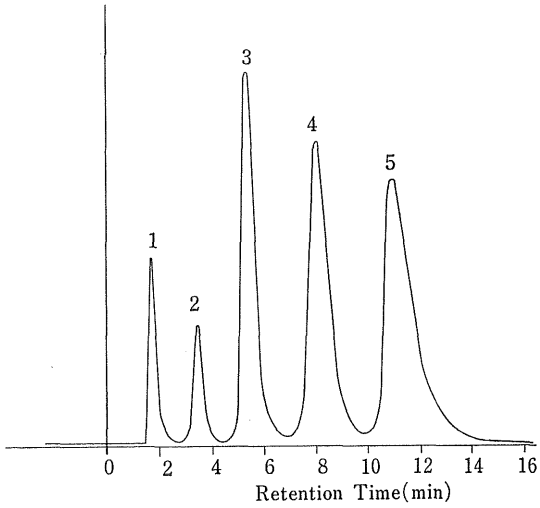


Fig. 1. HPLC Chromatogram of Germicides
Operating conditions…packing: Hitachi Gel 3011, column: 2.6mm i.d. × 500mm, mobile phase: MeOH–28% ammonia water (99.9:0.1), flow rate: 1.0m*l*/min, sample size: 5μl, detection: UV 265 nm
Sample; 1: G-11
2: DP-300
3: CF_3
4: TCC
5: benzylbenzoate (IS)

実験結果および考察

1. 高速液体クロマトグラフィーの条件

1—1 測定波長 各殺菌剤の紫外部極大波長はTable 1に示すとおりである．このなかで，石けん，シャンプー，デオドラント製品に繁用される G11, DP-300, CF_3 および TCC の極大波長はそれぞれ297, 280, 266, 265 nm であり，これらを相互分離するとき，検出感度の点から，265nm を測定波長として用いることにした．したがって，あらかじめ TLC で定性試験を行なった結果，試料中にいずれかの殺菌剤が単独で配合されていることが認められた場合には，その殺菌剤の最大吸収波長で測定すれば，最も高い感度で定量することが可能である．

1—2 充てん剤 前記4種の殺菌剤と内部標準物質の

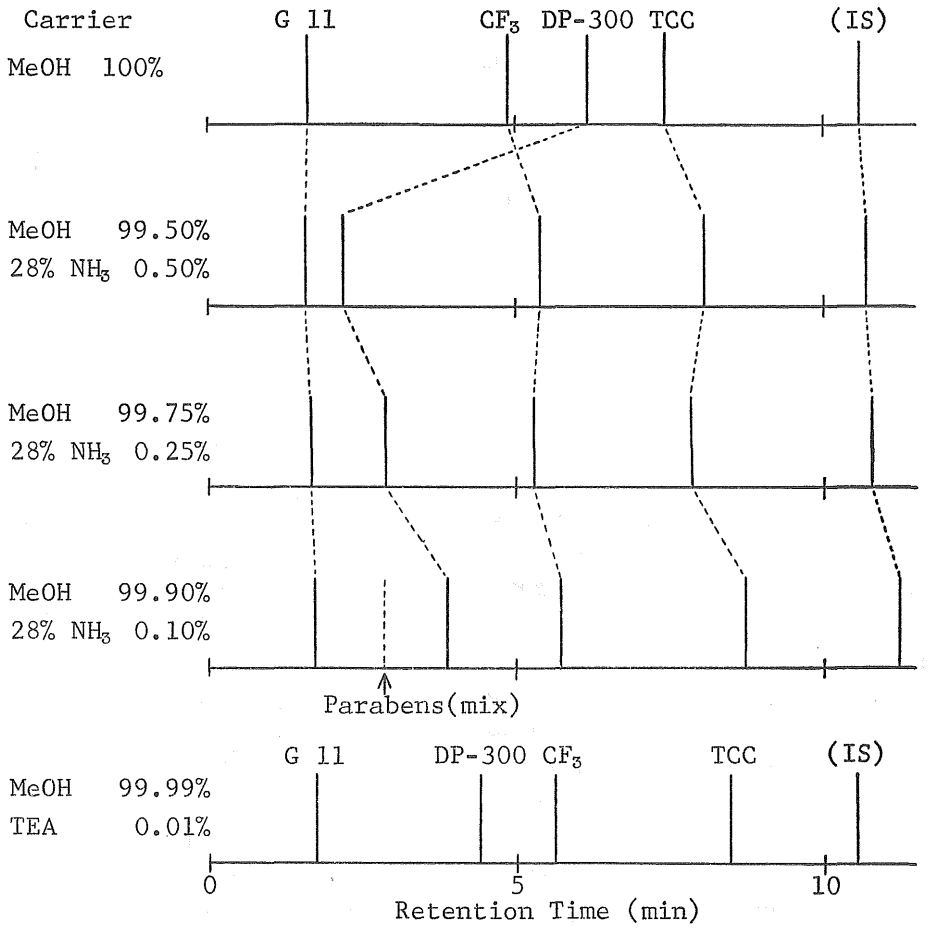


Fig. 2. Effect of ammonia water and triethylamine (TEA) (IS): benzylbenzoate

分離に適した充てん剤について検討を行なった．すなわち，用いたカラムはポリスチレン・ジビニルベンゼン系多孔質樹脂の日立ゲル3010 (2.6mm×50cm)，同3011 (2.6mm×50cm) および同3011-0 (4mm×25cm) を充てんしたもの3種を用いた．それぞれの比較を行なったところ，移動相に MeOH：28% NH_3 (99.9：0.1) を用いたとき，最も良い分離を示したものは日立ゲル3011であった．その時のクロマトグラムを Fig. 1 に示す．

1—3 移動相 日立ゲル3011はスチレン系ポーラスポリマーで溶離液にすべての有機溶媒が使用でき，応用範囲が非常に広い利点があり，再現性が優れている．殺菌剤分析でも中栄ら[20]のポーラスポリマーの応用例に紹介されている．ここで用いられているポーラスポリマーでは，一般に極性の大きい物質から溶出するので，G11のようなフェノール性水酸基をもつ化合物，あるいはカルボキシル基をもつような酸性物質には溶離液にトリエチルアミン(TEA)やアンモニアのような塩基性物質を加えることにより，より早く溶出させることができる．そこで，3011を用い，溶離液に MeOH のみとアンモニアと TEA を処方したものについて種々検討したところ，Fig. 2 に示すような結果となった．すなわち，MeOH 単独では CF_3，DP-300，TCC の三者は接近して溶出し，相互の分離はあまりよくないが，これにアンモニア水または TEA を入れ液性を塩基性にすると，DP-300 の溶出が早まり，相互の分離が良好となった．しかし，一方アンモニア水あるいは TEA の添加量は DP-300 の保持時間に大きく影響することも認められ，今回の分析に最適な混合比は MeOH 99.9 に28% アンモニア水 0.1 であった．この組成の溶離液を用いた場合のクロマトグラムが前出の Fig. 1 である．なお，TEA はそれ自身に紫外部吸収があり，265nm でも0.01%以上を使用することができなかった．前記 0.1% アンモニア水添加

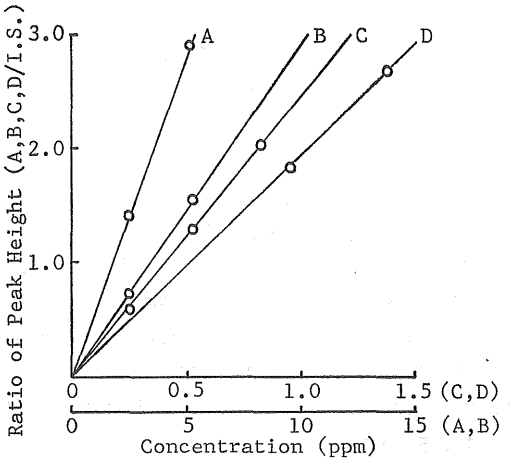


Fig. 3. Calibration Curves of Germicides
A: DP-300, B: G11,
C: CF_3, D: TCC,
I.S.: benzylbenzoate

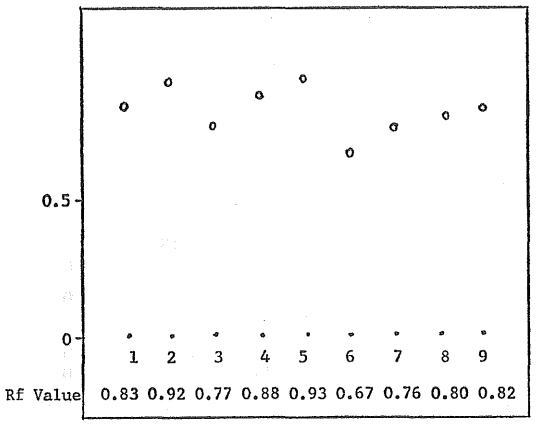


Fig. 4. Thin-Layer Chromatogram of Germicides
Plate: Silica Gel 60 F_{254} (Merck), Solvent System: $CHCl_3$–MeOH (9:1), Detection: Short Wave Length UV Light
Sample; 1: G11, 2: DP-300, 3: CF_3, 4: TCC, 5: TBS, 6: PHBA-Me, 7: G4, 8: BIT, 9: Biosol

の溶離液では，化粧品の防腐剤として併用されることが多いパラベン類の溶出位置が約2.8分で，メチル，エチル，プロピル，ブチルとも分離されず一つのピークとなることがわかった．この場合，G11との分離は良いが，DP-300との分離が不十分であり，パラベンが含有されるものは，あらかじめ TLC により定性後，何らかの前処理により除去する必要がある．TLC の結果，パラベンのみの場合には，本法を準用し，溶離液として MeOH:H_2O (85：15) を用いればパラベン四者の相互分離が可能である．他の殺菌剤のうち，本法の条件では，TBS, G4, BIT, Biosol などが存在すると，その溶出位置が G11 と重なり，障害となる．これらハロゲン化フェノール系殺菌剤の分離定量には，未だ HPLC 法の適用条件が見出されないので，著者らが先に検討し，衛生試験法注解[21]に収載された DEAE-セルローズカラム処理を行なったのち，ガスクロマトグラフ法を適用する方法が現段階では最適と考えられる．

1—4 **検量線および検出限界** 上記定量条件における G11, DP-300, CF_3 および TCC 四者の検量線を Fig. 3に示した．その結果，G11 は1–10ppm，DP-300 は 1–5 ppm，CF_3 は0.1～1.2ppm，TCC は 0.1～1.5ppm の範囲で，それぞれ原点を通る直線性が認められた．検出限界は，CF_3, TCC が0.05ppm，G11, DP-300 が 0.5 ppm であった，本法の条件である265nm では，その近辺に極大波長を有する前二者が，後二者の約10倍の感度があることが認められた．

2. **薄層クロマトグラフィー** 試料中にある殺菌剤の種類とその存在を確認する意味で，TLC をあらかじめ行なうことが必要である．Silica Gel 60 F_{254} の場合のクロマトグラムを Fig. 4に示した．このとき，DP-300 と TBS の *Rf* 値が接近しているが，TBS は紫外線照射により，それ自体青白色のけい光を発し，検出が容易で，判別が可能である．パラベン類の TLC については，ポリアミドFMプレートを用い，ベンゼン•MeOH•HAc (20：0.2：0.5) で展開するとき，*Rf* 値はメチル 0.33，エチル 0.44，プロピル 0.52，ブチル0.60であった．両プレートとも，けい光をバックグラウンドにスポットが黒く現われ，相互分離も良好であった．

3. **抽出条件の検討** 石けん，クリーム，デオドラント製品からの抽出法は，前記製品タイプ別の方法で行なったとき，良好な結果が得られた．すなわち，殺菌剤不含の銘柄の異なる種類の石けん，シャンプー，クリーム，エアゾール計20検体の各10g に殺菌剤 0.2% を添加したとき，TCC の場合は回収率90%以上，特に石けんとシャンプーは回収率と変動係数は それぞれ 98.0%，2.60 および93.5%，3.32であった．他の殺菌剤についてもほぼ同様の結果が得られた．試料溶液の調製法に関しては，TCCが MeOH に難溶であるため，DMF を用いること以外に問題とはならず，ほぼ満足できる結果であった．

4. **市販品への適用** 前記の各タイプ別操作法により市販品について試験した結果を Table 2 に示す．この場合，石けん中に Biosol とパラベンを併用したものが定量できなかった以外，化粧品および医薬部外品扱いの

Table 2. Germicide Content in Commercial Cosmetic Products

No.	Sample	Germicide	Found, %	Claimed, %
1	Bar Soap	TCC	0.394	0.4
2	〃	〃	0.776	0.8
3	〃	〃	0.384	0.4
4	〃	DP-300	0.279	0.3
5	〃	TCC CF_3	1.152 0.27	1.2 0.3
6	〃	Biosol Parabens		0.08 0.16
7	〃	G 11 DP-300	0.6 0.27	0.75 0.25
8	〃	G 11	1.96	2.0
9	〃	TMTD G 11	0.48	0.5 0.5
10	〃	G 11	0.675	0.75
11	〃	TCC CF_3	1.175 0.297	1.2 0.3
12	Cream	G 11	0.024	0.02
13	Hair Tonic	DP-300	0.052	0.05
14	Deodorant Spray	CF_3	0.011	0.01
15	〃	〃	0.26	0.2
16	〃	DP-300	0.23	0.2
17	〃 (Roller)	〃	0.34	0.3
18	Shampoo	CF_3	0.273	0.3
19	Eye Shadow	G 11	0.09	0.1
20	〃	CF_3	0.23	0.2

各種剤型より，表示の殺菌剤の種類とその含量が確認できた．殺菌剤の単独使用の例も多いので，市販品からの定量分析には，HPLC 法は迅速簡易で実用性の高い方法であると認められる．

結　語

1. 本法は化粧品および医薬部外品に使用される殺菌剤のうち，石けん，シャンプー，デオドラント製品に添加し，繁用される G11，イルガサン DP-300，ハロカルバンおよび TCC について，その各種剤型中より，分離定量するための諸条件を検討したものである．

2. 石けん，クリーム，シャンプー，デオドラントなど各種剤型中より，それぞれの殺菌剤を溶媒抽出後，フィルターろ過または遠心分離後，0.45μ のメンブランフィルターを通した液を HPLC に注入し，定量が可能であった．

3. TLC の結果，殺菌剤が単一であれば，その種類を確認した上で，内部標準物質として安息香酸ベンジルを用い，HPLC 法で迅速簡易に定量できる．

4. 本法による添加回収実験の結果，前記4種の殺菌剤の回収率は90%以上であり，特に TCC は石けんおよびシャンプーでの5回繰り返し実験による回収率および変動係数はそれぞれ，98.0%，2.60 および 93.5%．3.32であった．

文　献

1) 風間成孔，水石和子，中村義昭，原田裕文，戸谷哲也：衛生化学，20，248，1974
2) Matuszak, J. B., Bope, F. W., and Harris, L. E. : *Drug Standards*, 28, 68, 1960
3) Jungermann, E., and Beck, E. C. : *J. of Amer. Oil Chem. Soc.*, 38, 513, 1961
4) Sheppard, E. P., and Wilson, C. H. : *J. of AOAC*, 58, 937, 1975
5) Gutenmann, W. H., and Lisk, D. J. : *ibid.*, 53, 522, 1970
6) Wisniewski, J. V. : *Facts and Methods*, 8, 10, 1967
7) Porcaro, P. J., and Shubiak, P. : *Anal. Chem.*, 40, 1232, 1968
8) Porcaro, P. J., Shubiak, P., and Manowitz, M. : *ibid.*, 58, 251, 1969
9) Batehelder, M., Tarlin, H., and Williamson, G. : *J. Pharm. Sci.*, 61, 252, 1972
10) 風間成孔，水石和子，中村義昭，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，24，147，1973
11) Joint Committee of the Pharmaceutical Society and the Analytical Division of the Chemical Society on the Pharmaceutical Analysis: *Analyst* (London), 103, 284, 1978
12) 武藤義一，中栄篤男：日本化学会第29回秋季年会，化学関係学協会連合会協議会研究発表会合同大会講演予稿集(Ⅱ)，1166，1973
13) Wolf, T. et al. : *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 24, 363, 1973
14) Gabriel, D. M.,: *ibid.*, 25, 33, 1974
15) 岡谷吉雄，三砂久美子，谷川孝博，木嶋敬二，西村千賀子，狩野静雄，外村正治：日本薬学会第95年会講演要旨集(Ⅲ)，121，1975
16) Fitzpatrick, et al. : *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 26, 377, 1975
17) Senzel, A. J., Editor: *NEWBURGER'S Manual of Cosmetic Analysis*, 2nd Ed. 114, 1977
18) 化粧品原料基準編集委員会：化粧品原料基準追補Ⅱ注解，679，1973，薬事日報社
19) Wilson, C. H. : *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 26, 75, 1975
20) 中栄篤男，武藤義一：フレグランス ジャーナル，1(3)，55，1973
21) 日本薬学会編：衛生試験法注解，691，1980，金原出版

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 97-101, 1980

家庭用品の衛生化学的研究（第6報）
ガスクロマトグラフィーによるエアゾール噴射剤の分析法について

植田忠彦*, 森謙一郎*, 鈴木助治*, 原田裕文*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (VI)
Analysis of Propellants in Household Aerosol Products by Gas Chromatography

TADAHIKO UETA*, KENICHIRO MORI*, SUKEJI SUZUKI* and HIROFUMI HARADA*

A modified method for the analysis of propellant gas in household aerosol products by gas chromatography was studied. The peaks for 8 standard gases including carbondioxide (CO_2), propane, Freon 12, isobutane, n-butane, dimethylether (DME), vinylchloride, and Freon 11 were all clearly separated under the conditions using a mixture of dibutylmaleate (28.5w/w%) and β, β'-oxydipropionitrile (1.5w/w%) as liquid phase on C-22-SK packed in ϕ 3mm×4m glass column. The injection volume of each standard gas should be kept lower than 0.1m*l* to get a constant retention time without variation. Therefore, precise analysis of the propellant gas is now possible based on a linear relationship between each injection volume and its peak area of the standard gas. The quantitative determinations of the propellants were carried out for a total of 150 samples of commercially available household aerosol products. Propellants used for aerosol products were; LPG for 115 samples (76.7%), Freon 43 (28.7%), DME 35 (23.3%) and CO_2 1.

Keywords: gas analysis, household product, propellant, gas chromatography, LPG, vinylchloride, freon, dimethylether, carbondioxide

はじめに

エアゾール製品の噴射剤として用いられる液化ガスには液化石油ガス（以下 LPG と略す），ハロゲン化炭化水素（以下フレオンと略す），ジメチルエーテル（以下 DME と略す），二酸化炭素等がある．昭和48年10月12日，従来一部のエアゾール製品に使用されていた塩化ビニルモノマー（以下 VCM と略す）は発ガン性を有するため使用を禁止され，更にフレオンガスは成層圏のオゾン層破壊の危険性を理由として昭和54年4月15日米国において一部医薬品に対する使用を除き全面的に使用を禁止された．我国においてもエアゾール製品は近年急速に一般家庭にも普及し，その用途も多岐に渡っている．

著者らは先に（昭和52年）これらのエアゾール製品の中で家庭用エアゾール製品についてその噴射剤および重金属含有量の調査を行ない報告[1]したが，今回，従来行なわれている液化ガスの熱伝導度型検出器付ガスクロマトグラフィー（以下 TCD-GC と略す）による分析法の噴射剤への適応性について検討を行ない，市販の家庭用エアゾール製品中の噴射剤の調査を行なったので報告する．

実験方法

1. **試薬** （1）標準液化ガス ①プロパン，*iso*-ブタン，*n*-ブタン，DME東京化成工業社製．②フレオン-12，フレオン-11，VCM K.K.アリミノより分与されたもの．③二酸化炭素 日本酸素社製

（2）分離用カラム ①30%Dibutylmaleate. 担体 C-22-SK（以下30%DBM と略す）．②28.5%Dibutylmaleate+1.5% β, β'-Oxydipropionitrile, 担体 C-22-SK（以下28.5%DBM+1.5%ODPN と略す），③28.5% DBM+1.5%ODPN, 担体 Alumina, ④25%Bis (2-(2-methoxyethoxy) ethyl) ether, 担体 Celite 545, ⑤30% Diisopropyl succinate, 担体 C-22-SK, ⑥20% Dimethlsulfolane, 担体 Alumina, ⑦30%Benzylcyanide (67%)+$AgNO_3$(33%), 担体 Alumina 各60～80メッシュのものをそれぞれ内径3mm, 長さ4mのガラスカラムに充填したものを用いた．

2. **装置** （1）ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-5A型，熱伝導度型検出器付，（2）ガスサンプラー：同社製 MGS-5型，（3）マイクロシリンジ：テルモ社製ガスタイトシリンジ GAN-2.5, GA-1.0, GA-0.25,

* 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

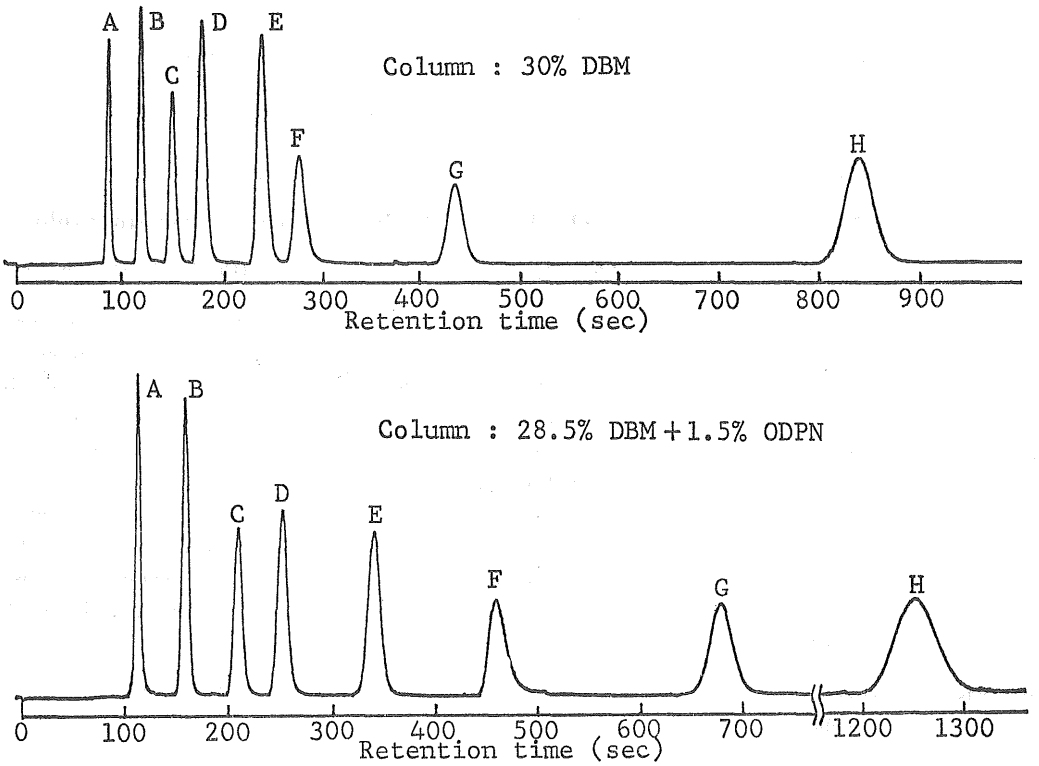


Fig. 1. Gas Chromatogram of the Standard Gases
A: Carbondioxide, B: Propane, C: Freon-12, D: *iso*-Butane, E: *n*-Butane, F:Dimethylether, G: Vinylchloride, H: Freon-11

(4)分離用カラム温調器：ヤマト社製 クールニクス CTR-120型，(5)データ処理装置：Spectra-Physics 社製 Computing Integrator System IV

3. **試料** 東京都内で昭和53年4月～54年6月の間に購入した市販の家庭用エアゾール製品を試料とした．

内訳は，ガラス・家具みがき19，台所油おとし6，カーペットクリーナー9，レコードみがき7，芳香消臭剤13，潤滑・防錆剤17，静電美化剤5，撥水剤11，洗濯のり9，部分洗濯剤5，防カビ消臭剤10，防蟻剤3，ネズミよけ塗料1，塗料20，車みがき剤10，その他すべり止め等5，合計16種150検体である．

4. **定量法** 標準ガスの採取は前報[1]に準じて注射筒により行ない，つぎにマイクロシリンジを用いて注射筒より空気の混入しないように注意して0.01，0.03，0.05，0.1m*l* ずつ分取しガスクロマトグラフに注入する．それぞれの注入量とデータ処理装置により得られたピーク面積より検量線を作成する．つぎに試料より同様に注射筒を用いて噴射剤を抜き取り，マイクロシリンジにより0.1m*l* を分取し，ガスクロマトグラフに注入して得られた保持時間によって定性を行ない，またピーク面積より検量線を用いて定量を行なう．この時のガスクロマトグラフィー測定条件はつぎのとおりである．

カラム：28.5% DBM+1.5%ODPN，C-22-SK 60～80メッシュ，内径3mm，長さ4mガラスカラム，温度25°
検出器：熱伝導度型，ブリッジ電流60mV，温度100°，注入口温度 150°．キャリアガス：ヘリウム 40m*l*/min
注入量0.01～0.1m*l*（オンカラム法）記録計速度10mm/min.

結果および考察

1. **分離用カラムの検討** 液化ガスのガスクロマトグラフ用分離カラムとしては JIS[2-4] および衛生試験法[5]に収録されているものの中から前記試薬の項に示した7種類を選び，各カラムについて8種の標準液化ガスを混合したものを適切な条件下で測定し，本試験に最も適したカラムの選択を行なった．Fig. 1 に分離の良好なカラム①および②を使用した場合の混合標準ガスのクロマトグラムを示した．カラム③は分離は良好であったが担体の活性アルミナの影響で全体として溶出が遅く不適当で

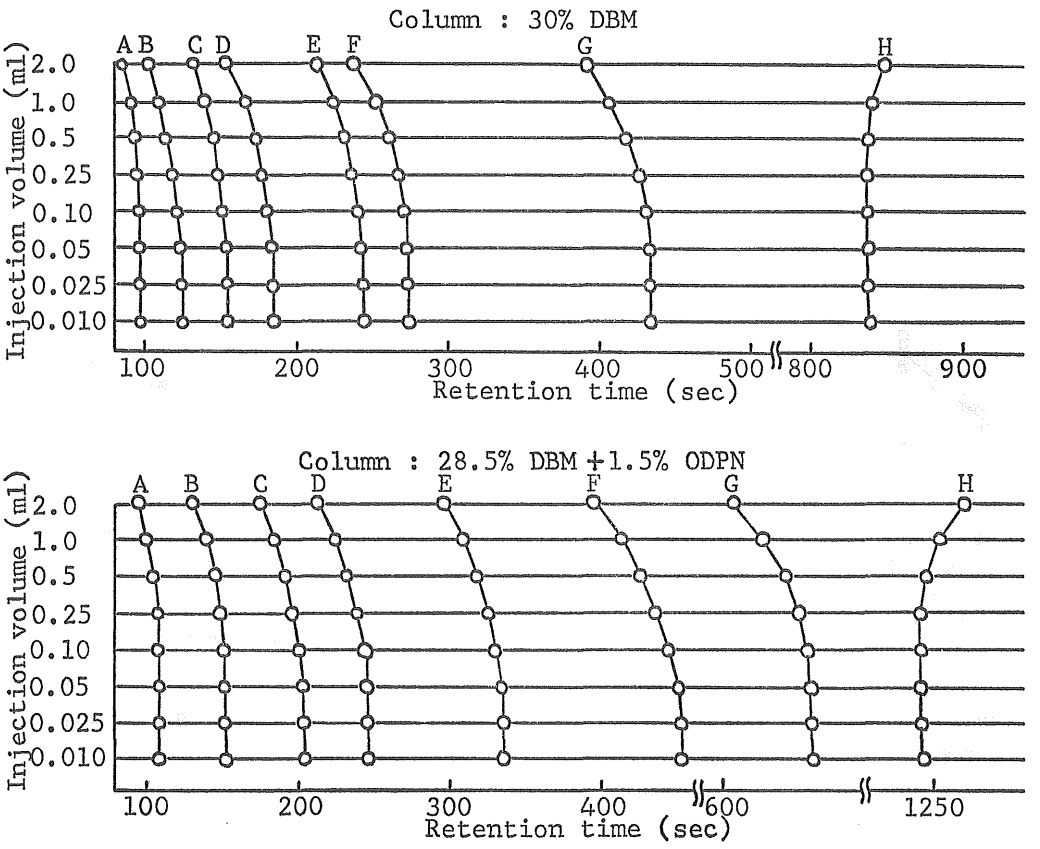


Fig. 2. Relationship between Retention Time and Injection Volume of Standard Gases
A: Carbondioxide, B: Propane, C: Freon-12, D: *iso*-Butane, E: *n*-Butane,
F: Dimethylether, G: Vinylchloride, H: Freon-11

あった．カラム④はフレオン-12と*iso*-ブタンの分離ができなかった．カラム⑤は分離は良好であったがフレオン-11の溶出が遅く不適当であった．カラム⑥および⑦はテーリングが強く，また分離も不十分であった．

2. **注入量と保持時間** 分離用カラムとして良好であった①および②について，各々の標準ガスの注入量を0.01m*l*から2.0m*l*まで変えて注入し，その注入量と保持時間の関係をFig. 2に示した．カラム①および②のいずれの場合においても，フレオン-11は注入量が0.01m*l*～2.0m*l*と増加するにともなって保持時間がカラム①で839sec～847sec，カラム②で1251sec～1267secといずれも長くなり，リーディングピークの特長を示しているのに対し，その他の標準ガスについては逆にカラム①においては二酸化炭素96sec～83sec，プロパン122sec～101secフレオン-12，154sec～130sec，*iso*-ブタン182sec～156sec，*n*-ブタン243sec～211sec，DME 272sec～237sec，VCM 433sec～389sec，カラム②においては二酸化炭素110sec～94sec，プロパン155sec～130sec，フレオン-12 204sec～176sec，*iso*-ブタン247sec～212sec，*n*-ブタン334sec～297sec，DME 455sec～395sec，VCM 661sec～607secといずれも短かくなり，テーリングピークの特長を示している．特に，注入量が0.1m*l*以下であればいずれの標準ガスにおいても保持時間の変動はほとんど認められないのに対し，0.1m*l*以上になるとこの変動が顕著となり，カラム温度を変えてもこの傾向は変らなかった．これは一般に担体の吸着性の影響や試料と固定相液体の極性との関係等によると考えられている．今回，試料注入量を0.1m*l*以下とすることによって保持時間の変動がほとんど認められなくなることがわかった．従って試料注入量を0.1m*l*とし，カラムは①，②いずれも良好であるがこのうちでも，分離のよい②を用いることとした．

3. **検量線の作成** 標準ガスボンベより注射筒（200m*l*）を用いてガスを採取し，つぎにこの注射筒よりマイ

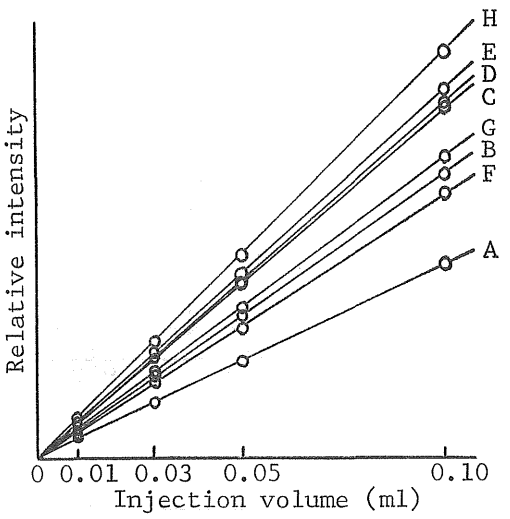


Fig. 3. Calibration Curve of the Standard Gases
A: Carbondioxide, B: Propane, C: Freon-12,
D: *iso*-Butane, E: *n*-Butane, F: Dimethylether,
G: Vinylchloride, H: Freon-11

クロシリンジを用いてこのガスの 0.01, 0.025, 0.05 および 0.1m*l* を各々分取しガスクロマトグラフに注入した．ガスの採取にあたっては空気が混入しないように注意する必要があった．注入量とデータ処理装置より得たピーク面積より検量線を作成したところ Fig. 3 に示す様に原点を通る直線が得られた．

4. 噴射ガス分析結果 前報[1]に引き続き16種150検体の試料について噴射ガスの分析を行ない，Table 1. に用途別に試料を分類し，使用されているガスを表わした．LPG はプロパン，*iso*-ブタンおよび *n*-ブタンの混合体であり，またフレオンはフレオン-12およびフレオン-11のいずれかまたは二種の混合体であった．

ＬＰＧについては，単独で使用しているもの72検体(48%)，DME あるいはフレオンなどと混合して使用しているものは43検体 (28.7%)，合計115検体 (76.6%) と最も多く，しかも使用されている製品の11種と広範囲におよんでいた．

フレオンについては，単独で使用しているもの27検体 (18%)，ＬＰＧ等と混合して使用しているものは16検体 (10.7%)，合計43検体 (28.7%) であった．

ＤＭＥについては，単独で使用しているものは７検体 (4.7%)，ＬＰＧ等と混合して使用しているものは28検体 (18.7%)，合計35検体 (23.3%) であった．

その他二酸化炭素を使用したものが１検体あった．

塩化ビニルモノマーは今回の調査では検出されなかった．

全体としては前回の調査[1]結果と同様の傾向であり，

Table 1. Results of Gas Analysis on the Propellant of Commercial Household Aerosol Products

Sample No.	Aerosol	No. of sample	Number of detected samples						
			LPG	Freon	DME	CO_2	LPG+Freon	LPG+DME	LPG+Freon+DME
1	Household Cleaner	19	18				1		
2	Kichen Cleaner	6	5					1	
3	Carpet Cleaner	9	8				1		
4	Record Cleaner	7		6			1		
5	Room Deodrant	13	5	1			5	2	
6	Lubricant	17	10	4			3		
7	Electrostatic Polish	5		1			2	2	
8	Waterproof Agent	11	5	5			1		
9	Starch	9	8		1				
10	Portion Detergent	5	5						
11	Eliminant Oder	10	2	2			1	5	
12	Anticide	3						2	1
13	Raticide	1						1	
14	Paint	20	1		6			13	
15	Car Polish	10	5	3		1		1	
16	Another Product	5		5					
	Total	150	72	27	7	1	15	27	1

昭和54年4月に米国においてフレオンの使用が禁止されたことによる影響は認められなかった.

ガス分析と合せてガス圧の測定を行なったところ，最小1.1kg/cm², 最大5.1kg/cm²平均3.2kg/cm²であった.

まとめ

1. 二酸化炭素 プロパン，フレオン-12，*iso*-ブタン，*n*-ブタン，ジメチルエーテル，塩化ビニルモノマーおよびフレオン-11の計8種の液化ガスについて，熱伝導度型検出器付ガスクロマトグラフィーによる定量法の検討を行なった．試料ガスの注入量を0.1ml以下とすることによって保持時間の変動もなく，注入量とそのピーク面積の間に直線関係が認められ，定量が可能となった.

2. 昭和53年4月～54年6月の間に東京都内において入手した16種150検体の家庭用エアゾール製品中の噴射ガスを定量したところ，最も広範に使用されていたガスは LPG であった．フレオンガスは LPG についで多く使用されていた．塩化ビニルモノマーガスは検出されなかった.

3. 家庭用エアゾール製品のガス圧は最小1.1kg/cm², 最大5.1km/cm²平均3.2kg/cm² であった.

文献

1) 観 照雄，植田忠彦，原田 裕文：東京衛研年報，28-1，84，1977
2) 日本規格協会編：JIS K2557，液化石油ガスの炭化水素成分分析法（ガスクロマトグラフ法），1978
3) *ibid.*：JIS K2305，燃料ガスのガスクロマトグラフ分析法，1979
4) *ibid.*：JIS K1518，フロン試験法，1978
5) 日本薬学会編：衛生試験法，680，1980，金原出版

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.*, 31-1, 103-108, 1980

市販食品中におけるサルモネラの増殖態度

斎藤香彦*, 伊藤　武, 柳川義勢*, 丸山　務**, 坂井千三*

Effect of Temperature on Growth of *Salmonellae* in Commercial Foods

KAHIKO SAITOH*, TAKESHI ITOH*, YOSHITOKI YANAGAWA*, TSUTOMU MARUYAMA** and SENZO SAKAI*

Influence of different temperatures on the growth of *Salmonellae* in commercially prepared and sold foods was investigated. *S. typhimurium*, *S. infantis* and *S. thompson* were observed to grow when inoculated into omlette at a temperature range of 15C to 30C. At 30C, the count of these organisms increased from 10^2 cells to over 10^5 cells per gram after 12 hours. Growth was much slower at lower temperatures, but even at 15C, the number of *Salmonellae* in the omlette increased to infective levels in 2 days.

A small number of Salmonellae in liver grew rapidly at 15C to 30C. When stored at 10C, *Salmonellae* counts in the liver increased to 1.4×10^3 pcs/g in 3 days. However, *Salmonellae* did not at all grow in salads at any temperatures. Mayonnaise was found to be effective in preventing the growth of *Salmonellae*. It was observed that pH levels lower than 5.0 were influential in preventing the growth of *Salmonellae*.

Keywords: *Salmonella*, growth, temperature, food

緒　言

サルモネラ食中毒は，食品中で，菌が増殖し，大量の菌を含む食品を摂取した場合に発生するものであると考えられている．したがってサルモネラ食中毒の予防には，他の細菌性食中毒の場合と同様，まず食品への菌の汚染防止と，次に菌に汚染されたことを想定して食品中における菌の増殖を防止することが重要である．しかしながら，サルモネラの場合，家禽，家畜をはじめとして自然界にも広く分布しているので，食品への汚染を根本的に遮断することは不可能に近い．そこで本菌食中毒を予防するためには，食品中での菌の増殖をおさえることが重要となる．

サルモネラの発育，生残あるいは死滅に関連する温度[1,2]，pH[3]，放射線[4]，食塩[5]，水分活性[6]などの影響についてはすでに多くの報告があるが著者らは，サルモネラ食中毒の原因となりやすいいくつかの食品に，実験的にサルモネラを接種し，それぞれの食品中におけるサルモネラ菌数の消長について，特に重要な因子である温度，pH と時間との相互関係を中心に検討を加えた．

材料および方法

供試菌株：供試したサルモネラ菌株は，わが国で発生するサルモネラ食中毒事例の原因菌型として多い *Salmonella typhimurium* 78-74株，*Salmonella infantis* 77-126 株および *Salmonella thompson* 77-366 株を選んだ．これらの菌株はいずれも東京都で発生したサルモネラ食中毒の際，患者ふん便より分離されたものである．

供試食品：実験に供試した食品は，玉子焼，サラダ，生レバーの3品目である．サラダはいずれもマヨネーズが使用されているフレンチサラダ，ポテトサラダ，玉子サラダ，カニ風サラダ，マカロニサラダ，野菜サラダの各々市販品を用いた．玉子焼およびサラダは，できる限り均一な品質を使用するために常に同一メーカーの市販品を供試した．生レバーはブタのレバーで，東京都市場検査所より直接分与を受け，市販流通経路を経ないものである．

サルモネラ生菌数測定：各食品を1ブロック10gずつ秤量し，滅菌容器に入れ，供試菌の Heart infusion broth 37C，18～24時間培養菌を滅菌生理食塩液で希釈し，玉

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

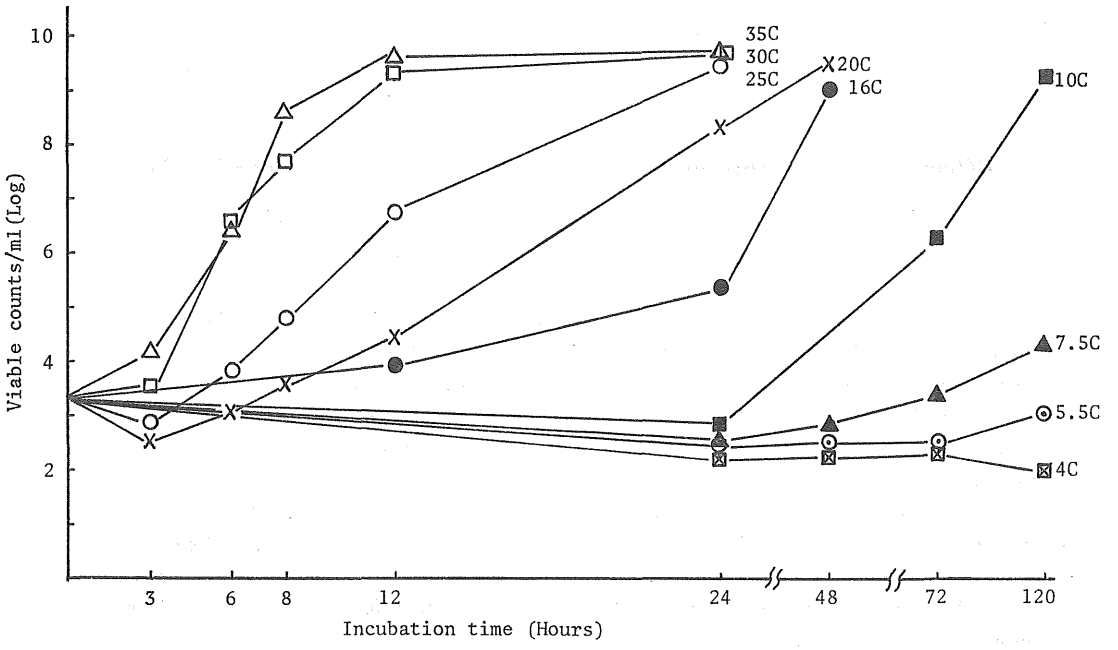


Fig. 1. Growth of *Salmonella typhimurium* in Heart Infusion Broth at Various Temperature

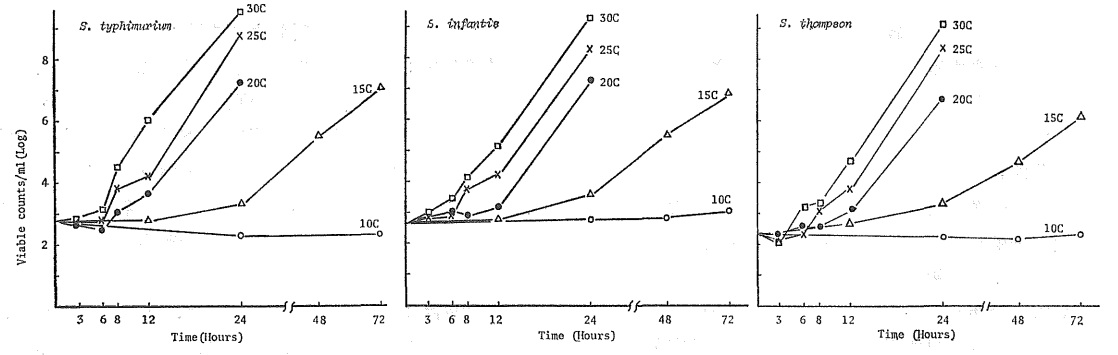


Fig. 2. Growth of *S. typhimurium*, *S. infantis* and *S. thompson* in Egg Roll at Various Temperature

子焼では3～8×10^2個，サラダでは3.2×10^5個，生レバーでは2.5×10^1個をその表面に接種した．菌接種を行なった食品は乾燥を防ぎ各温度条件で保存し，一定時間後に，それぞれの食品中におけるサルモネラ生菌数を測定した．

サルモネラ生菌数の測定は，各食品をブイヨン加生理食塩液で10倍乳剤とし，さらに生理食塩液で10倍希釈列をつくり，それぞれの希釈列の0.1m*l* を MLCB 寒天培地(Mannitol Lysine Crystalviolet Brilliant Green Agar 日水製薬)平板に接種し，コンラージ棒で全面塗布した．37C，18～24時間培養後，出現したサルモネラ集落を数え，生菌数を算出した．

なお，サルモネラ生菌数は各食品のブロックによるバラツキを考慮して，各条件の3ブロックを別々に検査しその平均値をもって表示した．

成　　績

1. Heart infusion broth (Hl ブロス) 中における供試菌株の増殖態度

食品中でのサルモネラの発育を検討する前に，最適培地で，各種温度域における供試菌株の増殖を調べた．供試菌株を HI ブロスに一定量ずつ接種し，温度勾配培養装置（東洋科学 TN3型）を用いて振とう培養し，各培養時間ごとにサルモネラ菌数を測定した．各供試菌株ともほとんど同様の増殖態度を示したので，Fig. 1には，

Table 1. Survivors of *S. typhimurium*, *S. infantis* and *S. thompson* in Salad at 25C and 30C

Salad	pH	*S. typhimurium*		*S. infantis*		*S. thompson*	
		Mean survivors (Cells/g)		Mean survivors (Cells/g)		Mean survivors (Cells/g)	
		Ohr.	25C for 24hr. 30C for 24hr.	Ohr.	25C for 24hr. 30C for 24hr.	Ohr.	25C for 24hr. 30C for 24hr.
French salad	4.41	3.2×10^5	4.0×10^3 5.0×10^2	4.7×10^5	4.0×10^4 8.0×10^3	2.7×10^5	1.2×10^4 4.2×10^3
Egg salad	5.07	3.2×10^5	6.6×10^4 1.0×10^3	4.7×10^5	8.0×10^4 1.0×10^3	2.7×10^5	4.7×10^5 1.0×10^3
Crab salad	5.17	3.2×10^5	5.8×10^4 9.0×10^3	4.7×10^5	4.0×10^4 4.0×10^3	2.7×10^5	1.9×10^4 4.0×10^4
Macaroni salad	4.64	3.2×10^5	1.0×10^3 2.1×10^4	4.7×10^5	6.0×10^4 9.0×10^3	2.7×10^5	2.3×10^4 2.0×10^3
Poteto salad	5.05	3.2×10^5	3.0×10^3 9.0×10^3	4.7×10^5	7.0×10^4 8.0×10^3	2.7×10^5	7.6×10^4 3.0×10^3
Vegetable salad	4.72	3.2×10^5	6.0×10^3 $<10^3$	4.7×10^5	9.0×10^4 8.0×10^3	2.7×10^5	2.1×10^4 $<10^3$

S. typhimurium 78—74株の場合を示した.

5.5C以下で培養した場合のサルモネラ生菌数は，72時間後でも著明な殖増を示さず，接種菌数と同じ10^3個/m*l* であった.

10Cでは，24時間後より増殖がみられ，120時間で10^9個/m*l* に達した．16Cおよび20Cの場合は，12時間後より増殖し，48時間で10^9個/m*l* となった．30Cおよび35では．12時間で10^9個/m*l* となりこの菌数が24時間まで持続した.

2. 市販玉子焼におけるサルモネラの増殖態度

玉子焼の表面にサルモネラを3～8×10^2個/g接種し，10C，15C，20C，25Cおよび30Cの各温度に保存した場合のサルモネラの増殖態度をFig. 2に示した.

S. typhimurium では，10Cに保存した場合，96時間でも菌の増殖は認められなかった．15Cでは，24時間より徐々に増殖し，48時間後で10^5個/g となった．20C以上では，サルモネラの増殖速度が早く，24時間後で約10^7個/g，25Cでは10^8個/gであった．30Cの場合は，保存8時間後ですでに10^4個/g となり，12時間後では，10^5～10^6個/gであった.

S. infantis および *S. thompson* の場合も *S. typhimurium* の場合と同様な結果が認められた.

3. 市販サラダ中でのサルモネラの増殖態度

市販サラダにサルモネラを接種し25Cおよび30Cに24時間静置した場合の接種菌の消長はTable 1に示す通りである．すなわち，HIブロス中では極めて良好な発育を示した25Cおよび30Cでも，供試した6種のサラダではいずれもまったくサルモネラの増殖は認められず，むしろ接種菌の減少が観察され，保存温度が30Cの場合の方が，25C保存よりも急激な菌の減少がみられた．この原因は，サラダに使用されているマヨネーズによるものと考えられるので，マヨネーズに供試菌株を接種し，前述のサラダの場合と同様に検討した.

その結果は，Table 2 に示すごとく，A，Bの2つのメーカーの市販マヨネーズの場合，25C，30C保存のいずれにおいても，接種菌の減少がみられた.

市販サラダおよびマヨネーズ中に接種したサルモネラの減少は，マヨネーズに含まれている食酢およびpHの影響を大きく受けていると思われる．そこでHIブロスのpH値を酢酸緩衝液を用いて調整し，各種pH域におけるサルモネラの増殖態度について検討した．各種pH域のHIブロスに供試菌株の3.4×10^5個/m*l* を接種して30Cで培養したときの成績をFig. 3に示した.

pH 4.0 以下の場合は，菌接種直後からサルモネラ生菌数の減少が認められ，pH3.5 およびpH3.75では3時

Table 2. Survivors of *S. typhimurium*, *S. infantis* and *S. thompson* in Mayonnaise at 25C and 30C

Factory	pH	Tested strains	Inoculated cells/g	Mean survivors (Cells/g)			
				25C		30C	
				24hr.	48hr.	24hr.	48hr.
A	4.05	*S. typhimurium*	1.3×10^5	2.8×10^3	1.0×10^2	3.0×10^3	$<10^2$
		S. infantis	1.3×10^5	2.5×10^2	5.5×10^2	1.0×10^2	$<10^2$
		S. thompson	8.0×10^4	$<10^2$	$<10^2$	3.2×10^3	$<10^2$
B	4.01	*S. typhimurium*	1.4×10^5	6.5×10^2	8.5×10^2	1.0×10^2	$<10^2$
		S. infantis	1.1×10^5	1.5×10^3	3.5×10^3	1.0×10^2	$<10^2$
		S. thompson	2.2×10^4	1.5×10^4	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$

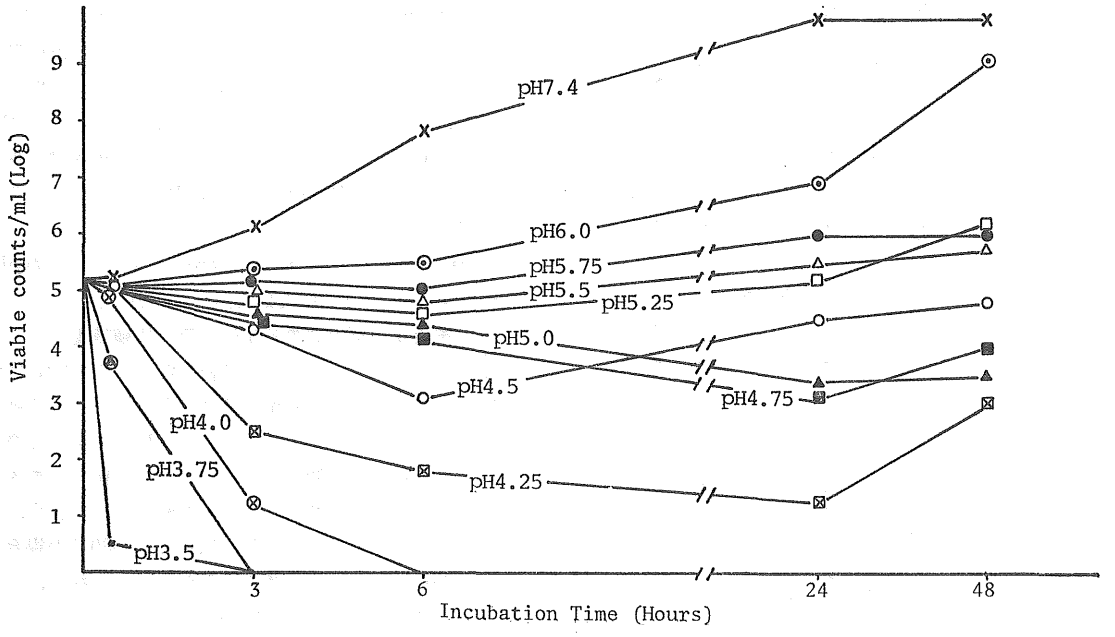


Fig. 3. Influence of pH on Growth and Survivor in Heart Infusion Broth of *S. typhimurium* at 30C

間以後，pH4.0でも6時間以後サルモネラは検出されなかった．pH4.5からpH5.75の場合，菌接種後48時間までほとんど菌数の変化は認められなかった．pH6.0の場合，6時間後から徐々に増殖を示し，48時間で10^9個/m*l* に達した．pH7.4の場合，3時間で10^6個/m*l* に増殖し，24時間で10^9個/m*l* に達した．

4. 生レバーにおけるサルモネラの増殖態度

供試したブタレバーは表面に付着した菌の影響を少なくするため，使用前に次亜塩素酸ソーダ液で洗浄した．洗浄レバー表面にサルモネラを接種し，各種温度における経時的生菌数の増減を検討し，その成績をFig. 4に示した．

10C，15C，20C，25C，30Cの各温度における生レバー中のサルモネラの増殖は，市販玉子焼中でのサルモネラの増殖とほとんど同一増殖パターンを示した．しかし，10Cおよび15Cにおける生レバーのサルモネラの増殖は，10Cでは24時間後より徐々に増殖しはじめ，15Cでは12時間後より増殖し，24時間後で約10^5個/gとなった．20C以上では発育が早く，20Cで，24時間後には10^5個/g，25Cでは10^7個/gであった．30Cの場合は保存8時間後ですでに10^4個/g，12時間で10^5個/g，24時間後では10^8個/gに達した．

考　察

サルモネラ食中毒の場合，サルモネラの生菌を含んだ食物を摂取して発病するのが普通であり，食品中のサル

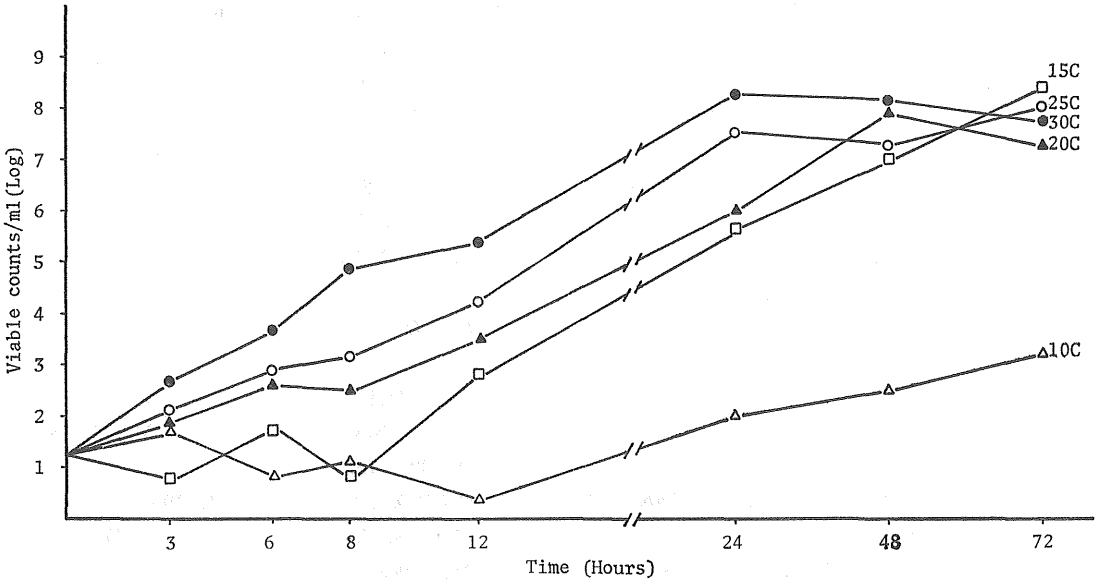


Fig. 4. Growth of *S. typhimurium* in Liver at Various Tempetature

モネラ生菌数が発病への重要な因子となっている. 通常, 発症には食品 1g 当り 10^5個以上の生菌数が必要といわれている.

今回の実験における玉子焼および生レバーでのサルモネラの推移は, ほとんど同様な増殖パターンを示した. すなわち, 10C 以下にこれらの食品を保存した場合, サルモネラの増殖はほとんど認められなかったが, 15C 以上で保存した場合, 6 時間後から急激な菌の増殖が認められ, 生レバーでは, 接種当初 10^1個/g 菌量が12時間後では10^5個/g～10^6個/g に達し, 十分食中毒の原因食となり得ることが確認された.

菌接種後, 25C 8 時間保存した生レバーおよび玉子焼は肉眼的に観察してもほとんど変化はなく, 10C 保存のものは72時間経過後も鮮度の状況を判断することが困難な状態であった.

サルモネラ食中毒の原因食品は通常, 食品中に最初から大量のサルモネラが混入していることは極めて例外的であろう. 少数汚染菌が保存方法等が適切でないために食品中で増殖し, 原因食品となることが多い[8].

今回の実験では極めて少量のサルモネラを接種し観察しているため, 発症に十分な菌量に達するまでに比較的長時間要するようにみえるが, 最初の食品への汚染菌量が多ければこの時間はもっと短縮されることは当然である.

市販サラダの場合は, まったく増殖が認められず, 保存温度が30C の場合の方が, 25C 保存よりも菌数が急激に減少した. これは, サラダに含まれるマヨネーズの pH の影響であることが各 pH に調整した HI ブロスでのサルモネラの増殖態度の実験から証明された.

供試したマヨネーズの pH 値はAメーカー品pH4.05, Bメーカー品 pH4.01 である. Fig. 3 で pH3.5～pH4.0 の範囲についてみるとサルモネラの増殖は, まったく認められず接種直後から生菌数の減少が観察された. このことから, サルモネラは pH4.0 以下の条件では死滅していくことが判明した.

サルモネラの発育許容最低 pH は Chung ら[9]の報告によると, pH4.05±0.05である. 従ってサラダのような食酢の添加が可能な食品では, 食酢を約 3 %程度添加することによってサルモネラの増殖を抑制できるものと考えられる[10].

今回の実験で15C 以上に保存した食品中では, 時間的な差こそあれ, サルモネラの増殖が認められた. 従って食品に汚染しているサルモネラを増殖させないためには冷蔵庫や冷凍庫などを用いて低温保存することが必要である. しかしながら, 冷凍庫に凍結保存した場合は別として, 冷蔵庫における低温保存を過信してはならない. なぜなら, 生レバー中での実験成績では, 10C に保存したレバー中でも12時間以上経過すると徐々にサルモネラの増殖が確認されている. また, サルモネラの発育許容最低温度は5.5～6.8C[11]であるという報告もあり, 著者らの HI ブロスの実験で 7.5C もで本菌の増殖を認めている.

結　論

サルモネラ食中毒予防の基礎資料を得るため，*S.typhimurium*, *S. infantis*, *S. thompson* の各サルモネラを用い，市販品の玉子焼，サラダおよび生レバーにおけるサルモネラの増殖態度について検討した．

サルモネラの増殖可能な低温限界は，およそ7Cであった．

玉子焼，生レバー中でのサルモネラの増殖態度はほとんど同じであり，玉子焼では15C以上で，生レバーでは10C以上で本菌の増殖が認められた．

市販サラダの場合，接種したサルモネラの減少が認められ，その原因は原料のマヨネーズによるpHの低下に起因することが確認された．

文　献

1) Alford, J. A., and Palumbo, S. A.: *Appl. Microbiol.*, 17, 528, 1969
2) Angelotti, R., Foter, M. J., and Lewis, K. H.: *Amer. J. Public. Health.* 51, 76, 1961
3) Matches, J. R., and Liston, J.: *J. Milk Food Technol.*, 35, 49, 1972
4) Matches, J. R., and Liston, J.: *J. Food Sci.* 33, 406, 1968
5) Matches, J. R., and Liston, J.: *J. Milk Food Technol.*, 35, 39, 1972
6) Goepfert, J. M., Iskander, I. K., and Amundson, C. H.: *Appl. Microbiol.*, 19, 429, 1970
7) McCullough, N. B., and Eisele, C. W.: *J. Infec. Dis.*, 88, 278, 1955
8) 坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斎藤香彦，善養寺浩，辺野喜正夫：東京衛研年報，27-1, 16, 1976
9) Chung, K. C., and Goepfert, J. M.: *J. Food Sci.*, 35, 326, 1970
10) 藤原喜久夫：食衛誌，9, 81, 1968
11) Matches, J. R., and Liston, J.: *J. Food Sci.*, 33, 641, 1968

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 109-114, 1980

市販食品における *Bacillus cereus* 汚染の実態と分離菌株の生物型および血清型

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

Survey for Contamination of *Bacillus cereus* in Commercial Foods, and Biotypes and Serotypes of the Isolates

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

Keywords: セレウス菌 *Bacillus cereus*, 汚染 Contamination, 市販食品 Commercial foods, 生物型 biotype, 血清型 serotype

緒言

Bacillus cereus（以下 *B. cereus* と略す）による食中毒事例報告の歴史は古く，1906年に Labenau[1]によってなされ，その後多くの研究者によって報告されてきた．

本菌食中毒の北部ヨーロッパ諸国の報告は潜伏時間が8～16時間で，下痢，腹痛を主徴とする下痢型食中毒である．近年になり，下痢型食中毒と異なる，潜伏時間が1～6時間と短く，嘔気，嘔吐を主症状とする嘔吐型食中毒がイギリスをはじめ，各国でつぎつぎに報告されるようになった．これらの原因食品の多くは中華料理店で喫食されたか，持帰りの調理飯または焼めしによるものである[2]．わが国では米飯類を主食としているにもかかわらず，本菌による食中毒の報告は極めて少ない．

しかしながら，近年，本邦においても *B. cereus* によると推定される食中毒事例が坂井ら[3]，品川ら[4-6]によって報告され，注目されてきている．

B. cereus は土壌，水などの自然環境に広く分布し，食品への汚染の機会は極めて多い．これまでに，わが国における市販食品の本菌汚染調査は楠ら[7]，寺山ら[8]，品川ら[6]によってなされている．本報では *B. cereus* による食中毒予防の基礎資料を得る目的で，坂井ら[3]の食中毒事例報告にみられる推定原因食品のスパゲッティ，仕出し弁当類など，調理済食品を中心に本菌汚染調査を行なった．また各種食品からの分離菌株について生化学的性状を詳細に調べるとともに，小佐々ら[9]による生物型分類および血清型別を行なった．

材料および方法

1. 調査対象

1977年1月～1979年12月の3年間に当所に食品細菌検査のために送付された豆腐1,217件，調理パン1,046件，洋菓子1,016件，そう菜998件，サラダ855件，めん類697件，弁当類636件，和菓子456件，野菜203件，煮豆・きんとん196件，粉末食品164件，弁当類似食品119件およびスパゲッティ75件など，合計7,678件を調査対象とした．

2. 分離用培地

B. cereus の分離用培地としては，普通カンテン培地（市販品）1 *l* 分に，マンニット10g，ポリミキシン-B50単位/m*l*，フエノールレッド（PR）0.2%液20m*l* および50%卵黄液100m*l* を添加したものを平板として用いた．（以下ＮＹ平板培地と略す）

3. *B. cereus* の検査法

食品10gを秤量し，これに滅菌10%ブイヨン加生理食塩液を90m*l* 加え，10%乳剤とした．この乳剤の0.1m*l* をＮＹ平板培地に注加し，コンラージ棒で培地全面に塗抹し，37℃20時間培養した．ＮＹ平板培地上でレシチナーゼ反応陽性集落を主に，扁平なＲ～Ｓ型の集落を形成するものを *B. cereus* として算定した．また各検体ごとに原則として3個の集落を釣菌し，半流動培地に穿刺培養後，ゴム栓をして保存し，生化学的性状試験，生物型分類および血清型別に供試した．

4. 生化学的性状試験

運動性，嫌気的条件下での発育・グルコースの分解，レシチナーゼ反応，澱粉分解，ゲラチン分解，7.5%食塩耐容性，リゾチーム感受性，窒化ナトリウム感受性，クエン酸塩の利用性，ＶＰ反応，各種糖分解（グルコース，サッカロース，サリシン，マンノース，セロビオース，アラビノース，キシロース，マンニット），エスクリン分解および尿素分解性などについて，田村[10]，村上[11]，東[12-13]の記載の方法に従い生化学的性状を調べた．

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

表 1. 各種市販食品からの *B. cereus* の検出状況
(1977. 1～1979. 12.)

食品	検体数	陽性数	検出率(%)
豆腐	1,217	887	72.9
生野菜	203	84	41.4
粉末食品	164	41	25.0
弁当類似食品	119	19	16.0
洋菓子	1,016	153	15.1
めん類	697	97	13.9
弁当類	636	87	13.7
調理パン	1,046	114	10.9
サラダ	855	85	9.9
和菓子	456	39	8.6
そう菜	998	86	8.6
スパゲッティ	75	4	5.3
煮豆・きんとん	196	1	0.5
計	7,678	1,697	22.1

5. 生物型分類

生物型分類は小佐々ら[9]の方法によった.

6. 血清型別

Taylor & Gilbert[14]が報告した1～18型のH型別用血清と, 寺山ら[8]が新たに追加したT1～18のH型別用血清を用いて行なった.

成績

1. 市販食品における *B. cereus* の汚染

各種市販食品からの *B. cereus* の検索成績を表1に示した. 豆腐1,217件中887件 (72.9%) から本菌が検出され, これまでの汚染調査報告と同様に, 各種市販食品中で最も高い汚染率であった. ついで汚染率の高いのは生野菜で203件中84件 (41.4%), また粉末食品として示した, ふりかけ, ベビーフード, けずりぶしなどの場合も164件中41件 (25.0%) と高い汚染率であった.

今回の本菌汚染調査の中心に考えたスパゲッティは75件中4件 (5.3%) と比較的低い汚染率であったが, 仕出し弁当類では636件中87件 (13.7%) とかなりの汚染率であった. 表中に弁当類似食品として記した食品は, 既製のグラタン, 焼そば, ピザ, スパゲッティ, 五目めしなどである. 本食品の場合は119件中19件 (16.0%), 洋菓子1,016件中153件 (15.1%) が陽性であった. 煮豆・きんとんなどは196件中1件 (0.5%) が陽性であり, 他の食品よりも極めて低い汚染率であった.

2. *B. cereus* 菌数と一般生菌数および大腸菌群数との関係

1979年1月～12月の1年間の各種市販食品における

表 2. 各種市販食品の汚染 *B. cereus* 菌数と一般生菌数および大腸菌群数との関係 (1979. 1～12)

食品	B. cereus 陽性検体数	B. cereus/g 10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	一般生菌数/g 10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	0<10	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	大腸菌群数/g
豆腐	247	87	75	62	20	3			1	37	108	77	17	6	1	29	136	33	31	13	3	2		
生野菜	34	14	13	6	1						3	2	10	19		4	8	5	10	1	4	2		
粉末食品	41	31	10					4	6	9	12	8		2		25	15		1					
弁当類似食品	19	9	8	2					1	3	5	5	4	1		6	5		3	1	1	2	1	
弁当類	39	27	6	6				1		5	11	6	12	3	1	3	9	5	6	7	5	3	1	
洋菓子	41	31	7	1	1	1			3	10	11	8	6	3		5	14	9	5	5	2	1		
調理パン	29	23	3	2	1				1	2	7	5	9	5		1	2	7	4	8	3	3	1	
めん類	20	16		1	3					5	9	2	2	2		3	11	1	3	1		1		
サラダ	27	21	3	2	1				1	2	5	5	9	5		1	2	6	4	8	2	3	1	
和菓子	11	9	2						2	1	5	2	1			5	4	1	1					
そう菜	10	9	1					1	1	2	5		1			1	4	1	3			1		
スパゲッティ	4	2	1	1				1	1				1	1		2					2			
煮豆・きんとん	1	1							1								1							

＊表中の数値は食品検体数を表わす.

表 3. 各種市販食品から検出された *B. cereus* の生化学的性状

性状	陽性菌株数	陽性率(%)
運動性	155	100.0
嫌気的条件下での発育	155	100.0
嫌気的条件下でのグルコース分解	155	100.0
レシチナーゼ反応	148	95.5
澱粉分解	45	29.0
ゲラチン分解	142	91.6
7.5%食塩耐容性	152	98.1
リゾチーム (10μg/ml)	R*142	91.6
窒化ナトリウム (200μg/ml)	R* 3	1.9
クエン酸塩の利用性	16	10.3
VP反応	148	95.5
好気的条件下でのグルコース分解	155	100.0
サッカロース	88	56.8
サリシン	44	28.4
マンノース	19	12.3
セロビオース	39	25.2
アラビノース	1	0.6
キシロース	5	3.2
マンニット	1	0.6
エスクリン分解	59	38.1
ウレア分解	35	22.6

* R: Resistance

B. cereus の汚染菌数と一般生菌数および大腸菌群数との関連性を調べた成績を表2に示した. 最も *B. cereus* 汚染率の高い豆腐では, 一般生菌数が 10^4/g 以上のものが約85%を占めているが, 大腸菌群数は10以下/gのものが, 66.8%認められた. 洋菓子においても同様の傾向がみられ, 一般生菌数が高い割合に, 大腸菌群数は低い成績であった. この傾向は *B. cereus* の検出されない豆腐, 洋菓子においても同様であった.

粉末食品では *B. cereus* の菌数は少ないが, 一般生菌数は比較的多く, 10^7/g のものも認められた. しかしながら, 大腸菌群陰性のものが41件中25件 (60.9%) も存在し, 特徴的であった.

弁当類似食品および仕出し弁当類では *B. cereus* 菌数が10^2から10^4/g であったが, 一般生菌数は10^1から10^8/g と幅広く, また大腸菌群数も0から10^6/g とばらつきが認められた.

調理パン, めん類, サラダおよびそう菜などでは, *B. cereus* の検出された検体の方が, 検出されない検体よりも, 一般生菌数, 大腸菌群数ともに1オーダーから2オーダー高い値を示した.

表 4. 各種市販食品由来 *B. cereus* の生物型

生物型	VP反応	サッカロース	澱粉分解	サリシン	エスクリン	マンノース	セロビオース	レシチナーゼ	ウレアーゼ	豆腐	弁当類	スパゲッティ	その他	計
I	+	+	+	+	−	−	−	+	−					
II	+	−	−	+	+	−	+	+	+		1			1
III	+	−	−	−	−	−	−	+	−	11	3		1	15
IV	+	+	−	−	−	−	−	− (w+)	−	2				2
V	+	+	−	−	−	−	−	+	−	15	12		8	35
VI	+	+	+	−	−	−	−	+	−	5	3			8
VII	+	+	+	+	+	−	+	+	−	2				2
VIII	+	−	+	w+	−	+	−	+	+					
IX	+	−	+	+	+	−	+	+	−					
X	+	−	+	+	−	−	−	+	+					
XI	+	+	+	+	−	+	−	+	−					
XII	+	−	+	−	−	−	−	+	−					
型別菌株数計										35	19		9	63
型不明菌株数計										31	43	6	12	92
総菌株数計										66	62	6	21	155

表 5. 各種市販食品から検出された *B. cereus* のH血清型

食品	供試菌株数	型別菌株数(%)	Taylor & Gilbert の血清型																寺山らの血清型															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
弁当	62 (100)	33 (53.2)	13				1		7							3											3		2				4					
豆腐	66 (100)	42 (63.6)	13				3		3				1		12						1		2		5				1	1							
スパゲッティ	6 (100)	5 (83.3)								2												3															
その他	21 (100)	16 (76.2)	3										2	4	3								1										3				
計	155 (100)	96 (61.9)	29 (18.7)				4 (2.6)		12 (7.7)				3 (1.9)	4 (2.6)	18 (11.6)						1 (0.6)	3 (1.9)	3 (1.9)		8 (5.2)			3 (1.9)	1 (0.6)			7 (4.5)					

3. 生化学的性状

各種市販食品から検出された *B. cereus* 155株の生化学的性状を検討した結果を表3に示した．供試したすべての菌株は運動性を有し，嫌気的条件下で発育，嫌気的条件下でグルコースを分解した．7.5% 食塩存在下で発育不能のものが155株中3株（1.9%）みられ，またレシチナーゼ反応およびVP反応ともに陰性株が7株認められた．クエン酸塩の利用性，各種糖分解については，かなり菌株によるばらつきが認められた．

4. 生物型

分離155株について小佐々ら[9]の方法により生物型分類を行なった結果を表4に示した．155株中63株が型別され，型別率40.6%であった．生物型Ⅰ～Ⅻのうち，6型に型別され，そのうちⅤ型が最も多く，63株中35株(55.6%)，ついでⅢ型が15株（23.8%），Ⅵ型8株(12.6%)であった．食品の種類と生物型との関連性があるか否かについては，型別率が低く，菌株数が少ないために明らかでない．

5. H血清型

Taylor & Gilbert の18型の抗血清および寺山ら[8]の18型の抗血清を用いて分離菌株のH血清型別を行なった結果を表5に示した．155株中96株（61.9%）が型別された．食品の種類別による血清型の片寄りは認められなかった．供試株のうち，最も多い血清型は Taylor & Gilbert の1型で96株中29株(18.7%)であった．ついで14型が18株（11.6%），8型12株（7.7%），寺山らの血清型のT6型が8株（5.2%）の順であった．

考　察

わが国では，年間1,000件以上の食中毒事件の発生があり，そのうち細菌によるものが60% 以上を占めている．

しかしながら，原因不明のものが，25%以上にも及んでおり[15]，その多くは症状，原因食品などにより細菌性のものと推測され，既知食中毒原因菌以外の食中毒起因細菌の存在が考えられている．

諸外国においては *B. cereus* が食中毒原因菌であるという事例報告が多い．しかし，わが国においては *B. cereus* による食中毒の報告は極めて少ない．その理由の一つとして，*B. cereus* は自然界に広く分布し，食品の腐敗細菌，いわゆる雑菌として取扱われ，食中毒起因菌として，重要視されていなかったためと思われる．しかしながら，本邦においても近年，本菌食中毒事例が坂井ら[3]，品川ら[4-6]によって報告され，わが国においても，本菌食中毒発生が決して少なくないことが示唆された．

このような観点から，本菌食中毒予防の基礎資料を得るために，食中毒事例報告にみられる推定原因食品のスパゲッティ，洋菓子ならびに仕出し弁当などを中心に，各種市販食品の *B. cereus* 汚染調査を実施した結果，豆腐の72.9%から，弁当類13.7%，洋菓子15.1%など，そのまま喫食される食品から高率に *B. cereus* が検出された．

豆腐における本菌の増殖態度については私どもの調査[16]では25℃に24時間放置されたものでは 10^8～10^7/gに増殖した．他の各種食品中での本菌の増殖態度，芽胞形成，エンテロトキシン産生性などは今後追究していかなければならない課題である．

つぎに *B. cereus* の検出された食品における一般生菌数ならびに大腸菌群数を調べた結果，一般生菌数は 10^5/g 以上のものが多数みられるのに対して，大腸菌群数は≦10/g のものが大半を占め，粉末食品などでは一般生菌数は 10^7/g に達するものが存在するにもかかわらず，大腸菌群数0のものが60%以上を占め，*B. cereus* の食品汚染と大腸菌群の汚染との関連性はほとんど認められなかった．

各種食品由来株の生化学的性状の検討では，運動性，嫌気的条件下での発育，グルコースの発酵などの性状はすべての株が一致したが，他の性状はかなりばらついた．

これらの成績をもとに，小佐々ら[9]の方法により生物型分類を試みた結果，型別率は40.6%と低く，食品の種類との関連性などについては言及し得る資料が得られなかった．一方，品川ら[6]は食中毒原因株の多くが，澱粉非分解性であることを指摘し，また小佐々ら[9]は食中毒由来株および事故卵由来株の多くが，澱粉非分解性の生物型Ⅱ，Ⅲ，ⅣおよびⅤ型に属していることを報告している．私どもの成績では，生物型別された63株中53株(85.0%)が，それらの型であり，食中毒原性を有する可能性が示唆された．

またH血清型別を行なった結果では，約62%が型別され，寺山ら[8]の豆腐の本菌汚染調査成績と同率であり，各種市販食品から食中毒事例で最も多い[14,17]，Taylor & Gilbert の1型菌が高頻度に検出されたことは注目すべき点といえよう．

結　論

1977年1月～1979年12月の3年間に，東京都内の各種市販食品における *B. cereus* の汚染状態を調査するとともに，各種食品からの分離菌の生化学的性状，生物型およびH血清型を検討し，以下の成績を得た．

1) 市販食品の *B. cereus* 汚染は，豆腐1,217件中887件（72.9%），ついで生野菜203件中84件（41.4%），粉末食品164件中41件（25.0%），弁当類似食品119件中19件（16.0%），洋菓子1,016件中153件（15.1%），めん類697件中97件（13.9%），弁当類636件中87件（13.7%），調理パン1,046件中114件（10.9%），サラダ855件中85件（9.9%），そう菜998件中86件（8.6%），和菓子456件中39件（8.6%），スパゲッティ75件中4件（5.3%）および煮豆・きんとん196件中1件（0.5%）であった．

2) *B. cereus* 汚染の認められる食品の中で，豆腐，洋菓子および和菓子を除くその他の食品は，*B. cereus* 汚染を受けていない食品よりも一般生菌数が多い傾向を示した．

3) 生物型分類を行なった *B. cereus* 155株のうち，63株が型別され，そのうちⅤ型35株（55.6%），ついでⅢ型15株，Ⅵ型8株，Ⅳ，Ⅶ型各2株，Ⅱ型1株であった．

4) *B. cereus* 155株のH血清型別を行なった結果，96株（61.9%）が型別され，食中毒由来株の中で最も多いTaylor & Gilbert の1型菌が，市販食品由来株の中に96株中29株（18.7%）認められた．

文　献

1) Labenau, C.: *Zentralbl. Bakteriol.*, I Orig. 40, 433, 1906
2) Gilbert, R. J., and Taylor, A. J.: *Arch. Lebensmittelhyg.*, 26, 38, 1975
3) 坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斎藤香彦，柳川義勢，稲葉美佐子，甲斐明美，新垣正夫，寺山　武：東京都衛生局学会誌，61，343，1978
4) 品川邦汎，新原富夫，国田信治，小林　貞：大阪府立公衛研所報，食品衛生編，9，125，1978
5) 品川邦汎，国田信治，小崎俊司，阪口玄二：大阪府立公衛研所報，食品衛生編，9，131，1978
6) 品川邦汎，国田信治，佐々木　寧，岡本　晃：食衛誌，20，431，1979
7) 楠　淳，池島伸至，新井輝義，神　真知子，入倉善久，友成正臣，伊藤　武，坂井千三：東京衛研年報 28-1，11，1977
8) 寺山　武，新垣正夫，山田澄夫，潮田　弘，五十嵐英夫，坂井千三，善養寺浩：食衛誌，19，98，1978
9) 小佐々学，和気迪子，東　量三：東京獣医畜産学雑誌，25，38，1977
10) 田村利勝：メデイヤサークル，13，225，1968
11) 村上　一：モダンメディア，23，131，1977
12) 東　量三：ニューフードインダストリー，4（9），67，1962

13) 東　量三：ニューフードインダストリー，4 (10)，61，1962
14) Taylor, A. J., and Gilbert, R. J. : *J. Med. Microbiol.*, 8, 543, 1975
15) 厚生省大臣官房統計情報部編，伝染病及び食中毒統計，昭和53年
16) 寺山　武，五十嵐英夫，潮田　弘，山田澄夫，新垣正夫，坂井千三，池島伸至，楠　淳，新井輝義，神真知子，入倉善久，友成正臣，佐野　隆，山田武勝，安部勇三，鈴木迪夫，斎藤　修，能登屋耕二：東京衛研年報，29-1，143，1978
17) Gilbert, R. J. : *Bacillus cereus Gastroenteritis*, 2nd ed., 495, 1979, H. Riemann & F. L. Bryan. Academic Pr. N. Y.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 115-121, 1980

生乳からの *Staphylococcus aureus* の検出と分離菌株の性状，エンテロトキシン産生性およびコアグラーゼ型の検討

寺山 武*，新垣正夫*，五十嵐英夫*，潮田 弘*
高橋正樹*，坂井千三*，山田 満**，美藤克幸**
茂木利夫**，山口安夫**

Incidence of *Staphylococcus aureus* in Bovine Raw Milk and some Characteristics, Enterotoxin Producibility and Coagulase Types of the Isolates

TAKESHI TERAYAMA*, MASAO SHINGAKI*, HIDEO IGARASHI*, HIROSHI USHIODA*, MASAKI TAKAHASHI*, SENZO SAKAI*, MITSURU YAMADA**, KATSUYUKI MITO**, TOSHIO MOTEGI** and YASUO YAMAGUCHI**

During the period from July through November 1978, a total of 222 raw milk samples consisting of 170 from tank lorries and 52 from storage tanks of 7 dairy plants in Tokyo were subjected to analysis for the presence of *Staphylococcus aureus*. For the isolation, surface plating method with Mannitol Salt Egg Yolk agar plate was used. After the inoculation of 0.1m*l* of the specimen, plates were incubated at 35℃ for 48 hours.

Consequently, it was found that 112 samples(65.9%)from 170 tank lorries and 34(65.4%)from 52 storage tanks had harbored *S. aureus*. Throughout the survey, a total of 202 strains of *S. aureus* were isolated. They were positive on rabbit plasma coagulation, mannitol fermentation, egg yolk reaction, and DNase test.

Among the 202 strains tested, 84 (41.6%) produced some of the enterotoxins A–D, viz., 15 strains produced toxin A, 16 strains toxin B, 38 toxin C, 7 toxin D; while 1 strain produced toxins A and C, 2 strains toxins A and D, 3 strains B and C, and 2 strains A, B and C. However, none of the isolates produced toxin E.

With regard to the coagulase types of the isolates, type III (28.7%) and VII(26.2%) were the dominant types among the 8 coagulase types.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, raw milk, enterotoxin, coagulase type, characteristics

Staphylococcus aureus はヒトの各種化膿性疾患の原因となるばかりでなく，細菌性食中毒の原因菌として重要な細菌であることから，公衆衛生上注目されている．また，本菌は動物における化膿性疾患の原因菌でもあり，特に，ウシ，ヤギおよびヒツジなど，搾乳用家畜の乳房炎の原因菌として重要な細菌である．酪農家にとって，ウシの乳房炎の発生は経済的影響が極めて大である．一方，乳房炎に罹患したウシから搾乳される生乳中には極めて多数の *S. aureus* が混入する可能性があるので，公衆衛生学的見地からもウシの乳房炎は重要な問題である．こうしたことから，ウシの乳房炎に関する調査は獣医学領域の研究者によって古くからよく行なわれている．

わが国におけるウシ乳房炎の実態調査および乳房炎ウシの乳汁からの *S. aureus* の分離と分離菌株についての性状およびファージ型別については，これまでも多くの報告がなされている[1-12]．しかしながら，食中毒との関連を知る上で極めて有効なコアグラーゼ型別や本菌食中毒の原因物質であるエンテロトキシンの産生性についてはまったく検討されていない．

東京都には大手乳業メーカーの市乳プラントがあり，東京近県より大量の生乳が搬入され，市乳として加工されている．都では，衛生局環境衛生部獣医衛生課牛乳検査室において，生乳の品質検査を行ない，不良原料乳の

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

排除につとめている．本報では，乳および乳製品に起因するブドウ球菌食中毒の予防を目的として，東京都内の乳処理工場に搬入される生乳における *S. aureus* 汚染の実態を明らかにすると共に，分離菌株のコアグラーゼ型別およびエンテロトキシン産生性を中心に各種性状を検討したので，その成績について報告する．

材料および方法

1. 調査対象

1978年7～11月の間に東京都内の7か所の乳処理工場に搬入された原料乳を対象として *S. aureus* の検出を試みた．東京，埼玉，神奈川，千葉，茨城，栃木，群馬および福島の1都7県からタンクローリーで運ばれてきた生乳を1タンクローリーを1件として，170台より材料を採取した．また，乳処理工場の生乳貯乳槽に集められた生乳を日別に採取した52件を検査材料とした．

2. *S. aureus* の分離培養

検査材料からの *S. aureus* の検出はマンニット食塩寒天に卵黄を加えた MSEY 培地[13]に検体として採取した生乳0.1m*l* をとり，コンラージ棒で培地全面に塗抹し，35℃で48時間培養する方法によった．今回の調査では，MSEY 培地でマンニット分解性で卵黄反応陽性の集落のみを *S. aureus* と推定し，1平板培地あたり2個の集落について同定試験を行なった．*S. aureus* の菌数測定は，MSEY 培地上でマンニット分解性で卵黄反応陽性の集落を数え，供試材料 0.1m*l* あたりの菌数をもとめ，その数値より 1m*l* あたりの *S. aureus* 菌数を算出した．MSEY 培地でマンニット分解性で明瞭な卵黄反応を示した集落はいずれも *S. aureus* と同定された．こうして検出された *S. aureus* を原則的に1検体あたり2個の集落を任意に選んだ202株について各種性状試験およびコアグラーゼ型別を行なった．

3. 性状試験

S. aureus の分類学上重要な生物学的性状および保菌動物種により生物型別が可能であるとされているいくつかの生化学的性状について以下のごとく行なった．

1) **コアグラーゼ試験**：Brain heart infusion broth (BHI) にウサギ血漿またはウシ血漿を無菌的に10％に加えたものを，10×100mm の滅菌試験管に 1.0m*l* あて分注し，これに供試菌株の BHI 35℃ 1夜培養菌液を0.1m*l* あて接種し，35℃で培養した．培養後2，4，6，8，24，48および72時間の各時間ごとに，血漿凝固の有無を観察した．血漿凝固の判定基準として，血漿培地全体がゼリー状に凝固したものはもちろん陽性としたほか，血漿培地がわずかに凝固したもの，あるいはフィブリンの析出が明瞭に認められたものをすべて陽性とした．

2) **マンニット分解性**：マンニットの分解性は分離培養の段階で好気的条件のもとで陽性のものだけを選択したが，さらに純培養菌について，MSEY 培地で好気的および嫌気的条件で35℃48時間培養して判定した．

3) **DNase 産生**：市販の DNA 培地（栄研）を用いて試験した．

4) **卵黄反応**：*S. aureus* の分離用培地として用いた MSEY 培地により判定した．

5) **フィブリノリジン産生**：普通寒天培地を滅菌後55℃に保ったものに，ウサギ血漿またはイヌ血漿を15％に加え，これを60℃10分間加熱してフィブリンを析出させ，滅菌シャーレに20m*l* あて分注して平板培地とした．この培地に供試菌株をスポット培養し，35℃で24時間および48時間培養後に集落周囲のフィブリン溶解による透明環形成の有無によってフィブリノリジン産生性を判定した．

6) **溶血毒産生試験**：寒天濃度 1.0％ の普通寒天培地に後述する種々の洗浄赤血球を最終濃度 1.0％ に加えた血球寒天平板に供試菌をスポット培養する方法によった．α溶血毒産生試験にはウサギ赤血球を，β溶血毒産生試験にはヒツジ赤血球を，δ溶血毒産生試験にはヒト赤血球を加えた血球寒天平板を用いた．αおよびδ溶血毒の産生は35℃24時間培養後，集落周囲の溶血環の形成の有無により，β溶血毒の産生は35℃24時間培養後，さらに4℃に1夜置き，hot cold lysis による溶血環の形成の有無によって判定した．

4. エンテロトキシン産生性および産生エンテロトキシン型の決定

BHI 培地で35℃ 24時間振盪培養した遠沈上清を検査材料として，Yamada *et al.*[14] の逆受身赤血球凝集反応 (RPHA) によってエンテロトキシンの検出を行なうと共に，産生毒素型を決定した．菌株によっては，培養上清中に非特異凝集素を産生するものがあるので，こうした菌株では RPHA 法でエンテロトキシンの検出が不可能である．非特異凝集を示したものは，その培養上清を未感作赤血球で吸収を行ない，非特異凝集素が完全に吸収できたものについては再度 RPHA 法によってエンテロトキシンの検出を試みた．この操作で非特異凝集素が吸収できなかったものについては，今回はエンテロトキシン陰性株として集計することにした．

5. コアグラーゼ型別

潮田ら[15]の簡易コアグラーゼ型別法によって型別を行なった．

成　　績

生乳からの *S. aureus* の検出

Table 1. Isolation of *Staphylococcus aureus* from Bovine Raw Milk

Origin of sample	No. of sample tested	Total no. of positive sample (%)	No. of positive sample by *S. aureus* count (%)*			
			<100	<300	<1,000	>1,000/ml
Tank lorry	170	112 (65.9)	17 (15.2)	43 (38.4)	46 (41.1)	6 (5.4)
Storage tank	52	34 (65.4)	8 (23.5)	11 (32.4)	15 (44.1)	0
Total	222 (100)	146 (65.8)	25 (17.1)	54 (37.0)	61 (41.8)	6 (4.1)

* It means the percent against total number of positive sample

生産地で集乳され，輸送用タンクローリーで東京都内の乳処理工場に搬入された生乳および乳処理工場の貯乳槽から採取された生乳からの *S. aureus* の検査成績を Table 1 に示した．タンクローリーより採取された生乳からの *S. aureus* の検出は170件中112件（65.9%）であり，貯乳槽からの生乳からは52件中34件（65.4%）で，両者において検出率にはほとんど差は認められなかった．生乳中に認められた *S. aureus* の生菌数は，タンクローリーからの材料では *S. aureus* 陽性の112件中，<100/ml が17件，<300/ml が43件，<1,000/ml が46件と>1,000/ml が6件であり，*S. aureus* が検出されたものの約95%は本菌数が<1,000/ml であった．一方，貯乳槽からの材料では，*S. aureus* が陽性の34件中，本菌数は<100/ml が8件，<300/ml が11件，<1,000/ml が15件であり，>1,000/ml のものは1例も認められなかった．タンクローリーおよび貯乳槽からの生乳における *S. aureus* の汚染率には差はみられなかったが，全体的にタンクローリーの生乳の方が貯乳槽乳よりも *S. aureus* 菌数が多い傾向であった．

S. aureus 分離菌株の性状

S. aureus が認められたタンクローリーおよび貯乳槽の生乳146件から各検体ごとに1～2個の集落を任意に選んで純培養した202株について各種性状を検討した成績を Table 2 に示した．コアグラーゼ試験についてはウサギ血漿を用いて行なった結果と，ウシやヒツジなどの動物由来 *S. aureus* だけが特異的にウシ血漿を凝固する[16,17]とされているので，ウシ血漿凝固性について検討した成績もあわせて示した．供試した *S. aureus* 202株はすべてウサギ血漿を凝固したが，ウシ血漿を凝固したものは106/202（52.5%）であった．ウサギ血漿はすべての菌株が24時間以内に凝固を生じたが，ウシ血漿は大部分の菌株が2～3日で凝固を生ずる程度の弱いものであった．

マンニット分解性，卵黄反応および DNase はすべての菌株が陽性であった．フィブリノリジンはヒト由来株のみ陽性で，ウシ由来株はすべて陰性であるとされているが[16,17]，本調査ではウシ生乳由来 *S. aureus* 176株中100株（56.8%）が陽性であった．溶血毒産生はα毒素産生が194/202（96.0%），β毒素が95/202（47%）そしてδ毒素が126/202（62.4%）であった．エンテロトキシン産生株は84/202（41.6%）に認められた．

Table 2. Characteristics of the Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Raw Milk

Characteristics	No. of strain tested	No. of positive strain (%)	No. of negative strain
Coagulase	202	202 (100)	0
Rabbit plasma		202 (100)	0
Bovine plasma		106 (52.5)	96
Mannitol fermentation	202	202 (100)	0
DNase	202	202 (100)	0
Egg Yolk reaction	202	202 (100)	0
Fibrinolysin	176	100 (56.8)	76
Hemolysin	202		
α		194 (96.0)	8
β		95 (47.0)	107
δ		126 (62.4)	76
Enterotoxin	202	84 (41.6)	118

S. aureus 分離菌株のコアグラーゼ型

生乳から検出された *S. aureus* 分離株202株のコアグラーゼ型別の結果を Table 3 に示した．タンクローリーおよび貯乳槽いずれの生乳から分離された *S. aureus* ともそのすべてがコアグラーゼⅠ～Ⅷ型のいずれかに型別され，しかもその両由来菌株のコアグラーゼ型にはほとんど差が認められなかった．コアグラーゼ型分布をみると，Ⅳ型が1株も認められず，それに対して，Ⅱ型，Ⅲ型およびⅦ型が比較的多く，それぞれ18.3%，28.7%と

Table 3. Coagulase Type of the Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Raw Milk

Origin of strain	No. of strain tested	No. of strain in individual coagulase type (%)							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Tank lorry	159	8 (5.0)	31 (19.5)	47 (29.6)	0	6 (3.8)	11 (6.9)	40 (25.2)	16 (10.1)
Storage tank	43	4 (9.3)	6 (14.0)	11 (25.6)	0	1 (2.3)	5 (11.6)	13 (30.2)	3 (7.0)
Total (%)	202 (100)	12 (5.9)	37 (18.3)	58 (28.7)	0	7 (3.5)	16 (7.9)	53 (26.2)	19 (9.4)

Table 4. Relation to Coagulase Type and Coagulation of Rabbit and Bovine Plasma of the Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Raw Milk

Coagulase type	No. of strain tested	Rabbit plasma		Bovine plasma	
		No. of positive strain	No. of negative strain	No. of positive strain (%)	No. of negative strain
I	12	12	0	8 (66.7)	4
II	37	37	0	35 (94.6)	2
III	58	58	0	9 (15.5)	49
IV	0	—	—	—	—
V	7	7	0	3 (42.9)	4
VI	16	16	0	11 (68.8)	5
VII	53	53	0	21 (39.6)	32
VIII	19	19	0	19 (100)	0
Total (%)	202 (100)	202 (100)	0	106 (52.5)	96

26.2%を占め，この3型で全体の73.3%を占めていた．コアグラーゼⅠ型，Ⅴ型，Ⅵ型およびⅧ型はいずれも10%以下であった．しかしながら，これまでにヒトの各種材料からはまれにしか分離されていないコアグラーゼⅧ型の *S. aureus* が9.4%に認められたことは注目される．

S. aureus 分離菌株のコアグラーゼ型と各種性状との関係

生乳から分離された *S. aureus* 菌株のコアグラーゼ型とその他の性状との関係を検討した成績をTable 4～7に示す．Table 4 はコアグラーゼ型と血漿凝固性，特にウシ血漿凝固性との関係を示したものである．当然のことながら，ウサギ血漿はすべての菌株が凝固した．しかしながら，ウシ血漿凝固性は菌株のコアグラーゼ型によってかなり異なっていた．すなわち，コアグラーゼⅧ型菌は19株のすべてがウシ血漿凝固性陽性，ついでⅡ型菌は94.6%．Ⅵ型菌は68.8%，Ⅰ型菌は66.7%が陽性であったが，Ⅲ型，Ⅴ型およびⅦ型菌はそれぞれ15.5%，42.9%，39.6%が陽性であるにすぎなかった．生乳からの *S. aureus* 分離株の202株中コアグラーゼⅢ型は最も多い菌型で58株存在したが，この型の *S. aureus* にウシ血漿凝固性陰性の菌株が多く認められたことはウシ由来コアグラーゼⅢ型菌の特徴として注目される．

溶血毒産生性とコアグラーゼ型との関係を示したのがTable 5 である．表から明らかなごとく，コアグラーゼ型と溶血毒産生性および産生溶血毒の種類との間にはまったく関連性は認められない．

Table 6 はコアグラーゼ型とフィブリノリジン産生性との関係を検討したものである．表から明らかなようにフィブリノリジン産生性は菌株のコアグラーゼ型とはまったく関係なく，いずれのコアグラーゼ型の *S. aureus* でもその約50%の菌株が陽性であった．

Table 7 は生乳由来 *S. aureus* 分離株のエンテロトキシン産生性，産生エンテロトキシン型およびコアグラーゼ型との関係を示したものである．エンテロトキシンを産生した84株のうち，最も多く認められたエンテロトキシン型はC型であり，単独および複数の毒素を産生したものを含めると44株（52.4%）を占めていた．ついでB型毒素産生株が21株(25.0%)，Aが20株（23.8%）であった．D型毒素産生株は9株（10.7%）と少なく，さらにE型毒素産生株は1株も認められなかった．複数の毒

Table 5. Relation to Coagulase Type and Hemolysin Production of the Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Raw Milk

Coagulase type	No. of strain tested	No. of strain which produce hemolysin							
		Total			Individual				
		α	β	δ	α	β	α+β	α+δ	α+β+δ
I	12	12	5	6	4	—	2	3	3
II	37	35	22	24	5	2	6	10	14
III	58	55	34	41	5	3	9	19	22
IV	0	—	—	—	—	—	—	—	—
V	7	7	2	5	2	—	—	3	2
VI	16	14	7	7	7	2	—	2	5
VII	53	52	17	33	17	1	2	19	14
VIII	19	19	8	10	6	—	3	5	5
Total (%)	202 (100)	194 (96.0)	95 (47.0)	126 (62.4)	46 (28.8)	8 (3.8)	22 (10.9)	61 (30.2)	65 (32.2)

Table 6. Relation to Coagulase Type and Fibrinolysin Production of the Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Raw Milk

Fibrinolysin	No. of strain tested	No. of strain in individual coagulase type							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Positive	100	4	18	29	0	4	7	32	6
Negative	76	5	13	25	0	3	9	14	7
Total	176	9	31	54	0	7	16	46	13

Table 7. Relation to Coagulase Type and Enterotoxin Production of the Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Raw Milk

Coagulase type	No. of strain tested	No. of strain which produce enterotoxin								
		Total (A–E) (%)	A	B	C	D	AC	AD	BC	ABC
I	12	3 (25.0)	1	2	—	—	—	—	—	—
II	37	18 (48.6)	1	3	6	7	—	—	1	—
III	58	18 (31.0)	6	3	6	—	—	2	1	—
IV	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
V	7	2 (28.6)	—	—	2	—	—	—	—	—
VI	16	9 (56.3)	1	2	4	—	1	—	—	1
VII	53	27 (50.9)	6	5	14	—	—	—	1	1
VIII	19	7 (36.8)	—	1	6	—	—	—	—	—
Total (%)	202 (100)	84 (41.6)	15	16	38	7	1	2	3	2

素を産生したものは，AとCが1株，AとDが2株，BとCが3株，AとBとCが2株であり，複数の毒素を産生した8株中6株はC型毒素を産生した．以上のように生乳由来 *S. aureus* はエンテロトキシンCおよびB産生株が多く，A産生株はそれほど多くないことが明らかにされた．

S. aureus 分離株のコアグラーゼ型とエンテロトキシン産生との関係をみると，コアグラーゼⅥ型，Ⅷ型およ

びⅡ型株のそれぞれ56.3%，50.9%，48.6%がエンテロトキシンを産生し，その他の型のものよりも著明に高率であった．しかし，コアグラーゼⅠ，Ⅲ，ⅤおよびⅧ型の *S. aureus* 分離株も25～35%のものがエンテロトキシンを産生しており，エンテロトキシン産生性とコアグラーゼ型との間に関係はみられなかった．いずれのコアグラーゼ型の菌株もエンテロトキシンCまたはBを産生するものが多く，産生エンテロトキシン型とコアグラーゼ型との間にも特に関係は認められなかった．ただし，エンテロトキシンDを産生した9株中7株がコアグラーゼⅡ型であり，Ⅱ型菌の中にD型毒素を産生するものが多く含まれていることが示された．

考　察

わが国における乳牛の乳房炎罹患率は極めて高率であり，佐々木ら[4]の調査では52.8%，Fujikura & Shibata[6]は43.8%，阿形らは46.1%に認められたと報告しているほどである．ウシの乳房炎は単一な原因によるものではないが，*S. aureus* が原因となるものが最も高率であるといわれる(Fujikura & Shibata[6])．佐々木らは乳房炎ウシの乳汁の80%から *S. aureus* が検出されたと報告している．本報では乳処理工場のタンクローリーおよび貯乳槽からの生乳について *S. aureus* の検査を行なった結果を述べたが，生乳の65.8%から *S. aureus* が検出されたほど高率に汚染されている実態が示された．乳処理工場の生乳は多数の個体から集められたものであるから，この結果が直ちにウシの乳房炎の実態を示すものではない．今回の調査では，試料0.1m*l* を直接ブドウ球菌の選択培地である MSEY 培地に塗抹するという方法に限定し，さらに，この培地で卵黄反応陽性の集落についてのみ *S. aureus* を疑ったこともあり，実際には原料生乳はこれよりもかなり高率に *S. aureus* に汚染されているものといえよう．大塚および小林[12]はタンクローリー乳から *S. aureus* が100%に検出されたと述べている．この場合，ブドウ球菌培地 No. 110 に生乳を培養し，出現したすべての集落を試験したとされているので，*S. aureus* の検出率が高かったものと考えられる．われわれは，現在ウシの乳房炎からの *S. aureus* の検出を行なっているが，ウシの乳房炎由来本菌の中に卵黄反応陰性菌が多数存在していることを認めているので[16]，今後，生乳における *S. aureus* の分布調査を行なう際には卵黄反応にとらわれない方法を採用しなければならない．

Meyer[17]，Hájek & Marsálek[18] はウシやヒツジなどの動物から分離される *S. aureus* はウサギとウシの血漿を凝固するが，ヒト由来株はウサギ血漿を凝固しウシ血漿を凝固しないと述べている．われわれも本調査で分離された *S. aureus* 202株についてこの点を調査した．その結果，すべての菌株がウサギ血漿を凝固したがウシ血漿を凝固したものは106株 (52.5%)にすぎなかった．この結果からウシ血漿凝固性陰性の96株がすべてヒトから汚染された *S. aureus* であると決めることは危険であり，むしろ動物由来 *S. aureus* の中にもウシ血漿凝固性陰性株が存在するとみる方が妥当であろう．

Meyer[17]および Hájek & Marsálek[18]は保菌動物の違いによる *S. aureus* の生物型決定にはウシ血漿凝固性の他に溶血毒とフィブリノリジン産生性，クリスタル紫を含む培地での集落の性状およびファージ型別が有効であると指摘している．われわれはこれらの性状のうち，溶血毒とフィブリノリジン産生性を検討したが，ウシ血漿凝固性と同様にこれらの性状によりヒト型とウシ型 *S. aureus* とを明瞭に区別することはできなかった．

S. aureus は牛乳中で極めてよく増殖するため，牛乳や乳製品を原因食とするブドウ球菌食中毒が西欧諸国では注目されている．わが国でも脱脂粉乳を原因食とするブドウ球菌食中毒の大集団発生の記録がある[19]．その後はこうした本菌食中毒は発生をみていないが，三野ら[2,20]は粉乳製造工場における自主管理において，製品粉乳中に *S. aureus* を証明し，その原因は原料乳中に存在した *S. aureus* が粉乳調製過程で完全に殺菌されないで少数の本菌が生残したためだと推察している．そして，製造技術者は原料乳中には *S. aureus* が存在することを考慮して乳製品の製造に当るべきだと警告している．

Olson *et al.*[21] は乳房炎ウシの乳汁から分離された *S. aureus* のエンテロトキシン産生性を検討し，157株中23株 (14.6%)が産生株であったと報告している．その他，乳および乳製品由来 *S. aureus* のエンテロトキシン産生性を検討した成績では，Casman *et al.*[22] は236株中10%，Untermann[23]は32株中6%，Payne & Wood[24] は48株中73%，Otenhajmer *et al.*[25] は36株中39%，Hájek & Marsálek[26]は79株中1.3%，Ahmed *et al.*[27]は57株中47.4%，Garcia *et al.*[28] は57株中5.3%がエンテロトキシン産生株であったと述べている．

乳および乳製品由来 *S. aureus* のエンテロトキシン産生性に関しては研究者によって調査成績に大きな違いが認められている．われわれの調査では，生乳由来 *S. aureus* 202株中84株 (41.6%) がエンテロトキシン産生株であった．わが国においては，これまでに乳および乳製品由来 *S. aureus* のエンテロトキシン産生性に関してまったく調査されていなかったが，われわれの成績に示されているごとく，わが国においても生乳が高率にエンテロトキシン産生 *S. aureus* に汚染されていることが明ら

かにされたことから，乳製品の製造およびその品質管理にはこのことを十分念頭におく必要があることが強調される．

これまでに乳および乳製品から分離された *S. aureus* のコアグラーゼ型を検討した成績はみられない．一方，ブドウ球菌食中毒事例から検出される食中毒原因 *S. aureus* のコアグラーゼ型はⅡ，Ⅲ，ⅥまたはⅦ型の4型に限られることがわれわれ[29]によって報告されている．本調査で生乳から分離された *S. aureus* も食中毒と関連があるとみられるこれら4コアグラーゼ型の菌株が202株中164株（81.2%）も存在していたことは注目される．また，これら4コアグラーゼ型の菌株の43.9%はエンテロトキシン産生能を有していた事実からみても，生乳におけるブドウ球菌汚染は食中毒発生に結びつく可能性を示すものといえよう．

結　論

東京都内の乳処理工場に搬入される生乳からの *S. aureus* の検出と分離菌株のエンテロトキシン産生性，コアグラーゼ型およびその他本菌の生物型分類のための主な性状について検討した．

牛乳生産地より輸送されたタンクローリーおよび乳処理工場の貯乳槽から採取した生乳のうち，タンクローリーは170件中112件（65.9%），貯乳槽は52件中34件(65.4%）から *S. aureus* が検出された．生乳中に認められた *S. aureus* の生菌数は大部分のものが1,000/m*l* 以下であった．

生乳からの *S. aureus* 分離株202株のうち，84株(41.6%）がエンテロトキシンを産生した．産生エンテロトキシンはC型が最も多く44株（52.4%），ついでB型21株(25.0%)，A型20株(23.8%)，D型9株(10.7%)であった．エンテロトキシンE産生株は1株も認められなかった．

分離菌株のコアグラーゼ型はⅣ型を除くⅠ～Ⅷ型のすべてが認められ，Ⅲ型58株（28.7%）とⅦ型53株（26.2%）が多く認められた．

その他の性状においては，ウサギ血漿凝固性，マンニット分解性，卵黄反応，DNase試験はすべての菌株が陽性であったが，ウシ血漿凝固性は52.5%，フィブリノリジン産生は56.8%，β溶血毒産生は47.0%の菌株が陽性であった．これらの性状とコアグラーゼ型との関係についても検討を行なった．

文　献

1) 吉田信行：獣医界，23，6，1948
2) 三野和雄，若泉久洋，青木　正，小飼宏男，品川孝三：雪印乳研究時報，23，1，1956
3) 平戸勝七，清水亀平次，国重照雄，清水悠紀臣，長村和雄，中川雅郎，長屋弘之，福田武明，管間　威，東野安平：日獣会誌，9，159，1955
4) 佐々木栄英，鈴木　守，阿形甚三郎，大庭武文，大須賀徹爾，名倉啓一郎，藤倉孝夫：日獣会誌，17，38，1964
5) Fujikura, T., and Shibata, S.: *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 5, 146, 1965
6) Fujikura, T., and Shibata, S.: *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 5, 65, 1965
7) 阿形甚三郎，藤倉孝夫：畜産の研究，20，1069，1966
8) 本田多人見，橋口清治，神田橋偲，吉野辰敏，蔵原久輝：日獣会誌，21，161，1968
9) 久米常夫，村瀬信雄：家衛試所報，61，56，1970
10) 久米常夫，村瀬信雄：家衛試所報，64，1，1972
11) 久米常夫，友成　功，志水　功：家衛試所報，64，7，1972
12) 大塚義一，小林嘉一：日獣会試，30，143，1977
13) 善養寺浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐英夫，丸山務，坂井千三：食衛試，12，311，1971
14) Yamada, S., Igarashi, H., and Terayama, T.: *Microbiol. Immunol.*, 21, 675, 1977
15) 潮田　弘，寺山　武，坂井千三，善養寺浩：東京衛研年報，26-1，1，1975
16) 寺山武ら，未発表
17) Meyer, W.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 17, 387, 1967
18) Hájek, V., and Marsálek, E.: *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.*, A217, 176, 1971
19) 嶋田幸治，春田三佐夫，加藤千里，市川忠次，大石純一，村上一，小宮山正，野田正健：東京衛研研究報告，13，1，1956
20) 三野和雄，椿　五郎，青木　正：雪印乳研究時報，16，1，1955
21) Olson, J. C.,Jr., Casman, E. P., Baer, E. F., and Stone, J. E.: *Appl. Microbiol.*, 20, 605, 1970
22) Casman, E. P., Bennett, R. W., Dorsey, A. E., and Issa, J.: *J. Bacteriol.*, 94, 1875, 1967
23) Untermann, F.: *Arch. Hyg.*, 153, 421, 1969
24) Payne, D. N., and Wood, J. M.: *J. Appl. Bacteriol.*, 37, 319, 1974
25) Otenhajmer, I., Mitic, S., and Stjanovic, L.: *Acta. Vet. Yugosl.*, 24, 255, 1974
26) Hájek, V., and Marsálek, E.: *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.*, A223, 63, 1973
27) Ahmed, A. A. A., Terplan, G., and Simon, E.: *Arch. Lebensmittelhyg.*, 29, 201, 1978
28) Garcia, M. L., Moreno, B.,and Bergdoll, M. S.: *Appl. Envir. Microbiol.*, 39, 548, 1980
29) 寺山　武，潮田　弘，新垣正夫，稲葉美佐子，甲斐明美，坂井千三：東京衛研年報，28-1，1，1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 122-126, 1980

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* on the Production of Their Enterotoxin A-E in Custard Cream

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

Effect of the presence of 10% and 30% sucrose in custard cream (water activity levels: 0.97 and 0.94), which was prepared under aseptic conditions in the laboratory, on the growth of *Staphylococcus aureus* and on the production of their enterotoxins A–E was studied.

When enterotoxin producing strains of *S. aureus* were incubated for 48 hours at 25C, it was found that sucrose in a concentration of 30% added to the custard cream remarkably inhibited the growth of *S. aureus* strain 243 and FRI-361 which produce enterotoxins B and C respectively.

After incubation for 48 hours at 25C, addition of sucrose in a concentration of 30% in the custard cream showed a strong inhibition of enterotoxin B production.

With regard to the effect of sucrose on the generation time of *S. aureus* strain 243 and FRI-361 which produce enterotoxins B and C respectively, the presence of 30% of sucrose in the custard cream prolonged the generation times considerably. However, the cell counts always reached to 10^8/g even in presence of 30% sucrose.

pH values of custard cream containing various concentrations of sucrose after incubation period of 48 hours at 25C were 5.9 to 6.7.

Keywords : *Staphylococcus aureus*, enterotoxin, production of enterotoxin, water activity, effect of sucrose, custard cream

我が国におけるブドウ球菌食中毒の発生は年間200～300事例，患者数は4,000～8,000人に達し，腸炎ビブリオ食中毒についで発生頻度が高い．

そこで，私どもは本菌食中毒予防対策上の基礎的検討を目的とし，食品の保存性を高めるために用いられている，食品の水分活性（以下Awと略）を調節する方法が，本食中毒の原因物質であるエンテロトキシン（以下Entと略）産生に抑制効果があるか否かの研究を進めている．その結果，培地に塩化ナトリウムや蔗糖を添加して，培地のAwを低下すると，Ent BおよびC産生が，Ent A，DおよびE産生に比べて著しく抑制されることが明らかになった[1,2]．

今回は，蔗糖で調節したAwの異なるカスタードクリームを実験的に調製し，各々にブドウ球菌を接種して，食品中でのブドウ球菌の増殖とEnt産生におよぼすAwの効果について検討を試みたので，その成績について報告する．

材料および方法

供試黄色ブドウ球菌はEnt A：100; Ent B：243; Ent C：FRI-361; Ent D：494; Ent E：FRI-326の各Ent型のreference株である．

カスタードクリームは，Table 1に示した組成で常法に従って調節した．カスタードクリームの調製に使用した器具は，すべて滅菌したものを用い，調製は無菌室で無菌操作で行なった．薄力粉，コーンスターチ，蔗糖はエチレンジオキサイドガスでガス滅菌したものを用いた．薄力粉，コーンスターチを混合した後，牛乳と卵黄を加え，蔗糖を最終濃度，10%(Aw：0.97)，30%(Aw：0.94)になるように添加して調製した．蔗糖無添加のものを同様の方法で調製し，対照（Aw：0.99）とした．

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

Table 1. Formula for Custard Cream

Milk	1,000 m*l*	
Egg yolk	200 m*l*	
Flour	35 g	
Cornstarch	35 g	
	—	(0%)……Aw : 0.99
Sucrose	141 g	(10%)……Aw : 0.97
	544 g	(30%)……Aw : 0.94

このカスタードクリームは25Cで48時間培養後，生菌数を標準寒天混釈培養法で，ブドウ球菌数を卵黄加マンニット食塩培地（MSEY と略）で検討したが，いずれの検査においても菌の発育は認められなかった．

Aw は水分活性測定器，mode/5803 (G. Lufft 社，西独）を用いて各蔗糖濃度のカスタードクリームを測定した．

培養法は各菌株を Brain Heart Infusion broth (BBL 製，以下 BHI と略）で18時間培養後，遠心により BHI で3回洗浄した菌を最終菌数が10^4～10^5/g に各蔗糖濃度のカスタードクリームに接種し，良く混和後，25Cで培養した．菌数の測定は培養4，8，12，18，24，48時間後の各カスタードクリーム 20g に，10%ブイヨン加生理的食塩液 80m*l* を加えて作製した20%乳剤の各試料について，Spiral plating[3]法で行なった．使用培地は標準寒天平板および MSEY 平板である．各平板上に Spiral plater で試料を塗布し，標準寒天では35C24時間，MSEY では35C48時間培養した後，各平板上のコロニー数より生菌数およびブドウ球菌数を算出した．

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[4]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．

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およぼす蔗糖の影響：Fig. 1 は蔗糖濃度の異なるカスタードクリームを用いて，25C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．Spiral plate 法で各試料について標準寒天平板および MSEY 平板で，それぞれ生菌数およびブドウ球菌数を測定した結果，両者で測定される菌数は，ほぼ一致した．本稿では，標準寒天平板で測定した生菌数を菌数として表現した．蔗糖無添加の場合，Ent B産生菌は1.6×10^5菌の接種菌数が8時間培養すると3.9×10^7，18時間培養では1.4×10^9に増殖した．Ent C 産生菌では，接種菌数3.8×10^4が8時間培養で4.4×10^7，12時間培養

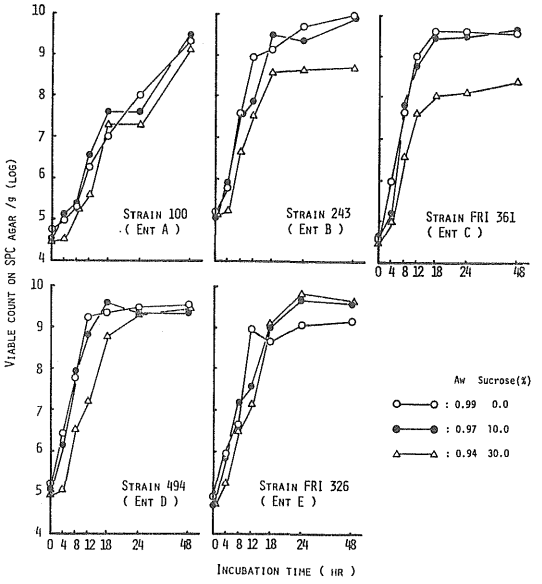


Fig. 1. Effect of Water Activity (Aw) on Growth of *Staphylococcus aureus* in Custard Cream

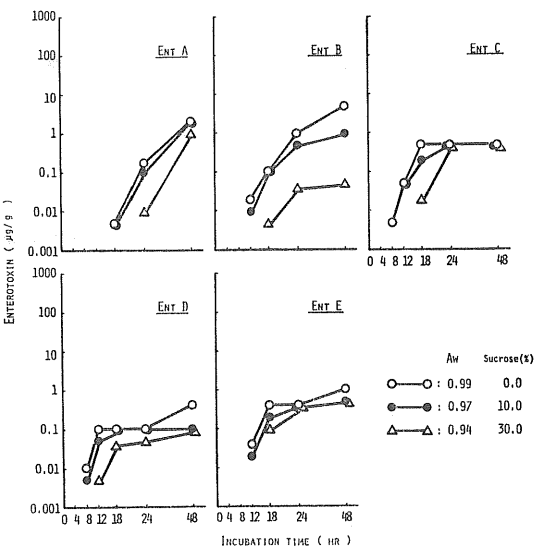


Fig. 2. Enterotoxins A–E Production of *Staphylococcus aureus* in Custard Cream of Various Water Activity Levels

で1.0×10^9の菌数に達した．これに対して Ent A 産生菌は，5.5×10^4の接種菌数が18時間培養で1.0×10^7，48時間培養で1.0×10^9に達し，Ent B，C 産生菌に比較して10^9個の菌数に達する培養時間が遅延した．Ent D 産生菌は，Ent C 産生菌と同じく12時間培養で1.7×10^9に達し，Ent E 産生菌は24時間培養で1.2×10^9に達した．

蔗糖を10% (Aw : 0.97), 30% (Aw : 0.94) に添加するとEnt B 産生菌と Ent C 産生菌の増殖にやや影響を与え，蔗糖無添加の場合に比較して菌数の減少が見られた．これらEnt B とCの産生菌の4～8時間の間のgeneration time は，Ent B 産生菌では蔗糖濃度0%：39分，10%：41分，30%：123分，Ent C 産生菌では蔗糖濃度0%：33分，10%：34分，30%：69分であった．蔗糖30%添加においてEnt BおよびC産生菌のgeneration time が著明に遅延し，蔗糖の添加による影響が見られた．

エンテロトキシン産生におよぼす蔗糖の影響：Fig. 2は蔗糖濃度の異なるカスタードクリームでのEnt 産生を経時的に示したものである．培養4時間後では，いずれの蔗糖濃度のカスタードクリームにおいても，Ent A～E の産生が認められなかった．培養8時間後の各型のEnt 産生は，Ent CとDの産生がみられた．Ent C は蔗糖無添加のカスタードクリームのみから検出され，Ent D は蔗糖無添加および10%添加まで検出された．培養12時間後の各型のEnt 産生をみると，Ent A は蔗糖無添加でも Ent が検出されなかったが，Ent B, C およびEは蔗糖濃度10%添加までEnt が検出された．Ent D は30%蔗糖添加カスタードクリームからも検出された．培養18時間後の Ent 産生は，Ent A は蔗糖10%濃度まで検出された．Ent A 以外の型では，すべての蔗糖濃度のカスタードクリームからEnt が検出された．このように，培養4時間から18時間のEnt 産生は，各Ent型によってEnt が検出される培養時間は異なるが，カスタードクリームの蔗糖濃度が高くなるに従って，各型のEnt 産生が抑制されることが確認された．

つぎに，培養48時間後の各Ent 型の Ent 産生量を蔗糖濃度の異なるカスタードクリームごとに比較した．その結果，Ent Aでは，蔗糖無添加と10%蔗糖添加のカスタードクリームでの産生量は2μg/g である．これに対して，30%蔗糖添加カスタードクリームでは1μg/g であった．Ent B では，蔗糖無添加のカスタードクリームで5μg/g であり，蔗糖10%添加すると1μg/g に減少し，30%蔗糖添加では0.05μg/g と更に減少した．これは蔗糖無添加の産生量と比較すると，わずか1%の産生量であった．Ent C の産生量は，蔗糖無添加および10%，30%蔗糖添加でいずれも0.5μg/g であった．Ent D の産生量は，蔗糖無添加では0.4μg/g であり，10%，30%蔗糖添加ではいずれも0.1μg/g であった．Ent E については，蔗糖無添加では1μg/g の産生量を示し，蔗糖10%，30%添加ではいずれも0.5μg/g の産生量であった．以上の結果，蔗糖添加による Ent 産生量への影響は，Ent B が最も大きく，30%蔗糖添加で，Ent 産生量は著明に減少することが明らかになった．

カスタードクリームのpHの経時的変化：Fig. 3 にEnt AとB産生菌のカスタードクリームで，培養したときのpH の経時変化を示した．カスタードクリームのpH は，6.75～6.90の範囲であった．これに各型Ent産生菌株の洗浄菌を接種して25Cで培養し，10^9/g の最高の菌数とEnt 産生を示した48培養時間までの pH を測定した．その結果，Ent A は pH 6.51～6.68，Ent B は pH 5.90～6.36，Ent C は pH 5.92～6.38，Ent D は pH 6.01～6.43，Ent E は pH 5.93～6.17 でpH の低下がみられた．しかしながら，蔗糖無添加のカスタードクリームも同様に pH の低下がみられ，添加した蔗糖濃度の違いによる pH の変化の差は，ほとんど認められなかった．

考　察

ブドウ球菌食中毒の原因または推定原因食品は，にぎりめし，弁当類，菓子類など種々のものがあり，カスタードクリームを原因食品とした本菌食中毒事例の発生は，にぎりめしや弁当類に比較して少ない．今回の実験にカスタードクリームを使用した理由は，カスタードクリームによるブドウ球菌食中毒の予防を直接の目的としたものではない．本菌食中毒の種々の原因食品のなかで，実験室で無菌的に調製でき，しかもブドウ球菌を均一に接種可能な食品として，カスタードクリームを選び，実験に供した．カスタードクリームの蔗糖濃度は，メーカーにより多少異なるが，その濃度は12～15%に添加されている．私どもは，カスタードクリーム，すなわち，食品中でのブドウ球菌の増殖とEnt産生におよぼす蔗糖の影響を調べる目的で，蔗糖無添加，10%および30%蔗糖添加したカスタードクリームを調製し，実験した．

蔗糖無添加のカスタードクリームでの各型のEnt産生菌の増殖をみると，10^9 の菌数に達するまでの培養時間は，Ent CとDは培養12時間後，Ent Bは18時間後，Ent Eは24時間後，Ent Aは48時間後であり，カスタードクリームでの Ent 産生菌の増殖は，BHI 培地における増殖と比較してゆるやかであった．蔗糖が30%に添加されたカスタードクリームでは，Ent B とC産生菌の増殖が抑制され，48時間培養でも10^8/g の菌数であった．しかしpHの経時的な測定結果は，Ent BおよびC産生菌培養のカスタードクリームが，他のEnt産生菌の場合と比較して特にpH の低下はみられない．このように，蔗糖を用いてAw を調製した BHI 培地での Ent 産生菌の増殖でみられた結果と同様に，蔗糖濃度によって各Ent産生菌の増殖におよぼす効果が，多少異なることが認められた．

Ent 産生におよぼす蔗糖の影響については，Aw 調節

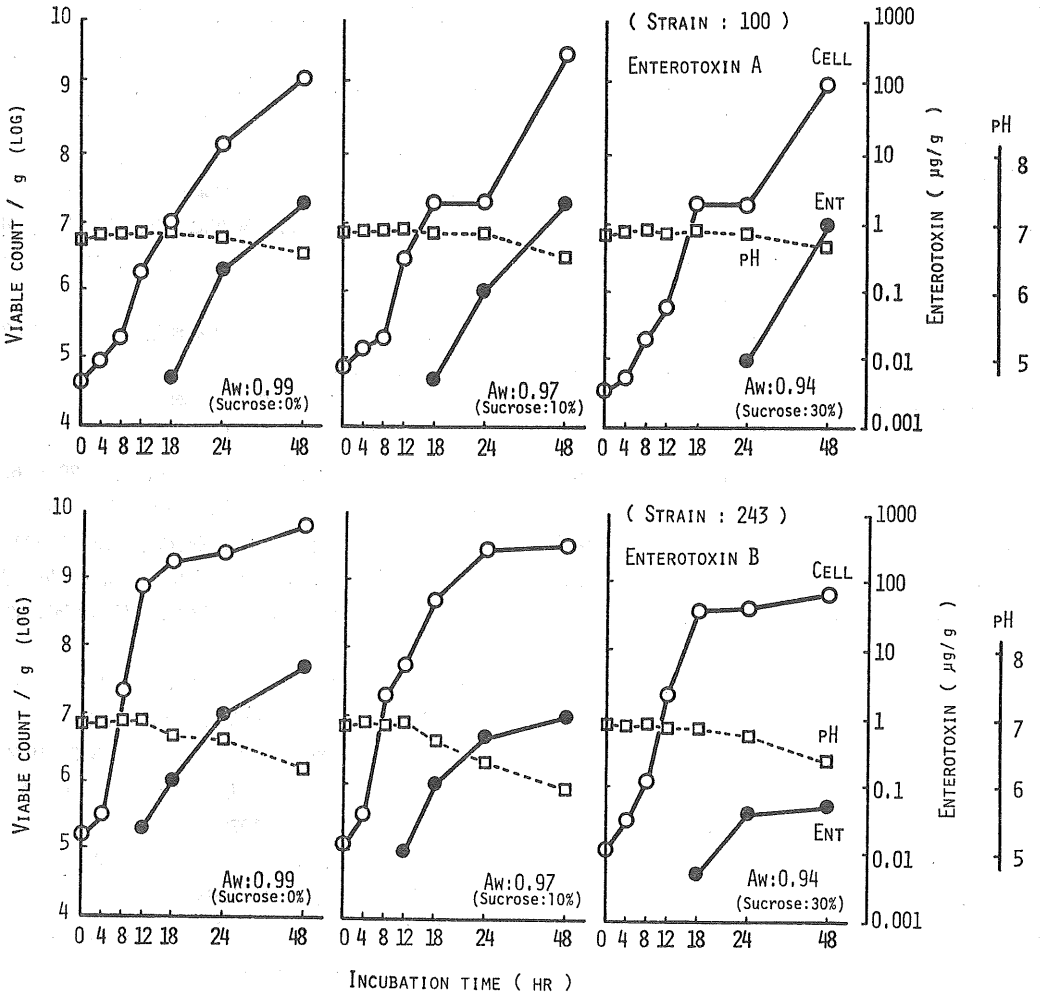


Fig. 3. Growth and Enterotoxin A and B Production of *Staphylococcus aureus* in Custard Cream of Various Water Activity Levels

剤として塩化ナトリウムや，蔗糖を用いてBHI培地のAwを調節した実験で認められたと同様に，Ent Bの産生が他のEnt産生型に比較して著しく抑制されることが認められた．Ent Bの産生はpHの低下によって抑制される報告があり[5]，また私どもの前回の実験でも蔗糖添加の培地を用いた場合，黄色ブドウ球菌が蔗糖を代謝し酸を産生するために，培地のpHが著しく低下し，このpHの低下がEnt B産生に影響している可能性を否定できなかった．今回のカスタードクリームを用いた実験では，菌の増殖によるpHの変化はほとんどみられないので，蔗糖の添加によるEnt Bの産生の抑制は，Aw値の低下によることが示唆された．

一方，塩化ナトリウムや蔗糖でAwを調節したBHI培地を用いた実験で得られたEnt C産生の著しい抑制は，今回の実験結果からはみられなかった．Ent C産生は，その検出される培養時間が蔗糖無添加のカスタードクリームでは，培養8時間後，10%添加では12時間後，30%添加では18時間後と蔗糖濃度の増加にしたがって，Ent検出までの時間が延長した．しかし培養48時間後のEnt C産生は蔗糖無添加のカスタードクリームと同じ産生量を示し，Awの低下によるEnt C産生への影響は認められなかった．このことから，Ent産生におよぼす，Awの影響は食品と液体培地とでは多少異なることが明らかになった．

以上のように，蔗糖でAwを調節したカスタードクリームでのEnt産生は，Ent B産生がEnt A, C, D, E産生に比較して，著しく影響を受け，Ent産生の抑制が認められた．前述のEnt産生におよぼすAw効果のEnt

型による相違は，これまでの著者らの成績にみられるように[6]，自然界のEnt産生ブドウ球菌の分布においてEnt型の片寄りが認められないにもかかわらず，Ent Bによるブドウ球菌食中毒の発生はほとんどみられず，食中毒事例の約70%がEnt Aまたは Ent Aと他の型との複合型および約15%が Ent C によることと関連があるものと考えられる．

今後，さらにグリシンなどの使用が許可されている食品添加物を培地や食品に加えて，ブドウ球菌食中毒の約70%を占める Ent A 産生におよぼす影響を検討し，ブドウ球菌食中毒の予防対策の一助にしたい．またブドウ球菌が食品を汚染し，増殖してEntを産生する能力は，他の汚染菌叢により著しく影響されることが知られていることから[7,8]，この点についても検討してゆきたい．

結　論

実験的に蔗糖濃度の異なるカスタードクリームを調製し，食品中でのブドウ球菌の増殖とEnt産生におよぼすAw効果について検討し，後述の結果を得た．

1. カスタードクリームの蔗糖濃度が30%の場合，Ent BおよびC産生菌の増殖が抑制された．この2菌株の4～8時間の間の generation time は，Ent B産生菌では蔗糖濃度0%，10%，30%の場合，それぞれ39分，41分，123分であり，Ent C 産生菌では蔗糖濃度0%，10%，30%の場合，それぞれ33分，34分，69分であった．両菌株の蔗糖濃度30%における generation time が著明に遅延した．

2. 培養48時間後の EntA～E産生におよぼすAw効果を検討した結果，蔗糖無添加の場合のEnt A～E産生量は，それぞれ，2，5，0.5，0.4，1μg/gであり，30%蔗糖添加の場合の EntA～E産生量は，それぞれ，1，0.05，0.5，0.1，0.5μg/g であった．Ent B 産生が，他の Ent A，C，DおよびE産生に比較して，著しくAwの影響を受けることが明らかとなった．

3. 48時間培養後の各蔗糖濃度を含むカスタードクリームの pHは5.9～6.7の範囲にあり，Ent産生菌株の違いや蔗糖濃度の差による pHの変化は，ほとんど認められなかった．

（本研究の概要は第37回，日本食品衛生学会，昭和54年5月で発表した．）

文　献

1) 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
2) 五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，潮田　弘，寺山　武，坂井千三：東京衛研年報，30-1，111，1979
3) Donnelly, C. B., Gelchrist, J. E., Peeler, J. T., and Campbell, J. E.: *Appl. Microbiol.*, 32, 21, 1976
4) Yamada, S., Igarashi, H., and Terayama, T.: *Microbiol. Immunol.*, 12, 675, 1977
5) 近藤雅臣，勝野真吾：日細誌，29，323，1974
6) 寺山　武，五十嵐英夫，潮田　弘，善養寺　浩：食衛誌，13，549，1972
7) Troller, J. A., and Frazier, W. C.: *Appl. Microbiol.*, 11, 11, 1963
8) McCoy, D. W., and Faber, J. E.: *Appl. Microbiol.*, 14, 372, 1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 127-131, 1980

冷凍食品から分離した黄色ブドウ球菌の性状について

庭山邦子*, 村上一*, 五十嵐英夫**, 篠原楷***
山岸宏***, 加藤喜市***

Characterization of Staphylococcus aureus Isolated from Frozen Egg Products socalled "Kinshi tamago"

KUNIKO NIWAYAMA*, HAJIME MURAKAMI*, HIDEO IGARASHI**,
TADASHI SHINOHARA***, HIROSHI YAMAGISHI*** and KIICHI KATO***

Six lots of a frozen egg product socalled "Kinshi tamago" (thin-sliced plain omelet) produced at certain food processing factory in Kyoto were subjected for the possible contamination of *Staphylococcus aureus*. The specimens subjected in this investigation were the ones produced between July 18 and November 1979, since the product from the same factory was incriminated as an incriminated food of an outbreak of *S. aureus* food intoxication. Consequently, it was found that 4 out of 6 lots of the products produced at July 18, August 4, August 22, and August 28, 1979 had harbored 10^2～10^4/g of *S. aureus* in the products. However, neither thermostable nuclease (DNase) nor enterotoxin was present in the specimens, although all of the 22 isolates were capable of producing DNase, and 6 from 3 specimens were capable of producing 2 or 3 types of enterotoxins. With regard to the tagging of the isolates, they were found to be coagulase type II, and 77% and 100% of them showed drug resistance against PC-G and SM respectively. Through these biological characteristics including producibility of hemolysins of the organisms, it is assumed that the origin of the contaminated *S. aureus* were presumably of human origin.

Keywords: egg product, *S. aureus*, coagulase, thermostable DNase, drug resistance, hemolysin

はじめに

動物性食品に起因する衛生上の危害のうち，黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシンによる食中毒は，過去10年間一向に減少する気配を見せず[1]，昨年の東京都衛生局の集計[2]では，腸炎ビブリオと同じ40件，28.4%と高い発生率を示している．特に注目すべき点としては，腸炎ビブリオによる食中毒が夏期に集中して発生している[3]のに対し，黄色ブドウ球菌による食中毒は年間を通してその発生が報告されていることであろう．これは，本菌が健康人の皮膚や鼻前庭をはじめ，広く家畜や家禽の皮膚の常在菌であるため，動物性原料食品は必然的に本菌に汚染される機会が多く，それらの加工食品がその製造工程中の不注意のために本菌により汚染される機会も多いと考えられていることと関連がある．

一方，現在のように，コールド・チェーンが行き届いている状況下では，多種多様な冷凍食品が市販されているが，冷凍食品の種類によっては多量の病原菌により汚染されていることがある．その汚染の原因については，食品衛生上それぞれ幾つかの興味ある問題点が挙げられているが，黄色ブドウ球菌が汚染食品の中で凍結状態におかれた場合には，強い抵抗性を示すので，生原料食品や製品が，一度本菌に汚染されてしまうと，長期間凍結されたままで製品中に生き残ることとなる．

今回我々は，分類上無加熱摂取冷凍食品のカテゴリーに入れられる，錦糸卵と称する卵製品が食中毒の原因食となったため，同一工場で生産された関連検体を入手して検査した．その結果，製造日の異なる6検体中4検体から，計22株の黄色ブドウ球菌を分離した．

本研究ではこれらの菌の汚染経路を推測する手がかりを得るため，分離菌株について，逆受身血球凝集反応(RPHA法)を用いて[4,5]，エンテロトキシン産生能を，Lachica et al., 等の方法[6,7]で耐熱性核酸分解酵素の検出

* 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
** 同微生物部細菌第一研究科
*** 東京都衛生局環境衛生部食品衛生課調査係

を，潮田等[8]の方法によりコアグラーゼ型別を，日本化学療法学会の方法[9]で，8種類の抗生物質に対する薬剤耐性度を，そしてウサギとヒツジ赤血球に対する溶血活性を調べ，若干の知見を得たので報告する．

材料および方法

1) 冷凍錦糸卵

検査に用いた検体は，都内某冷凍倉庫に保管されていた，7月18日，8月4日，22日，28日および11月9日製造の6検体で，食中毒関連参考検体である．

2) 試料の調製

搬入された検体は一夜4°で解凍し，試料10gに滅菌リン酸緩衝食塩液 pH 7.2 を 90m*l* 加え，ストマッカーで30秒間処理し，試料原液とした．

3) 黄色ブドウ球菌の分離同定

分離培地として，3%卵黄加マンニット食塩寒天培地を用い，平板に試料原液 0.1m*l* を塗抹し，35°，48時間培養後典型的形態を示すコロニーを釣菌した．コアグラーゼ産生能は，ウサギプラズマ（栄研）の7倍希釈液0.5 m*l* に平板より釣菌した菌を一白金耳接種し，35°に3時間，6時間および24時間保持してプラズマ凝固の有無を観察した．

4) 耐熱性核酸分解酵素の検出

Deoxyribonucleic acid DNA (Difco) 0.3g, Bacto-Agar (Difco) 10g, 0.01M $CaCl_2$ 1.0m*l*, NaCl 10gを 0.05M Tris buffer pH 9.0 中に入れ，完全に溶解させてから 0.1M Toluidin blue-0 (Wako co. Ltd.,) 3.0 m*l* を加え全量 1,000m*l* とする (TDA agar)．適量ずつ小分けして保存し，使用前溶解し，スライドグラスに 3.0m*l* のせ，固まってから2mmの穴をあけ，準備した試料液を加え，37°に1時間および4時間保持し観察を行なった．耐熱性核酸分解酵素（耐熱性 DN ase)が存在すれば，pink 色のハローが穴の周辺に見られる．

試料液は錦糸卵10gに 0.05M リン酸緩衝食塩液 (pH 7.2) 5.0m*l* を加え，ストマッカーにかけ，これをろ過後，ろ液を沸騰水浴中で15分間加熱処理を行なったものを用いた．

5) 薬剤感受性試験

日本化学療法学会の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法 (1974) に準じ，寒天平板希釈法で行なった．使用薬剤は，カナマイシン(KM)，クロラムフェニコール(CP)，ベンジルペニシリン Na (PC-G)，ジヒドロストレプトマイシン(DSM)，エリスロマイシン(EM)，ゲンタマイシン(GM)，クロルテトラサイクリン(CTC)，オレアンドマイシン（OL）の計8種類を使用した．

感受性測定用培地として，Heart Infusion Agar (Difco) を用い，被検菌株22株および対照菌株 *S. aureus* 209P株は Trypticase Soy Broth (BBL) で3代継代し，10^8/m*l*，10^6/m*l* の菌液について MIC 値を測定した．

6) エンテロトキシンの検出

製品についてはその10倍希釈試料液をそのまま，分離株については4% NZ-Amine (Shefield) で培養し，その培養ろ液について逆受身血球凝集反応 (RPHA) により[4,5]，エンテロトキシンの検出を試みた．なお，RPHA はまず Tween80 を0.1%，アラビアゴムを0.01%含む 0.15M リン酸緩衝液 pH 7.2 で培養ろ液を10倍段階希釈した．これにタンニン酸処理した，ホルマリン固定ヒツジ赤血球にエンテロトキシンA，B，Cの特異抗血清を感作した1%赤血球浮遊液を加え，ミキサーで1～2分間振とう混合後，室温に2時間放置し，凝集の有無を未感作赤血球のそれと対比して判定した．

7) コアグラーゼ型別

潮田等[8]の方法に従い，Brain Heart Infusion Broth (Difco) で24時間培養した菌液を用いて行なった．

8) 溶血活性

Heart Infusion BrothとHeart Infusion Agarを1：2の割合で混合した軟寒天培地に，ウサギおよびヒツジの各赤血球を4%となるように加え，それぞれ血液寒天平板を作成した．これに継代培養した菌液を一白金耳接種し，ウサギ血液平板では37°，24時間培養し，ヒツジ血液平板は37°で培養後，さらに4°で1夜放置し，溶血活性の有無を判定した．

結　果

Table 1 より明らかなように8月4日，22日および28日に製造された錦糸卵から，製品1g当り 10^2～10^4 個の黄色ブドウ球菌が検出された．しかし，これらの検体からは，直接に耐熱性 DNase は検出されなかった．また分離株のコアグラーゼ型はすべてⅡ型であり，これはさきに食中毒事件に関与した錦糸卵から分離された菌と同じ型であった[10]．さらに検体から直接エンテロトキシンは検出されなかったが，分離株22株中エンテロトキシン産生能は6株（3検体）に認められた．

各種抗生物質の分離株に対する MIC の分布は Fig. 1 に示したとおりであった．すなわち，PC-G，SM に対して中等度から高度耐性を示しており，この2剤耐性株は68%，PC-G に対する耐性株は77%，SM に対しては100%耐性を示すものであった．このうちエンテロトキシン産生株はすべて2剤耐性株であり，また他の薬剤に対しては感受性株が大部分を占めていた．

ウサギおよびヒツジ赤血球による各溶血活性測定の結

Table 1. Enumeration of *Staphylococcus aureus* and Detection of Enterotoxin and Thermostable Nuclease

Specimen	Date of production	Number of *S. aureus*/1 g	Thermostable nuclease		Enterotoxin (s)	
			In specimen	Producibility	In specimen	Producibility
1	July 18, 1979	6.0×10^{3}	−	+	−	−
2	Aug. 4, 1979	5.0×10^{4}	−	+	−	A, B, C (3/5)
3	Aug. 22, 1979	6.0×10^{2}	−	+	−	A, B, C (1/4) A, B (1/4)
4	Aug. 24, 1979	—	−		−	
5	Aug. 28, 1979	7.0×10^{4}	−	+	−	A, C (1/7)
6	Nov. 9, 1979	—	−		−	

Note ; Numerator in parentheses indicate the number of strain produced enterotoxin (s) and denominator indicate the number of tested strains.

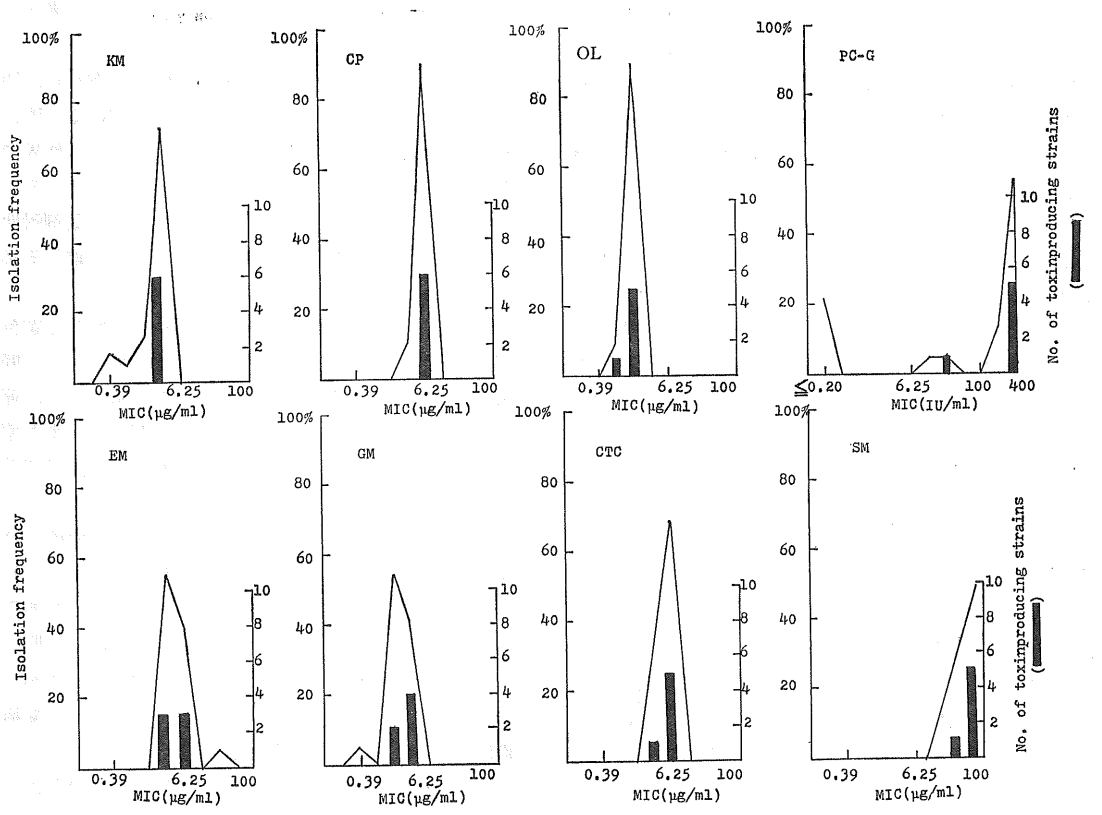


Fig. 1. MIC distribution of various antibiotics in 22 isolates of *S. aureus* compared with their enterotoxin producibilities. Keys for abbreviations: KM=Kanamycin, CP=Chloramphenicol, PC−G=Penicillin G, SM=Streptomycin, EM=Erythromycin, GM=Gentamycin, CTC=Chlortetracycline, OL=Oleandomycin.

果は，Table 2 に示すように α-Hemolysin は全株(100%)にみられ，このうち β-Hemolysin も有する α，β 型は3株（3検体）に認められた．

考　察

近年，黄色ブドウ球菌を原因菌とした，仕出し弁当類による食中毒の多発が，寺山等[1]により報告されている．彼等はその防止策として衛生的な設備の充実と製造工程

Table 2. Distribution of *Staphylococcus aureus* Classified with their Hemolysin Produced

Origin of the isolates		Types of hemolysin produced by the isolates	
No. of specimen	Date of its production	α-hemolysin	α, β-hemolysin
1	July 18, 1979	5	1
2	Aug. 4, 1979	4	1
3	Aug. 22, 1979	4	0
5	Aug. 28, 1979	6	1

Note : Figures in the table indicate the number of the isolates.

中でエンテロトキシンが産生される条件を与えないように工夫をすることを挙げている．今回調査対象とした錦糸卵は，業務用冷凍食品として製造されたものであり，消費者が手にする時は，主に弁当等の総菜として使用されており，最終的にはコールド・チェーンからはずれた経路で流通するものである．これは，一度製造段階で黄色ブドウ球菌による汚染を受けていれば，弁当の暖かい御飯と共に包装されることにより，汚染菌にとって最適な増殖条件が与えられることとなり，食中毒の発生を予防するという点からみると，一つの盲点である．

善養寺等[11]は，彼等が食品，マナイタ等から分離した471株の黄色ブドウ球菌中，54株（11.5%）がコアグラーゼⅡ型菌であったと報告している．一方，寺山等[1]は食中毒原性ブドウ球菌のコアグラーゼ型はⅡ，Ⅲ，ⅥおよびⅦ型に限定されていると述べている．この点，分離株がすべてコアグラーゼⅡ型に型別されたこと，さらにエンテロトキシン産生株が3検体に含まれていたことから，今回調べた製品でも使用法如何によっては食中毒事故につながる可能性は大きいものであると思う．耐熱性DNase は黄色ブドウ球菌が 10^4～10^5 個オーダーに増殖した時に検出が可能となり，エンテロトキシンはさらに増殖して 10^8 個以上になった時に検出されることが報告されており[12]，供試菌株すべてに DNase 産生能は見られたが，直接検体から検出されなかったことから，原料および製造段階で，エンテロトキシンが産生される程の本菌による汚染が有った事は考えられない．また食中毒検体について調査した結果からは[10]，全く人の手を介さずに卵焼きが作られ，スライスされるオートメーション設備であったことより，まず汚染を受ける機会として考えられることは，機械設備の清掃および製品を凍結するまでの温度管理に問題が有ったことがうかがえる．

Hájek and Marsalek によると[13]，人間由来の黄色ブドウ球菌の98.7%にα-Hemolysin 産生株が有り，Hájek *et al*[14]., Jean-Louis Marandon *et al*.[15]等で動物より分離された菌株についての結果からも，動物由来株ではβ-Hemolysin 産生株が大部分で，α-Hemolysin 産生株はごくまれであることが報告されている．Table 2 の結果からは人間由来と思われるα-Hemolysin が100%見られたことは，汚染源が単一な状況であったとも考えられる．

ついで各種抗生物質に対する MIC の分布から，PC-G，SM は家畜飼料での使用を禁じられているが[16]，これら2剤耐性株が68%も占めている．しかし自然界での黄色ブドウ球菌の薬剤耐性化が増加をたどっていることが三橋等により報告されていることから[17]，薬剤耐性化の遺伝上の問題を加えて，今後さらに検討を重ねる必要があると思われる．

かつて Doris Kush[18] が家禽の肉から分離した黄色ブドウ球菌について種々の生物学的性状を検討し，人間由来と思われる結果を得たことから，と殺時あるいは運搬過程で人間から動物への汚染経路を推測した．また薬剤耐性については，ＴＣに対して分離株の約80%が感受性と耐性を二分する結果を示したが，ＴＣは Biomysin と共に動物の飼料に加えられており，動物での耐性化は進んでいるが，健康人からはまれにＴＣ耐性が見られるとして，薬剤耐性の面からは動物由来か人間由来であるのかは推測出来ない結果であったとしており，この原因として，これら家禽の人間から動物への初期の汚染が，さらにもう一方では家禽における微生物の Flora の変換を推測していることは興味深い．

今回の我々の調査結果からは，冷凍錦糸卵の黄色ブドウ球菌による汚染源が人間由来の菌によると思われるふしが多く見られたが，今後はさらに正常卵あるいは錦糸卵の原料ともなっている冷凍液卵について調査を積み上げることにより，これらの汚染菌が動物由来であるのか，人間由来であるのかを明らかにするところまで発展させたいと考えている．それにより，汚染源を正確に把握し汚染の防止，原料・製品製造工程等における食品衛生上の問題点が改良されることを期待したい．

結　論

冷凍錦糸卵が食中毒の原因食となったため，同一製造所における，製造日の異なる関連6検体について検査を行ない，4検体より黄色ブドウ球菌が10^2～10^4/g検出された．製品からは直接耐熱性 DNase およびエンテロトキシンは検出されなかったが，4検体より分離した22株すべてに耐熱性 DNase 産生能があり，またエンテロトキシン産生株が3検体に含まれていた．コアグラーゼ型はすべてⅡ型であり，また PC-G, SM に対する耐性株は各々77%，100%であった．

以上の性状，および分離株での溶血性から，今回分離された黄色ブドウ球菌の汚染源が人間由来であった可能性が示唆された．

謝辞　本研究にあたり，御助言下さいました当所微生物部副参事研究員寺山武博士に感謝致します．

文　献

1) 寺山　武，潮田　弘，新垣正夫，稲葉美佐子，甲斐明美，坂井千三：東京衛研年報，28-1，1，1977
2) 東京都衛生局発行：昭和54年度食中毒統計資料，昭和55年度発行予定
3) 工藤泰雄，太田建爾，斎藤香彦，松下　秀，坂井千三，善養寺浩：東京衛研年報，26-1，25，1975
4) Yamada, S., Igarashi, H., and Terayama, T.: *Microbiol. Immunol.*, 21, 675, 1977
5) 五十嵐英夫，山田澄夫，寺山　武：モダンメディア，24，519，1978
6) Lachica, R. V., Genigeorgis, G., and Hoeprich, P. D.: *Appl. Microbiol.*, 21, 585, 1971
7) Murakami, H., Matsumoto, M., Jinbo, K., Niwayama, K., Igarashi, H., and Yamada, S.: *J. Tokyo Vet. Zootech. Sci.*, 24, 50, 1977
8) 潮田　弘，寺山　武，坂井千三，善養寺浩：東京衛研年報，26-1，1，1975
9) 日本化学療法学会：*Chemotherapy*, 22, 1126, 1974
10) 東京都衛生局環境衛生部食品衛生課調査係資料
11) 善養寺浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐英夫，丸山務：食衛誌，12，501，1971
12) Chesbro, W. R., and Auborn, K.: *Appl. Microbiol.*, 15, 1150, 1967
13) Hájek, V., and Marsalek, E.: *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I.*, **Suppl.** 5, 11, 1975
14) Hájek, V., and Marsalek, E.: *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 216, 168, 1971
15) Marandon, J., and Oeding, P.: *Acta Path. et Microbiol. Scandinav.*, 67, 149, 1966
16) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課監修：畜産物中の残留物質検査法　第1集，120，昭和52年
17) 三橋　進，井上松久：モダンメディア，17，257，1971
18) Kusch, D.: *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig.*, B 164, 360, 1977

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 132-136, 1980

保温惣菜の温度管理と細菌の増殖について

新井輝義*, 池島伸至*, 入倉善久*, 神　真知子*
古幡幸子*, 松本昌雄*

Actual Storage Conditions of Warmed Delicatessens in the Market and Their Bacteriological Qualities

TERUYOSHI ARAI*, NOBUYUKI IKEJIMA*, YOSHIHISA IRIKURA*, MACHIKO JIN*, YUKIKO FURUHATA* and MASAO MATSUMOTO*

Surveys on the take-out dishes stored in showcases at various temperatures in delicatessens were made from a viewpoint of food microbiology.

Of the 193 food specimens taken from the stores in Tama district in Tokyo, it was learned that 154 (80.0%) were stored at the temperatures between 30 and 60°C, and 132 (68.4%) were kept in a showcase for 1 to 4 hours.

With regard to the standard plate count obtained, 187 (96.9%) out of 193 were found to be containing less than 10^4/g of aerobes. However, 6 (3.1%) specimens kept at a temperature between 20 and 49°C tended to show the highest count.

Throughout the survey including the experimental storage test of vegetable croquette, fried shrimp dumplings and roasted chinese dumplings, it was found that the optimum storage temperature was above 60°C, since between 45 and 55°C, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* multiply very quickly.

Keywords : warmed delicatessen, storage condition, bacterial qualities, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*

緒　言

近年，各種食品の流通および販売様式の多様化が著しく，それに伴い，食品の安全性および品質管理についての基礎的資料の必要性が新たに生じている．今日，食品の販売様式の1つとして，温蔵ショーケースを利用したいわゆる保温食品が流通し，逐年その販売量が増加している．しかし，その細菌学的な評価についての報告は少ない[1-4]．そこで著者らは東京都多摩地区で販売されている保温惣菜を対象に，衛生指導の基礎資料を得る目的で，その細菌汚染状況，温蔵ショーケースの温度と食品の保存時間について検討した．それにより明らかにされた保存温度および保存時間における問題点をふまえて，保温惣菜の最適な保存条件を把握するために実験的検討を行なった．

実験材料および方法

試料　代表的な保温惣菜として市販されているコロッケ49件，ギョウザ26件，シュウマイ23件，フライ18件，ミートボール15件，メンチカツ11件，ハンバーグ10件，春巻6件，唐揚5件，グラタン5件，その他25件，合計193検体を供試した．

市販保温惣菜の保温温度と保温時間　保温温度については，食品衛生監視員が収去時に温蔵ショーケースの庫内温度を測定し，保温時間については販売店から聴取した．

温蔵ショーケースの性能調査　代表的な温蔵ショーケース（N社製）を対象にFig. 1に示した庫内の各箇所の温度並びに当該箇所に置かれている保温惣菜の品温を測定した．

細菌検査　定法に準拠して一般生菌数（SPC），高温菌数（50°，24時間標準寒天培養菌数），大腸菌群，サルモネラ，黄色ブドウ球菌，セレウス菌およびウェルシュ菌等の検査を実施した．

高温菌の発育温度の測定　温度勾配振とう機（東洋科学産業（株）製，TN-3型）を使用し，35°から70°まで

* 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

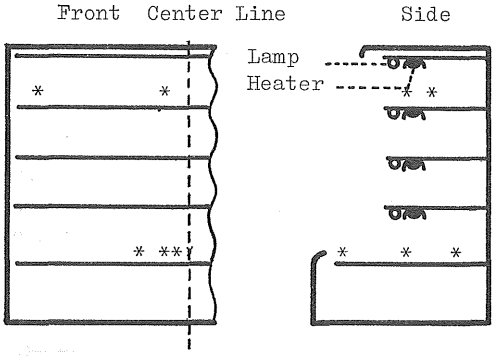


Fig. 1. Schema of Warmed Showcase
*: Ambient and food temperature were measured on these points.

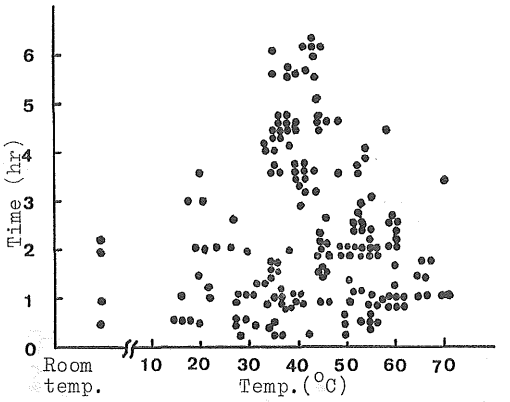


Fig. 2. Storage Conditions of Warmed Delicatessens in the Market.

の30段階の温度について振とう培養を行なった．発育試験用培地はトリプトソイブロース (Difco) を使用した．供試菌株の50° 培養菌液を滅菌生理食塩水で10^3/ml の菌量になるように希釈し，その0.1ml を各勾配温度の培養管に接種した．6時間振とう培養後各勾配温度の培養管から1ml ずつ採取し，定法に準じて混釈培養を行ない，50° で24時間培養後発生した集落数から至適発育温度を求めた．さらに18時間振とう培養後，各培養液の混濁の有無から発育上限温度を求めた．

保温惣菜の保存試験 販売の実態に即した保温温度と保温時間を選定して保存試験を次の方法で行なった．すなわち，製造直後の野菜コロッケ，揚げエビシュウマイおよび焼ギョウザ等を対象に，25°，35°，45°および55°の各温度で24時間保存し，保存直前および4時間，8時間，24時間ごとに SPC を求めると同時に，各保存温度と同一の温度（25°，45° および 55°）の生菌数も測定した．なお，各保存時間ごとに大腸菌群，黄色ブドウ球菌，サルモネラ，セレウス菌およびウェルシュ菌の検索も行なった．

主要菌の分離と同定 35°，45° および55° の各温度で保存した野菜コロッケ，揚げエビシュウマイおよび焼ギョウザ等の SPC 算定後，30～100 個程度の集落が形成された平板培地から無作為に20集落ずつ合計 171 集落を釣菌し，東の方法[6]および Bergey's Manual (1974)[7]に従って同定した．

Table 1. Incidence of Bacterial Count at 35° and 50° of Warmed Delicatessens on the Market

Storage temp. of foods (°C)	No. of samples tested	Incubation temperature for bacterial count (°C)	Bacterial count/g							
			$<10^2$	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
70 ～	3	35	1	1		1				
		50	2			1				
60 ～ 69	17	35	12	5						
		50	15	2						
50 ～ 59	51	35	23	17	9	2				
		50	32	12	7					
40 ～ 49	46	35	20	15	2	7	1	1		
		50	29	7	3	5	1	1		
30 ～ 39	49	35	19	16	8	4	1			1
		50	27	15	5	2				
20 ～ 29	17	35	10	3	2		1		1	
		50	14	3						
10 ～ 19	6	35	4	2						
		50	6							
Room temp.	4	35	2		1	1				
		50	2	1		1				

Table 2. Growth Characteristics of Bacilli Isolated from Warmed Delicatessens

Foods	Storage conditions		Growth temperature (°C)		
	Temp. (°C)	Time (hr)	Minimum	Optimum	Maximum
Humburg	20	1.5	≦ 38.0	45.0 ～ 55.0	57.2 ± 1.0
Nikuman	53	1.0	≦ 39.0	50.0 ± 0.5	57.6 ± 1.0
Nikuman	45	1.0	≦ 38.0	49.0 ± 0.5	54.0 ± 1.0
Meatball	24	2.5	≦ 35.5	46.0 ± 0.5	53.0 ± 1.0

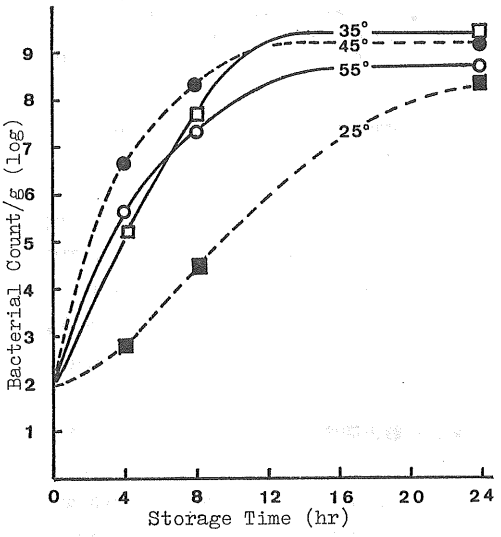


Fig. 3. Time Course of SPC on Croquette Stored at Different Temperatures.

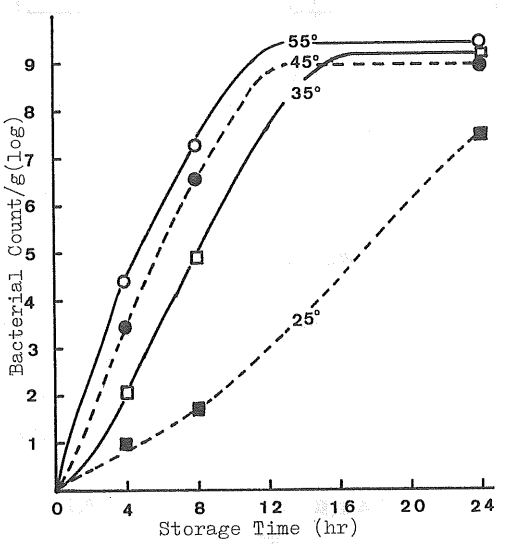


Fig. 4. Time Course of SPC on Syūmai Stored at Different Temperatures.

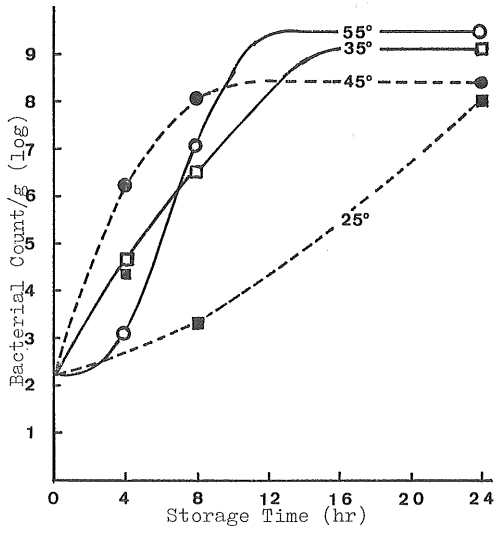


Fig. 5. Time Course of SPC on Gyōza Stored at Different Temperatures.

主要菌の発育上限温度測定 発育上限温度は, Gordon らの方法[8] に従い, あらかじめ所定の温度（35°, 40°, 45°, 50°, 55°または60°）に保温しておいた土壌抽出寒天斜面に上記の分離菌を塗抹し, 直ちに同じ温度の恒温水槽に保温し, 3日から7日の培養後の菌苔形成の有無によって求めた.

結果と考察

実態調査成績 市販保温惣菜の販売時の保温温度と保温時間は, Fig. 2 に示した. 当該食品は, 加熱調理された後, 熱いうちに, または放冷後の仕入れ品として温蔵ショーケースに保温されるのが普通である. 大半が30°～60°で1～4時間保温されていたが, 40°前後で5～6時間保存されているものがかなり多く認められた. 従って, 購入後喫食までの時間を加えると適温で7～8時間放置されている保温惣菜もあって, 食品の衛生学的品質保持上考慮すべきことである. 細菌検査の結果, 193検体のうち, 大腸菌群は8例が, セレウス菌は9例が, ウ

Table 3. Temperature Dependency of the Isolates Obtained from Various Food Stored at Different Temperatures

Storage conditions		No. of isolates from foods under each condition	Growth observed at					
Temp. (°C)	Time (hr)		35°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C
35	8	59	59	59	59	51	8	0
45	24	60	60	60	60	60	22	0
55	24	52	52	52	52	52	52	0

Note : Figures in the table indicate the number of isolates grown.

Table 4. An Incidence of Species Among the Principal Bacteria Isolated from Delicatessens Stored at Different Temperatures

Species	No. of isolates from delicatessens stored at								
	35°C for 8 hr			45°C for 24 hr			55°C for 24 hr		
	Gyōza	Croquette	Syūmai	Gyōza	Croquette	Syūmai	Gyōza	Croquette	Syūmai
B. subtilis	19	19	5	11	12	8	0	0	0
B. licheniformis	0	0	12	7	6	9	17	9	20
B. cereus	1	0	2	0	0	0	0	0	0
B. coagulans	0	0	0	2	1	1	3	2	0
Bacillus sp.	0	1	0	0	1	2	0	1	0
Total	20	20	19	20	20	20	20	12	20

ェルシュ菌は6例が陽性であった．大腸菌群数はいずれも少なく，ウェルシュ菌は 10^2/g レベルであったが，セレウス菌は10^2～10^4/g レベルであった．これらの菌が検出された食品に限ってその保温条件が特に劣悪であったということではなかった．なお，黄色ブドウ球菌とサルモネラは全く検出されなかった．各保温温度における保温惣菜のSPCと高温菌数との関係をTable 1に示した．SPC と高温菌数がともに多い保温惣菜は，40°～59° で保温されているもので，10^3～10^4/g レベルのものも多くみられ，中には東京都の措置基準の SPC 10^6/g を越えるものもみられた．ギョウザ，ハンバーグ，グラタンおよびオムレツなど焼物の多くは，SPC が高温菌数よりも1オーダー以上高く，コロッケ，魚フライ，メンチカツおよび春巻など揚げ物は，両者にオーダーの差は認められなかった．このように，保温惣菜の種類によって細菌の発育温度が異なるのは，原材料，加工方法，加熱調理方法の違い，特に加熱条件の違いによって生ずる食品中に残存する細菌叢の相違が大きく関与しているものと推測される．

高温菌の発育温度特性 ハンバーグ，肉まんおよびミートボール等の市販保温惣菜由来主要菌株（50° 培養分離菌）の至適発育温度は45°～50°，発育上限温度は53°～58°の範囲にあって，それらの菌株は，いずれも *Bacillus* 属であった．

保温惣菜の保存試験成績 野菜コロッケ，揚げエビシュウマイおよび焼ギョウザの各保存温度の SPC の推移を，Fig. 3～Fig. 5に示した．菌数の増加速度は食品の種類によってやや異なるが，総体的に温度が高いほど速かった．保存4時間後では，野菜コロッケが45°，55°，35°，25°保存の順に速く菌数が増加したのに対して，揚げエビシュウマイは55°，45°，35°，25°保存，焼ギョウザは45°，35°，55°，25°保存の順であって，いずれも最も速く増殖する保存温度では当初の菌数の 10^4 倍の増加を示した．保存8時間後に最も菌数が多くなる保存温度は，いずれの食品も4時間保存後の場合と同様であった．なお，8時間後の菌数は各食品とも 10^8/g に達したにもかかわらず，腐敗臭は感じられなかった．各温度で保存した食品の主要菌株の発育温度状況並びに菌種をTable 3 およびTable 4にそれぞれ示した．すなわち，ほとんどの菌株の発育上限温度は50°～55°で，60° ではいずれの菌株も発育不能であった．また，食品の種類にかかわらず，その保存温度と菌種が良く一致していることがわかった．すなわち，35°，8時間保存の野菜コロッケと焼ギョウザでは *B. subtilis* が，揚げエビシュウマイでは *B. licheniformis* が優勢を占め，45°，24時間保存では，いずれも *B. subtilis* と *B. licheniformis*

が等しく優勢であり，55°，24時間保存では，いずれも *B. licheniformis* が優勢であった．このように，*B. subtilis* と *B. licheniformis* との間には45°を境とした優占の逆転がみられた．この現象は，Gordon ら[8]の *Bacillus* 属菌の発育上限温度の成績とよく一致していた．

ところで，保温惣菜において優勢に増殖したこれらの *Bacillus* 属菌は本来自然環境に広く分布し，蛋白質や糖質をよく分解する常在菌であって，原材料に混入したものは加熱調理後でも熱に耐えて生残し，その後の取扱いによっても新たに付着するものであって，特に45°～55°で保温された場合は18～20分の世代時間で分裂を繰り返して食品を速やかに劣化させる．惣菜をはじめ，弁当類の販売温度については，既に厚生省が制定した衛生規範（環食第161号，54. 6 .29.）に10°以下か65°以上とすることが示されているし，藤原ら[9,11,12]，高橋ら[10]の熱蔵庫に関する研究報告や，田川ら[13]の食品の温蔵についての報告で細菌の殺菌および増殖を抑制する温度について考察されている．我々の実験でも保温惣菜における優勢菌は60°以上ならば増殖が抑制されることが示された．以上の観点から，惣菜を保温販売する場合は，温蔵ショーケース中の品温は60°以上に保たれねばならない．一般に使用されている温蔵ショーケースの保温性能調査[5]によると，Fig. 1に示されたように温度調節器を70°に設定した場合，5箇所の庫内温度は68°～50°という18°の，また品温は67°～52°という15°のばらつきが生じ，これは熱源と構造に起因するものであると報告されている．この様な性能の温蔵ショーケースの中で，食品の本質を損なうことのないような，しかも細菌が増殖できないような適温ですべての惣菜を保温販売することは非常に難しいことである．今後も現行どおり保温して販売する者に対し，行政は，短時間で売り尽すように指導すべきであろう．一方，性能の良い温蔵ショーケースの開発もまた必要である．

結　論

東京都多摩地区の食品販売店で販売されている保温惣菜について，著者らは食品細菌学的な見地から調査を行ない，以下の成績を得た．

1） 食品販売店から収去した試料193件のうち，154件（80.0%）は30～60℃の温度で，また132件（68.4%）は1～4時間保存されていた．

2） 一般細菌数についてみると，試料193件のうち，187件（96.9%）は 10^4/g 以下であった．しかし，20～49℃で保存されていた112件のうち6件は 10^5～10^8/g であった．

3） 野菜コロッケ，揚げエビシュウマイおよび焼ギョウザの保存試験の結果，45～55℃の間では，*B. subtilis* や *B. licheniformis* を主とした細菌が非常に速く増殖した．

4） 以上の調査並びに実験から，保温惣菜にとっての保存最適温度は60℃以上であることがわかった．

なお，本調査研究の実施に当り，環境衛生部食品監視課および青梅・福生両保健所の食品衛生監視員の方々から終始ご協力をいただきましたことに感謝いたします．
（本研究は昭和54年度当研究所調査研究課題「保温市販食品の流通過程における汚染状況」として実施し，その概要は第64回東京都衛生局学会1980年5月，で発表した．）

文　献

1) 森　喜一，松浦貞二，田中　博：全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録，128，1978
2) 北村久寿久，直井家寿太，丸山　務，小久保弥太郎，辺野喜正夫，松本　茂：都衛研年報，16，142，1965
3) 安東　晃，田辺良孝，畑本典昭：全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録，40，1976
4) 斉藤　勲，津田輝昭，大谷洋一，八反田元子：全国食品衛生監視員研修会研究発表抄録，40，1978
5) 池島伸至，新井輝義，入倉善久，神真知子，古幡幸子，松本昌雄，中嶋　誠，高取三郎，田村延一，稲垣俊彦，上条　宏，平山志津子，高良実之，荒井建三，安部勇三：東京都衛生局学会誌，No. 64，212，1980
6) 東　量三：*New Food Industry*，4，67，1962
7) Gibson, T. and Gordon, R. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 529, 1974, Williams & Wilkins, Baltimore
8) Gordon, R. E., Haynes, W. C. and Pang, C. H-N.: *The Genus Bacillus*, Agriculture Handbook No. 427, U. S. Department of Agriculture, 1973
9) 藤原邦達，榊原義之，向井英治，糸川崇之，工藤節子，山口三郎：食衛誌，5，68，1964
10) 高橋紀代子，稲垣洋子，戸田和子，藤原邦達：食衛誌，6，33，1965
11) 藤原邦達，高橋紀代子，稲垣洋子，蒲原一隆，戸田和子：食衛誌，6，331，1965
12) 藤原邦達，高橋紀代子，稲垣洋子，蒲原一隆，戸田和子：食衛誌，6，334，1965
13) 田川清，上原初枝：食衛誌，16，46，1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 137-141, 1980

ガスクロマトグラフィーによる食品中のヨウ素の定量法について

山野辺 秀 夫*, 鎌 田 国 広*, 鈴 木 助 治*, 原 田 裕 文*

Gas-Liquid Chromatographic Determination of Total Iodine in Food

HIDEO YAMANOBE*, KUNIHIRO KAMATA*, SUKEJI SUZUKI* and HIROFUMI HARADA

A method for determining total iodine in foods, mainly seaweeds, by gas-liquid chromatography was investigated. Ca. 100 milligram amount of the sample was ashed with treatment by general oxygen flask combustion method to decompose all bound iodine, and then oxidised to free iodine by adding potassium dichromate in acid solution. Iodine was converted by reaction with methylethylketone to iodoketone derivetive, 3-monoiodo-2-butanone, which was determined by gas-liquid chromatography equipped with an electron capture detector. The calibration curve showed linearity in the range of 0.01–0.10μg/ml of iodine. The recoveries and coefficients of variation of iodine added microgram levels for the seaweed samples were 82.4–84.8% and 3.89–4.37%, respectively. This method can be applied for rapid determinations of trace amounts of total iodine in foods.

Keywords : iodine, 3-monoiodo-2-butanone, ECD-GC, GC-Mass spectrometry, foods, seaweeds, Oxygen flask combustion method

緒　　言

ヨウ素の定量法には，比色法[1-3]，滴定法[4]，イオン電極法[5-7]，原子吸光分析法[8,9]，ケイ光X線分析法[7,10]などがあるが，これらの方法は，食品等の微量ヨウ素を定量するためには，感度，精度などの点で必ずしも満足できる方法とはいえない．また Hasty はペンタノン，アセトンなどの一連のケトン類とヨウ素とを反応させ，その生成物の強い電子親和性を利用して高感度な ECD 付ガスクロマトグラフィーによる定量法を報告[11,12]している．これは水溶液中，室温でヨウ素とケトン類を反応させるなど簡便な方法であるが，それらの反応条件や食品等の試料に対する応用性に関しては詳細に検討されていない．そこでわれわれは反応試薬としてメチルエチルケトン（以下 MEK と略す）を用い，微量のヨウ素を定量するための反応条件について種々検討し，感度，精度，再現性等いづれも満足できる方法を確立した．そしてさらに食品中のヨウ素を定量する場合の前処理法として酸素フラスコ燃焼法[13,14]を適用したところ十分満足する結果が得られた．

実 験 方 法

1. 試薬　ヨウ素標準原液：エタノールで再結晶したヨウ化カリウム130.8mgを精秤し，水に溶かして100mlとする（1mg/ml）．ヨウ素標準溶液：標準原液を水で希釈しヨウ素として0.1μg/mlの溶液を調製する．メチルエチルケトン：市販特級品を蒸留して79～80°の留分を用いた．ヘキサン：市販特級品を蒸留して用いた．その他の試薬：すべて試薬特級品を用いた．

2. 装置　ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-5A型，ECD (^{63}Ni) 付，ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)：日本電子製 JMS-D300，酸素フラスコ：浜田理科製 FHOI-A 型 (500ml)．

3. 試験溶液の調製　試料の一定量(約100mg)を正確にはかり，デシケータ中で充分乾燥したのち，常法[14,15]にしたがって酸素フラスコ中で燃焼させ，あらかじめ加えておいた吸収液 0.1NKOH 溶液20mlでフラスコ内の曇りが完全に消えるまで激しく振とうする．その吸収液10mlを50mlの分液ロートにとり，5N硫酸1ml，0.05%重クロム酸カリウム溶液1ml，MEK 0.5mlを加えてよく振りまぜる．室温に10分間放置したのち，ヘキサン10mlを加えて5分間振とうし，静置してヘキサン層を分取する．ヘキサン層を水5mlで2回洗浄したのち，無水硫酸ナトリウムで脱水し試験溶液とする．

4. ガスクロマトグラフィー　試験溶液の5μlを下記の条件に設定したガスクロマトグラフに注入し，得られ

* 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

たクロマトグラムのピーク高を測定する．別に作成した検量線からヨウ素の含有量を算出する．

ガスクロマトグラフの条件　カラム管：内径 3mm, 長さ 2 mガラスカラム，カラム充てん剤：2％PEG 20M, chromosorb W (60–80 mesh, AW–DMCS)，注入口温度：170°，カラム恒温槽：100°，検出器温度：230°，キャリヤーガス：窒素60m*l*/min，検出器：ECD(^{63}Ni)

5. 検量線の作成　ヨウ素標準溶液 2，4，6，8，10 m*l* をそれぞれ 50m*l* の分液ロートにとり，水を加えて 10m*l* とした液について以下試験溶液の調製の項にしたがって試験溶液を調製したのち，それぞれガスクロマトグラフィーを行ない得られたガスクロマトグラムのピーク高を測定し，これより検量線を作成する．

実験結果および考察

本法の骨子の概要は次のようである．すなわち試料中の結合型 I→I^-→I_2→iodoketone→GC 測定である．したがってこれらの変換を行なうため，まず試料中の有機および無機ヨウ素を灰化し，ヨウ素イオンとしてから酸化によってヨウ素 (I_2) とする．この I_2 は酸性条件下で MEK と容易に反応しヨードケトンを生成する．以下にヨウ素イオンの酸化や MEK のヨード化などの反応条件を検討した結果を示す．

1. ヨードケトン誘導体の生成　硫酸酸性溶液中にヨウ素と MEK を共存させた場合に生成する物質が MEK のヨウ素誘導体であることを確認するため質量分析を行なった．すなわちヨウ素標準原液1m*l* に硫酸酸性下，重クロム酸カリウムを加えてヨウ素イオンをヨウ素に酸化したのち，MEK と反応させ，ここに得た反応物をヘキサン抽出したのち GC–MS によって分析を行なった．その結果を Fig. 1 に示す．この誘導体の親イオン M^+ は m/e198 であり，開裂ピークとして m/e183, 155, 127, 71, 43にフラグメントが認められる．このことから本誘導体は 3–モノヨード–2–ブタノン (MIB) であることが確認された．

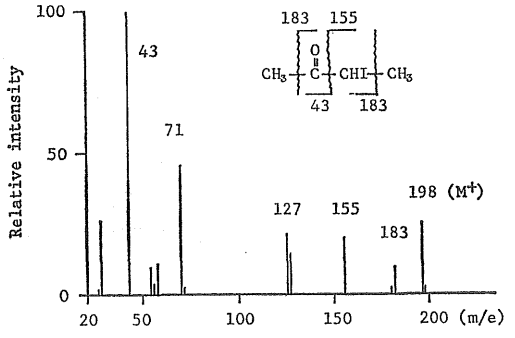


Fig. 1. GC–MS Spectra of the Iodoketone Derivative

Conditions : instrument, JMS–D300; detector, total ion monitor; ion source, electro impact; column ; 2% PEG 20 M on chromosorb W (60～80 mesh, AW–DMCS) 6 ft×2 mm i.d. glass ; temperature, injection temp. 200°, column temp. 140°, enricher temp. 270°; ionization voltage, 70eV ; accelerated voltage, 3 KV; ionization current 300 μA ; carrier gas, He (30m*l*/min)

2. カラム充てん剤　充てん剤として Hasty[11,12] が用いた SE–30の他に QF–1, OV–1, OV–17, OV–101, OV–210, OV–225, PEG–20M, DEGS などについて検討を行なった．その結果，MIB は PEG–20M と DEGS において感度および分離能が最もすぐれていることが認められた．

3. 反応条件　1) 酸化剤について：ヨウ素と MEK を反応させるためにはヨウ素イオンを酸化してヨウ素に変えなければならない．そこで，この場合に使用する酸化剤について検討を行なった．酸化剤としては，亜硝酸カリウム，ヨウ素酸カリウム，過酸化水素，重クロム酸カリウム，過マンガン酸カリウムの5種類で，これらのうち過マンガン酸カリウムは MIB を生成しないことが認められた．これは過マンガン酸カリウムの強い酸化性のため MEK が分解されることに原因があると考えられる．また Hasty[11,12] が用いたヨウ素酸カリウムは，Hendrik[15] が指摘しているようにガスクロマトグラム上で MIB と同一の位置に妨害ピークが認められ，定量値に誤差を与えた．これに対して，亜硝酸カリウム，重クロム酸カリウム，過酸化水素はいずれの場合も MIB の生成が良好であり，また妨害ピークも認められなかった．したがってこれらは本法における酸化剤として有用性が高いことが確認された．さらにこの三者を比較すると亜

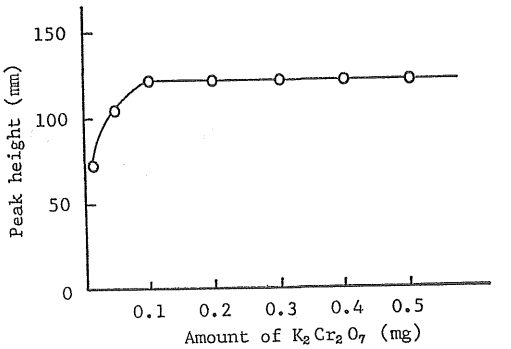


Fig. 2. Effect of Amount of Potassium Dichromate on the Formation of 3–monoiodo–2–butanone

Iodine, 0.5 μg ; 5 N sulfuric acid, 1 m*l* ; methyl ethyl ketone, 0.5 m*l* ; reaction temp., room temp. ; reaction time, 10 min.

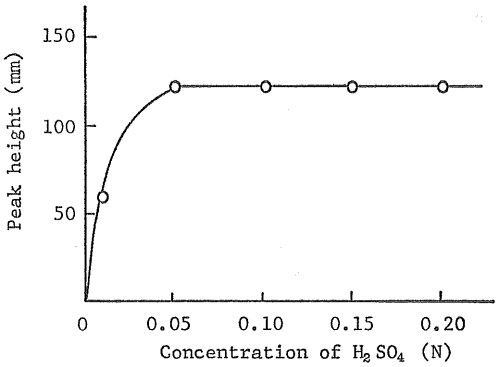


Fig. 3. Effect of Concentration of Sulfuric Acid on the Formation of 3-monoiodo-2-butanone

Iodine, 0.5μg; 0.05% potassium dichromate, 1ml; methyl ethyl ketone, 0.5 ml; reaction temp., room temp.; reaction time, 10 min.

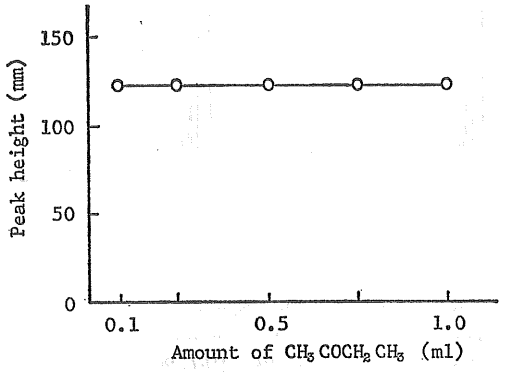


Fig. 4. Effect of Amount of Methyl Ethyl Ketone on the Formation of 3-monoiodo-2-butanone

Iodine, 0.5 μg; 0.05% potassium dichromate, 1 ml; 5 N sulfuric acid, 1ml; reaction temp., room temp.; reaction time, 10 min.

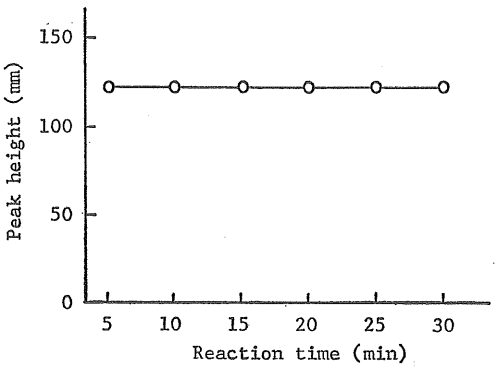


Fig. 5. Effect of Reaction Time on the Formation of 3-monoiodo-2-butanone

Iodine, 0.5μg ;0.05% potassium dichromate, 1ml; 5 N sulfuric acid, 1 ml; methyl ethyl ketone, 0.5 ml; reaction temp., room temp.

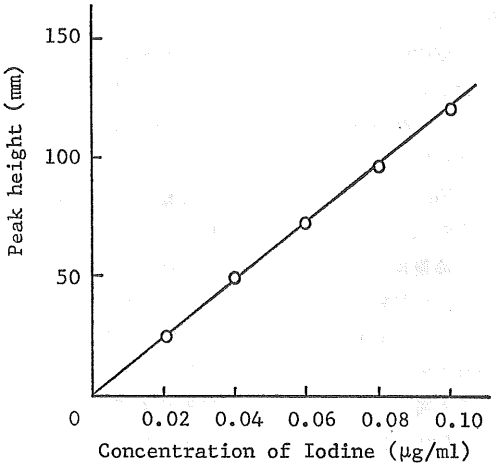


Fig. 6. Calibration Curve of Iodine

硝酸カリウムの場合は Hendrik[15] も報告しているように，MIB の近くに MEK の Oximino 誘導体と思われるピークが認められ，過酸化水素ではその濃度が高い場合にやはり MIB 近くに未知のピークが認められた．そこで本定量法における酸化剤として重クロム酸カリウムを用いることにした．

2) 重クロム酸カリウム量について：酸化剤として用いる重クロム酸カリウム量について検討した．ヨウ素標準溶液 5ml (I:0.5μg) に対し，重クロム酸カリウムの添加量を0.01～10mg と段階的に変化させ，それぞれについて反応を行ない MIB の生成量を調べた．その結果，Fig. 2 に示すように重クロム酸カリウムが 0.1mg 以上あれば MIB の生成量が一定になることが認められた．そこで0.05% 重クロム酸カリウム溶液 1ml を添加することにした．

3) 硫酸濃度について：酸化によってヨウ素イオンをヨウ素にかえ，これにMEK を反応させて定量的にMIB を生成させるためには，酸性で行なう必要がある．そこで今回，われわれは酸として硫酸を用いることとし，この場合に用いる 硫酸量と MIB 生成量との関係について検討した．その結果，Fig. 3 に示すように硫酸を添加しない場合には MIB はほとんど生成せず，反応溶液中の硫酸濃度が高くなるのに比例して MIB 生成量も増加し，0.05N以上の硫酸濃度において，その生成量は一定になることが認められた．そこで今回，硫酸量として，3. 試験溶液の調製の項において吸収液として0.1NKOH 溶液を用いるので，このことを考慮し，5 N硫酸1ml を用いることにした．

Table 1. Recovery of Iodine added to Seaweeds

Seaweeds	Weight (mg)	N	Added (μg)	Recovery (%)	C.V. (%)
Wakame	10.46—10.56	5	1	84.0	4.25
	10.66—10.97	5	2	84.8	4.37
Nori	10.00—10.13	5	1	82.4	4.13
	10.03—10.15	5	2	83.2	3.89
Tororokonbu	1.45— 1.61	5	1	84.2	4.06
	2.09— 2.54	5	2	83.0	4.14

C.V.: Coefficient of Variation, N: number of samples

4) MEK 量について：MIB の生成に必要な MEK 量を求めるため，ヨウ素標準溶液 5m*l*(I：0.5μg) に対して MEK の添加量を0.1–1.0m*l* と段階的に変化させ，それぞれについて反応を行ない MIB の生成量を比較したところ，Fig. 4 に示すように0.1m*l* 以上あればよいことが認められた．実際の操作にあたっては MEK 添加量を 0.5m*l* とした．

5) 反応時間について：ヨウ素標準溶液 5m*l* (I：0.5 μg) に水を加えて10m*l* としたのち，5N硫酸 1m*l*，0.05 %重クロム酸カリウム溶液 1m*l*，MEK 0.5m*l* を加えて室温で放置し，5分ごとに MIB の生成量を測定したところ，Fig. 5 に示すようにその生成量は5分以上の放置で一定を示したので反応時間は10分間とした．

4. 検量線 以上得られた測定条件にもとずき実験方法の5．検量線の作成の項にしたがって検量線を作成したところ，Fig. 6 に示すように 0.01～0.1μg/m*l* の範囲で直線性を示した．また，本定量法における測定値の再現性を確かめるため，ヨウ素標準溶液 5 m*l* を用いて検量線作成と同様に操作してヨウ素の測定を10回繰り返し行なったところ，変動係数は0.67%と良好な再現性を示した．

5. 妨害 本定量法に対するクロルおよびブロムの妨害について検討した．すなわち，ヨウ素標準溶液 5 m*l* (I：0.5μg)に対して KBr および NaCl をそれぞれ Br，Cl として 1mg ずつ添加し定量操作をおこなったところ，それらの元素はヨウ素の定量に妨害をおよぼさないことが認められた．

6. 添加回収実験 実際試料に対する本試験法の定量性を確かめるため，ワカメ，ノリおよびトロロコンブの3種類の海藻類を選び，これにヨウ素 1μg および 2μg を添加し，実験方法の項にしたがって回収実験を行なった．その定量結果を Table 1 に，またそのガスクロマトグラムを Fig. 7 に示す．Table 1 に示すように平均82.4～84.8%と良好な回収率が得られ，さらにそれぞれの回収率における変動係数を求めたところ，3.89～4.37%であった．また，Fig. 7 のクロマトグラムにおいても妨害ピークはみられず，本法は十分実用に供しうる定量法であると考えられる．

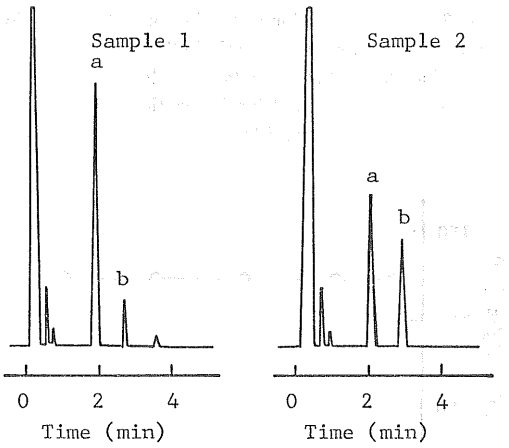


Fig. 7. Gas Chromatograms of Examined Samples
Sample 1 : tororokonbu Sample 2 : nori a : 3-monoiodo-2-butanone b : unknown
Conditions: column, 2% PEG 20 M (2m×3mm i.d.); tempreture, column temp. 100°, injection temp. 170°, detector temp. 230°; carrier gas, N_2 (60 m*l*/min); detector, ECD (^{63}Ni)

7. 実際試料中のヨウ素の測定 市販のノリ，トロロコンブ，コンブ，ヒジキ，ワカメの計21検体について本定量法を適用した．その結果を Table 2 に示す．平均値でみると，ノリ 9.7ppm，トロロコンブ2253.6ppm，コンブ2269.1ppm，ヒジキ535.4ppm，ワカメ92.2ppm といずれも高いヨウ素含有量を示している．これらの値は Whyte[16]，安達ら[17]が同種の海藻類についてイオン電極法により測定した結果とほぼ一致している．本定量法は前処理として酸素フラスコ燃焼法により試料の灰化を行なうことから，サンプリングの量は約100mg 前後に制約される．したがって試料中のヨウ素含有量が極めて微量の場合は，おのずから定量に限界がある．試料量を g

Table 2. Iodine Contents of Seaweeds

Sample	Sample taken (mg)	N	Range (ppm)	Av. (ppm)
Nori	45.34—219.60	5	2.1— 29.5	9.7
Tororokonbu	4.91— 6.00	4	1868.1—2773.4	2253.6
Konbu	4.05— 7.31	5	1656.6—3306.0	2269.1
Hiziki	83.07—104.45	5	408.5— 623.8	535.4
Wakame	10.51— 34.14	2	70.3— 114.2	92.2

N : number of samples

オーダーで取れるように灰化法を改善すれば，実際試料に対する適用範囲が更に拡大されるものと考えられる．

まとめ

ヨウ素とメチルエチルケトンは容易に反応し3-モノヨード-2-ブタノンを生成することが確かめられた．なお，この反応は非常に再現性がよく，生成した3-モノヨード-2-ブタノンは強い電子親和性を有するため，ECD-GCによって微量のヨウ素が定量可能である．さらに前処理として酸素フラスコ燃焼法を用いることにより，迅速且つ精度よく食品中のヨウ素の分析が可能であった．

文献

1) Ellis, G. H., and Duncan, G. D.: *Anal. Chem.*, 25, 1558, 1953
2) 無機応用比色分析編集委員会編：無機応用比色分析 3, 49, 1974, 共立出版
3) Joerin, M. M.: *Analyst*, 100, 7, 1975
4) 日本薬学会編：衛生試験法注解，905，1973，金原出版
5) Hoover, W. L., Melton, J. R., and Howard, P. A.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 54, 760, 1971
6) 鈴木房宗，小川 功，水上雅義：衛生化学，21，84，1975
7) Creeclius, E. A.: *Anal. Chem.*, 47, 2034, 1975
8) 山本勇麓，熊丸尚宏，林 康久ら：分析化学，17，92，1968
9) Kumamaru, K.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 42, 956, 1969
10) Pundham, J. T., Strausz, D. P., and Strausz, K. I.: *Anal. Chem.*, 47, 2030, 1975
11) Hasty, R. A.: *Mikrochim. Acta*, 348, 1971
12) Hasty, R. A.: *Mikrochim. Acta*, 621, 1973
13) 小野江敏浩：分析化学，12，490，1963
14) 日本公定書協会：第九改正日本薬局方，第一部，解説書，B-71，1976，広川書店
15) Hendrik, J. B.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 60, 1307, 1977
16) Whyte, J. N. C., and Englar, J. R.: *Analyst*, 101, 815, 1976
17) 安達修一，松江睦子，川井英雄ら：食衛誌，19，491，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 142-148, 1980

都内搬入米におけるカドミウム含有量について

伊藤弘一*, 原田裕文*

Contents of Cadmium in Brown Rice sent in Tokyo

KOICHI ITO and HIROFUMI HARADA

Keywords：玄米 brown rice, カドミウム cadmium

緒　言

昭和30年富山県神通川流域でイタイイタイ病が発見されて以来，我々の主食である米中のカドミウム含有量が問題となった．このことにより厚生省は，食品衛生法[1]において米中カドミウム含有量の安全基準を1.0ppmと定めた．一方東京都においては0.4ppmと独自の基準値をもうけて，都民に消費される都内搬入米についてカドミウム含有量の実態調査を行なうこととなり，昭和48年12月より現在に至るまで毎年実施してきた．今回著者らは過去8年間調査して得られた結果を統計処理し検討を行なったところ二三の知見が得られたので報告する．

試料および方法

1. **試料**　昭和48年12月より昭和55年3月までに各産地より都内米穀倉庫に搬入された玄米をつぎのaおよびbの条件で採取して分析検体とし，その約10gを精密にはかりとって試験に供した．

a．単一検体　単一の俵または袋よりサシをもって採取した玄米を検体とした．

b．混合検体　厚生省告示の米の規格基準[1]による方法(以下公定法とする)，すなわち倉庫別または生産地別の検査ロットを設定し，各検査ロットごとの俵又は袋数の平方根に相当する数の俵または袋よりサシをもってそれぞれ同量ずつを採取し，採取した玄米を十分に混和して検体とした．

2. **試験方法**　前処理操作および定量法は，厚生省告示の公定法に基づいて行なった．すなわち，試料約10gを精密にはかりとり硫硝酸灰化法を用いて湿式分解したのち，分解液をアンモニア水で中和し，ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムを加え，反応して生じたカドミウム錯体をメチルイソブチルケトンで抽出し，抽出液について原子吸光法を用いて定量を行なった．

結果および考察

1. **ヒストグラム**　比較的試料数の多かった単一検体の昭和50年，51年，52年および全試料の合計を例にとり，

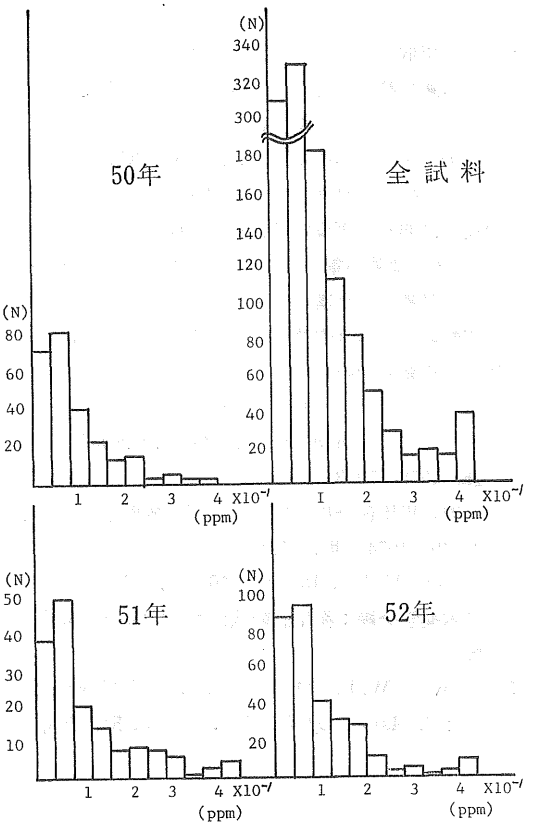


図 1. 搬入年別の玄米のカドミウム含有量の分布

玄米中の各含有量に対する出現度数のヒストグラムを作製したところ，図1に示すような結果が得られた．図の横軸はカドミウムの含有量（ppm）をあらわす．図1からわかるようにその分布は低含有量側にかたよりがみられた．一般にこのような分布パターンは対数正規分布に近似するために，含有量の常用対数をとってヒストグラムを作製したところ，図2にみられるようにほぼ正規分布に近似することが認められた．なお負の対数値をとら

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

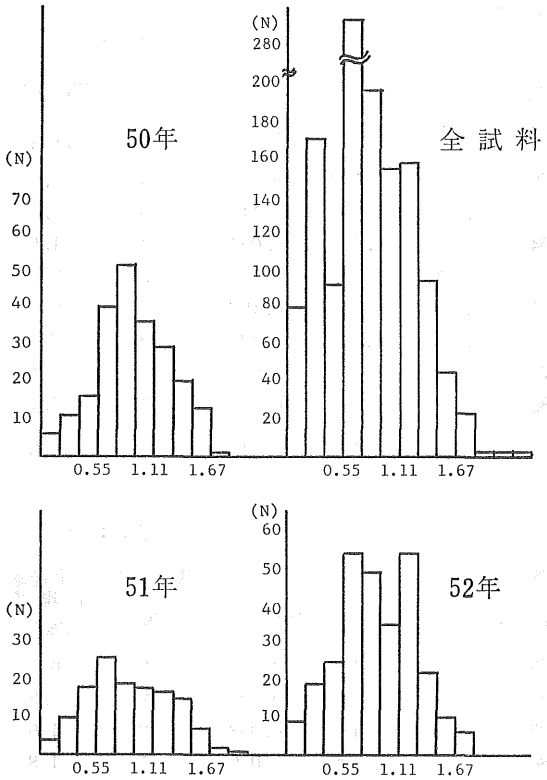


図 2. 搬入年別による玄米のカドミウム含有量の対数変換値の分布

ないように含有量に 10^2 を乗じて対数変換を行なった.

2. 搬入年別カドミウム含有量 搬入年別にカドミウム含有量を調べるために，単一検体および混合検体について，検体数，含有量の範囲，対数平均値，対数標準偏差，対数平均値および標準偏差から実数に復元した平均値および標準偏差，含有量から直接求めた実数平均値および標準偏差，都の基準である 0.4ppm をこえた検体数およびその出現率をそれぞれ表1に示した．平均値について図1と比較してみると，実数の平均値よりも対数平均値より実数に復元した値の方が実際の分布状態によく適合していることが認められた．以後平均値はこの実数復元値つまり幾何平均値を用いることとする．単一検体において，食品衛生法の規格基準 1.0ppm を上まわった試料は，調査を開始した年の3.04ppmと翌年の1.34ppmの二試料のみで，以後基準を上まわる試料はみられなかった．又都の規格基準0.4ppmを上まわる試料は52年の9検体を最高として，毎年数検体が検出された．一方混合検体では 1.0ppm を上まわる試料はみられなかったが，0.4ppmを上まわる試料は毎年1～2検体が検出された．そして全試料に対するカドミウム含有量平均値は，単一検体において 0.062ppm であり混合検体では 0.087ppm であった．

3. 搬入年別の平均値および基準超過出現率の検定 単一検体について各搬入年別のカドミウム含有量についてF検定を行なったところ分散に有意差が認められなかった．また各搬入年別の平均値の差の検定を行なったところ表2に示す t_0 値が得られた．49年—53年，50年—54年，50年—55年，52年—53年において5％の危険率で有意差が認められたが，その他においては有意差は認められなかった．一方，混合検体においてはF検定，t検定においてすべて有意差は認められなかった．次に各搬入年別の基準超過出現率の差の χ^2 検定を行ない，得られた χ_0^2 値を表3に示した．単一検体においては，50年—53年において1％の危険率で有意差が認められ，また48年—50年および49年—50年において5％の危険率で有意差が認められた．しかし，全体をとおしてみると，2×8分割表によって得られた χ_0^2 値は0.28となり，$\chi^2(7, 0.05) = 14.07$ と比較して有意差は認められなかった．また混合検体においては，ふたつの搬入年ごとの有意差は認められず，全体としても $\chi_0^2 = 0.002$ となり，$\chi^2(3, 0.05) = 7.8$ と比較して有意差は認められなかった．

4. 政府管理米と自主流通米の比較 政府管理米と自主流通米とを比較するために，それぞれについて平均値および標準偏差を算出し表4に示した．単一検体については，政府管理米の平均値は0.55ppmであり，自主流通米の平均値は 0.062ppm であった．又混合検体においては前者の平均値は 0.090ppm であるのに対し後者のそれは0.086ppm であった．しかしながら政府管理米と自主流通米とのカドミウム含有量についてF検定を行なったところ分散には有意差が認められなかった．そして単一検体と混合検体とについてそれぞれ政府管理米と自主流通米との間で平均値の差のt検定を行なったところ，単一検体，混合検体の両者とも，政府管理米と自主流通米との間において有意差は認められなかった．また基準超過出現率においても有意差は認められなかった．

5. 生産地方別の比較 生産地方別にカドミウム含有量に対する出現度数のヒストグラムを図3に示す．図の横軸は含有量(ppm)を示す．図3に示すように各地方別においてその分布パターンには差異が認められた．すなわち北海道においては含有量の分布は低含有量側に集中しているが，東北地方の分布は低含有量側に集中してはいるものの高含有量側へ漸次減少しながら尾をひく分布を示した．また関東地方の分布は東北地方のそれにきわめて近似したパターンを示した．これら三者に対し北陸地方においては，分布は低含有量側から高含有量側へ台

表 1. 搬入年別カドミウム含有量

1) 単一検体

単位：ppm

搬入年	検体数	範囲	対数変換値		実数復元値		実数値		基準超過検体数	基準超過出現率(%)
			平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		
昭和48年	45	N. D. ～3. 04	0. 898	0. 538	0. 079	0. 035	0. 192	0. 453	3	6. 7
49年	153	N. D. ～1. 34	0. 784	0. 401	0. 061	0. 025	0. 099	0. 146	8	5. 2
50年	274	N. D. ～0. 68	0. 731	0. 465	0. 054	0. 029	0. 090	0. 094	4	1. 5
51年	161	N. D. ～0. 72	0. 816	0. 469	0. 065	0. 029	0. 112	0. 123	5	3. 1
52年	323	N. D. ～0. 70	0. 786	0. 452	0. 061	0. 028	0. 100	0. 108	9	2. 8
53年	126	N. D. ～0. 70	0. 887	0. 428	0. 077	0. 027	0. 121	0. 126	8	6. 3
54年	73	N. D. ～0. 54	0. 851	0. 341	0. 071	0. 022	0. 097	0. 090	1	1. 4
55年	41	N. D. ～0. 54	0. 916	0. 391	0. 082	0. 025	0. 120	0. 109	1	2. 4
合計	1196	N. D. ～3. 04	0. 795	0. 450	0. 062	0. 028	0. 105	0. 142	39	3. 3

N. D. ＝定量限界以下

2) 混合検体

単位：ppm

搬入年	検体数	範囲	対数変換値		実数復元値		実数値		基準超過検体数	基準超過出現率(%)
			平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		
昭和52年	4	0. 13～0. 24	1. 245	0. 169	0. 173	0. 013	0. 180	0. 046	0	0
53年	136	N. D. ～0. 49	0. 969	0. 384	0. 093	0. 024	0. 130	0. 100	2	1. 5
54年	107	N. D. ～0. 56	0. 905	0. 353	0. 080	0. 023	0. 110	0. 098	2	1. 9
55年	57	0. 02～0. 47	0. 933	0. 274	0. 086	0. 019	0. 106	0. 079	1	1. 8
合計	304	N. D. ～0. 56	0. 942	0. 354	0. 087	0. 023	0. 118	0. 098	5	1. 6

N. D. ＝定量限界以下

表 2. 搬入年別の平均値の差の t 検定

	昭和48年	49	50	51	52	53	54	55
昭和48年								
49	0. 1537					*		
50	0. 6819	1. 1516					*	*
51	1. 0006	0. 6552	1. 7824					
52	1. 5129	0. 0424	1. 4245	0. 6775		*		
53	0. 1774	2. 0500	0. 3144	0. 4141	2. 1469			
54	0. 5871	1. 2105	2. 0203	0. 5622	1. 1402	0. 6208		
55	0. 1748	1. 8857	2. 4095	1. 2586	1. 7556	0. 3907	0. 9386	

*＝(P＜0. 05)　**＝(P＜0. 01)

状の分布を示し 0. 2ppm 附近より漸次減少するパターンを示した. つぎに, 地方別にF検定を行なったところ地方別に差があることが推定されたので, 各地方別の平均値の差の t 検定を行なった. 得られた t_0 値は北海道—東北＝5. 227, 北海道—関東＝6. 689, 北海道—北陸＝5. 227, 東北—関東＝1. 653, 東北—北陸＝7. 765, 関東—北陸＝5. 407 であった. 図3のヒストグラムのパターンでも東北地方の分布と関東地方の分布とはきわめて近似してい

表 3. 搬入年別の基準超過出現率の χ^2 検定

	昭和48年	49	50	51	52	53	54	55
昭和48年			*					
49	0.1370		*					
50	4.8825	5.1059				**		
51	1.1948	0.8911	1.4317					
52	1.8852	1.7983	1.2246	0.0390				
53	0.0056	0.1605	7.0904	1.7197	3.1585			
54	2.3850	1.9246	0.0033	0.6057	0.4854	2.6540		
55	0.8646	0.0632	0.2189	0.0504	0.0164	0.9276	0.1741	

$\chi^2(1, 0.05)=3.8414<*<\chi^2(1, 0.01)=6.6349<**$

表 4. 政府管理米と自主流通米におけるカドミウム含有量の比較

1) 単一検体

	検体数	範囲	含有量 (ppm)	基準超過検体数	基準超過出現率	χ^2_0	t_0
政府管理米	305	N. D. ～0.70	0.055±0.029	6	2.0	0.0695	1.3791
自主流通米	525	N. D. ～0.70	0.062±0.027	9	1.7		

$\chi^2(1, 0.05)=3.84146$ $t(120, 0.05)=1.98$

2) 混合検体

	検体数	範囲	含有量 (ppm)	基準超過検体数	基準超過出現率	χ^2_0	t_0
政府管理米	106	N. D. ～0.49	0.090±0.024	2	1.9	0.0562	0.4620
自主流通米	197	N. D. ～0.56	0.086±0.022	3	1.5		

$\chi^2(1, 0.05)=3.84146$ $t(120, 0.05)=1.98$

ることが示され，t 検定の結果においてもこの両者は有意差が認められず．この両者はきわめて近似していることが認められた．しかしその他の地方においてはそれぞれ 0.1% の危険率で有意差が認められた．

6. 品種別の比較 都内で現在流通している比較的搬入量の多い品種について各品種別にカドミウム含有量を表 5 に示した．各品種の検体数の多少を考慮する必要があると思われるが，表に示されたように各品種のカドミウム含有量の平均値には差が認められた．山上ら[2]は，早生種においてカドミウム含有量が少なく，栽培期間の短い品種ほど含有量は少ないと述べているが，事実栽培期間の短いと思われる東北，北海道地方で栽培されている品種であるレイメイの含有量は少なかった．また図 3 において北陸地方産の米のカドミウム含有量が高いことが示されているが，表 5 においてもこの地方を主産地とする越路早生およびコシヒカリの含有量は比較的高い値を示した．つぎに品種別に F 検定を行なったところ品種間に差があることが推定されたので，各品種別の平均値の差の t 検定を行ない得られた t_0 値を表 6 に示す．この表においてレイメイはすべての品種とにおいて 1% または，0.1 の危険率で有意差が認められた．また，その他 0.1% の危険率で有意差が認められた組合わせは，キヨニシキ—コシヒカリ，越路早生—ササニシキ，コシヒカリ—ササニシキ，トヨニシキ—ササニシキであった．前項において栽培地域間に有意差のあることが認められたが，このことは表 6 においても栽培地域の異なる品種において有意差のあることにより十分裏づけられた．

7. 同一品種における生産県別の比較 表 6 において同一地方を主生産地とするトドロキワセ—日本晴に有意差が認められなかったのに対し，同一地方を主生産地とするトヨニシキ—ササニシキに有意差が認められたため，同一地方内においても生産県別に有意差のあることが推

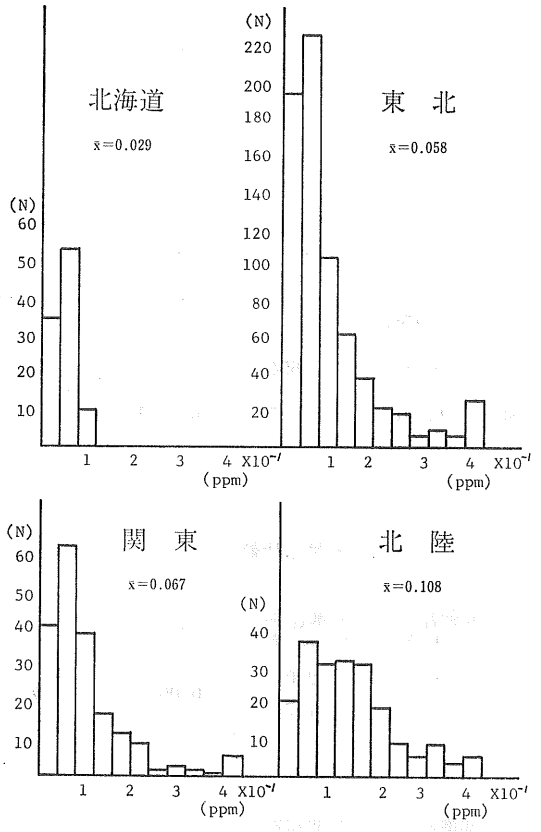


図 3. 生産地方別の玄米のカドミウム含有量の分布

定された．そのために同一品種を用いて生産県別にカドミウム含有量について比較し表7に示した．まず東北地方において生産されているキヨニシキおよびササニシキについてみると，いずれもその主生産県である山形県および宮城県の値が低いため全体としては比較的低い値を示した．しかしキヨニシキにおいては，秋田県は山形県につぐ検体数であったが，含有量は倍という値を示した．つぎに東北，関東地方で生産されているトヨニシキにおいては主生産県が秋田県のために，全体の値が高くなっていると思われる．そしてこの品種において，秋田県を除いた他の生産県産の米のカドミウム含有量は，他の品種の含有量と比べて差異が認められなかった．また，関東，北陸地方にて生産されているコシヒカリについてみると，関東に比し新潟，富山および石川県は高い含有量を示した．またこの北陸地方について越路早生を用いて比較してみると，富山県産の米のカドミウム含有量は新潟県産および石川県産の米の含有量に比し，倍の値を示した．

結　論

1. 搬入年別の米のカドミウム含有量については，平均値および都の基準超過出現率において経年的変化は認められなかった．そして全試料の平均含有量は，0.062 ppm であり，基準超過出現率は3.3% であったが，食品衛生法の規格基準 1.0ppm を上まわった試料は48年および49年に1検体ずつが検出されたのみでその後現在まで検出されていない．

2. 政府管理米と自主流通米について比較したところ，含有量平均値および基準超過出現率共に有意差は認められなかった．

3. 生産地方別の比較において，北海道および青森等の北東北地方産の米のカドミウム含有量は低く，北陸地方産の米の含有量は比較的高い傾向を示した．東北地方産と関東地方産との米のカドミウム含有量の分布は近似したパターンを示した．

4. 品種別のカドミウム含有量について比較を行なってみると，北海道等北日本を産地とする品種の含有量は低く，北陸地方を主産地とする品種において高い傾向が

表 5. 品種別のカドミウム含有量

単位：ppm

品種名	単一検体			混合検体		
	検体数	範囲	含有量	検体数	範囲	含有量
キヨニキシ	131	N. D. ～1.34	0.061±0.029	14	N. D. ～0.22	0.062±0.025
越路早生	94	N. D. ～0.41	0.090±0.022	15	0.02～0.55	0.093±0.028
コシヒカリ	101	N. D. ～0.70	0.105±0.027	28	0.03～0.32	0.121±0.017
ササニシキ	261	N. D. ～0.54	0.054±0.026	47	N. D. ～0.36	0.073±0.020
トドロキワセ	32	N. D. ～0.42	0.066±0.021	10	0.02～0.28	0.101±0.027
トヨニシキ	196	N. D. ～3.04	0.082±0.028	28	N. D. ～0.49	0.104±0.031
日本晴	48	N. D. ～0.42	0.076±0.022	15	0.03～0.26	0.109±0.018
レイメイ	46	N. D. ～0.70	0.033±0.080	7	0.02～0.30	0.092±0.030

表 6. 品種別の平均値の差の t 検定

	キヨニシキ	越路早生	コシヒカリ	ササニシキ	トドロキワセ	トヨニシキ	日本晴	レイメイ
キヨニシキ		**	***			*		***
越路早生	2.8974			***				***
コシヒカリ	3.9266	1.2092		**	*			***
ササニシキ	1.2962	4.6561	5.9543			***	*	**
トドロキワセ	0.3343	1.9546	2.3066	1.1529				**
トヨニシキ	2.5044	0.6841	1.9097	4.6775	1.1526			***
日本晴	1.2500	1.1826	1.9786	2.3780	0.7009	0.5297		***
レイメイ	3.5014	6.1556	6.4002	3.2244	2.8748	5.4896	4.2300	

*=(P<0.05)　**=(P<0.01)　***=(P<0.001)

表 7. 同一品種における生産県別カドミウム含有量

1) キヨニシキ　　単位：ppm

県名	単一検体			混合検体		
	検体数	範囲	含有量	検体数	範囲	含有量
岩手	6	0.03～0.10	0.043±0.016	1	0.05	0.050
秋田	46	N.D. ～1.34	0.085±0.033	6	0.04～0.18	0.098±0.018
山形	63	N.D. ～0.19	0.048±0.025	7	N.D. ～0.25	0.043±0.029
福島	15	N.D. ～0.66	0.062±0.032			
2) 越路早生						
新潟	64	N.D. ～0.34	0.085±0.021	6	0.02～0.30	0.091±0.022
富山	19	0.02～0.41	0.144±0.021	5	0.05～0.55	0.163±0.026
石川	13	N.D. ～0.23	0.046±0.028	4	0.02～0.26	0.053±0.031
3) コシヒカリ						
茨城	12	N.D. ～0.47	0.034±0.079	1	0.14	0.14
栃木	18	N.D. ～0.38	0.073±0.023	2	0.05～0.07	0.059
千葉	10	0.02～0.46	0.091±0.027	7	0.07～0.26	0.117±0.016
新潟	23	N.D. ～0.50	0.110±0.028	8	0.07～0.28	0.133±0.017
富山	16	0.08～0.67	0.197±0.017	5	0.13～0.32	0.175±0.014
石川	14	N.D. ～0.70	0.139±0.028	2	0.12～0.20	0.155
4) トヨニシキ						
岩手	43	N.D. ～0.62	0.074±0.028	3	0.05～0.16	0.093±0.018
秋田	69	N.D. ～3.04	0.108±0.030	4	0.14～0.47	0.233±0.025
福島	45	N.D. ～0.62	0.069±0.031	13	N.D. ～0.49	0.084±0.044
茨城	15	0.02～0.22	0.077±0.020	4	0.03～0.25	0.102±0.025
栃木	17	N.D. ～0.12	0.052±0.019	3	0.05～0.11	0.082±0.015

5) ササニシキ

山形	60	N. D. ～0.34	0.080±0.021	6	0.04～0.15	0.072±0.017
宮城	161	N. D. ～0.54	0.049±0.026	30	0.02～0.36	0.073±0.020
岩手	17	N. D. ～0.33	0.049±0.032	5	0.06～0.16	0.097±0.021
秋田	7	N. D. ～0.13	0.032±0.032	1	0.05	0.05
福島	12	N. D. ～0.17	0.037±0.024	3	N. D. ～0.14	0.062±0.034

認められた．また同一品種において生産県を比較してみると，生産県による有意差が認められたため，生産地の土壌により含有量が大きく左右されていることが推定される．

今回検討した結果，経年変化が認められなかったことにより，毎年規準を上まわる米が出現する危険性があることが推定される．そのために我々は恒常的に玄米中のカドミウム含有量のチェックを行なっていく必要があると思われる．

謝辞 本調査に御便宜をはかっていただいた東京都都民生活局米穀課佐々木主査をはじめ，その他の職員各位ならびに衛生局食品監視課の方々に深謝致します．

文　献

1) 厚生省，“食品，添加物等の規格基準の一部改正について”（昭和45年10月23日，環食第473号，厚生省環境衛生局長通知）

2) 環境庁土壌農薬課：公害と防止対策，土壌汚染，1973，白亜書房

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 149-152, 1980

東京都における PCB 汚染の実態について（第8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 (VIII)
Polychlorinated Biphenyl Concentrations 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

著者らは都内のポリ塩化ビフェニール（以下PCBと略す）による汚染状況を把握するため，主に食品中のPCB含有量の継続調査を行なってきた[1]．

今回は新たに輸入魚介類および魚肉練製品を中心とした水産加工品の調査も行なったので，併せて1979年度の結果として報告する．

実験方法

調査試料は1979年4月より1980年3月までに入手した．内訳は東京都築地中央卸売市場より搬入した魚介類49種類139検体，東京湾内で採取した魚介類3種類89検体，輸入魚介類2種類53検体，都内の小売店から入手した水産加工品30検体，食肉7種類40検体，鶏卵20検体，乳製品6種類75検体，ベビーフード10検体，容器包装紙24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500検体である．

操作および定量は第2報[2]と同様，厚生省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

市場入荷魚介類の可食部の PCB 測定結果を Table 1 に示す．なお，0.005ppm 未満は不検出とし，0.00ppm として示した．139 検体について検査したところ，0.01 ppm 以上の PCB を検出したものは全体の 57.6%であり，平均値は0.03ppmであった．これらのうちで最高値を示したものはイサキの0.53ppmであり，平均値が0.10 ppm以上の魚種はイサキ，コノシロ，マダラ，サワラ，スズキ，タチウオであるが，いずれも暫定規制値を越えるものは見られなかった．また，可食部全体の平均値を年度毎に比較すると，1973年から順に0.15, 0.09, 0.06, 0.04, 0.03, 0.05, 0.03ppmとなり，PCB 高濃度魚種が比較的多かった前回の調査を除けば，魚介類の PCB 汚染度は低下し減少傾向から横ばい状態になったことがわかる．

魚介類の内臓は前回と同じ魚種について検査したが，大きな変動はなかった（Table 2）．

輸入魚介類はエビ42検体，イカ11検体について調査したがいずれからも検出されなかった．

水産加工品については魚肉練製品を中心に今回初めて調査を行なった．30検体中6検体からPCBが検出され，平均値は0.02ppm，最高値はサメおよびスケトウダラの卵を原料とした人造からすみの0.17ppmであり，以下サラシ鯨，丸干各0.08ppm，ほっけ薫製0.07ppm，アンコウ肝水煮缶詰0.06ppm，つみれ0.01ppmであった．この他皮はぎ，くらげ，するめ，鮫油，かまぼこ，はんぺん，ちくわ，すじ，いか塩辛，うに，明太子，さきいか，かつお節からはいずれも検出されなかった．

東京湾で採取したアサリ29検体，ボラ，コノシロ各30検体について PCB 含有量を測定した結果を Table 3 に示す．アサリは 0.00—0.02ppm，平均 0.01ppm であった．また，荒川河口の三枚洲で採取したボラは 0.02—0.26ppm，平均0.09ppm，コノシロは0.13—0.99ppm，平均0.38ppmであり，前述の市場に入荷した同魚種の平均値0.03ppm，0.15ppmのほぼ3倍にあたる濃度を示した．内臓についても市場入荷の両魚種に比べてやや高い濃度が認められた．

乳製品の PCB 濃度測定結果を Table 4 に示す．バター，チーズ，育児用粉乳，牛乳および今回新たにコンデンスミルクを加えたが生クリームなどもこれに含めた．育児用粉乳および牛乳からは検出されず，バターは12検体中7検体，チーズは22検体中11検体，コンデンスミルクは1検体から検出されたが，いずれも低濃度であった．

母乳は都内在住の出産後4—60日の産婦20名から提供された．全乳中では0.011—0.047ppmの範囲で全検体か

* 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	0.02—0.07	0.05
Aji (horse-mackerel, *Trachrus trachrus*)	8	0.00—0.11	0.02
Anago (conger eel, *Astroconger myriaster*)	1		0.04
Ankimo (angler liver)	1		0.09
Anko (angler, *Lophius litulon*)	1		0.00
Ayu (ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis*)	4	0.00—0.01	0.01
Bora (grey mullet, *Mugil cephalus*)	3	0.01—0.05	0.03
Buri (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	8	0.02—0.14	0.06
Hatahata (sandfish, *Arctoscopus japonicas*)	1		0.02
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	1		0.01
Houbou (gurnard, *Chelidonichthys kumn*)	2	0.00—0.01	0.01
Isaki (grunt, *Parapristipoma trilineatum*)	3	0.00—0.53	0.18
Ishimochi (croaker, *Argyrosomus argentatus*)	1		0.00
Itoyori (*Nemipterus virgatus*)	1		0.00
Iwashi (sardine, *Sardinos melanosticta*)	3	0.02—0.06	0.03
Kaki (oyster, *Crassostrea gigas*)	3	0.01—0.07	0.04
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	5	0.01—0.06	0.03
Kasago (scorpiofish, *Sebastiscus marmoratus*)	1		0.00
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	3		0.00
Kawahagi (filefish, *Stephanolepis cirrhifer*)	1		0.00
Kinki (*Sebastolobus macrochir*)	1		0.04
Koi (carp, *Cyprinus carpio*)	2		0.00
Konoshiro (gizzard shad, *Clupanodon punctatus*)	3	0.12—0.18	0.15
Kotama-gai (*Gomphina melanaegis*)	1		0.00
Madai (sea bream, *Chrysophrys major*)	17	0.00—0.07	0.01
Madako (octopus, *Octopus vulgaris*)	2		0.00
Madara (codfish, *Gadus macrocephalus*)	1		0.12
Mafugu (fugu, *Fugu vermicularis porphyreus*)	1		0.02
Magarei (flat fish, *Limanda herzensteini*)	6	0.00—0.01	0.00
Maguro (tuna, *Thunnus thynnus*)	2	0.00—0.01	0.01
Mahata (*Epinephelus septemfasciatus*)	1		0.00
Managatsuo (harvest fish, *Pampus argenteus*)	2		0.00
Masu (trout, *Oncorhynchus masou*)	2	0.00—0.02	0.01
Mebaru (gopher, *Sebastes inermis*)	3		0.01
Mejina (opaleye, *Girella punctata*)	1		0.01
Menuke (rockfish, *Sebastes matsubarai*)	1		0.01
Mutsu (japanese bluefish, *Scombrops boops*)	1		0.09
Nijimasu (rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*)	3		0.00
Saba (mackerel, *Pneumotophorus japonicus*)	4	0.02—0.07	0.03
Sake (salmon, *Oncorhynchus kete*)	2		0.00
Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	2	0.01—0.02	0.02
Sawara (spanish mackerel, *Scomberomorus niphonius*)	5	0.02—0.32	0.11
Sayori (halfbeak, *Hemirhamphus sajori*)	2	0.02—0.11	0.07
Silver fish	1		0.00
Suketo-dara (walleye pollack, *Theragra chalcogramma*)	1		0.00
Surume-ika (cattlefish, *Todarades pacificus*)	8		0.00
Suzuki (perch, *Lataolabrax japonicus*)	2	0.11—0.21	0.16
Tachiuo (hairtail, *Trichiurus lepturus*)	2	0.12—0.20	0.16
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	4	0.00—0.01	0.00
Unagi (eel, *Anguilla japonica*)	3	0.00—0.01	0.01
Total	139	0.00—0.53	0.03

N : number of samples

Table 2. PCB Concentrations in Viscera (ppm)

Sample	N	Range	Mean
Aji	7	0.00—0.43	0.08
Bora	1		0.07
Konoshiro	3	0.08—0.36	0.20
Saba	4	0.02—0.08	0.05
Sayori	2	0.26—0.43	0.35
Surume-ika	8	0.00—0.25	0.08
Suzuki	2	0.44—1.80	1.12

N : number of samples

ら検出され，平均0.022ppmであった．脂肪中濃度でみると，0.380—1.032ppm，平均0.614ppmとなり，前回の調査結果[1]である全乳中平均濃度0.023ppm，脂肪中平均濃度0.633ppm，と比べて変化は認められなかった．

肉類は豚肉，豚肝，ラード（動物性油脂），牛肉，牛肝，鶏肉，鶏肝，鶏卵についてPCB濃度を測定した（Table 5）．肉類は検出されないものが多く，平均値では鶏卵が0.02ppmを示した他は0.00ppmであった．

びん詰めのベビーフード10検体からはいずれもPCBは検出されなかった．

Table 3. PCB Concentrations in Fishes Collected from Tokyo Bay (ppm)

Sample	Sampling station	N	Range	Mean
Asari	Ohi	5	0.00—0.02	0.02
	Futtsu	5	0.00—0.01	0.00
	Kisarazu	5	0.00—0.02	0.00
	Kanazawahakkei	5	0.00—0.01	0.00
	Jinkonagisa	4	0.00—0.01	0.00
	Sanmaizu	5	0.00—0.01	0.00
Bora	Sanmaizu	30	0.02—0.26	0.09
Bora (viscera)	Sanmaizu	30	0.04—0.54	0.17
Konoshiro	Sanmaizu	30	0.13—0.99	0.38
Konoshiro (viscera)	Sanmaizu	30	0.10—1.68	0.37

N : number of samples

Table 4. PCB Concentrations in Dairy Products

Sample	N	PCB concentration in wet material (ppm)		PCB concentration in extractable fat (ppm)	
		Range	Mean	Range	Mean
Butter	12	0.00 —0.07	0.02		
Natural cheese	16	0.00 —0.04	0.01	0.00 —0.17	0.05
Process cheese	6	0.00 —0.01	0.00	0.00 —0.02	0.01
Modified milk powder	10		0.00	0.00 —0.02	0.00
Condensed milk	11	0.00 —0.01	0.00	0.00 —0.06	0.01
Milk	20		0.00	0.00 —0.04	0.01
Human milk	20	0.011—0.047	0.022	0.380—1.032	0.614

N : number of samples

容器包装紙は24検体について検査した．ポリエチレン製の密閉容器のフタ1検体から0.04ppmが溶出されたが，その他の合成樹脂製容器，ぬり箸，木製容器，紙製容器，紙ナプキンからは検出されなかった．

まとめ

1979年度に都内で入手した魚介類，水産加工品，肉類，乳製品，母乳，ベビーフード，容器包装紙についてPCB含有量を調査したがいずれも暫定規制値以下であった．このうち魚介類については，PCB濃度は全般に低下し，減少傾向から横ばいの状態にあることが認められた．その他のものもPCB汚染の度合は例年と同様に極めて低いものであった．また，今回新しく調査品目に

Table 5. PCB Concentrations in Meats (ppm)

Sample	N	Range	Mean
Pork	5		0.00
Pig liver	5		0.00
Lard	10	0.00—0.01	0.00
Beef	5		0.00
Cow liver	5	0.00—0.02	0.00
Chicken	5	0.01—0.03	0.02
Chicken liver	5	0.00—0.01	0.00
Hen's egg	20	0.00—0.01	0.00

N : number of samples

加えた輸入エビ，イカ，動物性油脂，ベビーフードからは PCB は検出されず，水産加工品についてもほとんどが不検出であった．

謝辞 本調査にご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) 山崎清子，山野辺秀夫，鈴木助治，原田裕文：東京衛研年報，**30-1**，133，1979
2) 山野辺秀夫，天川映子，鈴木助治，小泉清太郎，戸谷哲也：東京衛研年報，**25**，119，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 153-155, 1980

東京都における水銀汚染の実態について（第7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 (VII)
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[1-6]．今回は1979年度における調査結果を報告する．

実験方法

1. **試料** 1979年4月から1980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13種51検体，エビ42検体（シュリンプ34検体，ロブスター8検体），イカ11検体，カキ1検体および水産加工品30検体の計135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[1,7]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

可食部を調査した結果を 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．

今回の調査に用いた魚のうちスズキおよびハモは過去の調査において高値を示した魚種であるので，今回も5検体ずつ調査した．

スズキ5検体の水揚げ先は千葉県銚子市である．今回調査したスズキは体長50cm台のもの3検体および60cm台のもの2検体であり，前者の総水銀含有量の平均値は0.31ppm，後者は0.39ppmであった．前年度[6]にスズキ48検体について体長と総水銀含有量との関係を調査したところ，体長50cm台のものは0.30ppm前後に集中しており，総水銀の規制値0.40ppmをこえるものはみられなかった．しかし，60cm台では5検体が規制値をこえていた．今回も前報[6]と同様の傾向を示していた．

今回調査したスズキ5検体のうち1検体が総水銀の規制値0.40ppmおよびメチル水銀の規制値0.30ppmをこえており，総水銀含有量0.44ppm，メチル水銀含有量0.38ppmであった．このものは体長60cm台であった．

いっぽう，今回の調査に用いたハモは体長70cmほどの中型のもので，これらは福岡県福岡市に水揚げされたものであった．総水銀含有量の平均値は0.15ppmで，最高値は0.18ppmであり，規制値をこえるものはみられなかった．また，過去の調査においても中型のものは，今回同様0.20ppm前後を示しており，体長1m以上の大型のものは規制値をこえているものがいくつかみられた．

つぎにキンメダイ1検体について調査した．これは静岡県下田市に水揚げされたもので，体長60cmほどの大型のものであった．総水銀含有量1.08ppm，メチル水銀含有量0.91ppmを示し，規制値をはるかにこえていた．キンメダイは過去の調査においても高濃度の水銀を検出しており，1977年度の調査[4]では最高1.79ppmという値を示した．キンメダイは深海魚であり，過去の調査結果と同様，今回も高値であった．

そこで，前に述べたスズキ，ハモおよびキンメダイの総水銀含有量に対するメチル水銀含有量の比率を算出してみたところ，それぞれ84.0%，83.0%，84.3%であった．

その他の魚種については，カマスおよびマダラから総水銀含有量0.22ppmが検出された．しかし，規制値をこすものはみられなかった．

つぎに輸入もののエビおよびイカを調査した．これらを捕獲した海域は東南アジア，アフリカ西海岸，南米などの外洋である．エビおよびイカは足の部分が除去されていたため，大きさは不明であった．

まずエビはシュリンプ34検体，ロブスター8検体調査したところ，ロブスターから1検体ではあるが，総水銀含有量0.43ppmおよびメチル水銀含有量0.36ppmを検出し，規制値をこえていた．その他のエビは総水銀含有量0.10ppm前後であった．

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

Table 1. Mercury Content of Muscle in Fish and Shellfish

	Sample Name	N	T-Hg (ppm) Range (Mean)	Me-Hg (ppm) Range (Mean)	Me-Hg/T-Hg (%) Range (Mean)
1	Ainame (Greenling) *Hexagrammos otakii*	1	0.10	0.08	80.0
2	Iwashi (Sardine) *Sardinops melanosticta*	1	0.02	<0.01	
3	Kamasu (Barracuda) *Spyraena japonica*	1	0.22	0.19	86.4
4	Kaki (Oyster)	1	0.02	0.01	50.0
5	Ginanago *Anago anago*	2	0.03	0.02	66.7
6	Kinki *Sebastolobus macrochir*	1	0.15	0.12	80.0
7	Kinmedai *Beryx splendens*	1	1.08	0.91	84.3
8	Konoshiro *Punctatus*	15	0.01—0.02 (0.01)	<0.01—0.01	
9	Kohada Young *Punctatus*	2	0.01	<0.01	
10	Suzuki (Bass) *Lateolabrax japonicus*	5	0.28—0.44 (0.34)	0.23—0.38 (0.29)	82.1—86.4 (84.0)
11	Tara (Cod) *Gadus macrocephalus*	1	0.22	0.18	81.8
12	Hamo (Sea eel) *Muraenesox cinereus*	5	0.10—0.18 (0.15)	0.08—0.15 (0.12)	80.0—86.7 (83.0)
13	Hatahata (Kind of hard-finned fish)	1	0.10	0.08	80.0
14	Bora (Mullet) *Mugil cephalus*	15	0.01	<0.01	
15	Managatsuo (Butter fish) *Pampus argenteus*	1	0.08	0.07	87.5
16	Ebi (Shrimp)	34	0.01—0.13 (0.04)	<0.01—0.11 (0.03)	75.0
17	Ebi (Lobster)	8	0.01—0.43 (0.14)	<0.01—0.36 (0.12)	85.7
18	Ika (Cuttle fish)	11	0.01—0.13 (0.04)	<0.01—0.11 (0.03)	50.0—84.6 (81.0)

N : number of samples

イカについては11検体調査したが，ほとんどが0.10ppm以下の総水銀含有量で，規制値をこえるものはみられなかった．

つぎに魚肉などを原料とした水産加工品30検体の調査結果をTable 2に示す．

ここにみられるように深海ザメから製造した食用油をのぞくすべての試料からかなり高濃度の水銀を検出した．最も高い値を示したものはハンペンで，総水銀含有量は，0.54ppm，0.59ppm，0.81ppmおよび1.17ppmであった．これはハンペンの原料に水銀含有量が多いといわれているサメ類[2,3]を用いているためであろう．また過去の調査[1]によるハンペン5検体の結果も高値で，最高値0.51ppm，平均値0.45ppmであった．その他スジから0.40ppmの総水銀含有量を検出した．

さらにカマボコ，チクワ，ツミレなどの練製品については0.10ppm程度と比較的低値であったが，これらはスケソウダラ，アジなどのような水銀含有量の少ない魚種を原料としているためであろう．

つぎに，さらしクジラは0.18ppmの総水銀含有量を示した．

Table 2に示したように乾燥した加工品あるいは調味処理した加工品の調査をしたが，ほとんど総水銀含有量は0.10ppm前後であった．

しかしながら，日常それらのものを食する機会が魚同様多いため，監視ならびに調査を今後も継続していくことが望まれる．

まとめ

1. 魚，輸入エビ，輸入イカおよび水産加工品について調査した．総数135検体である．

2. キンメダイ，一部のスズキおよびエビ（ロブスター）が規制値をこえていた．それぞれ総水銀含有量は1.08ppm，0.44ppm，0.43ppmであった．

3. 加工品はハンペンおよびスジから高い値の水銀が検出された．総水銀含有量は前者が1.17ppm，0.81ppm，0.59ppm，0.54ppmで，後者は0.40ppmであった．

4. 今後もキンメダイはじめ，過去に高値を示した数

Table 2. Mercury Content of Marine Products

	Sample Name	N	T-Hg (ppm) Range	Mean
1	Ankimo (Angler's liver ; canned)	1	0.18	
2	Kunsei ; Ika (Dried cuttlefish)	2	0.09—0.22	0.16
3	Binzume ; Uni (Sea urchin ; bottled)	1	0.01	
4	Urumeiwashi (Dried roung herring)	3	0.04—0.09	0.07
5	Katsuobushi (Dried bonit)	1	0.42	
6	Kamaboko (Boild fish-paste)	5	0.02—0.04	0.03
7	Karashimentaiko (Dressed with mustard pollack roa)	1	0.02	
8	Karasumi (Dried mullet roa)	1	0.02	
9	Kawahagi (Dried skinner)	1	0.05	
10	Kurage (Jellyfish)	1	0.01	
11	Sarashikujira (Bleached whale)	1	0.18	
12	Shokuyoyu ; Aizame (Shark oil)	1	<0.01	
13	Suji (Boiled fish-paste)	1	0.40	
14	Tatamiiwashi (Sardine paper)	1	0.02	
15	Hidara (Dried codfish)	1	0.19	
16	Chikuwa (Boiled fish-paste)	2	0.02	
17	Hanpen (Cake of pounded fish)	4	0.54—1.17	0.78
18	Kunsei ; Hokke (Smoked *Lockington*)	1	0.14	
19	Binzume ; Ika (Salted guts of cuttlefish)	1	0.03	

N ; number of samples

種の魚についてひきつづき調査を行なう予定である.

謝辞 本調査を行なうにあたり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諸氏に深謝いたします.

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) 雨宮 敬, 竹内正博, 原田裕文：東京衛研年報, 30-1, 137, 1979
7) 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.*, 31-1, 156-160, 1980

東京湾のアサリと底質中の重金属分布（1978～1979）

堀井昭三*, 山岸達典*, 宮崎奉之*, 金子誠二*
村上一*

Distribution of Trace Amounts of Heavy Metals in Short-Necked Clam and Sludge in Tokyo Bay (1978～1979)

SHOZO HORII*, TATSUNORI YAMAGISHI*, TOMOYUKI MIYAZAKI*, SEIJI KANEKO* and HAJIME MURAKAMI*

Keywords: アサリ short-necked clam, 重金属 heavy metal, 分布 distribution, 底質 sludge, 濃度 concentration, 東京湾 Tokyo Bay

1975年以降，著者らは東京湾内産の魚介類を対象にして，重金属[1]と有機塩素系化合物[2-4]のモニタリングを実施している．本報では，1978年と1979年の2年間にわたる湾内のアサリと底質中の重金属の分布について報告する．

材料および方法

1. 試料の採取 試料は，1978年と1979年の5月から9月までの期間に東京湾沿岸の下記の採取地点から，毎月1回の割合でアサリと底質を約1kg採取し，アサリ53底質55計108例を対象にした．

2. 試料の採取地点 1978年の採取地点は，葛西沖三枚洲，大井埠頭，千葉市中央港，富津市富津公園および木更津市人工島（以下三枚洲，大井，千葉港，富津，木更津と略す）の計5ヶ所とした．しかし，1979年になり，前年の採取地点のうち，千葉港での採取が困難になったため，これに代る採取地点として，葛西沖人工なぎさ，神奈川県野島崎公園前（以下人工なぎさ，神奈川と略す）を選び，試料を採取した．

3. 試料の調製 アサリは採取後水洗し2～3％食塩水中に1～2日間浸漬後，むき身を均質化し分析試料とした．一方，底質は，風乾し篩（1mm）にかけたものを分析試料とした．

4. 試薬 各元素標準液は和光純薬製，硝酸，塩酸および硫酸は関東化学製超特級を使用した．

5. 装置 原子吸光分析装置は日本ジャーレルアッシュ社製AA-8200型にフレームレスアトマイザーFLA10型および微量ヒ素測定装置 ASD-1A 型を付したものおよび島津 UV-200型をそれぞれ使用した．

6. 分析操作

1) 鉛(Pb)，コバルト(Co)，カドミウム(Cd)：試料1～5gを乾式灰化後，10％硝酸数 m*l* で湿潤させたのち，乾燥させ，再び10％硝酸数 m*l* を加え水で定容し，D_2 ラ

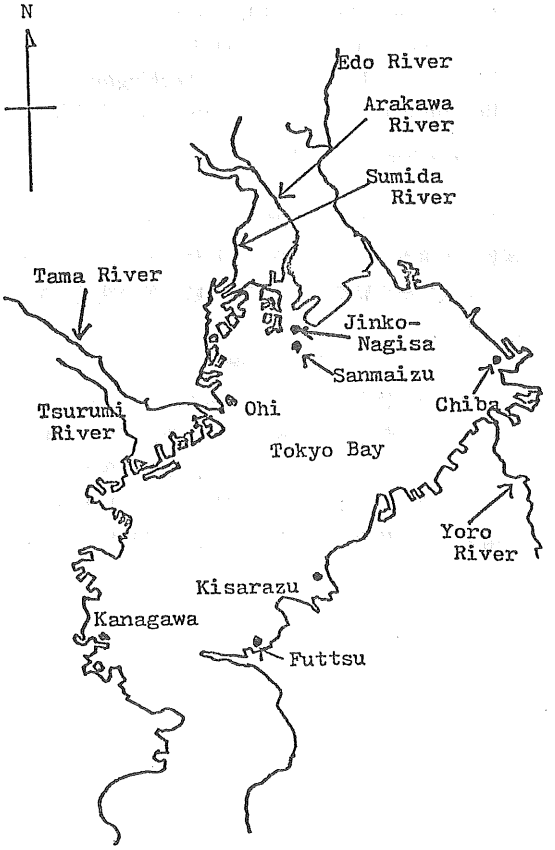


Fig. Sampling Stations in Tokyo Bay

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

Table 1. Concentrations of Heavy Metals in Short-Necked Clam (Wet Base ppm)

Station		Pb	Co	Zn	Cd	Cu	T-Hg	As
1978 (n=5, *n=2)								
Sanmaizu	Range	0.05～	0.11～	19～	0.04～	0.6～	0.070～	1.00～
		0.10	0.18	25	0.08	1.4	0.179	1.57
	$\bar{x}$	0.08	0.14	22	0.06	1.0	0.108	1.35
	σ	0.02	0.03	2	0.02	0.3	0.038	0.22
Ohi	Range	0.10～	0.09～	19～	0.07～	1.1～	0.090～	1.04～
		0.13	0.16	28	0.11	1.6	0.192	2.00
	$\bar{x}$	0.11	0.11	23	0.09	1.5	0.127	1.71
	σ	0.01	0.02	4	0.02	0.2	0.036	1.23
Chibako*	Range	0.06～	0.13～	25	0.03～	0.9～	0.080～	1.23～
		0.07	0.14		0.04	1.3	0.096	1.83
Futtsu	Range	0.06～	0.13～	15～	0.02～	0.8～	0.078～	1.32～
		0.11	0.22	22	0.05	1.3	0.184	2.34
	$\bar{x}$	0.08	0.18	18	0.03	1.1	0.108	1.77
	σ	0.02	0.04	2	0.01	0.2	0.038	0.39
Kisarazu	Range	0.05～	0.09～	14～	0.02～	0.8～	0.056～	0.68～
		0.10	0.26	28	0.08	1.2	0.143	2.86
	$\bar{x}$	0.07	0.18	21	0.05	1.1	0.108	1.71
	σ	0.02	0.06	5	0.02	0.1	0.032	0.71
1978-$\bar{x}$		0.08	0.15	22	0.06	1.2	0.111	1.62
〃 σ		0.02	0.05	4	0.03	0.3	0.036	0.47
1979 (n=5, *n=6)								
Sanmaizu	Range	0.07～	0.09～	20～	0.03～	0.9～	0.034～	1.23～
		0.39	0.19	34	0.05	1.3	0.295	2.15
	$\bar{x}$	0.20	0.12	26	0.04	1.0	0.107	1.60
	σ	0.13	0.04	5	0.01	0.2	0.096	0.44
Ohi	Range	0.05～	0.07～	24～	0.04～	0.9～	0.035～	0.72～
		0.36	0.12	35	0.08	1.5	0.204	1.67
	$\bar{x}$	0.19	0.10	29	0.06	1.3	0.095	1.15
	σ	0.11	0.03	4	0.01	0.3	0.061	0.35
Futtsu	Range	0.03～	0.14～	14～	0.01～	0.9～	0.039～	0.97～
		0.11	0.22	22	0.04	1.2	0.099	2.07
	$\bar{x}$	0.06	0.17	18	0.02	1.0	0.058	1.36
	σ	0.03	0.03	4	0.01	0.1	0.023	0.40
Kisarazu	Range	0.02～	0.09～	18～	0.01～	0.7～	0.056～	1.08～
		0.11	0.27	24	0.03	1.2	0.125	2.54
	$\bar{x}$	0.08	0.17	21	0.02	0.9	0.091	2.00
	σ	0.04	0.06	2	0.01	0.2	0.024	0.52
Jinko-Nagisa	Range	0.04～	0.09～	19～	0.03～	0.7～	0.053～	0.92～
		0.44	0.19	28	0.05	1.3	0.183	1.38
	$\bar{x}$	0.20	0.12	24	0.04	0.9	0.126	1.25
	σ	0.13	0.04	3	0.01	0.2	0.047	0.18
Kanagawa*	Range	0.07～	0.09～	14～	0.01～	0.9～	0.084～	1.03～
		0.46	0.15	36	0.03	1.5	0.158	2.10
	$\bar{x}$	0.24	0.10	27	0.02	1.1	0.116	1.36
	σ	0.15	0.01	7	0.01	0.2	0.026	0.35
1979-$\bar{x}$		0.16	0.13	24	0.03	1.0	0.099	1.45
〃 σ		0.13	0.05	6	0	0.2	0.057	0.48
Total-$\bar{x}$		0.13	0.14	23	0.04	1.1	0.104	1.52
〃 σ		0.11	0.05	5	0.02	0.3	0.050	0.48

Table 2. Concentrations of Heavy Metals in Sludge (Dry Base ppm)

Station		Pb	Co	Zn	Cd	Cu	T-Hg*	As
1978 (n=5)								
Sanmaizu	Range	4.43～	5.21～	43～	0.02～	5.0～	0.055～	3.50～
		5.54	8.49	60	0.05	7.4	0.206	7.10
	$\bar{x}$	5.10	6.38	50	0.03	6.1	0.109	4.64
	σ	0.37	1.11	6	0.01	1.0	0.051	1.28
Ohi	Range	5.53～	6.16～	43～	0.02～	4.7～	0.084～	2.30～
		8.79	7.67	105	0.27	25.3	0.278	3.90
	$\bar{x}$	6.85	6.84	73	0.14	10.6	0.155	2.93
	σ	1.19	0.48	20	0.10	7.7	0.070	0.62
Chibako	Range	2.86～	4.79～	48～	0.03～	1.3～	0.037～	4.80～
		3.95	6.03	78	0.06	2.4	0.166	6.25
	$\bar{x}$	3.48	5.20	56	0.04	1.7	0.100	5.46
	σ	0.36	0.48	11	0.01	0.6	0.044	0.52
Futtsu	Range	2.75～	2.74～	27～	0.05～	1.6～	0.075～	2.80～
		8.54	3.84	100	0.08	9.5	0.148	4.80
	$\bar{x}$	4.41	3.48	47	0.06	3.7	0.098	3.72
	σ	2.18	0.38	27	0.01	2.9	0.026	0.87
Kisarazu	Range	3.71～	4.11～	43～	0.07～	2.1～	0.052～	3.30～
		4.71	6.03	75	0.18	3.2	0.165	5.10
	$\bar{x}$	4.09	5.51	58	0.12	2.5	0.104	4.11
	σ	0.37	0.73	12	0.04	0.4	0.046	0.58
1978-	$\bar{x}$	4.79	5.48	57	0.08	4.8	0.113	4.17
〃	σ	1.63	1.35	19	0.06	5.0	0.054	1.18
1979 (n=5)								
Sanmaizu	Range	3.68～	3.63～	50～	0.01～	5.0～	0.052～	1.60～
		7.12	6.52	81	0.03	6.8	0.153	2.49
	$\bar{x}$	5.30	4.94	64	0.02	6.0	0.111	2.13
	σ	1.17	0.95	11	0.01	0.8	0.036	0.30
Ohi	Range	3.82～	4.21～	39～	0.03～	6.6～	0.081～	1.53～
		5.01	5.53	88	0.05	7.9	0.173	4.86
	$\bar{x}$	4.56	5.00	55	0.03	7.0	0.145	3.84
	σ	0.44	0.49	17	0.01	0.5	0.033	1.21
Futtsu	Range	2.27～	3.05～	34～	0.02～	1.7～	0.104～	1.02～
		3.00	4.04	39	0.03	2.6	0.154	2.56
	$\bar{x}$	2.65	3.47	36	0.02	2.3	0.131	1.69
	σ	0.28	0.36	2	0	0.3	0.018	0.52
Kisarazu	Range	2.09～	3.71～	39～	0.03～	2.7～	0.084～	2.17～
		3.98	5.94	100	0.05	3.3	0.173	2.56
	$\bar{x}$	3.14	4.69	64	0.04	3.0	0.130	2.30
	σ	0.61	0.84	21	0.01	0.2	0.030	0.14
Jinko-Nagisa	Range	2.74～	3.05～	34～	0.01～	3.7～	0.075～	1.21～
		4.23	5.61	51	0.03	5.1	0.158	2.49
	$\bar{x}$	3.28	4.29	43	0.02	4.2	0.113	1.80
	σ	0.53	1.11	7	0.01	0.5	0.033	0.50
Kanagawa	Range	4.10～	1.99～	50～	0.03～	2.9～	0.078～	1.02～
		5.09	4.04	81	0.04	4.4	0.200	1.60
	$\bar{x}$	4.66	3.22	63	0.04	3.6	0.134	1.30
	σ	0.34	0.70	10	0	0.5	0.041	0.19
1979-	$\bar{x}$	3.93	4.27	54	0.03	4.4	0.127	2.18
〃	σ	1.15	1.05	17	0.01	1.7	0.035	1.00
Total-	$\bar{x}$	4.33	4.82	56	0.05	4.7	0.122	3.03
〃	σ	1.46	1.35	18	0.05	3.6	0.044	1.44

T-Hg* is exceptionally expressed in wet base ppm.

Table 3. Correlation Coefficient between Concentrations of Each Heavy Metals in Short-Necked Clam

	Co	Zn	Cd	Cu	T-Hg	As
Pb	−0.07	0.46**	−0.03	0.17	0.36**	−0.10
Co		−0.22	−0.15	−0.04	−0.16	0.52**
Zn			0.15	0.40**	0.06	−0.12
Cd				0.44**	0.07	0.18
Cu					0.13	0.01
T-Hg						−0.24

n=53, **: P<0.01

Table 4. Correlation Coefficient between Concentrations of Each Heavy Metals in Sludge

	Co	Zn	Cd	Cu	T-Hg	As
Pb	0.39**	0.60**	0.41**	0.71**	0.07	0.11
Co		0.33*	0.36**	0.38**	0.12	0.41**
Zn			0.37**	0.50**	0.37**	0.08
Cd				0.19	0.17	0.18
Cu					0.47**	0.06
T-Hg						0.05

n=55, *: P<0.05, **: P<0.01

Table 5. Concentrations of Heavy Metals in Oysters

			Pb	Co	Zn	Cd	Cu	T-Hg	As
1979	Jinko-Nagisa	Range	0.03～	0.08～	350～	0.09～	18～	0.153～	0.79～
			0.11	0.10	520	0.10	24	0.277	1.54
		$\bar{x}$	0.07	0.09	422	0.09	21	0.216	1.12
		σ	0.03	0.01	55	0	2	0.024	0.27

ンプバックグラウンド補正によるフレームレス原子吸光（二波長）で定量した.

2) 亜鉛(Zn), 銅(Cu)：試料1～5gをPb, Co, Cdと同様な処理をした後, D_2ランプバックグラウンド補正による原子吸光（空気—C_2H_2炎, 二波長）で定量した.

3) 総水銀(T-Hg)：試料0.1～1gに五酸化バナジウムを加え, 沸騰水浴上, 硫酸, 硝酸で湿式灰化後, 還元気化法で定量した.

4) ヒ素(As)：試料1gに50%硝酸マグネシウム5mlを加え乾式灰化後, Zn末, 塩酸により水素を発生させヒ化水素として定量した.

結果および考察

1) アサリ中の重金属濃度

アサリ中の重金属の分析結果をTable 1に示した. すなわち, アサリ中の重金属濃度の総平均値は, Znが最も高く23ppm, 次いでAs 1.5ppm, Cu 1.1ppm, Co 0.14ppm, Pb 0.13ppm, T-Hg 0.10ppm および Cd 0.04ppmの順位であった. 次に, 年別による重金属濃度の差についてみると, Znが1979年に高く, Cdが1978年に高い値を示したがその他の元素では有意な差がみられなかった（$p<0.05$）. また採取地点別による重金属濃度の差についてみると, 大井で採取されたアサリ中のZnとCdは他の地点で採取されたものより高い傾向を示し, 富津と木更津で採取されたアサリ中のCoは同様に他の採取地点のものより高い傾向を示した（$p<0.05$）. アサリ中の重金属の相互の関係はTable 3に示したごとく, PbとZn, T-Hgの間に, CoとAsとの間に, CuとZn, Cdとの間にそれぞれ正の相関関係がみられた.

2) 底質中の重金属濃度

底質中の重金属の分析結果をTable 2に示した. これらの総平均値はZnが最も高く56ppm, 以下Co 4.8ppm Cu 4.7ppm, Pb 4.3ppm, As 3.0ppm, T-Hg 0.12ppm

および Cd 0.05ppm の順位であった．また，年別による重金属濃度の差についてみると，Pb，Co，Cdおよび As では1978年が高い値を示したが他の元素では有意な差がみられなかった（$p<0.05$）．採取地点による重金属濃度の差では，大井の Pb，Co，Zn および Cd が他の地点よりも高い値を示した．次に重金属の相互の関係は Table 4 に示したごとく Pb と Co，Zn，Cd，Cu との間に，Co と Zn，Cd，Cu，As との間に，Zn と Cd，Cu，T-Hg の間および Cu と T-Hg の間にそれぞれ相関関係が認められた（$p<0.05$，$p<0.01$）．

3) アサリと底質の重金属濃度の比較

Cd と T-Hg ではアサリ，底質ともほぼ同じレベルであったが，Co ではアサリは底質の約 1/40，Pb では約1/30，Cu では約 1/4，Zn と As では約1/2であった．

以上のアサリおよび底質中の重金属濃度，採取地点別による差異および重金属の相互の関係などの結果と，前報[1]の結果は，ほぼ一致していた．なお1979年に人工なぎさではカキも採取したのでその結果を Table 5 に示した．カキの重金属濃度は他の報告例[5,6]と同レベルの値であった．

要　約

今回は1978年と1979年の 2 年間にわたって，東京湾沿岸の 5～6 ヶ所の地点からアサリ53，底質55計 108 例を対象にして，Pb，Co，Zn，Cd，Cu，T-Hg および As を測定した．その結果は次の通りであった．

1. アサリ中の重金属濃度の総平均値(ppm)は Zn 23，As 1.52，Cu 1.1，Co 0.14，Pb 0.13，T-Hg 0.104，Cd 0.04であった．

2. アサリ中の重金属濃度を採取地点別にみると Zn，Cd は大井が高く，Co は富津，木更津が高い値を示した．

3. アサリ中の Pb と Zn，T-Hg との間，Co と As との間および Cu と Zn，Cd との間にはそれぞれ正の相関関係が認められた．

4. 底質中の重金属濃度総平均値(ppm)は Zn 56，Co 4.82，Cu 4.7，Pb 4.33，As 3.03，T-Hg 0.122，Cd 0.05 であった．

5. 底質中の重金属濃度を採取地点別にみると，Pb，Co，Zn および Cd では大井が高い値を示した．

謝辞　本調査にあたり試料を採取された食品機動監視班の皆様に深謝致します．

文　献

1) 堀井昭三，山岸達典，村上　一：東京衛研年報，29-1，170，1978
2) Yamagishi, T., Akiyama, K., et al.: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 23, 57, 1979
3) 山岸達典，秋山和幸ら：東京衛研年報，30-1，123，1979
4) Miyazaki, T., Akiyama, K., et al.: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 24. 1, 1980
5) Zook, Elizabeth G., Powell, John J., et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 24, 47, 1976
6) 上村俊一：日水誌，46，83，1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 161-165, 1980

魚介類中のクロルデンとその近縁化合物の分離同定と定量法

宮崎奉之[*1], 秋山和幸[*2], 金子誠二[*1], 堀井昭三[*1]
山岸達典[*1], 村上一[*1]

Identification and Determination of Chlordanes and Their Related Compounds in Fish and Shellfish

TOMOYUKI MIYAZAKI[*1], KAZUYUKI AKIYAMA[*2], SEIJI KANEKO[*1], SHOZO HORII[*1], TATSUNORI YAMAGISHI[*1] and HAJIME MURAKAMI[*1]

The purpose of the study was to establish the identification for unknown organohalogen compounds in aquatic fauna and to examine their residual levels. Results obtained are summarized as follows: Chlordane and its related compounds in hexane extract of the specimens were found to be consisted of two pairs of isomers, *trans*–and *cis*-chlordane, *trans*- and *cis*-nonachlor, and oxychlordane. It was determined by gas chromatography–mass spectrometry by the pooled samples of *Acanthogobius*(goby-fish), collected from Tokyo Bay in August, 1978. In practice, however, it was rather difficult to determine residual chlordane in fish and shellfish, because PCB's and *p*, *p*'-DDE often present in samples may mask the peak of chlordane compounds. Thus, in routine practice, an electron capture gas chromatography of the specimens on both 1.5% OV-17+1.95% QF-1 and 3% OV-1 columns was applied after the separation of PCB's and DDT's from residual chlordane by Florisil column chromatography. Residual chlordane in marine fish and shellfish determined by the method were found to be in the range of 4.6 to 60ppb (wet basis).

Keywords : chlordane, identification, determination, goby-fish, gas chromatography-mass spectrometory, Tokyo Bay

緒　言

1975年以降，著者らは東京湾の魚介類を対象にして，有機塩素系農薬および微量有害元素についてモニタリングを実施している．そのモニタリングの過程で，除草剤1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (CNP)を湾内産のムラサキイガイ中から分離，同定[1]し，さらにその汚染実態[2,3]を明らかにした．しかし，湾内産の魚介類中にはなお不明な化学的汚染物質の存在が認められた．そこで，1978年8月に東京湾の京浜島付近で採取したマハゼを対象にして，それらの不明の汚染物質の分離，同定を試みた．その結果，従来不明であった物質はクロルデンの成分である *trans*-chlordane, *cis*-chlordane, *trans*-nonachlor, *cis*-nonachlor とその代謝産物であるoxychlordane であることが判った．クロルデンはわが国ではシロアリ，キクイムシなどを防除する目的で年間約500トン使用[4]されている．また使用されているクロルデン製剤はジエン縮合反応[5]により生成される物質を塩素化して合成される関係上，その製剤中に多種類の異性体や近縁化合物が含まれている．しかし，生物試料中のクロルデンの測定方法が確立していないため，次にその定量法についての検討を試みた．すなわち，現在，東京湾に生息する魚介類の多くは，その体内にPCBやDDTなどの多種類の有機塩素化合物をとりこんでおり，これがクロルデンのピークと重なるため，生物試料中のクロルデンの正確な測定を困難にしていた．しかし，今回われわれが用いたフロリジルカラムクロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーの2つの操作により，クロルデンを他の有機塩素化合物から分離し，測定することが可能になった．以下その方法について述べると共に，この方法を用いて実施した東京湾産魚介類中のクロルデンの実態調査の成績について述べる．

材料および方法

1. 試料：同定に供したマハゼ（*Acanthogobius flavimanus*）は1978年8月21日に東京湾沿岸の京浜島付近

[*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

で採取した．また分析に供したボラ (*Mugil cephalus*)，スズキ (*Lateolabrex japonicus*)，むらさきいがい (*Mytilus edulis*)，しおふき (*Mactra veneriformis*)，まがき (*Crassostrea gigas*)，さるぼうがい (*Scapharca subcrenata*) は1979年5月から9月まで東京湾河口付近で採取した．

2. **試薬および標準品** 溶媒は残留農薬分析用のものを使用した．標準品の oxychlordane (o-C と略す)，*trans*-chlordane (t-C と略す)，*cis*-chlordane (c-C と略す)，は Nanogen Co Ltd (USA) 分析用のものを用いた．*trans*-Nonachlor (t-N と略す)，*cis*-nonachlor (c-N と略す) はヘプタクロールを塩素付加反応で合成し，フロリジルカラムクロマトグラフィーで分離，精製した．なお，その融点は c-N (214.5～215.2℃)，t-N 128.2～128.5℃) とも文献値[6]と一致している．

3. **分離同定法** マハゼ (1.5kg) は表面を蒸留水で洗浄したのち均質化し，芒硝脱水後，ヘキサンで抽出，減圧下 K.D. 濃縮器で濃縮した．この抽出操作により得られた脂肪は，常法によりアセトニトリル—ヘキサン分配し，さらに硫酸処理後，フロリジル (20g) カラムクロマトグラフィーによりヘキサン 150m*l* (E-1) で溶出し，さらに20%エーテル・ヘキサン 200m*l* (E-2) で溶出した．E-1はポリアミド TLC (メルク，F_{254}，メタノール) で精製し，E-2はポリアミド TLC (メタノール) にかけたのち，さらにシリカゲル TLC (メルク，F_{254}，ヘキサン) で精製して GC-MS 測定溶液とした．

4. **GC-MS 測定条件** ガスクロマトグラフは Hewlett Packard 5710A，質量分析計は日本電子(株) JMS D300，JMS 2000 システムでオンライン測定を実施した．カラムは3%OV-1，カラム温度210℃，He は 30m*l*/min.，注入温度，セパレーター温度は 250℃ とし，イオン化電圧 70eV，イオン化電流 300μA の条件で測定した．

5. **GC 分離用カラム液相** 1) Apiezon L, 2) OV-1, 3) OV-17, 4) OV-17+QF-1, 5) OV-210, 6) DEGS $+H_3PO_4$, 7) OV-275, 8) OV-1+OV-210の計8種類

6. **クロルデン測定法** (1) **抽出方法** **魚**：均質化した試料 10g を芒硝で脱水した後，ヘキサン100m*l* で1回抽出し，さらに 50m*l* で2回抽出した．この抽出液を濃縮し，ヘキサンに溶解して 15m*l* とした．これをアセトニトリル 30m*l* で3回抽出して，アセトニトリル層は2%塩化ナトリウム溶液 350m*l* 中へ入れ，ヘキサン 100 m*l* を加えて抽出した．さらに水洗，脱水後，減圧下 K.D. 濃縮器を用いて濃縮した．**貝**：均質化した試料のむき身 20g をヘキサン：メタノール (4：1) 200m*l* で抽出，遠心分離器で分離した後，残渣はさらにヘキサン 30m*l* で2回抽出した．抽出液を合わせ，水洗，脱水，減圧濃縮した．

(2) **クリーンアップおよび分画方法** ガラスカラム管 (2.2×30cm) にフロリジル 25g (650℃ 一夜加熱，さらに使用前に130℃で活性化)をヘキサンで湿式充てんし，前記濃縮液をカラム上に注ぎ，最初ヘキサン 110m*l* で溶出して捨てる．次いでさらにヘキサン100m*l* で溶出し，Fr-A (t-N 測定溶液) とし，さらに20%ジクロルメタン—ヘキサン150m*l* で溶出し，Fr-B(o-C, t-C, c-C, c-N 測定溶液)とし，それぞれを適当量に濃縮して ECD-GC 測定溶液とした．

(3) **ECD-GC 測定法** Fr-A は 3% OV-1, chromosorb W (AW-DMCS) 80～100mesh, 0.3×300cmカラムを使用し，カラム温度190℃，注入，検出器温度250℃，キャリアーガス(N_2)70m*l*/min. で測定した．Fr-B は1.5%OV-17+1.95% QF-1, chromosorb W (AW-DMCS) 80～100 mesh, 0.3×200cm カラムを使用し，カラム温度200℃，注入，検出器温度250℃，キャリアーガス (N_2)80m*l*/min. で測定した．

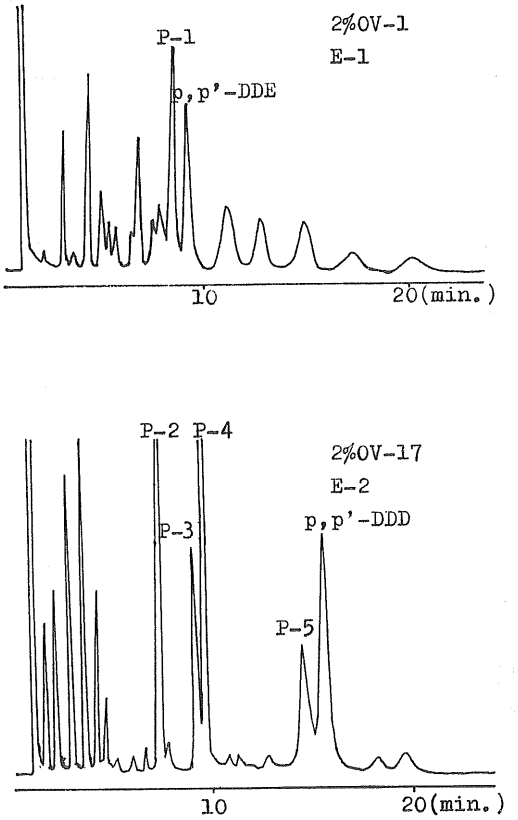


Fig. 1. ECD Gas Chromatogram of E-1 and E-2 from Goby-Fish

Table 1. EI, CI-Mass Spectra of Chlordanes

Peak	EI	CI	Assignment
P-1	440 (Cl_9, M)	440 (Cl_9, M)	*trans*-
	405 (Cl_8, M−Cl)	405 (Cl_8, M−Cl)	nonachlor
	270 (Cl_6)	369 (Cl_7), 135 (Cl_2)	
P-2	420 (Cl_8, M)	421 (Cl_8, M+1)	oxy-
	385 (Cl_7, M−Cl)	385 (Cl_7, M−Cl)	chlordane
	185 (Cl_3), 149 (Cl_2)	185 (Cl_3), 151 (Cl_2)	
	115 (Cl_1)	115 (Cl_1)	
P-3	406 (Cl_8, M)	406 (Cl_8, M)	*trans*-
	371 (Cl_7, M−Cl)	371 (Cl_7, M−Cl)	chlordane
	335 (Cl_6)	335 (Cl_6), 101 (Cl_1)	
P-4	406 (Cl_8, M)	406 (Cl_8, M)	*cis*-
	371 (Cl_7, M−Cl)	371 (Cl_7, M−Cl)	chlordane
	335 (Cl_6)	335 (Cl_6), 101 (Cl_1)	
P-5	440 (Cl_9, M)	440 (Cl_9, M)	*cis*-
	405 (Cl_8, M−Cl)	405 (Cl_8, M−Cl)	nonachlor
	270 (Cl_6)	369 (Cl_7), 135 (Cl_2)	

結果および考察

1. クロルデン類の同定について 京浜島で採取したマハゼより得たE-1, E-2分画のECDガスクロマトグラムをFig. 1に示した. E-1分画のP-1に相当する化合物はポリアミドTLCでクリーンアップした後, 次の測定結果からt-Nであると同定した. すなわち, Table 1に示したGC-MSによるEI, CIマススペクトルとGCの保持時間, および硫酸でほとんど変化しないこと, またINKOH, エタノールで1時間, 還流するアルカリ分解で分解する性質がそれぞれの標準品に一致した. 次にE-2分画のP-2, P-3, P-4, P-5に相当する化合物はポリアミド, シリカゲルTLCでクリーンアップした後, 次の測定結果からそれぞれP-2がo-C, P-3がt-C, P-4がc-C, P-5がc-Nと同定した. すなわち, Table 1に示したGC-MSによるEI, CIマススペクトルとGCの保持時間, 硫酸に安定であること, また前記アルカリ分解でt-Cをのぞいて分解する性質がそれぞれ標準品に一致した. ところで, Fig. 1に示したECDガスクロマトグラムにおけるF-1分画のt-N, *p, p'*-DDEのほかの多くのピークはPCBであるが, F-2分画のo-Cより保持時間の短いピーク群はBHC異性体に一致せず, 現在検討中である.

2. クロルデン類の定量法について クロルデン類と有機塩素系農薬のアルドリンに対する保持時間を8種類の液相について検討して, その結果をTable 2に示した. クロルデン類の相互の分離はOV-1, OV-275でも多少の重なりが見られ, 他のカラムでは分離しなかった. OV-275カラムでは農薬のBHC異性体および*p, p'*-DDEとクロルデン類との分離が悪く不適当であった. しかしOV-1カラムの長さを3mにするとc-Cとt-Nの間でかなりの分離効果が見られた. 次にフロリジルカラムクロマトグラフィーによる分離について検討したところ, フロリジル量を25g以上にすることにより, t-Nと他のクロルデン類は分離した. しかし, t-NはPCBと同じ分画になるため, GCによる分離が必要であった. これにOV-1カラムを使用すると, PCBとt-Nは分離した. さらに, Fig. 2に示したようにt-Nの溶出しない分画（最初のヘキサン110ml溶出液）を捨てると, さらに定量の信頼度が増した. また, t-Nのピーク位置

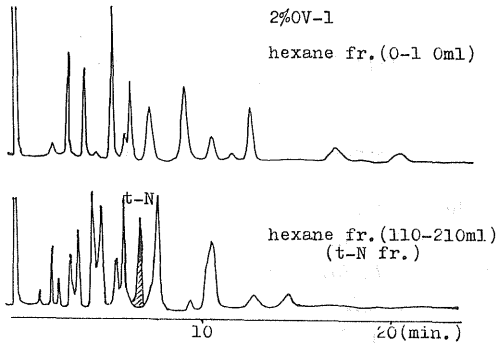


Fig. 2. Elution Pattern of PCBs
trans-Nonachlor (t-N) quantification is free interference, although PCB components are eluted in the two fractions.

Table 2. Retention Times of Chlordanes and Other Organochlorines (relative to aldrin)

Liquid phase	2% Apiezon L	2% OV-1	2% OV-17	1.5% OV-17 + 1.95% QF-1	0.5% OV-1 + 1.5% OV-210	2% OV-210	2.5% DEGS + 0.5% H_3PO_4	2% OV-275
temperature column (°C)	200	200	200	200	180	170	185	170
injection	240	250	240	250	250	240	250	250
N_2 flow rate (ml/min.)	80	80	75	80	80	60	90	80
oxy-chlordane	1.26	1.25	1.31	1.35	1.38	1.47	1.85	2.00
trans-chlordane	1.51	1.39	1.64	1.66	1.56	1.72	2.65	3.18
cis-chlordane	1.69	1.53	1.80	1.81	1.71	1.87	2.86	3.60
trans-nonachlor	1.71	1.61	1.73	1.71	1.65	1.69	2.62	2.96
cis-nonachlor	2.70	2.26	3.04	2.94	2.49	2.85	6.65	8.79
α-BHC	0.46	0.43	0.48	0.51	0.57	0.59	1.27	2.08
β-BHC	0.60	0.46	0.71	0.76	0.73	0.91	5.97	11.8
γ-BHC	0.57	0.52	0.62	0.66	0.70	0.76	1.96	3.43
δ-BHC	0.68	0.54	0.86	0.80	0.83	1.10	5.48	
heptachlor epoxide	1.23	1.21	1.43	1.51	1.54	1.84	2.77	4.49
dieldrin	1.97	1.71	2.20	2.33	2.34	2.92	4.14	5.34
endrin	2.88	1.96	2.76	2.84	2.67	3.53	4.72	
p, p'-DDE	2.22	1.73	2.23	2.12	1.84	2.00	3.43	3.30
p, p'-DDD	3.10	2.12	3.40	3.25	2.76	3.60	10.5	
p, p'-DDT	3.07	2.76	4.09	3.89	3.24	3.92	8.68	
o, p'-DDE	1.56	1.44	1.82	1.74	1.47	1.54	2.71	2.59
o, p'-DDT	2.20	2.25	3.32	2.99	2.37	2.57	4.72	
retention time of aldrin (min.)	5.49	4.90	4.90	5.18	3.16	3.58	2.28	1.35

Table 3. Concentration of Chlordanes in Fish and Shellfish Collected from Tokyo Bay (ppb on wet basis)

sample	oxy-chlordane	*trans*-chlordane	*cis*-chlordane	*trans*-nonachlor	*cis*-nonachlor	total chlordane
Goby (*A. flavimanus*)	0.5	1.5	2.7	7.1	6.1	18
Gray mullet (*M. cephaius*)	0.3	4.0	4.4	3.6	1.2	14
Sea bass (*L. japonicus*)	1.9	11.3	11.3	12.4	2.1	39
Oyster (*C. gigas*)	1.1	13.7	15.4	27.0	2.6	60
Blue mussel (*M. edulis*)	nd	3.2	5.3	6.3	1.0	16
Surf clam (*M. veneriformis*)	nd	0.9	1.6	1.6	0.5	4.6
Ark shell (*S. subcrenata*)	0.3	4.0	6.6	6.4	1.3	19

arithmetic mean (n=3), nd=not detectable

にPCBがほとんど存在しないことは，実際にPCBを多く含む魚の検体を用い，アルカリ分解法を応用して確認した．前述のフロリジル分画法とGC測定法を組み合せてクロルデン定量法を作成した．この方法により魚類としてコノシロを，貝類としてアサリを用いて，5ppb, 50ppbになるようにクロルデン類をそれぞれ添加して，3回繰り返しの回収実験を行なった結果，クロルデン類の平均回収率は82～99%の範囲であった．

3. **東京湾産魚介類のクロルデン測定結果** 測定結果をTable 3に示した．この結果から東京湾の魚介類がクロルデンにより汚染されていることが明らかとなった．一方，米国，カナダにおいて，すでに魚介類[7]，哺乳動物[8]などからクロルデンが検出されており，クロルデンが一般的な環境汚染物質の1つであることが報告されている．これら諸外国の結果と比べて，得られた残留レベルは決して高い値ではないが，広範囲の汚染実態と汚染経路を明らかにすることは汚染の拡大を防ぐために必要と考える．

文　献

1) Yamagishi, T., Akiyama, K., Morita, M., Takahashi, R., and Murakami, H.: *J. Environ. Sci. Health*, **B13**, 417, 1978
2) 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
3) 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
4) 広瀬忠爾：日本農薬学会誌，2，187，1977
5) 山本　亮：農薬学，174，1966，(南江堂) 東京
6) Cochrane, P. W., Forbes M., and Chau, Y. S.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 53, 769, 1970
7) Zitko V.: *Chemosphere*, 7, 3, 1978
8) Nalley, L., Bigler, G. H. W., and Hull W.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 13, 741, 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 166-169, 1980

牛乳中の無機ヨウ素の定量

竹葉和江*, 松本昌雄**, 村上一*

Determination of Inorganic Iodine in Cow's Milk

KAZUE TAKEBA*, MASAO MATSUMOTO** and HAJIME MURAKAMI*

The iodine level in cow's milk in Japan was determined by the gaschromatographic method. The procedure consists of derivatization of iodine with methyl ethyl ketone. The product, iodobutanone, was extracted with n-hexane and then measured by the electron capture gaschromatography. The stationary phase of the column used is 10%-DEGS+0.5% phosphoric acid. The averages of iodine level in raw, normal liquid and processed milk were 0.10, 0.14 and 0.20 μg/m*l* respectively.

Keywords : iodine, iodobutanone, cow's milk, methyl ethyl ketone

最近ヨウ素剤が乳牛の疾病の予防薬または治療薬として汎用されているかたわら，乳業機械器具類の消毒薬として使用されていることから[1-8]，乳汁中のヨウ素量が異常に高くなることも考えられる．

ヨウ素は必須の微量元素であるが，必要量以上を長期間にわたって摂取した場合健康が損われると言われている[9-11]．しかし最近のわが国における牛乳中のヨウ素量についての報告はほとんどない．そこで現在わが国の牛乳中のヨウ素レベルの実態を把握する目的で，Bakkerの報告した[4]ガスクロマトグラフィーによる牛乳中の無機ヨウ素の定量法について若干の検討を加え，あわせて都内乳処理場に搬入された生乳および市販飲用牛乳を対象にヨウ素量の測定を行なったので報告する．

試薬および実験方法

試　薬

1. ヨウ素標準溶液：KI 0.1307g を水 100m*l* に溶かし(I-1mg/m*l*)，これを水で希釈して0.1μg/m*l* にした．
2. 酢酸亜鉛溶液(A液)：$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ 21.9 gを氷酢酸 3m*l* 含む水 100m*l* に溶解した．
3. フェロシアン化カリウム溶液(B液)：$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 10.6g を水 100m*l* に溶解した．
4. 亜硝酸ナトリウム溶液：$NaNO_2$ 20mgを水100m*l* に溶解した．
5. メチル—エチル—ケトン (2-ブタノン)
6. 硫酸
7. n-ヘキサン

n-ヘキサンは残留農薬試験用，その他の試薬はすべて和光純薬特級を使用した．

装　置

1. 日立ガスクロマトグラフ163型：カラム10%DEGS+0.5%H_3PO_4，Gas ChromQ，60～80mesh，3mm×2 m．カラム温度110°，注入口温度200°，ECD 温度250°．N_2 ガス流量50m*l*/min.
2. 国産遠心機H107型B

試料溶液の調製方法

試料を 10m*l* にし以下 Bakker の方法に準じた．すなわち牛乳 10m*l* を共栓遠沈管にとり，これに水 7m*l*，A液，B液それぞれ 1.5m*l* およびヘキサン 20m*l* 加えてよく振り遠心分離した．水層 10m*l* を分液ロートにとりこれに硫酸0.35m*l*，2-ブタノン 0.25m*l* および亜硝酸溶液 0.5m*l* 加えてよく混合し室温で20分間放置後n-ヘキサン 20m*l* で2回抽出した．n-ヘキサン層を合わせて水洗し無水硫酸ナトリウムで脱水後ロカした．これを10m*l* に濃縮しガスクロマトグラフ用試料とした (Chart 1)．

実験結果

1. ガスクロマトグラフ用カラム充てん剤の検討

ヨウ素と2-ブタノンから生成するヨードブタノンの分離定量用カラムとして，10%SE-30，2%DC QF-1，2%

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都立衛生研究所多摩支所　190 東京都立川市柴崎町 3—16—25
** Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 16-25 Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo

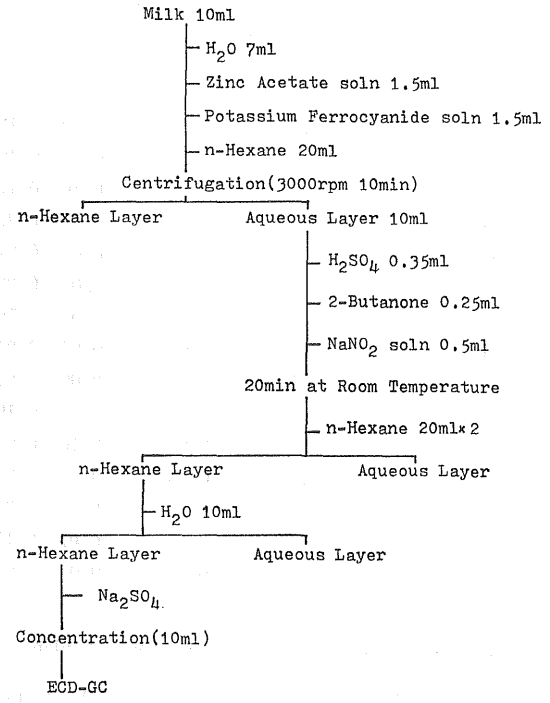


Chart 1. Analytical Method of Iodine in Milk

OV-225 および 10%DEGS+0.5% H_3PO_4 の充てん剤を使用した．10%SE-30，2%DC QF-1 では tailing が著しく，2% OV-225 では目的ピークはシャープであったが，反応副産物のピークとの分離上の問題があったので 10% DEGS+0.5% H_3PO_4 を採用した．そのガスクロマトグラムを示す (Fig. 1).

2. ヨウ素の検量線

0.010, 0.025, 0.050, 0.075および0.100μg/m*l*のヨウ素標準溶液について，おのおの 1μ*l* のピーク高さから検量線を作成した．その結果 0～0.100ng の範囲で直線性を示した (Fig. 2).

3. 添加回収実験

牛乳にヨウ素標準液を0.05μg/m*l*の濃度に添加し，その回収実験を行なった結果回収率は90.2%であった．またこの定量法の再現性は，ヨウ素濃度0.20μg/m*l*の牛乳を10回測定した場合の変動係数で4.9%あった．

4. 牛乳および飲用牛乳中のヨウ素の測定

生乳は昭和53年1月から9月の間に関東近県で搾乳された44検体，牛乳およびその他のものは昭和52年10月から昭和53年10月の間に都内で市販されていた 167 検体についてヨウ素の測定を行なった (Table 1).

生乳，牛乳および加工乳から検出されたヨウ素濃度の平均値はそれぞれ0.10, 0.14および0.20μg/m*l*で，検出

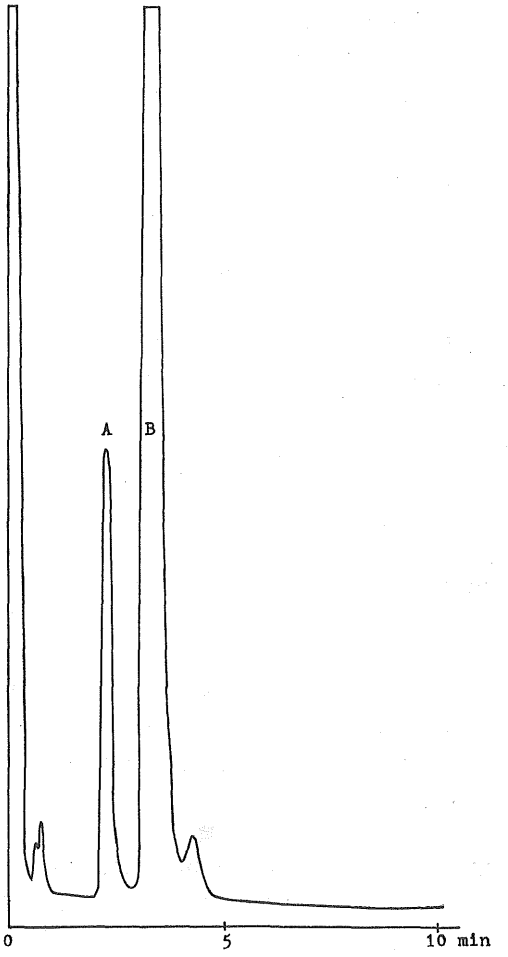


Fig. 1. Gas chromatogram of Iodobutanone
A; Iodobutanone
B; Oximoderivative

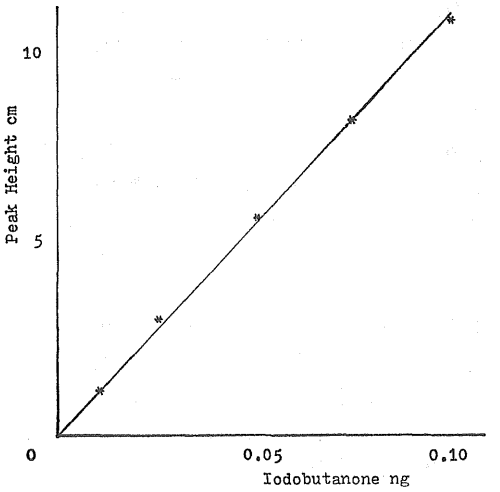


Fig. 2. Calibration Curve of Iodobutanone

Table 1. Detection of Iodobutanone in Raw and Commercial Milk ($\mu g/ml$)

Material	N	Mean	S.D.	Range
Raw Milk	44	0.10	0.07	0.007～0.29
Normal Liquid Milk	167	0.14	0.05	0.02 ～0.38
Processed Milk	25	0.20	0.09	0.07 ～0.41
Gersey Milk	4	0.04	0.01	0.02 ～0.06
Long Life Milk	1	0.01	—	—

された範囲はそれぞれ0.007～0.29，0.02～0.38および0.07～0.41$\mu g/ml$ であった．なお検体数は少ないがジャージ牛乳とロングライフ牛乳は，それぞれ0.04，0.01 $\mu g/ml$と低い値であった．

牛乳中のヨウ素レベルが製造工場により差があるかどうかを調べるために，牛乳167検体のうちで工場が東京都内および近郊にある15工場（O工場は北海道）からのもの130検体を選びだし，これらの各工場間の牛乳中のヨウ素レベルについてt検定処理を行なった(Table 2, 3)．その結果15工場の中で5工場以上との間に危険率5％で有意差の認められたものが5工場あった．すなわちI，LおよびMの3工場で製造された牛乳中のヨウ素レベルは他と比べて高く，NとO工場の牛乳では低いことを示している．

考　察

反芻動物の乳汁中のヨウ素の存在形態は，ほとんどが無機のヨウ化物の形である[12]と考えられている．本実験においても牛乳中の無機のヨウ素を対象として測定を行なった．ガスクロマトグラフを用いた牛乳中のヨウ素の測定例として Bakker の報告があるが，この方法に比べ試料を1/5に少量化し，ガスクロマトグラフのカラム充てん剤は Bakker の使用した10％SE-30は tailing が著しいので10％DEGS＋0.5％H_3PO_4 を用いた．改良した方法で牛乳中の微量のヨウ素を正確に精度よく測定することが出来た．

諸外国ではウシまたはヒトにおけるヨウ素欠乏症が多いために，その観点から牛乳中のヨウ素レベルに関する調査研究が多く，そのレベルは国あるいは地方により差はあるが本調査成績と比べ全般に低い傾向にある（Table 4）．わが国における最近の牛乳中のヨウ素レベルに関する data はほとんどないので，1976年版の食品標準成分表[14]の牛乳中のヨウ素レベル0.06$\mu g/ml$を参考にしてみると，本実験のレベルは全般に高く，特にI，LおよびM工場の牛乳は更に高い値を示している．

わが国の牛乳中のヨウ素レベルが，諸外国と比べやや高いことまた国内においても最近高くなっている傾向にあることの原因は，今後の調査研究にまたなければならないが治療薬あるいは消毒薬としてのヨウ素剤の汎用の結果，その一部が乳汁中へ移行残留しているのもひとつの要因であろうと考えられる．

健全な牛乳を確保してゆくために，乳牛における動物医薬品およびその他の薬品の適切な使用と指導が望まれる．

Table 2. Detection of Iodobutanone in Commercial Milk from 15 Plants ($\mu g/ml$)

Plant	N	Mean	S.D.	Range
A	12	0.14	0.03	0.09～0.19
B	11	0.13	0.03	0.08～0.19
C	4	0.13	0.03	0.10～0.17
D	14	0.15	0.03	0.10～0.22
E	15	0.12	0.04	0.06～0.21
F	11	0.14	0.05	0.07～0.23
G	4	0.12	0.03	0.08～0.16
H	11	0.15	0.04	0.09～0.21
I	11	0.19	0.06	0.09～0.27
J	12	0.15	0.03	0.07～0.19
K	11	0.16	0.04	0.10～0.22
L	4	0.21	0.03	0.18～0.24
M	3	0.34	0.04	0.29～0.38
N	3	0.09	0.02	0.07～0.11
O	4	0.04	0.03	0.02～0.09

Table 3. Tests of Significance among 15 plants

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
A															
B															
C															
D															
E															
F															
G															
H															
I	*	*		*	*	*									
J										*					
K					*										
L	*	*	*		*	*	*	*		*	*				
M	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
N	*			*				*	*	*	*	*	*		
O	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

* significant level 5%

Table 4. Iodine Level in Milk at Foreign Countries

Iodine (μg/ml)		References	
0.02～0.08	Holland	W. T. Binnets	1954 (9
0.10	Germany	M. Kirchgessner	1959 (9
0.04	U. S. A.	E. J. Underwood	1971 (9
0.01	U. S. A.	R. W. Hemken	1972(13
0.05～0.15	Norway	K. Iwarsson	1973 (1
0.01	U. S. A.	J. K. Miller	1973 (6
0.04	Poland	St. Grys	1974 (1
0.10～0.54	Australia	H. J. Bakker	1977 (4
0.02	U. S. A.	L. M. Conrad	1978 (5

文 献

1) Grys, St: *Journal of Chromatography*, **100**, 43, 1974
2) Joerin, M. M.: *Analyst*, **100**, 7, 1975
3) Cantor, A., and Most, S.: *J. Milk Food Technol.*, **39**, 554, 1975
4) Bakker, H. J.: *JOURNAL OF THE AOAC*, **60**, 1307, 1977
5) Conrad, L. M., and Hemken R. W.: *J Dairy Sci.*, **61**, 776, 1978
6) Miller, J. K., and Swanson E. W.: *J Dairy Sci*, **56**, 378, 1973
7) Miller, J. K., Swanson, E. W., and Lyke, W. A.: *J Dairy Sci*, **56**, 1344, 1973
8) Convey, E. M., Chapin, L. T., Thomas, J. W., and Swanson, E. W.: *J Dairy Sci.*, **61**, 771 1978
9) 日本化学会訳編：微量元素., 281, 1975, 丸善(株), 東京
10) Newton, G. L., Barrick, E. R., Harvey, R. W., and Wise, M. B.: *J. Anim. Sci.*, **38**, 449, 1974
11) Hillman, D., and Curtis, A. R.: *J Dairy Sci.*, **63**, 55, 1980
12) Miller, J. K., Swanson, E. W., and Spalding, G. E.: *J Dairy Sci.*, **58**, 1578, 1975
13) Hemken, R. W., Vandersall, J. H., Oskarson M. A., and Fryman, L. R.: *J Dairy Sci.*, **55**, 931, 1972
14) 科学技術庁資源調査会編：三訂日本食品標準成分表第265版, 144, 1976, 医歯薬出版(株), 東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 170-173, 1980

野菜，果実中の TPN，キャプタン，ダイアジノン，キノメチオネートの残留について

小関正道*，嶋村保洋*，真木俊夫*，田村行弘*
直井家壽太*

Residues of TPN, Captan, Diazinon, Chinomethionat in Vegetables and Fruits

MASAMICHI KOSEKI*, YASUHIRO SHIMAMURA*, TOSHIO MAKI*, YUKIHIRO TAMURA* and YASUTA NAOI*

Keywords：残留農薬 pesticide residues，テトラクロロイソフタロニトリル tetrachloroisophthalonitrile，キャプタン captan，ダイアジノン diazinon，キノメチオネート chinomethionat

緒　言

食品衛生法に残留農薬基準が設定されているが，BHCやDDTのようにすでに使われなくなっているものがはいっている反面，現在実際に繁用されている農薬についての基準設定がなされておらず実際的でない面がある．

野菜類は露地栽培のほかに，近年大規模な施設栽培が普及発展しており．この施設栽培では施設内の温度，湿度が高いため，病害が発生しやすい環境になっている．そこで病害を防除する目的で農薬は使用量，散布回数ともに露地ものより多い．さらに施設内は密閉状態となっているため，農薬が作物に残留しやすい状態をつくりだしている[1,2]．また使われる農薬は残留基準のない農薬が多用されており，残留実態については明らかでない．

一方果実では，その果皮を保護し着色を鮮明にする目的で，袋掛け栽培が行なわれている．この袋の内面を農薬で処理しているものがあるが，果実にどのくらい農薬が残留するか実態を調査した報告がほとんどない．

そこで残留農薬の実態を明らかにする目的で，収穫まぎわまで使用されているテトラクロロイソフタロニトリル（以下 TPN と略す），キャプタン，キノメチオネートおよび使用量の多いダイアジノンを調査対象農薬として選び，作物には多量に施設栽培されているトマト，キュウリ，イチゴ，さらに露地栽培のホウレンソウ，キャベツ，ハクサイ，果実にリンゴ，モモ，ナシを対象に選び市場調査を行なった．

実験の部

試料　1979年7月から1980年1月までに都内で収去された9種45検体の作物を対象とした．その内容は，果菜類；トマト5，キュウリ5，イチゴ4，葉菜類；ホウレンソウ8，キャベツ4，ハクサイ3，果実類；リンゴ4，ナシ8，モモ4である．

農薬別調査対象作物　TPN：すべての作物について調査した．キャプタンおよびダイアジノン：葉菜類を除くすべての作物について調査した．キノメチオネート：イチゴのみ調査した．

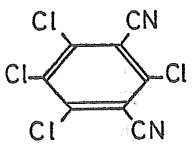
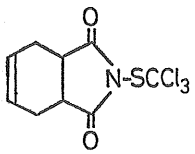
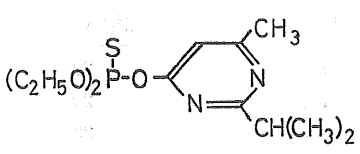
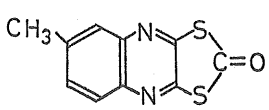
試薬　農薬標準品：TPN，キャプタン，ダイアジノン，キノメチオネートはいずれも和光純薬工業(株)製．n-ヘキサン，ジクロルメタン，アセトン，アセトニトリル，石油エーテル，エチルエーテル：残留農薬試験用．シリカゲル：メルク社製．その他の試薬はすべて試薬特級を使用した．

機器　ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製GC-5A（検出器 ECD），同 GC-1C（検出器 FPD）．ホモゲナイザー：日本精機(株)製．

分析方法　A法：TPN，キャプタン，ダイアジノンは鈴木らの方法[3]に準じて行なった．すなわちミキサーで均一にした試料100gをホモゲナイザーのカップに入れ，アセトニトリル100m*l*と50%リン酸5m*l*を加える．これを2分間高速でホモゲナイズしたのち減圧ろ過をして，残渣はアセトニトリル100m*l*で洗い，先のろ液と合わせる．このろ液のアセトニトリルをロータリーエバポレーターで減圧留去する．残った水層に10%食塩水200m*l*を加えて，n-ヘキサン 100m*l*と50m*l*でそれぞれ10分間振とうし，n-ヘキサン層を分取する．このn-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後，ほぼ乾固するまで濃縮する．残渣を石油エーテル：ジクロルメタン(4：1)の少量に溶解しシリカゲルカラムに移して，初めに石油エーテル：ジクロルメタン(4：1)100m*l*で洗う．ついで石油エーテル：ジクロルメタン：アセトン (50：48：2) 120m*l*で展開し，初流 20m*l*を捨て残りの流出液を分取する．この流

* 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. TPN, キャプタン, ダイアジノン, キノメチオネート

TPN[1]	キャプタン	ダイアジノン	キノメチオネート
			
1.0ppm[2]	5.0ppm[2,3]	0.1ppm[3]	0.5ppm[2]
LD_{50}(ラット♂)10000	LD_{50}(ラット)9000	LD_{50}(ラット♂)250 LD_{50}(ラット♀)285	LD_{50}(ラット♂)>2500 LD_{50}(ラット♀) 3000
殺菌剤	殺菌剤	殺虫剤	殺菌剤

1) TPN：テトラクロロイソフタロニトリル，クロルサロニル
2) 環境庁告示の残留基準　　3) 食品衛生法の残留基準

出液を5ml に濃縮してガスクロマトグラフで測定する．

B法：TPN は確認のため武田の方法[4] も準用した．すなわち，ミキサーで均一にした試料100gを 500mlの分液ロートに入れ，85%リン酸 5ml を加え，アセトン 100 ml で2回，それぞれ10分間振とうする．これを減圧ろ過してろ液に5%食塩水 500ml を加え，石油エーテル 100ml で3回，それぞれ10分間振とうし，石油エーテル層を分取して，これを蒸留水100ml で洗う．この石油エーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水後，ロータリーエバポレーターで，ほぼ乾固するまで濃縮する．残渣をエチルエーテル：n-ヘキサン (5：95) の少量に溶解し，シリカゲルカラムに移して，エチルエーテル：n-ヘキサン (5：95) 150ml で展開し，初流 50ml を捨て残りの流出液を分取する．この流出液を5ml に濃縮してガスクロマトグラフで測定する．

シリカゲルカラムの作製法：シリカゲルを130°，12時間以上加熱活性化する．このシリカゲルをA法は12g，B法では10g 用いて，内径 15mm のガラスカラム管に，それぞれの展開溶媒を用いた湿式法で充てんし，さらに無水硫酸ナトリウムを層積する．

C法：キノメチオネートは山下らの方法[5] に準じて次のように行なった．ミキサーで均一にした試料100gをホモゲナイザーのカップに入れ，アセトン 200ml を加える．これを2分間高速でホモゲナイズした後，減圧ろ過をする．このろ液のアセトンをロータリーエバポレーターで減圧留去する．残った水層に飽和食塩水 500ml を加えて，n-ヘキサン100ml で3回，それぞれ10分間振とうし，n-ヘキサン層を分取する．n-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後，ほぼ乾固するまで濃縮する．残渣をn-ヘキサン5ml に溶解してガスクロマトグラフで測定する．

ガスクロマトグラフィーの条件　TPN，キャプタン：カラム；内径3mm，長さ1.5mのガラスカラム，2%シリコン XE-60，クロモソルブ G(AW-DMCS)，60～80 mesh．検出器；ECD．カラム温度；210°，注入口温度；250°．検出器温度；250°．キャリヤーガス圧；N_2 1.4 kg/cm².

ダイアジノン：カラム；内径 4mm，長さ1.5m のガラスカラム，5%シリコン DC-200，ガスクロム Q，60～80mesh．検出器；FPD，P-フィルター．カラム温度；190°．注入口温度；190°．検出器温度；230°．キャリヤーガス流量；N_2 60 ml/min．水素流量；200 ml/min．空気流量；60ml/min．

キノメチオネート：カラム；内径3mm 長さ1m のガラスカラム，15%QF-1+10%DC200 (1：1W/W)，クロモソルブ W (AW)，60～80mesh．検出器；FPD，S-フィルター．カラム温度；190°．注入口温度；190°．検出器温度；230°．キャリヤーガス流量；N_2 60ml/min．水素流量；100ml/min．空気流量；40ml/min．

ガスクロマトグラムの最小検出量　TPN：0.03ng キャプタン：0.6ng ダイアジノン：0.3ng キノメチオネート：1.5ng

結果と考察

1. **添加回収実験**　本調査を行なうにあたり，鈴木らの方法[3]による各作物別の添加回収率をもとめた．ホモゲナイズした各試料 100g に，TPN，キャプタン，ダイアジノンを同時に添加し，回収実験を行なった．表2に示したように回収率は平均で TPN が79%，キャプタンが84%，ダイアジノンが75%であり，実用に支障がないと判断されたので，この分析法を用いて調査を行なうこととした．

2. **TPN の残留量**　TPN は広く作物に残留しており，イチゴ，ナシ，モモを除くすべてから検出された．特にトマト，キュウリ，ホウレンソウでは調査したすべてのものから検出され，その範囲は 0.001～1.35ppm で

表 2. TPN, キャプタン, ダイアジノンの添加回収率

	TPN		キャプタン		ダイアジノン	
	添加量 (ng)	回収率 (%)	添加量 (ng)	回収率 (%)	添加量 (ng)	回収率 (%)
トマト	0.5	77, 84	20	88	5	77
キュウリ	0.5	71, 73	20	90	5	77
リンゴ	0.5	84	20	88	5	76
ナシ	0.5	90	10	68	2	85
モモ	0.25	76	15	86	10	62
平均値		79.3		84.0		75.4
標準偏差		6.5		9.1		8.3

表 3. TPN, キャプタン, ダイアジノン, キノメチオネートの残留量

			TPN			キャプタン	ダイアジノン	キノメチオネート
	検体数	nd の検体数	最大値	最小値	平均値			
トマト	5		1.35	0.001	0.35	nd	nd	
キュウリ	5		0.46	0.002	0.11	nd	nd	
イチゴ	4	4				nd	nd	nd
ホウレンソウ	8		0.07	0.001	0.17			
キャベツ	4	2	0.05	0.001				
ハクサイ	3	2	0.002					
リンゴ	4	2	0.003	tr		nd	nd	
ナシ	8	8				nd	nd	
モモ	4	4				nd	tr, 0.03	

nd：検出しない　tr：こん跡,　単位：ppm

あった．この最高値1.35ppmを示したトマト1検体の値は，環境庁告示による残留農薬基準1.0ppmを越えるものであった．

各作物別の検出範囲は，トマト 0.001～1.35ppm，平均0.35ppm，キュウリ0.002～0.46ppm，平均0.11ppm，ホウレンソウ0.001～0.7ppm，平均0.17ppm，キャベツ nd～0.05ppm，ハクサイ nd～0.002ppm，リンゴ nd～0.003ppmであった．

TPNは適用範囲の広い殺菌剤であり，種々の作物に使用されているが，今回の結果からも広範囲な作物に使用されている様子がわかった．また残留期間も長いことが藤本らにより報告されている[2]．したがってTPNは，特に施設栽培作物において散布する場合には残留を考慮した使用法で行なう必要があり，また残留実態について十分把握していく必要がある．

3. キャプタンおよびダイアジノン キャプタンは調査した作物30検体のいずれからも検出されなかった．著者らは過去にも種々の作物についてキャプタン類の分析を行なっているが，検出された例はなく，また標準溶液の分解もはやく，保存もしにくいことから，作物へ散布されてからも分解がはやく残留することがほとんどないと考えられる．したがってキャプタンの残留については，農薬の一般的な使用法が守られるかぎり問題ないものと考えられる．

ダイアジノンはモモ4検体中2検体にtr～0.03ppm検出された．トマト，キュウリ，イチゴ，リンゴ，ナシからは検出されなかった．ダイアジノンは毒性の比較的強い殺虫剤であり，主として接触毒のため，広範囲の害虫を対象として使われている．今回モモからの検出量は残留農薬基準0.1ppmを下まわる値であったが，このように検出される作物があることやJMPR[6]により定められているADIが0.002mg/kgと比較的小さいことから，さらに種々の作物について実態を把握してゆく必要がある．

4. キノメチオネート イチゴについてのみ調査したが，キノメチオネートはいずれからも検出されなかった．山下ら[5]は栽培したイチゴでキノメチオネートの残留消長を調べ，2週間後で0.2ppm残存していると報告している．このことと，イチゴは十分に洗うことなく生

食されていることなどから，さらに継続して調べ実態を把握しなければならないと考えている．

農薬の使用量や散布回数は，病害虫の発生と密接に関係している．またイチゴなどのように施設栽培され，病害虫に比較的弱い作物は収穫間ぎわまで農薬が散布されることもある．さらに TPN のように ADI が0.03mg/kg と定められ[7]，急性毒性の低いものでも，今回の調査で明らかになったように，多くの作物から検出されその残留量も多いものがある．このように残留農薬については種々の問題が残されており，実態を明らかにしてゆく必要があることから，さらに調査を進めなければならないと考える．なお今回の調査では果実の残留農薬量が少なく，農薬処理された袋掛け用袋の実態調査も十分に行なえなかったため，残留との関係を明らかにすることができなかった．

要　約

市販されている施設栽培作物のトマト，キュウリ，イチゴ，露地栽培作物のホウレンソウ，キャベツ，ハクサイ，果実のリンゴ，ナシ，モモを対象に，TPN, キャプタン，ダイアジノン，キノメチオネートについて残留農薬実態調査を行なった．

1. TPN 調査した作物の大部分から検出され，その範囲は0.001～1.35ppm であった．最高値1.35ppm はトマトで環境庁告示の残留基準1.0ppmを上まわっていた．

2. ダイアジノン　モモから検出されその範囲は tr～0.03ppmであった．

3. キャプタン　いずれの検体からも検出されなかった．

4. キノメチオネート　イチゴだけについて調べたが検出されなかった．

文　献

1) 伊東　正：日本農薬学会第5回講演要旨集，SB-1, 1980，米山伸吾：*ibid.*, SB-2, 1980，後藤真康：植物防疫，32, 3, 1978
2) 藤本雄一，中村広明：農薬検査所報告，16, 39, 1976
3) 鈴木重雄，小田雅康：*ibid.*, 17, 43, 1977
4) 武田明治：食品衛生研究，27, 1043, 1977
5) 山下幸夫，西島　修，川原哲城ら：農薬検査所報告，14, 38, 1974
6) *Report of the* 1967 *Joint Meeting of the* FAO *Working Party of Experts and the* WHO *Expert Committee on Pesticide Residues.* FAO *Meeting Rept.*, 1967
7) *Report of the* 1975 *Joint Meeting of the* FAO *Working Party of Experts and the* WHO *Expert Committee on Pesticide Residues.* FAO *Meeting Rept*„ 1975

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 174-179, 1980

魚介類中の微量元素に関する基礎的研究（第5報）
カレイ，ボラ，コノシロの重金属およびヒ素

勝木康隆*，石井晴代*，伊東昭子*，直井家壽太*
木村康夫*

Study on Amounts of Trace Elements in Marine Fishes (V) Distribution of Heavy Metals and Arsenic in Flatfish Graymullet and Gizzard-shad Tissue

YASUTAKA KATSUKI*, HARUYO ISHII*, AKIKO ITOH*, YASUTA NAOI*
and YASUO KIMURA*

Keywords：重金属 heavy metals，ヒ素 arsenic，バックグランド background，魚 fish，カレイ flatfish，ボラ graymullet，コノシロ gizzard-shad

緒　言

魚介類中の微量重金属のバックグランドを調査する目的で，前回までにカツオ[1,2]ブリ[3]等の外洋魚および沿岸回遊魚であるスズキ[4]の分析を行ない重金属およびヒ素の体内分布を明らかにした．その結果，これらの魚食性大型魚に魚種間の差異がみられたため，食性が生態的により低次の魚で定着性の強いカレイ，ボラ，回遊性のコノシロのバックグランドを調査した．本報では以上6魚種の重金属の蓄積挙動を比較し魚齢，食性，棲息環境との関連性を検討した．

試料および方法

試料　神奈川，千葉，茨城，福島，静岡，北海道，山口各県で漁獲した推定魚齢3～7年のカレイ，ボラ，コノシロを原則として1尾1検体として筋肉，肝，腎，生殖巣，エラ，消化管等の部位に分けて分析した．

カレイ：体長20～40cm（体重0.2～1.1kg）33尾，ボラ：体長40～50cm（体重0.8～1.9kg）12尾，コノシロ：体長19～23cm（体重0.11～0.19kg）23尾．

分析法　総水銀（以下 T-Hg と略す）は硫硝酸分解後，還元気化フレームレス原子吸光法，As は硝酸マグネシウムを添加し乾式灰化後原子吸光法，Cd, Pb, Zn, Cu, Mn, Cr および Co は乾式灰化後 DDTC-MIBK 抽出原子吸光法で測定した．

結果および考察

カレイ，ボラ，コノシロの調査結果をそれぞれTable 1. Table 2. Table 3 に示す．表は部位別の金属含有量を平均値と範囲で示した．Table 1～3の平均値をカツオ[2]ブリ[3]スズキ[4]の体内分布と比較し金属ごとにに Fig. 1～9 示した．カレイ，ボラ，コノシロの消化管の分析値は消化管内容物を含むが，カツオ，ブリ，スズキは別々に分析したものである．コノシロ（20尾）は生殖巣以外の臓器を分けずに分析し消化管として記載した（消化管を内臓と読み替える）．

上記6魚種の食性[5]について述べると，カレイはゴカイ，クモヒトデ類のようなものから甲殻類，貝類および小魚，ボラは小甲殻類，藻類および海底の有機物等雑食性で消化管中には常に砂泥がみられる．コノシロは植物性プランクトンを摂餌する．対してスズキ，カツオ，ブリはカタクチイワシ，マアジを主餌とし他に，スズキはアユ，ホッコクアカエビを，カツオはイカを，ブリはサバ，イカ，タイその他摂餌は無選択で成長段階が進むにつれて生態的に高次の動物を捕食する食物連鎖の上位にある．

Hg　Fig. 1 に T-Hg の体内分布を示した．カレイ，ボラ，コノシロはいずれも筋肉部と内臓とで Hg 蓄積に差はみられず 0.05ppm 以下の低値であり，体長との相関はみられなかった．スズキ，カツオ，ブリはすべての部位でカレイ，ボラ，コノシロより高値でとりわけ筋肉の Hg 蓄積は著しい．この両者の相違は前述の食性の相違と一致する．また，魚類を主餌としないセイゴ，フッコ（スズキの若年魚）は Hg 蓄積は低く体長相関はみられないが，スズキでは高い相関があること[4]，メチル水銀の吸収はエラおよび体表面よりも消化管からの割合が大きいこと[6,7]等 Hg 蓄積の差は食餌形態の差異を反映したものであると考えられる．

概して腎は他の部位に比べて無機水銀の比率が高

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

Table 1. Concentration of Arsenic and Heavy Metals in Viscera and Muscle of Flatfish

unit : ppm wet base

	n	T-Hg	Pb	Cd	Cr	Cu	Zn	Mn	Co	As
Muscle	33	0.05 (0.01—0.11)	0.07 (0 —0.18)	0.01 (0 —0.04)	0.06 (0 —0.23)	0.20 (0.08—0.52)	4.6 (1.9—7.6)	0.10 (0.01—0.24)	0.02 (0 —0.06)	1.6 (0.55—4.0)
Liver	18	0.03 (0.02—0.05)	0.06 (0 —0.19)	0.26 (0.06—0.60)	0.01 (0 —0.09)	7.1 (1.3—11)	27 (11—47)	0.31 (0.08—0.72)	0.02 (0 —0.06)	2.3 (1.0—5.5)
Kidney	3	0.05 (0.03—0.07)	0.09 (0.02—0.16)	0.09 (0.03—0.16)	0.03 (0.02—0.06)	0.87 (0.44—1.3)	15 (14—16)	0.18 (0.09—0.26)	0.05 (0.04—0.07)	2.8 (0.70—4.7)
Gonad	18	0.01 (0 —0.05)	0.05 (0 —0.15)	0.03 (0 —0.07)	0.02 (0 —0.08)	1.0 (0.44—2.6)	29 (13—58)	0.14 (0.02—0.48)	0.04 (0 —0.13)	1.0 (0.23—1.6)
Gill	1*	ND	—	0.09	0.07	0.71	9.3	0.35	0.07	0.46
Digestive organs	15	0.03 (0.02—0.04)	0.12 (0 —0.31)	0.12 (0.04—0.23)	0.03 (0 —0.07)	2.4 (0.43—6.1)	16 (6.5—28)	0.41 (0.14—0.62)	0.04 (0.02—0.07)	1.4 (1.3—1.7)

* Collect 12 Samples into One

Table 2. Concentration of Arsenic and Heavy Metals in Viscera and Muscle of Graymullet

unit : ppm wet base

	n	T-Hg	Pb	Cd	Cr	Cu	Zn	Mn	Co	As
White muscle	12	0.02 (0.01—0.03)	0.07 (0 —0.22)	0.01 (0 —0.02)	0.03 (0.02—0.04)	0.16 (0.02—0.33)	3.8 (3.3—5.1)	0.08 (0.05—0.14)	0.03 (0 —0.11)	0.37 (0.23—0.53)
Red muscle	12	0.02 (0.01—0.06)	0.06 (0.02—0.11)	<0.01 (0 —0.01)	0.04 (0.02—0.11)	2.1 (1.6—2.7)	9.0 (7.5—13)	0.13 (0.08—0.23)	0.03 (0 —0.09)	0.64 (0.35—0.82)
Liver	12	ND	0.04 (0 —0.15)	0.10 (0.04—0.24)	0.07 (0 —0.20)	180 (51—310)	19 (6.5—39)	0.35 (0.12—0.79)	0.08 (0 —0.22)	0.40 (0.23—0.83)
Kidney	12	0.01	0.03 (0 —0.17)	0.05 (0.02—0.09)	0.03 (0 —0.07)	4.0 (2.5—6.3)	16 (10—20)	0.49 (0.21—0.70)	0.05 (0.03—0.07)	—
Gonad	12	0.01 (0 —0.03)	0.18 (0.02—0.39)	0.01 (0 —0.02)	0.04 (0 —0.11)	1.2 (0.47—3.2)	53 (8.1—98)	1.1 (0.05—4.8)	0.07 (0.01—0.17)	1.3 (0.37—2.9)
Gill	10	0.01 (0 —0.02)	0.06 (0 —0.28)	<0.01 (0 —0.04)	0.08 (0 —0.18)	0.20 (0 —0.60)	2.7 (0.8—6.9)	4.6 (2.0—7.7)	0.03 (0 —0.06)	0.35 (0.16—0.49)
Digestive organs	10	0.02 (0.01—0.05)	0.11 (0 —0.32)	0.02 (0 —0.04)	3.5 (0.07—11)	7.0 (2.3—13)	25 (8.7—37)	2.0 (0.31—4.7)	0.09 (0.03—0.22)	0.73 (0.33—1.4)

Table 3. Concentration of Arsenic and Heavy Metals in Viscera and Muscle of Gizzard-shad

unit : ppm wet base

	n	T-Hg	Pb	Cd	Cr	Cu	Zn	Mn	Co	As
White muscle	20	0.02 (0.01—0.03)	0.12 (0.07—0.20)	0.01 (0—0.09)	0.05 (0.01—0.09)	0.46 (0.32—0.68)	4.3 (3.6—6.6)	0.64 (0.26—0.91)	0.02 (0—0.07)	0.34 (0.22—0.56)
Red muscle	20	0.02 (0.01—0.06)	0.13 (0.04—0.24)	0.02 (0—0.12)	0.03 (0.01—0.07)	2.9 (2.3—3.8)	8.8 (7.2—12)	0.81 (0.49—1.3)	0.02 (0—0.06)	1.5 (0.78—2.0)
Liver	3	—	0.07 (0.03—0.13)	0.08 (0.04—0.17)	0.02	1.9 (1.6—2.3)	16 (11—19)	0.43 (0.11—0.70)	0.02 (0—0.10)	—
Gonad	2*	<0.01	0.08 (0.07—0.09)	0.06 (0.04—0.09)	—	0.80 (0.61—1.1)	35 (25—46)	0.30 (0.11—0.49)	0.03 (0.02—0.04)	0.49
Gill	2*	<0.01	0.13 (0.13—0.14)	0.02 (0.01—0.03)	0.03	0.04	1.3 (1.2—1.4)	2.3 (2.1—2.5)	0.03 (0.02—0.04)	—
Viscera	20	0.04 (0.03—0.05)	0.10 (0.01—0.24)	0.16 (0.03—0.46)	0.30 (0.11—0.57)	2.1 (0.70—3.1)	15 (8.3—19)	1.0 (0.30—2.7)	0.06 (0.01—0.10)	1.0

* Collect 10 Samples into One

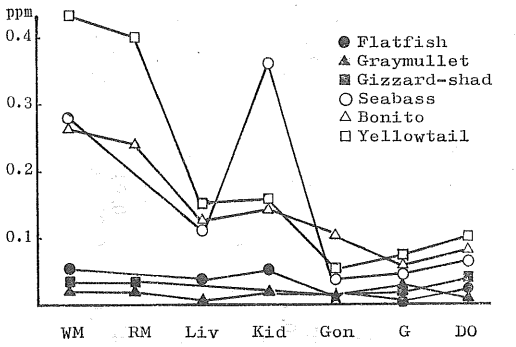


Fig. 1. Comparison of Total Mercury Concentration in Various Tissues of 6 Fishes. WM; White Muscle, RM; Red Muscle, Liv; Liver, Kid; Kidney, Gon; Gonad, G; Gill, DO; Digestive Organs

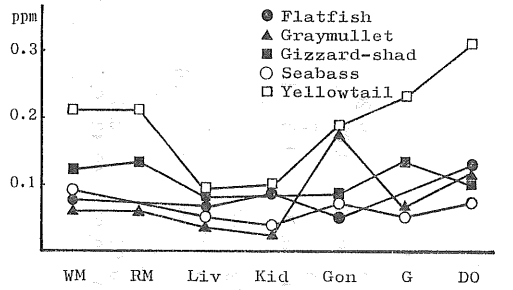


Fig. 2. Comparison of Lead Concentration in Various Tissues of 5 Fishes.

い[2-4,8]がスズキは最も高く(81%)かつ腎の T-Hg は筋肉を越えるきわめて高い値 (0.37ppm) がみられた. 筋肉ではブリよりも高い値のものも多く個体のバラツキが大きい. スズキのメチル水銀の生物学的半減期は 640～780日[8]と相当に長いこと等から, スズキは Hg の蓄積挙動が他と異なるのではないかと推測される.

Pb 体内分布は平均的で特定部位に親和性はなく, 体長相関もみられなかった (Fig. 2). 筋肉部でカレイ, ボラの 0.07ppm, コノシロの 0.12ppm はスズキと大差なく, 人為汚染の可能性の少ないブリ (0.2ppm) と比べて低値であること, 肝, 腎に魚種差がなく 0.1ppm 以下であることから, カレイ, ボラ, コノシロの Pb は高くはなく, また貴山ら[9]の数年間の調査範囲 (0.03～0.3 ppm) にあることからバックグランド値と考えられる.

ボラの生殖巣に 0.18ppm の高い値がみられたが性差 (卵巣>精巣) と思われる差があり続けて検討する必要がある. ボラおよびカレイの消化管中には多量の砂泥を含むものがあるが, コノシロやスズキと差がなく 0.1ppm

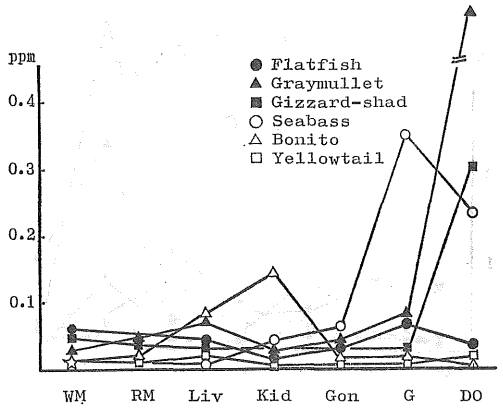


Fig. 3. Comparison of Chromium Concentration in Various Tissues of 6 Fishes.

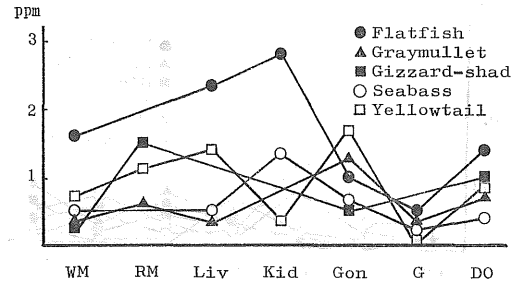


Fig. 4. Comparison of Arsenic Concentration in Various Tissues of 5 Fishes.

前後であることは底質に Pb の著しい蓄積がなかったことを示している.

Cr Fig. 3 に Cr の体内分布を示した. ボラの消化管は 3.5ppm のきわめて高い値であったが, 消化管内容物中に多量の砂礫があったことに原因すると思われる. スズキ, コノシロも0.2～0.3ppmと比較的高く, スズキはエラにも0.35ppmを検出した. にもかかわらず体内濃度は低値であり筋肉, 肝, 腎に Cr の蓄積はみられなかった. 消化管およびエラからの Cr の吸収率は低い[10]といわれ, 城ら[11]は大阪湾の Cr 濃度が魚の筋肉部の値 (0.02～0.04ppm) と対応しないと報告している.

カレイ, ボラ, コノシロのいずれも 0.1ppm を越えるものはなく, 大部分が0.05ppm以下の低濃度で体内濃度は平均的である. 体長相関はみられなかった.

As 体内分布 (Fig. 4) は起伏が魚種によりさまざまで傾向をつかみにくいが, 反面特定の部位に親和性のないことを示しているものと考えられる. ボラ, コノシロは0.3～1.5ppmでスズキ, ブリと大差ない, カレイは筋肉, 肝, 腎で高い値であり, Table 1 にみられるように

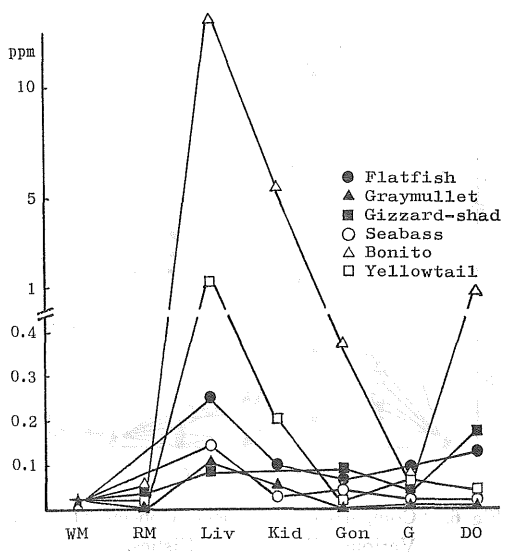


Fig. 5. Comparison of Cadmium Concentration in Various Tissues of 6 Fishes.

分析値の幅もかなり広い. 魚体に吸収された As はそのまま無毒の有機ヒ素の形で蓄積される[12]といわれ, カレイは摂餌の種類が多いこと, 甲殻類[13]およびその他の As を多く含む生物[9,14,15]を摂ることなどが原因と考えられる. さらに人体内に吸収された場合は, 分解されず蓄積されることもなく排泄される[12]ため有害性は低いと想定される.

カレイをはじめ魚の As 値の幅の広いことは多くの報告にみられ[15-18]As のバックグランドの特徴のひとつとしてあげられる. 筋肉およびその他の部位で体長との相関はみられなかった.

Cd 筋肉中の Cd は 6 魚種いずれも0～0.03ppmの低い値であり差はみられないが, 肝, 腎に親和性がみられ同時に魚種間の差が著しい (Fig. 5).

Cd 毒性に対して Zn が拮抗的に作用をあらわす量はモル数で100倍であるとされ[19]通常の状態では Cd/Zn×100の比率はおおよそ2以下である[20]. Fig. 5および7から部位別に Zn に対する Cd の比率 (Cd/Zn×100) を求めると以下のようになる.

	筋肉	肝	腎	生殖巣
カレイ	0.22	1.0	0.60	0.10
ボラ	0.26	0.2	0.30	0.02
コノシロ	0.23	0.25	—	0.17
スズキ	0.22	0.3	0.20	0.01
カツオ	0.14	21	19	0.55
ブリ	0.18	2.9	0.53	0.22

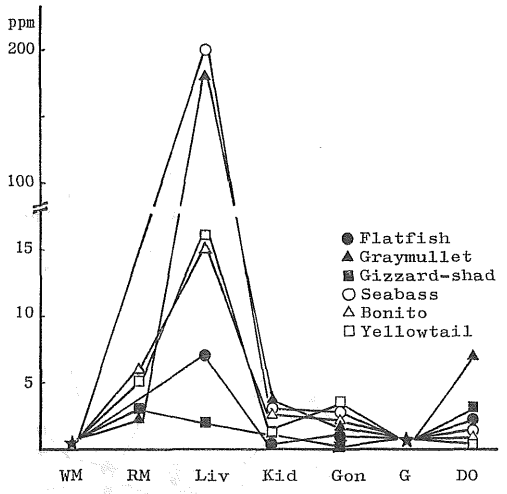


Fig. 6. Comparison of Copper Concentration in Various Tissues of 6 Fishes.

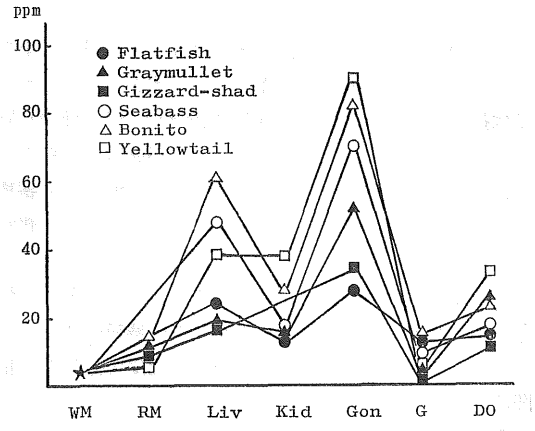


Fig. 7. Comparison of Zinc Concentration in Various Tissues of 6 Fishes.

Zn は Cd を隔離するような形で肝の Cd 濃度を増加させるといわれ[19]食物連鎖の上位にあるカツオ，ブリの肝，腎に Cd が蓄積しているものと考えられる．

Cu 体内分布 (Fig. 6) は Cd とよく類似し肝に高濃度である．しかし肝の Cu と Cd との存在比は一定しない．Cd はカツオ，ブリに高濃度であるが，Cu はボラ，スズキに 200ppm 検出されカツオ，ブリの10倍以上に相当する．肝の Cd 蓄積の高い魚が必ずしも Cu も高いとは限らず，Cd と Cu との関連性はみられなかった．白筋肉の Cu は平均0.36ppm で魚種差はみられなかった．血合筋は2～7ppmの範囲内にあり外洋性の大型魚に比べて，ボラ，コノシロの方が低値である．

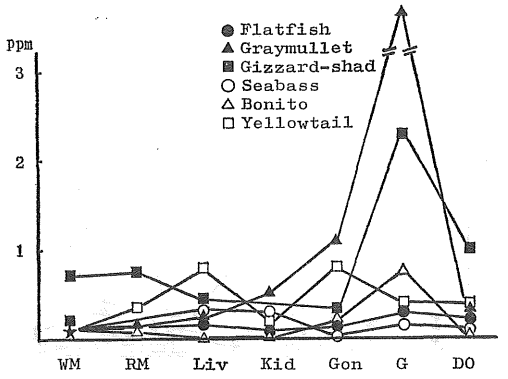


Fig. 8. Comparison of Manganese Concentration in Various Tissues of 6 Fishes.

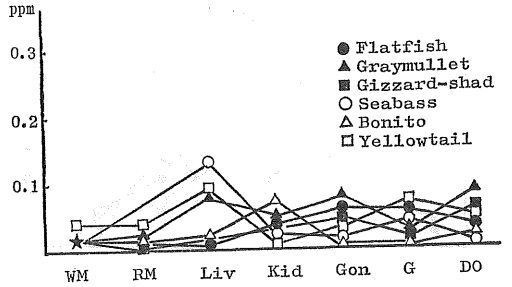


Fig. 9. Comparison of Cobalt Concentration in Various Tissues of 6 Fishes.

Zn 体内分布に二つのピークがみられる (Fig. 7) 動物の生殖系における Zn の必要性についての例証は数多くあるが[21]生殖巣に最も高い値が得られたことから，魚も例外ではないと考えられる．次いで肝，腎，筋肉，エラの順であり上位3部位では蓄積に魚種差がみられる．魚食性の魚に高値であり，カレイ，ボラ，コノシロはスズキ，カツオ，ブリ等よりも低値である．ボラ，スズキ，カツオ，ブリの生殖巣では卵巣は精巣よりも2～4倍高い有意差が認められた．カレイに性差はみられなかった．筋肉では魚種差はなく4～7 ppmである．体長との相関および卵巣重量との相関はみられなかった．

Mn Fig. 8 に Mn の体内分布を示す．筋肉部ではコノシロに0.6～0.8ppmで他の魚に比べて6～7倍高い値であった．骨の形成に Mn が関与することが知られており[22,23]，動物の骨には3 ppmほど含むといわれる．コノシロは筋肉中に小骨が多いため Mn が高く，これを完全に除いた状態では0.1ppm 程度である．したがって通常の試料の調製方法ではこの範囲で誤差を生じやすい．ボラ，コノシロのエラに Mn が高いのは鰓弓骨が入った

ためと考えられる．Mnの体内濃度は筋肉部が 0.1～0.3 ppm，骨を除いた各部は1 ppm以下のレベルである．

Co 体内分布（Fig. 9）は魚種差がなく均一でかつ0.1 ppm以下の微量である．

ま と め

カレイ，ボラ，コノシロの重金属およびヒ素の体内分布を調査し次の結果が得られた．

1) T-Hgの体内分布は3魚種とも平均的でかつ0.05 ppm以下であった．体長との相関はなく，魚食性の魚とではHgの蓄積性に明らかな相違がみられた．

2) Hg 以外で分布が均一なものは Pb, Cr, As, Mn, および Co である．As は個体，部位のバラツキはあるが約1 ppm，Mn は1 ppm以下，Pb は0.1ppm，Co は0.1ppm以下，Cr は0.05ppm以下のレベルにあり，対照とした魚食性の魚と大きな差はみられなかった．

3) Cd は肝に，Cu は肝，血合筋に，Zn は生殖巣，肝に親和性がみられ対照魚と挙動が一致する．含有量は魚種によりさまざまであるが，概して魚食性の魚の方がより高濃度である．体長との相関はみられなかった．

（本研究の概要は日本食品衛生学会第38回学術講演会1979年11月で発表した）

文 献

1) 勝木康隆，安田和男，上田 工，木村康夫：東京衛研年報，25，257，1974
2) 勝木康隆，安田和男，上田 工，木村康夫：*ibid.*，26-1，196，1975
3) 安田和男，勝木康隆，上田 工，直井家壽太：*ibid.*，29-1，177，1978
4) 安田和男，勝木康隆，上田 工，直井家壽太；*ibid.*，28-1，121，1977
5) 松原喜代松，落合 明：魚類学(下)，第3版，1973，恒星社厚生閣
6) 喜田村正次：食品衛生研究，24，401，1974
7) 吉田多摩夫：食衛誌，16，345，1975
8) 喜田村正次，近藤雅臣，瀧澤行雄，*et al.*：水銀，1976，講談社
9) 貴山道子，渡辺重信，和田 裕，*et al.*：神奈川県衛研年報，23，93，1973
10) Underwood, E. J.：微量元素，255，1975，丸善
11) 城 久，天持 進，安部恒之：大阪水試研究，4，1，1974
12) 竹下寿雄，前田 滋：油化学，29，75，1980
13) LeBlanc, P. J. and A. L. Jackson：*Mar. Pollut. Bull.*，4，88，1970
14) 池辺克彦，田中之雄，田中凉一，国田信治：食衛誌18，86，1977
15) 大江章夫，森 洋隆，杉谷 哲：岐衛研所報，23，52，1978
16) 渡辺昭宣，能勢憲英，鈴木敏正，*et al.*：埼玉県衛研年報，11，71，1977
17) 田村征男，石原利克，山本勝彦，*et al.*：名古屋市衛研年報，23，87，1976
18) 小林英一，秋山由美子，青森県衛研年報，13，41，1975
19) 和田 攻：代謝，12，219，1975
20) 石崎有信，福島匡昭，坂本倫子：日衛誌，25，207，1970
21) Underwood, E. J.：微量元素，207，1975，丸善
22) 蟹沢成好：代謝，12，237，1975
23) 和田 攻，木村正己：環境汚染物質の生体への影響 1 マンガン・アスベスト，77，1977，東京化学同人

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 180-184, 1980

天然甘味料の実態調査（第2報）市販天然甘味料製剤中のステビア成分の分析

中嶋 巌*, 広門雅子*, 中島和雄*, 溝入 茂*,
遠藤英美*

Survey of Natural Sweeteners (II)
Analysis of Stevia Components in Commercial Natural Sweetener Products

IWAO NAKAJIMA*, MASAKO HIROKADO*, KAZUO NAKAJIMA*, SHIGERU MIZOIRI*
and FUSAYOSHI ENDO*

Stevia components in 11 commercial natural sweetener products were analyzed; qualitative analysis was carried out by thin layer chromatography, and the total amount of stevia components in each product was determined by gas chromatography. In the meanwhile, concentrations of stevioside and rebaudioside A were determined by high performance liquid chromatography.

Stevioside, rebaudioside A, B, C and steviolbioside were analyzed qualitatively in all these products. Concentrations of total stevia component, stevioside and rebaudioside A were determined to be 1.23—8.83%, 0.47—4.77% and 0.18—3.59%, respectively.

Keywords: stevia, stevioside, rebaudioside A, natural sweetener, high performance liquid chromatography

緒　言

ステビアは天然の甘味料でサッカリンの代替えとして広い範囲の食品（珍味，清涼飲料，チューインガム等）に使用されている．

ステビア甘味成分は現在までに8種類が確認されており[1]，いずれもステビオール骨格を有するジテルペン配糖体で[1~3]．そのうち甘味が強く含有量の多い成分はステビオサイド（Stev）およびレバウディオサイドA（Reb A）である[4,5]．

前報[6]では，市販天然甘味料製剤中のステビア成分含量をガスクロマトグラフ法（GC法）により測定し，総Stevとして算出し報告した（この方法は，ステビオール骨格を有する配糖体すべてを測定する）．しかし，ステビア成分個々の甘味度（品質の一つの要素）が異なることから，成分個々の分離定量が望まれている．

そこで，今回我々は製剤中のステビア成分を薄層クロマトグラフィー（TLC）で確認し，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で主体甘味成分であるStevとReb Aの分離定量を，あわせてGC法で総Stevの定量を行ない，製剤中のステビア甘味成分の品質について検討し，若干の知見を得たので報告する．

実験の部

試料　都食品監視課より昭和54年5月～55年1月にかけて当所に送付された天然甘味料製剤11種を用いた．

試薬および器具　ステビオサイド（Stev），レバウディオサイドA（Reb A），レバウディオサイドB（Reb B）およびステビオールバイオサイド（Stev-b）標準品：いずれも丸善化成製のものをメタノールにより再結晶して用いた．ステビア4種混合標準溶液：Stev, Reb A, Reb Bおよび Stev-b 標準品をそれぞれ100mgとり，50%メタノールで全量 20m*l* とした．Stev-Reb A 混合標準溶液：Stev および Reb A 標準品をそれぞれ100mgとり，50%メタノールで全量20m*l*とした．グルコース（G），乳糖（L）およびデンプン（S）標準溶液：いずれも東京化成製のものを用い，50%メタノールに溶かし，1%溶液とした．シリカゲル薄層板：Merk 社製 Kiezelgel 60（20×20cm）を105°，30分間活性化し，デシケーター中で放冷したものを用いた．シリカゲルカラム：内径2cm，長さ20cmのコック付きガラス管に Kiezelgel 40（70～230mesh，ASTM，Merk 社製）のクロロホルム懸濁液を流し込み，高さ6.5cmの層とした後，クロロホルム：メタノール：水（30：40：15）混液50m*l*，ついでクロロホルム：メタノール（2：1）混液 10m*l* を用いて順次洗ったものを用いた．アニスアルデヒド-硫酸発色試薬：アニスアルデヒド 0.5m*l* をエタノール 9m*l* に溶かし，濃硫酸0.5m*l* および氷酢酸0.1m*l* を加えた．

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

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 ガスクロマトグラフ：柳本 G-80 型（検出器 FID）高速液体クロマトグラフ：ポンプ 日本分光 SP-048型，検出器 日本分光 UVIDEC 100 Ⅱ型

実験操作

1. 定性

試料1gを50%メタノール10mlに溶かし試験溶液とした．次に，ステビア4種混合標準溶液，G，L，S各種標準溶液および試験溶液それぞれ約1μlをKiezelgel薄層板上にスポットし，展開溶媒クロロホルム：メタノール：水（15：11.5：2）を用いて約15cm（約2時間）展開した．薄層板を取り出し風乾後，アニスアルデヒド・硫酸を噴霧し，120°，15分間加熱した後，スポットの呈色とRf値よりステビア成分の確認を行った．

2. 定量

i） **ガスクロマトグラフ法** 前報[6]に準じて行った．

ii） **高速液体クロマトグラフ法** 調整したシリカゲルカラムに試験溶液1mlを付し，シリカゲル層表面まで流した．クロロホルム：メタノール(2：1) 混液5mlでクロマト管内を洗い，ついでクロロホルム：メタノール：水（30：40：15）混液30mlでステビア成分を溶出させた．この溶出液を50°以下，減圧下で濃縮乾固後，残留物に水1mlを加えて溶かし，これを検液とした．検液およびStev-Reb A 混合標準溶液（Stev，Reb A 各0.25，0.5，1，2，2.5mg/ml）について，下記の測定条件によりHPLCを行い定量した．

測定条件：カラム Unisil Q NH_2 (5μ，4φ×250mm)，移動相 アセトニトリル：水（83：17），流速 1.2ml/min，圧力 70kg/cm²，検出波長 UV210nm

結果および考察

TLCの展開溶媒の検討 前報[6]で用いた溶媒系（クロロホルム：メタノール：水＝15：10：2)についてさらに検討を加えて，ステビア成分と他の糖類との分離条件を検討した．クロロホルム量(15)を一定とし，水(W)とメタノール（M）の溶媒比を変化させ，それらの溶媒でTLCを行ない，各成分のRf値を求めた．その結果をFig. 1に示した．ステビア成分および他の糖類の分離が良好であった溶媒比はW＝3，M＝16，18であるが，同時に存在する天然甘味料のグリチルリチン酸がReb AのRf値と一致するので，W＝2，M＝11，11.5，12のうちステビア成分の最も分離の良好なM＝11.5を用いることにした．この展開溶媒クロロホルム：メタノール：水（15：11.5：2）によるステビア成分，G，L，S各標準液および試験溶液のTLC図をFig. 2に示した．各成分のRf値はStev-b ＝0.45，Reb B＝0.36，Stev＝0.28，Reb C＝0.25，Reb A＝0.21，G＝0.17，L＝0.08，S＝0であった．アニスアルデヒド・硫酸で発色させた時の呈色は，ステビア成分がすべて緑色，GとLが深緑色，Sが黒緑色であり，ステビア成出の検出限界はそれ

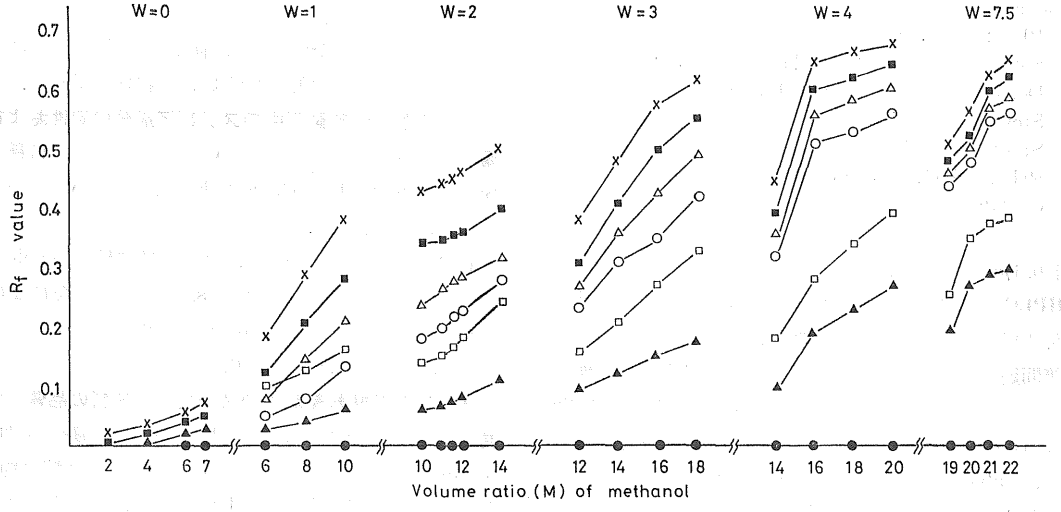


Fig. 1 Relationship between Rf Values of Sweeteners and Volume Ratios of $CHCl_3$–MeOH–H_2O (15:M:W)

×——× Steviolbioside ■——■ Rebaudioside B △——△ Stevioside
○——○ Rebaudioside A □——□ Glucose ▲——▲ Lactose
●——● Starch

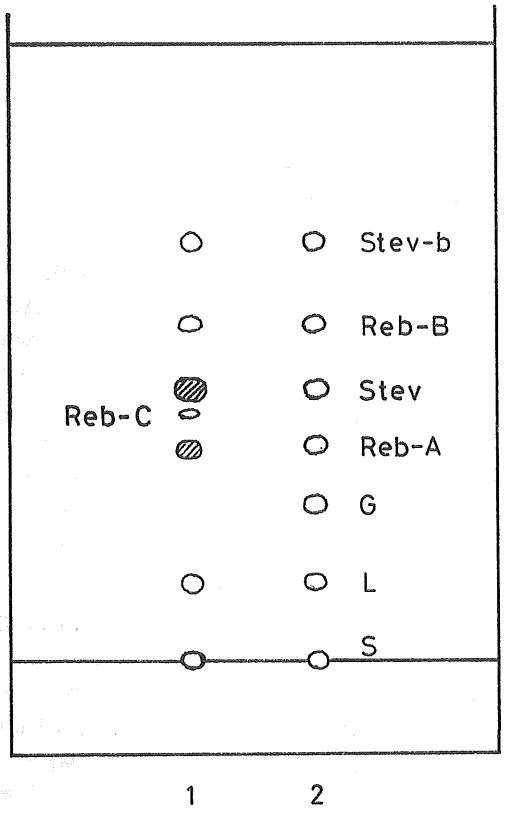


Fig. 2 Thin-Layer Chromatograms of a Natural Sweetener Product (1) and Seven Standard Components (2)
Plate: Silica gel
Solvent: $CHCl_3$–MeOH–H_2O (15:11.5:2)
Detection: Anysaldehyde–H_2SO_4
Stev-b: Steviolbioside
Stev: Stevioside
Reb-A, B, C: Rebaudioside A, B, C
G: Glucose L: Lactose S: Starch

それ0.1μg であった.

HPLC 法の検討 Sを含有する試料をそのままHPLCに付す場合，カラム分離に影響し，カラム寿命を短くする等問題があるので，シリカゲルカラムにより前処理を行いSを除去した．Stev および Reb A それぞれ 0.25 mg，1mg，2.5mg についてカラム回収実験を行ったところ，Table 1 のごとく良好な結果が得られた．

分離カラムは，ステビア成分が配糖体であることから，一般に糖類の分離分析に用いられているシリカゲル担体に–NH_2 基を導入した順相系カラムを用いた．また，移動相にはアセトニトリル–水系を用い，Stev，Reb A および Reb C の分離条件を検討したところ，分離が最も良好なアセトニトリル–水の溶媒比は 83：17 であった．この条件による Stev–Reb A 混合標準溶液および検液のクロマトグラムを Fig. 3 に示した．なお，Reb B，Stev–b，GおよびL等は検出波長 UV210nm において，吸収がないかあるいは小さいため，Stev および Reb A の分離定量に影響を及ぼすことはなかった．

Table 1. Recoveries of Stevioside and Rebaudioside A by Silica gel Column Chromatography

	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
Stevioside	0.25	0.218	87.2
		0.219	87.9
	1.0	0.935	93.5
		0.941	94.1
	2.5	2.329	93.2
		2.360	94.4
Rebaudioside A	0.25	0.225	90.2
		0.225	90.2
	1.0	0.947	94.7
		0.955	95.5
	2.5	2.392	95.7
		2.407	96.3

市販天然甘味料製剤中には他にシリカゲルカラムによる前処理で除去できない酸性物質（有機酸塩，グリチルリチン酸等）が配合されているが，これらは HPLC 分析の際，–NH_2 基に吸着されカラム分離に影響を及ぼすので，同系のプレカラムを用いることにより分離カラムへの影響を避けた．

また，Fig. 4に示すように，検量線は Stev および Reb A とも 0.5～5μg の範囲で良好な直線性を示した．

市販天然甘味料製剤中のステビア成分の定性および定量 市販品11種について TLC を行った結果，11種とも Stev，Reb A，Reb C，Reb B および Stev–b の5成分が確認された．

GC法および HPLC 法による定量結果を Table 2に示した．総 Stev 含量は1.23～8.83%，Stev 含量は 0.47～4.77%，Reb A 含量は0.18～3.59%で，Stev と Reb A の含量合計は0.65～7.79%であった．

市販天然甘味料製剤中のステビア甘味料の品質（甘味度） 現在までに，ステビア原葉中から8種類の甘味成分が確認されているが，中でも Reb A が砂糖の約450倍，Stev が約300倍と特に甘味が強く，他の成分はこの二成分に比べ非常に甘味が少ないと言われている．従って，Stev と Reb A の含量合計の総 Stev 含量に対する割合の大小から，その製剤に使用されているステビア甘味料の品質（甘味度）が判定できると考えられる．

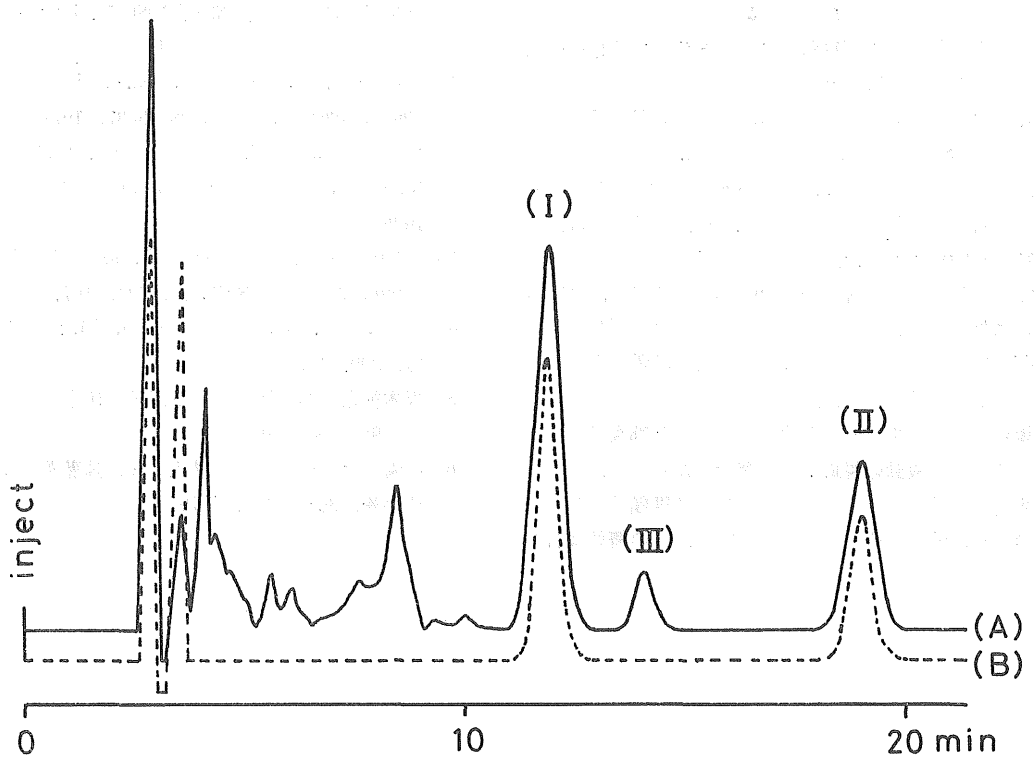


Fig. 3 HPLC Chromatograms of Stevia Components in a Natural Sweetener Product (A) and some Standard Components (B)
Column, Unisil Q NH_2(5μ, 4×250mm); Eluent, CH_3CN-H_2O(83:17); Flow rate, 1.2ml/min; Detecter, UV 210nm
(I) Stevioside (Ⅱ) Rebaudioside A (Ⅲ) Rebaudioside C

Table 2. Contents of Stevioside and Rebaudioside A and Total Stevia Component in Natural Sweetener Products

No.	Stevioside (I)	Rebaudioside A (Ⅱ)	I+II	Total Stevia Component
1	2.16%	1.66%	3.82%	4.94%
2	4.20	3.59	7.79	8.59
3	4.77	1.05	5.82	8.06
4	0.47	0.18	0.65	1.23
5	4.63	1.81	6.44	8.83
6	3.81	0.94	4.75	7.48
7	1.57	0.96	2.53	4.32
8	2.36	0.82	3.18	5.00
9	2.59	0.91	3.50	5.79
10	2.03	1.46	3.49	5.31
11	0.60	0.26	0.86	1.38

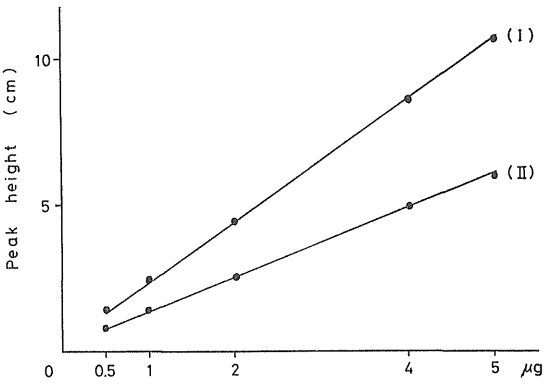


Fig. 4 Calibration Curves of Stevioside (I) and Rebaudioside (Ⅱ) by HPLC

今回我々が行った定量結果から, Stve と Reb A の含量合計の総 Stev 含量に対する割合は52.8～90.7%とバラツキがあった.

ま と め

市販天然甘味料製剤11種についてステビア成分の分析を行い次の結果が得られた.

1. すべての製剤から, Stev, Reb A, Reb B, Reb C および Stev-b の5成分が確認された.

2. 総 Stev 含量は1.23～8.83%, 主甘味成分である Stev および Reb A の含量はそれぞれ0.47～4.77%, 0.18～3.59%であった.

3. 主甘味成分の含量合計は0.65～7.79%で, 総 Stev 含量に対する割合は52.8～90.7%とバラツキが見られ, 製剤に使用されているステビア甘味料の品質に大きな差のあることが認められた.

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54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, その概要は日本食品衛生学会第39回学術講演会1980年5月で発表した.)

文 献

1) Sakamoto, I., Yamasaki, K., and Tanaka, O.: *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3437, 1977
2) Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K., and Tanaka, O.: *Phytochemistry*, **15**, 981, 1976
3) Sakamoto, I., Yamasaki, K., and Tanaka, O.: *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 844, 1977
4) Hashimoto, Y., and Moriyasu, M.: 生薬学雑誌, **32**, 209, 1978
5) 坂本征則, 神田博史, 村上国子, 田中 治: 薬学雑誌, **95**, 1507, 1975
6) 中嶋 巌, 広門雅子, 溝入 茂, 遠藤英美: 東京衛研年報, **30-1**, 153, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 185-189, 1980

東京湾産アサリ貝殻中の微量元素について（第2報）

安野哲子*, 荻野周三*, 小野綾子*, 大畠敏子*,
遠藤英美*

Contents of Trace Elements in Shells of Short-Necked Clam in Tokyo Bay (II)

TETSUKO YASUNO*, SHUZO OGINO*, AYAKO ONO*, TOSHIKO OHATA*
and FUSAYOSHI ENDO*

Arsenic, total mercury, cadmium, chromium, lead, copper, zinc, manganese, iron, magnesium and strontium in the shells of short-necked clams, collected at 5 points around the Tokyo Bay from 1976 to 1979 (87 samples) were determined by atomic absorption spectrophotometry in order to study the regional differences of the trace element contents. As regards arsenic, total mercury, cadmium, chromium, lead, copper and zinc, the mutual relations of these contents in shells with those in the sea sediment and those in soft tissues of short-necked clam were also discussed.

The study revealed that the amounts of cadmium, chromium, lead, copper, zinc, manganese, iron and strontium in the shells sampled in the western part of the Tokyo Bay were significantly higher than those in the shells samples in the eastern part. There were no marked regional differences in the contents of total mercury and magnesium respectively. The significant positive correlations were observed between the amounts of cadmium, chromium, copper and zinc in shells and those in the sea sediment. The significant positive correlations of arsenic and copper contents in shells with those in soft tissues were also observed.

Keywords : Tokyo Bay, short-necked clam, shell, trace element

緒　言

貝殻の主成分は炭酸カルシウムと，硬タンパク質の一種のコンキオリンであるが，ほかに多数の微量元素が含まれている[1]．そしてこの微量元素量は，生物種や生理機能などによっても影響されるが，貝の棲息環境を反映するものである．

著者らは，東京湾の各所に棲息するアサリを対象にして，その貝殻中の微量元素（ヒ素，水銀，カドミウム，クロム，鉛，銅，亜鉛，マンガン，鉄，マグネシウム，ストロンチウム）を定量し，棲息環境（底質）との関連性等について検討した．

調査期間および地点

調査は1976年から1979年まで4年間継続して行ない，試料のアサリは，各年とも5月から9月までの5カ月間，原則として毎月1回採取した．

採取地点は，大井ふ頭，葛西沖三枚洲，千葉中央港，木更津人工島，富津公園（以下順に大井，三枚洲，千葉，木更津，富津と略す．図1）の5カ所である．

分析方法

試料　前報[2]と同様に，可食部を取り除いたあとの貝殻を水洗し，風乾したのち，各採取分ごとに約100gの粉末試料(100メッシュ以下)を調製して分析に供した．試料数は87である．なお，採取したアサリの殻長は25～50mmで，各採取地点とも1回の採取量は，風乾後の貝殻重量にして約700gであった．

ヒ素　乾式灰化後，還元気化させ，原子吸光法で定量した．

水銀　加熱気化により総水銀として，原子吸光法で定量した．

カドミウム，クロム，鉛，銅　乾式灰化後，DDTCとのキレートをつくり，このMIBK抽出液を原子吸光法で測定した．

亜鉛，マンガン，鉄，マグネシウム，ストロンチウム　乾式灰化後，硝酸酸性溶液とし，原子吸光法で定量した．

結果と考察

貝殻中の微量元素量　貝の採取地点は，図1でも明ら

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

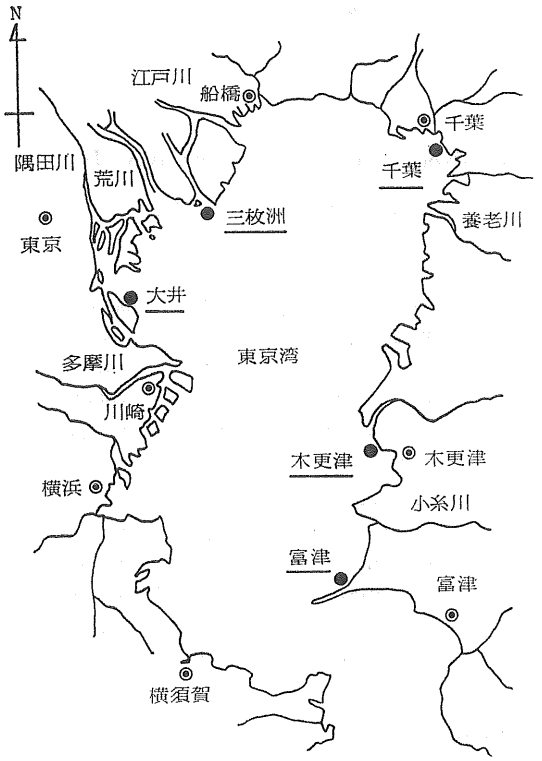


図 1. 試料の採取地点

かなように，湾西部から湾東部にかけて，東京湾沿岸のほぼ全域を代表しており，本調査で採取したアサリの貝殻中の微量元素量は，東京湾に棲息している全アサリの貝殻中のそれを包含するものと考える．表1にその分析結果を示したが，今回定量した11元素は，その含量から，ストロンチウム＞マグネシウム＞鉄＞マンガン＞亜鉛＞銅＞（鉛，クロム，カドミウム，水銀，ヒ素）のように表わすことができる．最も含量の多かったストロンチウムで 10^3ppm レベル，鉛，クロム等，その汚染が問題視されている元素については，それぞれ1ppm 以下という結果が得られている．

また，年度ごとに各元素量にはそれぞれ若干の変動がみられるが，増加，あるいは減少といった顕著な傾向は認められず，東京湾全体としては，調査期間中それぞれのレベル内で平衡状態にあったと言えよう．

採取地点別元素分布　採取地点別の分析結果を表2に示した．

この採取地点ごとの元素含量をより見やすい形で表現するため，多変量解析の一手法である主成分分析[8]を試みた．その結果，第一主成分（Z_1）で50%，第二主成分（Z_2）までで87%，第三主成分（Z_3）までで95%という累積寄与率を得，11元素の分布の約9割が，第一，第二の二つの主成分で表現可能であった．図2に主成分分析による採取地点の散布図を，図3には各元素の因子負荷量を示した．

図2および図3を対比させることにより，大井，三枚洲から千葉にかけて棲息しているアサリの貝殻中には，鉄，亜鉛，ストロンチウム，カドミウム，クロム，マンガン，銅，鉛が多く，ヒ素は三枚洲と木更津産の，そして，マグネシウムと水銀は木更津産のアサリ貝殻中に多いことが推察された．

さらに，この含量差が有意か否かを検べた結果，鉄，亜鉛，ストロンチウム，カドミウム，クロム，マンガン，銅，鉛は，大井で多く富津で少ないといった西高東低型を示し，ヒ素は，千葉で少なくその両側で多いという分布傾向を示していることが明らかとなった．マグネシウ

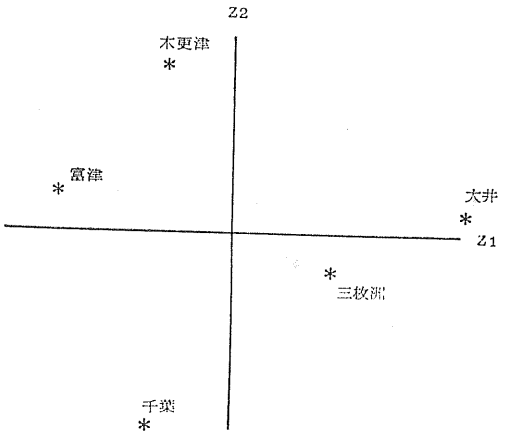


図 2. 主成分分析による採取地点の散布図

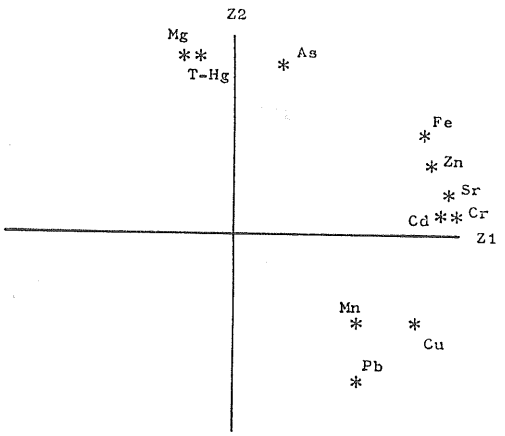


図 3. 主成分分析による各元素の因子負荷量

表 1. 東京湾産アサリの貝殻中微量元素含量 (ppm)

年		As	T-Hg	Cd	Cr	Pb	Cu	Zn	Mn	Fe	Mg	Sr
1976 (n=22)	Range	0.03—	ND—	ND—	ND—	ND—	0.7—	0.9—	7—	12—	135—	1300—
		0.21	0.223	0.026	0.11	0.64	2.1	6.8	41	64	185	1860
	Mean	0.09	0.034	0.009	0.02	0.18	1.2	3.7	16	33	157	1496
	S.D.	0.051	0.0610	0.0076	0.036	0.204	0.41	2.05	8.2	15.7	13.2	148.0
1977 (n=23)	Range	0.03—	0.003—	ND—	ND—	ND—	0.8—	1.1—	8—	13—	127—	1394—
		0.15	0.064	0.064	0.18	0.80	1.5	7.6	34	124	172	1762
	Mean	0.11	0.014	0.027	0.06	0.28	1.1	3.2	18	42	151	1566
	S.D.	0.030	0.0126	0.0218	0.049	0.238	0.22	1.48	7.2	27.0	11.7	98.2
1978 (n=21)	Range	0.02—	0.001—	0.020—	ND—	ND—	0.7—	1.8—	5—	10—	133—	1325—
		0.13	0.021	0.077	0.17	0.62	2.0	7.5	31	136	161	1843
	Mean	0.09	0.007	0.046	0.06	0.26	1.2	4.2	13	45	147	1534
	S.D.	0.029	0.0050	0.0157	0.045	0.157	0.39	1.67	7.3	36.5	8.4	165.7
1979 (n=21)	Range	0.03—	0.002—	ND—	0.01—	0.06—	0.6—	1.4—	4—	10—	122—	1275—
		0.20	0.344	0.082	0.14	0.90	2.1	19.2	27	73	166	1660
	Mean	0.09	0.038	0.022	0.06	0.27	1.1	6.0	9.4	37	143	1454
	S.D.	0.047	0.0999	0.0224	0.031	0.202	0.35	4.68	5.47	17.7	11.6	114.0
1976—1979 (n=87)	Range	0.02—	ND—	ND—	ND—	ND—	0.6—	0.9—	4—	10—	122—	1275—
		0.21	0.344	0.082	0.18	0.90	2.1	19.2	41	136	185	1860
	Mean	0.09	0.023	0.026	0.05	0.25	1.2	4.3	14	39	150	1514
	S.D.	0.041	0.0587	0.0219	0.044	0.203	0.35	2.90	7.7	25.5	12.5	137.9

表 2. 採取地点別分析結果 (1976—1979年, ppm)

採取地点		As	T-Hg	Cd	Cr	Pb	Cu	Zn	Mn	Fe	Mg	Sr
大井 (n=20)	Range	0.04—	0.001—	ND—	ND—	ND—	1.0—	1.9—	5—	31—	122—	1435—
		0.21	0.332	0.082	0.18	0.75	2.1	12.8	41	136	185	1860
	Mean	0.09	0.024	0.040	0.08	0.36	1.5	5.5	15	69	149	1669
	S.D.	0.040	0.0726	0.0213	0.063	0.201	0.27	2.49	7.6	32.1	15.3	118.1
三枚洲 (n=16)	Range	0.03—	0.003—	0.004—	ND—	0.02—	0.9—	1.9—	6—	13—	129—	1420—
		0.15	0.038	0.077	0.10	0.90	2.1	7.0	34	62	170	1729
	Mean	0.10	0.012	0.036	0.06	0.27	1.2	4.6	22	35	147	1586
	S.D.	0.030	0.0086	0.0213	0.027	0.209	0.35	1.42	8.6	12.2	12.0	92.2
千葉 (n=10)	Range	0.02—	0.002—	ND—	ND—	0.08—	1.0—	2.1—	11—	10—	135—	1300—
		0.08	0.023	0.036	0.11	0.64	2.0	6.6	23	17	155	1553
	Mean	0.05	0.009	0.011	0.04	0.34	1.3	3.3	17	14	146	1383
	S.D.	0.023	0.0080	0.0121	0.034	0.199	0.35	1.51	3.5	2.7	6.7	81.4
木更津 (n=20)	Range	0.05—	ND—	ND—	ND—	ND—	0.6—	0.9—	7—	21—	131—	1360—
		0.20	0.344	0.060	0.14	0.80	1.8	19.2	25	64	178	1613
	Mean	0.11	0.034	0.017	0.05	0.11	1.0	4.7	13	42	154	1462
	S.D.	0.039	0.0785	0.0215	0.040	0.182	0.32	3.79	6.5	12.0	13.0	77.7
富津 (n=21)	Range	0.03—	ND—	ND—	ND—	ND—	0.7—	0.9—	4—	10—	124—	1275—
		0.19	0.223	0.062	0.09	0.43	1.1	16.1	12	39	168	1519
	Mean	0.09	0.027	0.019	0.03	0.20	0.9	2.9	8	23	150	1423
	S.D.	0.042	0.0595	0.0161	0.025	0.138	0.13	3.16	2.7	7.0	11.1	72.4

ムと水銀含量には，採取地点による有意の差は認められなかった．

底質との相関性 当所乳肉衛生研究科の堀井らは，われわれとの共同調査において，アサリの採取地点の底質および可食部中の重金属類（ヒ素，水銀，カドミウム，クロム，鉛，銅，亜鉛，コバルト）を分析しており，底質については，ヒ素以外の重金属濃度は，湾西部で高く湾東部で低い西高東低型の傾向を示していると報告している[4-7]．また，一都三県公害防止協議会による東京湾の総合調査の結果でも，底質中の重金属類（ヒ素，水銀，カドミウム，クロム，鉛）は，西高東低型であると報告されている[8-10]．そしてこの傾向は，湾周辺部の開発，発展に伴う東京湾の汚染度を反映するもので，西高東低型を示すのは，湾東部の千葉県側の開発が比較的近年に行なわれはじめたのに対し，湾西部には東京という大都市と，明治以来発展し続けてきた京浜工業地帯とが存在するためであると考えられている．われわれが貝殻について分析した結果，貝殻中の微量元素量にもまた，この底質と類似した分布傾向がみられたことから，東京湾に棲息しているアサリが，その汚染の影響をこうむっていることは明らかである．

そこで，貝殻と底質間の関係をさらに詳細に把握するため，前述の堀井らとわれわれとの共通分析元素について相関係数を算出したところ，カドミウム，クロム，銅，亜鉛に，弱いながらも相関性のあることが認められた（表3）．この相関係数は，分析方法を統一すること等によりもっと高い値となることが予想され，従って，一部の元素については，貝殻から底質中のその量をある程度推測することが可能であると考える．そしてこのことは，もし保存状態のよい化石貝殻が得られれば，過去にさかのぼってその時代の底質の状態を観察することができ，現在の汚染状況との比較が可能であることを示唆するものである．

可食部中の微量元素量との比較 アサリの可食部中の微量元素を定量することは，それを食した時の安全性を評価する上で重要なことであるが，腐敗しやすいため，搬入や保存に困難を伴うのが現実である．そこで，比較的そのような心配のない貝殻から可食部中の微量元素量が推測可能か否かを検討した．

堀井ら[4-7]との共通分析元素について，貝殻と可食部中の含量比を表4に，相関係数を表5に示した．

貝殻と可食部中の含量比を平均値でみると，可食部よりも貝殻中に多かった元素は鉛で，可食部の約2倍であった．水銀と銅は，可食部と貝殻の両方にほぼ同じ割合で存在した．ヒ素，カドミウム，クロム，亜鉛は，いずれも可食部より貝殻の方に少なく，最低のヒ素で，可食部の約1/10の量であった．

つぎに貝殻と可食部間の相関性であるが，ヒ素と銅に

表 3. 貝殻と底質間の相関係数

	As	T-Hg	Cd	Cr	Pb	Cu	Zn
r	—0.00	0.09	0.38*	0.42*	0.17	0.30*	0.27*

n =85, * P<0.05

表 4. 貝殻および可食部中の微量元素含量比（貝殻／可食部）

	As	T-Hg	Cd	Cr	Pb	Cu	Zn
Range	0.01—	0—	0—	0—	0—	0.24—	0.05—
	0.17	6.89	2.80	7.00	7.27	2.50	1.11
Mean	0.06	0.79	0.48	0.51	2.14	1.02	0.25
S.D.	0.029	1.492	0.493	1.244	2.324	0.385	0.195

n =87

表 5. 貝殻と可食部間の相関係数

	As	T-Hg	Cd	Cr	Pb	Cu	Zn
r	0.26*	0.04	—0.10	0.11	—0.18	0.30*	0.18

n =85, *P<0.05

のみ弱いながら相関性のあることが認められた．前述の底質の場合と同様に，これらの元素に関しては，貝殻から可食部中のその量がある程度推測可能であると考える．

摘　要

1976年から1979年までに東京湾の大井，三枚洲，千葉，木更津，富津で採取したアサリの貝殻87試料について，ヒ素，水銀，カドミウム，クロム，鉛，銅，亜鉛，マンガン，鉄，マグネシウム，ストロンチウムの11元素を定量し，採取地点別の元素分布を把握するとともに，底質および可食部中の元素量との関連性を検討した．

その結果，貝殻中の水銀とマグネシウム含量には採取地点による有意の差は認められなかったが，カドミウム，クロム，鉛，銅，亜鉛，マンガン，鉄，ストロンチウムが，湾西部で多く湾東部で少ないといった西高東低型を示し，ヒ素が，湾奥部の千葉で少なくその両側で多いという分布傾向を示していることが明らかとなった．そしてこの分布傾向は底質のそれと類似しており，湾周辺部の開発，発展に伴う東京湾の汚染度を反映しているものと考えられる．さらに貝殻と底質間では，カドミウム，クロム，銅，亜鉛にそれぞれ弱い正の相関が認められ，可食部との間では，ヒ素と銅に弱い正の相関が認められた．

謝辞　本調査にあたり，試料を採取された都衛生局食品監視課の皆様に深謝致します．

文　献

1) 太田直一：*Gypsum & Lime*, 146, 41, 1977
2) 安野哲子，荻野周三，小野綾子，大畠敏子，遠藤英美：東京衛研年報，28-1，156，1977
3) 中島　淳，鎗田　功，小林節子，小倉久子：水処理技術，17，721，1976
4) 東京都衛生局食品監視課麹町班：昭和51年度先行調査報告，1977
5) 東京都衛生局食品監視課麹町班，荏原班：昭和52年度先行調査報告，1978
6) 東京都衛生局食品監視課麹町班，荏原班：昭和53年度先行調査報告，1979
7) 東京都衛生局食品監視課麹町班，荏原班：昭和54年度先行調査報告，1980
8) 一都三県公害防止協議会：昭和46年度水質汚濁共同調査報告書，1972
9) 一都三県公害防止協議会：昭和47年度水質汚濁共同調査報告書，1973
10) 一都三県公害防止協議会：昭和48年度水質汚濁共同調査報告書，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 190-194, 1980

ＡＳ樹脂製器具および容器からのアクリロニトリルモノマーの移行

吉田令子*, 渡辺悠二*, 佐藤憲一*, 遠藤英美*

Migration of Acrylonitrile Monomer from AS Resin Food Container

REIKO YOSHIDA*, YUJI WATANABE*, KENICHI SATO* and FUSAYOSHI ENDO*

A total of 29 AS resin food containers were investigated for the migration of residual Acrylonitrile (AN) monomer into the food simulating solvents (water, 4% acetic acid, 20% ethanol, n-heptane). AN monomer was determined by gas chromatography with NP detector (lower level : 2pg).

It was found that migrated AN monomer did not reach the equilibrium at 40° in 10 days and was determined to be 2–233 pg/m*l* (mean 62 pg/m*l*) in water, 12–168 (75) in 4% acetic acid, 16–271 (121) in 20% ethanol, 4–170 (37) in n-heptane. None of the samples showed migration of AN monomer exceeding 50 pg/m*l* within 24 hours except for 1 sample (20% ethanol).

Therefore, it is considered undesirable that food is stored in AS resin containers for a long period of time.

Keywords : acrylonitrile monomer, AS resin, migration

緒　言

1977年 FDA（米国食品医薬品局）は，アクリロニトリル・スチレン（以下ＡＳと略す），アクリロニトリル・ブタジエン・スチレン（以下ＡＢＳと略す）共重合体を含む飲料用アクリロニトリル（以下ＡＮと略す）樹脂製容器の使用を禁止し[1]，すべての食品用ＡＮ系樹脂製容器のＡＮモノマー移行規制値を0.05μg/m*l* とした[2]．また西ドイツ プラスチック取引推薦基準では従来の0.05μg/m*l* から 0.01μg/m*l* にさげる[3] など欧米各国は移行規制（ヨーロッパの大半は0.3μg/m*l*）を実施しているのに対して，現在わが国ではＡＮモノマーに対する規制は残留量，移行量ともに行なわれていない．ＡＮモノマーは水への溶解度が８％と高く，毒性も強いので，微量の移行も問題である．われわれは昨年市販 AS, ABS 製品中の残留ＡＮモノマー量の実態調査を報告[4] したが，その結果かなり高濃度のＡＮモノマー（平均95μg/m*l*，最高376μg/m*l*）が検出された．そこで市販AS 製品中の残留ＡＮモノマーの食品移行性について４種の類似溶媒を用い検討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，小売店などから入手したＡＳ製食品用器具容器計29種．

使用状況別の内訳：飲食用器具（直接，口に接触するもの）２種，調理用器具（短時間，食品と接触するもの）12種，保存用容器（長時間，食品と接触する可能性のあるもの）15種．

2. **装置**　パーキンエルマーシグマ３Ｂ型ガスクロマトグラフ（窒素・りん検出器付き）

3. **試薬・試液**　1）蒸留水　2）4%酢酸　3）20%エタノール　4）n-ヘプタン　1）2）3）4）については，必要があれば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を使用した．5）ＡＮ：市販のＡＮ（98%）を用いた．

4. **試験法**　1）**試験溶液の調製**　蒸留水，４%酢酸，20%エタノールを40°に加温し，それぞれの液を試料容器に注ぎ密封して40°に保ちながら１，２，24時間，５，10日間放置したものを試験溶液とした．n-ヘプタンは室温で同様の操作を行なった．

2）**ＡＮ標準溶液の調製**　ＡＮ25μ*l*をとり，蒸留水，４%酢酸，20%エタノール，*n*-ヘプタンに溶かしそれぞれ全容25m*l* とし標準原液（800μg/m*l*）とした．この原液を0.05, 0.1μg/m*l* にそれぞれの液で希釈したものを標準溶液とした．

3）**ＡＮモノマーの定量**　それぞれの試験溶液について次の条件でＧＣを行い，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２pg であった．

ＧＣ操作条件　蒸留水，４%酢酸の場合

カラム：10% PEG 600/Chromosorb WAW 80/100 mesh，ガラス製内径2mm×1.5m; 温度：カラム槽80°,

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

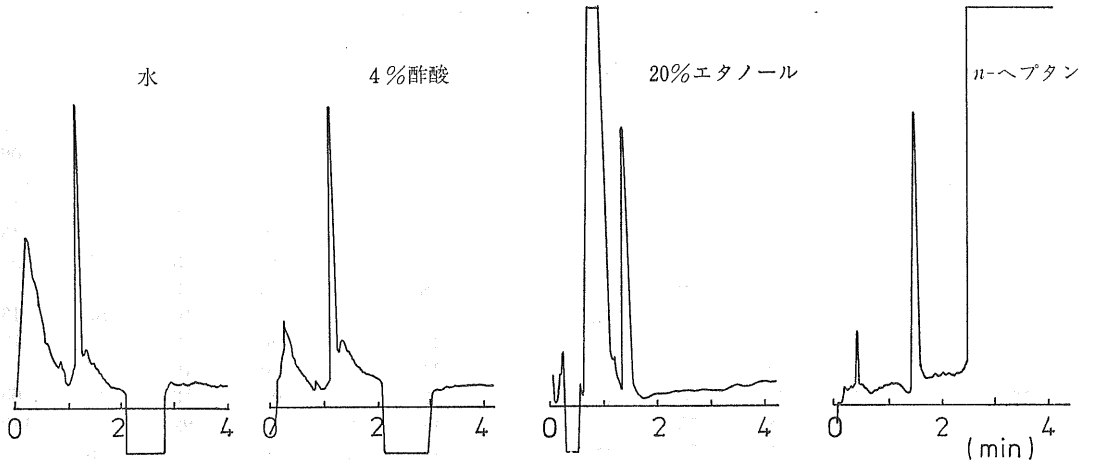


図 1. 各溶媒におけるANモノマーのガスクロマトグラム

注入口 200°, 検出器 250°, キャリヤーガス：N_2 25ml/min; 保持時間：1.2分.

20%エタノール, n-ヘプタンの場合

カラム：Chromosorb 101 80/100mesh; 温度：カラム槽150°; 保持時間1.5分 他は前記に同じ.

PEG 600 はピークの鋭さ, Rt の短さにおいてChromosorb 101 より優れているが, エタノールのピーク, n-ヘプタンのテーリングがANのピークと重なるため20%エタノール, n-ヘプタンの場合は Chromosorb 101 を使用した.

結果と考察

AS製品中の残留ANモノマー量を表1, 4種の食品類似溶媒へのANモノマー移行量を表2, このデータをまとめたものを表3に示した. なお移行量数値は試料の溶媒に接触する部分の表面積1cm²当り溶媒2mlの割合になるよう換算したものである. 放置温度と時間はヨーロッパの多くで用いられている条件 (40°, 10日) を最長期間として採用した.

残留量は12～240μg/ml(平均94μg/ml) で, 飲食用器具は平均39μg/ml と少いが, 調理用器具は 94μg/ml, 保存容器は 102μg/ml と米国や西ドイツの規制値 (80μg/ml と5μg/ml) を上わまわっていた.

図2に示したように移行量は時間とともにほぼ直線的に増加し, 各溶媒とも10日間では平衡に達しなかった. 室温で170～200日間放置しても平衡に達しないという報告[5] もあるので, 長時間貯蔵する場合表1の値より多くなると考えられる.

残留量と移行量の間には, ある程度の相関が認められた. 相関係数は水0.67, 4%酢酸0.70, 20%エタノール 0.72, n-ヘプタン0.83であった. 20% エタノールの場

表 1. 市販製品中 (材質) の残留ANモノマー

	No.	品名	AN (μg/ml)
飲食用器具	1	コップ	56
	2	〃	22
調理用器具	3	レモン絞り器	142
	4	メジャーカップ	134
	5	〃	134
	6	メジャーボール	34
	7	レモン絞り器	80
	8	油ひき器	138
	9	〃	50
	10	おろし器	46
	11	レモン絞り器	124
	12	うす切り・おろし器	106
	13	おろし器	108
	14	エッグスタンド	28
保存用容器	15	密封容器	152
	16	〃	18
	17	〃	86
	18	〃	136
	19	〃	148
	20	〃	146
	21	〃	144
	22	〃	90
	23	冷蔵庫用水入れ	98
	24	密封容器	60
	25	〃	84
	26	粉入れ容器	54
	27	調味料入れ	62
	28	〃	240
	29	バターケース	12

表 2. 市販製品から各溶媒への移行ＡＮモノマー

	No.	1	2時間	1	5	10日
水	1	nd	nd	3	3	16
	2	nd	nd	1	9	14
	3	nd	nd	2	2	5
	4	nd	1	15	71	124
	5	nd	1	8	36	66
	6	nd	nd	nd	3	18
	7	nd	nd	1	25	25
	8	nd	nd	2	2	4
	9	nd	nd	4	21	32
	10	nd	nd	3	7	7
	11	3	4	4	7	7
	12	nd	1	13	64	76
	13	3	3	18	18	54
	14	1	2	2	12	18
	15	5	7	36	107	160
	16	nd	nd	3	7	12
	17	1	2	12	18	64
	18	1	2	11	14	62
	19	4	5	28	82	150
	20	7	9	47	140	233
	21	3	5	24	38	130
	22	1	2	6	13	25
	23	3	4	17	51	68
	24	3	7	22	48	115
	25	3	3	16	40	58
	26	2	3	7	13	14
	27	nd	nd	6	22	38
	28	3	4	29	98	206
	29	1	1	1	1	2
20%エタノール	1	nd	nd	7	19	35
	2	nd	nd	7	12	12
	3	nd	1	19	95	101
	4	nd	2	20	86	118
	5	nd	nd	12	73	103
	6	nd	2	16	16	19
	7	nd	nd	10	20	36
	8	nd	nd	18	78	145
	9	nd	1	7	40	64
	10	nd	1	4	14	33
	11	nd	nd	26	26	80
	12	nd	2	16	16	27
	15	10	15	61	171	271
	16	nd	nd	4	11	16
	17	nd	2	14	61	84
	18	1	2	16	66	123
	19	3	6	33	113	183
	20	4	8	45	155	254
	21	5	6	34	111	177
	22	nd	nd	6	18	34
	23	nd	2	21	70	124
	24	8	11	40	110	189
	25	nd	1	6	32	68
	26	nd	1	12	50	80
	27	nd	nd	7	28	66
	28	nd	nd	30	102	204

	No.	1	2時間	1	5	10日
4%酢酸	1	nd	nd	3	11	26
	2	nd	nd	3	10	17
	3	nd	2	13	57	106
	4	nd	nd	6	13	121
	5	nd	nd	4	8	46
	6	nd	2	5	20	45
	7	nd	nd	5	32	57
	8	nd	nd	3	8	18
	9	1	1	16	52	113
	10	nd	nd	2	7	12
	11	nd	nd	16	66	97
	12	nd	nd	12	48	65
	15	3	5	23	51	149
	16	nd	nd	2	5	13
	17	1	1	12	33	69
	18	1	1	11	32	68
	19	4	4	25	81	133
	20	4	5	31	98	168
	21	4	6	32	93	141
	22	nd	nd	3	15	23
	23	nd	nd	14	56	86
	24	5	5	28	79	79
	25	nd	nd	10	37	56
	26	nd	nd	9	35	52
	27	nd	nd	5	24	41
	28	nd	2	19	103	153
n-ヘプタン	1	nd	nd	nd	2	5
	2	nd	nd	2	4	9
	3	13	14	14	21	39
	4	nd	2	18	79	170
	5	nd	nd	10	49	101
	6	nd	nd	3	11	20
	7	nd	nd	2	9	9
	8	nd	nd	2	9	18
	9	1	1	15	59	130
	10	nd	nd	nd	3	4
	11	nd	nd	9	19	20
	12	nd	nd	3	8	14
	15	5	6	12	34	63
	16	nd	nd	2	8	18
	17	nd	nd	4	20	35
	18	nd	nd	2	7	14
	19	nd	nd	2	13	25
	20	nd	nd	16	59	113
	21	nd	nd	5	13	29
	22	nd	nd	1	3	7
	23	nd	nd	2	8	16
	24	nd	nd	3	11	25
	25	nd	nd	2	6	12
	26	nd	nd	2	7	17
	27	nd	nd	nd	3	8

(pg/ml)

表 3. 移行ANモノマーの分布

	計	0—24	25—50	51—99	100—199	200—300 (pg/ml)
水	29	11	4	7	5	2
4 % 酢 酸	26	5	4	9	8	0
20 % エタノール	26	2	6	6	9	3
n − ヘプタン	25	15	5	1	4	0

40°, 10日

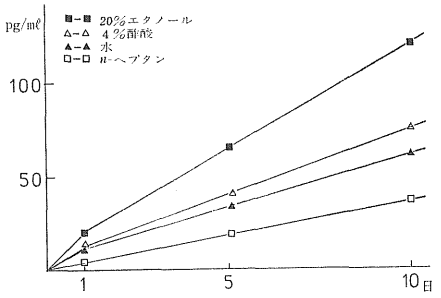


図 2. 各溶媒におけるAN移行量（平均値）の経時変化

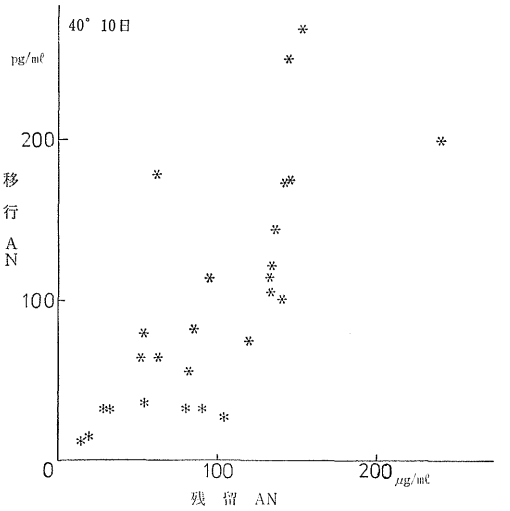


図 3. 残留ANと20%エタノールにおける移行ANの相関

合を図3に示した．西ドイツにはAS，ABS 樹脂について水における比例的な相関の報告[6]がある．

材質中のANモノマーの移行率は40°，10日間で水0～0.192%（平均0.061%），4%酢酸0.013～0.226%(0.080%)，20%エタノール0.025～0.315%（0.102%），*n*-ヘプタン0.008～0.127%（0.034%）であった．

移行量は1～2時間では溶媒による差は認められないが1日以降では，水と4%酢酸はほぼ同等で，20%エタノールは5%の危険率で有意に多く，*n*-ヘプタンは少なかった．これはANは極性が強いため水系の溶媒に移行しやすく，*n*-ヘプタンには比較的溶けにくいことと，エタノールは他の3種の溶媒に比べAN樹脂を膨潤させる作用が大きいので，ANが溶出しやすくなっているためと考えられる．

40°，10日間で20% エタノールにおける移行量の平均値をみると飲食用器具46pg/ml，調理用器具79pg/ml，保存用容器134pg/ml であり，食品と長く接触するようなものから多く移行しており，他の3種の溶媒も同じ傾向を示している．

ヨーロッパの大半の規制値である 0.3μg/ml を超えたものはなかった．米国の規制値0.05μg/mlを超えたものは水14検体（48%），4%酢酸17検体（65%），20%エタノール18検体(69%)，*n*-ヘプタン5検体(20%)あったが24時間の移行量は20%エタノールの1検体を除きすべて50pg/ml 未満であった．また西ドイツの規制値 0.01μg/ml に適合するものは水4検体（14%），*n*-ヘプタン5検体（20%）のみであり，24時間の移行量でも水16検体(55%)，4%酢酸12検体（46%），20%エタノール8検体(31%)，*n*-ヘプタン19検体（76%）であった．しかし残留量が50μg/ml未満のものから50pg/ml以上移行したものはなかった．したがって短時間の使用にはさしつかえないが，長期にわたり食品を保存することは問題があるとおもわれる．

ま と め

食品に接触する市販AS製品からの残留ANモノマーの食品移行性について4種の類似溶媒を用い検討を行なった．その結果，試験期間内では平衡に達しなかったこと，40°，10日間で米国の規制値 0.05μg/ml を超えたものが水48%，4%酢酸65%，20%エタノール69%，*n*-ヘプタン20%あったこと，保存用容器の残留量，移行量が短時間接触のものに比べて多いことなどから長期間の使用には問題があると考えられる．

溶媒により移行量に差が認められ，20%エタノールに

多く水と4%酢酸は同程度であり*n*-ヘプタンは少なかった.

残留量と移行量には相関があり，50μg/m*l*以下のものからはいずれの溶媒でも50pg/m*l*以上の移行がなかったことから残留量により規制ができるものとおもわれる.

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感謝いたします.

文　献

1) FDA : *Chemical week*, 28, 22, 1977
2) Federal Register, 42, 13546, 1977
3) 西ドイツ連邦衛生公報, 20, 231, 1977
4) 吉田令子，渡辺悠二，佐藤憲一，遠藤英美：東京衛研年報, 30-1, 163, 1979
5) Petrova, L. I. Boikova Z. K. : *Plast Massy*, 12, 31, 1976
6) Eagleton S. D. : *Kunstst. Plast.*, 25, 33, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 195-198, 1980

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬による過酸化水素およびホルムアルデヒドの定量

渡辺悠二*, 佐藤憲一*, 吉田令子*, 遠藤英美*

Quantitative Analysis of Hydrogen Peroxide and Formaldehyde by the 2, 4-Dinitrophenylhydrazine Method

YUJI WATANABE*, KENICHI SATO*, REIKO YOSHIDA* and FUSAYOSHI ENDO*

Keywords: 過酸化水素 hydrogen peroxide, ホルムアルデヒド formaldehyde 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 2,4-dinitrophenylhydrazine

緒　言

過酸化水素（以下 H_2O_2 と略す）は食品添加物として，殺菌や漂白の目的で水産ねり製品やめん類など各種食品に使用されている．しかし，厚生省は昭和55年2月，この H_2O_2 について，毒性試験を行ったところ発がん性が認められたとして，これまで使用を認めていたかまぼこ，ゆでめんなどにあっては最終食品前に H_2O_2 は分解または除去されなければならない（食品中に残留してはならない）という告示を公布した[1]．これに関連し，一部の牛乳および清涼飲料水で行われている完全無菌充てん包装において，食品を充てんする直前に包装材を滅菌する目的で H_2O_2 水を使用しているため，都として当該食品中の H_2O_2 の残留について調査を行った．

一方，食品中の H_2O_2 の定量法としては一般にヨウ素法が行われているが，低濃度の試料には適さず，微量の定量法として，最近 3-メチル-2-ベンゾチアゾロン法が報告されている[2]．この定量法は，H_2O_2 をメタノール存在下カタラーゼ処理してホルムアルデヒド（以下 HCHO と略す）を定量的に生成させ，更にこの HCHO を3-メチル-2-ベンゾチアゾロンと反応させて生ずる呈色物質を比色し，H_2O_2 を定量する方法であるが，試料によっては試料液の濁り，着色や呈色の妨害などの問題があり，全ての試料には適用できない．そこで著者らは，この H_2O_2 の存在下メタノールから HCHO が定量的に生成されることを利用し，HCHO をガスクロマトグラフィー（以下GC法と略す）によって検出することにより食品中の H_2O_2 の定量を行うことを試みた．HCHOの定量は，従来水蒸気蒸留後アセチルアセトン法による比色法が行われ，GC法ではHCHOそのものの感度が低い（水素炎イオン化検出器に対して）ことからほとんど行われていない．しかし，HCHOのようなカルボニル化合物はヒドラジンと容易に反応してヒドラゾンを生成することは古くから知られており，種々のヒドラジン化合物がカルボニル化合物の確認試薬として用いられ，中でも2,4-ジニトロフェニルヒドラジンは広く用いられている[3]．そこで HCHO のヒドラゾンである HCHO-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン（以下 HCHO-DNPH と略す）のGC法による測定，次いで食品中の H_2O_2 の定量法を検討した．また本法を用いて，HCHO を原料とするメラミン樹脂およびフェノール樹脂製飲食器から移行する HCHO についても調査を行ったので合わせて報告する．

実験の部

1. 試料

1）衛生局環境衛生部獣医衛生課より送付されたM社製の紙パックを容器とした牛乳（5検体），清涼飲料水（5検体）および食品の替わりに水を詰めたもの（10検体）．

2）デパート，小売り店よりの買上げ品メラミン樹脂製飲食器（10検体）およびフェノール樹脂製飲食器（5検体）．

2. 試薬・試液および装置

1）四塩化炭素，メタノール，クロロホルム，*n*-ヘキサン：GC法で妨害ピークのないもの．その他断りのない試薬は特級品を使用した．

2）カタラーゼ液：カタラーゼ130万単位/m*l*（ベーリンガーマンハイム・山之内社製）の懸濁液を蒸留水で10倍希釈したもの．

3）0.02% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（和光製）0.2gを2N硫酸1*l*に加え撹拌して溶かし，次いでその200m*l*を分液ロートにとり，同量の *n*-ヘキサンを加え5分間振とうし，静置後上層の *n*-ヘキサンを捨てる．再度同量の *n*-

* 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

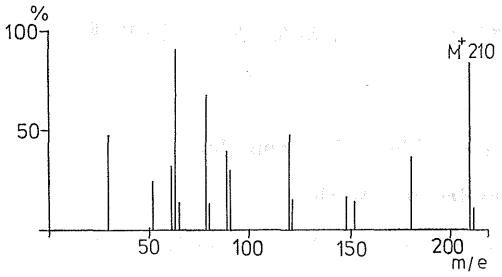


Fig. 1. Mass Spectrum of Formaldehyde-2, 4-dinitrophenylhydrazone

ヘキサンを加え同様の操作を行ったのち，四塩化炭素50 ml を加えて5分間振とうし，静置後下層の四塩化炭素を30倍濃縮し，GC法で妨害ピークのないことを確認したのち，上層液を試液として用いた．用時調製する．

4）装置：日立163形ガスクロマトグラフ（FID 付），島津 LKB-9000形ガスクロマトグラフ-質量分析計．

3. 標準品および標準溶液の調製

1）H_2O_2 および HCHO 標準溶液：H_2O_2水（30w/w %）およびホルマリン(35w/w%)を蒸留水で希釈し，各各0.1，0.4%液を調製する．各々その一部をとり，N/50チオ硫酸ナトリウム液で標定し，次いで蒸留水を用いて濃度が各々 0.1～10ppm となるように適宜調製した．

2）標準品 HCHO-DNPH および標準溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 1gにメタノール40ml および濃塩酸4ml を加え加熱して溶かす．流水で冷却後ホルマリン（35%）2ml を加え室温に約30分間放置する．析出するヒドラゾンをガラスろ過器でろ別し，結晶をメタノールと水の等量混合液で洗う．次いで得られたヒドラゾンを少量のメタノールに加熱して溶かし，冷後結晶が析出するまで水を加えて放置し，再結晶を行った．本品は黄橙色針状結晶，融点 166～167° でそのマススペクトルを図1に示す．

HCHO-DNPH 標準溶液：上記の標準品約 1.0g を精秤し，10ml のクロロホルムを加えて溶かしたのち，四塩化炭素を用いて正確に100ml とし標準原液とする．次いで濃度が10～50ppmとなるように四塩化炭素を用いて適宜調製した．

4. 試験法

1）食品中の残留 H_2O_2 の定量

(1) 試験溶液の調製 i 水の場合 試料10mlを正確に共栓三角フラスコにとり，メタノール2ml およびカタラーゼ液 40μl を加えて37°の恒温水槽で20分間加温する．ついでこの液を内容200ml の分液ロートに移し，0.02% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液 40ml を加える．分液ロートを2～3分間振とう後四塩化炭素 10ml を加え5分間激しく振とうする．静置後下層の四塩化炭素を予め四塩化炭素で潤した脱脂綿でろ過しクデルナ・ダニッシュ濃縮管に移す．再び四塩化炭素 10mlを加え同様の操作を2回繰り返す．合わせた抽出液を45°以下で約0.5 mlまで減圧濃縮したのち四塩化炭素で正確に 1ml とし，これを試験溶液とした．別に同じ試料についてカタラーゼ処理をしないものを同様に行い，これを空試験溶液とした．

ii 牛乳の場合 試料5mlを正確に共栓試験管にとり，メタノール 15ml を加え一昼夜冷所に放置したのちガラスろ過器でろ過し，ろ液に水を加えて正確に20ml とし，試料溶液とする．その4ml を正確に共栓三角フラスコにとり，水9ml およびカタラーゼ液40μl を加えて37° の恒温水槽で20分間加温する．以下，水の場合と同様の操作を行った．

iii 清涼飲料水の場合 試料 10ml を正確に共栓試験管にとり，メタノール 10ml を加え一昼夜冷所に放置したのちガラスろ過器でろ過し，ろ液に水を加えて正確に 20ml とし，試料溶液とする．その 4 ml を正確に共栓三角フラスコにとり，水6ml を加えたのち1%ホウ酸ナトリウム試液を用いて pH5～7 に調整する．次いでカタラーゼ液 40μl を加えて37°の恒温水槽で20分間加温する．以下，水の場合と同様の操作を行った．

(2) GC 法による HCHO-DNPH の定量

試験溶液について，次の条件でGC法を行った．標準品の保持時間は 4.9分で，その検量線は20～200ng の範囲で原点を通る直線性を示した．なお検出限度は H_2O_2 として水0.05ppm，牛乳および清涼飲料水 1.0ppm であった．

GCの操作条件 カラム：2% Silicone OV-17/Chromosorb W/AW-DMCS 60-80mesh，ガラスカラム 3ϕ ×2m；温度：注入口 250°，カラム恒温槽 210°；キャリヤーガス：窒素 28ml/min；注入量：4μl

2）メラミン樹脂およびフェノール樹脂製飲食器から溶出する HCHO の定量

(1) 試料溶液の調製

規格試験（厚生省告示第 434 号）に基いて行った．すなわち，試料に60°の水を満たし，60°の恒温槽内で30分間抽出したものを試料溶液とした．

(2) 定量

試料溶液20ml を正確に分液ロートにとり，0.02%2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液 40ml を加えて2～3分間振とう後，四塩化炭素 10ml を加え5分間激しく振とうする．以下，4．1)（1）の場合と同様の操作を行

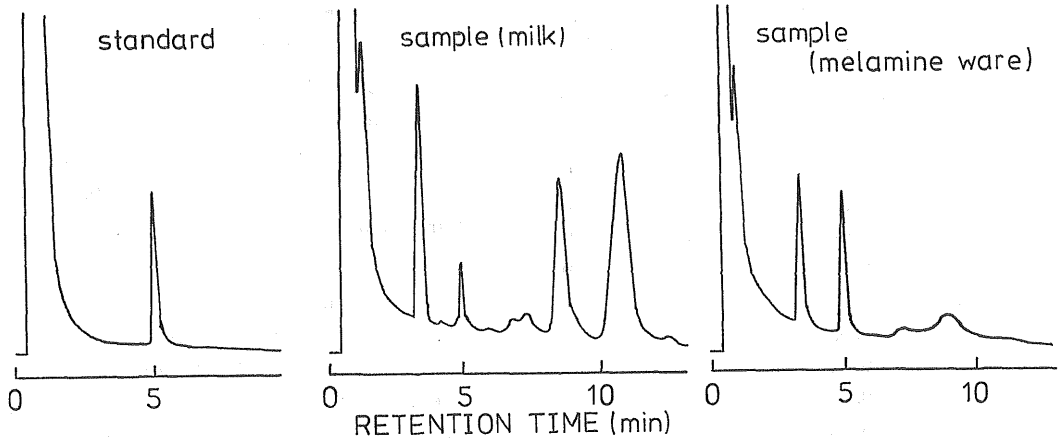


Fig. 2. Gas Chromatograms of Formaldehyde–2, 4–dinitrophenylhydrazone

った．なお検出限度は0.01ppmであった．

結果と考察

1. H_2O_2 および HCHO の定量法

1）カタラーゼ処理による HCHO の生成条件

この条件については石崎らが詳細に検討しており[2]，これを準用した．なお試料の前処理として，試料中の蛋白分などを除去するためメタノールを一定の割合で添加したが，メタノール量が増えるに従って回収率が低くなるので，カタラーゼ処理する時の試料溶液中のメタノールを3ml以下になるように調製した．なお空試験において，他の食品の場合著しい妨害ピークを示すものもあり本法を適用できないことがある．

回収率は，水の場合（試料溶液に H_2O_2 1μg 添加，以下同じ）98.4%，牛乳の場合96.4%，清涼飲料水の場合93.9%であった．

2）HCHO–DNPH 生成時における酸の影響

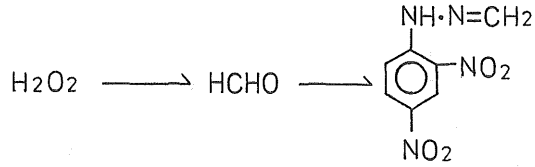
2,4–ジニトロフェニルヒドラジンはアルカリに非常に不安定だが酸には安定であり，またそのヒドラゾンの生成反応は酸を触媒とするので通常リン酸，硫酸，塩酸などの酸性溶液中で行われるが，脂肪族アルデヒド類やケトン類の場合２N硫酸が用いられている[3]．なおこの試液は，室温に長時間放置すると分解が進み，メタノール存在下四塩化炭素で抽出した時著しい妨害ピークを示す時があるので，用時調製し冷暗所に貯蔵する．

3）抽出溶媒

抽出溶媒は，回収率がよくかつＧＣ法で溶媒ピークのテーリングの少ないもの（保持時間が早くまた高感度分析を行うため）を選択した．その結果，四塩化炭素，クロロホルム，塩化メチレン，塩化エチレン，n–ヘキサンなどについて検討したところ，図２に示されるように（standard），四塩化炭素が最適でその抽出効率は各10ml，３回の操作で97.4%であった．なお試験溶液は冷暗所で１週間以上定安であった．

4）定量

本法では次のように反応が進み，また各物質の分子量比は下記のようになる．



m.w 34.01		m.w 30.01		m.w 210.16
1	:	0.88	:	6.18
1.13	:	1	:	7.00
0.16	:	0.14	:	1

図２のガスクロマトグラム（standard）は標準品40ngのものであるが，これは上式より H_2O_2 6.4ng，HCHO 5.6ng に相当する．従って本法において，例えば水試料（試料液量10ml）で図と同じピーク高を示した時，その濃度は0.16ppmとなる．

本法は，アセチルアセトン法に比べて検出感度が数十倍高く，また操作も容易であることから，HCHO を原料とする熱硬化性樹脂製品から溶出する微量 HCHO の定量法として十分に適用できる．

2. 食品中の H_2O_2 の残留について

紙パック詰牛乳および清涼飲料水各５検体，食品の替わりに水を詰めたもの10検体について H_2O_2 を定量した結果，全て検出限度（各々1.0，1.0，0.05ppm）以下であった．従ってこれらの食品においては，H_2O_2 による

Table 1. Amount of Formaldehyde into Water from Melamine and Phenolics Tableware

Melamine ware	HCHO ppm	Phenolics ware	HCHO ppm
1	0.13	1	0.02
2	0.04	2	0.03
3	0.06	3	0.02
4	0.05	4	0.03
5	0.05	5	0.01
6	0.02		
7	0.05		
8	0.03		
9	0.02		
10	0.02		

汚染（残留）はないものと思われる．

なお本食品は，次のような工程で製造されている．

ロール状で供給された包装紙(内面よりポリエチレン，アルミ箔，ポリエチレン，クラフト紙，ポリエチレンの5層で構成）は，充てん機にセットされると連続的に繰り出されたのち，H_2O_2 水（30%）の入った滅菌槽に下半分浸っているローラーにより内面のみ滅菌され，次いで2本のローラーの間を通って付着した H_2O_2 水が絞りとられ，続いて円筒状に成形され，ヒーターで約120°（内面の表面温度）に加熱されて残存する H_2O_2 は蒸発と分解によって除去される．次いで円筒状の中へ滅菌された食品が注入され，上部をヒートシールして製品ができ上る．

以上のように，H_2O_2 は絞りと加熱によって除去されており，充てん機が正常に作動していれば（異常時には自動的に停止する），H_2O_2 が残存することはないものと思われ，調査の結果もこれを裏付けていた．

3. メラミン樹脂およびフェノール樹脂製飲食器における HCHO の溶出について

メラミン樹脂製品10検体およびフェノール樹脂製品5検体についての結果を表1に示す．

この結果，全検体から HCHO の溶出が認められ，その濃度は0.01～0.13（平均0.04）ppmであった．また樹脂別にみると，メラミン樹脂製品では0.02～0.13（平均0.05）ppm，フェノール樹脂製品では0.01～0.03（平均0.02）ppmで，後者に比べて前者のほうが溶出しやすい傾向が認められたが，しかし，その溶出量はごく微量であり，最近の市販品にあっては HCHO の衛生上の問題はほとんどないものと考えられる．

ま と め

紙パック詰（無菌充てん包装）牛乳および清涼飲料水における H_2O_2 の定量法の検討および製品中の残留実態調査を行った．また本法を用いて，熱硬化性樹脂製品から溶出する HCHO の定量を試みた．

1. 食品中の H_2O_2 の定量は，メタノール存在下カタラーゼ処理して HCHO を生成させたのち，2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応して生じる HCHO-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンをGC法で定量することにより行った．本法は，操作性がよく，また回収率（牛乳96.4%，清涼飲料水93.9%，水98.4%）および検出限度（各々1.0，1.0，0.05ppm）も良好であった．

2. 紙パックを容器とした牛乳，清涼飲料水および食品の替わりに水を詰めたもの（計15検体）について調査した結果，H_2O_2 は全て検出されなかった．

3. メラミン樹脂およびフェノール樹脂製飲食器（計15検体）から溶出する HCHO を測定した結果（浸漬条件：水，60°，30分間放置），0.01～0.13(平均0.04)ppm の HCHO の移行が認められた．

文　献

1) 厚生省告示，昭和55年2月20日，第24号
2) 石崎睦雄，村上りつ子，上野清一ら：食衛誌，19，168（1978）
3) 船久保英一：有機化合物確認法 I，238（1967）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 199-203, 1980

市販果実飲料の化学的鑑定

牛尾房雄*, 西田甲子*, 深野駿一**, 関博麿*
道口正雄*

Chemical Evalution of Fruit Juice in Commercial Soft Drinks

FUSAO USHIO*, KOUKO NISHIDA*, SHUNICHI FUKANO**, HIROMARO SEKI*
and MASAO DOGUCHI*

Keywords：市販果実飲料 commercial soft drink, ベタイン betain, アミノ酸 amino acid

緒　言

著者らは1976年に果汁含有率100%の天然果汁，濃縮果汁を中心とした果実飲料について，ベタイン，遊離アミノ酸含有量および日本農林規格（以下 JAS と略す）を指標として，それら飲料の品質鑑定を行った[1]．その結果，すべての果実飲料について偽和または表示違反と判定されたものはなかった．

引続き，今回は果汁入り清涼飲料を中心として，前報と同じ試験を行い，市販果実飲料の品質評価を試みたので，その結果を報告する．

実験の部

(1) **試料**　昭和54年9月に都内において収集した果実飲料および清涼飲料43検体を供試した．その構成は表1に示したごとく濃縮果汁2検体，天然果汁2検体，果汁含有率50%の果汁飲料6検体，果汁含有率50%未満10%以上の果汁入り清涼飲料28検体そして清涼飲料6検体である．原料として用いられた果実は32検体がミカンと一部夏ミカンを混合したものであり，その他バレンシアオレンジ，ネーブルオレンジ，グレープフルーツである．またレモンを原料としたものは7検体である．

(2) **実験方法**　試験項目は前報と同じであり，JASに従い可溶性固形物，灰分，アミノ態窒素，酸，ビタミンCの定量を行い，さらにベタイン，遊離アミノ酸を加えた．試料の調製，分析方法もすべて前報と同様である．ただしアミノ酸の測定は今回，日立835型アミノ酸分析計を使い下記の条件で行った．

機種：日立835型アミノ酸分析計
カラム：2.6ϕ×400mm
樹脂：日立2619
溶出液：クエン酸リチウム緩衝液
流速：緩衝液　0.275ml/min，ニンヒドリン液0.300 ml/min

この条件で測定することにより，前回定量出来なかったアスパラギン，セリン，スレオニンとさらに果実中に多く存在することが知られているアミノ酪酸が定量出来た．

結果および考察

表1に可溶性固形分，灰分，アミノ態窒素，酸，ビタミンCおよびベタイン含有量を示す．表2に主要アミノ酸の構成比率および総含有量を示す．表3には JAS に記載されている果実飲料に関する上記検査項目の果実原料別の基準値[2]を示した．

(1) **可溶性固形分**　無糖のネーブル果汁入り清涼飲料の示度（2.4）は他の飲料の示度（10以上）より低い値であるが，この清涼飲料の基準値1.0より高く，可溶性固形分の値からではすべての果実飲料および清涼飲料は基準に適合していたといえる．

(2) **灰分**　10%ミカン果汁入り清涼飲料の1例を除いた全果実飲料が各々の適用すべき基準値を満足させていた．この例外の1試料は JAS 製品でありながら基準値以下を示したものである．

(3) **アミノ態窒素**　規格を適用すべき果実飲料の中で10%ネーブルオレンジ果汁入り清涼飲料の1例とレモン果汁入り清涼飲料の1例が各々の基準値2.0，2.5mgよりわずかに低い1.6，2.0mgを示した．果汁10%未満の清涼飲料は1～2mg前後の低い値を示した．

(4) **酸**　酸の規格適用を受ける濃縮果汁2例はいずれも基準値を満足させる値を示した．その他の試料では，その嗜好的目的のためにクエン酸などが添加されているので検出された酸濃度は果汁含有率にあまり関係せ

* 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
** 同生活科学部乳肉衛生研究科
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1.　市販果実飲料の成分測定値

	果実飲料名および表示果実名		検体数		可溶性固形分	灰　分	アミノ態窒素	酸	ビタミンC	ベタイン
						g	mg	g	mg	mg
A	濃縮果汁	みかん	2	A-1	10.1	0.42	39.5	1.26	27.0	54.5
				A-2	10.1	0.30	38.5	1.00	29.5	54.0
B	天然果汁	みかん	1		10.0	0.28	27.9	0.78	1.0	56.3
C	50%果汁飲料	みかん	5	範　囲	11.0～13.0	0.05～0.30	12.0～19.7	0.45～0.71	4.0～21.7	20.0～38.4
				平均値	11.9	0.18	14.9	0.56	12.6	27.7
D	40%果汁飲料	みかん	1		19.5	0.17	10.8	0.78	9.5	19.5
E	30%果汁飲料	みかん	3	範　囲	12.0～13.1	0.10～0.15	6.3～10.2	0.40～0.44	1.9～64.5	10.5～32.5
				平均値	12.6	0.13	8.0	0.43	25.9	20.9
F	20%果汁飲料	みかん	1		12.0	0.08	3.4	0.40	31.9	10.1
G	10%果汁入り清涼飲料	みかん	13	範　囲	11.6～17.4	0.01～0.22	2.0～4.8	0.21～0.51	0.3～16.9	1.8～6.4
				平均値	14.5	0.07	3.2	0.37	2.4	4.8
H	10%果汁入り清涼飲料	みかん夏みかん	2	H-1	13.0	0.20	2.6	0.37	0.9	15.0
				H-2	12.4	0.03	4.3	0.32	43.0	7.8
I	10%果汁入り清涼飲料	バレンシアオレンジ	1		17.0	0.06	3.9	0.45	1.7	5.9
J	10%果汁入り清涼飲料	ネーブルオレンジ	2	J-1	2.4	0.13	1.6	0.69	1.7	8.7
				J-2	15.0	0.03	5.1	0.35	1.2	3.1
K	10%果汁入り清涼飲料	グレープフルーツ	1		14.2	0.06	5.6	0.52	0.4	4.1
L	清涼飲料(果汁10%未満)	みかん	4	範　囲	12.0～16.3	0.01～0.16	0.5～2.8	0.25～0.47	0.5～1.7	痕跡～2.9
				平均値	13.6	0.05	1.5	0.32	0.9	1.2
M	天然果汁	レモン	1		12.2	0.53	33.2	4.84	61.7	5.3
N	10%果汁入り清涼飲料	レモン	4	範　囲	12.2～17.9	0.08～0.12	2.0～5.2	0.44～1.01	0.2～2.4	1.9～4.1
				平均値	14.3	0.10	3.2	0.73	0.83	3.1
O	清涼飲料果汁(10%未満)	レモン	2	O-1	17.3	0.02	0.6	0.49	0.6	1.4
				O-2	12.3	0.02	2.0	0.46	0.2	1.0

単位　試料 100g に対する値である.

(注)　試料 3 検体以上のものは範囲，平均値で示した.

表 2.　市販果実飲料のアミノ酸測定値

		主要含有遊離アミノ酸構成比率									遊離アミノ酸総含有量
		Arg	Asp	$AspNH_2$	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	γABA	Total Amino acid
A	A-1	13.9	8.0	31.3	7.2	5.1	12.6	0.3	7.7	9.2	274.5
	A-2	13.6	12.2	24.4	6.3	7.5	12.7	0.3	6.8	10.2	249.2
B		12.1	6.4	18.5	6.8	3.4	26.5	0.4	7.5	12.3	217.3
C	範囲	12.1～23.4	6.7～15.3	11.2～24.6	4.2～7.3	3.5～5.5	18.5～29.7	0.3～0.7	3.4～9.5	8.5～10.7	93.7～173.9
	平均値	15.6	10.6	19.7	6.0	4.3	22.5	0.5	6.8	9.5	128.4
D		15.0	11.7	27.5	7.0	5.5	11.5	0.5	7.7	8.7	91.3
E	範囲	13.0～16.9	5.6～17.9	痕跡～22.4	4.3～7.2	1.5～6.2	13.0～41.3	0.5～1.0	3.8～10.8	7.6～11.5	61.5～132.1
	平均値	14.4	11.4	12.5	6.1	4.3	26.4	0.7	8.0	8.9	85.8
F		14.9	8.6	28.8	6.5	5.0	13.9	0.9	6.3	9.0	47.6
G	範囲	5.2～22.0	8.3～27.1	10.6～28.8	4.8～6.8	3.2～7.7	7.5～28.2	0.4～6.1	3.6～19.7	4.9～10.9	13.2～33.9
	平均値	13.7	12.9	21.4	6.0	5.0	17.1	1.1	7.9	8.4	22.7
H	H-1	13.6	5.9	14.8	4.4	1.5	44.0	0.7	4.9	6.1	39.1
	H-2	14.2	6.7	17.3	5.2	2.6	32.1	1.0	6.2	7.8	42.1
I		15.5	7.2	21.2	5.7	2.7	31.0	0.6	4.9	7.6	26.4
J	J-1	12.8	9.2	20.3	6.6	3.6	25.6	0.3	8.9	8.7	33.5
	J-2	14.1	9.2	26.6	6.5	5.4	15.8	0.7	7.1	8.7	18.4
K		13.3	9.0	21.4	6.0	4.3	25.3	0.5	6.4	6.8	23.4
L	範囲	10.3～15.9	4.6～11.4	14.2～27.3	6.1～7.3	2.1～6.8	10.0～33.7	0.8～3.4	6.1～7.7	9.8～12.0	1.5～9.4
	平均値	13.9	6.6	18.4	6.8	4.2	20.8	1.7	7.1	11.1	6.8
M		3.2	27.8	7.5	13.0	13.6	10.5	0.6	17.8	2.4	252.9
N	範囲	1.6～3.5	12.8～29.5	9.6～34.3	8.0～13.2	5.9～11.7	8.6～18.3	0.5～16.0	6.9～18.1	2.4～4.8	6.5～28.1
	平均値	2.8	19.8	21.7	9.9	7.9	11.6	4.7	12.5	3.5	20.1
O	O-1	2.5	24.6	13.0	9.3	7.2	17.4	5.3	13.3	4.2	5.7
	O-2	11.6	23.9	4.6	7.9	15.4	4.4	6.6	4.4	7.2	5.5

単位　遊離アミノ酸総含有量は試料 100g に対する値である.

(注)　試料 3 検体以上のものは範囲，平均値で示した.

表 3. 日本農林規格基準値

	可溶性固形分	灰分 (g)	アミノ態窒素 (mg)	酸 (g)	ビタミンC (mg)
温州みかん搾汁	9	0.20	20	0.7	20
夏みかん搾汁	9	0.20	20	1.5	20
バレンシアオレンジ搾汁	11	0.30	23	0.8	23
ネーブルオレンジ搾汁	10	0.30	25	1.0	23
グレープフルーツ搾汁	9	0.25	20	1.0	23
レモン搾汁	8	0.25	25	6.0	30

(単位)：搾汁 100g に対する値

(注)：全ての果実飲料について可溶性固形分，灰分，アミノ態窒素含量の規格が定められており，果汁100%でない果汁飲料，果汁入り清涼飲料では表示果汁含有率N%の N/100 と規定されている．また濃縮果汁では酸について，天然果汁ではビタミンCの規格が追加されている．

ず，レモン天然果汁を除き 0.2～1.0g の値を示した．

(5) ビタミンC ビタミンCで規格の適用を受けるものは天然果汁でレモン天然果汁は 61.7mg を示し，基準値以上であったが，ミカン天然果汁は 1 mg と基準値20 mg 以下であった．ビタミンCは果実の成熟度に左右され，さらに収穫後または貯蔵条件たとえば貯蔵日数，温度そして容器等によっても大きく影響を受けることが知られている[3]．このミカン天然果汁のビタミンCは低値を示したが，アミノ態窒素，アミノ酸，ベタインの値から考えて偽和物とは思われない．ビタミンCが少ないのは何らかの因子が作用したためと考えられる．

(6) ベタイン 前報[1]において，ミカン果実飲料中のベタイン含量とアミノ酸総含量とは高い相関関係を有し，ミカン果実飲料はこの相関関係によって品質評価が出来ることを述べた．

本報のミカン果実飲料のベタインとアミノ酸は危険率1%以下で相関関係があり，ベタイン量も 18mg（果汁100%に換算した場合の値）を示した10% ミカン果汁入り清涼飲料の 1 例を除き，前報の95%信頼限界範囲33.3～74.5mg に近似していた．レモン果実飲料ではミカン果実飲料に比較して，低いベタイン量（レモン天然果汁で5.3mg）を示している．しかし実験的に作成したレモン搾汁も 8.3mg とミカン果汁のそれの1/5以下の値を示しており，レモン果実飲料のベタイン量がミカン果実飲料に比較して少ない量であっても，とくに異常な低値とはいえない．

(7) アミノ酸 前報[1]において100% 果実飲料のアミノ酸含量および主要アミノ酸の構成比を報告したが，その含量および構成比についてはかなりの変動が認められた．そこで今回は市販ミカン類33検体を購入し，果汁絞り器で搾汁としアミノ酸含量，主要アミノ酸構成比を求め，それを標準値として市販果実飲料のアミノ酸含量およびその構成比を検討した．

表4に示したように自家製搾汁であっても産地，品種その他の条件によって含有量に差のあることは否定出来ないが，今回の市販果実飲料のうち，10%ミカン果汁入り清涼飲料の 3 例は果汁 100% に換算した場合，120～150mgを示し，前記のミカン搾汁の下限値176.8mg以下であった．しかし，新鮮な搾汁でない市販果汁という条件を考慮するならば，この数値はとくにかけ離れたものとはいえない．

次にアミノ酸構成を見ると，主要アミノ酸はアスパラギン，アスパラギン酸，プロリン，γアミノ酪酸，アルギニンであり，なかでもアスパラギン，プロリンはほぼ共通して多量に含まれていた．アスパラギンが20%以上を占めるものは39検体中23検体であり，またプロリンが20%以上示したものは 17 検体であった．これら 2 アミノ酸についでアルギニン，アスパラギン酸が高い比率を示し，とくにアルギニンは比較的安定した比率を示し，ほとんどの検体で10～16%の範囲で含まれていた．構成比率の変動が少なかったものとしてはγアミノ酪酸，セリンも同様であり，各々 8%，6%前後含有されていた．10%ミカン果汁入り清涼飲料の 1 例を除き，これらミカン果実飲料のアミノ酸パターンの特徴は前記のミカン搾汁のそれとほぼ一致している．この例外の 1 試料はアミノ酸含有量で10%果汁入りとしては若干少ない値を示しており，アミノ酸構成比でもグリシン，アラニンなどが多少高い比率を示すなどミカン搾汁と異なっている．しかしアミノ酸以外の項目たとえばベタインなどでは異常値を示しておらず，アミノ酸の結果のみでは偽和とはいい難い．

三浦[4]はレモン果実および果汁中の遊離アミノ酸を報告しているが，それによるとアミノ酸総含有量は250mg/100g を示し，主要構成アミノ酸はアスパラギン，アス

表 4. ミカン搾汁中の主要アミノ酸構成比率およびアミノ酸総含有量

	総アミノ酸含有量(mg)	主要アミノ酸構成比率 (%)								
	Total Amino acid	Arg	Asp	$AspNH_2$	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	γABA
最小値	176.8	4.1	2.6	4.6	2.6	1.2	10.4	0.3	1.4	2.7
最大値	545.7	24.7	21.1	35.0	8.0	6.9	33.5	0.6	9.8	17.9
平均値	312.3	16.0	5.4	23.4	5.3	2.5	20.2	0.4	5.0	11.0
標準偏差値	71.32	3.77	4.71	7.33	1.30	1.39	5.28	0.11	1.73	3.81

(単位) 総アミノ酸含有量は試料100gに対する値である.

パラギン酸, プロリン, アルギニン, セリンであり, その比率は各々16, 17, 19, 11, 8%であった.

本報のレモン果汁を含有する果実飲料は1例を除き, アミノ酸の含有量, 構成比ともにこの報告に類似している. 例外の1試料は10% レモン果汁入りでありながら65.3mg(果汁を100%に換算した値)を示し, 三浦の報告, レモン100%天然果汁 (252.9mg) に比べ低い値である.

以上の様にアミノ酸の測定結果からみると10%ミカン果汁入りの清涼飲料の1例では通常1%しか示さないグリシンが6.1%, またアラニンも10%ほど高い比率の19.7%を認めた. しかしこの程度の比率では意図的な添加とは判定し難い. アミノ酸総含有量の低いレモン果汁入り清涼飲料の1例もベタインでは10%レモン果汁入りとしては十分な値を示しており, 果汁分の不足と断定するのは困難である.

ミカンおよびレモン果汁の含有量が10%未満の清涼飲料ではベタイン, アミノ酸含有量が各々3mg, 10mg以下であった. これは果汁が10%未満という清涼飲料であると考えれば当然である.

以上市販果実飲料および清涼飲料43検体について, 上記7項目の試験を行い検討した結果, 偽和または表示違反と明確に判定される試料は検出されなかった.

要 約

昭和54年9月, 都内で購入した果実飲料37検体, 清涼飲料6検体につき果実飲料に適用される JAS 試験項目およびベタイン, 遊離アミノ酸等を測定し, それにより品質の鑑定を試みた.

1. 可溶性固形分: 全試料が規格に適合した.

2. 灰分: 10%ミカン果汁入り清涼飲料の1例を除いた果実飲料が JAS の基準値を満足させていた.

3. アミノ態窒素: ほとんどの果実飲料が基準値以上であった.

4. 酸: レモン天然果汁以外0.21~1.26の値を示し, 果汁含有率とあまり関係ない値を示した.

5. ビタミンC: 規格の適用を受けるミカン天然果汁が1mgと低い値を示した.

6. ベタイン: 10%ミカン果汁入り清涼飲料の1例を除いた全ての果実飲料が果汁含量を100%に換算した場合, 前報の36.5~74.6mgに近似した値を示した. レモン果実飲料では, 実験的に作成した搾汁8.3mgに比較して著しく低い値を示す検体はなかった.

7. 遊離アミノ酸: 実験的に作ったミカン搾汁のアミノ酸含有量およびアミノ酸構成比を求め, 試料を検討した. ミカン果実飲料ではアミノ酸総含有量に特に低い値を示す試料はなかった. アミノ酸構成比でも10%ミカン果汁入り清涼飲料の一例を除くミカン飲料がミカン搾汁のそれと一致していた. レモン果実飲料ではそのアミノ酸含有量, アミノ酸構成比が他の報告のそれと類似していた.

以上の結果から, 本実験の果実飲料, 清涼飲料については偽和, 表示違反といえるものはなかった.

謝辞 本調査遂行にあたり, 試料収集に御協力いただいた食品監視課ならびに食品機動監視班各位に感謝致します.

文 献

1) 牛尾房雄, 深野駿一, 西田甲子, 道口正雄: 東京衛研年報, 28-1, 180, 1977
2) 日本農林規格協会: JAS, 果実飲料の日本農林規格, 昭和45年9月14日農林省告示第1379号, 一部改正, 昭和54年2月10日農林水産省告示第164号
3) S. Nagy: *J. Agric. Food Chem.*, 28, 8, 1980
4) 三浦 洋: 果汁協会誌, No. 242, 13, 1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 204-208, 1980

高速液体クロマトグラフィーによる魚体中のビタミンDの定量

井口正雄*, 菊谷典久*, 友松俊夫*, 道口正雄*

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Natural Occurring Vitamin D in Fish Tissue

MASAO IGUCHI*, NORIHISA KIKUTANI*, TOSHIO TOMOMATSU* and MASAO DOGUCHI*

A method for determination of naturally occurring vitamin D in fish tissue was established using reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). Lipid in the sample tissue was extracted with chloroform-methanol (1:1) and then saponified. Unsaponifiable matters extracted with benzene were cleaned up on an alumina column. Some fraction from the column was evaporated to dryness and the residue, in which vitamin D, vitamin A and some portion of sterols in the sample were contained, was dissolved in methanol. Most of cholesterol in this methanol solution were precipitated when the solution was stored at −20°C for 10 to 12 hours. Vitamin D was determined by an HPLC system on a 0.4×30cm MicroPak MCH-10 (ODS) column using methanol-water (95.5 : 4.5) as the mobile phase and detected at 265nm. The method measured actual vitamin D content in the fish samples. The recovery of vitamin D added to the samples was 88.3% with the range of 85.2% to 91.0%.

Keywords : vitamin D, high performance liquid chromatography, fish, alumina column

緒　言

魚類のビタミンD（以下V.Dと略す）の定量に関しては，東ら[1,2]，山川ら[3~5]の報告がある．東ら[1,2]，山川ら[3]はV.Dの定量を三塩化アンチモンによる比色法で行なっているが，魚体中にはビタミンAやその他のステロールが多量に共存し定量を妨害するため，これらを除くための前処理操作はかなり煩雑である．また，この処理によってもV.D以外の三塩化アンチモン呈色物質を完全に除去することはできない．従って魚体中の肝臓のようなV.D含量の高い部位を除いて，魚肉のようにV.D含量が低く妨害物が多い試料のV.D測定には不適当である．

比色法以外にガスクロマトグラフィー（以下GLCと略す）による定量法が種々[6~11]提案されている．しかし通常使用する水素炎イオン化検出器の感度には限界がありV.Dが低含量の試料では定量不可能である．そのため魚類に関するV.DのGLCによる分析はV.D含有量が高いマグロ肝油[9]やタラ肝油[12]についての報告があるにすぎない．

最近，高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）によってV.D濃縮物質，V.D樹脂油，混合ビタミン剤[13]，乾燥酵母[14]のような比較的純度の高い試料について，また強化乳[15]，強化粉乳[16]のような強化食品について定量した報告があるが魚類のような天然物についての報告はほとんどみられない．そこで著者らは魚体中のV.Dについて，簡便で精度の高い微量定量法を確立するために，HPLCによる定量法の検討を行なったところ良好な結果を得たので報告する．

実験方法

Ⅰ．試薬および装置

1. 試薬　メタノールは液体クロマトグラフ用（和光純薬），クロロホルム，エタノールおよびベンゼンは試薬特級（和光純薬），ビタミンD_2（以下V.D_2と略す）およびビタミンD_3（以下V.D_3と略す）標準品はそれぞれエルゴカルシフエロールおよびコレカルシフエロール（和光純薬）をアセトン—水（4：1）から再結晶したものを用いた．プレビタミンD_2は小林ら[17]の方法に準じて調製し，HPLCの保持時間測定に用いた．コレステロール（Sigma社），β-カロチン（和光純薬）はそのまま用いた．ビタミンAはビタミンAパルミテート100万IU（和光純薬）を常法[18]によりけん化後，不けん化物をエーテルで抽出したものを用いた．アルミナはW-200

* 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

(Woelm 社, grade super I) を用いた. その他の試薬は特に指定しないかぎり試薬特級品を用いた.

2 装置 高速液体クロマトグラフはLC-5000型(バリアン社), 検出器は紫外線吸収検出器バリスキャン(バリアン社), インテグレーターはITG-2A型 (島津製作所), 自記分光光度計はUV-200型 (島津製作所) を用いた.

Ⅱ. 試料

マイワシは体長12～16cm, 体重80～120gのもの10尾, カタクチイワシは体長 9～11cm, 体重 3～5g の生干し品500g, メバチマグロは凍結品 (体重, 体長は測定しなかった) 500g, キンメダイ肝臓65g(2尾分) を卸売市場あるいは小売店で鮮度の良好なものを購入し, 実験に供した.

Ⅲ. ビタミンDの定量

1. 脂質の抽出 試料秤取量は肝臓試料は 10g, それ以外は 50g とした. マイワシは切身にした後, 皮を除きメバチマグロは半解凍の状態で, カタクチイワシ, 肝臓試料はそのままそれぞれ適当な大きさに切断し, 秤量し, 10～20g の芒硝を加え乳バチ中で磨砕した. これを 100 ml 容のステンレス製ホモゲナイザーカップにとり, 等量のクロロホルム—メタノール(1：1)を加え最高速度で 30秒間ホモゲナイズする. これに全量が試料の 5 倍量になるようにクロロホルム—メタノール(1：1)を追加し, 分液ロートにうつし60分間振とう, 抽出する. 抽出液は 2000rpm, 5分間遠心分離し, 上清をナス型フラスコにうつし, 残渣には更に試料の 5 倍量のクロロホルム—メタノール(1 ： 1)を加え, 同様に60分間振とう, 抽出し, 遠心分離した上清をはじめの抽出液に合する. これをロータリーエバポレーターを用いて, 窒素ガス下, 40℃温浴中で溶媒を留去し, 黄色, 油状の残留物を得た. (以下本実験では溶媒の留去はすべてこの条件で行なうこととした).

2. けん化および不けん化物の抽出 けん化および不けん化物の抽出は小林ら[11]の方法に準拠した. 残留物にエタノール 100ml, 20%ピロガロール—エタノール溶液 40mlおよび90% KOH 溶液25ml を加え, 80℃, 30分間けん化した. けん化後急冷し, ベンゼン200ml を加えはげしく振とうし, これに 1NKOH 溶液80mlを加え, 分離したベンゼン層を分取し, これを 0.5NKOH 溶液80 ml で洗浄した. ついで洗浄液がフエノールフタレイン試薬で中性を示すまで, 40ml の蒸留水で洗浄をくりかえす. このベンゼン抽出液をろ紙でろ過し, ベンゼンを加え全量を200ml とする.

3. アルミナカラムクロマトグラフィー 8%の蒸留水を加えて失活したアルミナ 35gにクロロホルムを加えスラリーとした後, 内径 1.2cm, 長さ 50cm のテフロンコック付きガラスカラムに充てんした. 調製した不けん化物ベンゼン抽出液200ml 中の150ml をとり, 溶媒を留去した後, 残渣を0.5ml のクロロホルムにとかしカラム上端に移す. 更に 0.5ml のクロロホルムで容器を洗浄し, カラムに移す. ついでクロロホルムを溶離液として流速 0.8～1.0ml/分で溶出した. はじめのカロチノイド色素を含む35ml を捨て, その後10ml を分取した. この分取条件は以下の実験の結果に従って設定された.

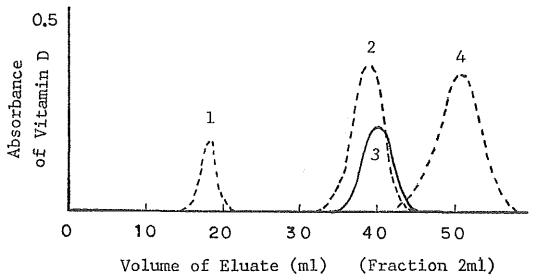


Fig. 1. Separation of Vitamin D by Alumina Column Chromatography. 1. β-Carotene 2. Cholesterol 3. Vitamin D and 4. Vitamin A (Eluting Agent, Chloroform)

4. アルミナカラムクロマトグラフィー分取条件設定の検討 1ml あたりβ-カロチン0.5mg, コレステロール 1mg, ビタミンA 210 IUおよびV. D 160μg を含むようにクロロホルム溶液を調製し, この1ml について実験方法Ⅲ. 3. に示した方法でそれぞれカラムクロマトを行なった. それぞれ2ml ずつのフラクションを分取し, これをクロロホルムで5ml に希釈し, β-カロチンは450nmにおける吸光度, コレステロールはLiebermann-Burchard 反応による比色法[19], ビタミンAは325nmの最大吸収ピークを, またV. D_2は265nm の最大吸収ピークをそれぞれスキャンして確認し, 保持容量および保持時間の測定を行ない分取条件を設定した.

5. HPLC 検液の調製 アルミナクロマトで得た 10 ml 分取液の溶媒を留去した後, 残留物に 1～2 ml のメタノールを加え, 冷メタノール沈でん[20]を行なう. すなわち, メタノール溶液を一夜フリーザー中に保管し, 析出した沈でんをフリーザー中でガラスろ過器 (3G4) でろ過しコレステロールの大部分を除去する. ろ液をフィルター (フルオロポアフィルター, ポアサイズ1μm住友電機製) でろ過し, メタノールを留去し, これに 100～200μl のクロロホルム—メタノール (1：2) を加えて溶解し, HPLC 検液とした.

6. HPLC による定量 HPLC 条件は, カラム,

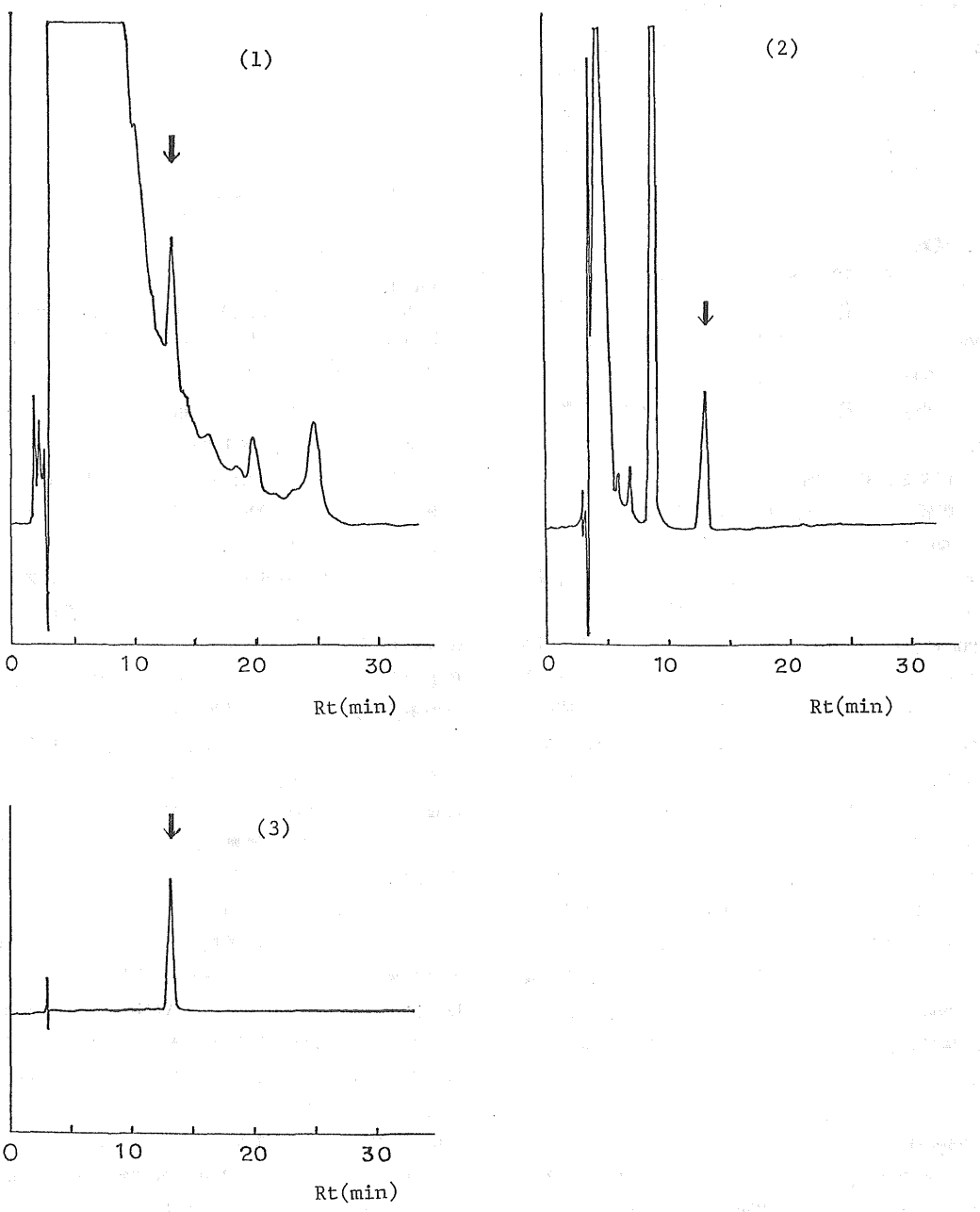


Fig. 2. Effect of Clean up by Alumina Column on HPLC Chromatogram of Unsaponifiable Matter Obtained from Tuna Muscle
(1) Unsaponifiable Matter Injected Directly
(2) Unsaponifiable Matter Cleaned Up by Alumina Column
(3) Authentic Vitamin D

Micro Pak MCH-10 (ODS) 0.4cm ID. ×30cm (バリアン社), 移動相にメタノール—水(95.5 : 4.5v/v), 流速1.0m*l*/分, カラム温度30℃ (恒温ジャケット使用), 検出波長は 265nm, 検出感度は 0.1AUFS (吸光度フルスケール), レコーダーチャートスピードは50mm/分であり, 供試検液は15μlであった.

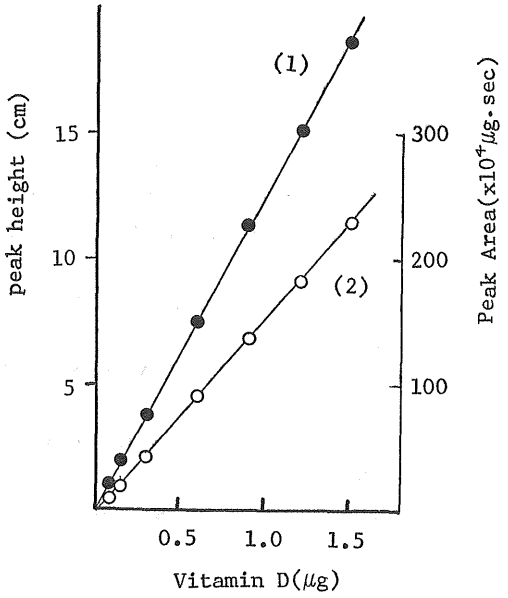


Fig. 3. Calibration Curves of Vitamin D on HPLC.
(1) Peak Height
(2) Peak Area

結果および考察

I. V.D 分画のクリーンアップ

V.D を分離するための クリーンアップには従来より試薬による処理とか種々のカラム吸着剤による操作[4]が検討されてきた．さらに近来ゲルろ過法[21]，HPLC による分取法[22]も報告されている．本実験においては一般的なアルミナを用いて1回のカラムクロマト操作で行った．それは HPLC による定量では比色法の場合ほど厳密なクリーンアップをする必要がないこと，またクリーンアップ操作は単純である方が再現性の上からも望ましいという理由からである．

魚体中には通常 V.D にくらべ，はるかに多量のビタミンAやコレステロールが含有され，これらが V.D 測定値に影響を与えることが知られており[5]，V.D 測定に当ってこれらの物質を出来る限り除去することが望ましい．実験方法Ⅲ．3．の条件でアルミナクロマトを行なった場合のこれら妨害物質について溶離液中の分布を検討した結果を Fig. 1 に示した．このクロマト条件ではβ-カロチンは，除去されるがビタミンAおよびコレステロールの一部が V.D フラクションに混在する．しかし，これらの混液を HPLC に供したところ，ビタミンAは V.D より先に溶出してしまう（保持時間 8.5 分）ため V.D の定量値には全く影響を与えない．またコレステロールが多量にある場合，ピークの一部は V.D ピークに近接するが前者は265nmでの吸収がないため，この検出波長で V.D の測定を行なうかぎりは影響を与えない．従って実験方法Ⅲ．3．のアルミナカラムクロマトの条件で十分であると考える．V.D の検出に直接影響はないが，アルミナクロマトの分画液中に多量のコレステロールが混入するような試料については，HPLC 検液調製の際に沈でんとなって析出し，試料注入が不可能となるので，HPLC 検液に十分溶解する量までコレステロールを除去する必要がある．この目的のためには，冷メタノール沈でん法で十分であることを認めた．アルミ

Table 1. Reproducibility of Peak Height, Peak Area and Retention Time on HPLC (Vitamin D 1.2μg Injected)

	Calculation Method		Retention Time (min)
	Peak Height (cm)	Peak Area (μV•sec)	
$\bar{X}$	15.63	173.4	13.29
SD	0.36	5.53	0.02
CV	2.3%	3.2%	0.2%

(n =6)

Table 2. Assayed Values of Vitamin D in Fish Tissue.
(All values are mean of duplicate determinations)

Sample	Assayed Value (μg/100g)
(1) Sardine (Fresh, Muscle)	9.59
(2) Big-Eye Tuna (Freezed, Muscle)	15.60
(3) Anchoby (Salted, Half Dried, Whole Body)	4.48
(4) Beryx (Liver)	72.00

Table 3. Recovery of Vitamin D from Fish Tissue (Sample (1) Sardine (2) Tuna (3) Anchovy)

	Assayed Value of Vitamin D (μg/100g)			Recovery (%)
	Vitamin D Added (A)	With Addition of Vitamin D (B)	Without Addition of Vitamin D (C)	$\frac{B-C}{A}\times 100$
(1)	10.0	18.21	9.33	88.7
(2)	10.0	25.12	16.08	91.0
(3)	5.0	8.70	4.44	85.2

ナカラムによるクリーンアップの効果をFig. 2に示す．すなわちマグロ試料の不けん化物について直接 HPLC を行なったものと，クリーンアップしたもののクロマトグラムを比較した．図に示されるようにクリーンアップにより V. D は良好に分離した．

Ⅱ．検量線の作製

V. D_2 の標準品を2～100$\mu g/ml$ の濃度になるように標準液を調製し，それぞれの 15μl を HPLC に注入し，得られたピーク高さおよびピーク面積を測定し，検量線を作製した．この範囲で，ピーク高さおよびピーク面積の両者とも原点を通る直線関係を示した（Fig. 3）．また，V. D_2 標準液（V. D_2 として1.2μg）をくりかえし注入し，6回測定したときのピーク面積，ピーク高さおよび保持時間の再現性を検討した（Table 1）．ピーク高さ法による方が再現性が良好であった．従って試料の定量はピーク高さ法を採用することとした．

Ⅲ．HPLC による定量

本法で使用した移動相のメタノール—水(95.5：4.5v/v)では V. D_2 と V. D_3 は分離されなかった．試料の定量には標準液にすべて V. D_2 標準品を用いV. D 値は V. D_2 として定量を行なった．またプレビタミンの HPLC における保持時間は11.4分であり V. D_2 と分離したことから本法は actual ビタミンD値を測定していることになる．

魚類4試料について定量した結果を Table 2 に示した．キンメダイ肝臓は魚肉よりもかなり高い値を示した．山川ら[3]によれば V. D は一般に魚肉よりも内臓，皮を含む不可食部分に V. D 含量が高いといわれる．今回行なったカタクチイワシ試料は全魚体を試料として定量したものであり，水分含量および塩分量を考慮に入れても，他の魚肉よりも低い値であった．これは試料が生干し品であったために加工工程での分解によって低い値となったことによるのか，本来含量が低いものであることによるのかは更に検討する必要があると思われる．

次に添加回収試験の結果を Table 3 に示した．回収率は85.2%から91.0%の範囲にあり平均88.3%とほぼ満足すべき結果が得られた．

文　献

1) 東　秀雄，山川健重，衣巻豊輔ら：ビタミン，23，342，1961
2) Higashi, H., Yamakawa, T., Kinumaki, T., *et al.*: *J. Vitaminol.*, 7, 215, 1961
3) 山川健重，杉井麒三郎，岩崎喜久子ら：ビタミン，27，269，1963
4) 山川健重：ビタミン，29，487，1965
5) 山川健重，衣巻豊輔：ビタミン，46，167，1972
6) Bell J. G and Christie A. A.: *Analyst*, 99, 385, 1974
7) Kobayashi, T., Adachi, A.: *J. Nutr, Sci. Vitaminol.*, 22, 41, 1976
8) Kobayashi, T., Adachi, A.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 22, 209, 1976
9) Kobayashi, T., Adachi, A., Furuta, K.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 22, 215, 1976
10) 小林　正，足立昌子：ビタミン，50，351，1976
11) 小林　正，足立昌子，古田肇子：ビタミン，50，421，1976
12) Bell J. G. and Christie A. A.: *Analyst*, 98, 268, 1973
13) Vanhaelen–Fastré, R., Vanhaelen, M.: *J. Chromatogr.*, 153, 219, 1978
14) 足立昌子ら：ビタミン，52，207，1978
15) Henderson K. Susan and Wickroski F. Alphonse: *J. AOAC*, 61, 1130, 1978
16) 古田肇子，足立昌子，小林　正：ビタミン，52，409，1978
17) 小林　正，康村満江：ビタミン，44，135，1971
18) 日本薬学会編：衛生試験法注解，138，1973，金原出版
19) 小林哲二郎ら：食品分析ハンドブック，171，1973，建帛社
20) 岩尾裕之，高居百合子：ビタミンの分析，96，1972，講談社
21) Thompson N. James, Maxwell B. William and L'abbé M.: *J. AOAC*, 60, 998, 1977
22) Allen C. Ray, J. Nelson Dwyer, and John C. Reagor: *J. AOAC*, 60, 1296, 1977

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.*, 31-1, 209-211, 1980

野生カラスおよびハト中の PCT, PCB, 有機塩素系農薬残留量

牛尾房雄*, 道口正雄*, 深野駿一**, 阿部 学***

PCT, PCB and Organochlorine Pesticide Residues in Wild Crows and Pigeons

FUSAO USHIO*, MASAO DOGUCHI*, SHUNICHI FUKANO** and MANAB ABE***

Keywords : ポリ塩化テルフェニール PCTs, ポリ塩化ビフェニール PCBs, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides, カラス crow, ハト pigeon

緒 言

PCT 汚染に関する一連の研究において，著者らはすでに多摩川の魚類[1]や，都内で購入した食品中[2]からPCT はほとんど検出されぬことを報告した．また都内で採収した人体脂肪組織[3]および人血液中[4-5]のほとんど全てからPCT が検出され，その濃度はそれぞれのPCB 濃度とほぼ等しいことも報告した．各種の食品中からが検出されぬことは皆川[6-7]や西本ら[8]の報告にも示されている．

PCB や有機塩素系農薬の人体汚染の主径路は食事であるとされているが，この径路はPCT の人体汚染に関してはあてはまらぬことを上記の結果は示唆している．

また興味あることは，2,3の例を除いて，ほとんどの野生鳥類や魚類からPCT は検出されないか，痕跡程度である．一方，人に飼われている犬や猫からは検出されることが多い．また例外的にPCT 高度汚染が見出された野鳥試料は，都内新宿区で採収されたハト[9]であった．

PCT 汚染は自然環境中にほとんど認められず，人間または人間と深くかかわりのある動物にのみ認められるということは，PCT の汚染源が人間の生活環境の中にあることを示唆する．

本研究は，都市環境に生活し，その餌の多くの部分を人の廃棄物に依存していると考えられる都内のカラスならびにハトと，比較的人の廃棄物依存度の少ないと考えられる郊外のカラスのPCT 汚染度を対比することによって，PCT 汚染源の解明をこころみたものである．またPCB および有機塩素系農薬分析を行い，得られた知見をあわせ報告する．

実験の部

1. **試料** 1976年都内台東区で捕獲したハシブトガラス26羽および栃木県矢板市郊外の山間部のハシブトガラス7羽およびハシボソガラス1羽計34羽，また1973年に都内で捕獲したハト12羽(区部9羽，日野市3羽)，神奈川県武山での3羽計15羽を分析に供した．

都内のカラスについては，肝臓ならびに腹部脂肪組織を，栃木県のカラスについては腹部脂肪の貯留がほとんどないため肝臓についてのみ分析を行った．ハトについては，脂肪組織を供試した．

2. **実験方法** 各組織をアセトン・*n*-ヘキサン (2：1) 混液とエチルエーテル・*n*-ヘキサン (9：1) を用いてホモジナイズし脂肪を抽出した．脂肪量を測定した後，PCT，PCB は厚生省PCB 分析研究班により作成された公定法[10]中のPCB 分析予試験法に準じたアルカリ加水分解法により行った．DDT 類縁化合物，BHC については前報[11]同様に行った，PCT の数値化は総波高法により行い，PCB は pp′DDE 以降のピークに対して鵜川[12]の数値化法を使った．農薬定量にはピーク面積による絶対検量線を用いた．なおGC測定条件は下記のごとくである．

機種：島津GC 7A型ならびに5A型

線源：ECD (Ni^{63})

カラム：PCT は2％OV-1/Gas chrom Q (3mmi. d×1m, glass) カラム温度275°，PCB は2％OV-1/Gas chrom Q (3mmi. d×1. 5m, glass) カラム温度190°，農薬は2％OV-17/Gas chrom Q (3mmi. d×1. 5m, glass) および2％DEGS+0. 5％H_3PO_4(3mmi. d×1. 5m, glass) カラム温度190°

検出器・注入口温度：300°

Sensitivity：$10^2 M\Omega$, Range：8×10^{-2}V

結果および考察

都内4ケ所で捕獲したハト12羽のうち半数の6羽からはPCTは検出されず，平均0. 1ppm最高値は0. 7ppm であ

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
** 同生活科学部乳肉衛生研究科
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakuninchо 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
*** 国立林業試験所

Table 1. Residue levels of PCTs, PCBs and DDE in pigeon (ppm on fat basis)

No.	PCT	PCB	DDE	Source
1	<0.05	1.5	1.2	Shibuya station
2	<0.05	0.5	1.9	
3	<0.05	0.5	2.3	
4	0.25	1.7	1.0	Asakusa temple
5	0.70	1.3	3.7	
6	<0.05	0.6	1.1	
7	0.41	0.8	1.6	Suitengu
8	<0.05	0.8	1.9	Chūō-ku
9	<0.05	1.9	0.9	
10	<0.05	0.3	0.6	Tama zoo
11	<0.05	0.4	0.7	
12	0.30	0.2	0.7	
13	<0.05	<0.1	3.8	Takeyama
14	<0.05	<0.1	8.7	Kanagawa Pref.
15	<0.05	<0.1	12.3	

った．これに対してPCBは全試料から検出され最高値は1.92ppmであり，PCBの平均値はPCTの約6倍を示した．一方神奈川県武山のハト3試料からはPCTは検出されず，PCBも痕跡であったがDDEは都内のハトより高い値を示した．若林ら[9]は1972年に新宿区で捕獲したハトの脂肪組織8試料を分析し，最高160ppmを示すもののあることを報告した．これらの試料の平均値は23ppm，範囲0.5～160ppmであった．しかし1976年に同区で捕獲したハトの脂肪中平均PCT濃度は0.4ppmまたはそれ以下，最高でも1.8ppmを示すにとどまっている．その72年調査においても，新宿区以外（江東区および中央区）では高汚染のものは存在しなかった．

本調査ならびに若林らの結果は，1972年の時点において，新宿区の或地域にハトがPCTによって高度汚染を受ける因子が存在したことを示すが，その因子はあくまで限定された地域に，しかも比較的短時間しか存在しなかったことを示唆している．

都内および栃木県のカラス肝臓中のPCT濃度は，それぞれ平均0.17ppm，範囲痕跡－0.56ppm，平均0.06ppm，範囲痕跡－0.11ppmであり，それぞれの1/4ほどの試料には痕跡程度しか検出されなかった．この両平均値は5％の危険率で有意差を示す．この結果は，人間とより密接した環境にあるものほど，PCT汚染をより多く受ける可能性のあることを示唆する．

一方PCBは両地域のカラス肝臓試料のすべてから検出され，平均値はいずれも3.3ppmであった．総DDTの肝臓中濃度は都内で平均3.7ppm，範囲1.9～11.0ppm，栃木でそれぞれ4.9ppm，2.6～8.9ppmであり，いずれもPCB濃度と近似の値を示している．総BHCは都内で平均0.88ppm，範囲0.3～2.3ppm，栃木で2.5ppm，0.6～9.8ppmであり，その82％および84％はβ-BHCであった．栃木で平均BHC濃度が高いのは，たまたまその1試料に9.8ppmという高濃度を示すものがあったためで，それを除くと平均値は1.4ppmとなる．

都内のカラスの脂肪組織中のPCT濃度は，平均0.19ppm（痕跡－1.5ppm）であり，PCBは平均4.8ppm（1.0～14.0ppm）を示し，PCBのほうが20倍以上も高い．

供試した全カラス試料について，脂肪組織，肝臓をとわずPCT濃度がPCB濃度を越えるものはなく，いずれもPCTはPCBより1/10～1/100程度の値を示した．

1974年都内で収集した人体脂肪中のPCT平均濃度は1.11ppm（0.04～9.20ppm）またPCB濃度は平均1.04ppm（0.38～2.50ppm）であり，それらの平均濃度はほぼ等しく，またPCT濃度がPCBを越える試料も少なからず認められ[5]，カラスの脂肪についての結果と著しく異なっている．

都内のカラスの脂肪組織中総BHC濃度は1.42ppm（0.6～3.4ppm）でそのうちの86％がβ-BHCであり，総DDTは7.1ppm（3.0～20.0ppm）うち77％がpp′-DDEであった．総体的に見た場合，都内のカラスのPCB，BHC，DDT汚染の程度は都民のそれらとほぼ同じまたは幾分高いのに比較してPCT汚染度は低いといえる．

カラスやハトの脂肪中PCT濃度がPCBやBHC，DDTより低いことは，都市においてもこれら鳥類の餌中のPCT濃度が，PCBやこれらの農薬より低いことを示すと考えられる．

一方，人については食事中にPCTはほとんど検出されない[2]にもかかわらず，都民の体脂肪中の平均PCT濃度はPCB濃度にほぼ等しく，PCB，DDTおよびBHC濃度はカラスとほぼ同レベルまたは幾分低い．これらの結果は人の主要PCT汚染源が人の住居環境中にあることを強く示唆するが，この解明にはさらに今後の研究にまたねばならない．

要　約

都内および栃木県山間部で捕獲したカラス計34羽，都内および神奈川県で捕獲したハト計12羽について，PCTならびにPCB，DDTおよびBHCの分析を行なった．

都内のハト体脂肪中のPCT濃度の平均は0.1ppmでPCBのそれの約1/6であった．神奈川のハトからはPCTは検出されなかった．

都内および栃木県のカラスの肝臓中のPCTはそれぞれ平均0.17ppm，0.06ppmで都内のカラス中の濃度は有

Table 2. Residue Levels of PCTs, PCBs and Some Organochlorine Pesticides in Crows (ppm on fat basis)

Area	Item	PCT		PCB		βBHC		ΣBHC		DDE		ΣDDT	
		A*	L**	A	L	A	L	A	L	A	L	A	L
Metropolitan Area	N=26												
	Mean Value	0.19	0.17	4.5	3.3	1.2	0.7	1.4	0.9	5.5	3.0	7.1	3.7
	Minimum Value	<0.05	<0.05	1.0	0.9	0.5	0.2	0.6	0.3	2.5	1.3	3.0	1.3
	Maximum Value	1.5	0.56	14.0	16.0	3.1	2.1	3.4	2.3	14.0	6.8	20.0	11.0
	Standard Deviation	0.30	0.19	3.6	3.0	0.7	0.5	0.8	0.6	2.8	1.2	3.8	2.0
Tochigi Prefecture	N=8												
	Mean Value		0.06		3.3		2.1		2.5		4.6		4.9
	Minimum Value		<0.05		1.7		0.4		0.6		2.5		2.6
	Maximum Value		0.11		9.9		9.2		9.8		8.5		8.9
	Standard Deviation		0.03		2.6		2.7		2.8		1.9		2.1

* A……Adipose Tissue
** L……Liver

意に高かった（危険率5％）．PCB 濃度はいずれも 3.3 ppm，総 BHC はそれぞれ平均0.88ppm および2.5ppm，総 DDT の平均はそれぞれ3.7ppm および4.9ppmであった．

都内カラスの脂肪組織中のそれら汚染物質の濃度は肝臓中よりそれぞれ数十％高かった．

本研究の結果ならびに先の報告の結果を総合的に考察し，PCT の主要汚染源はより人間に密接した環境，特に住居環境内にあると推定した．

（本研究は昭和52年度当研究所調査研究課題「環境汚染物質の点検に関する研究」として実施し，その概要は日本食品衛生学会第35回学術講演会1978年5月で発表した）

文　献

1) 深野駿一，牛尾房雄，道口正雄：東京衛研年報，25，297，1974
2) Ushio, F, and Doguchi, M.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 17, 707, 1977
3) Doguchi, M., and Fukano, S.: *ibid.*, 11, 157, 1974
4) Doguchi, M., and Fukano, S.: *ibid.*, 13, 57, 1975
5) Fukano, S., and Doguchi, M.: *ibid.*, 17, 613, 1977
6) 皆川興栄，滝沢行雄，酒井　洋，篠川　至：日衛誌 28, 543, 1974
7) 皆川興栄：日衛誌，33，778，1979
8) 西本孝男，上田雅彦，田植栄，近沢紘史，西山保：医学のあゆみ，87，264，1973
9) 若林明子，古井戸良雄：公害研究報告書（水質編）昭和51年度，東京都公害研究所，16，1977
10) 厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班：昭和46年度科学技術庁特別研究促進調整による研究成果報告書，食品衛生研究，22，241，1972
11) 牛尾房雄，深野駿一，道口正雄，阿部　学：日生態会誌，26，13，1976
12) 鵜川昌弘，中村彰夫，樫本　隆：食衛誌，14，415，1973

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 212-218, 1980

地下駐車場における環境調査

佐藤泰仁*, 多田宇宏*, 青木　実*, 溝口　勲*

Investigation of Air Environment in Underground Parking Lots

YASUHITO SATO*, TAKAHIRO TADA*, MINORU AOKI* and ISAO MIZOGUCHI*

A remarkable increase in the number of automobiles necessitated the use of underground areas as parking lots. Although the underground parking lots are provided with forced ventilation systems, the effect of exhaust air, etc. is unavoidable. The ambient air in three of such areas was investigated in order to assess the effect of CO and dust on the health of the workers in such environments.

1) Mean CO concentration within the parking area was below the threshold limit value of 50 ppm.

2) CO concentration within the toll collection office is subject to the presence of the air vent and it is considered necessary to keep the air pressure positive within the office.

3) The dust concentrations were found considerably high in all but one parking lots.

4) The concentration of aromatic hydrocarbons in the parking lots fluctuated from 10 to 100 times the value in the ambient air.

Keywords : underground parking lot, environmental pollution, carbon monoxide, dust

緒　言

近年，我が国における自動車の数は著しい増加を示しているが，特に東京においては人口および産業の集中のため，自動車の交通量はますます増加し，このままで進めばついに道路もその機能を果すことができなくなり，都市そのものの機能さえ脅かされることになりかねない現状である．したがって土地の有効利用の面から地下空間を利用する傾向にあり，地下街，地下鉄などが多く作られてきているが，それと平行して地価の高い狭い敷地に建つビルは高層となり，そこにビル専用の駐車場を設けることになると，その地下階があてられるのが現状である．しかし地下駐車場は比較的外気に影響されず，自然換気のほとんどない環境にあるため，機械換気の給排気に頼らざるを得ない．そこで，このような環境に働く従事者の健康を考えると通常の業務体系において，現場はどのような汚染状況であるかを把握し，現状の設備環境を1つでも改善していくことが必要と考えられる．地下駐車場の汚染実態については今までにもいくつかの報告[1-8]があり，特にCOの高濃度汚染が指摘されている．今回我々は，最近3年間に行なった某公社の管理する駐車場のうち，都心の主幹道路の地下に作られている3つの駐車場の料金所内および車路の汚染質等の一日の濃度変化を測定した調査結果を解析し，若干の知見を得たので報告する．

調査概要

調査期日　A駐車場　昭和52年11月29日～30日
B駐車場　昭和53年11月14日～15日
C駐車場　昭和55年1月23日～24日

調査場所　A，B，C駐車場の料金所内および車路

測定項目および方法

温度および湿度……自記温湿度計
一酸化炭素(CO)……エコライザー（定電位電解法）
浮遊粉塵(Dust)……テープエアーサンプラー（透過法）
炭化水素……ガスクロマトグラフィー

以上の項目の他に自動車移動台数として入庫，出庫の合計を記録した．尚，温度，湿度，CO, Dust については24時間の同時測定で行なった．

調査結果および考察

1)　駐車場規模概要について

A，B，C駐車場における規模概要を表1に示す．地下駐車場としては比較的規模も大きく，B駐車場は地下2層式のため面積や給排気量において多くなっている．しかし換気回数について計算してみると10～13回/hであり駐車場法の規定10回/h以上にはなっているものの，後述する立地条件から判断して，もう少し給気量を多くすることが望まれる．3つのうちではB駐車場が昭和35年開設と一番古いが，A，Cも2～3年の違いだけで20年

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1.　各駐車場における規模概要

駐車場名	面　積 m^2	体　積 m^3	給排気量 m^3/h	収容台数 台	換気回数 回/h	構　造
A	7,065	19,524	252,000	220	12.9	地下1層
B	12,900	35,430	355,000	265	10.0	地下2層
C	6,070	17,549	210,300	180	12.0	地下1層

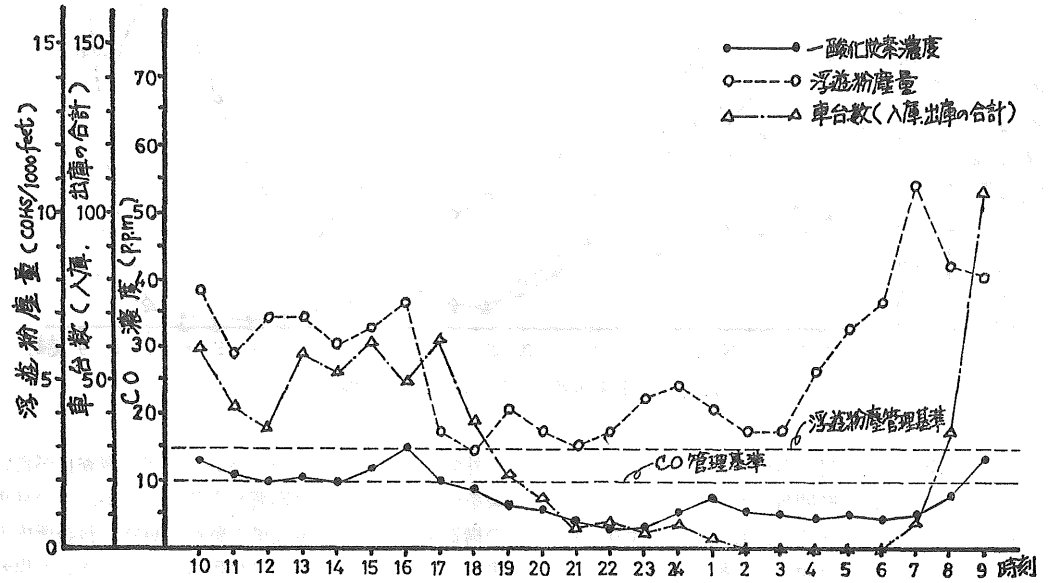


図 1.　A駐車場料金所内の CO, DUST の変動

近くたっており，保守管理を定期的に行なっているが設備環境が当初より劣化している現状である．尚，料金所内への給気はB駐車場だけがなされているが，A，Cについては自換換気である．又，営業は24時間営業である．

2) **環境条件について**　温熱条件（温度，湿度）については算術平均値で，汚染条件（CO, Dust）については幾何平均値で評価を行なっている．

A駐車場……温熱条件においては，車路の平均温度および湿度は17.7℃，49%と調査日の外気条件とほぼ同様であり，車路は常時，人がいない状態でもあり問題は少ないと考える．しかし料金所内では9～17時の時間帯の平均値が25.5℃と若干暑すぎると思われるが，ここは在室者の温度調節が可能であるため，在室者にとって適温であれば問題はない．湿度は平均35%台と外気に比べ15%も低くやや乾燥状態にあった．これには料金所内暖房のために使用しているファンコイルユニット暖房器による室内水分の蒸散の影響もあるので，もう少し加湿に対する配慮が望まれる．次に換気能をみるための CO_2 の濃度変化を検知管によりみたが，車路，料金所内ともビル管法の基準値 0.1% 以下にあり特に問題はないと思われた．また汚染条件（CO, Dust）の一日の変動を1時間の平均値でプロットしてみると，図-1，2に示す如くであり，特にCOは車の動きに対応した変化を示している．

車路におけるCOの平均濃度は 6.2ppm であり，料金所内の平均は 7.1ppm と室内の方が若干高くなっており，また，料金所内の9～17時の平均値は11.5ppmと料金所内を居室としてみた場合の基準値10ppm（ビル管理法）を越えている．料金所内でのCOの増加は料金収受の際の排気ガスの流入および喫煙が主たる原因である．窓閉時の狭い料金所内で喫煙をすれば当然CO濃度は高くなるし，窓をあけて料金の収受業務の時は，車が止まり暫時アイドリング状態にある．このアイドリングの時の排気ガス中のCOが瞬時に拡散されても相当高濃度のものが入り測定器のフルスケール（100ppm）を越える濃度も記録されている．尚，地下駐車場に関しての法律的規制値は1971年に労働省より出された「地下駐車場排気ガス障害予防対策要綱」（地下駐要綱）[4] があるが，これには排気ガス中の対象有害物としてCOが50ppm以下にすることと規定されている．

浮遊粉塵量（Dust）については連続測定できる測定器

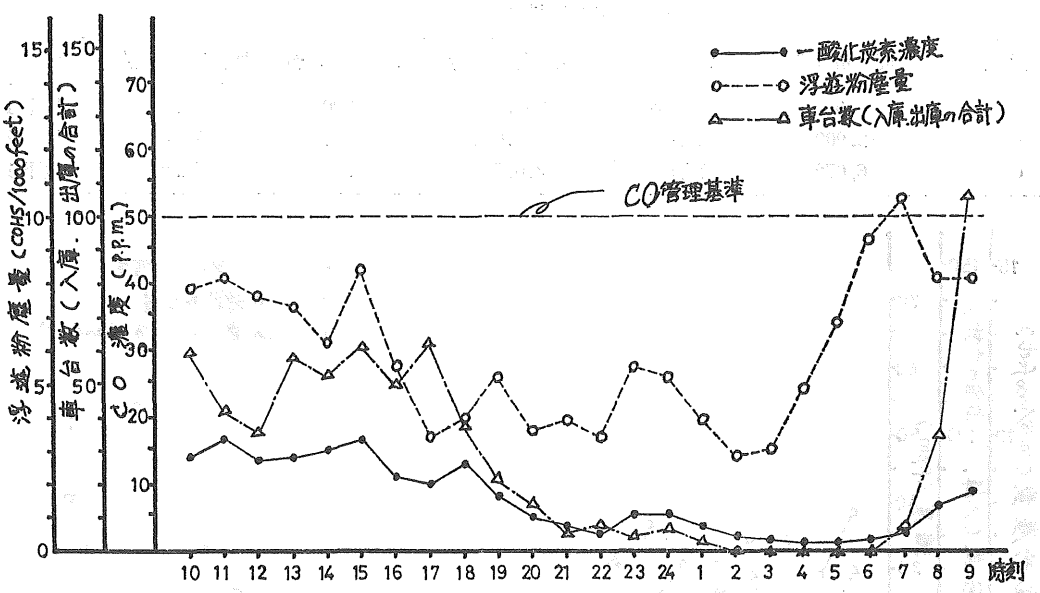


図 2. A駐車場車路の CO, DUST の変動

が少ないため，現在あまり汎用されていないがテープエアーサンプラーを用い，1時間毎のサンプリングによるろ紙の透過率の大小により求めた．したがって現在主に用いられている評価濃度の mg/m³ に換算しなければならないので，前もって実験室のチャンバーおよびフィールド調査から得られた1 COHS/1000feet＝50μg/m³[5] を用いることにする．A駐車場の Dust の経時変化については先に示したが，一日の平均濃度でみると，車路は，5.6COHS/1000feet(＝0.28mg/m³)，料金所内は5.3 COHS/1000feet(＝0.26mg/m³) と料金所内が若干低いが，その変動は車路，料金所内とも同じような動きをしており，料金所内は相当程度車路環境に左右されていることを推定させ，濃度的には先の地下駐要綱にないのでビル管法の基準値 0.15mg/m³ で判断すると倍近く越えており汚染度が高いといえる．ちなみに調査日の外気の平均濃度は公害局の資料[6]によると，COが 2.3ppm，Dust が0.05mg/m³ であった．

B駐車場……車路における温度は平均 20℃ 前後にあり，湿度も50～60%を維持しており比較的よい温熱状態であった．料金所内についても平均温度21.5℃，平均湿度52%であり，車路同様よい状態であったが，一時的現象として12～14時の時間帯に30℃近くの高温が記録されたが，これは料金所勤務者の操作により給気口よりの温風（温度53℃）を多量にとり入れたためであり，この時間帯を除けば中間期（秋）としての適温状態にある．温度や湿度は進入通路（スロープ）より外気の流入等により外気条件に左右されやすいが，今回の調査日が良い気象条件にあったことの影響も多分にあるが，この駐車場の構造条件および空調設備の整備（車路，料金所内とも陽圧になっている）のよさの影響の方が大きいと思われた．また炭酸ガス濃度による換気能をみると，料金所内，車路とも 0.1% を越える状況はみられず問題はない．

汚染条件の変動については図3，4に示す如くであるが，先のA駐車場に比べ浮遊粉塵量が低くなっているのが明らかである．同駐車場については以前にも同様な調査を行なっており，それとの比較においてCO, Dustをみると，今回は前回の調査よりさらに良好な環境状態であった．ちなみに一日の平均値でみてみると料金所内のCOは前回9.6ppm，今回8.3ppmであり，浮遊粉塵量は前回 3.0COHS/1000feet，今回2.1COHS/1000feet であった．また車路においてのCOは前回 15.9ppm が今回 7.4ppm，浮遊粉塵量は前回 4.1COHS/1000feet が今回 2.4COHS/1000feetといずれも低値を示している．空調機械設備の保守管理が前回と同様とすれば，今回も前回に近い値になるものと想定されたが，今回更に低い値となったことの影響として調査日の気象条件および駐車場利用の車台数の少なさが考えられた．つまり気象条件では調査日の前日が雨のため，車路および進入通路が適当な湿潤状態にあり，前回より乾燥状態でなかったため粉塵等の飛散がおさえられたこと，また利用台数については前回一日の入出庫が 1,600 台もあったが，今回は約30% 減でありその分車の動きが少ないため汚染物発生も低下

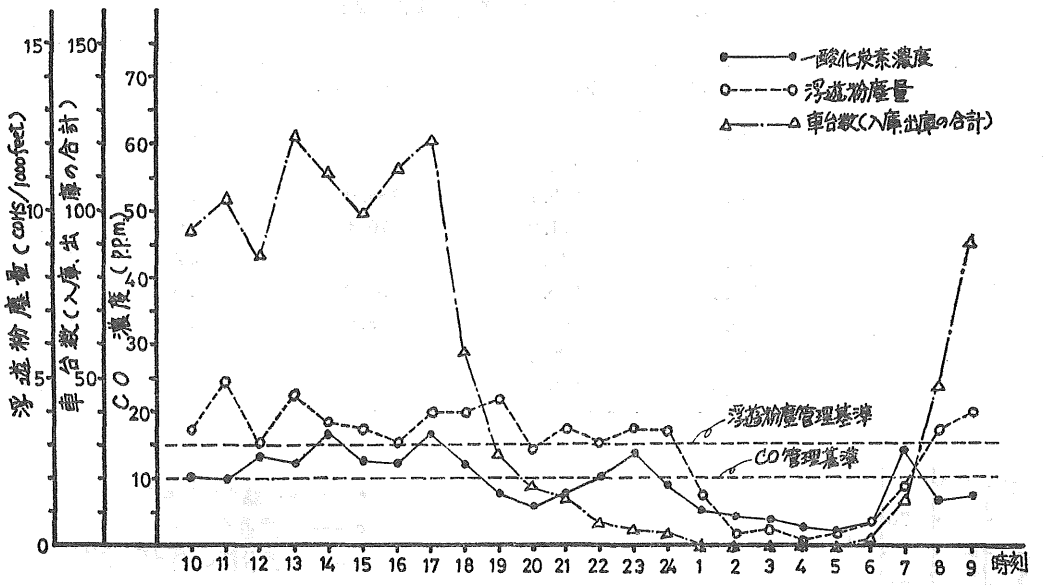


図 3. B駐車場料金所内の CO, DUST の変動

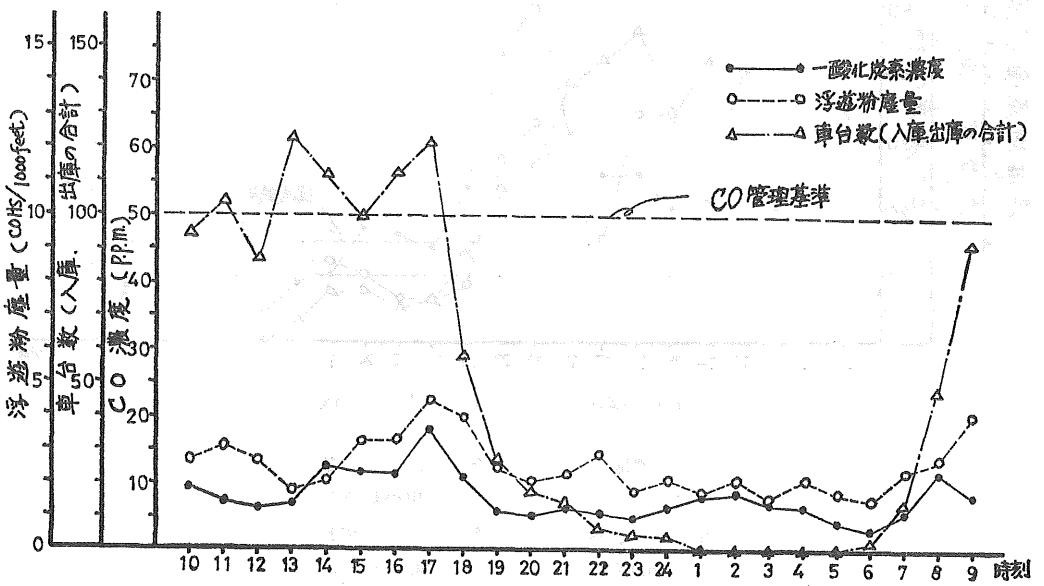


図 4. B駐車場車路の CO, DUST の変動

し，良好な結果を示したものと思われた．このことは特に車路において顕著であり，料金所内は大きな変化(低下)はみられず前回と同様な結果であったことから，当駐車場の料金所内においては現状の空調設備でも，COで10 ppm以下，Dust で2～3 COHS/1000feet (=0.1～0.15 mg/m³) の曝露があるということになろう．調査日における外気濃度は公害局の資料[7]から CO 3.0ppm，Dust 0.03mg/m³であった．

更に今回，排気ガスに起因する芳香族系炭化水素（ベンゼン，トルエン，エチルベンゼン，メタ，パラ，オルトーキシレン）の分析を行なった．これについては連続測定ができないので，真空瓶採取によるスポットサンプリングで行ない，25%アピエゾングリースL（クロモゾルブ W-AW）を用い，低温濃縮法により FID 検出器で分析した．結果は表-2に示す如くであるが，スポットサンプリングであり，測定場所での変動および経時変化

表 2. B駐車場における芳香族炭化水素濃度

(単位：ppb)

場所及び時刻		ベンゼン	トルエン	エチルベンゼン	m-, p-キシレン	o-キシレン
AM 9時	料金所内	58.2	332.7	157.8	412.3	255.1
	車路	75.6	104.7	—	118.2	—
PM 12時	料金所内	88.1	249.7	184.9	530.9	372.6
	車路	78.3	471.2	70.4	257.6	90.4
17時	料金所内	39.5	145.0	—	378.2	425.2
	車路	175.7	265.5	50.9	180.0	92.6
22時	料金所内	80.5	302.7	5.9	404.2	134.8
	車路	15.9	129.4	—	—	—
AM 6時	車路	129.4	313.9	—	69.0	81.9

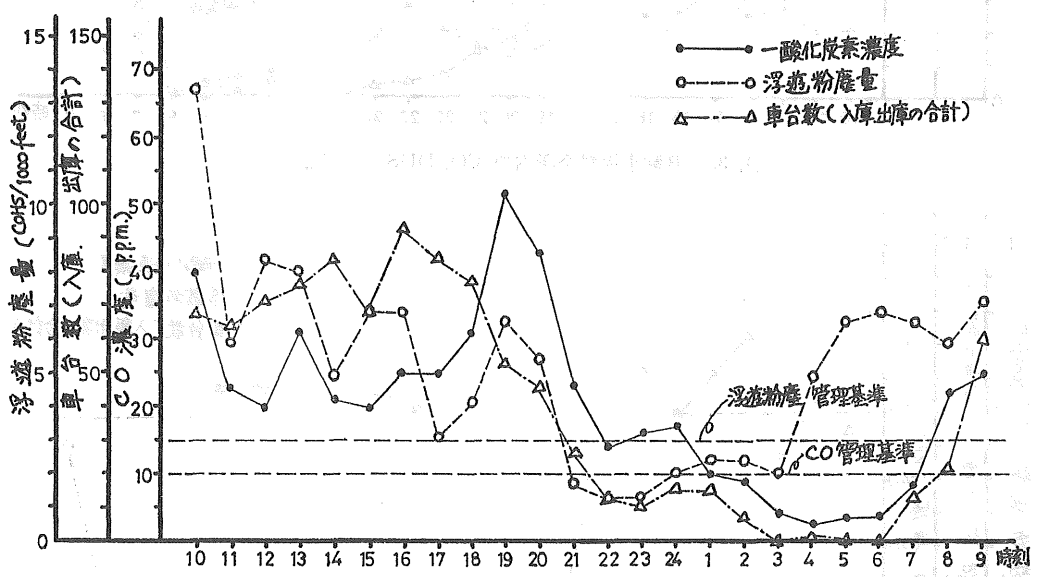


図 5. C駐車場料金所内の CO, DUST の変動

の考察は難しいので，環境大気中のこれらの濃度[9]と比較してみた．その結果，ベンゼンは10倍程度，トルエンが2～3倍，エチルベンゼンで10～100倍，メタ，パラーキシレンで100倍，オルトーキシレンで50～200倍のオーダーで駐車場内空気の方が高く，現状の給排気設備でも大気中より拡散の悪い地下では，これら排気ガスの成分が一定程度停滞していることが推定された．

C駐車場……まず温熱条件では，車路の温度は平均11.3℃，湿度は33%であり，調査日の外気の影響もありやや肌寒い状況であったが，料金所内ではウインドゥ型暖房器および電熱器を利用しているため，平均温度21.4℃，平均湿度43%を保ち，冬季の温熱としては良好な状態であった．次に換気能を炭酸ガス濃度でみてみると，車路では0.04%台と外気と同じで問題はなかったが，料金所内において基準値を上回る現象が夜間にみられた．当駐車場の料金所には給気のための給気口がなく，自然換気にたよっており，しかも狭いため2名以上の在室によって起ったものであった．つまり自然換気の弱い狭い空間に必要以上（この場合2名であったが）の人間が在室することで人間の呼気が停滞し，高濃度になることを示したわけである．次にCO, Dustの一日の変動については図5，6に示したが，全体的に浮遊粉塵量が高く，特に車路におけるパターンは先のA駐車場と似かよっている．一日の平均値を求めてみると，車路のCOは9.3 ppm, Dustは4.8COHS/1000feetであったが，料金所内はCO 15.6ppm, Dust 4.3COHS/1000feetとDustについては車路，料金所内とも同じ程度であったが，COについては料金所内の方が圧倒的に高く，料金所内

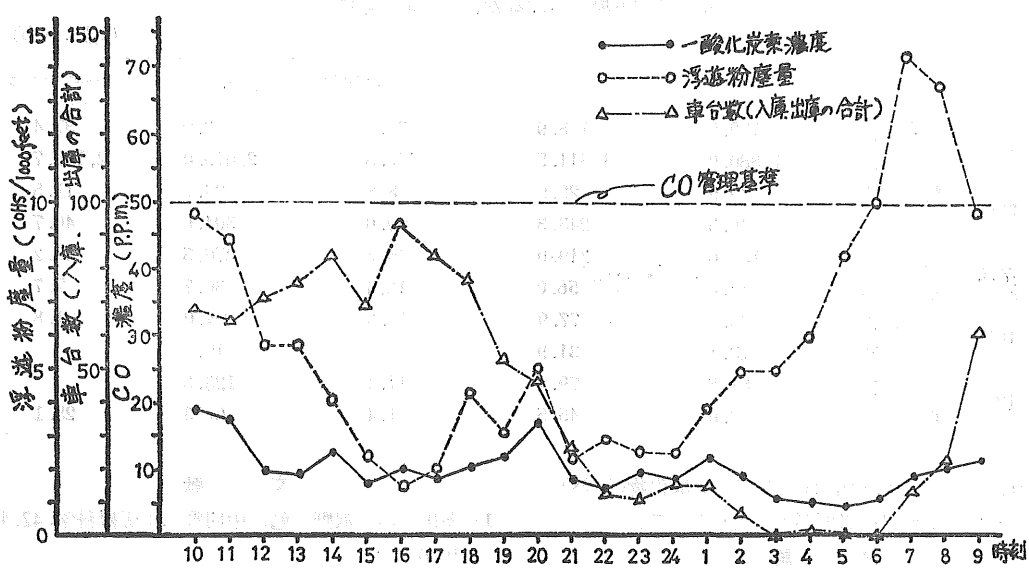


図 6. C駐車場車路の CO, DUST の変動

を居室としてみた場合の基準10ppmを越えていることは好ましくない現状であるが，この原因は浮遊粉塵測定のためのテープエアーサンプラーのスポット（採塵表面）をみると喫煙であると断定できる．すなわち，日中の高濃度の時のろ紙の色調が車路のカーボンブラックに対してたばこのタール分の茶系の色調を呈しているからであるが，総浮遊粉塵量に対するカーボンブラックとタール分の比率については不明である．ちなみに調査日の外気の平均濃度は公害局の資料[8]より CO 2.3ppm Dust 0.04 mg/m³であった．

今回の結果を先に行なったB駐車場と比較してみると，CO濃度は車路ではC駐車場の方が若干高めではあるが同程度とみなしてもよいと思われるが，料金所内は2倍弱程度，Dust については車路，料金所とも2倍程度汚染されていると言える．Dust飛散の原因の1つと考えられる車の移動量(入庫と出庫の合計)についてはB駐車場の方が多く，濃度ではC駐車場の方が高いことは調査日の気象条件の違いもあるが，これよりもむしろ駐車場の構造および管理面(特に堆積塵の除去を含めた清掃)の違いを推定させる．C駐車場（A駐車場も同様）は都心の交通量の多い通りの下に作られており，一般道路より50～100mの側道を通って駐車場入口があるため，この側道上に相当程度の堆積塵がみられる（水洗いによる清掃は場内ほど頻繁に行なっていない）．このような構造上の特徴があるため，夜間から早朝にかけて駐車場の利用台数が少ないにもかかわらず，この時間帯が多いことは側道からのとりこみが行なわれていると考えられる．このことは特に排気運転の時に問題となっている．B駐車場は同じような通りの下に作られているが，側道がなく，一般道路よりスロープで入，出庫できる形状である．したがって駐車場自体が独立の箱型となっているため給排気のバランスが多少くずれても，そのような現象にならないものと考える．なお，地下駐車場の換気方法による効果については富田ら[10]の報告があり，特にCOについては換気効果の順位として，全給排，排気のみ，給気のみとしている．

C駐車場についても芳香族炭化水素の濃度変化を測定してみた．測定日当日の試料については分析操作のミスが生じたため，3日後にあらためて試料を採取し分析した．結果は表3に示す如くであり，夕方時の車の動きの多い時に車路の方が高くなる傾向がみられたが，あとの時間帯では料金所内外による大きな違いはみられなかった．前回同様，大気中濃度と比べてみるとベンゼンで10倍，トルエンで5倍，エチルベンゼンで10～100倍，メタ，パラーキシレンで10～100倍，オルトーキシレンで50倍程度と高く，先のB駐車場内と同じような濃度範囲にあり，規定の10回/h以上の換気を行なっていても，地下駐車場での炭化水素の濃度は相当変動するものの，濃度レベルはこの辺にあるものと思われた．

いずれの駐車場も給気のための空気取入口の位置が地上5m以内と低く，交通渋滞時および特に冬期の逆転層形成時には排気ガスが取入口から相当程度流入するもの

表 3. C駐車場における芳香族炭化水素濃度

(単位：ppb)

場所および時刻		ベンゼン	トルエン	エチルベンゼン	m-, p-キシレン	o-キシレン
PM 17時	料金所内	100.0	178.9	34.1	133.0	37.4
	車路	1,880.0	1,811.5	467.5	2,615.0	2,182.7
22時	料金所内	39.9	22.9	8.8	23.1	11.5
	車路	49.3	243.3	99.0	304.6	40.7
AM 7時	料金所内	157.6	219.0	35.5	276.5	49.2
	車路	17.6	56.0	12.4	36.7	7.7
10時	料金所内	26.2	77.9	18.3	94.0	21.8
	車路	13.1	31.9	—	19.9	—
PM 12時	料金所内	81.8	79.1	11.4	123.3	—
	車路	30.0	45.5	11.4	67.3	28.1

と思われた．更に，今後の課題として窒素酸化物(NOx)の動態についても検討の必要があると思われる．

結　語

1) 駐車場内（車路）における平均ＣＯ濃度は，いずれの駐車場も地下駐要綱の基準値50ppm以下であった．

2) 料金所内のＣＯ濃度は，設備環境の良し悪し（給気口の有無）に左右されるため，給気口を設け室内を陽圧にする必要がある．しかし，喫煙がともなうと相当程度濃度上昇する．

3) Dust についてはＢ駐車場を除いて相当高く，構造上の影響（側道よりの堆積塵のとりこみ）が関与していると思われた．そして，その変動は自動車の移動量のパターンと似かよっている．

4) 駐車場内炭化水素は，基準（10回/h）以上の換気がなされていても，大気中濃度の 10～100 倍あることが認められた．

（本研究の概要は，日本公衆衛生学会39回大会1980年10月で発表した．）

文　献

1) 多田　治，沢野　勉，中明賢二：労働科学，42，463，1966
2) 石堂正三郎ら：日本建築学会大会学術講演梗概集，219，1973
3) 地下街環境調査研究委員会：ビル管理に関する人体影響調査研究，237，1972
4) 労働省労働基準局：地下駐車場排気ガス障害予防対策要綱，基発第223号，1971
5) 佐藤泰仁：未発表資料
6) 東京都公害局監視部：大気汚染常時測定室測定結果報告，昭和52年11月
7) 東京都公害局大気保全部：大気汚染常時測定室測定結果報告，昭和53年11月
8) 東京都公害局大気保全部：大気汚染常時測定室測定結果報告，昭和55年１月
9) 大阪市立環境科学研究所：大気汚染研究全国協議会大会抄録，324，1977
10) 富田絹子，春木孝祐，瓦家敏男：生活衛生，18，138，1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 219-225, 1980

ラットの肺および肝中の酵素に対する NO_2 曝露の影響

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*

Effect of NO_2 Exposure on Enzyme Activities in Lung and Liver of Rats

TAKAHITO SUZUKI*, MASANOBU OHSAWA*, FUMIO KANOH*, MASAO FUKUDA*, TOSHIHIDE KASAHARA*, NOBUE TERADA* and ISAO MIZOGUCHI*

Rats were continuously exposed to NO_2 at the concentrations of 0.5, 2, 4 and 8 ppm for four weeks, and then sacrificed at one week intervals. NO_2 exposed rats tended to increase the lung weight and inversely to decrease the liver weight as NO_2 concentration became higher. The elevations of enzyme activities of phosphfructokinase (PFK), lactate dehydrogenase (LDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSSG-R), β-glucuronidase (β-Gl) and γ-glutamyl transpeptidase (γ-GTP) in lung tissues were observed during exposure of rats exposed especially to 8 ppm NO_2. In the liver tissues of rats exposed to NO_2, activities of G-6-PD were inhibited and that of amylase elevated during exposure, and those of LDH and β-Gl increased at four week.

These results suggest that glycometabolic enzymes in the lung and liver tissues were stimulated following NO_2 exposure and that the effect of NO_2 on pentose monophosphate shunt enzymes of the lung may be related to pulmonary protection against peroxidation damage.

Keywords : nitrogen dioxide, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, β-glucuronidase, γ-glutamyl transpeptidase, amylase, rat

緒　言

NO_2ガスを吸入した場合，第一次標的臓器である肺組織内に摂取されて，肺気腫[1,2]，肺繊維症[3]，肺胞壁肥厚[4]などの病理学的障害をもたらすだけでなく，それに伴う代謝障害が引き起こされることが数多く報告されている．肺に摂取されたNO_2の大部分は血液を介して肺外に移行することも報告されており[5,6]，NO_2が循環する過程における各種の臓器に対する影響，ひいては全身的影響についても病理学的，生化学的アプローチが行われている．一般に何らかの障害を生体が受けた場合に，生化学的な変化は比較的早期にその影響を把握でき，量—反応関係をもとめやすいために，障害に対する鋭敏で有効な指標として考えられる．前報で，NO_2曝露ラットの血液における生化学的諸指標の検索を行い，比較的低濃度のNO_2に対しても amylase および β-glucuronidase 活性と免疫グロブリン IgA 含量が変動することを認めた[7]．今回，肺および肝におけるこれらの酵素を含む8種の酵素に対する NO_2 曝露の影響を検討した結果，肺はもとより肝における代謝系にまでその影響が及ぶことを示唆する知見を得たので報告する．

実験方法

実験動物は Sprage-Dawley 系の7週令の雄ラットを用い，0, 0.5, 2, 4, 8ppmの5段階の NO_2 濃度群に分けて4週間の連続曝露を行い，1週間ごとに屠殺した．曝露条件等は前報に記載したごとく行った．肺および肝は1/15モルのリン酸緩衝液（pH7.5）を10倍容加えてから肺は Ultra-Turrax を用い，肝は Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズし，16000×gで30分間遠沈した上清を検体として，PFK[8]，LDH，G-6-PD[9]，GSSG-R[10]，GSH-Px[11]，β-Gl[12]，γ-GTP，amylase の酵素活性を測定した．LDH には UV 法の LDH キット（ベーリンガー，No. 124907），γ-GTP には γ-GTP キット（和光純薬，No. 273-32701），amylase には Dyamyl-L キット（小野薬品，No. 7284）を用いて測定を行った．尚，肺および肝における測定の際には原報の方法をそれぞれ基質濃度，反応時間について検討を加えた後

* 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

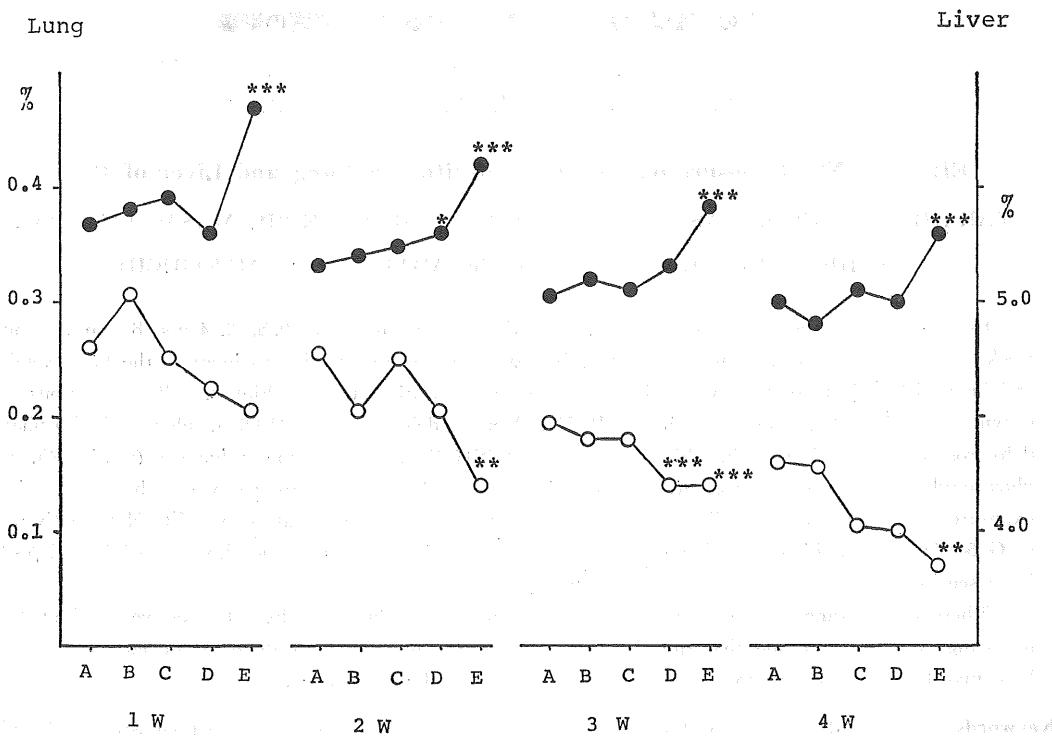


Fig. 1. Average of Percent Value of Lung or Liver Weight to Body Weight on Each Animal at Various Weeks
Each graph point shows average on lung of six rats(●) and average on liver of eight rats (○).
* P<0.05 ** P<0.02 *** P<0.01
A : control, B : 0.5ppm, C : 2ppm, D : 4ppm, E : 8ppm

に一部改変して行った．また，蛋白含量の測定には，Lowry の方法を用いた[13]．

実験結果

体重の変化は対照群と比較して差は認められなかった．腎臓，副腎，脾臓，心臓の重量の変化は認められなかったが，図1に示すごとく，曝露濃度が大きくなるにつれて肺体重比重量は増加し，逆に肝体重比重量は減少するが，対照群と比較して8ppm 曝露群では肺重量に曝露期間を通じて17～26%の有意な増加が認められ，肝重量では2週目以降に8～15%の有意な減少が認められた．しかしg湿重量当り組織蛋白含量は肺では変化なく，肝でも4週目の8ppm 群で11%の有意な増加を示した以外は変化は認められなかった．図2，図3に示したものは各週における対照群の各酵素活性の平均値を100として，NO_2 曝露群の%変化量の平均値を濃度別にプロットしたものである．表1，表2は各週の対照群における組織1グラム当りの酵素活性値と組織中の総活性値を示したものである．肺での変化は図2に示すごとく GSH-Px, GSSG-R, G-6-PD, PFK, LDH, β-Gl, γ-GTP 活性の上昇が曝露期間を通じて8ppm 群で明瞭に認められ，4ppm 群でも GSH-Px, GSSG-R 活性の上昇が認められた．更に GSH-Px と GSSG-R 活性の変化と曝露濃度との相関関係は危険率1%以下で各週とも量—反応関係が認められた．肝での変化は図3で示すごとく，LDH, β-Gl は3週目までは余り変動が認められないが4週目には特に8ppm 群では活性上昇を示した．G-6-PD は曝露期間中は活性低下を示した．amylase は3週目から上昇しているが，8ppm 群では1週目から活性上昇が認められた．肺と肝との比較では，amylase と β-Gl は同じような変動パターンを示したが，G-6-PD はミラー関係のパターンが認められた．

考察

NO_2曝露群の肺重量の増加は如何なる理由によるものであるのか．Freeman らは10～25ppm の NO_2 にラットを曝露した時の肺重量の増加の原因は肺胞壁および末端気管支に分布する肺胞上皮細胞の肥大，肺胞間質のコラ

Table 1. Average Value of Enzyme Activity per gram Tissue on Lung or Liver of Control Rat at Various Weeks

Enzymes	Lung				Liver			
	1 W	2 W	3 W	4 W	1 W	2 W	3 W	4 W
GSH-Px[a]	5.19±0.36#	5.60±0.28	5.20±0.33	4.93±0.21	13.2±1.90	14.4±1.00	14.2±1.70	13.4±1.20
GSSG-R[a]	6.03±0.92	5.19±0.67	5.13±0.74	4.79±0.80	12.3±3.35	10.5±2.21	12.3±1.15	10.7±12.0
G-6-PD[b]	1.51±0.19	1.63±0.63	2.21±0.32	2.73±0.48	2.39±0.42	2.21±0.50	1.92±0.38	2.85±0.42
PFK[c]	992±213	972±99	936±86	943±235	—	—	—	—
LDH[d]	68.2±14.3	88.0±18.0	66.9±11.1	72.3±31.3	446±57	440±86	452±40	374±159
Amylase[e]	17.6±3.90	15.7±4.53	14.1±4.08	14.6±3.54	5.61±2.83	10.2±2.16	6.47±1.17	8.23±3.54
β-Gl[f]	3.39±0.28	3.37±0.26	3.67±0.49	3.60±0.42	9.04±2.34	10.2±1.44	9.32±1.22	8.05±2.28
γ-GTP[g]	37.5±3.05	44.6±9.16	48.6±7.87	45.1±3.45	—	—	—	—

Data are expressed as mean and standard deviation on lung of six animals and on liver of eight animals.
a : μ moles NADPH oxidized/min, b : μ moles NADPH formed/min,
c : n moles NADH oxidized/min, d : μ moles NADH oxidized/min,
e : Dyamyl-L units f : Free p-nitrophenol mg/hr,
g : m units

Table 2. Average Value of Enzyme Activity per Whole Tissue on Lung or Liver of Control Rat at Various Weeks

Enzymes	Lung				Liver			
	1 W	2 W	3 W	4 W	1 W	2 W	3 W	4 W
GSH-Px	5.02±0.56	6.37±0.47	5.72±0.46	5.71±0.47	169±30.0	230±31.0	234±40.0	222±34.0
GSSG-R	6.10±0.72	6.02±0.68	5.79±0.41	5.76±0.63	156±33.0	169±14.0	202±26.0	175±16.0
G-6-PD	1.47±0.24	1.87±0.79	2.43±0.38	3.15±0.54	30.5±5.10	35.9±8.20	31.8±8.30	47.0±8.20
PFK	894±247	1100±73.0	1030±126	1117±298	—	—	—	—
LDH	65.9±14.1	99.9±19.5	73.4±11.9	87.7±42.6	5717±761	7155±1417	7411±858	6100±2574
Amylase	16.8±2.90	18.3±6.90	15.7±6.10	15.4±4.00	71.5±35.3	166±34.1	91.5±32.1	134±52.0
β-GL	3.28±0.40	3.83±0.27	4.02±0.50	4.16±0.37	117±32.0	166±29.0	152±16.0	132±35.5
γ-GTP	36.2±3.41	51.1±12.9	53.8±11.2	52.4±7.14	—	—	—	—

ーゲンやエラスチンの増加によるもので，血液量や浮腫液によるものではなく，この濃度では肺水腫や壊死を起こさないと報告している[14,15]．一方，服部らは0.5～0.8 ppm に30～45日間曝露したマウスで終末気管支から肺胞にかけての上皮細胞の増殖と共に肺胞壁間質の浮腫性変化を報告している[3,16]．Freeman らは光顕レベルで，服部らは電顕レベルでの検索という違いに起因しているとも思われるが，竹中らによって NO_2 曝露に対する LC_{50} や肺水腫形成に対する種属差による感受性の違いを報告しているところから[17]，種属差の点も関係しているものと思われる．我々の結果では湿重量当りの肺組織蛋白含量に変化は認められず，また，少数例の光顕的病理所見ではあるが肺組織に浮腫性変化は認められず，増殖性の変化が認められたので，肺重量の増加は単なる肺水腫ではなく，肺実質の増殖性変化によるものと思われる．一方，肝重量の減少の原因としては肝蛋白含量の減少，肝含水量の減少，グリコーゲンや脂質の減少，肝実質の破壊などが考えられるが，まず，第一に g 湿重量当り蛋白含量も全組織における蛋白含量も余り変化は認められなかった．第二には仮りに肝含水量の減少が生じたとしたならば，g 湿重量当り蛋白含量は増加する筈であるが変化は認められなかった．第三にグリコーゲンや脂質の減少によるものと考えた場合，肝におけるグリコーゲンの含量は 2.5～7.2%[18] であり，脂質は6%であるので[19] 例えば，2週目の8ppm 群の肝重量は15%減少していることから考えても，全てのグルコースと脂質の減少が生じるとは考えられない．第四に今回用いた曝露条件でこのような短時間のうちにこれ程の重量変化をもたらす肝

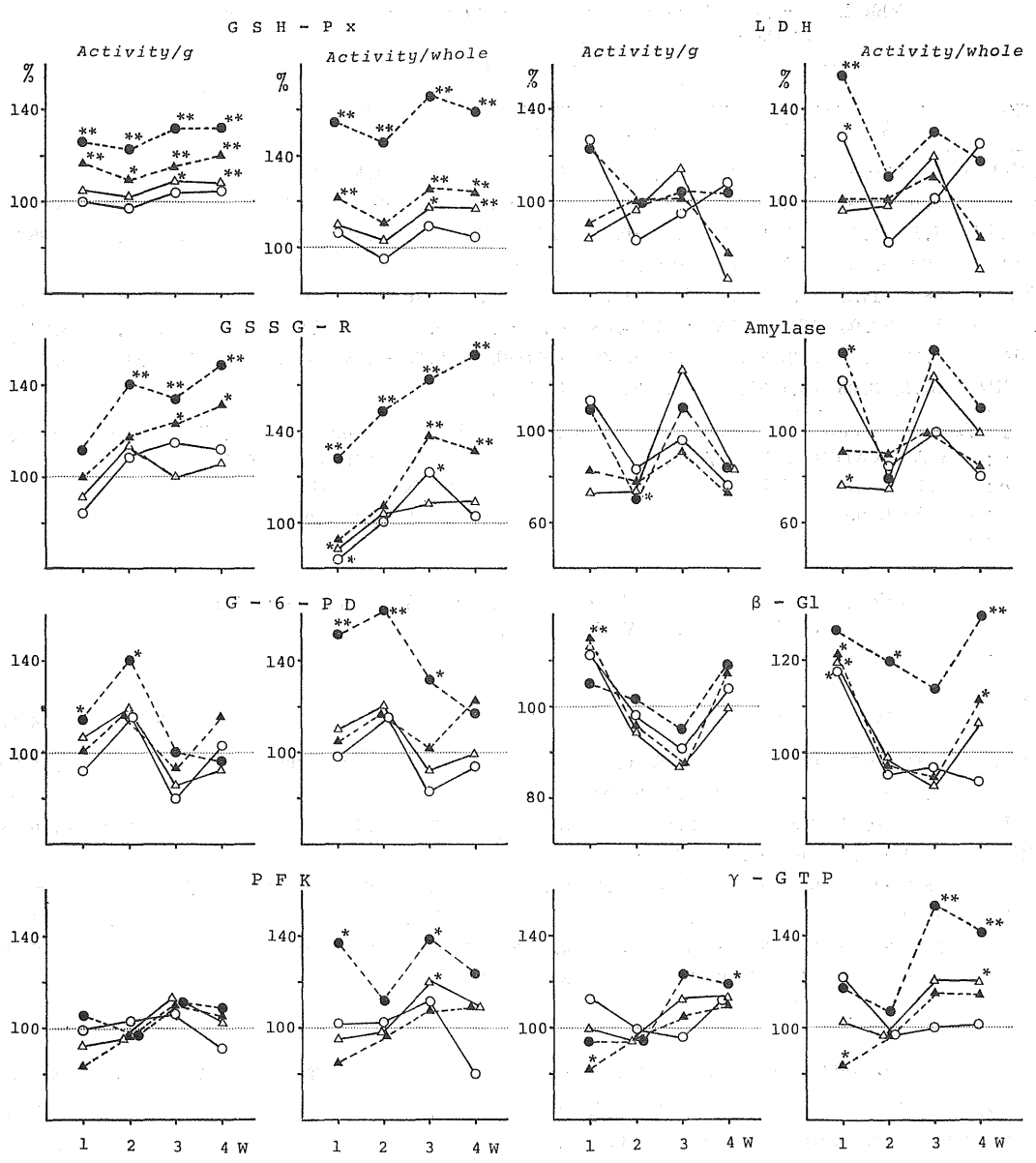


Fig. 2. Percent Changes of Various Enzyme Activities per gram lung or per Whole lung on Rats Exposed to NO_2 against Average Value of Control at Various Weeks

Each graph point shows average on lung of six rats.
○ : 0.5ppm, △ : 2ppm, ▲ : 4ppm, ● : 8ppm * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$

実質の破壊は恐らく起こり得ないと思われる．しかし，8ppm NO_2 にラットを1カ月間連続曝露した時，肝グリコーゲンの減少も報告されていることから[20]，肝重量の減少の原因の一つとしてグリコーゲンの過剰消費の可能性もある．また，G-6-PD を律速酵素とする pentose リン酸回路は脂肪酸や糖蛋白などの生合成に必要な NADPH の生産や核酸合成に必要な pentose の供給を行っており，我々の結果からも，G-6-PD 活性は曝露期間中に活性低下を示していたことから，何らかの肝における成長の抑制が生じた結果とも想像されるが，NO_2 による肝重量の減少の原因についての解明は今後の課題として検討したい．

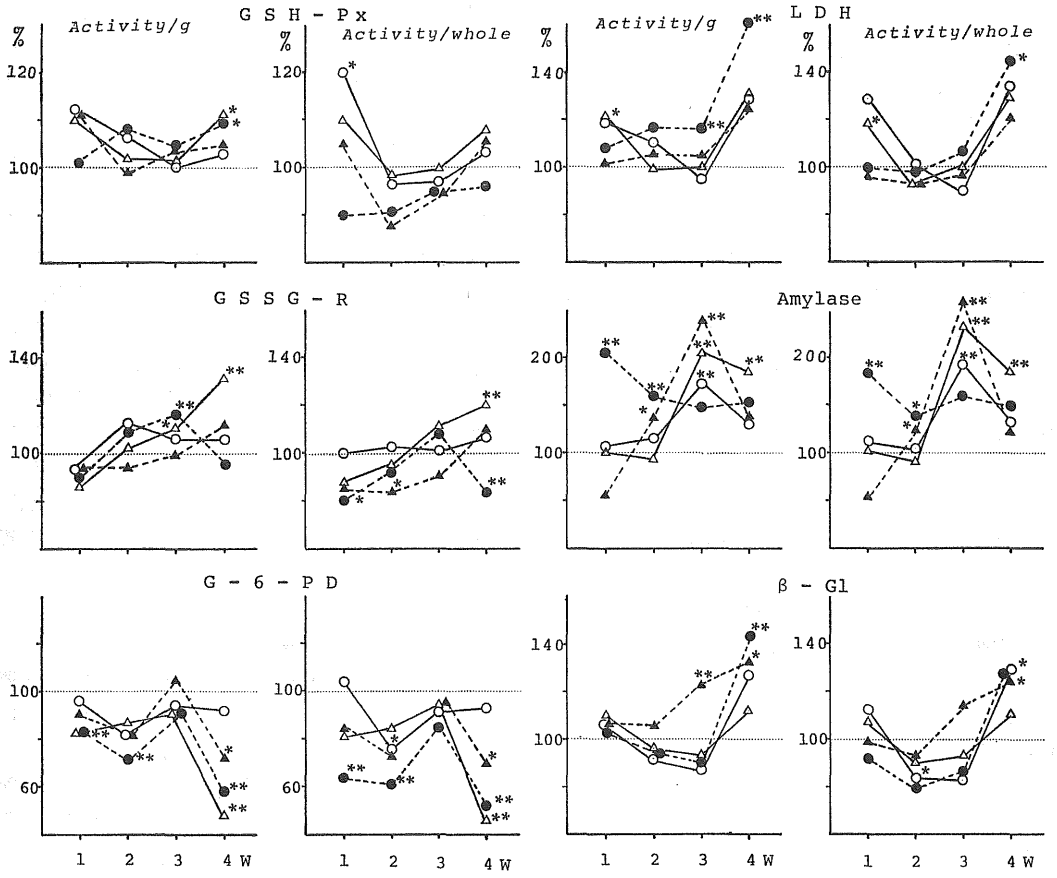


Fig. 3. Percent Changes of Various Enzyme Activities per gram Liver or per Whole Liver on Rats Exposed to NO_2 against Average Value of Control at Various Weeks

Each graph point shows average on liver of eight rats.
○ : 0.5ppm, △ : 2ppm, ▲ : 4ppm, ● : 8ppm * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$

肺において，解糖系の律速酵素であるPFK，解糖系の一部であるLDHや多糖とムコ多糖を分解するβ-Glの活性上昇が8ppmのNO_2曝露群で認められたことから，肺における糖質の代謝亢進が考えられると同時に，G-6-PDの活性上昇も認められたことから肺のエネルギー代謝の活発化が考えられる．また，組織の修復過程ではG-6-PD活性の上昇が報告されており[21]，更に，肺胞Ⅱ型上皮細胞がNO_2によって増殖すること[22-24]，このⅡ型上皮細胞ではG-6-PD活性が高いことなどを考えると[25]，NO_2の傷害に対する生体側の反応によるものと思われる．

また，酸化力の強い物質，例えば，O_3[26]，H_2O_2[27]などの毒性に対する防禦機構（Peroxidative metabolic pathway, PMP）の酵素としてGSH-Px, GSSG-R, G-6-PDが活性化することが知られているが，我々の結果でもこれらの酵素の活性上昇が認められたことから，NO_2に対してもこのPMP系機構の活性化が考えられる．しかし，Chowらはラットに1～6.2ppmのNO_2を4日間連続曝露してもGSSG-R, G-6-PD活性の上昇が起こるが，GSH-Px活性の上昇が起こらないと報告していること[28]，深瀬らもマウスに6ppm NO_2を3～4時間/日，30日間の間欠曝露でも同様の結果を示しており，更に，28ppmという高濃度のNO_2の7日間の間欠曝露ではこの三つの酵素はすべて活性上昇すること，15ppm間欠曝露では三つの酵素は活性が変わらないことを報告している[29,30]．一方，嵯峨井らはラットに10ppm NO_2を10日間連続曝露した場合，曝露開始5日目から曝露終了までこれらすべての酵素活性が上昇することを報告している[31]．以上の結果から判断すると連続曝露と間欠曝露の違い，曝露時間および曝露濃度などの曝露条件の違い

によって，特に，GSH-Px 活性の変化に対する差異が生じているものと思われる．

佐藤らはラットへ8ppm NO_2 を1カ月間連続曝露した場合，肺のγ-GTP活性が上昇することを報告している[20]．この結果は我々の結果と一致している．γ-GTPは大部分がマイクロソーム分画にあり，この酵素は細胞膜の内側に局在し，γ-グルタミンペプチドの水解およびγ-グルタミルサイクルの一員として細胞の外側から細胞内にアミノ酸を輸送することが知られている[32,33]．このNO_2曝露による肺 γ-GTP 活性の上昇は肺組織の増殖性変化と関連しているものと思われる．

NO_2 8ppm に1カ月間曝露されたラットの肝グリコーゲン量，肝グルコース量の減少の報告から[20]，NO_2による肝の糖代謝の亢進が予想された．我々の結果からも，特に8ppm群では，グリコーゲンや殿粉を分解する酵素であるamylaseは1週目から活性が上昇し，多糖類を分解する酵素であるβ-Glと解糖系酵素であるLDHは4週目に活性上昇が起こることから，NO_2曝露によって肝の糖代謝が亢進されることが示唆された．一方，G-6-PDは1週目から活性低下を示した理由は現時点では不明ではあるが，グルコースのほとんど大部分が代謝されるのは解糖系の主鎖である Embden-Meyerhof 回路であることを考えると，G-6-PD活性の低下はもしかしたらG-6-PDの基質であるグルコース-6-リン酸が主鎖回路で大部分消費されたためかも知れないが今後の検討が必要と思われる．

前報では血中 amylase 活性の NO_2 による活性低下を報告した．尚，血中 amylase 活性と肝の総 amylase 活性の相関関係を調べてみると危険率1％以下で逆相関関係が認められた．血中 amylase は膵以外の臓器もそのoriginとなり[34]，また，血中amylaseと肝組織のamylaseとで易動度が一致するアイソザイムが存在することから肝由来のamylaseの存在が確認されており[35,36]，同時に肝は血中のamylaseレベルの調節に主要な役割を果していることも報告されている[37,38]．一般に血中amylaseは糖質利用の亢進時に低下し，糖質利用の低下に際して上昇する．これらから判断すると，血中amylase活性の低下は肝における糖代謝の亢進によるamylase需要度が肝で増加したために生じたものと思われる．また，0.5ppm程度の NO_2 曝露によって肝と血中 amylase 活性の変動が認められたのでこの酵素は鋭敏な指標の一つとして考えられる．

Levvy らは動物実験で肝 β-Gl 活性の上昇は肝細胞の再生過程と一致すること，すなわち，肝 β-Gl 活性の上昇は肝切除後に残存肝の肥大増殖と一致することを示した[39]．我々の結果では，NO_2曝露による肝の糖代謝亢進の可能性のあること，8 ppm 群では蛋白含量の増加が認められたことを考えると，4週目における β-Gl 活性の上昇は肝での生合成の僅かな亢進によるものなのだろうか．前報では血中 β-Gl 活性の1週目の低下と4週目の低下傾向を報告したが，この血中 β-Gl 活性と肝の総 β-Gl 活性の相関関係を調べてみると，1週目では危険率5％以下で，4週目では1％以下で逆相関関係が認められた．β-Gl は哺乳動物のほとんどあらゆる組織や体液中に広く分布するが，特に肝，腎，脾などに活性が高く[40]，血中 β-Gl の主たる origin は肝である[41]．血中 β-Gl 活性は肝障害によって増加すること，すなわち，肝機能障害の患者[42]や四塩化炭素投与のラット[43]で血中 β-Gl 活性の上昇が起こるが，この場合は明らかに肝細胞の壊死などが原因と思われる．NO_2 曝露による血中 β-Gl 活性の低下は，今回の曝露条件の NO_2 曝露による肝の器質的変化は起こらないと思われるので，むしろ，肝における β-Gl 需要の反映として生じたものであろう．

要　約

SD 系雄ラットに0.5，2，4，8 ppm の NO_2 に4週間連続曝露し，1週間ごとに屠殺したラットの肺および肝における酵素活性の変動を検討した．

8 ppm 曝露群では曝露期間を通じて肺重量に17～26％の有意な増加が認められた．逆に肝重量は2週目以降に8～15％の有意な減少が認められた．それらの変化は曝露した NO_2 濃度に比例する傾向を示した．糖代謝に関連する酵素の活性上昇が肺だけでなく肝においても認められ，特に，NO_2の影響が肝にまで及ぶことを示唆する興味ある知見が得られた．pentoseリン酸回路が活性化することが肺において認められ，この活性化はNO_2に対する防禦機構として作用することが示唆された．amylaseは0.5ppm程度の NO_2に対しても血液と肝において変動する鋭敏な指標の一つとして考えられた．

（本研究は昭和54年度当研究所調査研究課題「複合大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) 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) Hattori, S., and Takemura, K.: *J. Clin. Microscopy*, 6, 350, 1973
4) 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
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) 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：東京衛研年報, 30-1, 183, 1979
8) Mansour, T. E.: *Methods in Enzymology*, 9, 430, 1966, Academic Press, New York
9) Langdom, R. G.: *Methods in Enzymology*, 9, 126, 1966, Academic Press, New York
10) Beutler, E.: *J. Clin. Invest.*, 48, 1957, 1969
11) Paglia, D. E., and Valentine, W. N.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 70, 158, 1967
12) Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H., Nobunaga, M., Masuya, T., and Sawada, T.: *Chem. Pharmac. Bull.* 8, 239, 1960
13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951
14) Freeman, G., Crane S. C., Stephens, R. J., and Furiosi, N. J.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 98, 429, 1968
15) Freeman, G., Crane, S. C., and Furiosi, N. J.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 100, 662, 1969
16) 服部正次, 建石竜平, 宝来 威, 中島泰知, 三浦武夫：日本胸部疾患学会雑誌, 10, 16, 1972
17) 竹中参二, 堀内博人, 清水不二雄：国立公害研究所研究報告, 8, 7, 1979
18) 日本生化学会編：生化学データーブック(Ⅰ), 1705, 1979, 東京化学同人, 東京
19) Cook, R. P.: *Distribution of Sterols in Organisms and in Tissue, in Cholesterol*, Academie Press, New York, 145, 1958
20) 佐藤光男, 長谷川弘道, 須藤綾子, 本間健資：第52回日本産業衛生学会講演集, 558, 1979
21) Beaconsfield, P., and Carpi, A.: *Nature*, 201, 825, 1964
22) Yuen, T. G. H., Sherwin, R. P., and Angeles, L.: *Arch. Environ. Health*, 22, 178, 1971
23) Evans, M. J., and Stephens, R. J.: *Arch. Intern. Med.* 128, 74, 1971
24) Sherwin, R. P., Dibble, J., and Weiner, J.: *Arch. Environ. Health*, 24, 43, 1972
25) Sorokin, S.: *Arch. Intern. Med.*, 126, 450, 1970
26) Chow, C. K., and Tappel, A. L.: *Arch. Environ. Health*, 26, 205, 1973
27) Cohen, G., and Hochstein, P.: *Biochemistry*, 2, 1420, 1963
28) Chow, C. K., Dillard, C. J., and Tappel, A. L.: *Environ. Res.*, 7, 311, 1974
29) 深瀬治, 礒村公郎, 渡辺弘：大気汚染研究, 11, 65, 1976
30) 深瀬治：日本衛生学雑誌, 34, 777, 1980
31) 嵯峨井勝, 久保田憲太郎：第20回大気汚染学会講演集, 363, 1979
32) Meister, A.: *Science*, 180, 33, 1973
33) Inoue, M., Moriuchi, S., and Morino, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 1104, 1977
34) 和嶋 毅, 水島 淳, 高橋 浩：医学と生物学, 67, 158, 1963
35) Hammerton, K., and Messer, M.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 244, 441, 1971
36) Messer, M., and Dean, R. T.: *Biochem. J.*, 151, 17, 1975
37) Janowitz, H. D., and Dreiling, D. A.: *Am. J. Med.*, 27, 924, 1959
38) Dreiling, D. A., Janowitz, H. D., and Josephberg, L. J.: *Ann. Int. Med.*, 58, 235, 1963
39) Levvy, G. A., Kerr, L. M. H., and Campbell, J. G.: *Biochem, J.*, 42, 462, 1948
40) Pineda, E. P., Goldberg, J. A., Banks, B. M., and Rutenberg, A. M.: *Gastroenterology*, 36, 202, 1959
41) Wakabayashi, M.: *Methabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*, 2, 519, 1970, Academic Press, New York
42) Goldberg, J. A., Pineda, B. M., Banks, B. M., and Rutenberg, A. M.: *Gastroenterology*, 36, 193, 1959
43) 伊藤文雄：臨床病理, 13, 601, 1965

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 226-228, 1980

NO_2 長期暴露によるラットの網状赤血球数の変動

福田雅夫*, 狩野文雄*, 寺田伸枝*, 溝口 勲*

Effects of Long-Term NO_2 Exposure on Reticulocytes of Rats

MASAO FUKUDA*, FUMIO KANOH*, NOBUE TERADA* and ISAO MIZOGUCHI*

Changes of reticulocytes of rats exposed to nitrogen dioxide (NO_2) were studied. Concentrations of NO_2 were 0.3, 0.5 and 1.0ppm and exposure times were 3, 6 and 12 months. Reticulocyte counts of rats exposed to 0.5 and 1.0 ppm NO_2 increased significantly at 3, 6 and 12 months as compared with the control values. On the other hand, erythrocyte counts did not elevate during all exposure times. It is suggested that reticulocyte counts may be a more sensitive index to NO_2.

Keywords : reticulocyte, erythrocyte, rat, nitrogen dioxide

緒 言

窒素酸化物 (NOx) は健康への直接的な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大気汚染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. 現在NO_2の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ー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指標の探究を課題として, 末梢血の赤血球系細胞への NO_2 の作用を検索した.

著者ら[1]は NO_2 0.5ppm～8ppm, 4週連続暴露を行ったラットの網状赤血球の増加, および明確な量—反応関係を認めたことを報告したが, 今回はより低濃度のNO_2を長期間暴露した場合にも類似の変化を示すか否か, また暴露期間と網状赤血球数および赤血球数の量的関係などについて検討したので報告する.

方 法

実験動物 Fischer 系雄ラット(日本チャールス・リバー) をチャンバー内で1週間清浄空気で飼育後, 5週令よりNO_2暴露を開始し, 3ケ月目, 6ケ月目, 12ケ月目に各群7～9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1000ppmおよび5000ppm NO_2 ガスを添加し, 動物暴露チャンバーに導入した. 各チャンバーの濃度は0ppm (0.02ppm以下), 0.3ppm (0.25～0.3ppm), 0.5ppm (0.45～0.5ppm) および1.0ppm (0.90～1.0ppm) であった. チャンバー内の温度は23±1℃, 湿度は60±10%, 換気回数は10回/時であった. NO_2 濃度はケミルミネッセンス法による窒素酸化物測定機 (Monitor Labs 8440) で測定した.

測定方法 NO_2暴露した各群7～9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. 網状赤血球の測定[2]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1：2,000アクリジンオレンジ溶液(pH 8)で2～3秒染色し, 螢光顕微鏡で観察した. 網状赤血球の出現率は赤血球5,000個観察し, 1,000個当り(‰)および血液 1mm³ 当りで表示した. 赤血球は Coulter Counter で測定した.

結 果

0.5ppm および 1ppm 群の網状赤血球の出現率 (‰) と数($\times 10^4/mm^3$) は3, 6および12ケ月暴露で対照群に比し有意の増加を示した ($p<0.05$, $p<0.01$). しかし0.3 ppm群は3ケ月暴露で若干の減少傾向を示し, その後増加傾向を示したが, 有意の増加には至らなかった(Table 1, Fig. 1). 各対照群の値は3ケ月暴露が血液 1mm³ 当り 13.7×10^4, 6ケ月暴露が8.9×10^4, 12ケ月暴露が10.1×10^4 と月令による変動を示した.

赤血球数は全暴露期間を通して対照群と暴露群との間で変化は認められなかった.

考 察

低濃度 NO_2 の長期暴露の赤血球への影響に関する文献は比較的少なく, Jakimchik と Celikanov[3] はラットで0.075ppm 3ケ月暴露で赤血球数の変化を認めなかっ

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Hematological Studies on Rats Exposed to NO_2

Month in NO_2	Group	No.	Erythrocyte $\times 10^6/mm^3$	Reticulocyte ‰	Reticulocyte $\times 10^4/mm^3$
3	Control	9	7.15±0.47	19.2±2.3	13.7±1.7
	0.3ppm	9	7.05±0.26	17.5±2.5	12.3±1.8
	0.5ppm	9	7.23±0.24	22.6±2.0**	16.3±1.5**
	1.0ppm	9	7.12±0.35	23.2±3.5*	16.5±2.9*
6	Control	9	7.15±0.29	12.4±1.0	8.9±0.7
	0.3ppm	9	7.40±0.40	13.2±1.7	9.7±1.2
	0.5ppm	7	7.50±0.50	17.1±2.6**	12.8±1.8**
	1.0ppm	9	7.34±0.29	15.8±2.4**	11.6±1.6**
12	Control	8	7.20±0.37	14.1±2.5	10.1±1.7
	0.3ppm	8	7.18±0.38	15.5±1.9	11.1±1.7
	0.5ppm	7	7.16±0.35	16.8±1.9*	12.0±1.1*
	1.0ppm	8	7.38±0.29	16.7±2.2*	12.3±1.9*

* $P<0.05$ ** $P<0.01$

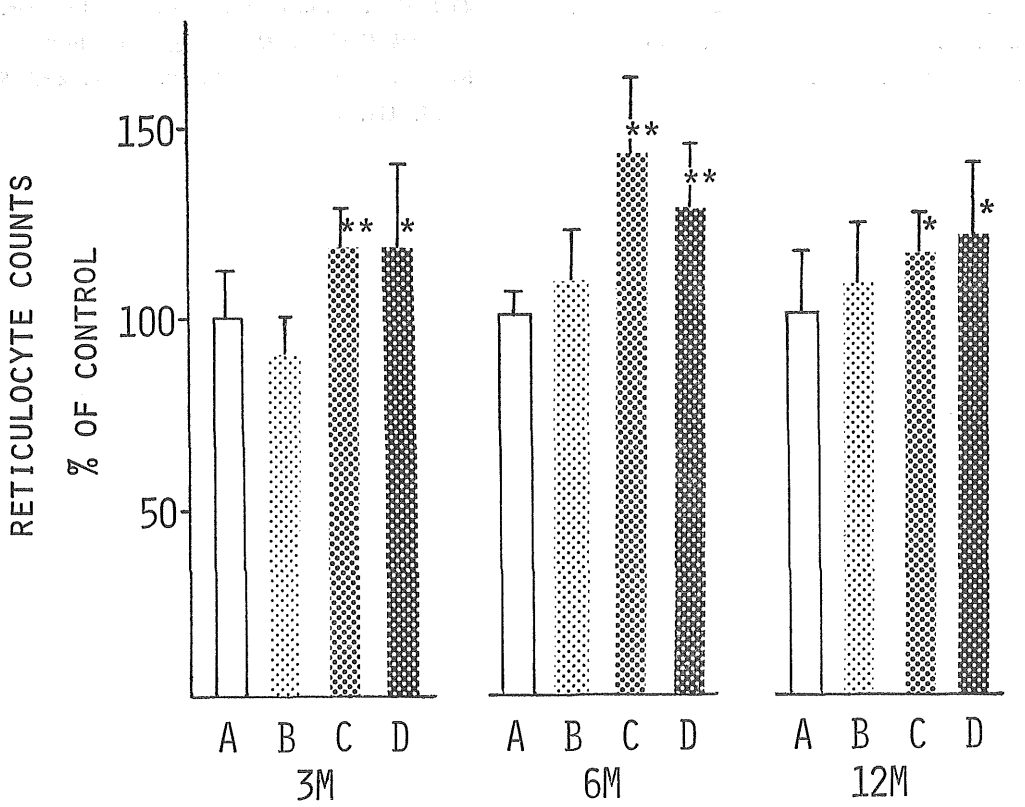


Fig. 1. Percent Changes of Rat Reticulocyte Counts at Various Months of NO_2 Exposure
A: Control B: 0.3ppm C: 0.5ppm D: 1.0ppm * $P<0.05$ ** $P<0.01$

たが，0.3ppmでは減少傾向を認めた．Furiosiら[4]はサルで2ppm 14ヶ月暴露で，又ラットで2ppm 3および6ヶ月暴露で赤血球数の増加を，著者ら[1]はラットで0.5, 2, 4および8ppm 4週暴露で網状赤血球数の増加を，8ppmで赤血球数の増加を報告した．今回の結果は，0.5および1ppm，3, 6および12ヶ月暴露で網状赤血球数の増加を認めたが，赤血球数の増加は示さなかった．以上の報告より，網状赤血球は赤血球よりも，低濃度のNO_2暴露で増加することを観察したので，NO_2の影響をより鋭敏に捕えることができると考えられる．又網状赤血球が1～12ヶ月暴露に至るまで増加しつづけることから，NO_2が造血機能に何らかの作用を与えていることが推察される．

Petr と Schmidt[5]はチェコスロバキアにおける疫学調査で，NO_2およびSO_2の汚染地域の小学生は，対照地域に比べ，幼若型赤血球が増加すると報告しているが，その幼若型赤血球の増加が，網状赤血球の増加を常に示すものではないと考察している．しかし，今回の結果から網状赤血球はNO_2の影響を鋭敏に捕えることができたので，疫学調査の一指標として使用できるのではないかと考えられる．今後他の大気汚染物質についても検討する必要があると考えられる．

要　約

Fischer 系雄ラットに0.3, 0.5および1.0ppmのNO_2を3，6および12ヶ月暴露を行い，螢光法で網状赤血球の観察を行った．0.5ppmおよび1ppm群の網状赤血球数は，3，6および12ヶ月暴露で対照群に比し有意の増加を示したが，0.3ppm群は有意の増加を認めなかった．赤血球数は全暴露期間を通して対照群と暴露群との間で変化は認められなかった．網状赤血球は赤血球よりも鋭敏にNO_2暴露の影響をとらえることができた．

（本研究は昭和54年度当研究所調査研究課題「複合大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) 福田雅夫，狩野文雄，寺田伸枝，溝口　勲：東京衛研年報，30-1，189，1979
2) 工藤吉郎：慈医誌，81，356，1966
3) Jakimchik, P. P., and Celikanov, K. N.: Biological Effect and Hygienic Significance of Atmospheric Pollutants, II, 164, 1968, Moscow
4) Furiosi, N. J., Crane, S. C., and Freeman, G.: *Arch Environ. Health*, 27, 405, 1973
5) Petr, B., and Schmidt, P.: *Hyg. and Sanit.* 31, 111, 1966

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 229-237, 1980

持続性せき・たんの有訴率に関連する因子の検討

牧野国義*, 溝口 勲*

A Study of Factors related to Prevalence Rates of Persistent Cough and Phlegm

KUNIYOSHI MAKINO* and ISAO MIZOGUCHI*

A study of factors related to prevalence rate of persistent cough and phlegm (PCP) is described with regard to three important problems. The data of PCP were obtained from a self-completed questionnaire as well as the data of five question items for this study. These data were classified in four groups of factors (two regional factors, two road factors, two smoking factors and three age factors). The subjects were females who were older than twenty years old. At first, frequency data were collected simultaneously for two categorical variables, PCP and each of five question items. The typical chi-square values were computed. Those values were significant in all items in all factors.

Secondly, relationship of contingency among factors to make up a group in each item was analyzed with Cochran's chi-square method. The results from calculation showed the regional factors could make up a best group to control prevalence rates of PCP and five items.

Thirdly, from prevalence rates of PCP in 18 regions making up Tokyo area, two kinds of values were calculated. One of them was the lowest prevalence rate which showed significance in equality test using one of chi-square methods. The other was the lowest concentration which showed significance in the equality test in each of two air pollutants of nitrogen dioxide and sulfur dioxide. In study population, the rate was 4.35 percent and the concentrations were 0.0251 ppm NO_2 and 0.0132 ppm SO_2. In sampled population, the rate was 3.42 percent and the concentrations were 0.0251 ppm NO_2 and 0.0137 ppm SO_2.

Keywords : Air Pollution, Respiratory Effect, Human Health, Statistics

緒　言

大気汚染が呼吸器症状の有症と密接な関係を有することは近年得られた知見ではなく，50年の歴史がある．1930年ベルギーの Meuse Valley 工業地帯で工場排気ガスにより発生したスモッグのため3日間で63人が死亡し，数千人が呼吸器障害等を起こした．1952年にはロンドンで有名なロンドンスモッグ事件が発生し，3週間に4000人以上の過剰死亡が生じたと伝えられている．我が国でも横浜ぜんそくや四日市ぜんそくと呼ばれたスモッグ事件が一般によく知られている．これらはいずれも亜硫酸ガスや浮遊粉塵を主原因物質として冬季の大気が停滞し易い状況の下で発生した事件であった．その後脱硫技術の進歩や排気ガス規制などにより大気中の亜硫酸ガス濃度は減少し続け，現在上記のような事件は発生していない．しかし近年亜硫酸ガスの代りに二酸化窒素を主とした大気汚染が問題化している．二酸化窒素は亜硫酸ガス同様工場排ガス中に含まれるが，自動車交通の過密化した今日では自動車排気ガスによる寄与の方が大きいことが知られている．また二酸化窒素の都心での経年変化をみると東京で最も古くから常設観測点のある都庁前で，昭和40年の年平均濃度は 1.7pphm であったが10年後 5.2pphm と3倍にも増大した．この二酸化窒素は光化学オキシダントの原因物質であるとともにそれ自体が呼吸器疾患に寄与するとの報告がいくつかなされた．中でも C. M. Shy らの報告[1,2]は現在の米国の二酸化窒素の環境基準の基になった疫学調査である．また我が国では6都市調査[3]，千葉県の調査[4]，大阪府，兵庫県の調査[5]，岡山県の調査[6]が旧環境基準の指針値設定の際の資料とされた．二酸化窒素の人体影響特に呼吸器影響について量・効果関係を認める報告は以上の他にも多く報告されているが，量・反応関係については議論が一定せず，昭和53年7月環境庁の判断で二酸化窒素の環境基準が改定されたことは周知の通りである[7]．東京都では同54年3月に改定についての検討結果を報告した[8]．本報告や

* 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

6都市調査に関する鈴木らの報告[9]，そして岡山県の調査に関する坪田らの報告[10]において旧環境基準が疫学的に根拠のあるものであることが示されている．しかし一方において持続性せき・たんと他の症状や外的条件との関係について多くは言及されていない．これらの症状や外的条件は持続性せき・たんの有症率に関連する諸因子として重要であり，その関係を追求することは意義深いと考えられる．本研究は入手した東京都に居住する家庭婦人の呼吸器症状調査資料に基づいて，持続性せき・たんとぜん鳴，眼の痛み，くしゃみや鼻水がでやすい，風邪をひきやすい，呼吸器疾患家族歴との関係を居住地(都内，都下)，近接道路の規模（幹線道路，路地），喫煙の有無，年齢層（20～39，40～59，60～）の条件により分けて検討し，得られたいくつかの知見の報告である．本研究はあわせて東京都を18ブロックに分けて地域特性を見た場合，地域差が認められる有訴率の最低値や影響が認められる大気汚染物質濃度の最低値についても統計学的手法を用いて検討した．

2. 方　法

(1) 調査方法

呼吸器症状の調査方法には問診法と自記法の二種類があり，本研究資料は自記法を採っている．問診法は面接形式で，質問者が被験者に各項目について質問し，答を記入する方法で，BMRC 法[11]が現在まで数多く採用されている（1979年その改良法としたATS-DLD法の日本版案が報告された[12]）．自記法は被験者自らがアンケート用紙に記入する方法で，Mittmanら[13]や春日ら[14]は自記法がBMRC法に比較して遜色なく，むしろ経済的であり，簡便で有効な方法であると述べている．調査総数は約10,600名で，20歳以上の家庭婦人を対象としている．調査は昭和53年4月に行なわれ，大気汚染物質として二酸化窒素と亜硫酸ガスを選び，補間法による年平均濃度の推定法[15]を用いて18ブロックについて昭和52年度の年平均濃度を求めた．

(2) 分析方法

諸々の条件の下で因子間の差を統計学的に検討する手法として従来よりカイ2乗検定が多く利用されている．本研究においても検討する目的に応じていくつかのカイ2乗検定を用いる．

二特性間の関連性を統計学的に検討する手法として最も簡便で一般的な方法はYatesの修正を加えた定型的なカイ2乗検定である．今調査総数nのとき持続性せき・たん症状のある者の数を$n_{1\cdot}$，ない者の数を$n_{2\cdot}$，ぜん鳴症状のある者の数を$n_{\cdot 1}$，ない者の数を$n_{\cdot 2}$とし，両症状のある者の数をn_{11}，持続性せき・たん症状のみがある者の数をn_{12}，ぜん鳴症状のみがある者の数をn_{21}，両症状ともない者の数をn_{22}とすると連続修正を加えたカイ2乗値は次式で示される．

$$\chi^2=\frac{n(|n_{11}n_{22}-n_{12}n_{21}|-0.5n)^2}{n_{1\cdot}\,n_{2\cdot}\,n_{\cdot 1}\,n_{\cdot 2}}$$

二特性（持続性せき・たん症状とぜん鳴症状）間の関連性の有意性を検討するには上式で求めたカイ2乗値を自由度1のカイ2乗分布表の数値と比較する．本研究においては全調査数を使用するのではなく，3回の無作為抽出法により抽出した1,000名による結果を平均した数値を用いる．その理由は修正項が入っていることで判るようにカイ2乗検定は精密な分析手法ではなく，大数を扱う場合に観測誤差が増大することがあり，以下で二因子（例えば都内と都下）の間の差を検討する場合各因子の調査数が極端に異なるときには各因子の調査数による観測誤差の差が無視し得ないことが考えられるからである．

上記の調査区分のように項目により四分割した表を一般に四分表と呼んでいるが，四分表によりある症状（例えばぜん鳴）そして加えて持続性せき・たん症状を有する者の数が得られ，これにより二因子間の差を検討する場合には以下に示すCochranの方法[16]が有効である．都内と都下の差を検討する場合，ぜん鳴症状の有症率を都内P_{11}，都下P_{12}とし，両症状を有するときの有症率を同様に都内P_{21}，都下P_{22}とする．この二種類の症状をiで区別する（$i=1, 2$）．都内の調査数をn_1，都下の調査数をn_2とし，全調査数をnとすると（上述のように本研究では$n_1=n_2=1000$，$n=2000$），i症状における全体の有症率は次のようになる．

$$p_i=\frac{n_1 p_{i1}+n_2 p_{i2}}{n}$$

関連性の程度を示す尺度の統計量として標準差d_iがあり，次式で示される．

$$d_i=\frac{p_{i1}-p_{i2}}{p_i(1-p_i)}$$

d_iはi症状についてであり，一般的尺度とするためにはこれに重みを与えて修正しなければならない．この重みw_iは分散の逆数で与えられ，次のように示される．

$$w_i=\frac{p_i(1-p_i)}{(1/n_1+1/n_2)}$$

そしてi症状におけるカイ2乗統計量は次式になる．

$$\chi_i^2=w_i d_i^2=\frac{(p_{i1}-p_{i2})^2}{p_i(1-p_i)(1/n_1+1/n_2)}$$

このχ_i^2は自由度1のカイ2乗分布に従い，よって全体のカイ2乗統計量は，$\chi_t^2=\sum_i\chi_i^2=\sum_i w_i d_i^2$のようになり，

自由度 i のカイ2乗分布に従う．このカイ2乗値 χ_t^2 が有意に大きければ i 症状のどれかに関連性が存在することを意味する．この χ_t^2 は，i 症状についての平均的な関連性の尺度の有意性を吟味するための χ_a^2 と i 個の関連性の尺度 d_i が均等であるかどうかを吟味する χ_h^2 とに分けられ，$\chi_t^2=\chi_a^2+\chi_h^2$ と表わされる．したがって χ_a^2 を求めれば χ_h^2 も求められることになり，χ_a^2 は次のようにして求められる．全体的にみた標準差の推定値 $\hat{d}$ とその分散 $\hat{v}$ は次のようになる．

$$\hat{d}=\frac{\sum_i w_i d_i}{\sum_i w_i}$$

$$\hat{v}=\frac{1}{\sum_i w_i}$$

したがって χ_a^2 は次のように表わされる．

$$\chi_a^2=\left(\frac{1}{\hat{v}}\right)\hat{d}^2=\frac{(\sum_i w_i d_i)^2}{\sum_i w_i}$$

この χ_a^2 は自由度1のカイ2乗分布に従い，よって χ_h^2 は自由度 i−1 のカイ2乗分布に従う．つまり χ_a^2 が有意に大きいならば，対象となる症状において二因子間の関連性が高いと推定することができ，χ_h^2 が有意でなければ対象とした症状（持続性せき・たんをある症状にリンクするか否か）により二因子間の関連性の推定に影響しないであろうと判断することができる．

東京都をN個(本研究では18)のブロックに分け，各ブロックについて持続性せき・たんの有症率を求め，これを p_i(i=1～N) とすると当然 p_i には大小がみられる．この有症率を小さい方から順に並べ，ある所で2群に分け，2群間に有意な差がみられるならば東京都の持続性せき・たん有症率に関して地域差があると推定することができる．また各ブロックの大気汚染物質濃度を求めて，これも小さい方から順に並べてある所で2群に分け，2群の有症率間に有意な差がみられるならば分けた濃度の上下で該有症率に関して地域差があると推定することができる．この切断点を小さい方から変化させ，有意な差がみられたときの切断した有症率または濃度は地域差や影響が認められる最低値であり，疫学的に興味深い．各ブロックの調査数を n_i とすると全体の有症率Pは

$$p=\sum_{i=1}^{N} n_i p_i / \sum_{i=1}^{N} n_i$$

で表わされ，自由度1のカイ2乗統計量を次のように表わすことができる．

$$A=\sum_{i=1}^{k} n_i p_i / \sum_{i=1}^{k} n_i - \sum_{i=k+1}^{N} n_i p_i / \sum_{i=k+1}^{N} n_i$$

$$B=1/\sum_{i=1}^{k} n_i + 1/\sum_{i=k+1}^{N} n_i$$

とおくと

$$\chi^2=\frac{(|A|-0.5B)^2}{p(1-p)B}$$

ここでkは切断時の小さい群のブロック数である．二群間の差の検討手法としてはこの他に Mantel-Haenszel の方法[17]もよく知られている．

3. 結果および考察

年齢20～59歳や喫煙習慣のないことを固定因子として各質問項目（ぜん鳴，眼の痛み，くしゃみや鼻水が出やすい，風邪をひきやすい，家族に呼吸器疾患者がいる）別に比較対照させる因子（都内と都下，住居に近接する道路の大小，喫煙の有無，年齢が20～39，40～59，60～）による持続性せき・たんと各質問項目との四分表とカイ2乗値を Table 1 に示した．固定因子の中で年齢を20～59歳に限定したが，60歳以上では急激に有訴者が増えるからである．また喫煙者も非喫煙者に比してかなり有訴者が多く，高齢者と同様に喫煙者も呼吸器症状有訴と密接に関わるために比較対照の場合以外には除外した．右端にカイ2乗値と星印による有意性を示したが，全ての場合に危険率1パーセント以下で有意の結果であった．すなわち，持続性せき・たん有訴者は同時に質問項目の症状の有訴者であることが多く，家族に呼吸器疾患有症者がいる者は持続性せき・たんを有訴することが多いことを示している．本研究では持続性せき・たんと質問項目にある症状とに優先順位を付けることはできず，質問項目の症状が持続性せき・たんをもたらすと推定することは困難であるが，両症状の有訴に密接な関連性があることが推定される．また質問項目の中ではカイ2乗値よりぜん鳴と風邪をひきやすいが他項目に比べてやや深く持続性せき・たんと関連すると推定される．

質問項目単独の場合およびこれに持続性せき・たん症状をクロスした場合の各有訴数により，上記対照させた因子間に関連性があるかを Cochran の方法[16]を用いて検討し，その結果を Table 2 に示した．都内と都下の比較では，ぜん鳴と家族歴には差がみられなかったが，持続性せき・たんをクロスした場合に有意な差がみられた．逆に眼の痛みやくしゃみや鼻水が出やすいでは有意な差がみられたが，クロスした場合には有意な差がみられなかった．χ_a^2 でみられるように全ての場合都内と都下で有訴の出現に関連性のあることが認められ，χ_h^2 でみられるように全ての場合上記の関連性の推定に質問項目から影響は認められなかった．したがって，Table 1 で五質問項目と持続性せき・たん症状の出現の関連性が認め

Table 1. Comparison of Items in 4 Groups of Factors

Fixed Factors / Question Items	Comparing Factors	Both Positive	PCP[a] Positive The Item Negative	PCP Negative The Item Positive	Both Negative	χ^2 df=1
Age 20—59 Non-smoker						
Wheezing	23 Wards in Tokyo	28	24	67	881	12830**
	Outside of 23 Wards[b]	14	19	58	909	8823**
Eye Irritation	23 Wards in Tokyo	33	20	370	577	886**
	Outside of 23 Wards	21	12	316	651	1700**
Sneezing	23 Wards in Tokyo	40	12	338	610	3979**
	Outside of 23 Wards	25	9	297	669	4108**
Liable to catch a Cold	23 Wards in Tokyo	45	7	332	616	9621**
	Outside of 23 Wards	27	7	301	665	6227**
Family History	23 Wards in Tokyo	28	24	180	768	2996**
	Outside of 23 Wards	13	20	167	800	1239**
Age 20—59 Non-smoker						
Wheezing	near Main Street[c]	31	32	76	861	8696**
	along Small Road[c]	40	78	44	838	13809**
Eye Irritation	near Main Street	41	22	416	521	701**
	along Small Road	65	53	276	606	1082**
Sneezing	near Main Street	47	16	349	588	3010**
	along Small Road	87	30	270	612	4524**
Liable to catch a Cold	near Main Street	55	9	385	551	6007**
	along Small Road	93	25	251	631	10782**
Family History	near Main Street	35	28	184	753	3157**
	along Small Road	49	68	156	727	2654**
Age 20—59						
Wheezing	Smoker	48	68	66	818	6667**
	Non-smoker	25	23	65	887	12284**
Eye Irritation	Smoker	77	38	325	560	1720**
	Non-smoker	30	18	359	593	1020**
Sneezing	Smoker	84	32	336	548	2444**
	Non-smoker	37	12	330	621	3768**
Liable to catch a Cold	Smoker	89	26	338	547	3628**
	Non-smoker	42	7	326	625	9194**
Family History	Smoker	54	61	149	736	2517**
	Non-smoker	25	23	177	775	2779**
Non-smoker						
Wheezing	Age 20—39	19	20	66	895	10273**
	40—59	31	26	64	879	13878**
	60—	74	34	73	819	22074**
Eye Irritation	Age 20—39	23	15	380	582	678**
	40—59	36	21	341	602	1265**
	60—	56	52	278	614	759**
Sneezing	Age 20—39	30	8	342	620	4639**
	40—59	43	14	319	624	3990**
	60—	79	24	299	593	4542**
Liable to catch a Cold	Age 20—39	30	5	354	607	9515**
	40—59	48	9	303	640	9023**
	60—	88	20	281	611	7513**
Family History	Age 20—39	19	19	210	752	1684**
	40—59	31	26	150	793	4249**
	60—	60	48	140	752	4737**

a; Persistent Cough and Phlegm, b; Outside Area of 23 Wards in Tokyo
c; The subject lives near main street or along small road
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 2. Cochran's *Chi-square* Values between Factors

Factors	Items	χ^2	χ^2_t	χ^2_a	χ^2_h
23 Wards in Tokyo and Outside of 23 Wards in Tokyo (Non-smoker Age 20—59)	PCP	4.44*			
	Wheezing	3.46	8.23**	7.05**	1.07
	+PCP	4.77*			
	Eye Irritation	9.34**	12.08**	11.73**	0.36
	+PCP	2.74			
	Sneezing	6.89**	10.47**	9.73**	0.74
	+PCP	3.58			
	Liable to catch a Cold	5.26*	9.93**	8.54**	0.39
	+PCP	4.67*			
	Family History	2.51	8.11*	6.37*	1.74
	+PCP	5.60*			
near Main Street and along Small Road (Non-smoker Age 20—59)	PCP	18.38**			
	Wheezing	3.06	4.24	0.81	3.43
	+PCP	1.18			
	Eye Irritation	28.05**	33.79**	14.59**	19.20**
	+PCP	5.74*			
	Sneezing	3.24	16.04**	0.002	16.04**
	+PCP	12.80**			
	Liable to catch a Cold	19.33**	29.87**	5.48*	24.39**
	+PCP	10.54**			
	Family History	0.59	3.03	0.00	3.03
	+PCP	2.44			
Smoker and Non-smoker (Age 20—59)	PCP	30.71**			
	Wheezing	3.14	10.66**	8.71**	1.95
	+PCP	7.52**			
	Eye Irritation	0.35	22.16**	6.21*	15.95**
	+PCP	21.81**			
	Sneezing	5.88*	25.31**	16.92**	8.40**
	+PCP	19.43**			
	Liable to catch a Cold	7.27**	43.89**	25.34**	18.55**
	+PCP	36.62**			
	Family History	0.003	15.09**	2.93	12.16**
	+PCP	15.09**			
Age 20—39 and Age 60— (Non-smoker)	PCP	34.96**			
	Wheezing	18.74**	52.85**	46.60**	6.26*
	+PCP	34.71**			
	Eye Irritation	10.22**	26.57**	2.39	22.19**
	+PCP	14.35**			
	Sneezing	0.08	19.07**	4.52*	14.55**
	+PCP	18.99**			
	Liable to catch a Cold	0.77	26.22**	2.09	24.13**
	+PCP	25.45**			
	Family History	2.50	24.65**	0.35	24.30**
	+PCP	22.15**			

られたが，これらの質問項目で都内と都下に出現の関連性が深く，後述する東京都を18ブロックに分けた持続性せき・たんの有訴率の地域差の検討が意味のあることを示している．住居に近接した道路の大小の比較では，χ_t^2でみられるようにぜん鳴と家族歴では有意な差が認められなかった．眼の痛みや風邪をひきやすいと持続性せき・たんをそれぞれにクロスした場合では道路の大小に出現の関連性が有意に認められたが，質問項目の影響が有意で推定精度は低められた．喫煙者と非喫煙者との比較では，持続性せき・たんをクロスした全ての場合にχ^2でみられるように有意な差が認められた．したがって喫煙による持続性せき・たんへの関連性の強さが容易に推定されるが，中でも単独質問項目がぜん鳴の場合質問項目による推定への影響もなく，喫煙の有無が両項目の有訴の出現に深く関連することが推定される．若年層と高年齢層との比較では，喫煙の有無の比較の場合同様持続性せき・たんをクロスした項目全てに有意な差が認められた．これは高年齢層(60歳以上)ではそれ以下の年齢層に比べて持続性せき・たんの有訴率が非常に高いことによると考えられる．また単独の質問項目ではぜん鳴や眼の痛みが危険率1パーセントで有意な差を示したのに対し，他項目では有意な差を示さなかった．これは高年齢の特質によると考えられる．χ_h^2でみられるように全ての場合に質問項目からの影響が有意に認められたが，単独質問項目がぜん鳴の場合両項目の有訴の出現に年齢層の高低が深く関連することが推定される．さらに持続性せき・たんのみについて各因子間の差をχ^2でみると全ての場合の因子間に有意な差が認められ，特に年齢層や喫煙の因子間に現われた（カイ2乗値34.96, 30.71）．Cochranによるこの手法は持続性せき・たんと他の質問項目をクロスしない項目としても解析できるが，クロスの影響を見ることに比重を置き，また類似傾向を示したのでTable 2のように示した．

調査人数を考慮して東京都を18ブロックに分け，各ブロックの地名をTable 3に示した（最少調査人数が100名を越えるように隣接地域を併合した）．地域差が認められる有訴率の最低値や影響が認められる大気汚染物質濃度の最低値をブロックを単位として以下のように検討した．有訴率，二酸化窒素，亜硫酸ガスを小さい方から順に並べて切断点を1～17まで順に変えたとき両群の有訴率に差があるかをカイ2乗値で求め，Table 4に示した．この手法は大気汚染物質の閾値を求めるためのホッケースティック法[18,19]に調査人数を考慮した効果を有し，東京都NO_x委員会報告[8]で同種の分析を行なっている．三種の因子とも小さい方から2ブロックで切断し，16ブロックと分けたときに両群に有意な差を示した．この2ブロックとは有訴率ではTable 3の18, 13，二酸化窒素では同じく18, 14，亜硫酸ガスでは同じく18, 17であった．また切断時小さい方から2番目の有訴率または濃度は各4.35パーセント，0.0251ppm，0.0132ppmであった．この値が自然有症率や大気汚染物質の環境基準設定の資料になり得るかについてはいくつかの問題がある．先ず第一に調査対象は東京都に住む家庭婦人が対象になっており，日本全国を対象にしない．したがって大気汚染のレベルで考えれば低レベル地域の資料が少ない．また各ブロックの調査人数は実際に居住する各ブロックの人数と相対的に一致しなければならないが，本研究の調査人数は一致せず分析方法で述べたカイ2乗値の計算にも関係する．このほか群化の問題，対象の選定方法などの問題があるため上記の値を直接環境基準などの資料に利用することは困難である．ここでこれらの問題のうち調査人口に関しては以下のように訂正が可能である．20～59歳の女性の各ブロックの人口をa_i ($i=1\sim18$)とし，総計をAとする．各ブロックの調査数をb_iとし，総計を

Table 3. Divided 18 Regional Groups in Tokyo

No.	Regions of the Group	No.	Regions of the Group
1	Chiyoda, Chuo, Minato	11	Mitaka, Musashino
2	Shibuya, Shinjuku, Toshima, Bunkyo	12	Chofu, Komae
3	Arakawa, Koto, Sumida, Taito	13	Koganei, Kodaira, Fuchu
4	Shinagawa, Meguro	14	Inagi, Tama, Hachiohji, Hino, Machida
5	Ohta	15	Kiyose, Tanashi, Higashikurume, Hoya
6	Setagaya	16	Akishima, Kunitachi, Kokubunji, Tachikawa
7	Nerima	17	Higashimurayama, Higashiyamato, Fussa, Musashimurayama, Mizuho
8	Suginami, Nakano		
9	Itabashi, Kita	18	Akikawa, Ohme, Itsukaichi, Hamura, Hinode, Hinohara, Okutama
10	Adachi, Edogawa, Katsushika		

Table 4. *Chi-square* Values of Three Factors with Study Population in varying Number of Groups

Number of Lower Level Groups	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Factor Prevalence Rate	3.69	6.19 *	7.93 **	11.03 **	20.54 **	23.57 **	22.30 **	21.77 **	21.55 **
NO_2	3.69	5.30 *	3.67	5.83 *	8.53 **	11.82 **	8.35 **	6.52 *	2.83
SO_2	3.69	6.44 *	8.22 **	10.49 **	8.92 **	5.71 *	8.26 **	5.73 *	5.04 *

Number of Lower Level Groups	10	11	12	13	14	15	16	17
Factor Prevalence Rate	20.99 **	20.76 **	18.94 **	16.71 **	16.38 **	15.43 **	13.30 **	7.73 **
NO_2	2.04	1.13	2.63	1.45	9.22 **	9.61 **	3.88 *	7.73 **
SO_2	2.04	3.76	0.56	0.17	0.002	1.36	0.03	0.001

Table 5. Summary of Study Population and Sampled Population in Each Regional Group

Group No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Study Population*	493	755	293	762	604	536	1088	955	828	1233
Sampled Population	112	346	293	192	200	240	168	274	269	441
Sampling Ratio (%)	22.7	45.8	100.0	25.2	33.1	44.8	15.6	28.7	32.5	35.8

Group No.	11	12	13	14	15	16	17	18	Total
Study Population	285	203	214	277	119	236	160	221	9254
Sampled Population	90	73	127	234	95	113	87	59	3300
Sampling Ratio (%)	31.6	36.0	59.3	84.5	79.8	47.9	54.3	26.7	

* Age 20—59, Non-smoker

Table 6. *Chi-square* Values of Three Factors with Sampled Population in varying Number of Groups

Number of Lower Level Groups	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Factor Prevalence Rate	1.62	5.92 *	6.99 **	7.70 **	8.74 **	11.19 **	11.86 **	12.00 **	12.88 **
NO_2	1.62	5.92 *	6.51 *	6.62 *	7.91 **	6.16 **	7.48 **	6.87 **	7.04 **
SO_2	1.62	2.01	3.01	3.21	4.20 *	9.11 **	8.90 **	7.48 **	5.28 *

Number of Lower Level Groups	10	11	12	13	14	15	16	17
Factor Prevalence Rate	12.77 **	12.71 **	11.69 **	11.08 **	9.94 **	9.18 **	7.26 **	2.37
NO_2	5.06 *	6.23 *	1.63	1.75	0.50	3.14	0.66	0.28
SO_2	5.06 *	4.76 *	6.33 *	3.86 *	8.41 **	7.74 **	2.65	2.37

Bとすると，各ブロックの人口と調査数の割合 p_i は，$p_i=(a_i/A)/(b_i/B)$ で求められ，18ブロックのうち p_i が最も大きいブロックの番号をkとすると，各ブロックの抽出調査数 S_i は，$S_i=b_i\cdot(a_k/A)$ となる．計算の結果kは3になった．

Table 5に各ブロックの調査数，抽出調査数，抽出率を示した．3回の無作為抽出を行ない，その平均有訴率を求めてTable 4と同様にカイ2乗値を求め，その結果をTable 6に示した．有訴率と二酸化窒素の場合抽出前の結果と同じく2ブロックで切断したとき有意な差が認められたが，亜硫酸ガスの場合5ブロックで初めて有意な差が認められた．この切断時の有訴率および二酸化窒素と亜硫酸ガスの濃度はそれぞれ3.42パーセント0.0251 ppm, 0.0137ppmであった．抽出前の結果と比較すると，有訴率は下がり，亜硫酸ガスは上っている．この変化の理由は明らかでないが，Table 5の抽出調査数で，5ブロックが100名以下となっている．有訴数10名未満のブロックが11におよぶので変動が大きく，これが変化に寄与していると考えられる．有訴数，調査数が少数の場合には有訴率値の信頼性が低いと思われるが，同種の抽出を行なった坪田の報告[20]では外因子（喫煙の有無，年齢層などの因子）と抽出地区により分割して求めたカイ2乗値が有意でなく小さい場合に訂正されたとしている．因みに本研究では6×18分割（近接道路大中小と年齢層20～39と40～59で6分割（2×3），×18ブロック）でカイ2乗値は0.941となり，充分小さいので訂正されたと判断される．本研究では大気汚染物質として二酸化窒素と亜硫酸ガスを使用したが，これらが単一物質として作用し上記結果をもたらしたと結論することはできず，むしろ指標とした大気汚染物質であることに注意しなければならない．通常用いられる有訴率と大気汚染物質濃度との相関分析結果を付記すると，抽出前データでは二酸化窒素とが0.594，亜硫酸ガス0.621とが，抽出データでは二酸化窒素とが0.770，亜硫酸ガスとが0.764で，いずれも危険率1パーセント以下で有意であった．抽出による相関係数の上昇は両物質濃度最低のブロック番号18の地域の有訴率が抽出により約半分に減少したことが影響したと考えられる．またこの相関分析では調査人数を考慮していない．これを考慮した分析方法に関しては別に示した[21]．

4. 結　論

慢性呼吸器症状の持続性せき・たんと他症状(ぜん鳴，眼の痛み，くしゃみや鼻水が出やすい，風邪をひきやすい）や家族歴（家族に呼吸器疾患者がいる）との関係を各因子（都内，都下，住居近接道路規模の大小（幹線道路，路地），喫煙習慣の有無，年齢層20～39歳，40～59歳，60歳以上）について統計学的手法を用いて検討した．また対照的な二因子間に関連性があるかを上記ぜん鳴などの5項目と各項目に持続性せき・たんをクロスさせた5対の項目について統計学的手法を用いて検討した．さらに有訴率や大気汚染物質濃度による地域差をみるために東京都を18のブロックに分け，各ブロックの有訴率や二酸化窒素と亜硫酸ガスの年平均濃度を小さい方から並べ，小さい方から切断する数を変えて上下2群の有訴率に差があるかを統計学的手法を用いて検討した．以上の検討に利用した手法は2.（2）分析方法で述べたカイ2乗検定である．その結果以下の知見が得られた．

持続性せき・たん症状と他項目（ぜん鳴，眼の痛み，くしゃみや鼻水がでやすい，風邪をひきやすい，家族に呼吸器疾患者がいる）との同時出現性は比較対照できる因子（都内と都下，近接道路の大小，喫煙の有無，年齢層の高低）において全て極めて高く，持続性せき・たん症状を有訴する者は上記したような症状も併せて有訴しやすいと推定された．また家族に呼吸器疾患者がいる者は予想されるようにいない者に比して持続性せき・たん症状を有訴しやすいと推定された．

Cochranの方法を用いた対照的な二因子間の関連性の検討では都内，都下に上記5項目にそれぞれ持続性せき・たんをクロスした5対項目全てに深い関連性のあることが推定された．喫煙の有無や年齢層20～39歳と60歳以上ではともに持続性せき・たんの影響が大きく，単独項目がぜん鳴の場合には有意な関連性がみられたが，他項目では深い関連性を有するとの推定を得られなかった．

東京都を18ブロックに分け，有訴率，二酸化窒素および亜硫酸ガス濃度を小さい方から並べたとき，小さい方から切断すると三種の因子とも2：16のときに上下2群の有訴率に有意な差が認められた．地域差や影響が認められる最低値の有訴率，二酸化窒素と亜硫酸ガスの濃度はそれぞれ4.35パーセント，0.0251ppm，0.0132ppmであった．この結果は居住地域の人口を反映していないので，同年齢女性の居住人口で訂正して同様に上下2群の有訴率に有意な差が認められる切断点を求めると有訴率，二酸化窒素は2：16で上記同様であったが，亜硫酸ガスは5：13と変化した．このときの上記同様の最低値となる有訴率，二酸化窒素と亜硫酸ガスの濃度はそれぞれ3.42パーセント，0.0251ppm，0.0137ppmであった．したがって本研究では持続性せき・たんの有訴率が3.42パーセント以下の地域が低有訴率地域であり，二酸化窒素を指標とする大気汚染では0.0251ppmを越えると持続

性せき・たんの有訴率が増大すると推定され，同様に亜硫酸ガスを指標とする大気汚染では0.0137ppmを越えると増大すると推定された．しかしこれらの値が一般的な意味を有するためにはいくつかの問題があるのでさらに検討する必要がある．

文　献

1) Shy, C. M., Crearson, J. P., Pearlman, M. E., McClan, K. E., and Benson, F. B.: *J. Air Pollut. Cont. Assoc.*, 20, 539, 1970
2) Shy, C. M., Crearson, J. P., Pearlman, M. E., McClan, K. E., and Benson, F. B.: *J. Air Pollut. Cont. Assoc.*, 20, 582, 1970
3) 環境庁環境保健部：複合大気汚染健康影響調査（調査の概要および主要調査結果のまとめ），1977
4) 吉田　亮，安達元明，仁田善雄，村井雅子，岩崎明子：日本公衛誌，23，435，1976
5) 常俊義三，山口泰正，中山典子，上田美代子：日本公衛誌，24，293，1977
6) 岡山県：水島地域窒素酸化物汚染対策調査結果，1977
7) 環境庁：環境庁告示，38，1978
8) 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
9) 鈴木武夫，石西　伸，吉田　亮ら：大気汚染学会誌 13，310，1978
10) 坪田信孝，中島泰知，目黒忠道，緒方正名：日本公衛誌，26，333，1979
11) Medical Research Council Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis 1960: *Br. Med. J.* 2, 1965
12) 安達史朗，安達元明，春日　斉ら：昭和53年度環境庁委託研究報告書，1979
13) Mittman, C., Barbela, T., McCaw, D., and Pedersen, D.: *Arch. Environ. Health* 33, 151, 1979
14) 春日　斉，逢坂文夫，松木秀明，成田史朗：日本公衛誌，26，367，1979
15) 牧野国義：東京衛研年報，29-1，305，1978
16) Cochran, W. G.: *Biometrics*, 10, 417, 1954
17) Mantel, N.: *J. Amer. Statist. Assoc.*, 58, 690, 1963
18) Hammer, D. I., and Hasselblad, V.: *Arch. Environ. Health*, 28, 255, 1974
19) Makino, K. and Mizoguchi I.: *Proc. The 4th Clean Air Congress*, 27, 1977
20) 坪田信孝：日本公衛誌，27，111，1979
21) 牧野国義，溝口　勲，塚谷恒雄：大気汚染学会講演要旨集，376，1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 238-243, 1980

空気中のクロラールの光酸化反応

太田与洋*, 溝口 勲*

Photooxidation of Chloral in Air

TOMOHIRO OHTA* and ISAO MIZOGUCHI*

Photooxidation of chloral, which is one of the products from the reaction of trichloroethylene with oxygen atom or ozone, was studied in the mixture of oxygen and nitrogen molecule by means of infrared spectroscopy. Major products were phosgen, hydrogen chloride, carbon monoxide and carbon dioxide. It was found that the reaction proceeded via a chain reaction and the chain carrier was chlorine atoms. The overall reaction mechanism was proposed. From the standpoint of atmospheric chemistry, the significance of the above reaction was discussed.

Keywords : chloral, photooxidation, phosgen

緒　言

都市大気中にトリクロルエチレン，テトラクロルエチレンが存在するが[1]，これらはオゾンや二酸化窒素の太陽光による分解反応の結果生成する酸素原子と反応して，トリクロルアセトアルデヒド(クロラール)，トリクロルアセチルクロライド(CCl_3CClO)，ジクロルアセチルクロライド($CHCl_2CClO$)になる．これらはホスゲン($COCl_2$)の前駆体(precursor)であると考えられ，米国カリフォルニア州で観測されたホスゲン[2]の存在を説明するもののひとつのパスと考えられる．本論文ではこの3種の化合物の大気中での光化学反応性を調べた．とくに比較的反応性に富んでいるクロラールの酸素存在下での光分解反応を調べ都市大気中での役割を検討する．またトリクロルメチルラジカル(CCl_3)は対流圏のみならず，成層圏でも重要な役割を果たしているが，それと酸素分子との反応も検討した．

実　験

1. 試薬

CCl_3CClO と $CHCl_2CClO$ は市販品（東京化成）を脱ガスして用いた．市販クロラール（東京化成）は安定剤として少量のハイドロキノン（約1％）を含み，若干のポリマーを含んでいるので，一度真空ラインの中で気化し，その気化物を液体窒素で冷却されたトラップで濃縮した．その濃縮物をドライ・アイスアセトン浴の中のトラップを通過させ，精製した．この操作を3度くりかえした．このことによりクロラールの分解物もあわせて除去できた．液化炭酸ガス(昭和炭酸 Co.)は脱ガスし，そのまま用いた．ホスゲンの30％トルエン溶液（和光化学）を2つの直列に配列した冷却トラップを通過する様にし真空ラインの中で吸引した．最初のトラップはドライ・アイスエタノール浴で次のトラップは液体窒素温度に保たれている．主としてホスゲンは最初のトラップに捕集せられ，この留分を用いて，2回同様の手続きで精製した．これらの試薬の純度は赤外分光光度計で確認した．酸素，窒素，水素はタンクガスをそのまま精製することなく使用した．

2. 装置及び実験方法

クロラール，酸素，窒素そして場合によっては他のガスを真空ラインを用いて，10cm のパイレックス円筒赤外セル（窓板 NaCl）の中に混合した．全圧は715 torr になる様にした．Hitachi-G3 赤外分光光度計のサンプルビームの中にセルを入れ，上方約10cm のところから，2本の20 watt ブラックライトけい光灯($\lambda max = 360nm$, $300 < \lambda < 400nm$)で照射した．30秒間照射し，赤外スペクトルを得，さらに30秒間照射という風にくりかえした．CCl_3CClO, $CHCl_2CClO$ についても同様に行なった．

結果と考察

1. 生成物分析

CCl_3CClO, $CHCl_2CClO$ はこの条件下ではほとんど反応が進まない．クロラールについては，赤外分光スペクトルで検出された生成物は，塩化水素 (HCl)，一酸化炭素(CO)，二酸化炭素 (CO_2)，とホスゲン ($COCl_2$) であった．クロロホルムは検出限界 (4.1×10^{-2}torr) 以下

* 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

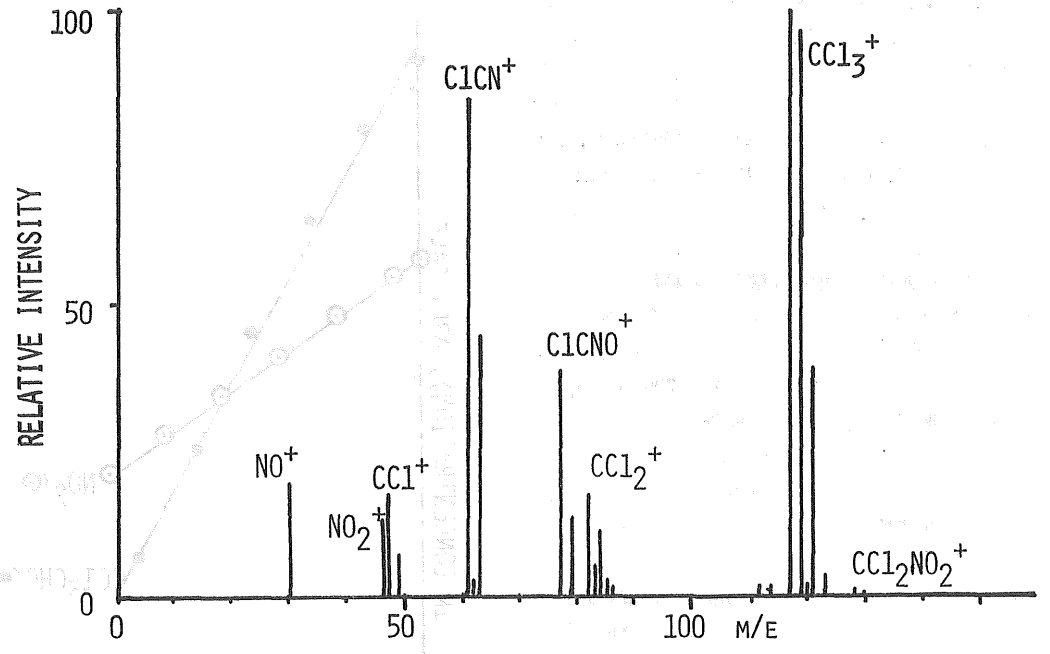


Fig. 1. Mass fragmentation pattern of major product of the reaction of $CCl_3CHO+NO_2+O_2+h\nu$

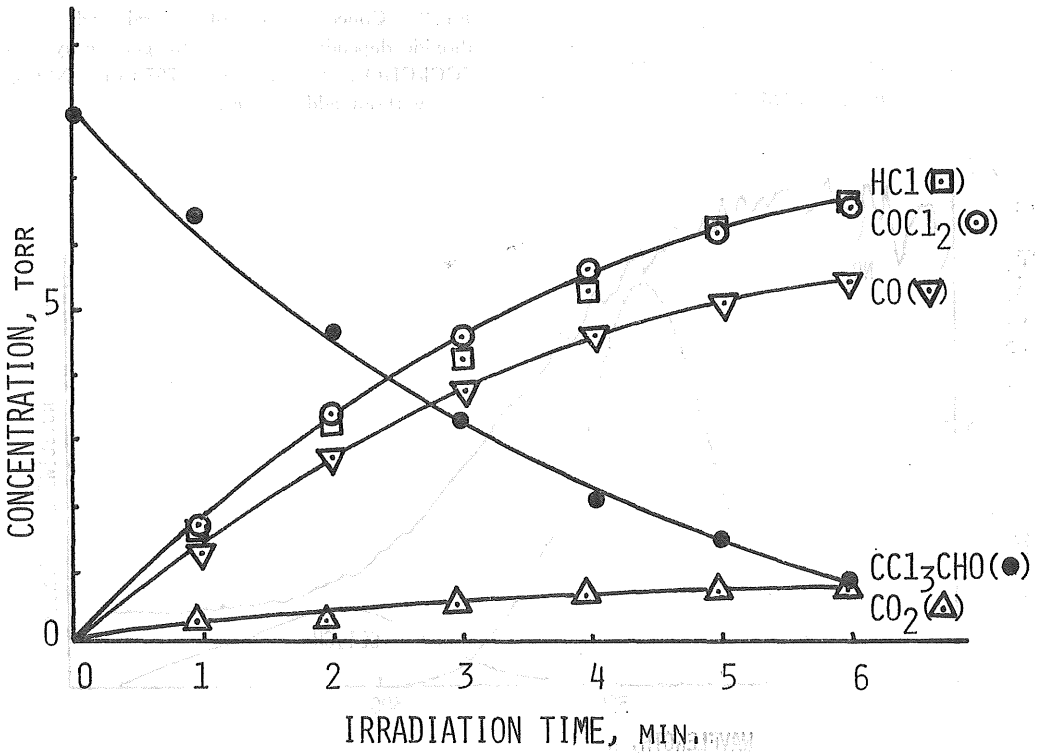


Fig. 2. A typical time-concentration profile of photooxidation of chloral: $[CCl_3CHO]_0=8$ torr, $[O_2]=707$ torr.

であった．四塩化炭素は ECD-GC で検出されたが，4.8×10^{-4}torr 以下であった．ヘキサクロロエタン，ギ酸，CCl_3COOH は検出されなかった．各生成物の濃度は赤外ピーク強度で決定された．吸光係数は CO_2 (2810 m^{-1})，1.27×10^{-2} $torr^{-1}cm^{-1}$，$COCl_2$ (1684cm^{-1})，4.16×10^{-3} $torr^{-1}$ cm^{-1}，CCl_3CHO (1351cm^{-1})，2.22×10^{-3} $torr^{-1}$ cm^{-1} であった．HCl と CO は Beer-Lambert 則に従わなかったので各々検量線を作った．

2. クロラールの空気中の光酸化反応機構

今回の実験条件下でクロラールの初期過程を知るために，すなわち，C–H 開裂か，C–C 開裂かを知るために，15torr のクロラールと数 torr の NO_2 を 700 torr の酸素と混合し，光照射した．その主生成物のマスパターンは Fig. 1に示している．m/e 61と m/e 63に強いマスフラグメントが表われていて，これは $ClCN^+$ と同定できる．他の2つの副生成物にもそのフラグメントが見られた．従って C–C 結合の開裂が主としておこることがわかる．

8torr のクロラールと 707 torr の酸素との混合物を光照射したときのクロラール及びその生成物の濃度を時間を横軸としてプロットした1例が Fig. 2 に示してある．

おおよその量子収率を知るために 3torr の NO_2 を化学光量計として用いるために同じセルの中で光分解しその分解の時間依存を Fig. 3に示している．クロラールの分解も併わせて Fig. 3に示している．クロラールと NO_2 の一次分解速度はそれぞれ 0.351，0.137min^{-1} である．クロラ

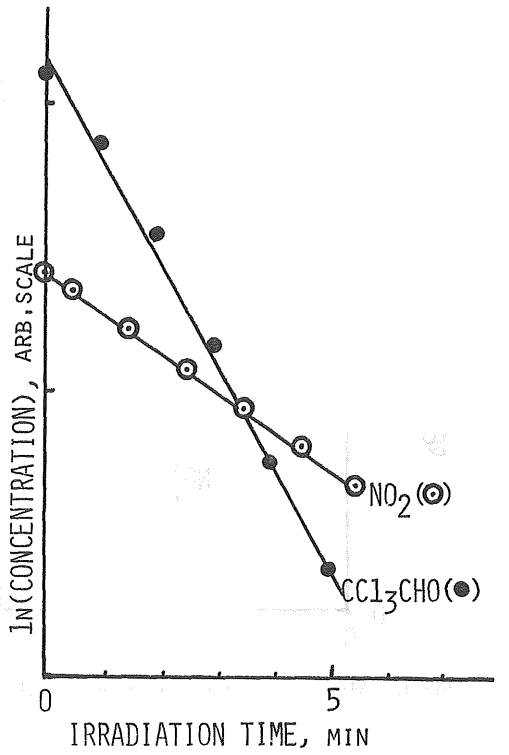


Fig. 3. Concentrations of chloral and nitrogen dioxide depending on time to get decay rates: $[CCl_3CHO]_0=8$ torr, $[O_2]_0=707$ torr: $[NO_2]_0=3$ torr without added gases.

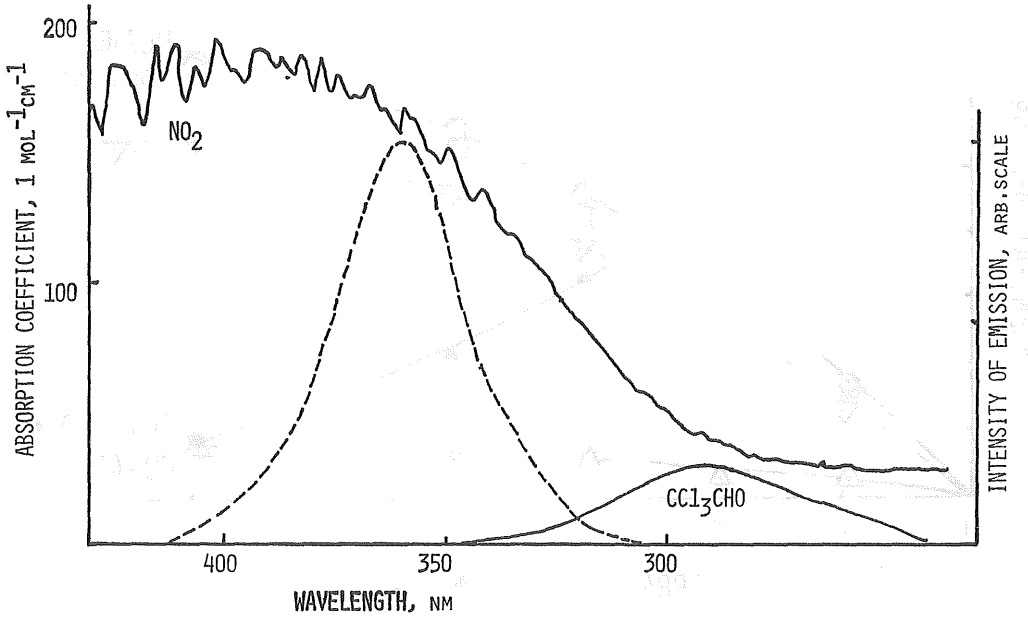


Fig. 4. Absorption coefficient of chloral and nitrogen dioxide. Emission spectrum of black blue lamp (Toshiba 20BLB) by broken line.

Table 1. Initial rates of products formation in the photooxidation of chloral

Run	Pressure of reactant or added gases, torr				Initial rates of products formed and reactant decayed, torr/mm				
	CCl_3CHO	O_2	N_2	Added gas	R_{HCl}	R_{CO_2}	R_{CO}	R_{COCl_2}	$-R_{CCl_3CHO}$
1	15	700	0	—	2.90±.30	0.41±.06	2.54±.12	2.99±.15	3.19±.34
2	15	486	224	—	3.16±.25	0.35±.10	2.97±.19	3.31±.39	3.18±.13
3*	15	251	449	—	3.28±.36	0.18±.05	3.17±.36	3.07±.40	3.40±.48
4	15	30	670	—	3.58±.35	0.01±.02	3.13±.36	3.11±.36	3.18±.34
5	15	9	691	—	3.12±.17	0	3.12±.16	2.92±.01	3.11±.25
6	5	710	0	—	0.57±.21	0.09±.01	0.61±.05	0.74±.06	0.82±.16
7	10	705	0	—	1.55±.12	0.25±.05	1.48±.18	1.69±.34	1.40±.27
8	20	695	0	—	4.16±.73	0.54±.12	3.62±.71	4.25±.79	4.01±.83
9	25	690	0	—	5.40±.68	0.74±.09	4.79±.74	5.67±.50	5.51±.99
10	15	700	0	CO, 0.65	3.20±.08	0.44±.01	2.74±.02	3.41±.10	3.28±.21
11*	15	667	0	CO, 33	1.87	0.28	—	2.06	2.02
12	15	691	0	H_2, 9	3.60	0.45	3.06	3.68	3.85
13	5	40	0	H_2, 670	small	small	small	small	small

* Light intensity was changed.

Table 1. (continued)

Run	Ratios of initial rate			
	$\frac{R_{COCl_2}}{-R_{CCl_3CHO}}$	$\frac{R_{HCl}}{-R_{CCl_3CHO}}$	$\frac{R_{CO_2}+R_{CO}}{-R_{CCl_3CHO}}$	$\frac{R_{CO_2}}{R_{CO}}$
1	0.978±.060	0.950±.151	0.942±.093	0.162±.019
2	0.933±.050	0.974±.122	0.976±.071	0.108±.014
3	0.933±.049	1.03 ±.151	1.03 ±.067	0.057±.013
4	0.992±.057	1.17 ±.173	1.00 ±.102	0.002±.002
5	0.939	1.00	1.00	0.0
6	0.925±.231	0.589±.116	0.873±.242	0.161±.029
7	1.12 ±.085	1.14 ±.137	1.05 ±.156	0.174±.016
8	0.992±.95	0.975±.081	0.964±.051	0.150±.013
9	1.01 ±.153	0.949±.119	0.987±.184	0.158±.006
10	1.04	0.976	0.970	0.161
11	1.02	0.926	—	0.157*
12	0.956	0.935	0.912	0.147
13	—	—	—	—

ールと二酸化窒素の波長に対する吸光係数を Fig. 4 に示している．この光源の領域でクロラールの吸収は弱く，二酸化窒素は強い．二酸化窒素の分解の量子収率は 2 であることを含めて，以上のことから，クロラールの分解の量子収率は 300 である．すなわちこの分解反応は連鎖反応であることがわかる．

連鎖のキャリヤーを決定するために，いくつかの初期条件の異なる系で実験を行なった．結果は Table 1 に示している．Run 12, 13 よりクロラールに対して過剰の水素は連鎖反応を抑止していることがわかる．クロラールの分解の量子収率が 300 という大きなこともあわせて考えると，連鎖のキャリヤーは塩素原子であると考えられる．

Fig. 2 で一例が示されている様に反応初期の段階では，$-R_{CCl_3CHO}=R_{HCl}=R_{COCl_2}=R_{CO}+R_{CO_2}$ が成立している．この傾向は種々の初期条件で行なわれた一連の結果 Table 1 においても見られる．炭素原子についてのマスバランスはきわめてよい．このメカニズムの詳述は他にゆずるが[3]，概略は以下の様である (Table 2)．まずクロラールが光を吸収し，トリクロルメチルラジカル (CCl_3) とホルミルラジカル (HCO) に開裂し，CCl_3 は酸素分子と

Table 2. Reaction scheme of the photooxidation of Chloral

$CCl_3CHO+h\nu \rightarrow CCl_3+HCO$	(1)
$CCl_3+O_2 \rightarrow CCl_3O_2$	(2)
$CCl_3O_2+CCl_3O_2 \rightarrow 2CCl_3O+O_2$	(3)
$CCl_3O \rightarrow COCl_2+Cl$	(4)
$Cl+CCl_3CHO \rightarrow CCl_3CO+HCl$	(5)
$CCl_3CO \rightarrow CCl_3+CO$	(6)
$CCl_3CO+O_2 \rightarrow CCl_3COO_2$	(7)
$CCl_3COO_2+CCl_3COO_2 \rightarrow 2CCl_3CO_2+O_2$	(8)
$CCl_3COO_2+CCl_3O_2 \rightarrow CCl_3CO_2+CCl_3O+O_2$	(9)
$CCl_3CO_2 \rightarrow CCl_3+CO_2$	(10)
$Cl+O_2+M \rightarrow ClOO+M$	(11)
$ClOO+M \rightarrow Cl+O_2+M$	(12)
$Cl+Cl+M \rightarrow Cl_2+M$	(13)
$HCO+O_2+M \rightarrow HCOO_2+M$	(14)
$HCO+O_2 \rightarrow HO_2+CO$	(15)
$HCO+O_2 \rightarrow HO+CO_2$	(16)

結合し，過酸化ラジカル (CCl_3O_2) になり何らかのプロセスを経て，CCl_3O に還元され，単分子的に分解して $COCl_2$ と塩素原子 (Cl) を生成する．Cl はクロラールと反応し，塩化水素と CCl_3CO を生成する．CCl_3CO は二つのパスを持っている．ひとつは CCl_3 と CO への解離で，ひとつは酸素分子との結合である．CCl_3COO_2 は何らかのパスで CCl_3CO_2 に還元され，CCl_2 と CO_2 に解離する．このメカニズムの検証として R_{CO_2}/R_{CO} を酸素分圧に対してプロットすると直線になることが予想されるが，Fig. 5 に示している様にこの仮説が正しいことが証明されている．以上のことから全体の反応メカニズムは Table 2 に示されている様に考えられる．

3. 空気中でのクロラールの光分解反応

CCl_3CClO と $CHCl_2CClO$ は，対流圏内での太陽光領域の波長の吸収は見られず，空気中で安定に存在する．しかし，クロラールは，光分解をしやすく，しかも大量の酸素存在下で連鎖反応を引き起こし，空気中に長く存

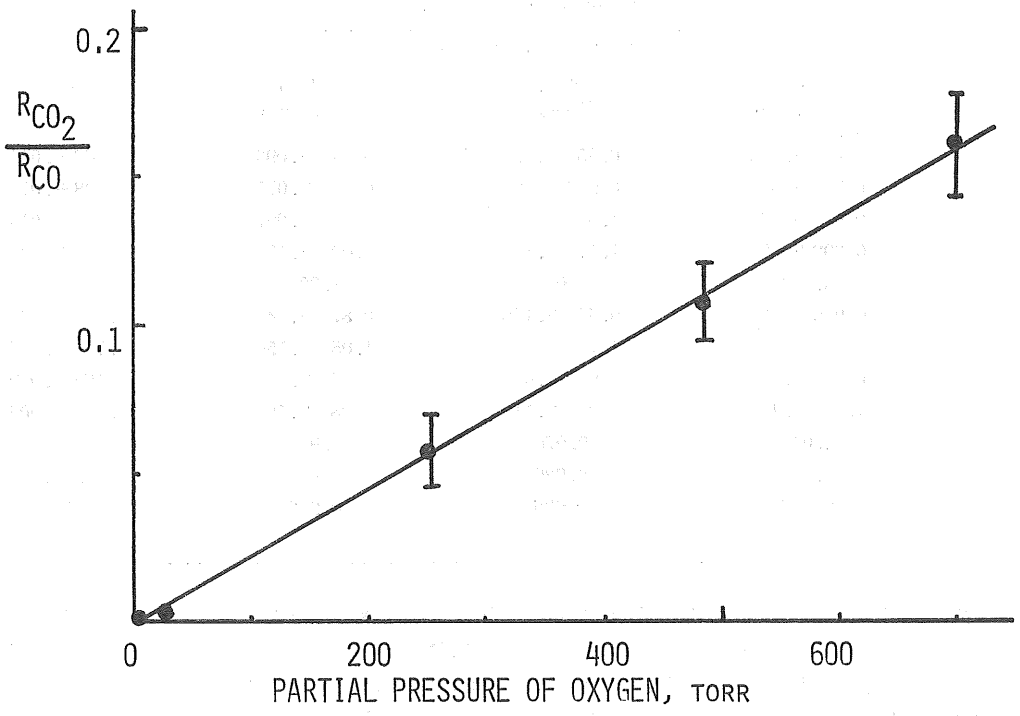


Fig. 5. Dependence of R_{CO_2}/R_{CO} on partial pressure of oxygen: $[CCl_3CHO]_0=15$ torr, $[CCl_3CHO]_0+[O_2]_0+[N_2]_0=715$ torr.

在することはできず，当量のホスゲンと塩化水素と一酸化炭素と二酸化炭素になる．この分解反応は速いが，トリクロルエチレンがクロラールを生成するパスは遅く，大気化学的には重要でないと考えられる．また CCl_3 と O_2 と NO_2 の共存下で CCl_3O_2 NO_2 が存在することが報告されており[4] その物質の NOx—汚染大気中での挙動・寿命を知る必要がある．

文　献

1) Ohta, T., Morita, M., Mizoguchi, I., and Tada, T. : *Atmospheric Environment*, 11, 985, 1977
2) Singh, H. B. : *Nature*, 264, 428, 1976
3) Ohta T., and Mizoguchi, I. : to be published in *Int. J. Chem. Kinet.*
4) Simonaitis, R., and Heicklen, J. : *Chem. Phys. Letters*, 62, 473, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 244-248, 1980

カドミウム・銅カラム還元法による水中の硝酸性窒素定量法の検討

笹野英雄*, 斎藤庄次*, 高橋正博*, 小輪瀬勉*

Study on Determination of Nitrate Nitrogen in Water by Cadmium-Cupper Reduction

HIDEO SASANO*, SHOJI SAITO*, MASAHIRO TAKAHASHI* and TSUTOMU KOWASE*

In Japan, application of a cadmium-cupper column reduction method has been recommended for the quantitative determination of nitrate nitrogen in tap water. In practice, however, flow rate of the water specimen diluted by distilled water in column is often obstructed to less than 10m*l*/min., and influential upon the reduction rate of nitrate nitrogen in the specimen. To overcome the difficulty, several attempts were made and it was found that the addition of EDTA4Na to the diluent (distilled water) in a concentration of 0.2% and adjusted to pH 8 is suitable for the yield of the constant flow rate, 10–20m*l*/min., and contributed to obtain the stabilized reduction rate of the nitrate nitrogen.

Keywords : Cadmium, Nitrate Nitrogen, Determination, Tap Water, EDTA

緒　　言

本法は硝酸性窒素定量法[1-5]の一つで，昭和53年8月31日水道法水質基準に関する省令法の改正により採用された試験法[6]である．本法は従来使用されていたブルシン・スルファニル酸法[2]と比較し，精度，感度など優れた点が多いが，分析操作上迅速性に欠ける傾向がある．硝酸性窒素は日常検査を行なう水道法水質基準の定期項目で，短時間で多量の検体を処理しなければならない場合が多い．そこで著者らは，本法の精度，感度を損なうことなく，簡易，迅速性をはかるためにいくつかの点について検討を行ない，改良すべき点を得たので報告する．

実験方法

1. 試薬および装置

（1） 金属カドミウム（硝酸性窒素還元用，径0.5～2 mm）

（2） EDTA 溶液：エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム（4水塩）45gを蒸留水に溶かして1*l*とした．

（3） カラム活性化液：EDTA 溶液 75m*l* と硝酸性窒素標準原液160m*l*との混合溶液に蒸留水を加えて4*l*とした．

（4） カラム洗浄液：EDTA 溶液20m*l* と塩酸（1＋99）12.5m*l* との混合液に蒸留水を加えて1*l*とした．

（5） 塩化ナトリウム溶液（0.6w/v%）：塩化ナトリウム6gを蒸留に溶かして1*l*とした．

（6） スルファニルアミド溶液（1w/v%）：スルファニルアミド10gを塩酸100m*l* と蒸留水約600m*l* との混合液に溶かし，蒸留水を加えて1*l*とした．

（7） N-(1-ナフチル) エチレンジアミン溶液：N-(1-ナフチル) エチレンジアミン塩酸塩1gを蒸留水に溶かして100m*l*とした．この溶液はかっ色びんに入れて保存し，調製後1週間以内に使用した．

（8） 硝酸性窒素標準原液：あらかじめ摂氏105～110度で4時間乾燥させ，デシケーター中で放冷した硝酸カリウム0.722gを蒸留水に溶かして1*l*とした．この溶液1m*l*は，硝酸性窒素0.1mgを含む．

（9） 硝酸性窒素標準液：硝酸性窒素標準原液を蒸留水で50倍にうすめたもの．この溶液1m*l*は，硝酸性窒素0.002mgを含む．この溶液は使用の都度調製した．

2. 操作方法

（1） カドミウム・銅カラムの作製

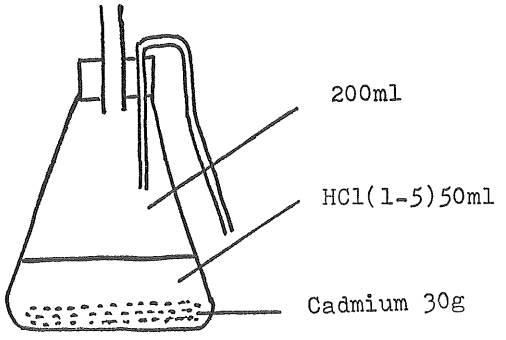


Fig. 2. Washing flask

* 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

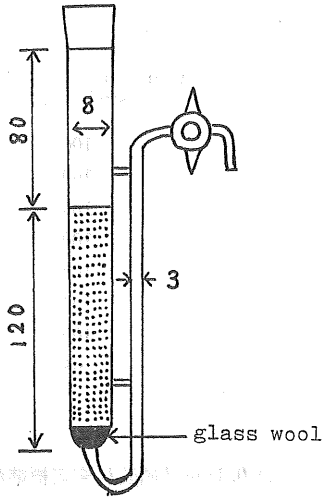


Fig. 1. Cd-Cu column for reduction of nitrate nitrogen

↓

よく振りまぜてカドミウムの表面を洗浄する

↓

塩酸溶液をすて，水100m*l* で5回洗浄

↓

硝酸（1+39）50m*l* で1回洗浄

↓

硝酸溶液をすて，塩酸（1+5）50m*l* で2回洗浄

↓

塩酸溶液をすて，水100m*l* で5回洗浄

↓

2%硫酸銅溶液50m*l* を加え，静かに振りまぜる（表面が灰黒色になる）

↓

硫酸銅溶液をすて，水100m*l* で5回洗浄

↓

水でフラスコ内を満たし（空気遮断）密封保存

↓

フラスコよりカドミウムをカラムに充填する

↓

カラムにカラム活性化溶液4*l* を10～20m*l*/min. で流す

（2） 前処理

検水2m*l*（硝酸性窒素として0.0002～0.02mg）

↓

0.6%塩化ナトリウム2m*l* を加える

↓

蒸留水を加えて100m*l* とする（検液）

この検液をカラム洗浄溶液50m*l* で10～20m*l*/min. で流したカラムに，駒込ピペットで5m*l* づつカラムの上部を2回洗浄し，残りの90m*l* を10～20m*l*/min. で流す．初流出液をすて，次の流出液10m*l* を試験溶液とする．

（3） 分析操作

試験溶液10m*l*（共栓25m*l* 試験管）

↓

スルファニルアミド1m*l* を加える

↓

5分間放置

↓

N-（1-ナフチル）エチレンジアミン1m*l* を加える．

↓

混和後20分間放置

↓

540nm 附近で吸光度測定

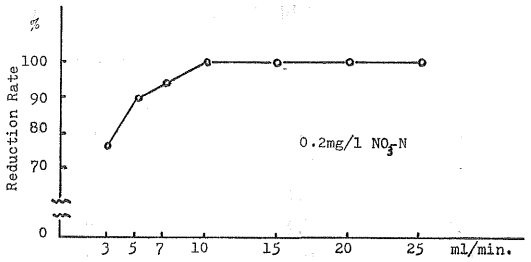


Fig. 3. Effect of Flow Rate on the Determination of NO_3-N by Cadmium-Cupper Reduction Method

（4） 検量線の作成

硝酸性窒素標準液0，1，2…10m*l* を段階的にとり，メスフラスコで100m*l* にメスアップする．試験液と同様の操作を行ない検量線を作成する．

検討項目

1. カラム通過時の流速と硝酸性窒素還元率，2. カラム充填剤の長さ，3. カラム活性化液の有効性，4. 塩化ナトリウム添加と硝酸性窒素還元率，5. 硝酸性窒素還元に及ぼす検水および洗浄液の pH の影響，6. カラム通過時における亜硝酸性窒素生成量の経時変化，7. カラム洗浄液の使用量と洗浄効果の関係，8. 排水中のカドミウム，銅含有量．

結果と考察

1. カラム通過時の流速と硝酸性窒素還元率

0.2mg/*l* 硝酸性窒素標準溶液を用いて，カラム流速と硝酸性窒素還元率の関係を検討した．その結果を Fig. 3 に示した．カラム流速 10～25m*l*/min. で100%の還元率が得られた．しかし本法では流速を常時10m*l*/min. 以上に保つことがむずかしく，流速の低下にしたがって硝酸性窒素の還元率が低下する傾向があった．そこで流速が低下した場合に洗浄液でカラムを洗うと，流速が回復することに着目し，検水2m*l* を EDTA 溶液で100m*l* に希釈する方法で検討を行なった．その結果を Table 1 に示した．EDTA 4 Na溶液濃度0.1～0.4%で還元率は100%，流速は0.02～4.0%の全検討濃度で10m*l*/min. 以上が得られた．なお各濃度の EDTA 4 Na 濃度を pH8 に調整した場合は，すべての濃度についてほぼ100% の還元率が得られた．この結果から，0.2% EDTA 4 Na 溶液（必要に応じて塩酸で pH を7～10に調整する）を検水の希釈液に使用することにより，還元率100% が得られる流速（10m*l*/min.）を常時保つことが出来ることがわかった．

2. カラム充填剤の長さ

カラム充填剤の長さを6～15cm の間でカラムを5本作

Table 1. Effect of EDTA Concentration on NO_3-N Reduction Rate

EDTA %	pH	Flow Rate (m*l*/min.)	Reduction Rate of NO_3-N (%)	Reduction Rate (%) of NO_3-N (adjusted to pH 8)
0.02	6.0	more than 10	95	100
0.04	6.3	〃	98	100
0.1	6.8	〃	100	100
0.2	7.8	〃	100	100
0.4	9.5	〃	100	100
1.0	10.2	〃	97	100
2.0	10.5	〃	78	100
4.0	10.8	〃	78	98

Distilled Water : pH 5.4 0.2mg/*l* NO_3-N

Table 2. Effect of Cd-Cu Column Length on Reduction of NO_3-N

Cd-Cu Column Length (cm)	0.05 mg/*l* NO_3-N Reduction Rate (%)	0.1mg/*l* NO_3-N Reducion Rate (%)
6	75.8	80
8	98.7	94
10	100	100
12	100	100
15	100	100

Flow Rate: 10m*l*/min.

り，0.05mg/*l* および0.1mg/*l* 硝酸性窒素標準液をこのカラムに流速10m*l*/min. で流したものについて，各カラムの硝酸性窒素還元率を検討した．その結果を Table 2 に示した．カラム充填剤の長さ10～15cm で100%の還元率が得られた．カラム充填剤の長さは，使用頻度が増加するにつれて短くなるが，本法のカドミウム量 30g でカラムを作る方法は約 12cm の長さのカラムが出来ることから，長期にわたって 10cm 以上の長さを保ち，カラムの耐用期間を長くする効果があると考えられる．

3. カラム活性化液の有効性

カラム作製時に硝酸性窒素含有のカラム活性化液を使用する原理が不明であることおよび4*l* の液量をカラムに流すため手間が係ることから，活性化液処理カラムと未処理カラムについて，0.01～0.2mg/*l* 硝酸性窒素標準溶液による還元率を検討した．その結果を Table 3 に示した．検体の希釈液に蒸留水を用いる本法，0.2%EDTA 4Na 溶液を用いる EDTA 法両法とも，活性化液処理カラム，未処理カラムを用いた結果に差を認めなかった．この結果から，カラム作製時におけるカラム活性化液の使用は不要（省略出来る）と思われる．

4. 塩化ナトリウム添加と硝酸性窒素還元率

0.05mg/*l* および 0.1mg/*l* 硝酸性窒素標準溶液に，0.6%塩化ナトリウムを添加したものをカラムに流し，添加量と硝酸性窒素還元率との関係を検討した．その結果を Table 5に示した．検液100m*l* 中の0.6%塩化ナトリウム添加量0.5m*l* の間に還元率の差を認めなかった．塩化ナトリウムの添加は，カドミウムによる硝酸性窒素の還元の触媒効果や，カラム内の還元雰囲気作りを意図したものと考えられるが，この結果からは検水に塩化ナトリウムを添加することを省略することが出来ると思われる．

5. 硝酸性窒素に及ぼす検水および洗浄液 pH の影響

カラム流速が10m*l*/min. 以上でも，検水の pH により還元力が低下することから，0.2mg/*l* 硝酸性窒素標準溶液を用いて pH と硝酸性窒素還元率の検討を行なった．その結果を Fig. 4 に示した．pH 7～10 で還元率100%の安定した結果が得られた．洗浄液についても pH により洗浄後のカラム還元率に影響があることが考えられ，0.06，0.1，0.2mg/*l* 硝酸性窒素標準溶液を用いて洗浄前，洗浄後の還元率を洗浄液（pH 約 8）と蒸留水（pH 約 5.5）について検討した．その結果を Table 6 に示した．洗浄液では，カラムの還元力に影響を与えなかったが，蒸留水はカラム還元率が 100% から26～34%に減少した．この結果から蒸留水はカラムの洗浄液に使用出来ないことがわかった．

6. カラム通過時における亜硝酸性窒素生成量の経時変化

0.01，0.06，0.2mg/*l* の硝酸性窒素標準溶液のカラム流出溶液を15m*l* 流出後10m*l* ごとに分取し，各フラクション中の亜硝酸性窒素濃度を測定した．その結果をFig. 5 に示した．流出液 15～95m*l* の全範囲で均一な亜硝酸性窒素濃度が得られた．この結果から，検水のカラム流出液は初流出液 15m*l* 以降はどのフラクションを分取しても定量に支障のないことがわかった．

Table 3. Comparison of NO_3–N Reduction Rate with Activated and Nonactivated Column

NO_3–N (mg/l)	Absorbance at 540nm	Standard Method (Activated Column)	Standard Method (Nonactivated Column)
0.01	0.034	0.034 (100%)	0.034 (100%)
0.02	0.067	0.067 (100%)	0.067 (100%)
0.06	0.198	0.196 (99%)	0.196 (99%)
0.1	0.321	0.328 (99%)	0.320 (100%)
0.2	0.623	0.623 (100%)	0.618 (99%)

Table 4. Comparison of NO_3–N Reduction Rate with Activated and Nonactivated Column

NO_3–N (mg/l)	Absorbance at 540nm	EDTA Method (Activated Column)	EDTA Method (Nonactivated Column)
0.01	0.034	0.034 (100%)	0.033 (97%)
0.02	0.067	0.067 (100%)	0.066 (99%)
0.06	0.198	0.196 (99%)	0.194 (98%)
0.1	0.321	0.318 (99%)	0.314 (98%)
0.2	0.623	0.615 (99%)	0.618 (98%)

EDTA Method: This sample was diluted with 0.2% EDTA 4 Na (Adjusted to PH 8) solution

Table 5. Effect of Concentration of NaCl on Reduction of NO_3–N

0.6% NaCl (ml)	0.05 mg/l NO_3–N Absorbance at 540 nm	0.1 mg/l NO_3–N Absorbance at 540 nm
0	0.320 (100%)	0.622 (100%)
0.1	0.320 (100%)	0.622 (100%)
0.3	0.321 (100%)	0.622 (100%)
0.5	0.321 (100%)	0.622 (100%)
1	0.321 (100%)	0.622 (100%)
2	0.320 (100%)	0.622 (100%)
5	0.320 (100%)	0.622 (100%)

Table 6. Effect of Washing Solution on NO_3–N Reduction Rate

NO_3–N (mg/l)	Washing Solution (Adjusted to pH 8)	Distilled Water (at pH 5.5)
0.06	100%	26.2%
0.1	100%	30.8%
0.2	100%	34.0%

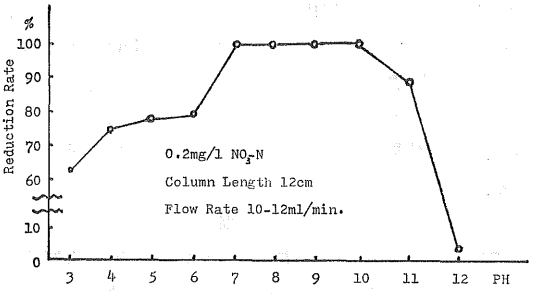


Fig. 4. Effect of pH on Reduction on NO_3–N

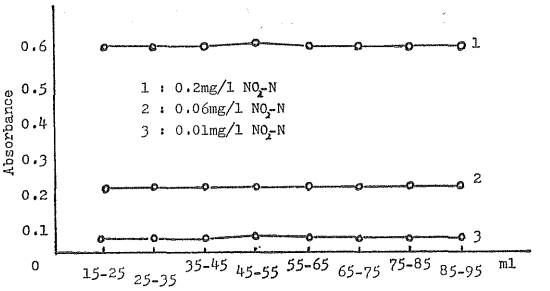


Fig. 5. Concentration of Nitrate Nitrogen in each fraction through column

7. カラム洗浄液の使用量と洗浄効果

0.2mg/l硝酸性窒素標準溶液を100ml流したカラムを用いて，洗浄液の洗浄効果最小量を検討した．その結果をTable 7に示した．洗浄液50mlの使用で次の検液の測定に支障のない洗浄効果が得られた．この結果から洗浄液と同成分を含有する0.2%EDTA 4Na 溶液で希釈した検液でカラムを共洗いする（洗浄効果最小量50mlで）ことにより，1検体毎にカラムを洗浄液50mlで洗浄する操作を省略することが出来ることがわかった．

Table 7. Residual NO_3–N Rate in the Effluent Solution

m*l* of the Effluent Solution	Standard Method		EDTA Method	
	T % at 540nm	Absorbance	T % at 540nm	Absorbance
50	98.4	0.0070	99.6	0.0017
100	99.6	0.0017	99.6	0.0017
150	99.6	0.0017	100	0
200	99.6	0.0017	100	0
250	99.6	0.0017	100	0

Flow Rate: over 10m*l*/min. 0.2mg/*l* NO_3–N

Table 8. Cd and Cu Concentration in the Effluent Solution

Effluent Solution	Cd (mg/*l*)	Cu (mg/*l*)
Distilled Water	3.9	below 0.1
0.2% EDTA 4 Na Solution (pH 8)	37	below 0.1
Washing Solution	114	below 0.1

8. 排液中のカドミウム，銅含有量

本法は排液量が無視出来ないことから，排液中のカドミウム，銅濃度を測定した．その結果をTable 8に示した．EDTA 濃度の高い排液ほどカドミウム含有量が多かったが，銅濃度はいずれの排液中も0.1mg/*l* 以下であった．この結果から排液の処理には十分な配慮が必要である．

結　論

昭和54年4月1日から実施されている水道法水質検査方法の硝酸性窒素定量法を検討し，本法の精度，感度を損なうことなく，簡易，迅速性のある改良点を見出すことが出来た．

改良点：検体の希釈に0.2%EDTA4Na 溶液（必要に応じてpH 約8）を用いることにより1）希釈検体のカラム通過流速を10m*l*/min. 以上を常時保つことが出来，迅速に100% の硝酸性窒素還元率が得られるようになった．2）希釈検体 50m*l* でカラムを共洗いすることにより，一検体毎の洗浄液によるカラム洗浄操作を省略出来，迅速化をはかることが出来た．

そのほか活性化カラム，未活性化カラムについて硝酸性窒素還元率に差が認められないことから，時間がかかり，排液が多量に出るカラム活性化操作を省略することが可能になった．

文　献

1) APHA-AWWA-WPCF: Standard Method 14th, Edition, 420, 1975
2) 日本水道協会，上水試験方法，248，1978
3) 日本薬学会，衛生試験法注解，707，1973
4) 日本規格協会，工業用水試験方法，JIS K0101, 55, 1966
5) 日本規格協会，工場排水試験方法，JIS K0102, 43, 1971
6) 大蔵省印刷局，官報第15490号，厚生省令第56号，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 249-252, 1980

某福祉センターの細菌汚染について

佐藤泰仁*

Contamination of Bacteria in the Air of a Welfare Office

YASUHITO SATO*

In a welfare office where unemployed people are helped to find temporary or permanent jobs, the bacterial contamination in the air was investigated three times in order to assess its effect on the workers' health. Standard plate count was larger in the samples collected in the rooms where many visitors are received than in others, and coliform bacilli and *staphylococcus aureus* were extracted from the samples collected in these rooms in the first investigation. In the second investigation only a few bacteria were found presumably as a result of efforts to control bacteria using cresol for cleaning and providing air curtains.

However, the third investigation revealed that many bacteria were present on couches in the waiting rooms and in the recreation room used by many visitors. It is concluded that these places in the office should be cleaned frequently and regularly.

Keywords : environmental survey, bacterial contamination, swab contact method

はじめに

病原性微生物による疾病の形態は感染源に直接に接触する，あるいは経口伝染病のように飲食物を媒介として感染発病するもののほか，病原体が空気を介して伝染する，いわゆる空気伝染があることが知られている．空気環境を対象とした細菌の実態調査は地下街や教室について浮遊細菌を指標としてなされている報告[1-3]はあるが床面付着菌としてとらえた調査は少ない．今回我々が実施した福祉センターは，日雇い労働者の就職あっせん，相談などの業務を行なっており，例えば，庁舎内で用便をしてしまうなど衛生知識の低い人々との接触があるため，職員にとって常に細菌感染に対しての不安感がある職場であった．そこで職員への健康影響が懸念されるとして某福祉センター側から調査の依頼があり，過去3回にわたってふきとり法により行なってきた細菌検査の結果をまとめてみた．

調査項目及び方法

調査対象とした細菌は一般生菌数，大腸菌群数，表皮ブドー球菌数，黄色ブドー球菌数，サルモネラ，赤痢菌及びセレウス菌である．検体の採取方法については第一回目の調査の以前に落下法により予備試験を行なってみたが，この現場にはよい方法とは認められなかったので，ふきとり法（床面付着菌量測定）[4]に準拠して行なった．すなわち，大きさ一定のガーゼを6cm平方程度におりたたみシャーレに入れ，それに一定量の生理食塩水を含浸させ，高圧滅菌器により滅菌ガーゼを作成した．現場では滅菌ピンセットでガーゼをはさみ，机上採取面積900cm²を1回ふきとりを行ないシャーレに入れて持ち帰り，検査に供した．

結果及び考察

調査の第一回目は昭和52年の11月に行なった．その結果を表1に示すが，表中①は清掃前，②は清掃後開室直前のもので，事務室と娯楽室は単に午前と午後に分けて採取したものであり，数値は1検体（ガーゼ）当りの細菌数で示してある．この調査のねらいはそれぞれの場所の同一ポイントにおいて清掃前後の細菌数の消長をみることにあったが，清掃後に逆にふえている場所が数ヶ所みられており，何の原因であるかは判明しえない．来訪者の出入りの多い特別室，娯楽室，待合室では一般生菌数において，職員のみの事務室より多いことがみられており，そのうち特別室からは他に大腸菌群，表皮ブドー球菌，黄色ブドー球菌も検出されている．第一回目の調査結果から一般生菌数として常時多い箇所としては特別室，娯楽室，待合室であり，状況によっては面接室，受付なども含まれるものと思われた．これらは来訪者の出入りが頻繁なため，土足による土砂等の流入，衣服からのホコリ等の粉塵が多く存在し，人間の動きにともなってこれらの舞い上り現象が起きているためと考えられ，したがって粉塵の流入をできるだけ少なくする配慮（例えば土落しマットの設置など）が望まれる．また，大腸

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. 第 1 回 調 査 結 果

昭和52年11月 （単位：個数／1検体当り）

	採取場所及び条件		一般生菌数	大腸菌群数	表皮ブドー球菌数	黄色ブドー球菌数	サルモネラ，赤痢菌
新館	事務室	午前	4100	0	0	0	—
		午後	2200	0	0	0	—
	特別室	①	480000	0	8600	70	—
		②	160000	100	5600	420	—
	待合室	①	10000	0	0	0	—
		②	44000	0	0	0	—
	面接室	①	2200	100	0	0	—
		②	9800	100	0	<10	—
	受付	①	1200	0	0	0	—
		②	12000	1900	0	0	—
	ドア	①	<10	0	0	0	—
		②	<10	200	0	0	—
	エレベーター	①	100	0	0	0	—
旧館	娯楽室	午前	1100000	<10	0	0	—
		午後	42000	0	380	0	—

註） ① 清掃前 ② 清掃後開室直前

表 2. 第 2 回 調 査 結 果

昭和53年7月 （単位：個数／1検体当り）

	採取場所及び条件		一般生菌数	大腸菌群数	表皮ブドー球菌数	黄色ブドー球菌数	サルモネラ，赤痢菌
新館	特別面接室	①	190000	60	0	0	—
		②	4000	0	0	0	—
	受付	①	1600	0	100	0	—
		②	430	0	0	0	—
	事務室	①	130	0	0	0	—
	相談コーナー内側	①	70	0	0	0	—
		②	680	70	0	0	—
	相談コーナー外側	①	2800	0	0	0	—
		②	1700	190	0	0	—
	待合室	①	6000	10	1100	0	—
		②	22000	140	400	0	—
	ドア（握り）	①	80	0	0	0	—
		②	2100	20	0	0	—
	階段手すり（A）	①	920	0	200	0	—
		②	30	0	0	0	—
	階段手すり（B）	①	920	<10	100	0	—
旧館	娯楽室	①	50000	130	5000	0	—
		②	560000	610	2400	0	—
	事務室	①	1600	0	0	0	—
		②	6000	0	0	0	—

註） ① 清掃前 ② 清掃後2時間経過

表3. 第3回調査結果

昭和54年11月 （単位：個数／1検体当り）

	採取場所	一般生菌数	大腸菌群数	表皮ブドウ球菌数	黄色ブドウ球菌数	セレウス菌
新館	託児室児童通用階段手すり（2階→1階）	20	0	0	0	0
	調理室調理台	140	<10	100	0	0
	表階段手すり	1200	0	300	0	0
	相談コーナー入口ドア握り	160	0	0	0	0
	待合室長椅子	8000	0	1300	<100	0
	職員出入口引き戸の引き手	<10	0	0	0	0
	職員出入口ドア握り	60	0	300	0	0
	特別面接室内壁	420	0	300	0	0
	エレベーターかご内壁	100	0	0	0	0
	受付カウンター来訪者側	4200	0	1400	0	0
	受付カウンター職員側	600	0	0	0	0
	48番電話台（相談来訪者も利用する）	40	0	0	0	0
	相談コーナー来訪者側机の上	1600	0	210	0	0
	相談コーナー職員側机の上	100	0	0	0	<100
	事務室机の上	1100	<10	200	0	0
旧館	事務室机の上	2200	<10	900	0	0
	事務室入口ドア握り	60	0	0	0	0
	娯楽室入口引き戸の引き手	7000	0	3000	100	0
	娯楽室流しの縁	8000000	550	40000	0	100
	学童保育室テーブルの上	130	0	100	0	0

註） 今回は清掃開室後7時間経過後のものである．

菌は主に人間や動物の排泄物から由来するところであるので検出された箇所では今までのように水掃きのみならず，クレゾールを使用しての拭き掃除を行なう必要がある．さらにブドー球菌についてはケガなどの化膿からの由来であり，特に黄色ブドー球菌は病原性があるため，これについてもクレゾールによる清掃を行なえば十分であると考える．最後にサルモネラ，赤痢菌についてはいずれの場所からも検出されなかった．

第二回目の調査は昭和53年7月に実施した．今回の調査は設備の一部改善（エアーカーテンの設置）および清掃方法の改善（クレゾール掃きの併用）によるその効果をみることを中心に前回と同様の調査を行なった．その結果を表2に示したが表中①が清掃前のもの，②は清掃後2時間後のものである．一般生菌数において，娯楽室を除いては前回の結果より相対的に減少していることが認められ，更に病原性のある黄色ブドー球菌が検出されていないので，クレゾール清掃の効果があったものと認められる．又，相談コーナーに設置されたエアーカーテンの効果については，清掃前，後の条件でも内側と外側に差がみられていることからある程度あるものと思われた．しかし今回も来訪者の大勢集まる待合室や娯楽室は一般生菌数等において常に一定程度（比較的多く）存在していることがみられるので，これらの場所については清掃回数を多くすることにより減少させるとか，来訪者に対する衛生知識の啓蒙など行なう以外，現状では適当な防菌対策は考えにくい．

第3回目の調査は昭和54年11月に行なった．今回は福祉センター勤務職員にとって細菌汚染の関心の深い場所を対象としたため，階段の手すりとか扉の握りなどがあり，常法の如く採取し検査を行なった．結果は表3として示したが，今まで行なってきた環境改善の効果のためか，一般生菌数でみた場合1ヶ所（娯楽室流しの縁）を除いては従来の数値よりも少ないことがみられた．

個々については受付カウンターおよび相談コーナーでは明らかに職員側よりも来訪者側に多くみられること（これは前回と同じエアーカーテンによる効果と判断される）や，待合室長椅子や娯楽室入口引き戸の引き手（ドアーの握りよりゴミ等がたまりやすいと思われる）など来訪者が直接関係するところは他に比べ多かった．今回もサルモネラ，赤痢菌についても行なったが未検出

であった.

更に今回はじめて土壌由来のセレウス菌について同定を行なってみたが，2ヶ所においてみとめられただけであり，数値も少なかった.

以上，3回の調査についての考察を述べてきたが，このような福祉センターは外部来訪者（特に衛生知識が乏しい）との接触が業務であることから，一定程度の細菌汚染はさけられないと思うが，段階的に改善したことによって少なくなってきた結果がある．これらをふまえ，一にも二にも清掃に心がけることが必須の職場と考えられた.

ま と め

(1) 来訪者の出入りの多い待合室，娯楽室などでは，職員のみの事務室より一般生菌数が多く，条件によっては大腸菌群や病原性の黄色ブドー球菌なども検出される.

(2) 清掃方法の改善（水掃きをクレゾール掃きに改める）による効果が認められた.

(3) 来訪者側と職員側の間にエアーカーテンを設置したことにより内側への細菌の流入が一定程度防がれることが認められた.

謝辞 今度の細菌類の定性，定量に際しては当所細菌第一研究科山田澄夫研究員に全面的に御協力をいただいた．ここに記して謝意を表します.

文 献

1) 本田えり：公害と対策，13（9），950，1979
2) 中田秀彦，横田正義，河原林忠男：日衛誌，29(6)，563，1975
3) 吉沢 晋，菅原文子：日本公衆衛生学会講演集，703，1979
4) (社) 日本食品衛生協会：食品衛生検査指針（Ⅱ），p. 308，1978

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 253-260, 1980

Epidemic of Dermatitis due to a cheyletid Mite, *Chelacaropsis* sp., in Tatami Rooms (I)

MIDORI YOSHIKAWA*

It is known that new tatami contain several kinds of mites and insects. Since so many houses have been built recently, the straw for making tatami is being used before it has dried out enough. Mites and insects which flourish in damp straw are introduced to houses by this new tatami. Some of these living things cause itching problems in houses.

Through April 1979 to March 1980, many itching problems from newly-built apartments and houses were reported to us. Most of the itching was caused by mites or insects which were already known to bite human beings. In several houses, however, there were no instances of such mites or insects already known to cause itching, but widespread dermatitis appeared among residents of the houses. A living cheyletid of *Chelacaropsis* sp. was collected in a large number from the dust of all these houses so that this mite was thought to be responsible for the itching problem.

Keywords: dermatitis, acariasis, swelling, urticaria, eczema, allergic

Introduction

Tatami are a traditional floor covering made of dried grass, widely used in Japanese houses. New houses, especially so-called mansions, have recently increased so rapidly in number that the straw for making tatami is being used before it has dried out enough. Several kinds of mites and insects are introduced to houses by this new tatami since some species flourish in damp straw. The common mite families found in new tatami are pyemotidae, Tydeidae, Tarsonemidae, Cheyletidae and Acaridae. Some species in these families are already known to cause itching. Among Cheyletidae, *Cheyletus fortis* Oudemans 1904[1] (= *Cheyletus malaccensis* Oudemans 1903[2]), *Cheyletus eruditus* (Schrank 1781)[1] and *Cheletomorpha lepidopterorum* (Schaw 1794)[3] are known to bite human beings. Cheyletids are found on mass in damp straw since they live on cheese mites, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank 1781) of Acaridae, which feed on fungi grown in damp straw.

Through April 1979 to March 1980, many itching problems were reported to us. Most of the itching was caused by bloodsucking insects or mites, or caused by insects and mites in new tatami which were already known to bite human beings. In several houses, however, there were no instances of such mites or insects already known to cause itching but widespread dermatitis appeared among residents of the houses. A cheyletid of *Chelacaropsis* sp. was collected from all these houses. The dermatitis of the residents of these houses was similar to the dermatitis caused by *Pyemotes ventricosus* (Newport 1805) of Pyemotidae, and the dermatitis was much more widespread in houses where a number of this living mite were found than in houses where other living cheyletids were collected. The itching cases caused by *Chelacaropsis* sp. are reported here, adding several data and further details to the previous report[4]. Oshima[5] also mentioned one case of itching caused by this cheyletid.

Many homes in one apartment block were troubled with the same type of itching which was guessed to be caused by *Chelacaropsis* sp. Only a few homes in the apartment were selected to check the house dust since the materials used for the apartment were brought from the same company, so

* 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

that the cause of the itching would be the same in all.

Cases of Acariasis

People who had been bitten but did not know how consulted our laboratory or Department of Environmental Sanitation (D.E.S.) or Health Centers (H.C.) of Tokyo Metropolitan Government. These people were asked to show the bitten parts of their bodies and to bring in the house dust swept up by their vacuum cleaners [6]. Of these, the people who experienced itching and whose house dust contained *Chelacaropsis* sp. were listed (Table 1). The people and the questions put to them were recorded as follows: Case: each case was noted down by a number, the people who came to consult us, their ages, the date consulted and where they lived. Family: The other members of

Table 1. Mites and Insects Collected from the Dust of Itching Problem Houses

mites \ case No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Blattisocius keegani		x					○ xx				x
Kleemannia plumosus										x	
Pytoseiidae											x
Tydeus sp.										x	
Tarsonemus spp.			xx					○ xx	x		
Cheyletus fortis			xx			○ x					x
Cheyletus malaccensis						○ x				x	
Chelacaropsis sp.	○○○ xxx	○○○ xxx	○○○ xxx	○ xx	○○○ xxx	○ x	○○ x	○○○ xx	x	x	○ xx
Cheyletomorpha lepidopterorum										x	
Tetranychus spp.	x		x							x	
Tyrophagus putrescentiae			xx		xx	x	○ xx	xxx			x
Suidasia nesbitte										x	
Saproglyphidae hypopus										x	
Glycyphagus domesticus		x									
Lepidoglyphus destructor											x
Dermatophagoides farinae	○○○ xxx	○○ x	○○ xxx	○○ xxx	○○ xx	○○○ xxx	○○ x		○ x	○ xx	○ xx
Dermatophagoides pteronyssinus	x			○○ xxx				○○ xxx		xx	
Euroglyphus maynei										x	
Haplochthonius sp.	xx								○ xxx		
Cosmochthonius sp.	x								○ x		
Other oribatei	x	x							x		
Psocoptera		○○○ xxx	○○○ xxx	xx	○○○ xxx	○ xx		xx			xxx
Tysanura		x									
Coleoptera		x						xx			x

○○○,xxx : More than thirty living ones (○○○) or dead ones (xxx) found in a treatment for examination in each case.

○○,xx : Ten to thirty living ones (○○) or dead ones (xx) found in a treatment for examination in each case.

○,x : One to ten living ones (○) or dead ones (x) found in a treatment for examination in each case.

the person's family living in the same house, and their pet animals if they had any, since animal parasites might be responsible for biting the members of the family [7—9]. History: How the family first started to suffer from dermatitis. Symptoms: Symptoms of the people who were checked by us. Symptoms of the others: Symptoms of other members of the person's family as described by that person.

Cases 1 to 8 (excluding 4) and 11 were checked by the author as to the symptoms of the person. Case 4 was checked by the house wife of case 3. Cases 9 and 10 were checked by members of D.E.S. and the Hino H.C. The author confirmed all the details of cases 4, 9 and 10 by phone.

Case 1 A lady (33), July 1979, Tokyo, No animals.

History: In July 1977, the tatami of her house were changed to new ones. She felt itching during the summer and autumn of 1977 and 1978, but the problem was not severe. Early July 1979, she was bitten almost all over her body, although she did not notice the moment she was bitten. Once bitten, she had felt the itching continuously for at least a week. Also, brown spots remained and did not disappear for several months. Widespread rashes broke out while she slept in Japanese-style bedding, where bedclothes are laid directly on tatami.

Symptoms: Red swellings of 0.5 to 1 cm in diameter were found on her neck, stomach and legs.

Case 2 A house wife (33), September 1979, Tokyo.

Family: Her husband (31) and son (1.5). No animals.

History: In September 1979, this family bought a carpet made of straw (3m × 4m) which they placed on top of the tatami in the bed room. A week later, all the family started to feel itching and found a lot of red swellings on their bodies. All of them, except the wife who used a bed, were affected, especially at night after sleeping in Japanese-style bedding.

Symptoms: A few small red spots were found on her arms. Her dermatitis was very light.

Symptoms of the others: The son was the most seriously affected person in the family. He was covered with red swellings of 0.3 to 0.5 cm in diameter all over his body and it looked like urticaria. The swellings on her husband appeared in big but only a few circles on his neck and legs.

Case 3 A house wife (44), September 1979, Tokyo.

Family: Her husband (45), son (18), daughter (16) and daughter (15). No animals.

History: In May 1978, this family moved into a twelve-story apartment which was built in April of its year. They started to feel itching and found some swellings in autumn 1978. In August 1979, they were affected much more seriously. The itching was especially bad when they were sleeping in Japanese-style bedding. Only her son, who used a bed, had no trouble at night. In this apartment, 136 among 178 homes complained of itching in autumn 1979. The itching first occurred in 1978 but most of the residents did not report it since they were afraid that it might be thought that mites had bred as a result of their rooms being dirty.

Symptoms: She had several red swellings on her arms and legs. She did not show us her inguinal parts, waist and nates which were, she said, severely affected.

Simptoms of the others: Her husband could only find a few red spots on his arms and legs, and the son had only two small spots on his arms. Her daughters were terriblly bitten on their inguinal parts, waists and nates, and most of the red swellings of 0.5 to 1 cm in diameter, appeared in pairs, separated by a distance of 1 to 3 mm from each other.

Case 4 A house wife (38), September 1979, Tokyo.

Family: Her husband (42), son (14) and son (6). No animals.

History: In May 1978, this family moved into the same apartment as case 3. They found more swellings in autumn 1979 than in 1978. All of the family were affected while sleeping in Japanese-style bedding, but her husband had never been bitten.

Symptoms: She had several red spots on her inguinal parts and nates, grouped in pairs as in case 3's daughters'.

Symptoms of the others: Sons had a few swellings of the pair-type.

Case 5 A lady (63), September 1979, Tokyo.

Family: Her son (37) and daughter (22). No animals.

History: In May 1978, they moved into the same apartment as case 3. They found some swellings in autumn 1978, but the trouble became extremely serious in August 1979. All the family were bitten so severely while sleeping in Japanese-style bedding that they could not sleep well for several nights. This case was considered to be the most serious one among the 178 homes in the apartment.

Symptoms: She was bitten around her chest and back where the red spots were 0.5 to 0.8 cm in diameter.

Symptoms of the others: The son was the most severely affected person in the apartment. He was bitten all over his body including his face and neck. One night, when he could not stand the terrible itching, he took a large quantity of oral medicine and ointment which were prescribed by the doctor of a dermatology clinic. A little later, he had a convulsive fit and was taken to hospital by ambulance. The dermatitis looked like eczema. The daughter was bitten on her arms and entire part of her back. The spots appeared as pairs on most parts of the bodies of the son and the daughter.

Case 6 A house wife (38), September 1979, Tokyo.

Family: Her husband (44) and son (3). No animals.

History: In May 1978, this family moved into the same apartment as case 3. In August 1979, they were bitten more severely than in autumn 1978. They had no itching trouble while sleeping, but the next morning they found many red swellings. They used Japanese-style bedding.

Symptoms: She had a few red swellings of 0.1 to 0.2 cm in diameter, only on her iguinal parts.

Symptoms of the others: Her husband was the most severely affected in the family and was bitten in several places on his back and legs. Only two or three bites were found around the chest and back of the son.

Case 7 A house wife (27) and her son (2), October 1979, Tokyo.

Family: Her husband (31). No animals.

History: In July 1979, this family moved into a seven-story apartment built in April of its year. In September, they started to feel itching, especially at night after sleeping in Japanese-style bedding.

Symptoms: Several rashes were found on her arms and femora. Her son, who was the most seriously affected in the family, was bitten all over his back with spots of 0.3 to 0.5 cm in diameter, most of which had already turned brown when the author examined him. The scattered spots resembled urticaria.

Symptoms of the other: Her husband had only two or three small bites on his neck.

Case 8 A company employé (38), November 1979, Chiba Prefecture.

Family: His wife (35) and son (2). No animals.

History: In July 1979, this family moved into a new house which was built in April of its year. In August they started to feel itching and found several red swellings. In September the outbreaks became very serious, especially when they used Japanese-style bedding.

Symptoms: He had been severely bitten since late September and consulted a medical doctor as he thought he was suffering from eczema. He was bitten all over his body. The swellings were scattered at random not in pairs.

Symptoms of the others: His wife was bitten on her side but the rash was small. The spots scattered all over the back of the son looked like urticaria.

Case 9 A house wife (29), her daughter (3) and daughter (4 months), January 1980, Tokyo.
Family: Her husband (36). No animals.
History: In 1978, this family moved into a newly-built apartment in Tama New Town. They had a few itching problems in the summer and autumn of 1978 and 1979, but in December 1979 and January 1980, they found a lot of red swellings on their bodies. Although they used Japanese-style bedding, they felt no itching while sleeping but when waking up next morning, they found many red swellings.
Symptoms: The house wife was the most severely affected in the family and was bitten randomly all over her body except her face. Some of the swellings on her back were waterly. The elder daughter had several bits only on her nates. The younger daughter who used a cot had not been bitten.
Symptoms of the other: Her husband was lightly affected and bitten only on his stomach.
Case 10 A house wife (20's), son (3) and daughter (6 months), January 1980, Tokyo.
Family: Her husband (30's). No animals.
History: In 1978, they moved into a newly-built apartment in Tama New Town. They found only a few bites in summer 1978. In September 1979, her husband started to feel itching and found some bites. Spots appeared on the bodies of the wife and the son in October. All of them felt itching especially while using Japanese-style bedding.
Symptoms: The wife and the son were bitten on their femora, back and nates. The daughter had a few red spots on her nates which might have been caused during the waking-time she spent on tatami, as she used a cot for sleeping.
Symptoms of the other: Her husband was the most seriously affected in the family and was bitten all over his body except his face. His dermatitis was like eczema.
Case 11 An office lady (20), February 1980, Tokyo, No animals.
History: In a company domitory, about 20 girls (fluctuating in number) live together in a big tatami room where the tatami had been renewed in Spring 1979. The girl felt itching but no dermatitis. All of the girls used double bunks for sleeping in the big room.

Mites and Insects Collected

Mites and insects were extracted from dust and identified. Mites were recorded in the species level, but incomplete ones were identified in the genus or the family. The identification of Cheyletidae followed the book of Summers and Price[10]. The insects which were confirmed as non-venomous species were recorded in the order level (Table 1).

Discussion of the Cases and Their Control

Several mites collected from the dust (Table 1) have been reported as causing itching or dermatitis. Among mites of Pyroglyphidae, *Dermatophagoides farinae* Hughes 1961[11] and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart 1897)[12] become allergens causing allergic dermatitis or asthma. These mites are very common and are collected from over 90% of house dust[13], especially from beds since they feed on human dandruff[14]. People may have contact with these mites every night in bed, however, only acarina allergics, especially children, suffer from dermatitis or asthma. People severely affected in seven cases 3 to 9 consulted medical doctors before they brought the dust to us. The doctors concluded that all of them suffered from acariasis or swellings caused by having been bitten by mites or insects, because of the holes pierced by them, but not from allergy, eczema, or urticaria.

Glycyphagus domesticus (De Geer 1778) of Glycyphagidae, *Kleemannia plumosus* (Oudemans 1902) of Ameroseiidae, *Tydeus* sp. of Tydeidae and *Tetranychus* spp. of Tetranychidae are reported to bite human beings, but these mites would have been too few to cause problems in these houses

even if they had been alive. The mite of *Chelacaropsis* sp. should be considered as responsible since it was collected in all houses where dermatitis was found (except No. 11) and a number of the mites were alive. A cheyletid is a predator so that it attacks other small animals such as *T. putrescentiae*, *D. farinae*, *D. pteronyssinus* and eggs or larvae of Psocoptera. It may accidentally bite human beings.

In cases 1, 2, 4, 5, 7, 8 and 9, only *Chelacaropsis* sp. could be responsible. The most severe case was No. 5, followed by Nos. 1 and 8, where living mites of *Chelacaropsis* sp. were collected in a large number. In case 3, this mite was the main mite causing itching as there was a lot of living specimens, however, *C. fortis* when alive might have made the problem more serious. In case 6, *C. fortis* and *Chelacaropsis* sp. are thought to be jointly responsible for causing the swellings. In case 10, two kinds of cheyletids of *Chelacaropsis* sp and *Cheyletomorpha lepidopterorum* when alive apparently bit human beings. In case 11, living mites of *Chelacaropsis* sp. were few and besides all the girls used beds, so the problem was minor. How seriously people are affected is closely related to the number of living mites of *Chelacaropsis* sp. in cases where people used Japanese-style bedding.

Chelacaropsis sp. resembles *Chelacaropsis moorei* Baker 1949, but the female has a prodorsal shield and the male has a prodorsal and a hysterosomal (which is not clear in our speciemen) shields. The characteristics of this mite is that it has a pair of claws on all of its legs, a pair of eyes, suboval idiosoma with relatively short or spatulate dorsal body setae and palptarsus with one comblike seta (Fig. 1 and 2). This mite may bite human skin with its needlelike chelicera, but sometimes it may

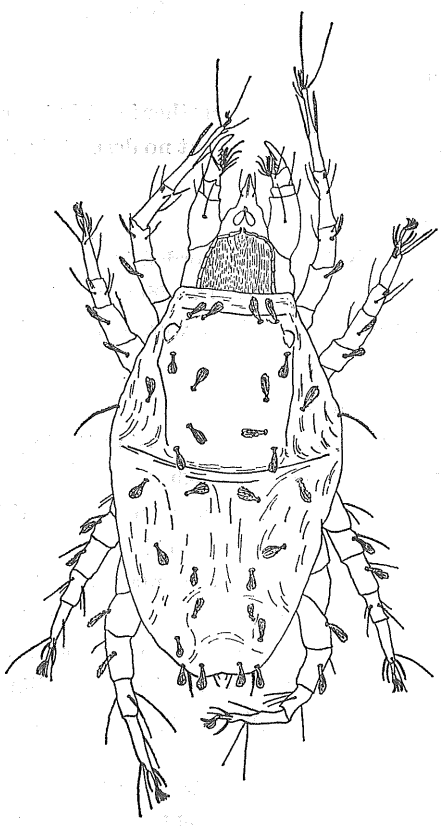


Fig. 1. *Chelacaropsis* sp. Dorsal View of Female

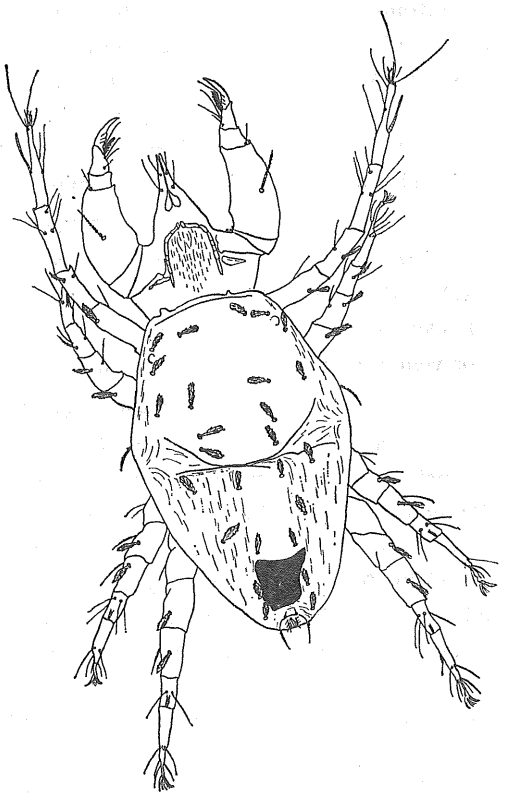


Fig. 2. *Chelacaropsis* sp. Dorsal View of Male

nip the skin with its clawlike palps. It could be that the red swellings appear scattered at random when people are bitten by chelicera, and the swellings appear in paris when the person is nipped.

All cases of itching were caused by new straw-mats so that the best way of controlling the mites is to dry the mats thoroughly in the sun, thus killing the mites, before bringing the new mats indoors. Even when existing tatami cause itching problems, they should be dried in the sun for about a week, turning them over occasionally. It is clear that when the moisture in the air is decreased, a mite loses its body water down to the same moisture level of the air surrounding it[15] and in dry air it loses water rapidly initially and then more gradually until it dies[16].

Powder insecticide is useful for controlling mites. However, it is impossible to kill them quickly. Insecticide is not effective enough. Only mites touched by or close to the insecticide are killed. In the middle of May 1980, all the families except No. 10 were checked by the author to see whether the problems had stopped or how controlled the mites were. In cases 1, 5, 6, 8 and 9, tatami had been dried in the sun at least for a day. The people in those cases do not experience itching now. In cases 2, 3, 4, and 11, people opened the doors and windows constantly and admitted fresh air into rooms and then sprayed powder insecticide under the tatami. Of these cases, Nos. 4 and 11 have no trouble now but Nos. 2 and 3 are still affected. In case 7, the problem was stopped a few weeks later after a pest control company sprayed insecticide.

Acknowledgements Thanks go to Ms. Joan Swindells, CWAJ Fellowship secretary, for reading this manuscript and to Mr. Tomosuke Ito, Department of Environmental Sanitation of Tokyo Metropolitan Government, and all sanitary inspectors of the Hino Health Center for cooperating the work of cases 9 and 10.

References

1) Sasa, M.: *Danirui (Mites and Ticks)*, 2nd Ed., 343, 1965, Tokyo University Press, Tokyo
2) Nakada, E.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 26, 151, 1975
3) Aoki, J.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 17, 29, 1966
4) Yoshikawa, M.: *Inform. of Environ. Sanit.*, 4, 14, 1980
5) Oshima, S.: *Proceed. Jap. Associ. Acarology*, 6, 12, 1980
6) Nakada, E., and Yoshikawa, M.: *Tokyo Eiken Nenpo*, 28-1, 234, 1977
7) Tanaka, H.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 4, 72, 1953
8) Hatsushika, R., Miyoshi, K., and Shimizu, M.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 30, 289, 1979
9) Ogata, M., Itagaki, H., Suzuki, T., and Ishida, F.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 31, 67, 1980
10) Summers, F.M., and Price, D.W.: *Review of The mite Family Cheyletidae*, 61, 5, 1970, University of California Press, Berkely
11) Pepys, J.M., and Hargreave, F.E.: *Lancet*, 1, 1270, 1968
12) Maunsell, K., Wraith, D.G., and Cunnington, A.M.: *Lancet*, 1, 1267, 1968
13) Wharton, G.W.: *J. Med. Ent.*, 12, 577, 1976
14) Sesay, H.R., and Dobson, R.M.: *Acarologia*, 14, 384, 1972
15) Arlian, L.G., and Wharton, G.W.: *J. Insect Physiol.*, 20, 1063, 1974
16) Yoshikawa, M.: *Jap. J. Sanit. Zool.*, 30, 271, 1979

ツメダニの一種による掻痒性皮疹について

吉川　翠*

新しい畳には数種類のダニや昆虫が生息していることは，よく知られている．最近頻繁に家が新築され，その結果，畳を作るワラは十分に乾燥されないうちに使用されてしまう．この湿ったワラの中に生息しているダニや昆虫は，畳と一緒に家の中に運ばれ，そのうちの何種かが住民にかゆみを起こしている．

昭和54年4月から55年3月までの1年間に，かゆいという苦情が新築住宅からたくさんよせられた．その多くは，かゆみを起こすとすでに報告されているダニや昆虫によるものだった．しかし，数家屋では，そのような報告のあるものは見つからなかったのに，人々は何かにひどく刺されていた．これらの家のゴミから，生きたツメダニの一種である *Chelacaropsis* sp. が多数採取されたので，このツメダニが原因であると考えられた．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 261-264, 1980

神田川水系のセスジユスリカ終令幼虫の，2種の有機リン系殺虫剤に対する感受性

大野正彦*，岡本　寛*

Test on the Susceptibility of the Last Instar Larvae of *Chironomus yoshimatsui* Martin et Sublette (Diptera, Chironomidae) collected at the Kanda River to Two Organophosphorus Insecticides

MASAHIKO OHNO* and HIROSHI OKAMOTO*

Keywords：セスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui*，有機リン系殺虫剤 organophosphorus insecticide，感受性 susceptibility

緒　言

近年，都内の中小河川でセスジユスリカ *Chironomus yoshimatsui* Martin et Sublette が大発生し，その防除のため各区役所などでは河川に殺虫剤の散布をおこなっている．1979年には都内で総計53トン程度の殺虫剤，主にテメホス temephos（アベイト Abate），フェンチオン fenthion（バイテックス Baytex），フェニトロチオン fenitrothion（スミチオン Sumithion）などが頻繁に散布されている．このような同種薬剤の反復散布がそこに生息するユスリカ幼虫の薬剤感受性に影響を及ぼしていると思われる．したがって，効果的に薬剤散布をおこなうためには，ユスリカの薬剤感受性を知る必要があると考え，神田川水系に生息するセスジユスリカ幼虫について，2種の有機リン系殺虫剤に対する感受性を調査し，若干の知見が得られたので，その結果を報告する．

材料と方法

供試昆虫：79年10月に神田川水系の2地点，すなわち，よく薬剤散布がおこなわれ，またその上流で散布した薬剤が流入する神田川高田橋附近の水域，および76年から散布がおこなわれていない善福寺川春日橋附近の水域で，セスジユスリカの卵塊を採集した（Fig. 1）．採集した卵塊を実験室に持ち帰り，孵化させ，善福寺川の底泥を与え室温で終令まで生育させたものを実験に供した．

供試薬剤：実験に用いた殺虫剤はtemephos (*O*, *O*, *O*′, *O*′–tetramethyl *O*, *O*′–thiodi–*p*–phenylene phosphorothioate)，fenthion (*O*, *O*,–dimethyl *O*–4–methylthio–*m*–tolyl phosphorothioate) の2種である．原体をアセトンに溶解して供試した．

実験方法：150m*l* 容のガラス製標本瓶（口径3.5cm）に，溶存酸素が飽和状態の蒸留水100m*l* を取る．マイクロシリンジを用いてアセトンに溶解させた薬剤をその中に入れた．また，薬剤を含まずアセトンのみを添加したものをつくり，これをコントロールとした．アセトンの量は0.4m*l* を超えることがないようにした[1]．ふたをし，よく振り混ぜ，蒸留水と薬剤，アセトンが均一になるようにし，ふたをとり20℃，暗条件下の恒温槽に1～2時間放置した．そして，それにセスジユスリカ終令幼虫を10～20個体入れた．暴露を1時間，24時間の2段階とした．各濃度について2～5回実験を行なった．暴露後，幼虫をよく洗浄し，清浄な蒸留水の入っている別の標本瓶に移し，今までユスリカが営巣していた底泥を1g程度加え，20℃，暗条件下に置いた．観察は24，48，72時間後に行ない，死んだものは速やかに取り去った．観察終了後，熱帯魚用のエアポンプを用いて1分間の通気を行なった．薬剤の効力判定には72時間後の結果を用いた．各濃度ごとに実験に用いた総個体数に対する巣を造らない個体の割合を算出した．これらの結果から，プロビット法により，実験に供したものの半数が巣を造らない濃度50% Effective concentration[2]（以下 EC_{50} と称す），および回帰直線を求めた．

結　果

結果をFig. 2，Table 1で示した．神田川（高田橋）のセスジユスリカ幼虫の temephos に対する EC_{50} は暴露を1時間，24時間とした時，それぞれ3.64，0.092 mg/*l* であった．善福寺川（春日橋）のそれは1.67，0.033mg/*l* で，神田川のものより小さかった．回帰直線の傾きは両者にあまり差がないように思われた．また，fenthion に対しては両地点とも感受性が低かった．特に神田川のものの感受性は低く，1時間暴露で死ぬものが

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24–1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

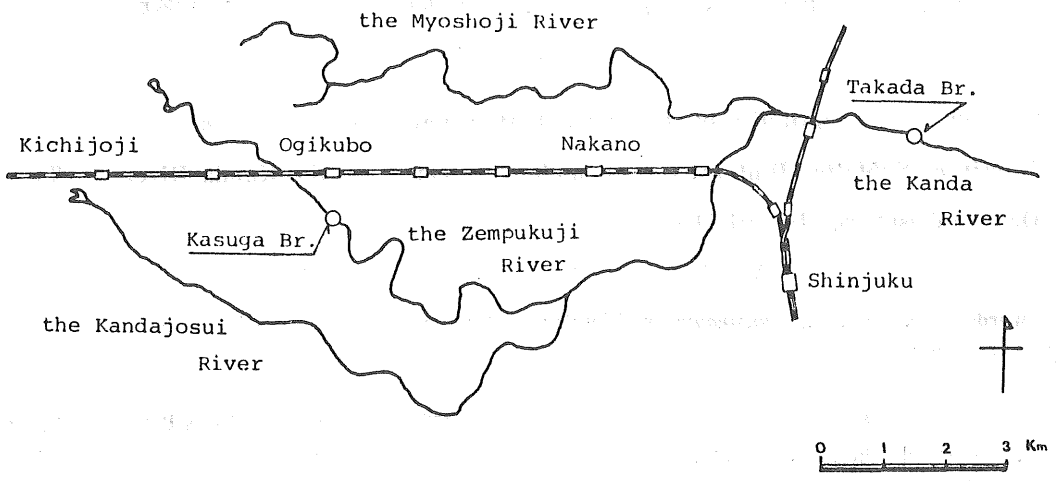


Fig. 1. Sampling Stations

Table 1. The Equations of Concentration-Nest Making Failure Regression of Two Insecticides to the Larvae of *Chironomus yoshimatsui*

Insecticide	Time of exposure	the Kanda River			the Zempukuji River		
		Regression equation	EC_{50}*	95% confidence interval	Regression equation	EC_{50}*	95% confidence interval
temephos	1 hr.	y=5.18x+2.10	3.64	3.24—4.00	y=4.28x+4.04	1.67	1.48—1.88
	24 hrs.	y=2.49x+7.59	0.092	0.076—0.111	y=3.24x+9.77	0.033	0.028—0.040
fenthion	1 hr.	—	—	—	y=6.74x−3.14	16.2	15.2—17.1
	24 hrs.	y=6.69x+0.32	5.00	4.69—5.36	y=11.58x−3.60	5.53	5.24—5.79

*: 50% Effective concentration (mg/*l*)

みられるのは濃度が 20mg/*l* 以上からであった．そのときの濃度の水溶液はやや白濁し，薬剤が完全に溶解してないように思われ，EC_{50} を求められなかった．24時間暴露した時の EC_{50} は神田川で 5.00mg/*l*，善福寺川で 5.53mg/*l* で，両者にあまり差がなかった．回帰直線の傾きは善福寺川の方が大きかった．

考　察

temephos がユスリカ幼虫に対して高い効力を示すといわれ[3-6]，近年，わが国においてセスジユスリカの防除によく用いられている．井上ら[7]はモデル実験を行ない，薬剤がよく接触し得る条件では temephos（5%乳剤）1ppm，10分間の投入がセスジユスリカに対し有効で，営巣した状態では LC_{50} が 3.5ppm 程度と述べている．田原ら[8]は野外実験を行ない，temephos（水和剤）1ppm，60分間継続投入はセスジユスリカ幼虫駆除に効果的で，浮遊流失する幼虫は全部が苦悶状態を呈し，ほとんどが死亡したと述べている．都内の各区役所ではこれらの報文の値を参考にして散布を行なっているのが現状である．

しかし，今回の感受性試験の結果から算定すると，1 mg/*l*，60分間暴露で，神田川のセスジユスリカでは巣を造らないものは総個体数のわずか 0.2% である．また，善福寺川のものは17%となる．両者の EC_{50} からみて，temephos 1mg/*l*，60分間暴露ではあまり効果がないように思われる．

これは文京区が調査した野外での薬剤散布効果の結果でもいえる．79年9月，神田川駒塚橋（高田橋の1300m下流）附近の水域，水温23℃において temephos 水和剤 1.7ppm，60分間散布時に河川中に置かれたケージ中で暴露を受けた幼虫の死亡率は散布4日後で63%であったという．また，同年10月，1.7ppm，80分間散布直後に採集した幼虫の死亡率は3日，4日後にそれぞれ45，63%であった．これらの結果は今回の薬剤感受性試験に比べ，死亡率は高かったが，神田川水系のセスジユスリカ

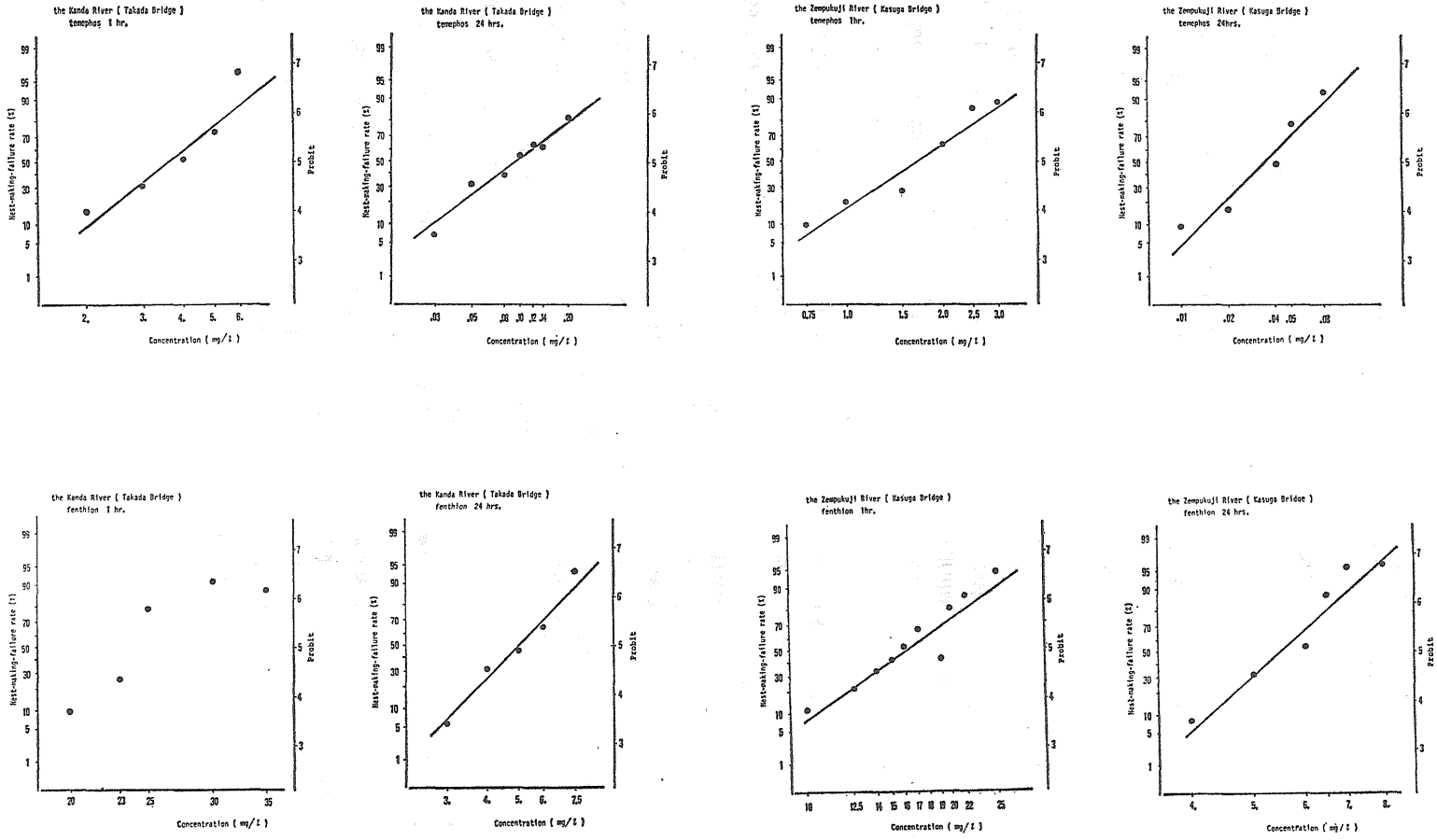


Fig. 2. Susceptibility of the Larvae of *Chironomus yoshimatsui* to Two Organophosphorus Insecticides

幼虫に対し，従来いわれてきた temephos の散布濃度ではあまり駆除効果がないことを示すように思われる．

神田川のものの temephos に対する EC_{50} は善福寺川のものに比べて大きかった．これは善福寺川のものは76年に temephos の散布を2回受けたにすぎないのに反し神田川高田橋附近のものは77年から今日まで頻繁に散布されているためと考えられる．しかし，両地点が比較的近接しており，成虫の移動や相互間の交雑が考えられるので，今後，両地点の感受性のちがいの起因を詳細に調査する必要があると考えられる．

佐藤ら[2]は fenthion の24時間暴露の EC_{50} が 0.103 mg/l であると述べている．また，若林ら[9]は室内で生育させた神田川の3令幼虫を用い，通気を行なわない条件下では fenthion 乳剤の24時間 TLM は 1.1mg/l であると述べている．今回の実験では両地点とも24時間暴露の EC_{50} は約 5mg/l で，高い値を示した．神田川水系に生息するセスジユスリカは，72年から今日まで散布が続いている fenthion に対し強い抵抗性がついているように思われた．

以上述べてきたように，今回の実験から，神田川水系の2地点に生息するセスジユスリカ幼虫の2種の有機リン系殺虫剤に対する感受性は低下しているように思われた．神田川高田橋のものの感受性は fenthion-24時間暴露を除き，善福寺川のものに比べて低く，これは薬剤散布歴の違いによると考えられた．今後，幼虫の薬剤感受性が季節的に，また薬剤散布によりどう変動するかを追究していきたい．さらに，感受性の程度を比較するために，薬剤の影響が少なく，散布場所から遠く離れた地点に生息するセスジユスリカについて調査する必要があると考えられる．

結　論

神田川水系の2地点，神田川高田橋附近，および善福寺川春日橋附近の水域から採集し，実験室で生育させたセスジユスリカの終令幼虫の，有機リン系殺虫剤2種（temephos, fenthion）に対する感受性を調べた．薬剤暴露後，ユスリカが正常に活動できず，その半数が巣を造れない濃度を各薬剤について求めた．temephos 1mg/l，60分間の薬剤散布では，79年10月の時点の神田川高田橋附近の水域に生息するセスジユスリカには，あまり効果がないように思われた．神田川水系のセスジユスリカは fenthion に対し強い抵抗性がついているように思われた．

謝辞　本研究を行なうに際し，有益な助言を賜った国立公害研究所生物環境部　安野正之博士，川崎市衛生研究所 佐藤英毅研究員，および快く試料を提供された三共製薬株式会社　田原雄一郎博士に深謝いたします．また，貴重な資料を閲覧させて下さり，いろいろと便宜をはかって下さった東京都衛生局環境衛生部　関春雄係長，伊藤智亮主事，文京区役所環境部　清水憲一主事に謝意を表します．

文　献

1) Muirhead-Thomson, R. C.: *Pesticides and Freshwater Fauna*, 1971, Academic Press, London & New York
2) 佐藤英毅，安野正之：衛生動物，30，361，1979
3) Mulla, M. S., and Khasawinah, A. M.: *J. Econ. Ent.*, 62, 37, 1969
Mulla, M. S., Barnard, D. R., and Norland, R. L.: *Mosquito News*, 35, 389, 1975
Ali, A., and Mulla, M. S.: *J. Econ. Ent.* 69, 509, 1976
4) Bickley, W. E., and Ludlam, K. W.: *J. Econ. Ent.*, 61, 1454, 1968
5) Patterson, R. S., and Wilson, F. L.: *Pest. Cont.* 34, 26, 1966
Von Windeguth, D. L., and Patterson, R. S.: *Mosquito News*, 26, 377, 1966
6) Tsai, Shan-Ching: *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107, 493, 1978
7) 井上義郷，三原　実：衛生動物，26，135，1975
8) 田原雄一郎：ibid., 26, 247, 1975
田原雄一郎，松永秀子，佐藤淳夫：ibid., 29, 87, 1978
9) 若林明子，日高義治，下松則子，原　敏，川原　浩，古井戸良雄：東京都公害研究所年報，7，125，1976

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 265-272, 1980

皇居内濠群の水質（第3報）

渡 辺 真利代*

Water Qualities of Inner Moats around the Imperial Palace(III)

MARIYO F. WATANABE

Keywords：濠 moat，植物プランクトン phytoplankton，季節変化 seasonal variation，燐 phosphorus，窒素 nitrogen

緒　　言

皇居濠群は千鳥ヶ淵，日比谷濠，桜田濠などのいわゆる外濠とその内側のひとまわり水量の少ない内濠とからなりたっている．これらの濠の水は都民の憩いの場として望ましい景観が要求されるばかりでなく，地震等の緊急時に際して飲料水となりうるよりよい水質が必要とされる．

皇居外濠群の水質については，1930年代の報告[1,2]以降1969年からは当研究所においても調査[3]がなされてきている．しかし内濠群については，1977年度および1978年度の調査報告[4,5]があるのみで，しかもそれは年4回という限られた回数であった．が，濠のような富栄養化の進行した浅い水界においては，植物プランクトン量が多いゆえに，その影響が種々の形で水質に効いてくるものと考えられる．またこの植物プランクトンは細菌より分裂速度が遅いにしても日単位で分裂していくものであり，年4回の調査では水質の状況を知るための調査として不十分さは否定できない．今回月1回の水質調査を行なう機会を得たのでその結果を報告する．

調査時期および地点

調査は1979年2月から1980年2月までの期間に実施した．調査日は1979年2月14日，3月27日，4月24日，5月25日，6月21日，7月20日，8月17日，9月17日，10月23日，11月29日，12月21日，1980年1月21日，2月18日であった．調査を実施した濠は，吹上大池 (St. 1)，上道灌濠 (St. 2)，中道灌濠 (St. 3)，下道灌濠 (St. 4)，蓮池 (St. 5)，乾濠 (St. 6)，平川濠 (St. 7)，天神濠 (St. 8)，二ノ丸池 (St. 9) であり，このうち St. 2，St. 6，St. 7 は2月，8月，11月の調査を行なった．

調 査 方 法

採水は表面水について行ない，実験室にもち帰り以下のものについて定量した．セストン量は，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過し，その前後の秤量の差より算出した．このろ紙上のものを懸濁態有機炭素 (POC)および懸濁態有機窒素 (PON) とし，CHN コーダ (柳本 Co) により定量した．溶存態有機炭素(DOC)は Menzel & Voccaro[6]の方法により定量した．PO_4–P, NO_2–N, NO_3–N は Strickland & Parsons[7]の法により，NH_4–N はインドフェノール法[8]により，有機態燐は溶存態 (DOP) と懸濁態 (PON) に分け Menzel

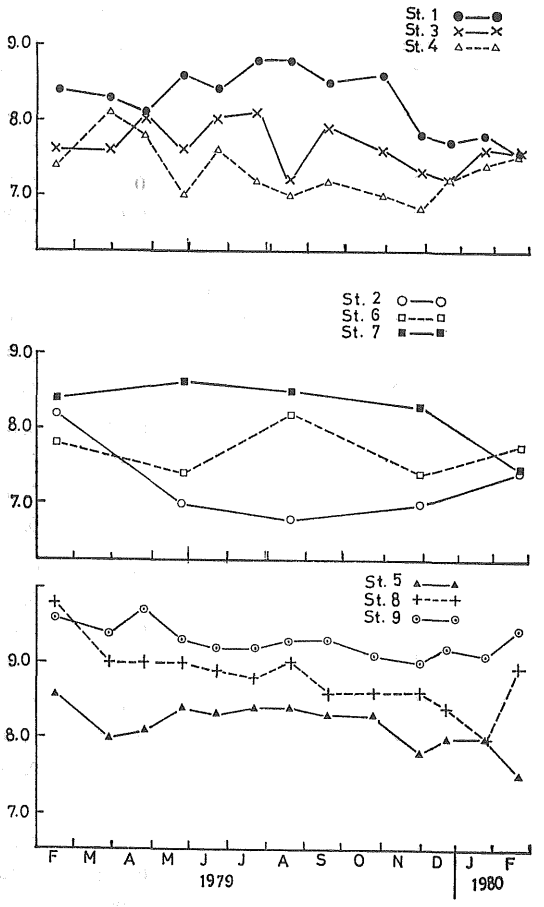


Fig. 1. Seasonal Changes in pH

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24–1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Mean, Maximum and Minimum Values of PO_4-P, Dissolved Organic Phosphorus (D. O. P.), Particulate Organic Phosphorus (P. O. P.), Total Phosphorus (T-P), NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N and Particulate Organic Nitrogen (P. O. N.)
The values are expressed as mg/m*l*.

		PO_4-P	D. O. P.	P. O. P.	T-P	NH_4-N	NO_3-N	NO_2-N	P. O. N.
St. 1	Mean	0.004	0.010	0.099	0.114	0.064	0.050	0.005	1.13
	Maximum	0.009	0.024	0.231	0.243	0.245	0.271	0.019	2.67
	Minimum	0	0	0.026	0.032	0	0	0.001	0.368
	Max. /Min.	—	—	8.88	7.59	—	—	—	7.26
St. 2	Mean	0.087	0.056	0.136	0.278	0.166	0.032	0.011	0.499
	Maximum	0.333	0.165	0.419	0.917	0.726	0.109	0.043	0.912
	Minimum	0.013	0.007	0.022	0.057	0.001	0	0	0.120
	Max. /Min.	—	—	19.0	16.1	—	—	—	7.6
St. 3	Mean	0.007	0.015	0.101	0.123	0.044	0.089	0.007	0.856
	Maximum	0.010	0.032	0.197	0.225	0.117	0.363	0.019	1.64
	Minimum	0	0.007	0.025	0.038	0.007	0	0	0.314
	Max. /Min.	—	—	7.8	5.92	—	—	—	5.22
St. 4	Mean	0.016	0.010	0.052	0.089	0.079	0.016	0.014	0.373
	Maximum	0.033	0.025	0.116	0.156	0.307	0.629	0.039	0.805
	Minimum	0.003	0	0.025	0.039	0	0.002	0.001	0.158
	Max. /Min.	—	—	4.64	4.0	—	—	—	5.10
St. 5	Mean	0.004	0.010	0.050	0.062	0.033	0.129	0.014	0.386
	Maximum	0.020	0.025	0.122	0.150	0.107	0.794	0.119	0.650
	Minimum	0	0	0.012	0.023	0.004	0	0	0.200
	Max. /Min.	—	—	10.1	6.52	—	—	—	3.25
St. 6	Mean	0.006	0.010	0.040	0.056	0.027	0.048	0.003	0.380
	Maximum	0.015	0.022	0.097	0.113	0.060	0.116	0.007	0.667
	Minimum	0.002	0.002	0.016	0.022	0.002	0	0.001	0.172
	Max. /Min.	—	—	6.06	5.14	—	—	—	3.88
St. 7	Mean	0.010	0.032	0.028	0.071	0.033	0.311	0.007	0.562
	Maximum	0.035	0.118	0.061	0.142	0.064	0.691	0.015	0.955
	Minimum	0.001	0.009	0.010	0.023	0.008	0.050	0	0.364
	Max. /Min.	—	—	6.10	6.17	—	—	—	2.62
St. 8	Mean	0.005	0.012	0.083	0.100	0.052	0.087	0.004	0.749
	Maximum	0.013	0.021	0.149	0.166	0.356	0.430	0.014	1.548
	Minimum	0	0.006	0.023	0.034	0.002	0.087	0	0.230
	Max. /Min.	—	—	6.48	4.88	—	—	—	6.73
St. 9	Mean	0.014	0.018	0.097	0.129	0.019	0.057	0.004	1.02
	Maximum	0.053	0.028	0.187	0.226	0.064	0.280	0.013	0.639
	Minimum	0.003	0.006	0.022	0.060	0	0	0	0.150
	Max. /Min.	—	—	8.5	3.77	—	—	—	4.26

& Corwin の法[9]により定量した.

結　果

1. **pH, 燐, 窒素, 炭素の変化**　図1に pH の変化を示す. 濠全体としては, St. 2 の 8 月と St. 4 の 11 月で測定された6.8を最低値とし, 最高値は St. 9 の 4 月の 9.7 となっている. 夏に高い傾向にあるのが St. 1, 3, 6, 7, であり, 逆に冬が高くなっているのが St. 2と4であった. またSt. 9は常に pH が高く最低でも11月の9.0であった.

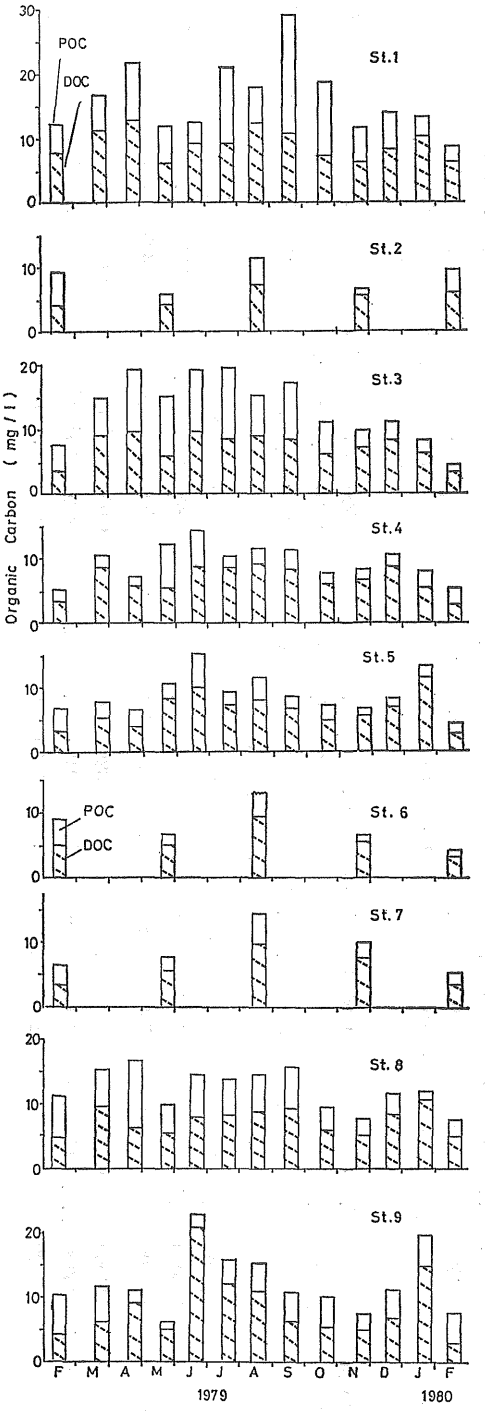


Fig. 2. Seasonal Changes in the Amounts of Dissolved Organic Carbon (D. O. C.) and Particulate Organic Carbon(P. O. C.)

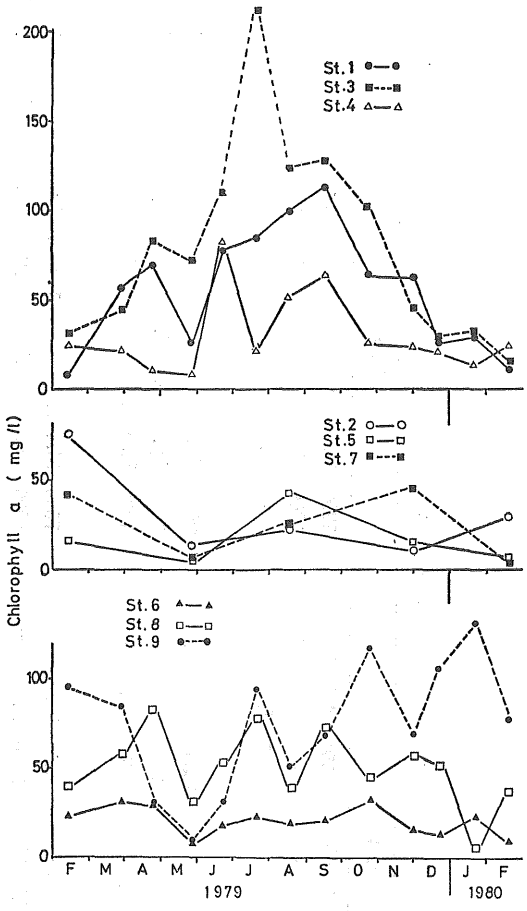


Fig. 3. Seasonal Changes in the Amounts of Chlorophyll a

次に Table 1 に無機態と有機態の燐および窒素の平均値，最高値，最低値を示した．また POP, TOP, PON については最低値と最高値の比を示してある．PO_4–P は St. 2の 8 月に 0. 333mg/*l* という高い値があるほかは，いずれも低くなっている．DOP は St. 2の 8 月と St. 7の 5 月で高い値が測定された．POPは St. 2の8月で最も高く，またこの濠で最高値/最低値の 値が高く 変動が大きいことを示している．逆に POP の変動が少ないのは St. 4であった．またPONについては，St. 1の 9 月が最も高く，平均値としてもこの濠が一番高い値を示している．St. 4, 5, 6, が PON の低い所となっている．また PON に比較して POP の変動が大きくなっていることがわかる．

Fig. 2 には POC および DOC の変化を示した．POC の最高値および POCと DOC の合計としての TOC の最高値はいずれもSt. 1の 9 月で測定されている．一般的に DOC の変動は POC の変動に比較して小さい．例えば，

Table 2. Main Species of Phytoplankton (Cell Number/ml)

Month	St. 1		St. 3		St. 4		St. 5		St. 8		St. 9	
1979	Sy. acus	37000	M. italica	1500	F. c. v. binoides	550	M. italica	1900	Cy. comta	38000	Cy. comta	14000
2	M. italica	2400	Cy. comta	1000	F. construens	110	F. c. v. binoides	1300	M. pusillum	6400	F. construens	1400
	Cy. comta	750	Sy. acus	750	M. italica	55	F. construens	890	M. granulata	2500		
			A. gracilima	750								
3	Sy. acus	86000	M. minima	5100	H. contorta	93000	H. contorta	93000	Cy. comta	77000	F. c. v. venter	11000
	Cy. comta	4800	M. italica	4900	Cy. comta	1900	Cy. comta	1900	Cy. meneghiniana	17000	Cy. comta	98000
	M. granulata	2800	Cy. comta	4300	Cy. meneghiniana	1300	Cy. meneghiniana	1300	H. contorta	3400	Cy. meneghiniana	21000
			Cy. meneghiniana	4300								
4	O. limnetica	140000	Merismopedia sp.	61000	F. c. v. venter	4400	M. italica	7500	M. incerta	180000	Sy. ulna	22000
	Ly. contorta	110000	Sy. acus	47000	F. c. v. binoides	3600	F. construens	6000	Cy. meneghiniana	99000	Cy. meneghiniana	21000
	Merismopedia sp.	61000	H. contorta	26000	M. italica	1100	Dimorphococcus sp.	2000			Cy. comta	6100
5	M. italica	17000	M. italica	19000	F. construens	8800	M. italica	3200	O. limnetica	49000	F. c. v. venter	2000
	Sy. ulna	17000	M. granulata	2900	F. c. v. venter	8500	Cy. comta	2400	Cy. comta	19000	Sy. ulna	1300
	M. granulata	10000	Trachelomonas sp.	2300	F. c. v. binoides	6300	Cy. meneghiniana		Cy. meneghiniana		Sy. acus	9400
									M. granulata	5100		
6	Ly. contorta	560000	M. italica	14000	Gomphospheria sp.	42000	M. minima	6000	Cy. meneghiniana	14000	Cy. meneghiniana	7400
	M. minima	230000	M. granulata	9000			M. granulata	3400	M. granulata	8900	F. c. v. venter	3000
	M. italica	34000	D. pulchellum	4300	F. c. v. binoides	2000	M. italica	2800	Cy. comta	3400	Sc. abundance	2100
					Trachelomonas sp.	1700						
7	M. minima	330000	M. minima	7400	F. c. v. binoides	2300	O. limnetica	35000	Sc. abundance	17000	O. limnetica	76000
	A. Rachiborskii	120000	M. italica	5400	F. c. v. venter	900	M. italica	2800	M. granulata	11000	Sy. ulna	12000
	Ly. contorta	100000	D. pulchellum	5000	Crucigenia sp.	900	Oscillatoria sp.	1500	P. simplex	4300	Sy. acus	12000
8	Ly. contorta	840000	M. minima	5400	O. limnetica	3200	O. limnetica	32000	O. limnetica	14000	Cy. meneghiniana	8200
	A. Rachiborskii	620000	F. c. v. binoides	2000	F. c. v. binoides	2400	M. italica	2300	P. simplex	7100	Sy. ulna	2300
	O. limnetica	320000	M. italica	1900	F. construens	1400	Ly. contorta	2300	M. granulata	6800	P. tetras	1500

9	Ly. contorta	4300000	M. minima	32000	F. construens	3800	O. limnetica	100000	O. limnetica	120000	Cy. comta	23000
	O. limnetica	710000	M. granulata	11000	F. c. v. binoides	2900	F. construens	14000	Cy. comta	27000	Cy. meneghiniana	
	A. Rachiborskii	400000	Crucigenia sp.	7200	Phacus sp.	1100	M. italica	6100	M. minima	11000	A. hantzchii	4000
											Sc. quadricauda	2700
10	Ly. contorta	3300000	M. italica	33000	M. minima	2000	Cy. comta	12000	O. limnetica	31000	Cryptomonas sp.	13000
	O. limnetica	550000	M. minima	16000	M. italica	1400	M. italica	6900	Ly. contorta	16000	Cy. meneghiniana	11000
	M. minima	83000	M. granulata	6900	F. construens	380	F. c. v. binoides	4000	O. quasiperforata	5600	O. limnetica	6700
11	Ly. contorta	480000	M. granulata	13000	F. c. v. venter	3600	Cy. comta	4700	Cy. comta	35000	Cy. comta	38000
	O. limnetica	110000	Dictyosphaerium sp.		F. c. v. binoides	2400	Cy. meneghiniana		Cy. meneghiniana		Cy. meneghiniana	
	Sy. ulna	10000		8100	F. construens	950	O. limnetica	4500	O. limnetica	6200	F. c. v. venter	2000
			M. minima	5200			M. granulata	1500	A. falcatus	4800	H. contorta	1700
12	Ly. contorta	100000	M. italica	4600	Cy. comta	1300	F. c. v. binoides	2400	Cy. comta	42000	Cy. comta	62000
	O. limnetica	17000	Cy. comta	2400	F. construens	1200	Cy. comta	1900	O. hamelii	1000	F. c. v. venter	1300
	Phormidium sp.	16000	M. granulata	1100			M. italica	1100	M. pusillum	840	Sc. quadricauda	1600
1980	Ly. contorta	240000	M. italica	3900	Trachelomonas sp.	290	Cy. comta	8800	Cy. comta	11000	Cy. comta	44000
1	Sy. ulna	17000	Cy. comta	2700	F. c. v. binoides	270	Cy. meneghiniana		Cy. meneghiniana		Cy. meneghiniana	
	O. limnetica	5700	Cy. meneghiniana		F. construens	160	F. construens	1600	Gonium sp.	11000	F. c. v. venter	660
			Dinobryon sp.	950					M. italica	310	F. construens	560
2	Ly. contorta	25000	A. gracilima	400	F. c. v. venter	2600	Cy. comta	2700	Cy. comta	2500	Cy. comta	250000
	Sy. ulna	6000	Peridinium sp.	200	M. italica	120	F. construens	900	Gonium sp.	110	F. construens	1300
	Cy. comta	4400			Cy. comta	120	M. italica	400				
	P. simplex	1400										

註　St. 2, St. 6, St. 7 についてはデーターを省略。

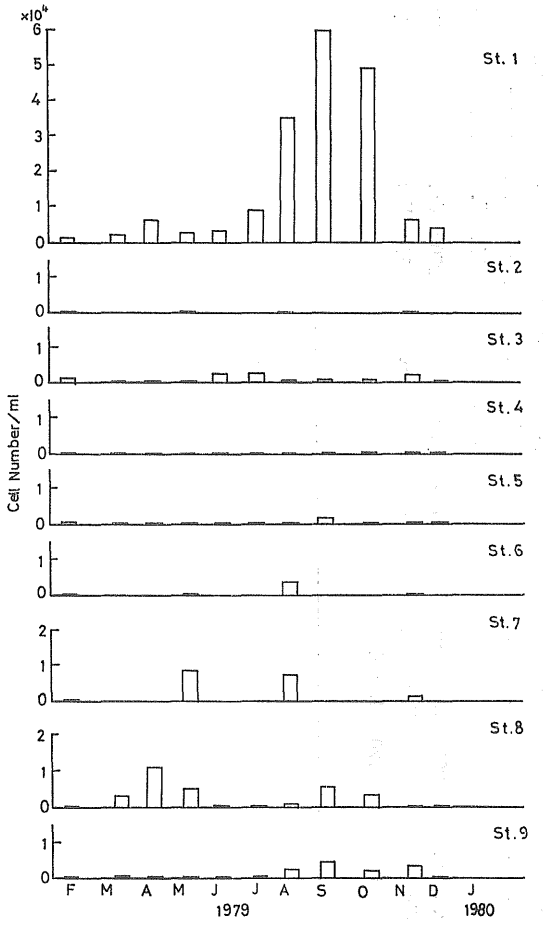


Fig. 4. Seasonal Changes in the Cell Number of *Microcystis aeruginosa*

St. 1では最高値/最低値がPOCで8.0であるのに対し，DOCでは2.1となっている．また各濠間の値を比較してみても，DOCの各濠の平均値の巾が5.6～8.9mg/*l*であるのに対し，POCは2.2～8.0mg/*l*となっている．POCに比べてDOCの多い濠としてはSt. 2, 4, 5, 7, 9が挙げられるだろう．

2. 植物プランクトン量および主要構成種の変化 植物プランクトン量の変化をクロロフィルaとフェオフィチンaの合計の変化でとらえたものをFig. 3に示す．St. 1では9.2～11.2, St. 2では9.1～29.7, St. 3では15.7～211 St. 4では9.1～92.5, St. 5では8.0～32.1, St. 6では5.4～42.7, St. 7では2.8～31.7, St. 8では5.3～76.5, St. 9では9.6～130μg/*l*の値が測定された．平均してみると，最も低いのがSt. 6の16.6μg/*l*次にSt. 5の20.0μg/*l*, St. 7の24.4μg/*l*となった．クロロフィル量の高い濠は，St. 3の

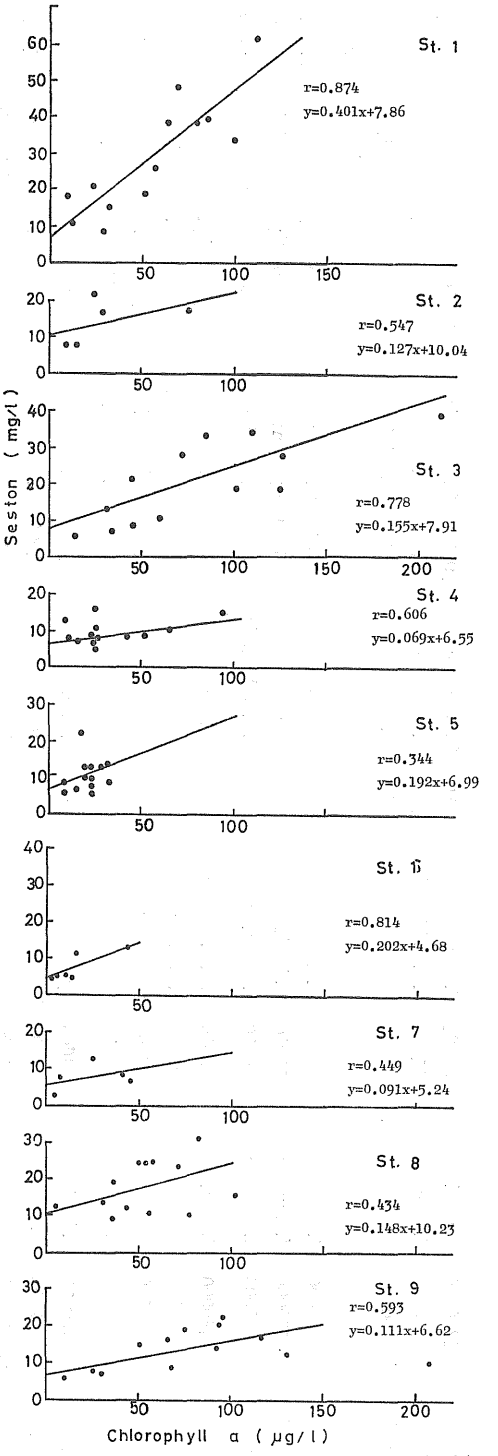


Fig. 5. Relations between the Amounts of Chlorophyll a and Seston

78.8μg/*l*, 次にSt. 9の73.4μg/*l*, St. 1の53.6μg/*l*と続く．St. 2とSt. 4は通常は低い値を示しているが，ある時極め

Table 3. C: N : P Atomic Ratios of Seston

Station	P. O. C.	P. O. N.	P. O. P.
1	106	14	1
2	32	55	1
3	65	9	1
4	48	8	1
5	61	10	1
6	79	11	1
7	128	20	1
8	67	10	1
9	51	8	1
Microcystis aeruginosa collected from Chidorigafuchi			
28. 7. '79	119	13	1
22. 8. '79	103	13	1

て高い値をだす濠である.

Table 2 に優占種の変化, Fig. 4 に *Microcystis aeruginosa* の細胞数の変化を示す. St. 7 以外の濠では冬期に珪藻が優占している. St. 1 は冬期においても, *M. aeruginosa* が10^2～10^3オーダーみられるが, 夏期においては10^4オーダーどまりであり, *Lyngbia*, *Anabaenopsis* 等の他の藍藻が優占している. この濠は藍藻の種類数が多いことが特徴となっている. St. 2, 4 は珪藻が優占している濠であり, 夏期にはハスが水面を被うため, クロロフィルa量にもあらわれているように, 植物プランクトン量の少ない濠である. St. 3は構成種としてはSt. 1に似るが, 優占種としては珪藻の比重が高くなっている. St. 5 および 6 は *M. aeruginosa* が出現してはいるが, St. 1に比較してもずっと低い量となっている. St. 5と 6 は構成種はよく似るがSt. 6のほうが藍藻の比重が低くなっている. St. 7は 8 月に出現する藍藻が13種あり種類数としては多いが, 他の藻類は少なく, クロロフィルaであらわれてくる植物プランクトンの現存量は低いものとなっている. St. 8は 2 月, 3 月においても *M. aeruginosa* が10^2オーダー認められる濠であるが, この細胞数は真夏より 4 月, 9 月に多くなっている. またここでは緑藻類が優占種となることが多い. St. 9は年間を通じて珪藻が優占しており, 特に冬期においても2, 3種の珪藻が 10^4 オーダーと高く存在していた. この一因としては, この濠においては水温が他の濠より高く, 次に水温が高い所との差が12月から 2 月にかけて 2.4° もあることが考えられる.

3. 懸濁物間の関係について クロロフィルa量とセストン量の関係をみたのが Fig. 5 である. 相関が良いのはSt. 1とSt. 6であり次にSt. 3となった. 特にSt. 1とSt. 3はセストン量が大きく変化するが, これはほとんど植物プランクトン量の変化によるものであることがわかる. 相関が悪いのはSt. 5とSt. 8である. またSt. 2とSt. 8はクロロフィルaが 0 の時の値がそれぞれ10. 0と10. 2となり植物プランクトン以外に由来するセストン量が他の濠より多い. Table 3 には POP を 1 とした時の PON, POC の値について各濠ごとの平均値を示した. N : P 比が最も低いのはSt. 5であり, 次にSt. 4, 9, 3が低い所となった. 外濠の千鳥ヶ淵で採集した *M. aeruginosa* のC : N : P比についても表に示してあるが, このN : P 比13以上となっている濠はSt. 1と 7 である. これらの濠はいずれも藍藻の割合が高い濠となっている. またN : P 比が低い濠はSt. 4, 9, 8 となっており, いずれの濠とも珪藻量が相対的に多くなっている. このような濠ではN : P 比が低いために藍藻の割合が低いのか, あるいは逆に藍藻量が少ないためにN : P比が低くなったのかは今後の問題であろう.

考　察

皇居内濠群のうち 9 ヶ所について調査を行ない, うち 6 か所は月 1 回の調査を実施した. 坂本[10]は富栄養湖の全P濃度として 0. 01～0. 09mg/*l*, 全Nとして 0. 5～1. 3 mg/*l* を提出しているが, 内濠の中では全Pの最も低い所で年間平均0. 06mg/*l* (St. 5およびSt. 6) であり, St. 1, 2, 3, 8, 9 はいずれも 0. 1mg/*l* を越える値であった. ここでは溶存有機態窒素の測定を行なっていないが, 無機窒素成分および PON の値の合計だけでも各内濠の年間平均は 0. 496～1. 246mg/*l* の範囲となり富栄養湖のなかにはいる. またクロロフィルa量についてみても富栄養湖の範囲[11]に入るものであったが, 松本城の各濠の最高値が 128～424mg/*l*[12] にあること に比較すると内濠は 32. 1～211μg/*l* と低いほうにずれている. 外濠の最高値の範囲については 45～175μg/*l* という値[3]がだされているが, これは年 4 回の調査結果であり, 実際には高いほうにずれると考えられる. 例えば, 内濠の調査結果でも 8 月に最高値を示しているのはSt. 1のみであり, 通例の年 4 回の調査（2 月, 5 月, 8 月, 11月）結果のみでは, 最高値は低いものとなってくる.

ここで内濠群の植物プランクトンの栄養条件について考察してみたい. まず N/P 比についてみると内濠群では 5～20の値がえられた. Fuhs ら[13] によれば. 珪藻や細菌の最高の分裂速度を可能にする値は16であり, 緑藻のある種については 30[14] という値も 提出されている. Healey & Hendzel[15]によれば, 窒素制限でない条件下では C/N 比が安定で約 5 となりこれ以上の値だと窒素制

限の条件になると報告している．また野外の条件下でも藍藻のある種は4.6～4.8になる[16]と報告されている．いずれにしても，内濠のC/N比は6.4～9.1であり，C/N比およびN/P比からみて，相対的に窒素が少ない条件にあるのではないだろうか．これはあくまでNとPの比であってPが過剰にあるということかもしれない．

内濠群はたとえばクロロフィルaの季節変動をとってみても濠によってそのパターンは異なる．これは内濠群が，湖沼の遷移の発達段階の異なるものを含んでいるからではないだろうか．すなわち，St. 5と6は中栄養湖に近い段階にあり，更に富栄養化がすすめばSt. 1, 3, 8のようになり，また有機物が蓄積され深度が浅くなり，アシやハスのような植物が侵入するような末期の段階としてSt. 2とSt. 4が考えられる．この段階では，毎年植物体の枯死により底に更に大量の有機物を蓄積し濠の浅化は助長される．従ってSt. 2や4のような濠では，植物の枯死体をできるだけ除去することが望まれる．

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．

文　献

1) 倉茂英次郎：気象集誌，10，475，1932
2) 倉茂英次郎：気象集誌，10，482，1932
3) 山崎洋子，松本浩一：東京衛研年報，26-1，336，1974
4) 渡辺真利代，松本浩一：東京衛研年報，29-1，382，1978
5) 渡辺真利代，松本浩一：東京衛研年報，30-1，246，1979
6) Menzel, D. W., and Vaccaro R. F. : *Limnol. & Oceanogr.*, 9, 138, 1964
7) Strickland, J. D. H., and Parsons, T. R : *A Practical Handbook of Sea Water Analysis*, 1968, Fish. Res. Bd. Can.
8) 日本水道協会：上水試験法
9) Menzel, D. W., and Corwin, N. : *Limnol & Oceanogr.*, 10, 280, 1965
10) Sakamoto, M. : *Arch. Hydrobiol.*, 62, 1, 1966
11) Sakamoto, M. : *Bot. Mag. Tokyo*, 79, 77, 1966
12) 倉沢秀夫，沖野外輝夫，加藤憲二，吉沢清晴：松本城の富栄養化の現状とその対策，信州大学理学部付属諏訪臨湖実験所報告，1978
13) Fuhs, G. W., Demmerle, S. D., Canelli, E., and Chen, M. : *Nutrients and Eutrophication*, 113, 1972, Am. Soc. Limnol. Oceanogr.
14) Rhee, G.-Y. : *Limnol. & Oceanogr.*, 23, 10, 1978
15) Healey, F. P., and Hendzel, L. L. : *J. Fish. Res. Bd. Ca.*, 36, 1364, 1979
16) Rother, J. A., and Fay, P. : *Freshwater Biol* 9, 369, 1979

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 273-274, 1980

藍藻 *Microcystis aeruginosa* の毒性 — 1979年の結果 —

渡 辺 真利代*, 大 石 真 之**

Toxicity of *Microcystis aeruginosa* — Results in 1979 —

MARIYO F. WATANABE and SHINSHI OISHI

Keywords: 藍藻 blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*, 水の華 water-bloom, 毒性 toxicity

緒　言

富栄養化や汚濁の進行した湖沼や池などでは，春から秋にかけて表面水が黄緑色に呈色する藍藻の水の華の出現がみられる．都内の公園池や濠も例外でなく[1,2]，多くの水界で *Microcystis* や *Anabaena* などの水の華がみられる．また冬期においても水の華の状態になっていないとはいえ，表面水に *Microcystis* が観察されることもある．そして，池によっては4月はじめでも水面の呈色がみられる．この藍藻の水の華はその細胞が分解される際に悪臭を放つばかりでなく，諸外国においては家畜や水鳥の斃死を引き起している[3,4]．我国においては毒性を有すると報告されているものと同種の藍藻が水源池にもみられるようになっている[5]．我々は1977年から *Microcystis* の毒性について検討してきているが[6,7]，本報では1979年の野外調査の結果を報告する．

材料と方法

藻体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び採取した．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300mg に対し蒸留水6m*l* を加え，ホモジナイザー（ポリトロン）で磨砕し，1晩5°に放置後遠心（3,000 rpm, 20′）し，その上清液を 0.2 m*l* ずつマウス（ＩＣＲ系，体重25〜30g)に腹腔内注射した．上記の遠心で上清が得られなかった試料については更に 16,000 rpm, 20′ の遠心を行った．

結果と考察

表1に *Microcystis aeruginosa* による水の華の毒性試験の結果を示す．毒性は死亡個体数／実験個体数であらわされている．ここではマウス1匹あたり藻体 10mg からの抽出物を投与したことになり，これは330〜400 mg/kg に相当する．調査したのは9か所の水界であり，このうち6か所すなわち諏訪湖，津久井湖，相模湖，都内公園の清澄庭園の池，富士見池，皇居外濠の千鳥ヶ淵で毒性が認められた．諏訪湖の *M. aeruginosa* は7月と8月のはじめには致死作用がみられたが，1978年の *M. aeruginosa* は同じ10mg/匹の投与量では致死作用を示さなかった[7]．津久井湖は昨年水の華状態になっていたのは7月のはじめと9月の末の限られた時期であったが，今年は *M. aeruginosa* の水の華が著しく，調査した8月のはじめから9月のはじめにかけて毒性が維持されていた．また清澄庭園の試料は採取の前1週間ほどの間に，この年たまたま北に帰らず残ったコガモが毎日一羽ずつ死亡していくという報告を受けて調査したものである．この試料には，*Anabaena spiroides* が藻体量として2％程度含まれていた．同様に *A. spiroides* が含まれていたのは碑文谷池からのものであり，5％程度であった．しかしこの試料では毒性がみられなかった．この2か所以外の試料は100％近く *M. aeruginosa* であった．千鳥ヶ淵については，6月末から8月の末にかけて約2週間おきの試料採取を行い，すべての時期に致死作用がみられた．ここは1977年の調査では毒性の認められなかったところである．昨年毒性が認められたにもかかわらず，1979年にはみられなかったのが，不忍池と洗足池からの藻体であった．またいずれの藻体によるものでも，マウスの死亡は接種後1〜2時間でおこった．

以上，毒作用の発現は時期によりまた年により異なることがわかった．培養実験では対数期に毒性物質が多いという報告[8]もあり，諏訪湖の8月の下旬に毒性がみられないのは，この時期諏訪湖でも藻の活性が落ちていることと関連があるかもしれない．またここで用いた試料はほとんど *M. aeruginosa* からなり，清澄庭園の池と碑文谷池のものでは *Anabaena spiroides* が含まれていたが，量的にも少なく，またこれは有毒種といわれているものとは異なることより，マウスの死亡は *Microcystis* によると考えられる．

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160　東京都新宿区百人町 3—24—1
** 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 *Microcystis aeruginosa*

Source of bloom	Date	Mortality
Lake Suwako	17. 7. 79	5/5
	7. 8. 79	5/5
	24. 8. 79	0/5
Lake Tsukuiko	4. 8. 79	5/5
	13. 8. 79	5/5
	27. 8. 79	3/5
	7. 9. 79	5/5
Lake Sagamiko	27. 8. 79	5/5
	7. 9. 79	5/5
	15. 9. 79	5/5
	22. 9. 79	5/5
Pond Senzoku-ike	21. 6. 79	0/5
	26. 7. 79	0/5
	26. 9. 79	0/5
Pond Shinobazunoike	25. 7. 79	0/5
Pond Himonya-ike	26. 9. 79	0/5
Pond Shiakuji-ike	25. 7. 79	0/5
Pond Kiyosumi	11. 9. 79	5/5
Moats around the Imperial Palace		
Chidorigafuchi	30. 6. 79	5/5
	16. 7. 79	5/5
	28. 7. 79	5/5
	11. 8. 79	5/5
	22. 8. 79	5/5

また水道水源に異常に増えた藍藻が人体に害をもたらすという報告[9]もあり，今後この毒物質が周囲水界にどの程度溶出するのかを調査する必要があるだろう．

文　献

1) 渡辺真利代，松本浩一：東京衛研年報，29-1，382，1978
2) 東京都建設局公園緑地部：都立公園池水水質保全総合調査報告書，1974
3) Schwimmer, M., and Schwimmer, D.: *Algae, Man and Environments*, 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) 渡辺真利代，大石真之，松本浩一：東京衛研年報，29-1，389，1978
7) 渡辺真利代，大石真之，松本浩一：東京衛研年報，30-1，243，1979
8) Gorham, P. R.: *Algae and Man*, 307, 1964, Plenum Press, New York
9) Lippy, E. C., and Erb, J.: *Journal AWWA*, 68, 606, 1974

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 31-1, 275-281, 1980

都内陸水の生活環境に関する調査研究（第12報）
三宅島新澪の水質およびプランクトンの周年変化

松本淳彦*, 土屋悦輝*

Limnological Studies on the Inland Waters in the Metropolis of Tokyo (XII)
Monthly Changes of Water Quality and Plankton of the Meromictic Lake Shinmyo, Miyake Island

ATSUHIKO MATSUMOTO* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Some physico-chemical and plankton community features of the Lake Shinmyo with the maximum depth of 36m were surveyed monthly from April 1973 to March 1974. The lake has neither inflow nor outflow connected with the stream. Water temperature in the epilimunion varied remarkably in each month and it was stratified in the hypolimnion below 15m from the surface throughout the year. The temperature rises gradually with the depth and such values as 27.2–28.1°C were recorded at the bottom of the lake. The dissolved oxygen was not detected in all the layers below 10m in depth. The lake water contains high concentration of chlorinity reaching as high as 17 g/l near the bottom. The dominant plankton species were as follows; *Anabaena* sp., *Chroococcus dispersus*, *Chaetoceros muelleri* and *Ankistrodesmus falcatus* v. *mirabilis*. The water-bloom of blue-green alga representing *Anabaena* was observed in September.

Keywords : meromictic lake, phisical and chemical features, plankton

緒　言

三宅島は東京の南約180kmの距離にある伊豆七島の一つで，周囲およそ40kmの島である．本島には大路池（淡水湖，面積98,800m²，最大水深9.3m）と新澪（汽水湖，面積57,600m²，最大水深36m）の二つの自然湖がある．

大路池は飲料水源となっていたが，富栄養化が進み，1972年にはカビ臭が発生するなど水質障害をこうむるようになった[1,2]．一方，新澪も流入，流出する河川がない閉鎖環境にありながら，水の華が発生する富栄養湖の様相を示している[3]．

我国には多くの汽水湖があるが，この人工汚染のない特殊環境にある新澪の現状を他の汽水湖と対比することは陸水学上，また自然環境保護の面から重要と思われる．本湖については吉村，宮地[4]，福島[5]，新井[6]，松本ら[3]の報告があるが，生物学的にはいづれも一時的な調査に終っていた．そこで著者らは一年間にわたって毎月一回の調査を行ない，理化学的，生物学的な周年変化について明らかにしようとしたものである．

新澪の概要

新澪は1763年の噴火で形成されたといわれる火口湖であり[7]，島南の海岸からおよそ300mの距離に位置している．本湖の湖盆形態(Fig. 1)は堀江[8]，新井[9]の資料によると長径400m，短径200m，面積57,600m²，体積約146万m³，最大水深36mを有する汽水湖である．湖の周囲は絶壁で囲まれ，湖岸は急斜して湖棚の面積がきわめて少ない特徴をもっている．

本湖には流入，流出する河川はないが，砂岩層を通して間接的に海と連絡しているといわれ，潮汐の影響による水位変化がみられる．本湖は地形的に人為汚染を受けることの少ない閉塞環境にあるが，夏季には藍藻の水の華が発生しており，富栄養湖の様相を呈している．なお肉眼的な動物としてコイ，ワカサギ，スジエビ等が生息しているが，水草の生育はみられない．

調査時期と方法

1973年4月から1974年3月まで毎月一回（原則として月末）最深部において観測を行なった．調査時間は午前10時から12時の間である．現場では，電気水質計（東邦電探EST-3型）を使用して表面から湖底まで1mごとに水温，電気伝導度を測定し，同時にバンドン採水器（5l容）で水深5mごとに採水を行なった．pHは比色法により，溶存酸素はウインクラー変法によってすみやかに測定した．その他の項目は試水を実験室に持帰ったのち，おもに上水試験法[10]に準じて分析を行なった．

植物プランクトンはホルマリン固定した試水をそのま

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuk-ku, Tokyo, 160 Japan

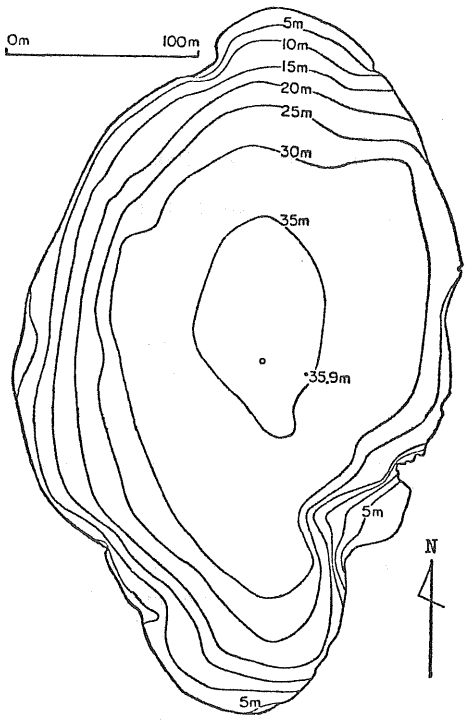


Fig. 1. Contour Map of Lake Shinmyo (From T. Arai (1972). ∘ indicates Central Sampling Station.

ま，あるいは遠心分離法で10倍に濃縮したものを界線スライドグラス上に 0.1ml とり，200～400倍の拡大で鏡検，計数し，湖水1ml 中の個体数を算定した．動物プランクトンは，口径20cm（網目××13号）のプランクトンネットを水深10mから垂直引きして採集し，ホルマリン固定したものを定性的に鏡検した．

調査結果

1) 水色と透明度

湖水の色は，4月～7月の間は淡緑色から灰緑色であったが，8月から10月にかけては濃茶褐色，褐色を呈し，著しく濁っていた．11月～1月は淡褐色で濁りも減少した．2月，3月は灰緑色となり．かなり澄明になった．透明度の年変化をFig. 2に示したが，0.3mから3.6mの間であり，最大は6月，最小は9月であった．とくに8月から10月にかけては藍藻が著しく増殖していたため，0.3～0.7mと小さかった．

2) 水 温

表面水温は，8月調査時が32.0°でもっとも高く，1月が最低で9.0°であった．各月の水温の垂直分布をFig. 3に示した．これによるとそれぞれ非常に特異的で，中層部でかなり複雑な分布がみられている．4月から9月

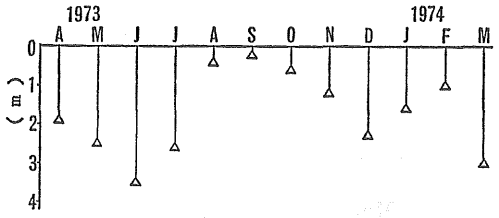


Fig. 2. Monthly Variation of Transparency in Lake Shinmyo.

の停滞期には，水深5mにいたる間に急激に水温が降下していくが，その後一次的に上昇し，9～10m層でふたたび降下している．10月から3月の循環期は5～7mまではほとんど等温となるが，これ以深では同じように上昇，降下をくり返す分布を示している．

このような特異分布がみられるのも15m以浅のみに限られており，これ以深ではほとんど水温は変らない．しかし，この水深を境に深さとともに徐々に温度が上昇し，底層では27.2～28.1°となっている．このことはFig. 4に示した等温線図によるとより明らかである．

つぎに，各水深における水温の年較差をみると，表層では23°と大きいが，水深が増すごとに小さくなり，5m層では14.7°，10m層では5.7°となり，15mにいたるとわずかに1.2°であった．これ以深でも湖底の36mに達するまで0.9～1.3°の微差でしか水温は変動していない．このように新澪では上層部でのみ循環しており，15m以深ではほとんど年間を通じて完全に停滞していることが明らかである．

3) pH，溶存酸素

表面のpHは8.4～7.6の範囲で変化していた．4月から9月の間は8.4とやや高く，10月から3月の低水温時は8.0～7.6であった．垂直的周年分布をFig. 4に示したが，水深5mから10mではpHの水深差が大きく，1m深くなるごとに約0.2降下している．水深8m附近では中性を示すが，これ以深になると弱酸性となり，6.6～6.8の状態が30m層附近までつづく．しかし，さらに水深が増すとpHは逆に高くなり，底層では7.1～7.4の弱アルカリ性を示していた．

溶存酸素は，表層で4月から8月の間は110～130%の過飽和状態を示したが，10月から3月までは90～100%の飽和率であった．9月の調査時は藍藻が水の華を形成するほど増殖していたため，溶存酸素も170%と著しく過飽和となった．しかし，5m層では急減しており，50%にすぎなかった．また，7月にのみ5m層で180%の過飽和層が観察された．Fig. 4に示したように，水深10mを境にして溶存酸素は非常に少なくなり，これ以深で

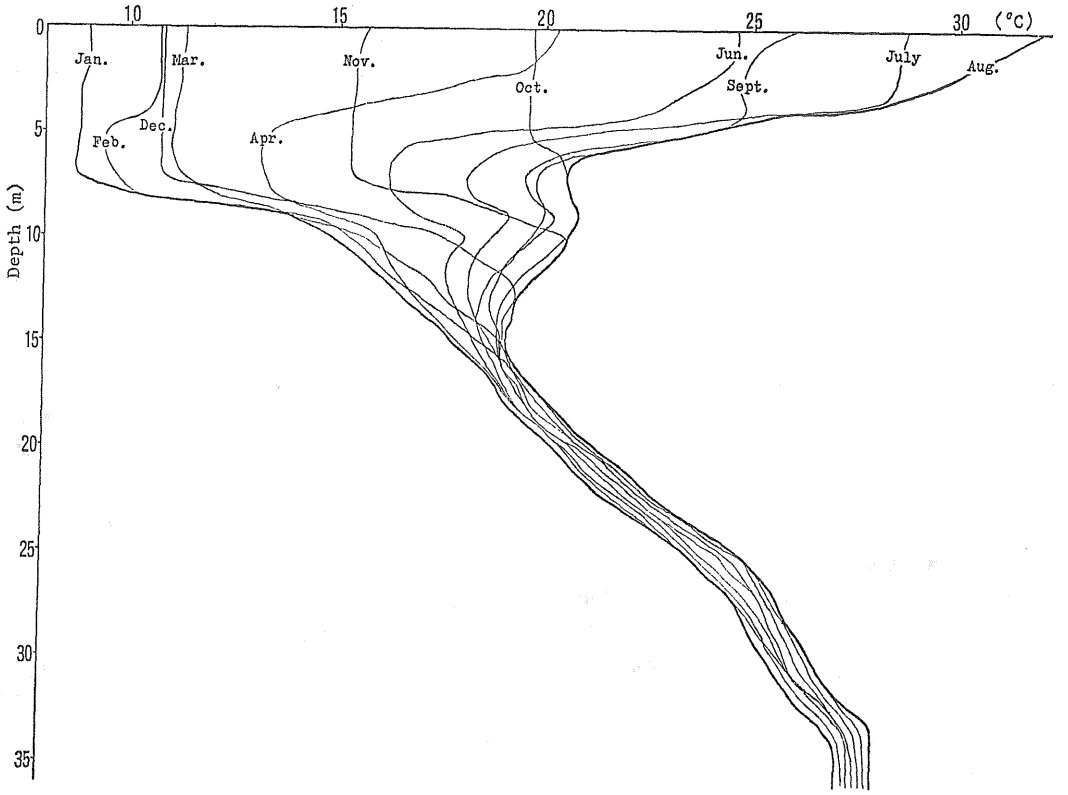
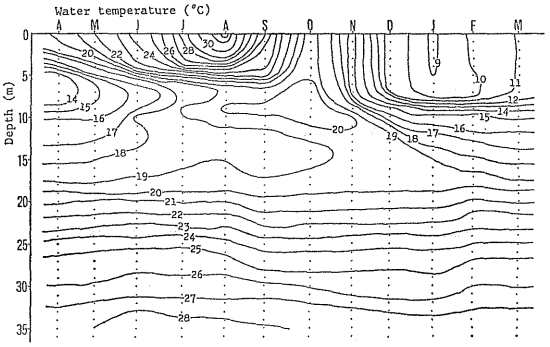
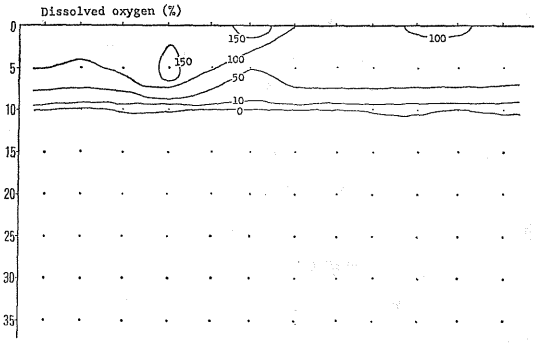
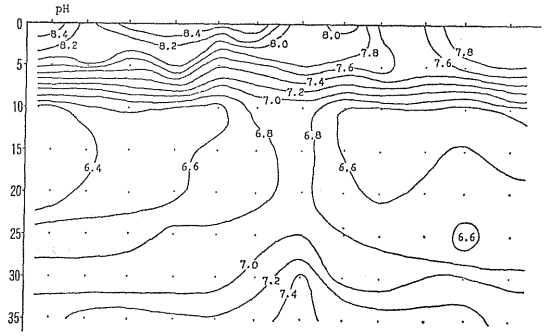
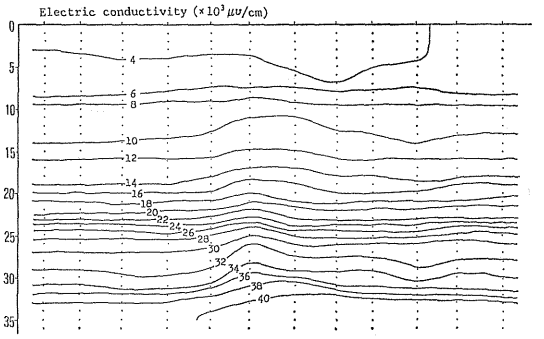


Fig. 3. Vertical Distribution of Water Temperature in Lake Shinmyo, April 1973-March 1974.









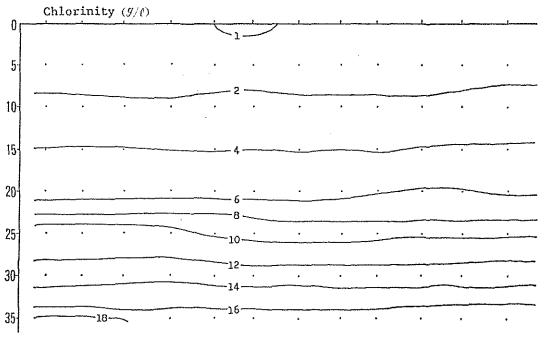


Fig. 4. Monthly and Vertical Distribution of Water Temperature, pH, DO, Electric Conductivity and Chlorinity in Lake Shinmyo, April 1973–March 1974.

は年間を通して還元状態であり，同時に濃厚な硫化水素の生成が認められた．

4) 電気伝導度，塩素イオン

電気伝導度（18° 換算値）の垂直的周年変化を Fig. 4 に示した．表層では 3.5～5.5×$10^3$$\mu\mho$/cm の範囲で多少変動しているが，8 m附近にいたると6.0×$10^3$$\mu\mho$/cmとなり，年間ほとんど変化がみられなくなる．さらに水深が増すにつれて徐々に高くなり，20m以深ではおよそ1 mにつき2,000$\mu\mho$/cm の割合で高くなっていく．底層では表層の約10倍となり，4.0×$10^4$$\mu\mho$/cmであった．

本湖には海水の浸入があるため，塩素イオンは非常に濃厚であり，電気伝導度の分布と同様な傾向を示し，著しく成層している．水深5 mまでは1.2～1.3g/l であるが，10m附近で2g/l となり周年ほとんど変動がみられない．Fig. 4 に示したように，水深20m 附近まではおよそ2.5mごとに 1g/l の割合で増加しているが，これ以深は1m深くなるごとに 1g/l 増加している．そして底層では海水濃度と近似の 17～18g/l にも達していた．

5) その他の化学成分

過マンガン酸カリウム消費量，総硬度，SiO_2，PO_4^{3-}，無機態窒素，有機態窒素についての水深による年間平均値を Table 1 に表示した．これらは一般的に水深とともに増加していく傾向にあった．

PO_4^{3-} は 0～5 mの表層では 0.05～0.07mg/l を示すが，深さとともに増加し，25，30m層では0.35mg/l，35 m層では 1.8mg/l となっている．無機態窒素は表面で 0.39mg/l とやや高かったが，中層で減少し10m層では 0.08mg/l の最小値であった．これ以深では，20m 層で 0.25mg/l と増加したが，30m まで大きな増減はみられていない．しかし，35m 層では急増して 1.06mg/l となり，すべてが NH_3-N であった．

アルブミノイド態窒素の垂直分布も同様な傾向にあり，表層で 0.26mg/l であるが，15m 層では最小の 0.1 mg/l であった．これ以深では徐々に増加しており，35m層では 3.0mg/l を示した．

過マンガン酸カリウム消費量は表層では 15.5mg/l であったが，5～10m層でやや少なく11mg/lであった．これ以深では深さとともに増加し，35m層では219.7mg/l を示した．

Table 2 は，7 月調査時に湖水の Na^+, K^+, SO_4^{2-}, Cl^- について分析を行ない，標準海水の値[11]と比較したものである．Na^+, K^+, Cl^- については水深が増すごとに値が高くなり，底層では海水の値に近似してくる．しかし，SO_4^{2-}は例外で 150mg/l 前後を示し，海水に比較して値が小さかった．しかも表層から底層までほとんど濃度変化がみられていない．これは，本湖の10m以深では一年中無酸素状態にあり，硫化水素が多量に存在することから硫酸塩環元菌の作用によることが大きいためと考えられる．

6) プランクトン相

この調査中に見出されたプランクトンは藍藻類 2，珪藻類 1，鞭毛藻類 1，渦鞭毛藻類 1，輪虫類 2，甲殻類 1 の計 12taxa で，次記のようなものであった．

Cyanophyceae
- *Anabaena* sp.
- *Chroococcus dispersus*

Dinophyceae
- *Peridinium* sp.

Bacillariophyceae
- *Chaetoceros muelleri*

Chlorophyceae
- *Ankistrodesmus falcatus*
- *Ankistrodesmus falcatus* v. *mirabilis*
- *Carteria* sp.
- *Chlamydomonas* sp.
- *Selenastrum* sp.

Rotatoria
- *Brachionus plicatilis*
- *Keratella valga monstrosa*

Crustacea
- Cyclopidae sp.

これらは1972年における四季調査時のプランクトン相[3]とほとんど変わりはみられなかった．本湖のプランクトン相の種類構成は貧弱であり，季節によって個体数の増減をくり返していた．これらの周年消長を Lohmann の球曲線法によって Fig. 5 に図示した．季節的な消長を

Table 1. Mean Values of Chemical Properties of Lake Shinmyo, April 1973–March 1974.

Depth (m)	$KMnO_4$ cons. (mg/l)	Total hard. (mg/l)	SiO_2 (mg/l)	PO_4^{-3} (mg/l)	Inorg.-N (mg/l)	Alb.-N (mg/l)
0	15.5	730	53	0.07	0.39	0.26
5	10.9	790	56	0.05	0.23	0.18
10	11.8	1,600	73	0.09	0.08	0.11
15	18.3	2,000	77	0.11	0.10	0.10
20	18.0	2,500	77	0.26	0.25	0.24
25	44.2	3,600	73	0.35	0.10	0.38
30	51.1	4,700	70	0.35	0.12	0.76
35	220.0	5,600	76	1.80	1.06	3.00

Table 2. Some Ionic Compositions at Different Depths of Lake Shinmyo in July 1974.

Depth (m)	Na^+ (mg/l)	K^+ (mg/l)	SO_4^{2-} (mg/l)	Cl^- (g/l)
0	660	18.6	148	1.2
5	880	25.6	154	1.3
10	1,750	43.5	152	2.3
15	2,400	70.0	154	4.5
20	3,200	87.0	153	5.9
25	5,400	126.0	153	9.3
30	7,600	200.0	152	13.0
35	8,400	256.0	153	17.0
Sea water	10,560	380.0	2,650	19.0

優占種からみると，4月には *Chaetoceros muelleri* が2,000/ml 個体ともっとも多く出現していた．群体をなす細胞は非常に少なく，ほとんどが単独浮遊性であり，10～2,000/ml の個体数で周年出現がみとめられた．5月から8月にかけては *Chroococcus dispersus* が優占して2,600～16,000/ml を数え，これも周年みられている．8月になると藍藻 *Anabaena* sp. が急激に増殖して4,000/ml となり，さらに9月には最高の5,200/ml に達した．水色は濃茶褐色に変色し，水の華を形成していた．このときのクロロフィルaは78.0mg/m³を示し，もっとも高かった．しかし，11月に入ると急減して460/ml となり，2月，3月にはまったく消失していた．また，9月には湖水全体が茶褐色を呈しているなかで，一部分に濃緑色の帯状の水の華が観察され，鞭毛藻類 *Carteria* の一種と思われた．11月になるとふたたび *Chroococcus dispersus* が増殖して1,500～2,000/ml となり，水色も淡緑色となり，この状態が翌年1月まで続いた．2月，3月には *Ankistrodesmus falcatus* v. *mirabilis* が優占種となり，8,000～9,000/ml を計数した．

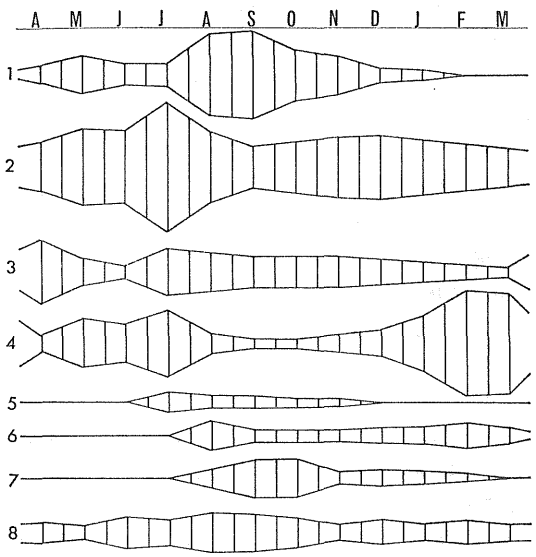


Fig. 5. Quantitative Changes of Eight Species of Plankton in Lake Shinmyo, April 1973-March 1974.

その他のプランクトンとして，7月から11月にかけて *Ankistrodesmus falcatus*，8月から2月には *Selenastrum* sp., *Chlamydomonas* sp. などが少ないながら出現していた．渦鞭毛藻の *Peridinium* sp. は30～420個体/ml で周年出現していたが，ことに8月，9月に多くみられた．

動物プランクトンは3taxa がみとめられたが，6月に *Brachionus plicatilis* が多く，また *Keratella valga monstrosa* は7月，8月を除いた各月に出現しており，

ことに10月から12月にかけて多くみられた．その他，Cyclopidae が7月～10月の間に出現していた．

考　察

わが国にはサロマ湖をはじめとして多くの汽水湖が存在する[12]．塩分濃度の高い水は密度差によって湖の深層に停滞し，循環期でも表層水と深層水が混合しにくい．そのため，深層水中の溶存酸素は消失し，硫化水素が多量に発生している．このような湖は部分(不完全)循環湖と呼ばれるが[13]，代表的なものとして春採湖（9m），水月湖（34m），貝池（11.5m）[13]などがあり，新澪もこれに該当している．新澪は海岸から300m も離れていながら潮汐の影響による水位変化がみられている．

水温の垂直分布から，15m以浅では顕著な季節変化がみられるが，これ以深は一年中変化することなく停滞している．また，本湖の水温で特異的なのは15m以深では深くなるにつれて温度が徐々に上昇していくことである．湖底では27.2～28.1° を示すが，1932年の吉村，宮地による測定結果（26.7°）とほとんど変っておらず，長年にわたって高温状態にあることがわかる．これに類似した現象は Hot Lake（ワシントン，3.5m），Vanda Lake（南極，66m）などにみられるが[14]，太陽輻射エネルギーの貯留や，地熱，湧泉熱などが高温をもたらすものと言われている．最大水深が34mと新澪に類似している水月湖[15]では，8m以浅では同じような水温分布がみられているが，17m 以深では湖底にいたるまで14.7～15.0° の範囲で周年変化していない．しかし，深さとともに温度が上昇する現象はみられない．

溶存酸素は，淡水湖の大路池では夏季停滞期にのみ底層（8m以深）で消失するが[18]，新澪の10m以深では一年中存在していない．この無酸素層の厚さは26mにもなっている．一菱内湖や水月湖では30mにも達するといわれる[17]．

春採湖，水月湖，貝池では無酸素層との境に硫黄細菌の *Chromatium* が水を紅色にするほど増殖する現象がみられているが[16,18,19]，新澪では常には認められない．これはむしろ淡水湖の大路池で夏季の無酸素層（8m層）でみられている[20]．

塩素イオンは35m層では17～18g/*l* であるが，この底層における濃度は，海と地表でつながっている貝池(18.6 g/*l*)[21]や日向湖（17.6g/*l*）[15]と同じように高塩であり，海水の値に近い．水月湖では表層の濃度は同様であるが，湖底では8g/*l*となっている．

湖水は深層ほど非常に澄明である．しかし，10月から2月にかけて10～15m層で濁度15～27mを示すことがあり，この上下5mより5～10倍の高濁層が認められる．色調は淡褐色で懸濁しており，プランクトンの分解物と考えられる．この時期は夏季に大増殖をする藍藻の衰退期であり，これが死滅，沈降し，水の密度差から一時的に高濁層をもたらすものと推察される．中尾らは[22]，網走湖，水月湖で懸濁物の垂直構造を調べているが，前者では11m層に，後者では7～9m層に極大がみられるという．この層への懸濁物の集積は生物活性のためではなく，塩分の淡濃境界での摩擦力が懸濁物粒子を沈降に抗して保持するものと推論している．

藍藻 *Anabaene* は，夏季になると大増殖を起こすプランクトンであり，水の華の形成は1972年は8月であったが，1973年は1ヶ月おくれて9月に出現した．その後の経年観察ではこれほど顕著にはなっていない．

Chroococcus dispersus は塩素イオンが6～8g/*l* の養鰻池でよくみられる種で[24]，季節的な持続性種といわれる．新澪でも本種は周年出現しており，ことに7月に多くみられている．*Chaetoceros muelleri* は本湖の唯一の浮遊性珪藻であるが，汽水性種として養鰻池のほか，水月湖にも優占プランクトンとして出現している[24]．輪虫 *B. plicatilis* も汽水性種として知られ，河北潟で *K. valga* とともに多く出現しているものである[25]．

40年前の1932年6月に吉村，宮地はすでに本湖において *Nodularia harveyana* が水の華を形成するほど増殖しているのを観察し，透明度1.5mを記録している[26]．このことから，新澪が富栄養湖になったのはさらに以前のことと思われる．

ま と め

1973年4月から1974年3月の一年間にわたり，三宅島新澪の毎月1回の調査を行ない，次のような知見が得られた．

1）透明度は最大6月の3.6m から9月の0.3m であり，とくに夏季の8月，9月は0.5，0.3mと小さかった．

2）水温は，水深15m以深では年間を通じてほとんど変わらないが，それ以浅では顕著な季節変化がみられていた．また，15m以深では徐々に水温は上昇しており，湖底では27.6±0.5°の高温状態であった．

3）塩素イオンは，表層では 1g/*l* 強であるが，深さとともに増加し，底層では海水濃度に近い17～18g/*l* である．

4）溶存酸素は10m以深では検出されず，周年還元状態であり，硫化水素が多量に発生している．

5）PO_4^{3-}は表層では0.05～0.07mg/*l*であるが，深さとともに増加し，35m層ではで 1.80mg/*l* であった．無機態，有機態窒素は，表層で 0.39，0.26mg/*l* を示し，10～15m層で一担少なくなるが，これ以深では増加してい

る．35mではそれぞれ1.06，3.0mg/*l*であった．

6）プランクトンは，植物性9，動物性3の12taxaであった．季節的な優占種の遷移は，*Chaetoceros muelleri*, *Chroococcus dispersus*, *Anadaena* sp., *Chroococcus dispersus*, *Ankistrodesmus falcatus* v. *mirabilis* であった．

謝辞 この調査を実施するに際しては，三宅島村役場水道温泉課，山本幸蔵前課長をはじめ，同課の方々に大変お世話になった．また，本稿の執筆にあたっては東京都水道局，乙幡恵氏から有益な助言をいただいた．ここに深謝の意を表する．

文　献

1）東洋大学工業技術研究会：三宅島の水道水源調査報告書，昭和48年3月
2）松本淳彦，土屋悦輝：水協雑，514，42，1977
3）松本淳彦：東京衛研年報，25，453，1974
4）Yoshimura, S. and D. Miyaji : *Jap. Jour. Geol. Geog.*, 13, 339, 1936
5）福島　博：横浜市大論叢，13，1，13，1961
6）新井　正，森　和紀，高山茂美：陸水雑，38，1，1，1977
7）池田信道：三宅島百話，1973，島の新聞社
8）堀江正治：陸水雑，18，1，1，1956
9）新井　正，高山茂美，他：地理評，45，5，364，1972
10）日本水道協会：上水試験方法，1978
11）小山忠四郎，半田暢彦，杉村行勇：湖水，海水の分析，1972，講談社サイエンティフィク
12）西条八束，阪口　豊：科学，48，6，352，1978
13）Ruttner, F.: *Fundamentals of Limnology*, 3ed., Univ. Toronto press, 1973
14）Bayly, I. A. E. and W. D. Williams: *Inland Waters and Their Ecology*, Longman Australia, 1977
15）Matsuyama, M.: *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.*, 44, 1, 1978
16）松本淳彦，土屋悦輝：東京衛研年報，29，392，1978
17）上野益三：陸水学史，1977，培風館
18）堀江正治：日本の湖，1964，日本経済新聞社
19）Matsuyama, M.: *Jap. Jour. Limnol.*, 39, 3, 103, 1978
20）松本淳彦：未発表資料
21）Matsuyama, M.: *Jap. Jour. Limnol.*, 39, 3, 97, 1978
22）中尾欣四郎，石井吉之，知北和久，谷沢享子：日本陸水学会講演要旨集，1980
23）岩井寿夫：三重県立大学水産学部紀要，5，3，412，1962
24）津田松苗編：日本湖沼の診断，1975，共立出版
25）Mashiko, K.: *Scei. Rep. Kanazawa Univ.*, 6, 1, 135, 1955
26）吉村信吉：湖沼，1941，誠文堂新光社

他　誌　発　表

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1979. 7—1980. 6)

感染症等に関する調査研究

Laboratory aspects on the cause of the cholera outbreak occurred in Japan, 1978

Makoto Ohashi : J. Korean Soc. Midribiol., 14, 39, 1979

Laboratory aspects on the cause of the cholera outbreak in Japan, originated from a public wedding hall, in 1978

Makoto Ohashi : Proceedings of the 15th Joint Conference on Cholera. The U. S.–Japan Cooperative Medical Science Program, pp. 334, U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, NIH Publication No. 80–2003, 1980

The cause of the cholera outbreak which took place in Japan in November 1978 and originated from a public wedding hall in Ikenohata, Tokyo was analyzed.

Based on our observations, the following conclusions were drawn : The packed take–home–food served and provided by the wedding hall was regarded as the vehicle of the current cholera outbreak. Although no cholera vibrio was detected from the epidemiologically incriminated food, it seems likely that the outbreak was brought about by an unfortunate combination of the following factors. (1) A small number of the whole–cooked frozen lobsters which were imported from a cholera infected country and were used for the packed food had been contaminated with cholera vibrios at the producing site, (2) while the vibrios multiplied in the lobsters and spread to other foods during the cooking process, and then (3) they were allowed to multiply further before the packed food was finally consumed.

ヒトにおける *Campylobacter* 腸炎の実態とその感染源としての動物保菌について

坂井千三，丸山　務，斎藤香彦，深見トシエ，斎藤誠，景森令克，渡辺賢哉，足立卓治：昭和54年度健康づくり特別研究報告書　1980

最近，*Campylobacter jejuni* によるヒトの腸炎が明らかにされ，本菌が新しい感染症の起因菌として注目されている．しかしながら，わが国における本菌の研究はまだ緒についたばかりであり，菌学および疫学についての十分な資料はない．本稿では我々の成績を中心に *C. jejuni* のヒトにおける腸炎の実態と，感染源としてのヒトおよび動物保菌について検討した成績を報告した．

***Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* が原因と推定される食中毒について**

海沼　勝，山下智司，平井政好，和泉充夫，坂井千三，丸山　務，斎藤香彦：食品衛生研究，29(10)，861，1979

昭和54年5月，東京都渋谷区内のある飲食店で，宴会料理が原因で118名中101名が発病する食中毒が起きた．その共通原因食品は“あさりとわけぎのぬた”で，患者の糞便から *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* が検出されて原因菌と推定された．

本事例は，わが国における *Campylobacter* によるきわめてまれな事例と思われるので，その疫学的調査成績を中心に報告した．

わが国におけるウェルシュ菌食中毒および検査法

伊藤　武，坂井千三：メディヤサークル，24（9），288，1979

食中毒起病性ウェルシュ菌は，ヒトの腸管内常在細菌叢としてのウェルシュ菌よりも芽胞の熱抵抗性が強く，100℃，1～4時間の加熱でも生存する“いわゆる耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌”であるとされ，さらに食中毒起病性ウェルシュ菌の抗原分析により血清型が呈示された．しかし，その後熱抵抗性の弱い芽胞を形成するウェルシュ菌やHobbsの血清型に該当しないウェルシュ菌の食中毒例が多数報告されるにいたり，食中毒起病性菌を芽胞の熱抵抗性や血清型のみでは解決できなくなった．

一方，Duncanらや Hauschildらの毒素学的面からの解析により，本中毒に直接関与する毒素すなわちエンテロトキシンが明らかにされた．そこで，これらの最近の知見と本食中毒発生時の検査法について紹介した．

ウェルシュ菌食中毒患者ふん便からのエンテロトキシン検出について

稲葉美佐子，伊藤武，斎藤香彦，坂井千三，植村　興，阪口玄二：感染症学雑誌，53（9），409，1979

ウェルシュ菌による下痢症の起因物質は，本菌の産生するエンテロトキシンであることが明らかにされており，我々は本毒素のサル投与実験によって，サルの下痢便から逆受身血球凝集反応（RPHA）で直接エンテロトキシンが検出されることを明らかにしている．このこと

をヒトの本菌食中毒診断に応用し，本菌による食中毒事例を明らかにした．すなわち，東京都内に発生したウェルシュ菌食中毒患者ふん便を対象に RPHA 法でふん便中のエンテロトキシンを検討した結果，以下の成績を得た．

1963年～1978年までに都内で発生した13事例の各事例のふん便から本毒素が証明され，その毒素量は1：100～1：25,800 (RPHA 価)であり本菌の排菌量は10^6/gであった．また同一患者について1病日と5病日のふん便中のエンテロトキシンを検討したところ，1病日では陽性であったが5病日では陰性であった．一方，13事例の分離菌のエンテロトキシン産生性は1事例由来株を除いてすべて陽性であった．エンテロトキシン非産生株については De test で腸管の腫張が認められ，その貯溜液中より本毒素が証明された．

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

稲葉美佐子，伊藤武，斎藤香彦，坂井千三，植村興，阪口玄二：第9回嫌気性菌感染症研究会講演記録，(9)，95，1979

ウェルシュ菌の産生するエンテロトキシンの検索は，ウサギ De test やマウス致死試験，モルモット皮膚反応などの生物学的方法もあるが，植村らは本毒素を高純度に精製した特異抗毒素血清を用いた血清学的方法として逆受身血球凝集反応 (RPHA) 法を開発した．

我々は，この RPHA 法をさらに微量かつ迅速な方法に改良し，エンテロトキシン検索の実用化を確認した結果を述べた．

ウェルシュ菌下痢症の毒素学的検討——散発下痢症について——

稲葉美佐子，伊藤　武，斎藤香彦，坂井千三，山崎悦子，早矢仕治邦，矢島太郎：第10回嫌気性菌感染症研究会講演記録，(10)，96，1980

散発下痢症におけるウェルシュ菌の因果性を明らかにする目的で，下痢患者ふん便141件につき下痢原性細菌の検索を行ったところ，本菌下痢症と考えられる2例を認めたので報告した．

すなわち，腸炎ビブリオその他の腸管病原菌の検出されなかった下痢便141件のうち耐熱性 (75℃20分) ウェルシュ菌が54件(38.3%)より検出された．一方，ふん便から直接本菌エンテロトキシンが証明されたのは2例で，ふん便中のウェルシュ菌数はいずれも10^8/g であった．この2例の分離菌のうち1例は *in vitro* でもエンテロトキシン産生が確認されたが，他の1例では認められなかった．

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

Itoh, T., Saito, K., Maruyama, T., Sakai, S., Ohashi, M., and Oka, A. : Microbiol. Immunol., 24 (5), 371, 1980

An outbreak of acute enteritis due to *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* involving a total of 35 out of 74 children occurred at a nursery school in Tokyo in January 1979 and lasted for 7 days. It was the first case of a community outbreak of the disease to be recognized in Japan.

The major symptoms observed in tne patients consisted of diarrhea (88%), fever (82%), abdominal pain (39%), and vomiting (61%). The rate of isolation of the organism from the patients was 39%. Sera of four patients showed elevated aggultinin titers against the organism ranging from 1 : 80 to 1: 320.

Although it is suggested that the outbreak was caused by a communal lunch or between-meal snacks prepared by and provided at the nursery school, the incriminated food, source and route of contamination could not be pinpointed.

ブドウ球菌コアグラーゼ型別法の実際

潮田　弘，寺山　武：臨床検査，23，779，1979

黄色ブドウ球菌は多種多様な疾患の原因菌となる．本菌による院内感染の流行もまれではなく，その汚染源追求や各種疾患の原因菌型の調査，あるいは食中毒の疫学調査などに本菌の型別が必要とされる．世界的に最も普及しているファージ型別法は，20種以上の標準ファージを常備しておくことが非常に繁雑であるし，欧米で確立されたためか，わが国で分離される菌株では型別不能株が極めて多い．それにかわって，黄色ブドウ球菌の同定基準性状であるコアグラーゼの抗原性の違いを利用したコアグラーゼ型別法は黄色ブドウ球菌をⅠ～Ⅷ型に正確に型別できる．

また型別用抗血清が市販されているので，どこの検査室，研究室でも容易に行なえる簡便な黄色ブドウ球菌の型別法であることを紹介した．

Antibiotic Resistance and Conjugative R Plasmids in *Salmonella* Isolated from Gastroenteritis in Japan between 1966 and 1975

Nakaya, R., Horiuchi, S., Yoshida, Y., Sakai, S., Itoh, T., Saito, K., Terayama, T., Zen-Yoji, H., and Onogawa, T. : Microbial Drug Resistance, (2), 207, 1979

This paper presents a summary of the data compiled from annual surveys on the antibiotic resistance and R plasmids in the strains of *Salmonella* isolated from gastrointestinal infections in Japan during the 10-year period between 1966 and 1975, *i. e.*, an extention of our previous report. The antibiotic resistance of 1,799 isolates of *Salmonella* was determined.

Resistance to one or more of fhe antibiotics tested was found in 78% of the isolates. The frequencies of resistance to Sm and Tc were 73 and 34%, respectively, whereas those to Am, Cer, Cm, and Km were 2.5 to 7.4%. All the strains examined were found to be Gm-sensitive. It was found that the frequency of Sm resistance markedly decreased in the last 2 years, while that of Km resistance increased in the last 4 years. Of 1,408 resistant strains, 43% were multiply resistant, in which the patterns (Sm. Tc) and (Km. Sm. Tc) were predominant. *Salmonella typhimurium* were the most prevalent serotypes during the period, representing 71% of the resistant serotypes.

Conjugative R plasmids were demonstrated in 37% of the resistant strains in average and in 1975 the prevalence percentage of R^+ strains reached to 70%. If strains with single Sm resistance conjugally nontransferable were excluded, the percentage of R^+ strains were 68% of resistance strains. *S. typhimurium* represented 84% of the R^+ serotypes.

A New Method for Purification of Staphylocoagulase by a Bovine Prothrombin-Sepharose Column

H. Igarashi, T. Morita, and S. Iwanaga : J. Biochem., 86 (5), 1615, 1979

Staphylocoagulase was isolated from a culture filtrate of *Staphylococcus aureus*, strain st-213, by a two step purification procedure of chromatography on a bovine prothrombin-Sepharose 4B affinity column and gel filtration on Sephadex G-25. The yield of the coagulase activity ranged from 75-83% and the purified preparation gave a single precipitin line in immunodiffusion tests against anti-crude and anti-purified staphylocoagulase sera. However, the final product was shown to contain one major and two minor components by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Chemical analysis of the meterial indicated that it does not contain any cystine residues and that its NH_2-terminal residue is a single isoleucine.

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とその性状

五十嵐英夫，高橋正樹，森田隆司，岩永貞昭：臨床と細菌，7 (1)，153，1980

コアグラーゼ（以下 Coag. と略）は黄色ブドウ球菌の産生する菌体外蛋白質で，ヒト，ウサギなどの血漿を凝固し，ブドウ球菌の分類学上，重要な因子の1つでもある．ブドウ球菌感染症における Coag. の役割や Coag. の血漿凝固作用機構等については，まだ解明されていない．その理由は Coag. の精製が従来の方法では，きわめて複雑でかつ均一成分の分離が困難であったことがあげられる．

私どもは，簡便な Coag. の分離法を開発する目的で，アフィニティークロマトを試みた結果，ウシ・プロトロンビンをリガンドとした Sepharose 4B カラムを用いて，ブドウ球菌の培養沪液から一挙に，Coag. の分離，精製しうる方法をみいだした．

そのときの回収率は 75～83%，比活性は A_{280}＝1当り，128,000 MCD；精製度は 8,600倍であった．最終標品はゲル内沈降反応および免疫電気泳動，超遠心分析により均一であった．一方，等電点分画法，Disc および SDS—ポリアクリルアミドゲル電気泳動では，不均一性を示したが，これは分子量，等電点の異なる Coag. の共存によるものと推定された．アミノ酸組成の特色は Cys がなく，NH_2 末端はイソロイシンであった．

Coag. 活性の測定は，これまでヒトやウサギ血漿を用いるゲル形成能により測定されているが，この方法では Coag. の微量の変化量の測定ができない．そこで，ヒト・プロトロンビンと合成発色性基質（Tosy-Gly-Pro-Arg-pNA）を用いる光電比色法による Coag. の定量法を開発した．

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—

五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，潮田　弘，寺山

武：臨床と細菌，7 (1)，154，1980

黄色ブドウ球菌の産生するコアグラーゼ（以下 Coag. と略）は，その抗血清との中和反応によって，免疫学的にⅠ～Ⅷに型別されることが善養寺らによって明らかにされ，コアグラーゼ型別として，黄色ブドウ球菌の型別に実用化されている．しかしながら実際の型別においてしばしばⅡ型およびⅢ型 Coag. 抗血清の共通反応がみられる．

そこで，これらの原因を明らかにする目的で，ウシ・プロトロンビンをリガンドとしたアフィニティークロマトで精製したⅡ型およびⅢ型 Coag. の免疫学的特異性について再検討した．まず，精製 Coag. ⅡおよびⅢ型をそれぞれ，CNBr で活性化した Sepharose 4B とカップリングして，Coag. Ⅱ型–Sepharose 4B および Coag. Ⅲ型—Sepharose 4B アフィニティーカラムを調製した．これらのアフィニティーカラムにカラムの Coag. 型と同型または異型の組み合せになるように抗 Coag. ⅡおよびⅢ型血清を applyして，各型の抗 Coag. 血清の分画を行なった．その結果，各型の抗 Coag. 血清中に，その型の Coag. とのみ反応する型特異抗体と他の型の Coag. とも反応する型共通抗体の2種類の抗体をそれぞれ単離することができた．型特異抗体と型共通抗体の特異性を検討した結果，型特異抗体は Coag. Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅴ，Ⅵ型の感作血球との RPHA 反応，中和反応，ゲル内沈降反応において，対応する Coag. とのみ反応し，その特異性が確認された．これに対して，型共通抗体は上述のいずれの反応においても，異なる型の Coag. と反応し，型共通性が認められた．

Travellers' diarrhea and enterotoxigenic *Escherichia coli*—a survey in 1977–1979 in Tokyo—

Yasuo Kudoh, Shigeru Matsushita, Sumio Yamada, Masaaki Tsuno, Kenji Ohta, Akemi Kai, Senzo Sakai and Makoto Ohashi : Proceedings of the 15th Joint Conference on Cholera. The U. S.-Japan Cooperative Medical Science Program, pp. 225, U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, NIH Publication No. 80–2003, 1980

During the period from November 1977 to February 1979, a total of 1,975 fecal specimens of oversea travellers among Tokyoites, who were mainly of visitors to South East Asia and India, were examined for enteric bacterial pathogens.

An etiological agent was found in 50 per cent of diarrheal cases of acute phase, in 25 per cent of those of convalescent phase, and in 16 per cent of healthy individuals. Enterotoxigenic *Escherichia coli* of non-enteropathogenic serotypes was the most common cause in the diarrheal cases of acute phase; other responsible pathogens included Salmonellae, *Vibrio parahaemolyticus*, Shigellae, invasive type *E. coli*, and so-called NAG vibrio.

Enterotoxin producibility of the *E. coli* isolates was examined by using CHO cell assay and reversed passive hemagglutination (RPHA) test with red blood cells sensitized with specific anti-cholera toxin immunoglobulin as well as using intragastric inoculation method in suckling mice. Out of 101 isolates of enterotoxigenic E. coli, 52 were producing ST, 28 were producing both LT and ST and 21 were producing LT. Although a wide variety of serotypes were observed among the enterotoxigenic isolates, most prevailing ones were 0148 : H28, 06 : H16 and 027 : H20. Of the enterotoxin producing isolates, 35 were found to be antibiotic resistant.

1976～77年猩紅熱患者由来A群溶血レンサ球菌の薬剤感受性と菌型について

大久保暢夫，柏木義勝，柴田　実，永瀬金一郎：感染症学雑誌，53 (10)，498，1979

1976～77年度に全国各地から収集したA群溶血レンサ球菌について，薬剤感受性と菌型型別をおこなった．この両年度における主要流行菌型は過去と同様に12型であったが，これ以外に1型，4型菌の台頭が著明に認められた．抗生物質に対しては，β-ラクタム類にすべて感受性を示したが，TC，CP，MLs にはなお高度耐性を示す菌株が多いことが認められた．

猩紅熱患者とその家族の咽頭溶血連鎖球菌に関する研究

飯村　達，清水長世，柳下徳雄，和田　弘，庭野一次田中　実，永瀬金一郎，大久保暢夫，柏木義勝，柴田実：感染症学雑誌，53 (10)，564，1979

1972～75年の4年間に猩紅熱の疑いで豊島病院に入院した患者1,581名より分離した菌株につき，菌型と薬剤感受性の両面から患者と家族の溶連菌の関連性を検討した結果，家族よりの菌型分布は，患者の場合と同様で，12型が最も高率で，患者株の67.5%と家族株の70.4%を占めた．また同一家庭の患者と家族の双方からの分離菌

の菌型が同定できたものは213組で，そのうち195組(91.5%)は両者の菌型が一致していた．患者分離株152株と家族分離株137株について，PCG，TC，CP，EM，OL に対する薬剤感受性を調べたところ，PC 耐性株は全く見られず，TC，CP，EM，OL に対しては何れも菌株の50%ないしそれ以上が耐性であり，家族株と患者株の MIC 値の分布は良く類似していた．

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)，15，1979

エンテロウイルス（腸内ウイルス）の検査法も近年は広範な関連分野からの知識，技術の導入応用が活発になり，大幅な進展をみている．

著者はエンテロウイルスの分離同定試験および血清試験に主焦点をおいて，技術解説をおこなうとともに，実施にあたっての注意事項問題点についてのべている．

下水のサーベイランスからみた夏季のウイルスの生態学

岩崎謙二：小児科，20 (7)，681，1979

地域社会におけるエンテロウイルス，アデノウイルスおよびレオウイルスの感染流行状況を，ウイルス検索によってさぐる場合，下水検体はきわめて実用性のあることをのべた．

ついで，過去12年間著者らが実施してきた下水検体を対象としたウイルス・サーベイの結果をもとにして，東京都内におけるエンテロ，アデノおよびレオ各ウイルス感染の主流行発生，流行ウイルス種類の年次変遷経過や季節消長などについて解析した．また下水ウイルスの疫学的意義も考察した．

抗核抗体保有患者の BK ウイルス感染

田口文章，藪内　清，矢野一好，柴田タツ美，岩崎謙二，和田重次，郡司俊実：臨床とウイルス，7 (3)，305，1979

抗核抗体陽性の患者血清125例についてＢＫウイルスＨＩ抗体価を測定し，抗核抗体価とＢＫウイルスＨＩ価を対比させて相関性を検討した．

Speckled 型（47件）では正の相関（0.46），Shaggy，Speckled 混在型（54件）では無相関（−0.04），その他の型（24件）では負の相関（−0.48）が観察され，抗核抗体価とＢＫウイルスＨＩ価との間に関連性のあることが想定された．

BK ウイルスの研究　1. 東京地区における BK ウイルス感染の血清疫学

田口文章，岩崎謙二，矢野一好，吉田靖子，山崎清：臨床とウイルス，7 (3)，311，1979

東京地区における BKV（新しいヒトのパポバウイルス）の浸淫状況を知る目的で，1958年および1972～73年に採取した一般都民血清510件，家兎血清148件，ブタ血清94件，ウマ血清59件，マウス血清50件およびヤギ血清22件についてＨＩ試験をおこない，抗体保有状況を検討した．

ＢＫウイルス感染はヒトの間では非常に高率に発生しているが，動物では種類によって差異があるばかりでなく，一般に低率であった．

BK ウイルスの研究　2. 東京地区における BK ウイルス抗体保有状況の年次推移

田口文章，長木大三，岩崎謙二，矢野一好，吉田靖子藪内　清，梶岡実雄：臨床とウイルス，7 (3)，313，1979

東京地区における一般住民のＢＫウイルス抗体保有状況の年次変遷経過をさぐる目的で，1958年から1976年の間に採取した都民血清 3,845 件についてＨＩ試験をおこない，得られたデータは回帰分析法を応用して解析した．1969～73年にかけて高い抗体価を示した例が多くみられた．なお，並行して実施した家兎血清の調査結果でも同様の傾向がみられた．

Histopathological Studies on Experimental *Yersinia enterocolitica* Infection in Animals

Kohji Fukai and Tsutomu Maruyama : *Contr. Microbiol. Immunol.*, 5, 310, 1979

Relatively few reports have been made on histopathological studies of experimental *Y. enterocolitca* infection. The authors attempted to make detailed examinations using mice, rabbits and monkeys according to the time course. Histopathological changes in infected animals were found mainly in mucous membranes on Peyer's patches of intestin. The lesions consisted of formation of bacterial colonies accompanied by accumulation of neutrophils and histiocytes, and proliferation of reticulum cells. Apart from the intestines, the liver showed most remarkable changes. Next raked changes in bone marrows and spleen.

Observations on the Correlation Between Pathogenicity and Serovars of *Yersinia enterocolitica* by the Assay Applying Cell Culture System and Experimental mouse Infection

Tsutomu Maruyame, Tsutomu Une and Hiroshi Zen-Yoji : *Contr. Microbiol. Immunol.*, **5**, 317, 1979

Although the strains of *Yersinia enterocolitica* are at present known to be typed into 34 serovars, almost all the isolates from patients with intestinal illness are known to be typed to particular serovars such as 03, 05B, 08 and 09. From this fact a question should be clarified on whether the strains of all serovars are pathogenic to man, or if particular serovar strains have pathogenicity. Thus, we carried out attempts to solve the question by experimental infections in mice and cultured HeLa cells.

Yersinia enterocolitica 感染症

丸山務：医学のあゆみ，111 (13)，850，1979

「最近の感染症，その変貌と対策」特集の一環として *Y. enterocolitica* の部分を分担執筆した．本菌がヒト感染症の起因菌として注目されるようになってからの歴史は比較的新しいが，これまでに得られた本菌の菌学，病原性，疫学，感染像，臨床症状，診断と治療など我々の調査研究と文献的考察を含めて解説した．

好冷性病原細菌 *Yersinia enterocolitica* の検査法

丸山　務：肉の科学，20 (1)，178，1980

Y. enterocolitica はヒトの胃腸炎の原因となり，これまでにいくつかの大規模な集団発生も報告されている．本菌は *Salmonella* 同様動物からしばしば分離され，特にブタには高率に保菌されていることが明らかにされ，食肉への汚染が十分考えられる．一方，本菌は4℃以下の低温でも増殖する好冷性状が明らかにされ，食品衛生上の新たな問題を提起している．本稿では畜産食品を取り扱う技術者および管理者を対象に，以上の問題点を指摘し，本菌の検査方法について解説した．

人畜共通伝染病と公衆衛生行政

村上　一：モダンメディア，26 (4)，171，1980

現在知られている数多くの人畜共通伝染病がヒト以外の動物に由来することが明らかにされているが，狂犬病以外の疾病に対しては一本化した行政対応はなされていないのが現状である．そのため，個々の疾病についての正確な統計もなく，実態把握も困難である．そこで本稿では，まず公衆衛生の第一線で，人畜共通伝染病の予防，制圧に当たる技術者達が防疫の要点を理解し易いように解説し，次に実態把握の障害になっている行政上の問題点を明らかにして，将来人畜共通伝染病に対応してゆく際に，一体何から手をつけてゆくべきかについて問題提起を行なった．

The Critical Equilibrium Activity (Minimum Humidity for Survival) and Water Loss Kinetics in *Dermatophagoides microceras*

Midori Yoshikawa: Jap. J. Sanit. Zool., **30** (3), 271, 1979

Net water movement between standardized mites and ambient air was measured by weight changes in fasting mites. The ambient vapor activity, a_v, is humidity indicated as R. H. /100. The minimum humidity from which a mite can extract water is expressed as the critical equilibrium activity (CEA). Standardized females of *Dermatophagoides microceras* were exposed to eight activities of 0.50 to 0.85 for 24 hours using glycerol-water mixtures. The weight change for each activity was recorded as the net change in weight in 24 hours, Δw_{24}. Values of Δw_{24} were directly proportional to activities of 0.5 to 0.70 (A). However, in activities from 0.75 to 0.85, values of Δw_{24} were not significantly different, so they were averaged (B). The CEA is calculated by A and B. It is determined to be 0.72. In dry air (a_v 0.00), weight losses were monitored for 48 hours using standardized females. Mites lost water rapidly initially and then more gradually. Transpiration occured from two compartments(two types of water losses: fast and slow compartments). The mean water mass of the fast compartment at time 0 is 1.15μg and it disappears at a rate of 19.76% each hour; thus rate constant equals 0.1976. The mean water mass of the slow compartment at time 0 is 4.09μg and its rate constant is 0.0027.

A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets and humans

T. Arai, N. Ikejima, T. Itoh, S. Sakai, T. Shimada and R. Sakazaki: *J. Hyg.*, 84, 203, 1980

We conducted a survey during the period from 1974 to 1976, to determine the distribution of *Plesiomonas shigelloides* in human faeces, the intestinal contents of cattle, swine, poultry, dogs, cats, fresh water fish, and river water and sludge from

wet riverbeds in the vicinity of Tokyo. Isolation of the organisms was performed by using Salmonella-Shigella (SS) agar and deoxycholate-hydrogensulphide-lactose (DHL)agar plates.

P. shigelloides was isolated from 3 (0.0078%) of 38,454 healthy Tokyoites, 37 (3.8%) of 967 dogs, 40 (10.3%)of 389 cats, 25(10.2%)of 246 fresh water fish, 64 (12.8%) of 497 river water samples, and 2 of 19 (10.5%) sludge samples.

Of 302 strains isolated, from dogs, cats, fresh water fish, river water and healthy carriers, 196 were typed to 50 serovars. Most of the serovars were found to be similar to strains isolated from patients with gastroenteritis due to *P. shigelloides*.

医薬品等の安全性に関する調査研究

薬用化粧品中の生薬の分析法

下平彰男，安田一郎：フレグランスジャーナル，臨時増刊，No.1 (1979)，100，1979

近年，大衆薬（家庭薬）のみならず，加工食品や化粧品にまで生薬ないしその抽出成分を配合したものが増えている．そこで最近の主な生薬分析法の概要を解説紹介し，さらに化粧品中に多く用いられている生薬（甘草，人参，アロエおよび紫根）の薬効，有効成分，分析法および品質管理上の問題点について述べた．

臭化水素の付加反応を利用したエチレンオキサイドの電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィーによる定量法

森謙一郎，西田茂一，原田裕文：衛生化学，26，107，1980

エチレンオキサイド（EO）はガス滅菌剤として広範に使用されているが，FDA によれば発ガン性を疑われており，残留性が問題になっている．残留EO分析法は多種報告されているが，操作性等に問題があるため，より合理的な分析法の確立意図をして検討を行なった．本法では臭化水素酸をn-プロパノールで3Nに調製し，その1m*l*をフロリジル5gに混合，グラスフィルター付カラム管に充てんしたものを反応カラムとして用いた．細切した医療用具，粉末食品試料はエタノールと共にフラスコに入れ窒素バブリング法によってEOを追い出し，又大気試料はそのままこの反応カラムに導いた．EOは反応カラム中でエチレンブロムヒドリン（EBH)に変換され，保持される．次にこれをエーテル100m*l*で溶出し，濃縮してECD-GCに供した．EOをEBHに変換することにより，ガスモレ等による損出がなく，又特異反応を利用するため妨害物の影響を受けにくく，簡便に操作できた．又EO標準物質として0.1%EO/N_2 ガスボンベを用い，安定性，操作性の向上をはかった．

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中のエストラジオール，エチニルエストラジオールの分離定量法

鎌田国広，山添律子，原田裕文：衛生化学，26 (1)，41，1980

化粧品，医薬部外品に使用されるホルモンは薬事法によって，その種類および使用量に規定が設けられているが，これらのホルモンの分析法に関する報告はあまりなされていない．そこで今回，著者らは高速液体クロマトグラフィー（HSLC）を用いて化粧品中のエストラジオール（ED），エチニルエストラジオール（EED）の分離定量法の確立を意図して種々検討をおこなった結果，防腐剤など製品中に含まれる他成分の妨害なしに再現性よく微量のED, EEDを分析することができた．その概要は，試料をジクロルメタンで抽出し，抽出液を濃縮後，シリカゲルカラムを用いてクリーンアップ操作をおこなう．基剤などを除去するために，1,2-ジクロルエタンでカラムを洗浄後，酢酸エチルで溶出をおこない，HSLC 試験溶液とした．HSLC の測定条件はつぎのとおりである．

カラム：Zorbax SIL，移動相：10% テトラヒドロフラン・ヘキサン，流速：0.75m*l*/min，温度：室温，検出器：ケイ光検出器（Exλ=286nm，Emλ=307nm）

ED，EED の検出限界はそれぞれ0.005μg であり，検量線は1～10μg/m*l* の範囲で直線関係を示した．本法を用いて ED，EED の添加回収実験をおこなった結果ED 92.0～96.0%，EED は92.6～96.4% はの回収率であった．

食品等の安全性に関する調査研究

Inhibitory Effects of Spices on Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi

Hiroshi Hitokoto, Satoshi Morozumi, Tomoaki Wauke, Senzo Sakai, and Hiroshi Kurata: Applied and Environmental Microbiology, **39** (4), 818, 1980

The inhibitory effects of 29 commercial powdered spices on the growth and toxin production of three species of toxigenic *Aspergillus* were observed by introducing these materials into culture media for

mycotoxin production. Of the 29 samples, cloves, star anise seeds, and alllspice completely inhibited the fungal growth, whereas most of the others inhibited only the toxin production. Eugenole extracted from cloves and thymol from thyme caused complete inhibition of the growth of both *Aspergillus flavus* and *Aspergillus versicolor* at 0.4mg/m*l* or less. At a concentration of 2mg/m*l*, anethol extracted from star anise seeds inhibited the growth of all the strains.

カビ毒産生菌の生態

一言　広：公衆衛生，44（7），485，1980

代表的マイコトキシン産生菌種とその産生毒素を紹介し，それらの毒素産生カビの国内および諸外国における土壌，水，空気などの自然界における分布と各種の農産物における汚染実態から，毒素産生菌種の間に地域的分布の相違が見られることを示した．また，毒素産生カビの生態として，圃場における農産物への侵入機構とその防除対策について，さらに，各種食品における汚染時の菌の動態について解説した．

農産物中の残留臭化メチル分析法

上村　尚，西島基弘，永山敏広，安田和男，斎藤和夫井部明広，中山博文，直井家寿太：食衛誌，20（4），257，1979

臭化メチルは，一般にコクゾウムシ，アズキゾウムシおよびコクヌストなどの貯穀害虫やセンチュウ，ケラ，ネキリムシおよびネズミ，モグラなどの駆除に効果があり，くん蒸剤として各国で広く用いられている．我が国においては，農薬の取り扱いの中で果実類，穀類，種実類，たばこおよび土壌などの病害虫除去を目的として広く使用されている．

そこで我々は，果実や穀類などに使用されている臭化メチルの分析法を検討した．

試料50gをホモジナイザー用カップに秤取し，3°以下に冷却したエタノール40m*l*を加えた後，冷却槽にアセトンを入れ，さらにドライアイスを投入して冷却しながら，5分間撹拌混和したものを200m*l*の二口フラスコに冷却水（3°以下）を用いて移し，捕集装置に装着した．捕集管をアセトンドライアイス中に浸し，−70°以下に保持し，試料浴槽温度50°空気流量80m*l*/minの条件で120分間通気を行い，臭化メチルを捕集した後，エタノールを用いて一定量とし，20%Ucon oil 50LB550Xを用いてガスクロマトグラフィーを行った．

本法の回収率は89%以上であり，確認限度は0.05ppmであった．試料の固有成分による妨害を考え，検討を行ったが，いずれも影響はみられなかった．

本法を用いて，果実類についてチェリー4検体，プラム2検体およびチェリー缶詰15検体，穀類については，玄米6検体，小麦2検体，種実類については，栗18検体について実態調査を行ったが，いずれからも臭化メチルは検出されなかった．

食品中のマイコトキシンに関する研究（第12報）食品加工時におけるトリコテセン系マイコトキシンの分解

上村　尚，西島基弘，斎藤和夫，安田和男，井部明広永山敏広，牛山博文，直井家寿太：食衛誌，20（5），352，1979

最近，我が国産麦からFusarium属菌産生マイコトキシンのうち，deoxynivalenolおよびnivalenolの自然汚染例が報告され，その汚染実態の一部が明らかになり注目されている．

そこで，我々は穀類および小麦粉などの食品原料がトリコテセン系マイコトキシンに汚染された場合を想定して，小麦粉にトキシンを添加して食品を作製し，調理加工した場合の熱によるトキシンの分解の有無，また食品添加物などの影響について検討した．

小麦粉にトキシンを添加して，パン，うどんおよび即席めんを作製して残存率を調査したところ，パンは50%程度，うどんは60%程度が残存することが判明した．また即席めんはdeoxynivalenolおよびnivalenolがいずれも30%程度残存したが，fusarenon-xおよびT-2タイプのトキシンは検出されず調理加工形態により非常に異なることが判明した．トキシンが減少する要因として熱が関与していることが考えられる．そこで調理時に繁用されている温度を選び，トキシンを加熱したところ，加熱温度が高くなるに従い，トキシンの分解は高まるが，調理の際に通常用いられている温度および時間では，その一部が残存することが判明した．また，比較的調理温度の低いうどんでも残存率が予想以上に少なかった原因は，トキシンが煮汁中に移行しているためであることが分った．即席めん中のトキシンの減少は製造する際に添加したかんすいが関与していることが判明した．

食品中のマイコトキシンに関する研究（第13報）Aflatoxin の製あん原料豆汚染実態調査ならびに製あん時の挙動

斎藤和夫，西島基弘，安田和男，上村　尚，井部明広永山敏広，牛山博文，直井家寿太：食衛誌，20(5)，358，1979

前報において著者らは種実類，豆類および穀類などのaflatoxin汚染実態調査を行い，ピーナッツ，ピーナッツ製品の他にアーモンド，ピスタチオおよび数種類の製あん原料豆から aflatoxin B_1, B_2 を検出したので，その結果を報告した．

今回，著者らは製あん原料豆についての汚染実態調査を引き続き行うとともに aflatoxin の熱による安定性および製造工程中での減少率などの調査を行った．

製あん原料豆610検体について aflatoxin 汚染実態調査を行った結果，バター豆，サルタニ・サルタピア豆および赤豆など11検体から aflatoxin B_1 1.3～26.9ppb, B_2 0.4～6.9ppb の範囲で検出した．

これらは生あん中に残存するか否かが問題であるため，食品衛生法の生あん製造基準に従って製造したところ，生あんには12～18%が残存することがわかった．

また，生あんの残存率および排水への移行率の総和から aflatoxin が製造工程中で分解などを生ずる要因が考えられたため，調理時の熱による分解を検討したところ沸騰水中で比較的分解しやすいことが判明した．

汚染豆で製あんした場合，その13～15%が残存することから，今後可能な限り原料豆の段階で aflatoxin 汚染のチェックを行う必要があると考える．

乳製品のアフラトキシン汚染について

斎藤和夫，西島基弘，安田和男，上村　尚，井部明広，永山敏広，牛山博文，直井家寿太：東京都衛生局学会誌 63, 106, 1979

アフラトキシン類，特にアフラトキシン B_1（以下Af. B_1）は天然界に存在する化学物質の内で最も強い発がん性を有すると言われ，各国で穀類，豆類等の汚染実態が明らかになるにつれて，その対策に苦慮している．Af. B_1 等に汚染された農産物は家畜に配合飼料として与えられる可能性があるが H. de IONGH らにより Af. B_1 は肝臓で Af. B_1 とほぼ同程度の強い毒性を有するアフラトキシン M_1（以下 Af. M_1）に変換し，乳および尿中から分泌されることが報告された．そこで我々は乳製品中のアフラトキシン汚染状況を把握する必要を生じたため，乳製品中の試験法を確立するとともに，市販乳製品について汚染実態調査を行った．

昭和50年1月から54年8月までの間に東京都内で市販されていた調製粉乳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，プロセスチーズ45検体およびナチュラルチーズ249検体等製品492検体について調査を行った結果，調製粉乳，脱脂粉乳，コンデンスミルクおよび生クリームからはいずれもアフラトキシン類は検出されなかった．しかし，輸入ナチュラルチーズからは5種類8銘柄から Af. M_1 を検出した．これらについて追跡調査を行った結果，同一製造年月日のものはもちろん，年間を通し全て汚染されたものもあることが明らかとなった．

食用油脂中の *tert*-Butylhydroguinone, BHA および BHT の同時分析法

中里光男，冠　政光，有賀孝成，藤沼賢司，直井家寿太：食品衛生学雑誌，21 (1)，64，1980

tert-Butylhydroguinone（TBHQ）は不飽和度の高い油脂に用いた場合，その酸化防止効果は既存の酸化防止剤に比べ顕著であることが知られている．さらに，他の酸化防止剤と併用した場合の相乗効果も期待できることから，1972年以来，アメリカ，オーストラリア，マレーシヤ，ペルー，ブラジル等で許可されている．

我が国においては TBHQ は食品添加物として認められていないが，近年食用油脂の輸入増加に伴い，許可国からの輸入食品中に混入している可能性があることから，TBHQ の分析法を確立する必要があると考えた．しかし諸外国では BHA あるいは BHT との混合製剤として用いられる機会も多いことから，TBHQ，BHA および BHT の3種の酸化防止剤の同時分析法について検討した．

3種の酸化防止剤の油脂からの抽出は試料5gに対し，n-ペンタン 20m*l*，アセトニトリル 100m*l* 3回の抽出でいずれも95～99%と平均した良好な抽出率が得られた．

定性はシリカゲルプレートを用い，n-ヘキサン・酢酸（30：8）を用いて分離後，発色試薬として2,6-ジクロルキノン-4-クロルイミドおよびリンモリブデン酸を用いることにより，TBHQ，BHA および BHT を同時に確認できた．またジメチルアミンを用いることにより，TBHQ のみを特異的に確認することができた．

定量は GLC について検討したところ，SE-30の場合はカラム温度 150°，OV-17 の場合は 170° の条件で，TBHQ，BHA および BHT の相互分離が最もよく，かつ再現性も良好であった．また本法を各種油脂に適用したところ3回収率は87～99%であり良好な結果が得られた．

N-ニトロソ化合物の衛生学的研究（第4報）ビール中のニトロソアミンとその成因について

真木俊夫，田村行弘，嶋村保洋，小関正道，西垣　進，直井家寿太：食衛誌，21 (3)，184，1980

市販ビールの N-ニトロソアミンの調査を行い，ジメ

チルニトロソアミン(DMNA)を検出したことから，ビール製造工程を追って成因の究明を行った．DMNAが検出されない生の大麦を発芽させ，電気乾燥および都市ガス焙燥を行ったところ，都市ガスで処理した麦芽に最高13.8ppbのDMNAが生成することが判った．糖化，ホップの添加，主醗酵，熟成等製造工程の各段階においては，生成増加のないことから，ビール中に存在したDMNAは焙燥を行った乾燥麦芽が原因であると結論した．

農産物および加工食品中の残留臭素に関する研究（第1報）農産物中の総臭素分析法

上村　尚，西島基弘，永山敏広，安田和男，斎藤和夫井部明広，牛山博文，直井家寿太：食衛誌，21（3），214，1980

臭化メチルはくん蒸剤として，穀類，種実類および果実類など広範囲の農産物に使用されている．

くん蒸後の臭化メチルの残留量は総臭素として定量される場合が多く，分析法はWHOが提唱した方法が一般的に用いられている．しかしこの方法は，多量の試薬を必要とし，かつ試薬調製の操作が繁雑である．また，ヨウ素滴定法であるため終点が不明瞭であり，10ppm以下を定量するには熟練を必要とする．

そこで我々は，臭素がフルオレセインと反応して赤桃色のテトラブロモフルオレセインを生成することを利用し，フルオレセインをポリアミドに吸着させたものを充てん剤とし，検知管による定量法を作製した．

試料を灰化後，臭素発生装置に移し検知管を装着した．試料浴槽温度50°，通気量80m*l*/minで3時間通気し，検知管中に出現した赤桃色の呈色層の長さより定量を行った．

本法の回収率は95～102%であり，確認限度は1ppmであった．試料の固有成分による妨害，また，ヨウ素，塩素による妨害を考え検討を行ったが，いずれも影響はみられなかった．

本法を用いて，市販の玄米，精白米，小麦，小麦粉，栗，チェリー（日本産およびアメリカ産）について調査を行ったところ，臭素は玄米3検体中より1検体，精白米は17検体中11検体，小麦粉は3検体中3検体，栗は10検体中7検体，アメリカ産チェリー4検体中4検体から検出された．特に，栗の総臭素量は平均94ppmであったが，うち1検体に215ppmと高濃度に検出されたものがあった．

Determination Method for Residual 2, 4-Dichloro-1- and 1, 3, 5-Trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (NIP and CNP) in Fish and Shellfish

T. Yamagishi, K. Akiyama, M. Morita, R. Takahashi, T. Miyazaki and S. Kaneko : *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 23, 57, 1979

The purpose of the study was to establish the method for determining 2, 4-dichloro-1-and 1, 3, 5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (NIP and CNP) in fish and shellfish. The results were obtained that NIP and CNP residues in aqutic fauna could be measured by electron cature gas chromatography on 2% OV-1 and 2% OV-17 columns, after clean-up by the procedures of saponification of NIP and CNP from fat, DDTs and PCBs. Recoveries and standard errors of NIP CNP determined by this method were 93.2±3.3% and 97.3±2.3%, respectively. Also, sensitivities of the method were 0.3 and 0.5mg for NIP and CNP, respectively, based on a 10g sample.

Identification of *trans*-Nonachlor in Goby-Fish from Tokyo Bay

Tomoyuki Miyazaki, Kazuyuki Akiyama, Seiji Kaneko, Shozo Horii, and Tatsunori Yamagishi: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 23, 631, 1979

Trans-Nonachlor which is one component of technical chlordane and technical heptachlor was identified in goby-fish collected at the seashore of Keihinjima along Tokyo Bay, on August 25, 1978. This compound was extracted with hexane from the goby-fish. After cleanup through partition between hexane and acetonitril, treatment with conc. sulfuric acid, and Florisil column chromatography, the compound as well as PCBs was eluted in the first hexane fraction. Further purification by thin-layer chromatography on polyamide (methanol), *trans*-nonachlor was confirmed by gas chromatography-mass spectrometry.

Identification of Chlordanes and Related Compounds in Goby-fish from Tokyo Bay

Tomoyuki Miyazaki, Kazuyuki Akiyama, Seiji Kaneko, Shozo Horii, and Tatsunori Yamagishi : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, 1, 1980

Trans-and *cis*-Chlordane, *cis*-nonachlor, components of technical chlordane, and oxychlordane, a metabolite of them, were identified by gas chromatography-mass spectrometry, after purification by thin-layer chroma-

tography on polyamide (methanol) and silica gel (hexane). The sample were the same as being treated for identification of *trans*-nonachlor in the previous work (MIYAZAKI et al.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 631, 1979). The occurrence of these compounds in goby-fish is indicative of pollution with technical chlordane. In Japan, chlordane (annual consumption, 500 tons) have been used for wood protection from termites and powder post beetles.

食品中の天然色素の分析法（第1報）
ポリアミドバッチ法による水溶性天然色素の分析

荻原　勉，野沢竹志，平田恵子，天川映子，大石充男，関　博麿：食衛誌，21 (3)，207，1980

水溶性天然色素11種の迅速簡易分析法を検討した．試料溶液を1 N酢酸および1％アンモニア水でpH 4～5に調整し色素をポリアミドに吸着させたのち，0.05％塩酸メタノール混液で溶出し，薄層クロマトグラフィーと吸収スペクトルにより確認した．しかしリボフラビンの場合，ポリアミドに吸着しないためカオリンを用いた．次に共存物質の影響を調べたところ，サフラワーエロー，ベタニン，モナスカス色素およびリボフラビンは有機酸により，クロシンブルー，ベタニンおよびリボフラビンはショ糖により吸着が減少した．本法を市販のあめ，清涼飲料水などに応用し良好な結果を得た．

飼料添加物の抗菌性について

松本昌雄，神崎政子，春田三佐夫：食衛誌，21 (3)，224，1980

抗生物質検定用標準株7株（*B. stearothermophilus* var. *B. calidolactis* c-953, *B. subtilis* ATCC6633, *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Stap. aureus* ATCC 6538p, *E. coli* NIHJ およびテトラサイクリン耐性の同菌変異株）を対象に抗菌性飼料添加物30種類（BC, OTC, CTC, ER, OM, KM等の抗生物質17種並びに Sulfaquinoxaline, Carbadox, Furazolidone等の合成抗菌剤13種）の抗菌パターンを調べたところ，Zolene, Clopidole, Amprolium, Ethopabate, Decoquinate およびカプリロヒドロキサム酸以外のものは，いずれ特徴ある抗菌パターンを示した．

生活環境保全に関する調査研究

地盤凝固剤による地下水の汚染調査

樋口育子，坂本朋子，中川順一，三村秀一，石井　求，中山敏雄：東京都総務局プロジェクト研究報告，19，1979

昭和49年，福岡県新宮町で，アクリルアミド系地盤凝固剤が直接井戸水に混入し，その水を飲料に供した者が神経系中毒にかかる事故が発生し，薬液注入工法の安全性が社会的問題として提起された．水ガラス系地盤凝固剤は現在土木工事のシールド工法の補助工法として広く採用されているが，この工法の場合，薬液によって固化した土壌と地下水が接触して，凝固剤の溶出あるいは，未反応の薬液が地下水に混入することが充分考えられる．今回，東京都の下水道局，建設局が実施している現場三ケ所を選び，水ガラス系薬液を用いた場合の周辺地下水の汚染状況を把握する為，定期的な調査を行った．調査項目は，外観，pH，R. pH，過マンガン酸カリウム消費量，塩素イオン，総硬度，ナトリウム，二酸化ケイ素，総アルカリ度の9項目について実施し，その結果，下水道局の観測井においては，明らかに薬液注入の影響と思われるpH，ナトリウム，ケイ酸の増加が認められた．一方，建設局の薬注工事で30本の観測井について，51年7月から54年3月まで調査した結果，水ガラス系薬液の影響は認められなかった．本報告は，地盤凝固剤に関する調査研究の総括報告である．

The Protective Potency of Marine Animal Meat Against the Neurotoxity of Methylmercury: Its Relationship with the Organ Distribution of Mercury and Selenium in the Rat

G. Ohi, S. Nishigaki, H. Seki, Y. Tamura, T. Maki, K. Minowa, Y. Shimamura, I. Mizoguchi, Y. Inaba, Y. Takizawa and Y. Kawanishi: Food and Cosmetics Toxicology, 18 (2), 139, 1980

The meats of two marine animals, that were known to contain high levels of both methylmercury and selenium, were compared with respect to their protective potencies against the neurotoxicity of methylmercury. The organ distributions of selenium and mercury in rats given diets containing these meats was also compared. Weanling rats were fed for 12 wk on a diet containing 17.5 ppm methylmercuric chloride and one of two levels of selenium (0.3 or 0.6ppm) originating from the meat of sebastes (*Sebastes iracundus*) or of the sperm whale (*Physeter catodon*), or from sodium selenite. The protection conferred by sebastes meat was roughly equal to that of the selenite regarding growth rate but was considerably greater with respect to the neurological signs. By both

criteria, spermwhale meat was less effective than sebastes meat and selenite in providing protection. The organ distribution pattern of selenium and mercury showed that selenium in the blood, brain and spinal cord was positively correlated with neurological protection, while total mercury and methylmercury in those organs were negatively correlated with neurological protection. The level of protection (delay of the neurological manifestations by nearly 7 wk) corresponding with the increase in selenium levels in the nervous system (from about 1/50 to 1/10 of the methylmercury levels on a molar basis) indicated that the protective mechanism was not simply direct conjugation of selenium with methylmercury. It has previously been noted that tuna fish containing high levels of selenium provide protection against methylmercury toxicity and it may be that all marine animals rich in both selenium and methylmercury afford this protection.

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1979. 7—1980. 6)

Igarashi, H., Morita, T., and Iwanaga, S.: **Purification of staphylocoagulase by a bovine prothrombin-Sepharose 4B column and its physicochemical properties**

VIIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis. (1979. 7)

Makoto Ohashi: **Laboratory aspects on the cause of the cholera outbreak in Japan originating from a public wedding hall, in 1978**

The 15th Joint Conference, the United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1979. 7, Bethesda, U. S. A.)

Yasuo Kudoh, Shigeru Matsushita, Sumio Yamada, Masaaki Tsuno, Kenji Ohta, Akemi Kai, Senzo Sakai and Makoto Ohashi: **Travellers' diarrhea and enterotoxigenic *Escherichia coli*-a survey in 1977–1979 in Tokyo**

The 15th Joint Conference, the United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1979. 7, Bethesda, U. S. A.)

長谷川紀子，近藤　勇，保科定頼，黒坂公生，五十嵐英夫：**S. aureus BB 株の Coagulase 欠損株の毒力と感染防御効果について**

第41回日本細菌学会関東支部総会（1979. 7）

大橋　誠：**最近のコレラ情勢とコレラ菌検査体制のあり方**

第41回日本細菌学会関東支部総会（1979. 7）

坂井千三，伊藤　武，斎藤香彦，稲葉美佐子，大橋誠，阪口玄二，高橋政寿，山本一郎：**腸炎起病性ウェルシュ菌の腸管内におけるエンテロトキシン産生と病理学的考察**

第41回日本細菌学会関東支部総会（1979. 7）

Hiroshi Ushioda: **Serological coagulase typing of *Staphylococcus aureus* and its application in routine work**

IV International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (Warszawa) (1979. 10)

板橋雄二，円城寺政子，岡　愛子，黒沢淑郎，鈴木秀和，千種操子，馬場武男，菱沼　勉，松本公輝，伊藤武，斎藤香彦，丸山　務，坂井千三，大橋　誠：***Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* 感染による集団下痢症について**

第63回東京都衛生局学会（1979. 10）

Makoto Ohashi: **Epidemiological surveillance of diarrheal diseases; concept and practice**

The 7th SEAMIC Seminar "Strategies for Implementing Primary Healfh Care Activities with Special Reference to the Control of Diarrheal Diseases" (1979. 11, Bangkok, Thailand)

Makoto Ohashi: **Contribution of SEAMIC (South East Asia Medical Information Center) on diarrheal disease control through primary health care-**

The 7th SEAMIC Seminar "Strategies for Implementing Primary Health Care Activities with Special Reference to the Control of Diarrheal Diseases" (1979. 11, Bangkok, Thailand)

Yasuo Kudoh: **Role of laboratory services in diarrheal disease control; application of appropriate technology**

The 7th SEAMIC Seminer "Strategies for Implementing Primary Health Care Activities with Special Reference to the Control of Diarrheal Diseases" (1979. 11, Bangkok, Thailand)

坂井千三，斎藤香彦，伊藤　武，稲葉美佐子，丸山　務：**食品中のサルモネラの増殖態度**

第38回日本食品衛生学会学術講演会（1979. 11）

寺山　武，新垣正夫，五十嵐英夫，潮田　弘，高橋正樹，坂井千三，山田　備，美藤克幸，茂木利夫，山口安夫：**生牛乳からの黄色ブドウ球菌の分離と分離株のエンテロトキシン産生性の検討**

日本食品衛生学会第38回学術講演会（1979. 11）

五十嵐英夫，高橋正樹，森田隆司，岩永貞：**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とその性状**

昭和54年度ブドウ球菌研究会（1979. 11）

五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，潮田　弘，寺山

武：**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**
昭和54年度ブドウ球菌研究会（1979. 11）

五十嵐英夫，高橋正樹，森田隆司，岩永貞昭，加藤正弘：**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法の自動化について**
第23回液体クロマトグラフ研究会（1980. 2）

景森令克，竹重都子，渡辺賢哉，山口武一，足達卓治中井　薫，丸山　務，斎藤香彦，坂井千三：**家畜における *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* の保菌とその分離株の性状に関する研究．1. ブタ腸内容物からの本菌の分離成績**
第89回日本獣医学会（1980. 3）

中沢宗生，上田　久，丸山　務：**子ウシ由来大腸菌の血清型および毒素原性**
第89回日本獣医学会（1980. 3）

諸角　聖，一言　広，和宇慶朝昭，坂井千三：**毒素産生カビの増殖および毒素産生に及ぼす香辛料の阻害作用について**
日本食品衛生学会第38回学術講演会（1979. 11）

大橋　誠：**毒素原性大腸菌による下痢症**
第28回日本感染症学会東日本地方会総会（1979. 11）

市瀬正之，天野祐次，小野川　尊，平石　浩，寺山武：**1978年に都内健康者から分離された Salmonella と他の Enterobacteriaceae の抗生剤感受性と R plasmid について**
第28回日本感染症学会東日本地方会総会（1979. 11）

深見トシエ，柏真知子，斎藤　誠，丸山　務，斎藤香彦：**下痢患者からの *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* の検出について**
第28回日本感染症学会東日本地方会総会（1979. 11）

斎藤香彦，伊藤　武，丸山　務，坂井千三，大橋　誠：***Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* による下痢症の二つの集団発生例**
第28回日本感染症学会東日本地方会総会（1979. 11）

大橋　誠：**エンテロトキシン—座長のことば—**
第53回日本細菌学会総会（1980. 4）

工藤泰雄：**毒素原性大腸菌下痢症—特に東京都における下痢症の調査成績を中心にして—**
第53回日本細菌学会総会（1980. 4）

工藤泰雄，松下　秀，山田澄夫，津野正朗，太田建爾丸山　務，坂井千三，大橋　誠：**NAG ビブリオ（O-1以外の V. cholerae）のエンテロトキシン産生性**
第53回日本細菌学会総会（1980. 4）

潮田　弘，寺山　武，高橋正樹，五十嵐英夫，新垣正夫，津野正朗，工藤泰雄，坂井千三，大橋　誠：**エルトール型コレラ菌検査における Kappa 型ファージの検出の有用性とその応用限界**
第53回日本細菌学会総会（1980. 4）

坂井千三，斎藤香彦，丸山　務，伊藤　武，大橋　誠：***Campylobacter* 腸炎の6集団発生事例と原因菌についての細菌学的検討**
第53回日本細菌学会総会（1980. 4）

五十嵐英夫，高橋正樹，森田隆司，岩永貞昭：**発色性合成基質を用いたエンドポイント法によるブドウ球菌コアグラーゼの定量法の検討**
第53回日本細菌学会総会（1980. 4）

五十嵐英夫，高橋正樹，新垣正夫，潮田　弘，寺山武：**ブドウ球菌コアグラーゼの免疫学的特異性の検討**
第53回日本細菌学会総会（1980. 4）

深見トシエ，柏　真知子，岩瀬世津子，久鍋美晴，鴻巣晶子，右田琢生，吉松　彰，村田三紗子，今川八束，斎藤　誠，丸山　務，斎藤香彦，坂井千三：**下痢患者からの *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* の分離状況について**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

稲葉美佐子，伊藤　武，斎藤香彦，坂井千三，山崎悦子，早矢仕治邦，矢島太郎：**散発下痢患者ふん便からのウェルシュ菌およびエンテロトキシンの検出**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

工藤泰雄，太田建爾，津野正朗，松下　秀，山田澄夫坂井千三，大橋　誠：**各種由来 NAG ビブリオ（O-1以**

外の V. cholerae）の血清型・生物学的性状と毒素産生性
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

諸角　聖，一言　広，和宇慶朝昭，坂井千三，小原哲二郎：**コーヒー豆成分中の抗カビ物質について―カフェインおよびクロロゲン酸の作用機作―**
日本食品衛生学会第39回学術講演会（1980. 5）

鵜野尚道，永田芳積，菅原通夫，桑田辰男，一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，坂井千三：**本邦食品の糸状菌汚染に関する研究　都内の市販食品における最近3年間の調査成績**
日本食品衛生学会第39回学術講演会（1980. 5）

潮田　弘，五十嵐英夫，高橋正樹，新垣正夫，寺山武，坂井千三，五島瑳智子，深見トシエ，宮崎　繁，田中実，後藤甚作，青木義雄，加藤俊子：**Staphylococcus epidermidis 感染症に関する研究　第1報　各種臨床材料および健康人由来株の生化学的性状，生物型ならびに薬剤感受性について**
第64回東京都衛生局学会（1980. 5）

飯倉憲子，美馬道夫，山本一哉，潮田　弘：**1979年の膿皮症と原因ブ菌の性状について**
第4回日本小児皮膚科学会（1980. 6）

実川久美子，三並順子，肥田野　信，潮田　弘：**SSSSの30例**
第4回日本小児皮膚科学会（1980. 6）

大久保暢夫，柴田　実，浅香治美，飯塚純子：**トレポネーマに対する陽性石けんの殺菌効果**
第14回 STD 研究会（1979. 8）

村田以和夫，川中正憲，鈴木了司：**鳥類住血吸虫のセルカリアによる水田皮膚炎の間接螢光抗体法（ＩＦＡ法）を応用した診断法**
第28回日本農村医学会総会（1979. 10）

村田以和夫，加藤桂子，斉藤玲子：**東京多摩地区で発生した水田皮膚炎の疫学および免疫血清学的調査**
第49回日本寄生虫学会総会（1980. 4）

大久保暢夫，石上　武，坂井富士子，大橋　誠ほか：**都民の Legionnaire's Disease 抗体価保有状況と本病が疑われた1症例について**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

浅香治美，柏木義勝，柴田　実，大久保暢夫：**1978～79年分離のA群溶血性レンサ球菌の薬剤感受性と菌型について**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

矢野一好，林　志直，柴田タツ美，藪内　清，岩崎謙二：**ポリオウイルスのオゾンガス吹込による不活化実験**
第27回日本ウイルス学会（1979. 10）

坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：**東京都における1978年4月～79年4月のインフルエンザ検索成績**
第27回日本ウイルス学会（1979. 10）

岩崎謙二，吉田靖子，関根整治：**回帰分析法を応用した東京都民におけるムンプス HI 抗体保有状況の解析**
第27回日本ウイルス学会（1979. 11）

梶岡実雄，田口文章，長木大三，岩崎謙二，藪内　清，矢野一好，吉田靖子，加地正郎，柏木征三郎，新宮世三，林田一夫，出口雅経，三吉野産治：**BK パポーバウイルス感染の血清疫学的調査**
第27回日本ウイルス学会（1979. 11）

矢野一好，林　志直，柴田タツ美，藪内　清，岩崎謙二：**塩素添加によるプール水中のウイルス不活化実験**
第28回日本感染症学会東日本地方会（1979. 11）

吉田靖子，関根整治，岩崎謙二：**1968年～1978年における東京都民の日脳ウイルス抗体保有調査**
第28回日本感染症学会東日本地方会（1979. 11）

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：**塩素添加によるプール水中のポリオウイルス不活化実験**
第63回東京都衛生局学会（1979. 11）

坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：**近年における都内飼育ブタのインフルエンザウイルス HI 抗体保有状況**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

岩崎謙二，坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清：**A/H_1 インフルエンザウイルス株の数理論的HA抗原構造解析**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

吉田靖子，関根整治，岩崎謙二：**最近の東京都民日脳抗体保有状況の解析**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

林　志直，矢野一好，柴田タツ美，藪内　清，吉田靖子，関根整治，岩崎謙二，浦野純子，河野弘子，渡辺悌吉：**東京都内の急性呼吸器感染症患児および下水からのウイルス検索（1979年）**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

大久保暢夫，石上　武，坂井冨士子，大橋　誠，加藤貞治，黒木達郎，斎藤　誠，衣笠恵士，村田三紗子，木村　仁，福島保喜：**都民の Legionnaire's disease 抗体保有状況と本病が疑われた一症例について**
第54回日本感染症学会総会（1980. 5）

安田一郎，佐々木一郎，竹谷孝一，糸川秀治：**国内産および韓国産山椒の品質について**
日本生薬学会第26回年会（東京）（1979. 11）

上原真一，宇佐美博幸，下平彰男：**Limulus test の食品への応用（健康食品中のエンドトキシン）**
日本薬学会第100年会（1980. 4）

安田一郎，下平彰男，竹谷孝一，糸川秀治：**細辛の辛味成分について**
日本薬学会第100年会（1980. 4）

橋爪直規，田中豊隆，村田光明，塩見久章，高島利幸梅木富士郎：**東京都で保護収容された犬のレプトスピラ抗体保有状況**
第63回東京都衛生局学会（1979. 11）

橋爪直規，田中豊隆，塩見久章，村田光明，高島利幸梅木富士郎，村上　一：**東京都で保護，収容された犬のレプトスピラ抗体保有状況**
昭和54年度日本獣医公衆衛生学会（東京）（1980. 2）

影井　昇，林　滋生，加藤桂子，梅木富士郎：**Aminosidine の抗条虫作用とその作用機序に関する研究**
第49回日本寄生虫学会（1980. 4）

神保勝彦，松本昌雄：**食品由来 *B. cereus* の生化学的性状型別**
第38回食品衛生学会（1979. 11）

岡崎留美，茂木利夫，美藤克幸，山田　満，山口安夫神保勝彦，小久保弥太郎，村上　一：**粉乳および生クリームの *B. cereus* 汚染状況について**
第64回東京都衛生局学会（1980. 5）

小杉智彦，龍田桂吉，太田嘉二，塩見久章，高島利幸小久保弥太郎，村上　一：**東京都内で保護収容されたイヌからのサルモネラ検出状況と分離菌株の薬剤感受性について**
昭和54年度日本獣医公衆衛生学会（1980. 2）

山岸達典，宮崎奉之，秋山和幸，堀井昭三，金子誠二高橋利恵子：**東京湾産魚介類からの chlordanes および近縁化合物並びに CNP の分離同定**
第14回有機化合物のマススペクトロメトリー討論会（1979. 11）

宮崎奉之，秋山和幸，堀井昭三，金子誠二，山岸達典森田昌敏：**有機ハロゲン化合物の Negative CI-MS**
日本農芸化学会，昭和55年度大会（1980. 4）

斉藤和夫，西島基弘，安田和男，上村　尚，井部明広永山敏広，牛山博文，直井家寿太：**乳製品のアフラトキシン汚染について**
第63回東京都衛生局学会（1979. 11）

斉藤和夫，西島基弘，安田和男，上村　尚，井部明広永山敏広，牛山博文，直井家寿太：**食品中のマイコトキシンに関する研究-XIX　種実類中のアフラトキシンおよびその関連化合物**
第39回日本食品衛生学会（1980. 5）

小川仁志，鈴木二郎，落合節子，西島基弘，直井家寿太：**食品中のマイコトキシンに関する研究-XXII 果汁中におけるパツリンの安定性**
第39回日本食品衛生学会（1980. 5）

上村　尚，西島基弘，永山敏広，安田和男，斎藤和夫井部明広，牛山博文，直井家寿太：**臭化メチルくん蒸後の残留形態**
第38回日本食品衛生学会（1979. 11）

上村　尚，西島基弘，安田和男，斎藤和夫，井部明広，永山敏広，牛山博文，直井家寿太：**食品中のマイコトキシンに関する研究（XXI）Fusarium 属菌産生マイコトキシンの同時分析法**
第39回日本食品衛生学会（1980. 5）

安田和男，西島基弘，斎藤和夫，上村　尚，井部明広，永山敏広，牛山博文，直井家寿太：**いわゆる健康食品の衛生学的調査**
第38回日本食品衛生学会（1979. 11）

安田和男，西島基弘，斎藤和夫，上村　尚，井部明広，永山敏広，牛山博文，直井家寿太，田中孝治，吉沢政夫：**チョウセンアサガオ属のアルカロイドに関する研究　時期的変化および調理による消長**
第39回日本食品衛生学会（1980. 5）

有賀孝成，冠　政光，中里光男，藤沼賢司，直井家寿太，五十嵐英夫，潮田　弘，新垣正夫，高橋正樹，坂井千三：**生あん中のシアンに関する研究　細菌によるシアン配糖体からのシアン化水素の生成**
第38回日本食品衛生学会（1979. 11）

有賀孝成，冠　政光，中沢久美子，中里光男，藤沼賢司，直井家寿太：**生あん中のシアンに関する研究（第2報）製造工程におけるシアン化合物含有量の推移**
第39回日本食品衛生学会（1980. 5）

中里光男，冠　政光，中沢久美子，有賀孝成，藤沼賢司，西島基弘，直井家寿太：**食品中のマイコトキシンに関する研究-XX 穀類中のシトリニン分析法**
第39回日本食品衛生学会（1980. 5）

藤沼賢司，冠　政光，中沢久美子，中里光男，有賀孝成，直井家寿太：**チリパウダーおよびパプリカ中の Ethoxyquin について**
第39回日本食品衛生学会（1980. 5）

真木俊夫，田村行弘，嶋村保洋，小関正道，直井家寿太：**N-ニトロソ化合物に関する衛生学的研究（第2報）食用油脂類中のニトロソアミン含有量について**
第39回日本食品衛生学会（1980. 5）

溝入　茂，中嶋　厳，広門雅子，中島和雄，遠藤英美：**レーザーを用いた高速液体クロマトグラフィーによる施光性物質の検出法**
日本農芸化学会昭和55年度大会（1980. 4）

中嶋　厳，広門雅子，中島和雄，溝入　茂，遠藤英美：**天然甘味料製剤中のステビオサイド類の分析**
日本食品衛生学会第39回学術講演会（1980. 5）

佐藤ミヨ，田辺嘉子，西田甲子：**血液透析食の調理法別によるカリウム摂取量の検討**
第26回日本栄養改善学会（1979. 10）

Tomohiro Ohta, Fu Su, Jack G. Calvert and John H. Shaw: **A Kinetic Study of the tert-Butyl Radical Reactions in Dilute NOx-Mixtures in Air Through the Photolysis of 2-Methyl-2-nitrosopropane**
The 14th International Symposium on Free Radicals (1979. 9)

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：**母親と新生児における水銀の蓄積と相互関係（第4報）（血液成分と水銀量の関係）**
第38回日本公衆衛生学会（1979. 10）

牧野国義，溝口　勲：**大気汚染と慢性呼吸器症状有症率との関連性の検討**
第38回日本公衆衛生学会（1979. 10）

太田与洋，J. G. Caluert：**t-ブチルペルオキシナイトレートの NOx-炭化水素汚染大気中の生成及び分解速度**
日本化学会第40回秋季年会（1979. 10）

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：**NO_2 曝露したラット血液における生化学的諸指標の検討**
第20回大気汚染学会（1979. 11）

福田雅夫，鈴木孝人，大沢誠喜，狩野文雄，笠原利英，寺田伸枝，溝口　勲：**NO_2 曝露によるラットの網状赤血球数の変動**
第20回大気汚染学会（1979. 11）

狩野文雄，福田雅夫，溝口　勲：**マウス脾臓細胞内 Cyclic nucleotides に及ぼす NO_2 と NO の作用**

第20回大気汚染学会（1979. 11）

笠原利英；鈴木孝人，大沢誠喜，狩野文雄，福田雅夫寺田伸枝，石川隆章，溝口　勲：**ラット尿中ハイドロキシプロリン排泄に及ぼす二酸化窒素曝露の影響**
第20回大気汚染学会（1979. 11）

牧野国義，溝口　勲，塚谷恒雄：**調査人数を考慮した量・反応関係の解析**
第20回大気汚染学会（1979. 11）

太田与洋，溝口　勲：**クロラールの酸素存在下の光分解反応**
第14回高速反応討論会（1979. 12）

大井　玄，蓑輪佳子，関　比呂伸，溝口　勲：**東京都における鉛汚染―ハトに現われた改善状況―**
第50回日本衛生学会総会（1980. 4）

大井　玄，長橋　棣，中村清純，余　泰宏，関　比呂伸，溝口　勲，藤田昌彦：**ハトの臓器中 Aryl Hydrocarbon Hydroxylase ―多環芳香族の汚染指標として用いうるか―**
第50回日本衛生学会総会（1980. 4）

関　比呂伸，鈴木継美，蓑輪佳子，溝口　勲，大井　玄：**メチル水銀の低濃度，高濃度くり返し投与による毒性影響**
第50回日本衛生学会総会（1980. 4）

渡辺真利代，大石真之，中尾順子：**藍藻 Microcystis の毒**
第38回日本公衆衛生学会（1979. 10）

高橋保雄，中川順一，土屋悦輝，三村秀一，森田昌敏：**多摩川河川水中の揮発性ニトロソアミン**
第38回日本公衆衛生学会（1979. 10）

松本淳彦，土屋悦輝：**カビ臭発生水域の臭気物質と藍藻類**
第16回日本水処理生物学会（1979. 11）

土屋悦輝，松本淳彦，西垣　進，三村秀一，岡本敏彦：**水の臭気に関する基礎的研究（VII），カビ臭発生水域における原因水中微生物について**
日本薬学会第100年会（1980. 4）

中川順一，森田昌敏，樋口育子，西垣　進，三村秀一河野康広：**塩素化フェノール，塩素化ベンゼンの熱分解による PCDF，PCDD の生成**
日本薬学会第100年会（1980. 4）

大野正彦：**溶存酸素濃度の減少に伴う数種類の底生動物の呼吸量の変化**
第45回日本陸水学会（1980. 6）

大野正彦：**神田川水系善福寺川に生息するユスリカ類の成虫および幼虫の形態**
第4回水生昆虫研究会（1980. 6）

池島伸至，新井輝義，入倉善久，神真知子，古幡幸子松本昌雄，中嶋　誠，高取三郎，田村延一，稲垣俊彦，上条　宏，平山志津子，高良実之，荒井建三，安部勇三：**保温惣菜の温度管理と細菌の増殖について**
第64回東京都衛生局学会（1980. 5）

中村　弘，押田裕子，栃本　博，菊地洋子，池島伸至友成正臣：**多摩川支川秋川の水質と汚濁状況**
第16回全国衛生化学技術協議会（1979. 10）

楠　淳，西条頼広，松本昌雄，友成正臣，図師栄子：**昭和54年度夏季保菌者検索により検出されたサルモネラの血清型と薬剤感受性について**
第64回東京都衛生局学会（1980. 5）

平田一郎，小野田浩子，友成正臣：**干渉フィルターを使用した低エネルギー励起 FTA-ABS 法**
第14回 STD 研究会（1979. 9）

平田一郎，小野田浩子，友成正臣：**FITC 干渉フィルターによる FTA-ABS 法の検討**
第26回日本臨床病理学会総会（1979. 10）

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

木村康夫（委員長）
五味渕弘平
寺山武
藪内清
下平彰男
原田裕文
村上一
西垣進
石川隆章
中尾順子

昭和55年12月1日　発行

規格表　第2類
印刷番号（55）814
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第31-1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
〒131 東京都墨田区向島3—33—5
電話 03（625）7481（代）