

1211

ISSN 0385-1575

岐衛研所報

Rep. Gifu

Inst. P. H.

岐阜県衛生研究所報

第 3 3 号

昭和 6 3 年

Report of Gifu Prefectural
Institute of Public Health

No.3 3

1 9 8 8

岐阜県衛生研究所

Gifu Prefectural Institute
of Public Health



目 次

<資 料>

食中毒原因食品からの神奈川現象陽性腸炎ビブリオの検出	1
1,2-ジアミノ-4-ニトロベンゼンを用いた水中セレンの吸光光度定量	5
水道水検査結果からみた岐阜県内の飲水の水質	9
解熱鎮痛薬の崩壊と溶出 (Ⅱ)	13
漢方エキス製剤中のグリチルリチン測定におけるシリカゲルカートリッジ前処理法の検討	17
神経芽細胞腫マスキニング検査における防腐剤添加用紙利用の試み (第1報) Dip 法の変法と HPLC 法	22
(第2報) クレアチニン定量	27
学校給食油におけるエルカ酸含有量について	31
50%酸性ホスファターゼ活性阻害値測定によるオキサダ酸の定量	34

<他誌掲載論文>

38

<学 会 報 告>

40

題字 岐阜県知事 上松 陽助

CONTENTS

<REPORTS>

Detection of Kanagawa Phenomenon Positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> from Causative Food in an Outbreak of Food Poisoning.....	1
Spectrometric Determination of Selenium in water with 1,2-Diamino-4-nitrobenzene.....	5
Quality of the Drinking Water based on the Examination Results of Tap Water in Gifu Prefecture.....	9
Disintegration and Dissolution of Analytical Analgesic Tablets (I).....	13
Study on the Pretreatment with Silicagel cartridge for the Determination of Glycyrrhizin in Extracts of Kanpo Preparations.....	17
Antiseptic Effects of Filter paper with Disinfectant for Mass-Screening of Neuroblastoma	
(1) Study of Dip-test and HPLC.....	22
(2) Determination of Creatinine.....	27
Content of Erucic Acid in Edible oil for School Lunch.....	31
Determination of Okadaic Acid by Measuring 50% Acid Phosphatase Activity Inhibitory Concentration (APIC ₅₀).....	34

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

食中毒原因食品からの神奈川県陽性腸炎 ビブリオの検出

長野 功*, 所 光 男*, 後 藤 喜 一*, 河 合 信*,
木 村 英 道**, 赤 座 嘉 幸**, 安 田 文 博**, 大 洞 剛**,
浅 尾 もと子**, 清 水 義 則**

Detection of Kanagawa Phenomenon Positive *Vibrio* *parahaemolyticus* from Causative Food in an Outbreak of Food Poisoning

Isao NAGANO*, Mitsuo TOKORO*, Kiichi GOTO*, Makoto KAWAI*,
Hidemichi KIMURA**, Yoshiyuki AKAZA**, Fumihiro YASUDA**,
Tsuyoshi ŌBORA**, Motoko ASAO**, Yoshinori SHIMIZU**

腸炎ビブリオ（以下腸ビ）食中毒において、患者糞便から分離される腸ビのほとんどの株は神奈川県現象（以下KP）陽性株である。しかし、疫学的に原因食品として推定される食品からKP陽性株が分離されることはほとんどない。また、KP陽性株が分離されたとしても、患者分離株と血清型が一致することは稀である^{1,2)}。以上の問題を解明するためにはKP陽性株が分離された事例の集積が不可欠であり、我々は食中毒発生に際して、患者が実際に喫食した残品の入手に努めると共に、推定原因食品から分離された腸ビをKP検査用培地にできるだけ多く釣菌する我妻方式³⁾の分離法を食中毒検査術式に組み込んできた。その結果、1979年に拭き取り材料から、1981年、1982年に推定原因食品から患者分離株と同一血清型のKP陽性株を分離することができた^{4,5,6)}。

1987年9月14日に岐阜県H郡で発生した食中毒において、原因食品と推定される食品から分離された腸ビ

はすべてKP陽性でかつ患者分離株と同一血清型であった。本報ではその概要を報告すると共に若干の考察を加えた。

材料および方法

1. 被検材料

患者便11件、調理従事者便15件（患者便11件、健康者便4件）、8月12日朝食より8月13日夕食までの検査食18件、拭き取り5件、使用水1件。

2. 検査法

腸ビの分離および生化学的性状の検査は微生物検査⁷⁾に準じた。分離株の血清型別には市販（デンカ生研製）の腸ビ診断用血清を用いた。腸ビのKP検査は我妻らの方法⁸⁾に従ってTCBS寒天培地に発育した腸ビが疑われる集落をできるだけ多くKP検査用培地（栄研化学製）に釣菌する方法で行った。また、腸ビ

*岐阜県衛生研究所：500 岐阜市野一色4丁目6番3号

Gifu Prefectural Institute of Public Health：6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

**岐阜県羽島保健所：501-62 羽島市竹鼻町狐穴川口719の1

Gifu Prefectural Hashima Health Center：719-1 Kawaguchi, Kitsuneana, Takehana,

Hashima 501-62, Japan

の耐熱性溶血毒産生能は KAP-RPLA 生研（デンカ生研製）を用い、逆受身ラテックス凝集反応にて行った。

成 績

1. 疫学調査

表1に示したように、1987年9月14日、岐阜県H郡のK刑務所の被収容者429名中170名および職員1名が下痢、発熱、腹痛等の食中毒症状を呈した。本刑務所には被収容者用と職員用の2つの集団給食施設があるが、患者発生は被収容者用の集団給食施設だけであった。職員のうち唯一の患者は事件発生当日の検食を実施した宿直職員であった。

共通食品について、患者20名および健康者20名で

表1 食中毒発生概要

発 生 年 月 日	1987年9月14日
発 生 場 所	K 刑 務 所
原 因 施 設	所内集団給食施設
原因施設所在地	岐 阜 県 H 郡
摂 食 者 数	439 名
患 者 数	171 名
発 病 率	39.8%
推定原因食品	チキンマカロニサラダ
平均潜伏時間	13.9時間

マスターテーブルを作成し χ^2 検定を実施したが、患者、健康者共に摂食率が高く、有意差は認められなかった。しかし、刑務所の被収容者は全員刑務所内の被収容者用集団給食施設で調理された給食のみを食べておりその他の食品は一切食べていないこと、また職員のうち唯一の患者は9月13日の昼食と夕食の検食を行っていることから、本刑務所内での9月13日の昼食あるいは夕食が原因食と考えられた。

患者の発病率は39.8%とあまり高くなかった。また、表2に示したように9月13日の昼食を原因食とした場合、潜伏時間は9~24時間と患者間で大きな幅があった。患者の症状は表3に示したように下痢、腹痛が主要症状であり、発熱も70.2%に認められた。

2. 細菌学的検査

表4に示したように、腸ビは患者糞便6件、検食1件（9月13日昼食のチキンマカロニサラダ）より分離された。腸ビが分離された平板上の集落のうち患者糞便については平均4株を、食品については可能なかぎり多くを釣菌し、常法により生化学的性状を検査すると共に、KP検査およびKAP-RPLA生研により耐熱性溶血毒産生能を調べた。表5に示したように、患者6人から分離された腸ビ24株はすべてKPおよび耐熱性溶血毒陽性であり、血清型はO4:K63であった。また、検食のチキンマカロニサラダから分離された腸ビ25株もすべてKPおよび耐熱性溶血毒陽性であり、血清型はO4:K63であった。

表2 潜伏時間別発症状況

時 間	9 ~10	~11	~12	~13	~14	~15	~16	~17	~18	~19	~20	~21	~22	~23	~24	不明
患 者 数	26	15	7	17	23	26	20	10	8	3	3	6	3	1	1	2
%	15.2	8.8	4.1	9.9	13.5	15.2	11.7	5.8	4.7	1.8	1.8	3.5	1.8	0.6	0.6	1.2

表3 臨 床 症 状

症 状	発 熱	腹 痛	下 痢	嘔 吐	嘔 気	頭 痛	悪 感	戦 慄	倦怠感	暖 気
患 者 数	120	159	163	122	122	144	130	89	161	51
%	70.2	93.0	95.3	71.3	71.3	84.2	76.0	52.0	94.2	29.8

表4 腸炎ビブリオ検出状況

検 体	検 体 数	陽 性 数	
患 者 便	11	4	
調理従事者便	患者	11	2
	健康者	4	0
検 食	18	1	
拭 き 取 り	5	0	
使 用 水	1	0	

表5 腸炎ビブリオの神奈川現象および血清型

検 体	供試株数	神奈川現象陽性菌株数 (%)	耐熱性溶血毒産生菌株数 (%)	血清型
				O4:K63
患 者 便	24	24(100)	24(100)	24 (100)
チキンマカロニサラダ	25	25(100)	25(100)	25 (100)

考 察

腸ビ食中毒事例では原因食品から患者糞便由来株と同一血清型のKP陽性株が分離されることはきわめて稀である。この要因として、腸ビ食中毒では原因食品が生魚介類であることが多いため、食品が検査時まで残っていないことが少なくなく、細菌学的検査は参考食品で代用している点があげられる。患者が実際に喫食した残品を検査できた事例では食品からKP陽性で患者由来株と同一血清型の腸ビが分離されたという報告は多い。また、前報の事例においても推定原因食品は比較的保存されることが多い弁当類であった。今回の事例では、刑務所という特殊な施設内での発生であったため、数日前よりの食品が検査として残されていた。このことが食品からKP陽性株を分離できた大きな要因と思われる。

本事例の原因食品であるチキンマカロニサラダには原材料として魚介類は使用されていなかった。しかし、発生前日の食事には魚介類が使用されており、また食器用の容器（ザル、コンテナ等）、調理台、包丁、まな板等は食品の種別によって区分されていなかった。このことより、腸ビは魚介類から二次的にチキンマカロニサラダへ汚染したと推測される。ただ、今回は調理場の拭き取り材料から腸ビは検出されず、汚染

源、汚染経路は細菌学的調査では解明できなかった。

また、チキンマカロニサラダ以外から、腸ビはまったく検出されず、チキンマカロニサラダから検出された腸ビはすべてKP陽性であったことも注目される点である。過去にKP陽性株が分離された事例の解析の結果から、KP陽性株が分離されやすい食品の調理形態は、加熱、解凍などにより付着細菌叢の菌数が減少した状態であり、このような食品に腸ビが二次汚染すると菌の増殖が良くなることが報告されている。チキンマカロニサラダの具は鶏肉、マカロニ、卵など加熱調理食品が多く、細菌叢が減少した状態でKP陽性株が二次汚染し、室温に3時間放置されたことで増殖したものと思われる。しかし、チキンマカロニサラダのKP陽性株の菌数は、計測しなかったが食中毒をおこすには必ずしも十分でなかったように思われた。これは発症率が39.8%と腸ビ食中毒としては低かったこと、潜伏時間が患者間で大きな幅があったことより、チキンマカロニサラダ中の菌量が均一でなかったためと思われる。また、食品から分離された腸ビがすべてKP陽性株であったことは、チキンマカロニサラダがKP陽性株の生存、発育に有利に作用したとも考えられ、今後さらに検討する必要がある。

食品由来株のKPに関する未解明の問題は数多く、その解明のためにはKP陽性株が分離された事例の集積が不可欠であり、今後この方面の研究が望まれる。

文 献

- 1) 三輪谷俊夫, 竹田美文: 腸炎ビブリオ感染症, 総合臨床, 23, 1716-1720, 1974
- 2) 藤野恒三郎: 腸炎ビブリオに関する最近の知見, 食衛誌, 18, 131-141, 1977
- 3) 我妻正三郎, 円治和子, 湯田和郎, 白取剛彦, 今野二郎: 生カキによる腸炎ビブリオ食中毒の発生とその汚染源の追究, メディアサークル, 16, 168-170, 1971
- 4) 所 光男, 後藤喜一, 山田不二造, 河瀬 操, 佐橋 隆, 清水栄治: 拭取検体から神奈川現象陽性株が検出された腸炎ビブリオ食中毒について, 岐衛研所報, 25, 1-5, 1980

- 5) 所 光男, 加藤樹夫, 後藤喜一, 渡辺 実, 山田不二造, 上田 宏, 大橋富男, 奥村直尊, 大平恵美子, 林 峯雄, 上田 茂, 白井宗一, 伊藤 保, 栗田元徳: 卵焼きによる腸炎ビブリオ食中毒事例について, 食品衛生研究, **32**, 945-954, 1982
- 6) 所 光男, 加藤樹夫, 後藤喜一, 渡辺 実, 山田不二造, 佐橋 隆, 清水英二, 松尾 登, 渡辺靖信, 所 正澄, 高橋英勝: 原因食品から神奈川現象陽性株が検出された腸炎ビブリオ食中毒について, 岐衛研所報, **28**, 11-13, 1983
- 7) 赤羽荘資, 浅川 豊: 微生物検査必携, 細菌, 真菌検査, 第3版, D70-D82, 日本公衆衛生協会, 1987
- 8) 湯田和郎: 腸炎ビブリオ食中毒の原因食品と拭き取り検体から神奈川現象陽性株の検出成績, 医学と生物学, **94**, 529-531
- 9) 湯田和郎: 食中毒時における溶血性腸炎ビブリオの原因施設別・検体別・地域別検出状況, 医学と生物学, **95**, 183-186, 1977
- 10) 花岡正春, 岡田陽一, 宮本三郎: 低温域における生鮮魚介類中腸炎ビブリオの消長, 大阪市環境科学研究所報告, **39**, 193-197, 1976

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.1, 2-ジアミノ-4-ニトロベンゼンを用いた
水中のセレンの吸光光度定量

森 仁*, 今井 準 三*

Spectrometric Determination of Selenium in Water with
1,2-Diamino-4-Nitrobenzene.

Hitoshi MORI* and Junzo IMAI*

はじめに

水中のセレンの測定法としては、3, 3'-ジアミノベンゼン^{1,2)}を用いる吸光光度法、2, 3-ジアミノナフタレン^{3,4)}を用いるけい光分析法が広く一般に用いられている。しかし、これらの方法は分析操作が煩雑で長時間を必要とするなど、迅速性に欠ける等の問題点が指摘されている。

一方、微量のセレンの分析法としては、1,2-ジアミノ-4-ニトロベンゼン（以下、DNBと略記）を用い、ピアズセレンノールを生成させた後、有機溶剤で抽出し、GC (ECD付) で測定する方法が報告⁵⁾されているが、この方法は、操作が煩雑でルーチン検査の測定法には適用が困難である。

そこで、水中のセレンの簡易測定法の確立を目的として、DNBとセレン(IV)との生成物であるピアズセレンノールが350nm付近に吸収強度が大きい極大吸収を有していることに着目し、ピアズセレンノールのトルエン抽出-吸光光度を検討したところ、水中のセレンを比較的高感度に精度よく分析することが可能となったので報告する。

実験方法

1. 試薬及び装置

セレン(IV)標準液：亜セレン酸 1.633gをとり、

水に溶かして全量を1,000mlとし、セレン(IV) 1mg/ml溶液を調製した。これを適宜希釈して用いた。

セレン(VI)標準液：セレン酸 1.836gをとり、水にとかして全量を1,000mlとし、セレン(VI) 1mg/ml溶液を調製した。これを適宜希釈して用いた。

DNB溶液：DNB 1塩化物400mgをとり、1M塩酸溶液 200mlに溶解し、トルエン 30mlで3回洗浄した後、水層を用いた。

20%EDTA溶液：エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム20gをとり、水に溶解して全量を100mlとし、使用した。

0.2M三酸化ヒ素溶液：三酸化ヒ素 7.91gをとり、水に溶かして全量を200mlとし、使用した。

なお、試薬はすべて市販特級を用いた。

分光光度計：日立200-20型及び日立100-20型を用いた。

振とう機：イワキKMシェーカーVD型を用いた。

2. 分析操作

検水500ml（セレンとして10 μ g以下）を500mlのビーカーにとり、塩酸（塩化水素35%含有）1mlを加えホットプレート上で加熱し、液量を200ml以下にする。

次いで、0.2M三酸化ヒ素溶液 0.2mlを添加し、攪拌した後、200mlのコニカルビーカーに移す。塩酸 18ml、20%EDTA溶液 1ml、臭化カリウム 3gを加え沸騰水浴中で1時間加熱する。

*岐阜県衛生研究所：500 岐阜市野一色4丁目6番3号

*Gifu Prefectural Institute of Public Health：6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

次に、0.2% DNB 溶液 4 ml を添加し、沸騰水浴中で 1 時間放置する。冷却後、300 ml の分液ロートに移し入れ、液量を約 200 ml とし、トルエン 5 ml を添加、3 分間振とうする。静置後、トルエン層を脱脂綿を通して分取し、セミマイクロセル (20mm) を用いて 350nm の吸光度を測定し、別に標準を用いて作成した検量線からセレン量を求める。

結果及び考察

1. 吸収曲線

DNB とセレン (IV) との生成物であるピアズセレンノールの極大吸収を調べるため、蒸留水 500 ml にセレン (VI) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 5 ml を添加し、分析操作に従って操作し、吸収スペクトルを測定した。その結果、ピアズセレンノールの極大吸収波長は図 1 に示したように 350nm を示した。従って、測定波長を 350nm とした。

2. 残留塩素除去

検水中に残留塩素が共存すると強いプラスの妨害を示すため、その除去法と影響を検討した。蒸留水 500 ml にセレン (VI) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 5 ml をとり、残留塩素の除去剤として一般に用いられている、三酸化ひ素、亜硝酸ナトリウム及びアジ化ナトリウムの各 0.2M 溶液を用いて検討したところ、三酸化ひ素溶液以外は残留塩素の妨害を除くことができなかった。

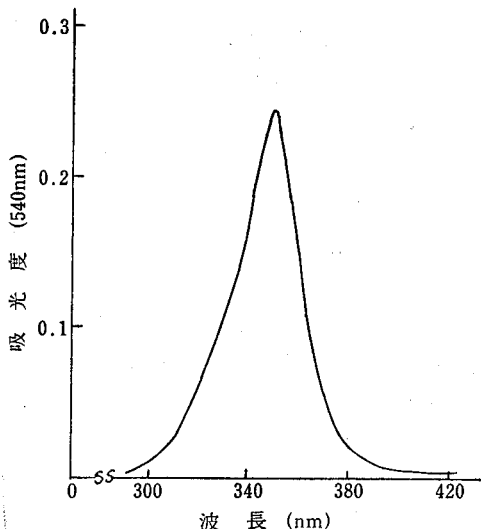


図 1 ピアズセレンノールの吸収曲線

Se 5 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ トルエン

そこで、残留塩素の妨害を除去することが可能であった三酸化ひ素の最適添加量を調べた。蒸留水 500 ml にセレン (VI) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 5 ml を添加し、残留塩素濃度を 0 ~ 2 ppm と変化させ、0.2M 三酸化ひ素溶液 0.2 ml を添加し、ピアズセレンノールの吸光度を測定した。その結果を図 2 に示した。ピアズセレンノールの吸光度は、0.2M 三酸化ひ素溶液無添加の場合は残留塩素濃度が高くなるに伴って吸光度が増大したが、0.2M 三酸化ひ素溶液を 0.2 ml 添加した場合には残留塩素濃度に関係なく吸光度はほぼ一定となった。

このことから、0.2M 三酸化ひ素溶液 0.2 ml を添加することにより、残留塩素の妨害を除くことが可能であることが認められた。

3. セレン (VI) の還元条件の検討

1) 塩酸濃度の影響

塩酸濃度がセレン (VI) の還元に与える影響を調べるため、蒸留水 500 ml にセレン (IV) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 5 ml を添加し、塩酸濃度を 0 ~ 3 M になるように塩酸を加、ピアズセレンノールの吸光度を測定した。吸光度は、図 3 に示したように塩酸濃度の上昇につれて増大したが塩酸濃度 0.75M 以上ではほぼ一定となった。従って、塩酸濃度が約 1 M になるように塩酸の添加量を 18 ml とした。

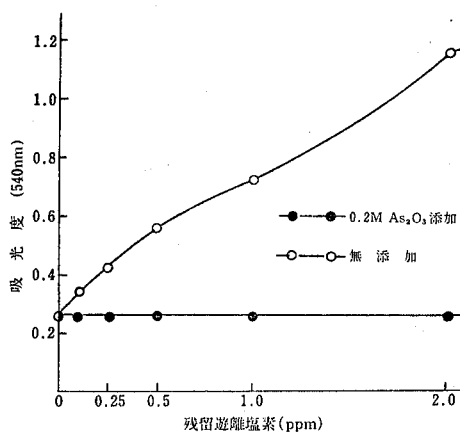


図 2 残留遊離塩素がピアズセレンノールの吸光度に及ぼす影響

Se (VI) 5 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ トルエン
0.2M As₂O₃ 溶液 0.2 ml 添加

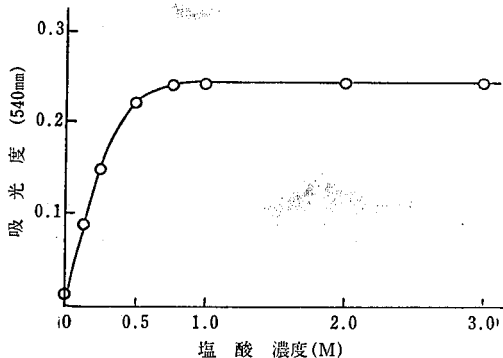


図3 塩素濃度がピアズセレンールの吸光度に及ぼす影響

Se (VI) 5 μ g/5 mlトルエン

2) 臭化カリウムの添加量の影響

臭化カリウムの濃度がセレン(VI)の還元に及ぼす影響を調べるため、セレン(VI) 1 μ g/ml 溶液 5 ml をとり、臭化カリウムの添加量を 0~8 g と変化させ吸光度を測定した。ピアズセレンールの吸光度は、図4に示したように添加量 2 g 以上で一定値を示した。従って、安全をみて添加量を 3 g とした。

3) 加熱時間の影響

セレン(VI) 1 μ g/ml 溶液 5 ml をとり、沸騰水浴中の加熱時間を 10~80 分と変化させ、最適加熱時間を調べた。その結果、吸光度は加熱時間 40 分以上で一定値を示した。従って加熱時間を沸騰水浴中で 1 時間とした。

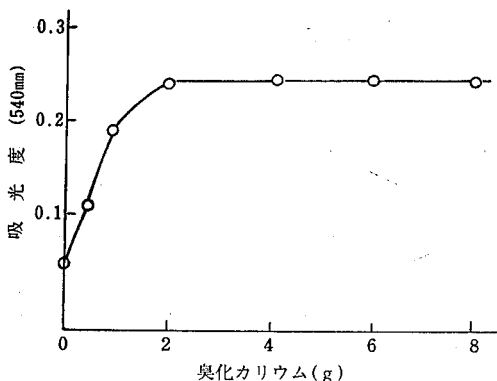


図4 臭化カリウムの添加量がピアズセレンールの吸光度に及ぼす影響

Se(VI) 5 μ g/5 mlトルエン

4. ピアズセレンールの生成条件の検討

1) 0.2% DNB 溶液の添加量の影響

ピアズセレンールの生成条件のうち、DNB の最適添加量を検討するため、セレン(VI) 1 μ g/ml 溶液 5 ml を蒸留水 500 ml にとり、0.2% DNB 溶液の添加量を 1~8 ml と変化させ吸光度を測定した。その結果、ピアズセレンールの吸光度は図5に示したように、3 ml 以上の添加量で一定値を示した。そこで 0.2% DNB 溶液の添加量を安全をみて 4 ml とした。

2) 加熱時間の影響

ピアズセレンールの生成反応については、加熱時間の影響を受けるため、セレン(VI) 1 μ g/ml 溶液 5 ml をとり、沸騰水浴中での加熱時間を 10~120 分間と変化させ吸光度を調べた。その結果、加熱時間 60 分以上で吸光度は一定を示した。そこで、加熱時間を 60 分間とした。

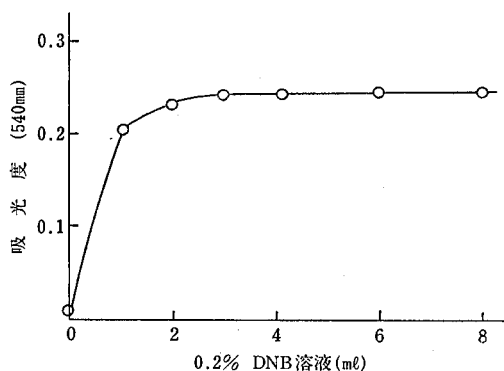


図5 DNB の添加量がピアズセレンールの吸光度に及ぼす影響

Se (VI) 5 μ g/5 mlトルエン

5. 共存イオンの影響

水中に共存すると思われる陽イオン、陰イオンについて、セレン(VI) 1 μ g/ml 溶液 5 ml に対して 200 倍量を添加し影響を調べた。その結果、共存イオンの妨害は表1に示したように鉄(III)が+30%の妨害を示したが、その他のイオンについてはほとんど影響が認められなかった。

なお、鉄(III)については、20% EDTA 溶液 2 ml をマスキング剤として添加することにより妨害を除くことが可能であった。

6. 検量線、定量下限及び分析精度

検量線はセレン(VI) 0~8 μ g の範囲において良好な直線性を示し、モル吸光係数は $1.04 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1}$

表1 共存イオンの影響

イオン	添加物	添加量 (μg)	検出量 Se(μg)	回収率 (%)
Na ⁺	NaCl	1000	5.03	101
Mg ²⁺	MgCl ₂	1000	5.00	100
Ca ²⁺	CaCl ₂	1000	4.95	99
Pb ²⁺	Pb(NO ₃) ₂	1000	4.66	93
Al ³⁺	AlCl ₃	1000	4.97	99
Fe ³⁺	FeCl ₃	1000	6.53	130
〃*	〃	1000	5.3	106
NH ₄ ⁺	NH ₄ Cl	1000	4.92	98
NO ₃ ⁻	NaNO ₃	1000	4.87	97
SO ₄ ²⁻	H ₂ SO ₄	1000	4.86	97
PO ₄ ³⁻	H ₃ PO ₄	1000	5.15	103

Se添加量：Se(VI) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液を 5 ml 添加
* 20% EDTA 溶液 2 ml 添加

であった。また、定量下限値は吸光度 0.03 のとき 0.6 μg であった。

次に、分析精度を調べるため、セレン(VI) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 5 ml を添加し、10 回の繰り返し実験を行ったところ、変動係数は 3.3% と良い結果が得られた。

7. 他法との測定値の比較及び実測例

本法の信頼性と実試料への適用性を調べるため、以下の検討を行った。

セレン(VI) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液を段階的にとり、セレン濃度が 0.5~6.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ の標準試料を調製し、本法とセレンの分析法として汎用されている 3,3'-ジアミノベンジジン法との測定値の比較を行った。その結果を表 2 に示した。両法による測定値の間には、相関係数 $r=0.998$ ($n=5$) と良好な関係が認められ、本法を Y としたとき $Y=1.00X-0.051$ の関係式が得られた。

次に、地下水、表流水、河川水及び温泉水について

表2 本法と 3,3'-ジアミノベンジジン法との測定値の比較

Se 標準試料	($\mu\text{g}/\text{l}$)	
	本 法	3,3'-ジアミノベンジジン法
0.5	0.46	0.51
1.0	0.95	1.03
2.0	1.95	2.01
4.0	4.03	4.00
6.0	5.95	6.05

Se 標準試料：Se(VI) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を蒸留水に添加し、調製した。

表3 実試料への適用

試 料	Se ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	本 法	3,3'-ジアミノベンジジン
地 下 水	<0.002	<0.002
表 流 水	<0.002	<0.002
河 川 水	<0.002	<0.002
温 泉 水	<0.002	<0.002
温 泉 水	0.003	0.003

て、本法と 3,3'-ジアミノベンジジン法を用いてセレンの測定を行った。その結果を表 3 に示した。本法で得られた値はいずれの試料についても 3,3'-ジアミノベンジジン法の測定値と良く一致しており、本法の実試料への適用が可能であることを示した。

ま と め

水中のセレンの測定法として、DNB を用いた溶媒抽出-吸光度法の検討を行った結果、本法は共存イオンの影響も少なく、精度よく分析することが可能であり、定量操作が簡易であることから、多数の検体の測定が要求されるルーチン検査には、実用分析法として利用できるものと考えられる。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局水道環境部監集：上水試験方法，422~425，日本水道協会，1985
- 2) 日本工業規格：工場排水試験方法，226~227，日本規格協会，1986
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，56~57，金原出版，1980
- 4) 由井 収，平木敬三，西川泰治，重松恒信：海水，河川水中のセレン(IV)，セレン(VI)のけい光定量，分析化学，26，91~96，1977
- 5) M. Akiba, Y. Shimoishi and K. Tōei: Gas-chromatographic Determination of Selenium in Pure Elemental Arsenic and Arsenic(III) Oxide with 4-Nitro-1,2-Diaminobenzene, Analyst, 101, 644~651, 1976

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.水道水検査結果からみた岐阜県内の
飲料水の水質

寺尾 宏*, 有川幸孝**, 森下有輝*

Quality of the Drinking Water Based on the Examination
Results of Tap Water in Gifu PrefectureHiroshi TERAO*, Yukitaka ARIKAWA** and
Yuki MORISHITA*

はじめに

著者らは、パーソナルコンピュータを活用した水道水検査のデータファイル作成の有効性について検討を行い、水道施設における水質の維持管理、検査機関の精度向上に役立つことを明らかにした¹⁾。これらの検討結果をふまえて、著者らは県内各保健所の協力のもとに水質検査結果のデータファイルの作成を行っている。今回、作成したデータファイルから浄水の検査結果を利用して若干の解析を試み、岐阜県内の飲料水の水質の概要を明らかにした。

方 法

入力データは、(財)岐阜県公衆衛生検査センターで行われている県内の各施設ごとの全項目検査結果(原水、浄水各年1回)であり、現在までに昭和51~60年度の10年間に行われた13,368件が入力されている。データファイルの作成には、NECパーソナルコンピュータN5200-05のデータファイル作成用ソフトLANFILEを使用している。

今回はこのファイルの中から10年間の浄水検査結果6,243件のデータを利用し、硝酸性窒素および亜硝酸性窒素(以下、硝酸性窒素と略す)、塩素イオン、有機物等(過マンガン酸カリウム消費量)、硬度、蒸発

残留物、およびpH値の主要6項目について自作したBASICプログラムを使用し、①県内飲料水の主要成分の平均値、②10年間の水質変動、③市町村別水質比較地図、の3点について明らかにした。

結果および考察

1. 県内飲料水の主要成分の平均値

10年間のデータの中から、昭和58~60年度3年間の2,018件を利用し、これを河川水を水源とする施設764件、地下水(伏流水、ゆう水を含む)を水源とする施設1,254件に分類して各々の平均値を求め標準偏差と

表1 岐阜県における飲料水の水源別の平均水質
(単位mg/l)

項 目	河 川 水 (n=764)	地 下 水 (n=1,254)
硝 酸 性 窒 素	0.67 ± 0.59	1.19 ± 1.02
塩 素 イ オ ン	3.32 ± 3.14	4.36 ± 4.36
有 機 物 等	1.72 ± 1.00	1.22 ± 0.67
硬 度	22.34 ± 15.44	42.12 ± 25.17
蒸 発 残 留 物	49.36 ± 23.92	75.95 ± 36.19
pH 値	6.95 ± 0.43	6.96 ± 0.52

* 岐阜県衛生研究所：500 岐阜市野一色4丁目6番3号

Gifu Prefectural Institute of Public Health：6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

** 岐阜県衛生環境部：500 岐阜市藪田1丁目1番地

Department of Hygiene and Environment, Gifu Prefectural Government Office：1-1 Yabuta,
Gifu 500, Japan

ともに表1に示した。岐阜県内の水道水の検査結果の検討は、既に森下²⁾によって行われているが、今回は水源別に分類した。

飲料水の平均的な水質については、岡沢³⁾の水道原水の水質の集計、愛知県衛生研究所の県内全域の飲用の地下水の測定結果に関する報告がある。これらと比較すると、一般に人為的な汚染指標と考えられる硝酸性窒素、塩素イオン、および有機物等は河川水、地下水を利用する施設とも、いずれも低濃度であった。特に、塩素イオン濃度は、消毒のための次亜塩素酸ナトリウムの添加により上昇するが、この点を考慮しても低濃度であった。この結果は岐阜県内の飲料水は、全体をみると人為的な汚染の影響が小さいと考えられた。

しかし、これらの項目について河川水、地下水の間で比較すると、硝酸性窒素、塩素イオンの2項目は地下水の方が相対的に濃度が高く、有機物等は、逆に河川水の方が高濃度であったが、これらの結果は、地下水の汚染、河川の汚濁の影響が一部の施設において起こっている可能性を示唆した。

硬度、蒸発残留物は、いずれも地下水が河川水に比

較して高い濃度を示し、地下水と河川水の濃度比はそれぞれ1.89、1.54であった。

pH値は、河川水、地下水ともほぼ同じ値であった。しかし、両者の頻度分布のパターンは異なっており、河川水は7付近に集中したパターンであるが、地下水では、遊離炭酸の影響を受けて6.0から6.5を示す施設と、西南濃地方（県南西部）を中心とした被圧地下水地帯にある7.5付近を示す施設があり、幅の広いパターンを示している。

6項目間の相関性をみると、硬度、蒸発残留物の間で最も高く、相関係数は河川水では0.717、地下水では0.813であった。このように相関性が高かったのは、溶存成分の総量を反映していると考えられる蒸発残留物に対して、硬度の寄与が大きいことを示している。汚染成分と考えられる塩素イオン、ナトリウムイオン濃度が高い施設が増加すると、硬度と蒸発残留物の相関性はより低下すると考えられる。

2. 10年間の水質変動

図1に、昭和50年度から10年間の年度毎の平均値を求め、この値をもとに水質変動を河川水、地下水の水源種別、項目別に示した。硝酸性窒素、塩素イオンは昭和54年度から測定法が変更になっており、改訂の前

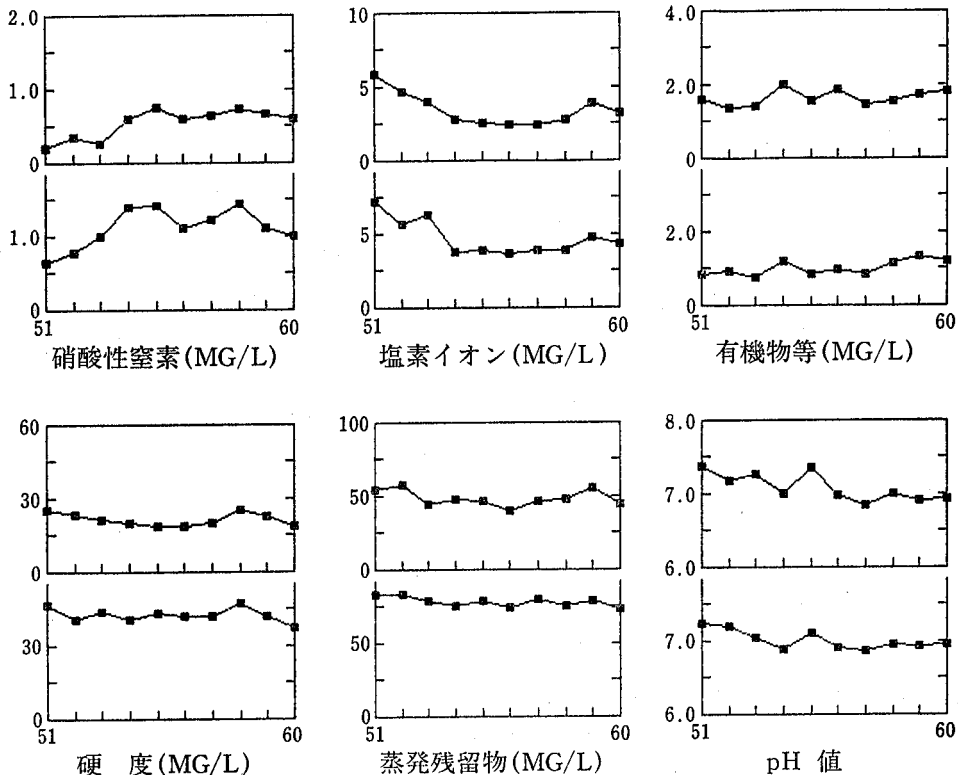


図1 水源種別別にみた10年間の水質変動グラフ (昭和51~60年度, 上段—河川水, 下段—地下水)

後で変動が認められた。しかし、この点を考慮しても10年間の水質は河川水、地下水のいずれを水源とする施設でも、各項目とも顕著な変動は認められなかった。

これらの結果は、河川水を取水する場合、岐阜県では山間地の谷川水を利用した施設が多いために汚染の影響を受けにくく、長期にわたり安定した水質で給水が行われていることを示している。一方、地下水の有

機塩素化合物の汚染事例が近年全国的にみられるが、岐阜県では地下水を水源とする施設は西南濃地方に多く、この地域は地上の影響を直接受けにくい被圧地下水地帯となっており、河川水と同様大きな水質の変動は認められなかった。

3. 市町村別水質比較地図

昭和57~60年度3年間の各施設の浄水検査結果2,018件のデータから各市町村ごとに平均値を求め、

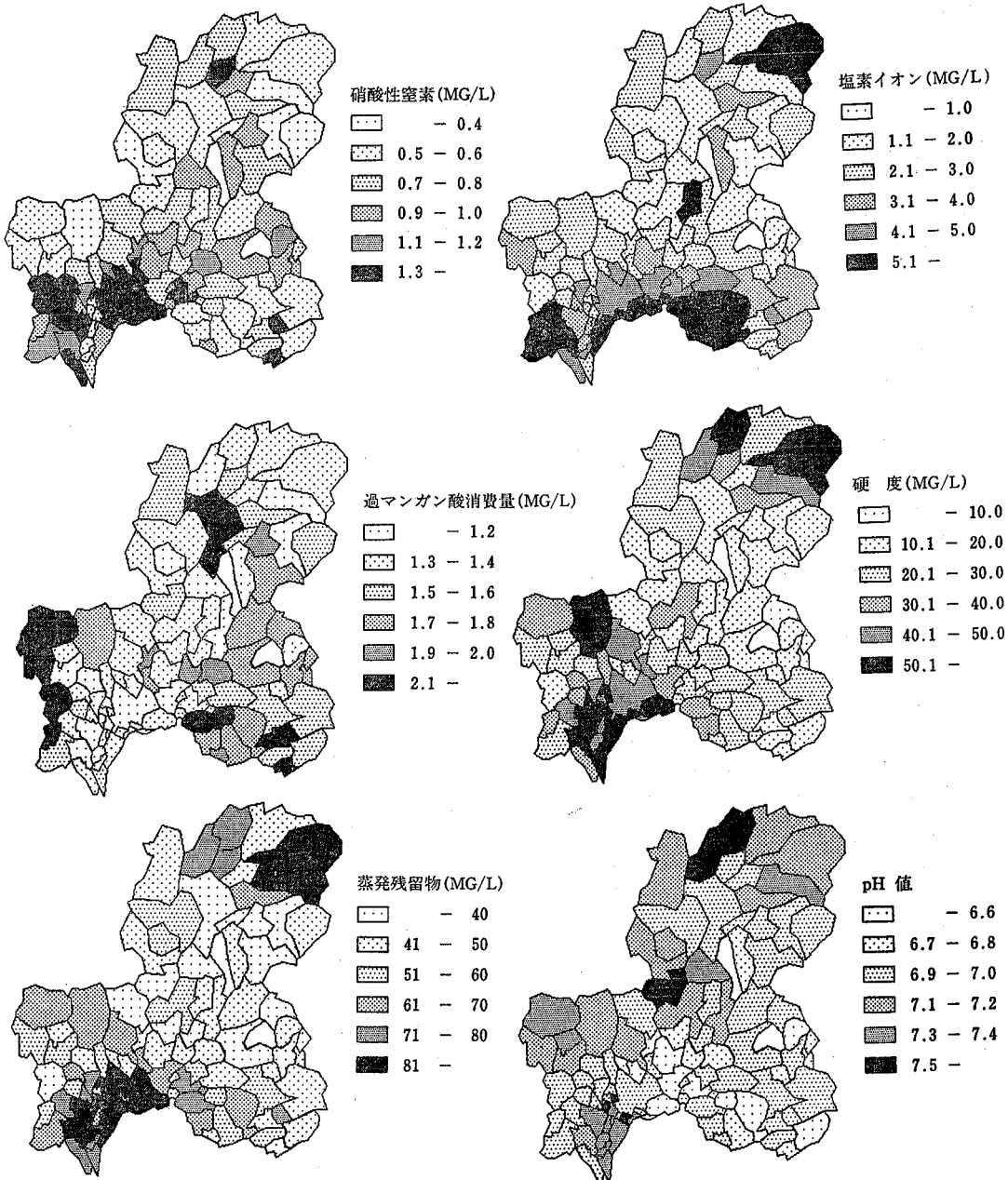


図2 岐阜県における市町村別水質分布地図

この値をもとに市町村別の水質比較地図を作成し図2に示した。河川水を水源とする施設は山間地に、地下水を水源とする施設は平野部に多くみられ、一部の市町村では両施設が混在している。今回は各市町村の住民がどのような水質の飲料水を飲んでいるかという観点から、水源の違いを考慮せずに市町村別に平均値を求めた。なお、東白川村、馬瀬村の2村には水道施設がないため空白とした。

硝酸性窒素

岐阜市周辺から西南濃地方、および東濃地方（県南東部）の一部などで、他の地域に比較して高い濃度を示した。これらの地域では地下水を水源とする施設が多く、地下水の汚染の影響も懸念されたが、最も高い値でも各務原市の $3.4\text{mg}/\ell$ であり水質基準値と比較して3分の1程であった。一方低濃度を示した市町村は、山間地の谷川水から取水している地域に多くみられた。

塩素イオン

硝酸性窒素と同様汚染指標である塩素イオンは各務原市から関ヶ原町にかけての一带、中東濃地方の一部、上宝村などで $5\text{mg}/\ell$ を超え、他の地域に比較して高い濃度を示した。硝酸性窒素では地下水を水源とする施設が多い地域で高い濃度を示したが、塩素イオンの場合、河川水を水源とする地域でも比較的高い濃度を示した。

有機物等（過マンガン酸カリウム消費量）

明確な地域の特徴はないが、可児市、関ヶ原町、御嵩町、岩村町などが他の地域と比較して高い濃度を示した。いずれも河川水を利用しており、汚濁の兆候が現れていると考えられ、将来的に監視していくことも大切である。

硬 度

表1に示したように、河川水と地下水利用施設の間では濃度に大きな差があり、地域差は水源の違いとして表れている。 $50\text{mg}/\ell$ 以上の高い濃度を示した地域は、各務原市、大垣市、羽島市をはじめ西南濃地方の地下水利用地域、宮川村、上宝村などゆう水利用地域であった。河川水利用施設の中では東濃地方が特に低い濃度であり、坂下町、川上村、加子母村の3町村では $10\text{mg}/\ell$ 以下であった。

蒸発残留物

硬度と高い相関があることを前述したが、濃度分布

図を比較しても類似のパターンを示した。

pH 値

高い値を示したのは、大垣市、海津郡、安八郡、そして揖斐郡および羽島郡の一部など西南濃地方の遊離炭酸の少ない被圧地下水（深井戸）を利用した施設であり、7.2~7.5の範囲であった。また、河合村、宮川村など飛騨地方（県北部）のゆう水利用施設の多い地域でも7.5~7.6を示した。

ま と め

10年間（昭和51~60年度）の浄水の全項目検査結果を利用して岐阜県内の飲料水の水質についてつぎの3点の検討を行った。

1. 検査結果を水源の種類別に2つに分けて主要6項目の平均値などを明らかにし、全体的にみて人為的な汚染の影響は小さかった。
2. 10年間の水質の変動を水源の種類別に明らかにした。試験法の改定により一部の項目で変動がみられたが、平均値としてとらえると安定した供給が行われていることを示した。
3. 各項目について、市町村別濃度分布図を作成した。地域差の要因として水源の種別の違いが大きいが、一部の地域では汚染の兆候も認められた。

謝 辞

本研究の一部は、昭和61年度岐阜県簡易水道協会の委託研究として行った。関係各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 寺尾 宏、梶川正勝、森下有輝：パーソナルコンピュータによる『水道水検査結果の活用』、岐衛研所報、32、11-16、1987
- 2) 森下有輝、梶川正勝、寺尾 宏、山田不二造、安田文博、小川宗治、水野隆雄、谷 志郎：定期検査結査からみた岐阜県内の水道水質について、岐衛研所報、26、70-76、1981
- 3) 岡沢和好：地下水水質の特徴について——表流水との比較——、用水と廃水、16、1369-1373、1974
- 4) 愛知県衛生研究所：愛知県下の地下水（飲用）水源の水質代表値、1986

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

解熱鎮痛薬の崩壊と溶出

(第2報) pHによる影響

大野勝弘*, 坂井至通, 今井準三

Disintegration and Dissolution of Antipyretic
Analgesic Tablets (II)

Katsuhiro OHNO*, Yoshimichi SAKAI*, and Junzo IMAI*

はじめに

内用固型医薬品の製剤的試験法として、第11改正日本薬局方(JP11)では、従来からの崩壊試験に加え、一部品目に溶出試験が適用された。これは溶出試験が医薬品の適正な有効性および安全性を図るため、よりバイオアベイラビリティに近い評価試験法として重要視されるようになったためである。しかし、溶出試験がバイオアベイラビリティとの関連において、なお研究途上であることもあって、JP11では溶出試験の適用は7品目であり、現時点では製剤設計および品質管理の判断基準の試験法にとどまらざるを得ない状況にある。

ところで、固型医薬品の薬効発現は医薬品の崩壊、主成分の溶出という過程を経ることから、一般的には崩壊と溶出との間には関連性の認められる場合が多い。そのため、崩壊特性は製剤設計のうえでも特に重要な指標としてとり扱われている。しかし、*in vivo*の観点から崩壊および溶出を考えると、胃内のpH変動は、当然両者に関連してくるものと推察され、またこれに関する報告もみられる¹⁾。

そこで、今回前報²⁾に引き続き一般用解熱鎮痛薬をとりあげ、用いる溶出液のpHと崩壊および溶出挙動の関係について検討したので報告する。

材料および方法

1. 試薬および標準溶液

²⁾前報と同様に調製した。

2. 試料

²⁾前報のA, B, C, Dのうち、A, B, D各1ロットを用いた。

3. 装置

崩壊試験器：萱垣医理工業 S. T. S 式

溶出試験器：富山産業 NTR-VS₃

高速液体クロマトグラフ (HPLC) :

日本分光 Triroter

4. 操作法

1) 崩壊試験：JP11の一般試験法、崩壊試験

2) 崩壊重量の測定：各錠剤は試験筒に入れ、一定時間上下運動させた後、未崩壊の残留物をとり出し、予め恒量にした秤量瓶に入れ、105°Cで2時間乾燥し重量を測定した。

3) 溶出試験：試験液は、pH1.2および6.8のものについては、JP11に規定された第1液および第2液を用いた。また、pH3.5の試験液は次のように調整した。

塩化ナトリウム 2.0g に0.2M リン酸二水素カリウム試液200ml, 0.1N 塩酸試液 12ml および水を加えて1,000mlとし、pH3.5に調整した。

溶出試験は、試験液900mlを用い、回転数は100rpmとし、パドル法³⁾で行った。他の条件はJP11の溶出試験法に準じた。

錠剤1個を丸底ビーカーに投入し、一定間隔で試験液5mlをとり、メンブランフィルター(0.8 μ m)で濾過した。濾液4mlに内部標準液1mlを加えて混合したも

* 岐阜県衛生研究所：岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health : 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500 Japan

のを HPLC 試験液とした。別に標準溶液1, 2, 4mlをとり、各々水を加え以下同様に操作して検量線を作成した。

4) HPLC条件

カラム：ODS80TM 5 μ m (4 mm \times 150mm), 溶離液：0.05% 炭酸アンモニウム溶液 - メタノール (60:40), 流速：1.0ml/min, 測定波長：280nm

4) 膨潤度の測定：シヤレ上の沓紙 (東洋No.2, ϕ 90mm) に試験液 2 ml を均一に浸込ませ、予め重量を

測定した錠剤1個を置いて一定時間後の重量を測定する。最初の重量に対する膨潤後の割合を求め膨潤度(%)とした。

結果および考察

1. 溶出特性に及ぼす試験液の pH の影響

崩壊試験における試験液は、錠剤の場合水の適用が規定されている。しかし、錠剤の崩壊および成分溶出

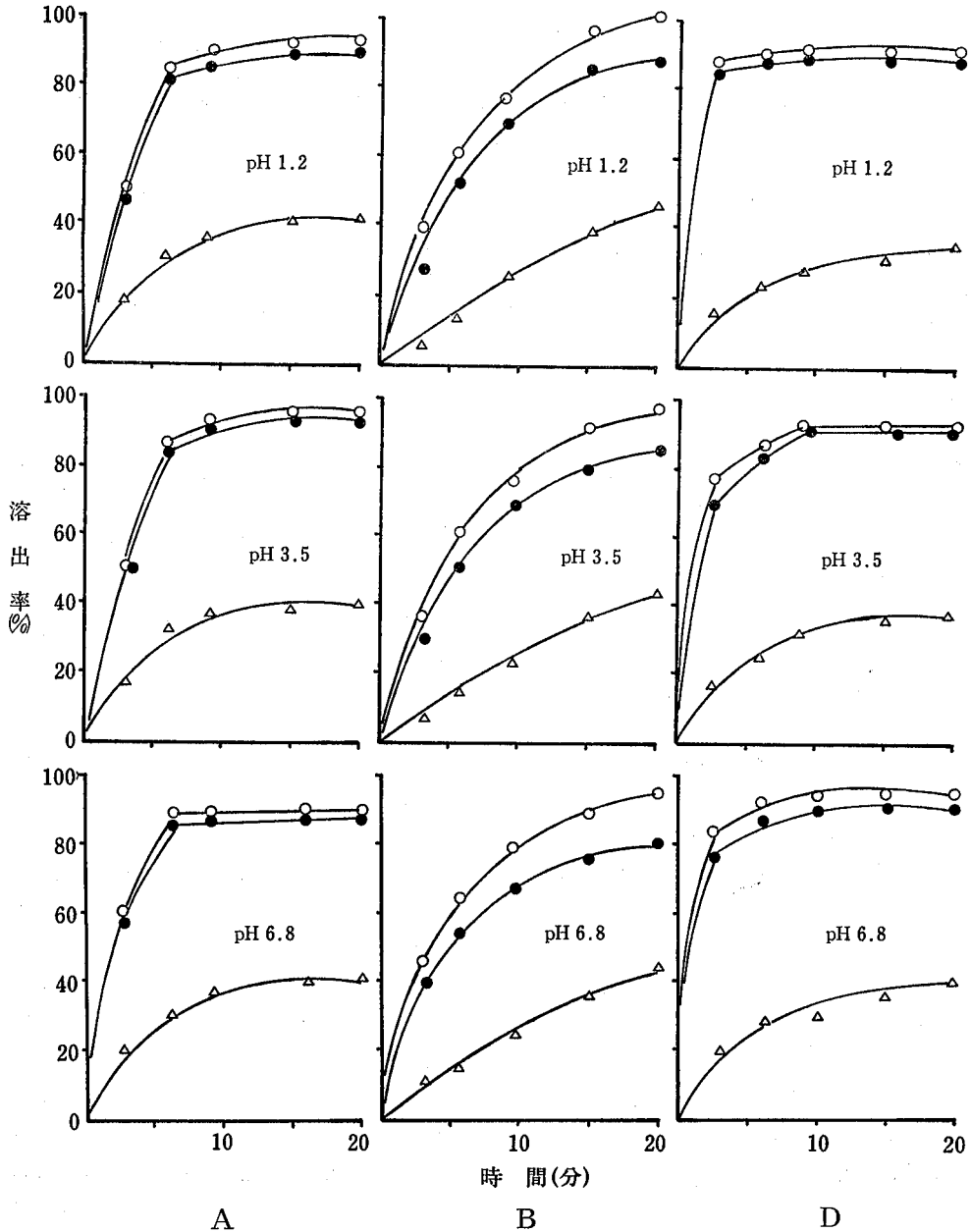


図1 成分溶出に及ぼす試験液の pH の影響

○—○：アセトアミノフェン, ●—●：無水カフェイン, △—△：エテンザミド

は胃液の酸度により影響されうるものと考えられる。したがって、成分溶出に対する胃内のpH変動の及ぼす影響を把握しておくことは、バイオアベイラビリティとの関連のうえでも重要なことである。図1は試験液のpHを変えた場合の溶出曲線を示したものである。その結果、試料A、BおよびDのいずれもpHの違いによる溶出曲線に差異は認められず、成分溶出に対する影響はほとんどないことが明らかとなった。また、崩壊試験においても試験液のpH差の影響は認められず、いずれの試料も7分前後で崩壊し、その崩壊重量曲線も直線的傾向が認められた。

次に品目別にみた溶出曲線は、AとDが類似しており、Bのアセトアミノフェンおよび無水カフェインの溶出はA、Dに比べてやや緩徐な傾向がみられた。また、その溶出時間は、80%溶出率でみた場合、Aではアセトアミノフェン、無水カフェインが約6分、Dでは約3分であったのに対し、Bのアセトアミノフェンは約10分、無水カフェインは15分以上を要した。

2. 主薬三成分の総溶出特性

試料AおよびBには、主薬としてアセトアミノフェン、無水カフェインおよびエテンザミドの三成分が、またDにはこの三成分の他にアスピリンアルミニウムが含有されている。そこで、試料中のこれら共通三成分の含有量に対する溶出量（総溶出）の比を求め、図2に示した。その結果、総溶出率が50%となる時間

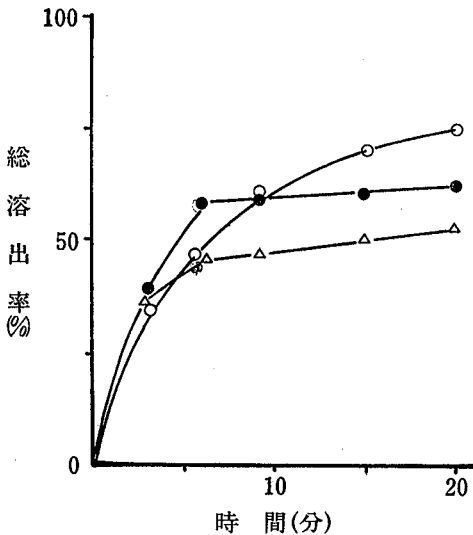


図2 主薬三成分の総溶出速度

●—● : A, ○—○ : B, △—△ : D
試験液 : pH6.8

は、Aが5分、Bが6分であるのに対しDは20分であった。このような総溶出特性の差異は、主薬三成分の薬効がともに解熱鎮痛作用であることを考慮すると、錠剤中の個々の成分含有量は各々異なるものの、いわゆる「効きめの速いあるいは遅い」ということに関係してくる。したがって溶出試験は、医薬品の使用目的によっては適正な溶出特性、即ち有効性を確保するためにも積極的な適用を図ることが必要であろう。

3. 総溶出率と崩壊重量

経時的な総溶出率と崩壊重量との関係を図3に示した。試料AおよびBの総溶出率および崩壊重量曲線は概ね3~4分までは一致しており、初期においては両者間に密接な関係がみられた。また、試験開始後4~5分からは両曲線間に隔たりがみられ、崩壊重量曲線がほぼ直線的であるのに対し、総溶出曲線は緩やかに上昇した。一方、試験開始20分後における総溶出率はBが75%と最も高く、次いでAの63%、Dの54%であった。これは、各試料中の三成分含有量に占めるエテンザミドの処方比(A57%、B31%、D72%)と良い符合を示しており、総溶出率でみた場合、エテンザミドが総溶出速度を律しているものと推測された。

4. 崩壊重量と膨潤度

固型医薬品の品質の評価については、従来から崩壊時間、硬度等の種々の特性値が用いられている。

そこで、今回崩壊性と密接な関係があるとされる膨

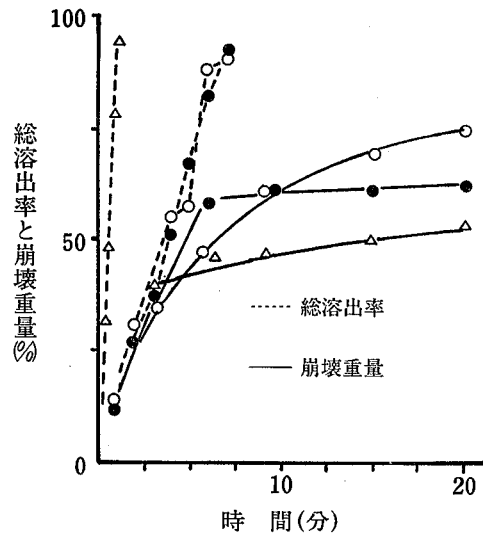


図3 総溶出率と崩壊重量の経時変化

●—● : A, ○—○ : B, △—△ : D
試験液 : pH6.8

ま と め

市販解熱鎮痛薬の崩壊性および溶出性について、その挙動を検討した。

溶出試験液の pH 変化が錠剤の溶出特性に及ぼす影響は認められなかった。また医薬品の使用目的によっては、より適正な有効性を確保するために、溶出試験の適用の必要性が示唆された。

崩壊と溶出の間には、溶出初期において密接な関係が認められた。

文 献

- 1) 青柳伸男, 鹿庭なほ子, 緒方宏泰: 第21回全国衛生化学技術者協年会年會講演集, 80P, 1984
- 2) 堀実代子, 坂井至通, 今井準三: 解熱鎮痛薬の崩壊と溶出, 岐衛研所報, 32, 22~26, 1987
- 3) 厚生省: 第11改正日本薬局方, 厚生省告示第49号, 1986
- 4) 江島 昭, 立沢政義, 松田りえ子: 混合製剤の分析について(13)高速液体クロマトグラフィーによるかぜ薬中の解熱鎮痛薬の定量, 医薬品研究, 12, 881~891, 1981

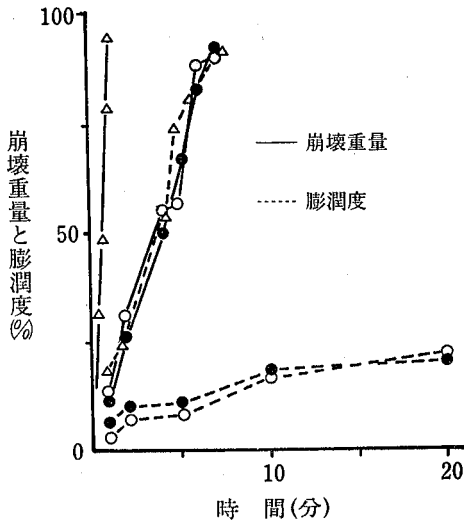


図4 崩壊重量と膨潤度の経時変化

●—●: A, ○—○: B, △—△: D
試験液: pH6.8

潤度を測り、試料の差異について検討を加えた。その結果、図4に示したように試料AおよびBの崩壊重量並びに膨潤度曲線は良好な一致を示した。このことから、AおよびBは、その溶出特性は異なるものの崩壊性、膨潤性等の製剤的特性はほぼ類似していることが推測された。

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.漢方エキス製剤中のグリチルリチン測定にお
けるシリカゲルカートリッジ前処理法の検討

坂井至通*, 堀実代子*, 今井準三*

Study on the Pretreatment with Silicagel Cartridge for the Deter-
mination of Glycyrrhizin in Extracts of Kanpo Preparations

Yoshimichi SAKAI*, Miyoko HORI* and Junzo IMAI*

はじめに

甘草は、厚生省指定の一般用漢方210処方の約7割¹⁾の処方に配合される重要生薬であり、その主成分のグリチルリチン (GLA) は、医薬品・化粧品の製造原料、食品中の甘味料として広く利用されている。GLAは、副腎皮質ホルモン類似構造を持つステロイド系サポニンで、GLAの長期大量服用によって、偽アルドステロン症などの電解質作用異常を誘発することが知られ、甘草およびGLAの一日最大服用限量が示されている²⁾。製造原料用GLAの測定法としては、紫外外部吸収法 (UV法)^{3~5)}が利用されているが、漢方エキス製剤中のGLAを測定する場合は、GLA類縁物質やフラボン系色素などの成分が妨害するため、UV法に代わってガスクロマトグラフ法 (GC法)⁶⁾、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC法)^{7~10)}が広く利用されている。しかし、GC法、HPLC法も漢方エキス製剤への直接応用が困難で、いずれも前処理を必要としている。著者らは、GC法における酸分解前処理の条件を検討し、すでに報告したが、今回は、HPLC法における前処理法として、逆相系シリカゲルカートリッジを用い、測定時の操作性、GLAの吸着量、処理時のGLA塩の化学形、漢方エキス剤への応用などの検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試薬

GLA標準品：HPLC分取品を和光純薬より購入し

た。

試料：GLA、グリチルリチンアンモニウム (NH₄塩)、グリチルリチンジカリウム (K₂塩)、グリチルリチンナトリウム (Na₃塩) は、常盤植物化学、丸善化成、アルプス薬品工業より、入手した。市販漢方エキス末は、十全大補湯、小青竜湯、加味逍遙散、酸棗仁湯、人參湯、柴胡桂枝湯、補中益氣湯、防風通聖散湯、抑肝散湯、桂枝加芍薬散、麻黄湯、麻杏薏甘散、小建中湯、苓桂朮甘湯、葛根湯、小柴胡湯、十味敗毒湯、大黃甘草湯、麻杏甘石湯、の20処方¹¹⁾のエキス末をアルプス薬品工業より入手した。

2. 装置

GC (島津4CM, FID)、原子吸光度計 (日立308フレーム)、HPLC (日本分光, TRIROTAR-V, UV IDEC-100-V)、カールフィッシャー水分測定器 (京都電子工業, MKA-3) を用いた。逆相系シリカゲルカートリッジは、Sep-pak C₁₈ (ウォーターズ社) を用いた。

3. 試験方法

1) 水分含量：第11改正日本薬局法 (日局11) 一般試験法水分定量法 (カールフィッシャー法) に準じた。

2) 規格試験：GLAおよびNH₄塩は化粧品原料規格基準⁴⁾、K₂塩は日本薬局方外規格、Na₃塩は食品添加物公定書⁵⁾に記載された方法に従ってそれぞれ含量を測定した。

3) GC法：前法¹¹⁾を用いた。

*岐阜県衛生研究所：500 岐阜市野一色4丁目6番3号

*Gifu Prefectural Institute of Public Health：6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

4) HPLC法: GLA 1-10mg 相当量の試料量を正確に秤取し, pH 8.0 のMcIlvaine緩衝液 10ml を加え超音波発生器中に約15分放置後, 必要ならば 3000 rpm で10分間遠心分離し試料溶液を得た. この試料溶液 5 ml を正確に取り, 予めメタノール10ml, 蒸留水10ml で順次洗浄した Sep-pak C₁₈ を通過させ溶出液Aを得た. 次に, 0.2 M クエン酸溶液10ml, 蒸留水10ml を順次通し溶出液BおよびCを得た. さらに, アセトニトリル:水 (1:1) 混液で, GLA を 5 ml のメスフラスコに溶出させ溶出液Dを得た. 溶出液Dについて, カラム LiChrosorb RP 18 (4mm, I. D. ×250 mm), 移動相 0.05 MKH₂PO₄ (pH 2.5)-CH₃ CN (63:37), 流速 0.6 ml/min, 測定波長 254 nm の条件で GLA を測定した. (以下, Sep-pak C₁₈ で前処理した HPLC 法を本法とする)

5) ポリアミド HPLC 法: 加藤の方法⁹⁾に準じた.

6) GLA 無機塩試験: 溶出液 A-D の Na, K は, それぞれ原子吸光度法で定量し, アンモニウムは, 日局11一般試験法アンモニウム試験を用いた.

結果および考察

1. Sep-pak C₁₈ への吸着と試料溶液の pH

試料溶液の pH による GLA の Sep-pak C₁₈ への吸着は, 図1に示したように pH 3.2 以下では, 著しく低下するが pH 3.4 から 8.0 までは良好であった. GLA および NH₄ 塩は, 水に対する溶解性が悪く, これらの試料溶液 (各 5 mg/ml) を冷暗所に数日保存したとき沈澱が生じたため, 試料溶液の調製には, pH 8.0 の McIlvaine 緩衝液を用いた. この緩衝液には, GLA の遊離形, NH₄ 塩, Na₃ 塩, K₂ 塩いずれも良く溶解し, 沈澱も生成しなかった.

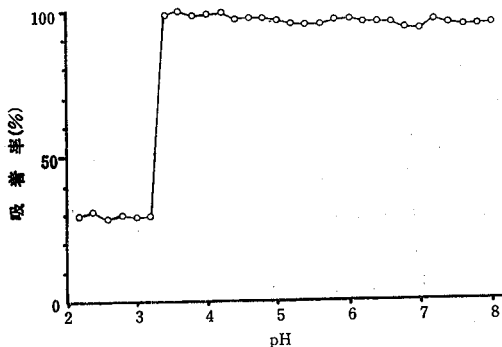


図1 GLA 吸着率に対する試料溶液の pH の影響

2. Sep-pak C₁₈ 処理速度および GLA 含量と GLA 吸着

試料溶液を Sep-pak C₁₈ に通す場合の GLA 吸着に及ぼす処理速度の影響を検討し図2に示した. GLA の Sep-pak C₁₈ への吸着率は, 処理速度 2.5 ml/min 以上では低下するので, これより小さい速度が必要であった. また, 試料溶液中の GLA 濃度と Sep-pak C₁₈ への吸着量との関係は, 図3に示したように, Sep-pak C₁₈ 1本当たり約10mgまでは, ほぼ 100% の回収率が得られた. さらに, GLA 2mg を 5, 10, 50, 100, 500, 1000ml に溶解し全液量を Sep-pak C₁₈ に通し吸着率を検討したところ, いずれも 100% の回収率を得た. このことは, 試料中の GLA 含量が少ない試料溶液でも, 液量を多くし, 全液量を Sep-pak C₁₈ 処理することによって GLA の濃縮が可能であることを示している.

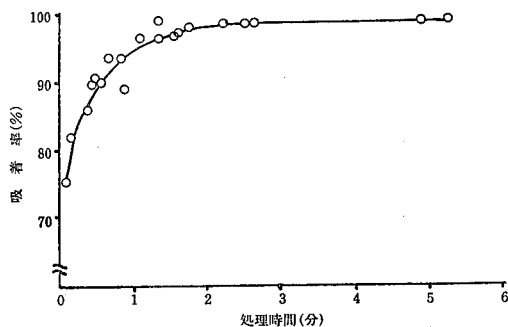


図2 GLA 吸着率に対する試料溶液処理速度の影響
(2 mg/5 ml の試料溶液を使用した)

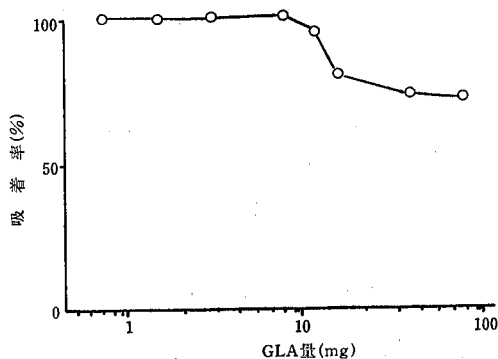
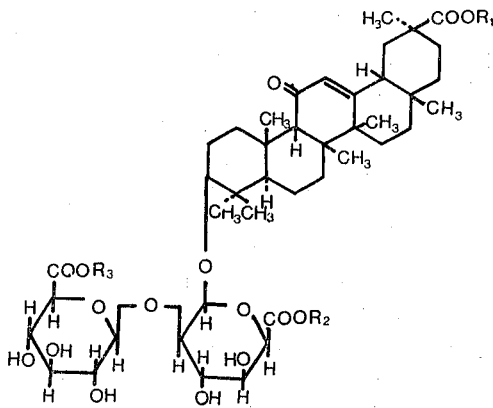


図3 Sep-pak C₁₈ 1本に吸着される GLA 量

3. 測定方法と GLA 含量

GLA は、図4に示したようなステロイド骨格のグリチルレチン酸と2分子のグルクロン酸より構成さ



	置換基	分子量
GLA (遊離形)	R ₁ =R ₂ =R ₃ =H	822.9
NH ₄ 塩	R ₁ =R ₂ =H, R ₃ =NH ₄	840.0
K 塩	R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =NH ₄	861.1
K ₂ 塩	R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =K	899.1
Na ₃ 塩	R ₁ =R ₂ =R ₃ =Na	888.9

図4 GLA およびその塩類の化学構造

表1 UV法, GC法および本法による医薬品等製造用原料中のGLA含量

GLA	水分含量 (%)	GLA 含量 (%)		
		UV法 (% , n=2)	GC法 (% , n=3)	本法 (% , n=3)
GLA (遊離形) *1	5.93	98.8	74.7	77.1
	4.43	97.0	74.2	84.5
	2.19	99.7	55.9	61.0
	3.15	99.7	65.7	65.2
NH ₄ 塩 *2	...	99.4	60.4	69.9
	6.21	100.1	79.6	82.1
	3.41	99.5	67.8	67.6
	3.30	99.2	71.6	72.3
	3.96	99.4	81.3	81.1
K ₂ 塩 *3	6.87	96.1	59.4	63.1
	4.00	96.3	76.3	77.9
	3.92	97.5	68.4	59.5
Na ₃ 塩 *4	3.09	106.6	33.3	17.1
	3.20	107.5	26.9	17.7

*1: 粧原基 (50%エタノールに溶解, 測定波長 252 nm)
 *2: 粧原基 (50%エタノールに溶解, 測定波長 252 nm)
 *3: 局外視 (蒸留水に溶解, 測定波長 259 nm)
 *4: 食添 (蒸留水に溶解, 測定波長 259 nm)

れ, カルシウム塩, カリウム塩として甘草中に6-14%¹⁸⁾含まれている. 医薬品や化粧品¹⁸⁾の製造原料, 食品中の甘味料としては, 遊離形, NH₄ 塩, K₂ 塩, K 塩, Na₃ 塩などが使用されている. これら製造用原料14品について, 公定法による含量試験, 水分含量, 分子吸光係数, GC法, 本法のそれぞれによって測定した結果を表1に示した. 水分含量は, 3-6%でほぼ同程度であった. GLA含量は, 遊離形がUV法で97.0-99.7%, GC法で55.9-74.7%, 本法で61.0-84.5%, 同様に, NH₄ 塩は, 99.2-100.1%, 60.4-81.3%, 67.6-82.1%, K₂ 塩は, 96.1-97.5%, 59.4-76.3%, 59.5-77.9%, といずれもUV法ではほぼ100%の定量値であったが, GC法, 本法では低い定量値を得た. また, Na₃ 塩は, UV法では, 106.6, 107.5%, であったが, GC法で33.3, 26.9%, 本法で17.1, 17.7%と極めて低い値を得た. GC法と本法の定量値は良く一致し, 相関係数は0.962であった. GC法では, 酸加水分解によってGLAをアグリコンのグリチルレチン酸にして測定するため, 配糖体部分を換算して(換算比1.748=GLA/グリチルレチン酸=822.94/470.67)GLA含量が計算される. このことから, UV法の定量値がほぼ100%を示し, GC法および本法で低い

定量値を示したのは, グリチルレチン酸とは構造の異なったUV吸収を持つ夾雑物の影響によるものと考えられた. Na₃ 塩において, GC法と本法で極めて低い値を得たことは, 公定法としてUV法の採用を再検討する必要性を示している.

4. Sep-pak C₁₈ 処理後のGLAの化学形

GLA標準品の化学形が遊離形であるため, 試料中のGLA含量は, 得られた標準品と試料のGLAのピーク面積比を各塩類の分子量を換算して求める. すなわち, NH₄ 塩, Na₃ 塩, K₂ 塩, K塩は, それぞれ換算比1.021, 1.080, 1.093, 1.046を用いて補正している. しかし, HPLC分析時のそれぞれ塩類の状態が明らかでない. そのため, Sep-pak C₁₈ 処理時の各溶出液中の各塩類量を測定し, 処理後の状態を検

表2 Sep-pak C₁₈ 処理時の塩類含量

GLA 塩	処 理 前 試料溶液	処 理 時 の 溶 出 液			
		(A)	(B)	(C)	(D)
NH ₄ 塩	2.22	0.14	2.22	n. d.	n. d.
K 塩	4.46	n. d.	3.93	n. d.	n. d.
K ₂ 塩	8.76	n. d.	8.25	n. d.	n. d.
Na ₃ 塩	4.54	0.27	3.65	n. d.	0.16

(A): 溶出液A (B): 溶出液B (C): 溶出液C

(D): 溶出液D

測定方法: K塩, K₂塩, Na₃塩のカリウムおよびナトリウムは原子吸光光度法で測定し, NH₄塩は水蒸気蒸留後ネスラー試液で比色定量した。

n. d. : 検出限界 (いずれも 0.1%) 以下

討した。その結果, 表2に示したように, 処理後はいずれの塩も遊離形になっていることが認められた。

Sep-pak C₁₈ 処理後は, 標準品, 試料共に遊離形になっているため, 換算比を用いた補正を適用できることが確認された。

5. 漢方エキス剤への応用

漢方エキス剤中の GLA 含量を, 本法, GC法, ポリアミド HPLC 法で測定し, それぞれの定量値を, また, 漢方エキス剤に GLA 標準品を添加し本法での添加回収率を, 表3に示した。添加回収率の低いエキス剤を数処方 (小柴胡湯, 十味敗毒湯, 大黃甘草湯, 麻杏甘石湯) 認めた。また, GC法の値が, 本法に比べ2倍程高いエキス剤 (人參湯, 桂枝加芍薬湯, 苓桂朮甘湯, 葛根湯) を認め, GC測定では甘草以外に配合された生薬成分の影響を考慮する必要があると思われた。

小川¹⁴⁾らは, 漢方処方中に麻黄が配合されている場合, 麻黄中の成分と GLA が結合し沈澱するため, エキス中の GLA 含量が低くなることを報告している。今回の結果から, 定量値の低い処方に麻黄を配合した処方 (麻杏甘石湯, 神秘湯, 葛根湯, 麻杏薏甘散, 麻黄湯) が多いものの, 大黃甘草湯, 十味敗毒湯, 小柴胡湯などの処方には麻黄が配合されておらず, 麻黄以外の配合生薬との作用が考えられた。

表3 本法, GC法, ポリアミド HPLC 法による漢方エキス製剤中 GLA 含量測定および本法での添加回収率

漢方処方名	GLA 添加回収率 (%, n=2)	GLA 含量 (%, n=2)		
		本法	GC 法	ポリアミド HPLC 法
十全大補湯	102.9	0.35	0.24	...
小青竜湯	102.5	0.70	0.61	0.59
加味逍遙湯	100.6	0.91	0.78	0.98
酸棗仁湯	100.3	0.58	0.57	...
人參湯	98.2	0.94	2.02	1.78
柴胡桂枝湯	98.2	0.41	0.41	...
補中益氣湯	98.1	0.43	0.55	...
防風通聖散	97.8	0.75	0.68	...
抑肝散	97.6	0.72	0.77	...
桂枝加芍薬散	97.3	0.58	1.2	...
麻黄湯	95.0	0.88	1.03	0.89
麻杏薏甘散	93.6	1.14	0.94	...
小建中湯	92.7	0.14	0.16	...
苓桂朮甘湯	91.8	0.74	1.7	...
葛根湯	91.6	0.89	1.17	0.79
神秘湯	91.0	0.64	1.0	...
小柴胡湯	84.0	0.64	0.73	...
十味敗毒湯	80.0	0.37	0.43	...
大黃甘草湯	79.1	1.37	...	1.49
麻杏甘石湯	73.8	1.60	1.47	1.13

... 測定せず

ま と め

Sep-pak C₁₈ を前処理に応用した時の利点としては, 試料中の GLA を迅速に処理でき, HPLC カラムの劣化や目詰りによる流速変化の防止に役立つほか, GLA を濃縮できるため, GLA 含量の少ない漢方エキス剤にも応用可能であった。

現在, 医薬品原料等に使用される GLA の公定法 (UV法) は, 夾雑物の影響を考慮していないことから GLA の測定には適していないと思われた。また, 本法は, 操作が容易で迅速に GLA を測定できることから, 従来の GLA 測定法に比べ有用性の高い方法と思われる。

謝 辞

本研究を進めるに当たり, ご指導頂いた, 岐阜薬科大学小瀬洋喜教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 坂井至通, 今井準三, 堀実代子: 漢方エキス製剤の薄層クロマト分析による確認試験法の検討, 岐衛

- 研所報, 32, 17-21, 1987
- 2) 厚生省薬務局通知: グリチルリチン酸等を含有する医薬品の取り扱いについて, 薬発第153号, 昭和58年2月13日
 - 3) 厚生省薬務局審査課: 化粧品原料基準, 第2版, 113-117, 薬事日報社, 1982
 - 4) 厚生省薬務局審査課: 日本薬局方外成分規格, 249-254, 薬業時報社, 1983
 - 5) 石館守三, 谷村顕雄: 第5版食品添加物公定書, D268-275, 広川書店, 1987
 - 6) 日本薬学会編: 衛生試験法注解, 233-236, 金原出版, 1980
 - 7) 冠 政光, 西島基弘, 観 公子, 中里光男, 木村康夫, 直井家躰太: 食品中のグリチルリチン酸の分析法, 東京都衛研年報, 29-1, 193-198, 1987
 - 8) 北田善三, 玉瀬喜久雄, 佐々木美智子, 西川喜孝: 高速液体クロマトグラフィーによるグリチルリチン酸の定量, 食品衛生学雑誌, 21(5), 354-359, 1980
 - 9) 加藤三郎: 高速液体クロマトグラフィーによる食品中のグリチルリチン酸の定量, 衛生化学, 26(6), 318-321, 1980
 - 10) 岡田憲三, 田中 順, 宮下 晶, 井元勝恵: 高速液体クロマトグラフィーによる甘草成分の分析 (第1報) グリチルリチン酸の定量, 薬学雑誌, 101, 822-828, 1981
 - 11) 堀奥代子, 坂井至通, 今井準三, 日比 誠: グリチルリチン酸の定量における酸加水分解条件の検討, 岐衛研所報, 30, 52-56, 1985
 - 12) 日本公定書協会編: 第11改正日本薬局方解説書, B179-184, 広川書店, 1986
 - 13) The MERCKINDEX, eighth edition, 502, 1968
 - 14) 小川俊太郎: 生薬主成分の分析化学的研究 (第2報) 甘草含有製剤中のグリチルリチン酸の高速液体クロマトグラフィーによる定量, 薬学雑誌, 96, 1488-1491, 1976

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

神経芽細胞腫マスキリーニング検査に おける防腐剤添加ろ紙利用の試み

(第1報) Dip法の変法とHPLC法

田中久子*, 今井準三*

Antiseptic Effects of Filter Paper with Disinfectant for Mass-Screening of Neuroblastoma

(1) Study of Dip-test and HPLC

Hisako TANAKA* and Junzo IMAI*

はじめに

神経芽細胞腫マスキリーニングをDip法と高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により実施しているが、ろ紙尿中のクレアチニン(Cre)、ホモバニリン酸(HVA)が異常低値を示すものに遭遇した。

著者らは低下の原因について検討を加え、細菌汚染による場合があることを明らかにした。細菌汚染防止対策として、比較的低濃度でも殺菌力が強く、皮膚刺激性の少ない塩化ベンザルコニウム添加ろ紙、グルコン酸クロルヘキシジン添加ろ紙の使用を考え、良好な結果を得た。

ところが塩化ベンザルコニウムを添加することにより、その量によってはDip法の発色が抑えられること及び退色が著しいことが判明した。そこで、Dip法のジアゾ化反応の系に界面活性剤等を添加し、塩化ベンザルコニウムによる妨害を抑える方策を検討した。また塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジン(ヒビテン)の、HPLCによるバニルマンデル酸(VMA)、HVA測定への影響についても検討したので報告する。

材料および方法

1. 試薬、標準ろ紙

(1) 0.1% p-ニトロアニリン液: p-ニトロアニリ

ン(特級) 1.0gに濃塩酸20mlを加え、振り混ぜながら穏やかに加熱して溶かし、水を加えて1ℓとした。(4°C保存)

(2) 0.2% 亜硝酸ナトリウム液: 亜硝酸ナトリウム(特級) 2.0gに水を加えて溶かし、1ℓとした。(4°C保存)

(3) 10%炭酸カリウム液: 炭酸カリウム(特級) 10gに水を加えて溶かし、100mlとした。これに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS, 和光, 生化学用), トリトンX-100(和光, 化学用), ポリオキシエチレンラウリルアルコールエーテル(Brij35, 半井, アミノ酸自動分析用), 塩化アルミニウム(和光一級), デオキシコール酸ナトリウム(Deso, 東京化成, GR)等を適宜単独でまたは混合して添加した。

(4) VMA標準ろ紙: VMA(東京化成, GR) 20mgを精秤し、0.1N HClを加えて溶かし、正確に100mlとした。これを水で希釈して10μg/mlのVMA標準液を調製した。標準液をビーカーにとり、ろ紙(東洋ろ紙No.63, 1.5×5cm)を30秒浸したものを標準ろ紙とした。(チャック付ビニール袋に入れ、-15°Cで凍結保存)

(5) 塩化ベンザルコニウム添加標準ろ紙, ヒビテン添加標準ろ紙: (4)で10μg/ml VMA標準液を調製する際、塩化ベンザルコニウム液(日局, オスバン液「ダイゴ」大五栄養化学), グルコン酸ヘキシジン液(日

* 岐阜県衛生研究所: 500 岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

局, ヒビテングルコネート, 住友製薬) をそれぞれ 0.01%または0.02%になるように添加し, (4)と同様にろ紙を浸して調製した。

(6) 発色試薬:(1), (2), (3)をこの順に1:1:2の割合で混合した。

特に示さなければ, 他は全て試薬特級を用いた。

2. 装置

分光光度計(日立200-20)

高速液体クロマトグラフ(HPLC):日立655-A

3. 測定法

1) Dip法

中田らの方法⁶⁾に従った。ただし発色試薬を前項1,

3)に記載した様に一部変更した。

2) HPLC法に対する塩化ベンザルコニウムの影響

VMA20mg, HVA40mgを精秤し, 各40μg/mlとなるよう0.1N HClを加え, さらにその10mlをとり, 0.1%塩化ベンザルコニウム液20mlを加え水で正確に100mlとした。これをそのまま, または食塩飽和にして酢酸エチル抽出したもの⁷⁾について測定した。また, 対照として塩化ベンザルコニウムを添加しない溶液についても同様に操作し, 測定した。

3) HPLC法に対するヒビテンの影響

VMA, HVAを添加したプール尿(VMA2.8μg/ml, HVA6.5μg/ml) 0.45mlに, 0.2%ヒビテン水溶液または水を0.05ml加えた。これらについて, そのまままたは塩酸酸性, 食塩飽和条件下で酢酸エチル抽出したもの⁷⁾について, VMA, HVAを測定した。

4) HPLC条件

カラム: Nucreosil 5C₁₈ (内径4mm×長さ150mm)。溶離液: 0.03M KH₂PO₄ (pH3.0, EDTA2Na10⁻⁴M加)+CH₃CN (925+75)。流速: 0.7ml/min, クロマトリー電解電圧: +0.60V。カラム温度: 40°C

結果および考察

1. 塩化ベンザルコニウム添加VMA標準ろ紙のためのDip法に関する検討

1-1 方法の適応化

塩化ベンザルコニウムは陽イオン界面活性剤であり, 菌の細胞膜に作用して膜の透過性に障害を起し, 溶菌させる。その殺菌力に着眼し, 塩化ベンザルコニウム添加VMA標準ろ紙を用いたが, 通常のDip法に

表-1 塩化ベンザルコニウムによる発色妨害, 退色に対するSDS, トリトン, AlCl₃の抑制効果

判定時間	直後	5分後	45分後	23時間後
0.1% SDS	差	(-) = (+)	(-) ≥ (+)	(-) > (+)
0.1%トリトン (+0.1%SDS)	な	(-) = (+)	(-) = (+)	(-) = (+) 退色
0.05M AlCl ₃		(-) = (+) うすい	(-) > (+)	(-) ≥ (+) 色消失
0.1%トリトン+0.05M AlCl ₃		(-) = (+) うすい	(-) > (+)	(-) = (+) 色消失

(-): 塩べ無添加ろ紙, (+): 塩べ0.01%添加ろ紙, 記号=, ≥, <, =は, 発色させたろ紙の色の濃淡を比較した結果を示す。

表-2 SDS, Brijの抑制効果

判定時間	6分後	20分後	17.5時間後
0.1% SDS + 0.5% Brij	(-) = (+)	(-) > (+)	(-) > (+) 辺縁黄
0.2% SDS + 0.6% Brij	(-) = (+) うすい	(-) = (+) うすい	(-) < (+) 辺縁黄
0.5% Brij	(-) = (+) うすい	(-) > (+) うすい	(-) > (+) 辺縁黄, 退色
—	(-) = (+)	(-) > (+)	(-) > (+) 退色, (+)全面黄

(-): 塩べ無添加ろ紙, (+): 塩べ0.01%添加ろ紙, 記号=, >, <は, 発色させたろ紙の色の濃淡を比較した結果を示す。

より発色させた場合、発色の抑制と著しい退色が認められた。これは、VMA 発色反応（ジアゾカップリング）における p-ニトロアニリン由来のジアゾニウム塩と4級アンモニウム塩である塩化ベンザルコニウムの競合反応によるのではないかと考えられた。そこで、これらの妨害を除去する方法について検討を加えた。

まず塩化ベンザルコニウム0.01%、VMA10 μ g/mlの標準ろ紙について、次の4種の10%炭酸カリウム液でDip法により発色させた。①0.1%SDS添加液 ②0.1%トリトン添加液 ③0.05M AlCl₃添加液 ④0.1%トリトン、0.05M AlCl₃添加液。このうち②については、退色防止のため発色1時間後に0.1%SDS液に浸漬した。表-1にその結果を示したが、発色45分後に塩化ベンザルコニウム添加と不添加で差がなくても、23時間後ろ紙が乾燥した時には肉眼でも差が認められ、紫色が消失するものも認められた。Dip法において塩化ベンザルコニウムによる発色抑制、退色等を抑えるには、陰イオン界面活性剤であるSDS、非イオン性界面活性剤のトリトン、キレート作用のあるAlCl₃、いずれもその効果は充分ではなかった。

表-2にSDSとBrij35（非イオン性）を添加した結果を示したが、ここでも良い結果は得られなかった。

次に、塩化ベンザルコニウム0.01%、0.02%のVMA10 μ g/mlろ紙について、SDSとこれも界面活性作用

のあるDesoを量比を変えて添加した結果を、表-3に示した。①~⑩では、発色30分後まで、どれもほとんど差は無かった。通常のルーチンワークでは、発色直後、15分後に判定した結果を重視しているため、①~⑩の条件ならばどれもよいということになる。発色済ろ紙を風乾後1年保存するという事を考慮に入れると、少なくともろ紙が完全に乾燥した時に退色が著しくは不相当であると判断できる。したがって表-3から、②、⑥、⑦、⑧、⑨がよいと思われたので、⑥の条件（SDS 0.2%、Deso0.6%）を選定した。

1-2 SDS-Deso 試薬の安定性

Dip法において、0.1% p-ニトロアニリン液と0.2%亜硝酸ナトリウム液は、ジアゾ化反応のため4°C保存する必要がある、またこれらの濃度は比較的正確でなくてはならない。一方10%炭酸カリウム液は、単に液性をアルカリにするためのものであり、その濃度変化、液温はさほど反応系に影響しないと思われる。したがって、通常Dip法により検査を行う時、新たに調製するのは10%炭酸カリウム液だけである。これにSDS-Desoを添加すると、毎回の試薬調製が複雑になる。そのため、あらかじめ調製して冷蔵保存しておく。0.2%亜硝酸ナトリウム溶液に、SDSとDesoを、それぞれ0.8%、2.4%（発色試薬中濃度は0.2%、0.6%）添加した。これについて、3ヶ月間経時的にDip法により発色させ、その安定性を検討した。ろ紙はVMA

表-3 SDS, Deso 抑制効果

	SDS%	Deso%	直後	15分後	30分後	45分後	90分後	180分後	24時間後
①	0.1	0.1	差	差	-	ろ紙表面が乾燥して白っぽくなる	差なし	(-)≒0.01>0.02	(-)≒0.01≧0.02
②	0.1	0.2						(-)≒0.01≒0.02	(-)≒0.01≒0.02
③	0.1	0.4						(-)≒0.01≧0.02	(-)≧0.01≒0.02
④	0.2	0.2	なし	なし	-	ろ紙表面が乾燥して白っぽくなる	差なし	(-)≒0.01≧0.02	(-)≧0.01≒0.02
⑤	0.2	0.4						(-)≒0.01>0.02	(-)≒0.01≧0.02
⑥	0.2	0.6						(-)≧0.01≧0.02	(-)≒0.01≒0.02
⑦	0.4	0.4						(-)≒0.01≧0.02	(-)≒0.01≒0.02
⑧	0.4	0.6						(-)≧0.01≧0.02	(-)≧0.01≒0.02
⑨	0.4	0.8	し	し	-	-	0.02 薄い	(-)≒0.01>0.02	(-)≒0.01≧0.02
⑩	-	-	⑩若白っぽい	干				0.02 薄い	(-)≧0.01>0.02
⑪	-	0.6			(-)≧0.01≒0.02	(-)≒0.01≒0.02			

(-)：塩べ無添加ろ紙、0.01および0.02；塩べ0.01および0.02%添加ろ紙、記号≒、>、≧等は、色の濃淡を示す。

標準ろ紙 (5~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 塩化ベンザルコニウム添加標準ろ紙 (0.01, 0.02%, VMA はそれぞれ5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) について行った。

3ヶ月間発色に何ら影響はなく, SDS-Deso 加亜硝酸ナトリウム液は安定であった。なお, 塩化ベンザルコニウム添加ろ紙に含まれる VMA は, 表-4 から3ヶ月間安定であるという結果がよみとれた。

表-4 塩べろ紙中 VMA の安定性 (単位 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

ろ紙	保存時間	3日	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
		塩べ0.01%	5.84	4.97	5.48
VMA 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.02%	5.63	4.91	5.27	5.49
VMA	0.01%	11.0	10.2	10.7	10.8
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.02%	11.4	9.71	10.7	10.9
VMA	0.01%	23.1	20.4	20.9	21.8
20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.02%	23.2	20.4	21.4	22.3
VMA	0.01%	34.6	30.6	33.1	33.8
30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.02%	35.0	30.3	33.2	32.1

凍結保存ろ紙を解凍後, しぼり出してHPLCで定量

2. ヒビテンろ紙のためのDip法に関する検討

ヒビテンを0.02%含有する標準液 (VMA 5~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) について, 通常の Dip 法により発色させた。塩化ベンザルコニウム添加ろ紙にみられたような発色妨害, 退色は認められず, VMA が30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で少し色調が赤味を帯びたものになるだけで, 特別に方策を考へる必要はないと思われた。

3. 塩化ベンザルコニウムの HPLC 法への影響

VMA, HVA 標準液について塩化ベンザルコニウム

表-5 塩化ベンザルコニウムのVMA, HVA 測定に及ぼす影響

抽出	塩ベ	VMA (%)	HVA (%)
無	(-)	100	100
	(+)	99.2	99.0
有	(-)	92.1	101
	(+)	92.2	101

VMA (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HVA (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 標準液について塩べ(-), 抽出無の値を100とした。

の影響を調べた結果を表-5に示した。塩化ベンザルコニウムが添加されても, 感度および酢酸エチル抽出率に影響は認められなかった。また, HPLCのチャートにも変化は認められなかった。クロマトリーの検出器およびカラムへの影響の有無については, 長期間使用した後でなければ断言できない。

4. ヒビテンのHPLC法への影響

標準液およびプール尿について, ヒビテン存在下 (0.02, 0.05%) での測定値への影響を調べた結果を表-6に示した。ヒビテンは塩化ベンザルコニウムと同様に, 測定値には影響しなかった。クロマトリー検出器への影響 (劣下促進) 等については, 塩化ベンザルコニウムと同様に断言はできない。

表-6 ヒビテンの VMA, HVA 測定に及ぼす影響

	ヒビテン (%)	VMA (%)	HVA (%)
標準液	0	100	100
	0.02	105	101
	0.05	102	102
プール尿	0	100	100
	0.02	109	102
	0.05	101	102

標準液: VMA3.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, HVA4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

(抽出なし)

プール尿: VMA2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, HVA6.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (抽出)

それぞれヒビテン(-)の値を100とした。

ま と め

神経芽細胞腫マスキングのろ紙尿の細菌汚染を防止する目的で, 塩化ベンザルコニウム, ヒビテンを添加した場合の Dip 法への影響, および HPLC 法による VMA, HVA 測定への影響について検討を加えた。

その結果, 塩化ベンザルコニウムを添加した場合は, Dip 法の発色妨害, 退色が認められた。これらの妨害を除去する方策としては, 塩化ベンザルコニウム 0.02% 添加の VMA 標準液 (5~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) については, Dip の反応系に SDS-Deso を添加することにより解決できることが判明した。0.2% 亜硝酸ナトリウム液に SDS を 0.8%, Deso を 2.4% 添加すれば充分であり, この SDS-Deso 加亜硝酸ナトリウム液は, 3

ヶ月間は充分安定であった。

ヒビテン0.02%含有標準列では、妨害は認められず、通常のDip法で判定可能であった。

塩化ベンザルコニウム、ヒビテンどちらもHPLC法には何ら支障を認めなかったが、長期使用による検出器およびカラム劣下等の影響については、今後の検討課題である。

文 献

- 1) 今井準三, 田中久子, 坂井至通, 森下有輝: 岐阜県における神経芽細胞腫マスキューニング結果について, 岐衛研所報, **32**, 34~37, 1987
- 2) 今井準三, 田中久子, 後藤喜一, 森下有輝, 河合信: 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿のクレアチニン異常低下の解析, 日衛誌, **42**, (1), 511, 1987
- 3) 田中久子, 今井準三, 大野勝弘, 後藤喜一, 河合信: 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究(第1報)クレアチニン分解菌の分離と汚染状況, 日本公衛誌, **34** (10, 特別附録) 446, 1987
- 4) 今井準三, 田中久子, 大野勝弘, 坂井至通, 後藤喜一, 河合信: 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究(第2報)クレアチニン分解菌汚染防止についての検討, 日本公衛誌, **34**(10,特別附録) 447, 1987
- 5) 今井準三, 田中久子, 大野勝弘, 後藤喜一, 河合信: 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究(第3報)クレアチニン分解菌汚染防止目的の塩化ベンザルコニウム添加ろ紙の試用成績, 日衛誌, **43**(1), 476, 1987
- 6) 中田利一, 石井護治, 児玉京子, 三谷一憲, 土平一義, 山下克己, 磯村修三, 角岡秀彦, 加藤敬純, 長縄伸幸, 正岡昭, 加藤浩: Dip法を利用した乳児期における神経芽細胞腫のVMA (Vanillyl mandelic acid) の検査, 日本公衛誌, **30**, 227~233, 1983
- 7) 今井準三, 田中久子: 神経芽細胞腫マスキューニングの精度向上に関する検討(第2報)高速液体クロマトグラス法による尿中VMA, HVA定量法の検討, 岐衛研所報, **32**, 30~33, 1987

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

神経芽細胞腫 マスクリーニング検査に おける防腐剤添加ろ紙利用の試み

(第2報) クレアチニン定量

田中久子*, 今井準三*

Antiseptic Effects of Filter Paper with Disinfectants for Mass-Screening for Neuroblastoma

(2) Determination of Creatinine

Hisako TANAKA*, and Junzo IMAI*

はじめに

神経芽細胞腫マスクリーニングを¹⁾Dip法で行う際、クレアチニン (Cre), ホモバニリン酸 (HVA) を消失させるような細菌の汚染防止対策として、塩化ベンザルコニウム (塩ベ) 添加ろ紙, グルコン酸クロロヘキシジン (ヒビテン)^{2~3)} 添加ろ紙の使用が考えられる。

しかし、塩ベ添加ろ紙よりしぼり出した尿について、Jaffe 反応法で Cre 定量を試みると、反応液に混濁がみられ、測定不能であった。この現象は、添加した塩ベに由来するものであることが判明した。

そこで、この妨害を取り除くため若干検討を加えたので報告する。

材料及び方法

1. 試薬, 標準溶液

(1) 0.04Mピクリン酸溶液: ピクリン酸 (和光, 特級) 12.5gに水1ℓを加えて溶かす。室温に24時間放置し、上清900mlに水300mlを加え、混合する。

(2) 0.75M水酸化ナトリウム液: 水酸化ナトリウム (和光, 特級) 3gに水を加えて溶かし、100mlとする。

(3) クレアチニン標準溶液: クレアチニン (和光, 特級) 100mgをとり、0.1NHCℓを加えて溶かし、100ml

とする。その25mlをとり0.1NHCℓを加えて100mlとする。(25mg/dℓ)

(4) 塩ベ液 (日局, オスバン液「ダイコ」大五栄養化学), グルコン酸クロロヘキシジン液 (日局, ヒビテングルコネート, 住友製薬), トリトン X-100 (和光純薬, 化学用), 他は特に示さない限り試薬特級を用いた。

2. 装置

分光光度計 (日立200-20)

3. 測定法⁴⁾

Cre 標準溶液および尿 0.2mlに水 5.2ml, 0.04Mピクリン酸溶液2.0ml, 0.75M水酸化ナトリウム溶液2.0mlを加え、よく混和する。30分静置後の515nmにおける Cre 標準液の吸光度を Abs·st および被検尿のそれを Abs·u とする。水 0.2mlについても同様に操作し、Abs·Bl を得る。

計算式

$$C = \frac{\text{Abs} \cdot u - \text{Abs} \cdot \text{Bl}}{\text{Abs} \cdot \text{st} - \text{Abs} \cdot \text{Bℓ}} \times k$$

k: 標準液の Cre 濃度 (mg/ml)

c: 尿の Cre 濃度 (mg/ml)

結果および考察

1. トリトン X-100の反応系への影響
Cre 標準液 0.2mlに 0.1%トリトン X-100水溶液を

* 岐阜県衛生研究所: 500 岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

0~5.0ml添加し、さらに水を加えて全量5.2mlとした。以下、測定法に従って操作し、発色させた。水0.2mlについても同様に操作し、発色後30分、45分、60分の吸光度を測定した。その結果を、表-1に示した。

0.1%トリトン X-100水溶液を5mlまで添加しても、ブランク、標準溶液の発色に全く影響しないことが確認された。

2. トリトンによる塩ベ由来の混濁の抑制効果

塩ベ添加ろ紙をDip法により検査する場合、塩ベによる発色妨害、退色のため、せいぜいその添加量は0.02%までである。ここでは余裕をみて、0.05%塩ベ液で検討した。

標準溶液0.2mlに0.05%塩ベ液0.2mlおよび0.1%トリトン0~4.8mlを加え、更に水を加えて5.2mlとし、以下測定法に従って操作し、吸光度を測定した。その結果を表-2に示した。

反応30分後から60分後までのどの時点でもCre標準液とブランクの吸光度の差はほとんど一定であり、塩ベはCreとピクリン酸の反応を妨害しないと思われた。

塩ベ0.05%溶液では、0.1%トリトンを2ml以上添加すれば混濁は完全に抑制可能であった。

乳児尿0.2mlについても検討し、その結果を表-3に示した。尿0.2mlに水5.0ml添加したもの、尿0.2mlに0.1%トリトン5.0ml添加したもの、尿0.2mlに0.1%トリトン4.8mlと0.1%塩ベ0.2ml添加したものについて、測定法に従って操作し発色させた。

表-1 トリトンX-100の反応系への影響

反応時間(分)		30		45		60	
	0.1%トリトン量(ml)	Abs.	△	Abs.	△	Abs.	△
Bl	0	0.044	—	0.042	—	0.042	—
	1.0	0.045	—	0.041	—	0.042	—
	2.0	0.044	—	0.042	—	0.042	—
	3.0	0.044	—	0.042	—	0.042	—
	4.0	0.043	—	0.042	—	0.042	—
	5.0	0.044	—	0.042	—	0.042	—
St	0	0.406	0.362	0.404	0.362	0.402	0.360
	1.0	0.407	0.362	0.404	0.363	0.403	0.361
	2.0	0.409	0.365	0.403	0.361	0.402	0.360
	3.0	0.409	0.365	0.403	0.361	0.401	0.359
	4.0	0.409	0.366	0.403	0.361	0.403	0.361
	5.0	0.408	0.364	0.403	0.361	0.403	0.361

Abs. : 波長515nmでの吸光度, △ : Abs. st-Abs. Bl

表-2 トリトンによる濁濁抑制効果(標準液)

反応時間(分)		30		45		60	
	0.1%トリトン量(ml)	Abs.	△	Abs.	△	Abs.	△
Bl	0*	0.050	—	0.053	—	0.054	—
	0**	0.145	—			0.155	—
	0.6	0.056	—	0.069	—	0.073	—
	1.0	0.054	—	0.057	—	0.065	—
	2.0	0.053	—	0.047	—	0.059	—
	3.0	0.050	—	0.043	—	0.056	—
	4.0	0.050	—	0.043	—	0.056	—
	4.8	0.050	—	0.043	—	0.056	—
St	0*	0.403	0.353	0.409	0.356	0.410	0.356
	0**	0.622	0.477			0.635	0.480
	0.6	0.411	0.355	0.420	0.351	0.431	0.358
	1.0	0.413	0.359	0.413	0.356	0.423	0.358
	2.0	0.407	0.354	0.408	0.361	0.410	0.351
	3.0	0.408	0.358	0.408	0.365	0.410	0.354
	4.0	0.407	0.357	0.407	0.364	0.409	0.353
	4.8	0.408	0.358	0.407	0.364	0.410	0.354

Abs. : 波長515nmでの吸光度, △ : Abs. St-Abs. Bl

* : 塩ベを添加しないときの測定値

** : 0.05%塩ベ溶液を0.2ml加えたときの測定値

ブランク、尿ともに吸光度に差はなく、尿についてもトリトンは反応系に影響しないこと、ならびに塩ベの妨害を抑制することが確認された。

この尿についての添加回収率は、反応時間30分後で98.6%、また60分後では97.2%であった。

3. Cre 測定におよぼすヒビテンの影響 (標準溶液, 尿)
標準液0.2mlに0.02%ヒビテン0~0.5mlを添加し、さらに水を加えて5.2mlとした。以下測定法に従って操作し、発色させた。対照として、水0.2mlについても同様に操作した。

反応時間30分~60分の吸光度を表一4に示した。ヒビテン0.01~0.05%は、反応後30分~60分の範囲で、ブランク、Cre 標準溶液どちらの反応系にも影響を与えることはなく、トリトン等の添加は必要ないと考えられた。

乳児2名の尿(尿A、B)それぞれ0.2mlに対し、0.02%ヒビテンを0.2mlまたは0.5ml添加し、さらに水を加えて5.2mlとした。これは、ヒビテンを0.02%または0.05%含有する尿0.2mlに、水5.0mlを添加した場合に相当する。これらについて測定法に従い操作し、発色させた。結果を表一5に示した。

尿についても、ヒビテンは反応に影響を与えないことが確認された。

ま と め

Jeffe 反応法による Cre 測定においてみられた、塩化ベンザルコニウ

表-3 トリトンによる混濁抑制効果 (尿)

反応時間(分)	30		45		60	
Abs. 515	Abs.	△	Abs.	△	Abs.	△
BI	0.046	—	0.043	—	0.042	—
トリトン加 BI	0.046	—	0.047	—	0.043	—
トリトン塩ベ加 BI	0.047	—	0.047	—	0.042	—
塩ベ加 BI	0.140	—	0.142	—	0.145	—
尿	0.268	0.222	0.271	0.228	0.264	0.222
尿+トリトン	0.270	0.224	0.273	0.226	0.269	0.226
尿+塩ベ+トリトン	0.268	0.221	0.271	0.224	0.267	0.225
尿+塩ベ	0.362	0.222	0.366	0.224	0.370	0.225

表-4 ヒビテンの影響 (標準液)

反応時間(分)		30		45		60	
	ヒビテン濃度(%)	Abs.	△	Abs.	△	Abs.	△
BI	0	0.044	—	0.042	—	0.040	—
	0.1	0.045	—	0.043	—	0.042	—
	0.2	0.044	—	0.042	—	0.041	—
	0.3	0.043	—	0.042	—	0.042	—
	0.5	0.042	—	0.041	—	0.043	—
St	0	0.428	0.384	0.411	0.369	0.410	0.370
	0.1	0.419	0.374	0.410	0.367	0.411	0.369
	0.2	0.422	0.378	0.405	0.363	0.407	0.366
	0.3	0.424	0.381	0.403	0.361	0.405	0.363
	0.5	0.424	0.382	0.408	0.367	0.405	0.362

表-5 ヒビテンの影響 (尿)

反応時間(分)		30		45		60	
	ヒビテン濃度(%)	Abs.	△	Abs.	△	Abs.	△
BI	—	0.044	—	0.042	—	0.040	—
尿A	0	0.455	0.411	0.432	0.390	0.430	0.390
	0.02	0.463	0.419	0.440	0.398	0.435	0.394
	0.05	0.464	0.422	0.444	0.403	0.440	0.397
尿B	0	0.477	0.433	0.458	0.416	0.459	0.419
	0.02	0.479	0.435	0.456	0.414	0.456	0.415
	0.05	0.474	0.432	0.461	0.420	0.461	0.418

Abs : 波長515nmでの吸光度, △ : Abs. u-Abs. BI

ム由来の混濁の抑制方法およびヒビテンの影響の有無について検討を加え、次の結果を得た。

1) 塩化ベンザルコニウム由来の混濁抑制には、トリトンX-100の添加が有効であった。

すなわち、反応系に0.1%トリトンX-100を2~5 ml加えれば、検液中に塩化ベンザルコニウムが0.05%存在しても混濁発生を完全に抑制した。

2) トリトンX-100は、反応に影響をおよぼさなかった。

3) ヒビテンは、検液中に0.05%まで添加されても、何らCre測定に影響をおよぼさなかった。

文 献

1) 中田利一, 石井譲治, 児玉京子, 三谷一憲, 土平

一義, 山中克己, 磯村修三, 角岡秀彦, 加藤敬純, 長縄伸幸, 正岡 昭, 加藤 浩: DIP法を利用した乳児期における神経芽細胞腫のVMA (Vanillyl mandelic acid) の検査, 日本公衛誌, 30, 227~233, 1983

2) 今井準三, 田中久子, 大野勝弘, 後藤喜一, 河合信: 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究, 日衛誌, 43 (1), 476, 1988

3) 田中久子, 今井準三, 後藤喜一, 河合 信: 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究, 日本公衛誌, 35 (9, 特別附録), 300, 1988

4) 齊藤正行, 北村元仕, 丹羽正治編: 臨床化学分析 I, 78~81, 東京化学同人, 1968

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

学校給食用油におけるエルカ酸含有量について

大塚 公人*, 堀部 京子*, 春日 洋二*,
杉谷 哲*

Content of Erucic Acid in Edible Oil for School Lunch

Kimihito OTSUKA*, Kyoko HORIBE*, Yoji KASUGA*,
Akira SUGITANI*

はじめに

菜種油, からし菜油等のあぶらな科植物から採れる油には, エルカ酸が含まれている。エルカ酸 (cis Δ 13ドコセン酸, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$) はオレイン酸と同様に二重結合を一個含む不飽和脂肪酸であるが, 炭素鎖がオレイン酸よりも4個多いものである。²⁾ これを多量に摂取すると心臓障害を起こすことが知られている。^{2,3)} このため FAO/WHO 合同専門家委員会はエルカ酸を多量に含む油の使用を控えるように勧告している。⁴⁾ カナダではエルカ酸含有量を全脂肪酸中5%以下に規制している。日本では日本油脂協会が1985年2月にエルカ酸含有量を5%以下にするという自主基準を設定したが, 特に公的な規制はなされていない。

中沢ら⁵⁾は植物油及び油脂製品についてエルカ酸含有量の実態調査を行い, 菜種油及び菜種油を原材料とした製品から, 自主基準の5%を越えるエルカ酸を検出している。そこで, 我々は成長期の学生に供されている学校給食用の油についてエルカ酸含有量の実態調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

岐阜県下の132学校給食施設から大豆白紋油97検

体, 大豆サラダ油60検体, 食用調合油35検体, 食用大豆油34検体, ごま油8検体, とうもろこし油2検体, 綿実油1検体の合計237検体を収集した。このうち, 油の種類, 製造年月日, 製造会社等を考慮し, 157検体を分析対象とした。

2. 試薬

内部標準溶液: 100mgのテトラコセン酸メチルエステルをヘキサンに溶解して100mlとした(1mg/ml)。

標準溶液: 100mgのエルカ酸メチルエステルをヘキサンに溶解して50mlとした(2mg/ml)。

ナトリウムメトキサイドの調製: 1gの金属ナトリウムを100mlの無水メチルアルコールに溶解した。

これらに用いたエルカ酸メチルエステルおよびテトラコセン酸メチルエステルはガスクロ工業(株)製, 分析用標準品である。金属ナトリウム, 無水メチルアルコール, ヘキサン, 塩酸は和光純薬工業(株)製, 試薬特級である。

3. 装置

水素炎イオン化検出器付きの島津 GC-4CM を使用した。

4. 試験溶液の調製

試験方法は Methods of Analysis-A. O. A. C. (13版, 1980)⁶⁾に準拠した。すなわち, 50mgの食用油をフラスコに正確に秤量し, 3mlの内部標準液および10mlのナトリウムメトキサイドを加え, 1時間還流した。

*岐阜県衛生研究所: 500 岐阜市野一色4丁目6番3号

*Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

放冷後、ヘキサン5 ml, 1 N塩酸7 mlを加え、1分間激しく振とうした。水で25 ml定容とした後、ヘキサン層の2~5 μ lをガスクロマトグラフに注入した。

5. 標準曲線の作成

エルカ酸メチルエステルの標準溶液1, 2, 3 mlをフラスコにとり、内部標準溶液3 mlをそれぞれ加えて、以下試験溶液と同様に操作した。得られたエルカ酸メチルエステルのピークと内部標準溶液のピーク面積比から検量線を作成した。

6. ガスクロマトグラフィー測定条件

カラム：内径3 mm, 長さ1.5 mのガラス管に15% DEGS-クロモソルブ(AW DMCS)を充填した。カラム温度：205°C, 注入口温度：290°C, 窒素流量：40 ml/min, 空気圧：0.5 kg/cm², 水素圧：0.5 kg/cm²

結果および考察

1. 食用油の種類とエルカ酸検出実態について

学校給食施設で使用されていた油は食用調合油、大豆サラダ油、大豆白絞油、食用大豆油、ごま油、とうもろこし油、綿実油の7種類であった。なお、食用調合油としては菜種油・大豆調合油の他、ごま油・大豆油・米油および大豆油・ごま油調合品が使われていた。各食用油におけるエルカ酸の検出実態を表1に示した。エルカ酸は、菜種・大豆調合油の83.8%から検出されたが、その他の調合油からは検出されなかった。大豆サラダ油4検体からエルカ酸が検出されたが、本来大豆には含まれていない成分であること^りから、その原因は検体採取時等における混入によると思われた。エルカ酸が検出された大豆油は、製造会社が同じであることから製造工程での混入の可能性も考えられる。大豆白絞油、食用大豆油、ごま油、とうもろこし油、綿実油からは、いずれもエルカ

酸を検出しなかった。

2. エルカ酸含有量について

菜種油を含んでいる食用調合油26検体からエルカ酸が検出されたが、その含有量の分布を図1に示した。検出されたエルカ酸は0.05%~0.48%であり、平均⁵⁾0.21%であった。中沢らは菜種調合油から0.1~6%

表1 エルカ酸の検査結果

	採取 検体数	検査 検体数	検出数	最大値 (%)	平均値 (%)
食用調合油					
菜種油・大豆油	31	31	26	0.48	0.21
ごま油・大豆油・米油	3	3	0	0	0
大豆油・ごま油	1	1	0	0	0
大豆白絞油	97	56	0	0	0
大豆サラダ油	60	27	4	0.31	0.21
食用大豆油	34	28	0	0	0
ごま油	8	8	0	0	0
とうもろこし油	2	2	0	0	0
綿実油	1	1	0	0	0
合計	237	157	30		

検出限界：0.05%

エルカ酸含量(%)

検体数

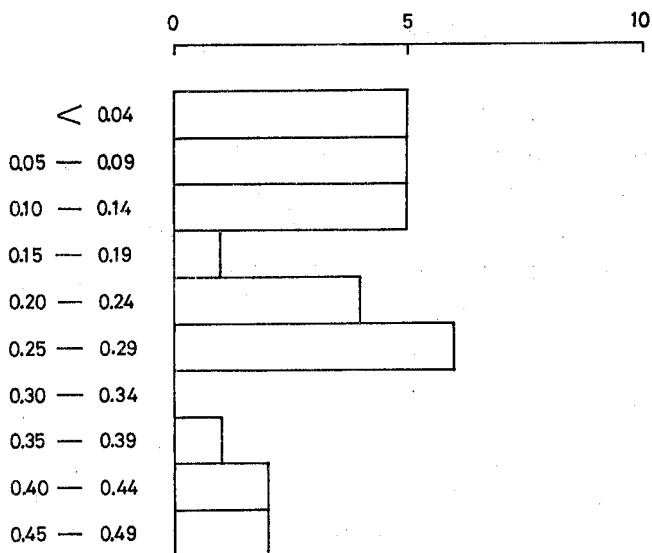


図1 菜種・大豆調合油におけるエルカ酸含量

平均0.7%エルカ酸を検出しているが、我々の結果はそれを下回っていた。外国産菜種油のエルカ酸含量は国産に比べて低い傾向にあり、また菜種調合油のエルカ酸含量は菜種油の配合比率により変動することも報告されている。中沢らと我々との結果の相違は、このような事情によると思われた。大豆サラダ油4検体からエルカ酸が検出されたが、その値はそれぞれ0.31%、0.20%、0.19%、0.14%であった。

今回検出したエルカ酸含量は日本油脂協会の自主基準値5%の1/10以下であった。

ま と め

県下132校から237検体の食用油を収集し、157検体についてエルカ酸含有量の測定を行った。その結果、菜種・大豆調合油26検体、大豆サラダ油4検体から0.05%~0.48%のエルカ酸を検出した。これらの値は、日本油脂協会の自主基準値5%よりかなり低かった。

大豆サラダ油4検体からエルカ酸が検出されたが、大豆には本来含まれていない成分であり、混入によると推察された。

検体採取に御協力賜りました岐阜県教育委員会、保健体育課、海老名よね子技術主査および学校給食関係の皆様へ深く感謝いたします。

文 献

- 1) 岩田久敬：食品化学総論，83-90，養賢堂，1967
- 2) 福場博保：食用油に含まれる自然毒，食の科学，81，35，1984
- 3) Beare-Rogers, J. L. and Nera, E. A. : Cardiac Lipids in Rats and Gerbils Fed Oils Containing C₂₂Fatty Acids, Lipids, 7, 548-552, 1972
- 4) FAO/WHO 合同専門家委員会：人間の栄養における食用油脂の役割，金田尚志，監訳，53-68，医歯薬出版株式会社，1980
- 5) 中沢久美子，勝木康隆，冠 政光，二島太一郎：市販食用油脂および油脂製食品中エルカ酸含有量，東京衛研年報，38，191-194，1987
- 6) Horwitz, W. editor : Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13th ed., 449, Association of Official Analytical Chemists, 1980

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.50%酸性ホスファターゼ活性阻害値測定
によるオカダ酸の定量白木 康一*1, 杉谷 哲*1, 河合 信*1,
安元 健*2Determination of Okadaic acid by Measuring 50% Acid
Phosphatase Activity Inhibitory Concentration (APIC₅₀)Koichi SHIRAKI*1, Akira SUGITANI*1, Makoto KAWAI*1
and Takeshi YASUMOTO*2

はじめに

著者らは、テトラヒメナの増殖が下痢性貝毒 (diarrhetic shellfish toxin, DST) によって特異的に抑制され、その50%増殖阻害値 (50% growth inhibitory concentration, GIC₅₀)¹⁾が1マウスユニット (MU)/20 ml培地に一致し、さらにDSTによるテトラヒメナの50%酸性ホスファターゼ活性阻害値 (50% acid phosphatase activity inhibitory concentration, APIC₅₀) もよく一致することから GIC₅₀, APIC₅₀ による DST の実用的な定量法として報告した。この研究に用いた DST は、毒化ホタテ貝から抽出した部分精製毒 (主に DTX3) であった。現在までに DST には、数種の毒素、オカダ酸 (Okadaic acid, OA)³⁾、ディノフィシストキシン (Dinophysistoxin 1, 3, DTX1, DTX3)^{3), 4)}、ペクテノトキシン (Pectenotoxin 1~5, PTX 1~5)³⁾ 及びイェントキシン (yessotoxin, YTX)⁵⁾ が報告されている。

今回は、精製されたOA、新たに分離されたPTX1, PTX2, YTXの定量にGIC₅₀, APIC₅₀及びMU法を適用してみたので報告する。

材料及び実験方法

1. 試料

OA溶液：滅菌培地にOAを加え1MU/mlの毒量に調製し試料溶液とした。

PTX1溶液：滅菌培地にPTX1を加え2MU/mlと20 MU/mlの毒量に調製し、試料溶液とした。

PTX2溶液：PTX1溶液に同じ

YTX：PTX1溶液に同じ

2. 試薬

培地：別報と同じ

酸性ホスファターゼ (酸ホス) 試薬：別報²⁾と同じ

3. 装置

遠心分離器：クボタKR702

その他は、別報²⁾と同じ

4. 毒量の測定

別報²⁾と同様マウス致死試験によった。

5. テトラヒメナ及びその培養法

別報²⁾と同じ方法を用いた。

6. テトラヒメナの増殖阻害実験

別報²⁾に従って材料及び方法の1で調製した試料をそ

*1 岐阜県衛生研究所：500 岐阜市野一色4丁目6番3号

*1 Gifu Prefectural Institute of Public Health：6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

*2 東北大学農学部：仙台市堤通雨宮町1丁目1番地

*2 Faculty of Agriculture, Tohoku University：1-1 Tsutsumidori, Amemiyamachi, Sendai 980, Japan

それぞれ100ml容量の三角フラスコに加えて、0~1.0MU/mlの各毒素濃度系列を調製(培地容量20ml)した。これにテトラヒメナの前培養液0.2mlをそれぞれの三角フラスコに接種し(細胞数2,000個/ml培地の濃度になる。), 28°Cで24時間静置培養した。

a) GIC₅₀

上記静置培養液に3.7%ホルマリン溶液を数滴加え繊維運動を止めビュルケルチュルク型血球計算板を用いて細胞を計測した。

b) APIC₅₀

培養細胞を遠心分離(2,000rpm, 5min)で集め、0.5%食塩水30mlで2回洗浄後、0.5%食塩水10mlに浮遊した。超音波破砕器により細胞を破壊して遠心分離し、その上澄液0.1mlを0.5mlの基質緩衝液(ワコー酸ホス測定キット使用)の入った試験管に加え、37°Cで30分間恒温水槽中で加温した後、0.05N水酸化ナトリウム溶液5mlを加えて発色させ、波長405nmで酸ホス活性を測定した。

結果及び考察

1. テトラヒメナの増殖阻害(GIC₅₀)

各毒素濃度系列(0.5~20MU/20ml培地)におけるテトラヒメナの増殖を対照(毒素を含まない培地のテトラヒメナの増殖数)と比較した結果を図1に示した。

横軸が培地20mlあたりの毒量で、下段の数字は、試料1gあたりのMU換算値で、0.05MU/gが毒化規制基準になる。縦軸は、対照を100としたときの毒素含有培地中の相対増殖率である。

OAの1MU時の相対増殖率は、DTX3と同じ50.6%(n=7)を示し、毒化規制基準値0.05MU/gとよく一致した。

PTX1, PTX2は、0.5~20MUの間で93.4~100.3%(n=7)と対照と

ほぼ同様な値を示し、テトラヒメナの増殖を抑制しないと考えられた。

YTXは、20MUで39.6%を示し、若干テトラヒメナの増殖を抑制するように見受けられる。

2. テトラヒメナの酸ホス活性(APIC₅₀)

それぞれの毒素の各毒量(0.5~20MU/20ml培地)におけるテトラヒメナの細胞内酸ホス活性を測定し、対照(毒素不含)の酸ホス活性を100としたときの相対活性率で比較した結果を図2に示した。OAの1MU

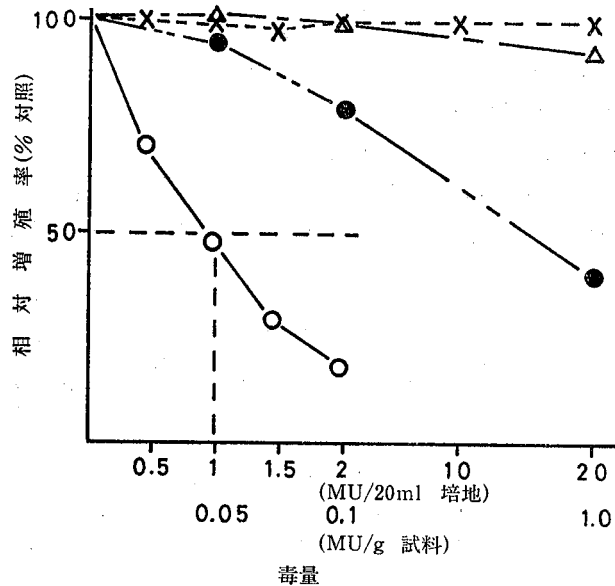


図1 下痢性貝毒によるテトラヒメナの増殖阻害率 (○)OA (●)YTX (×)PTX1 (△)PTX2

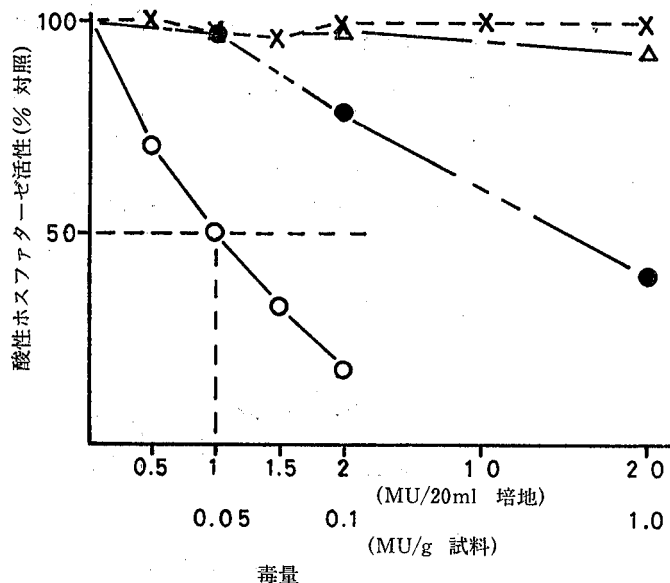


図2 下痢性貝毒による酸性ホスファターゼ活性阻害率 (○)OA (●)YTX (×)PTX1 (△)PTX2

時の酸ホス活性阻害率は、48.1% (n=7) であり、DTX3 と同様毒化規制基準値 0.05MU/g とよく一致した。

PTX1, PTX2 は、0.5~20MU の間で 95.7~100.4% と対照とほぼ同じ値を示した。YTX は、20MU で 40.8% であった。

これら DST のうち OA, DTX3 (OA の 7 位をアシル化, 35 位をメチル化) は、ポリエーテル脂肪酸であり、PTX1, PTX2 は、ポリエーテルラクトン化合物である。

YTX は、分子式 $C_{55}H_{80}O_{21}S_2Na_2$ のエーテル環 11 個が融合した化合物である。

これまでの研究から、また食中毒事例から、これらは共にマウス致死性をもつが、ポリエーテル脂肪酸系のみが下痢毒性を合せ持つことが明らかにされてい

る。

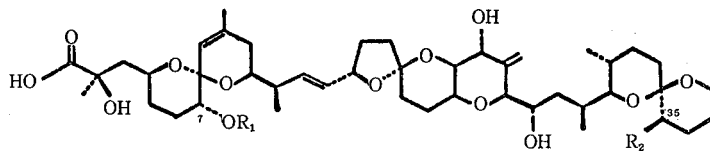
しかし、これらの構造と下痢原性 (食中毒) との関連については、明らかにされていない。

今回の実験の結果から、著者らは、この下痢性毒のみがテトラヒメナの増殖を強く阻害することを明らかにした。この事から同様な構造を持つ DTX1 も恐らくテトラヒメナに対して毒性を示すものと思われるが、これらポリエーテル脂肪酸系のテトラヒメナに対する毒性機構へのアプローチに今後の興味もたれる。

ま と め

今回 DST のうち OA, PTX1, PTX2 及び YTX についてテトラヒメナを用いた GIC₅₀, APIC₅₀ を測定した。

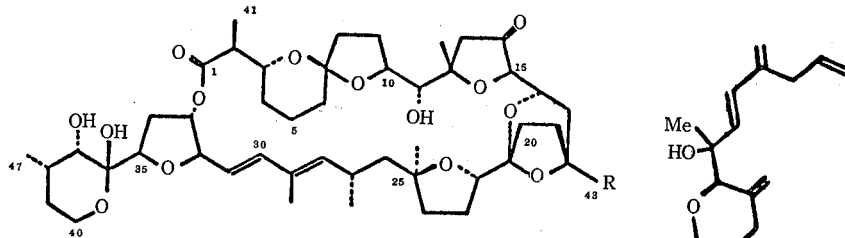
1. OA における GIC₅₀, APIC₅₀ は、DTX3 同様



オカダ酸: $R_1 = H, R_2 = H$

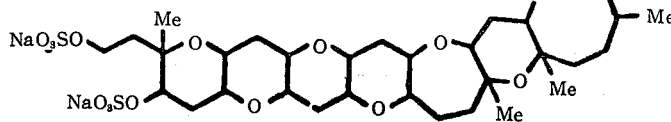
ディノフィストキシン-1: $R_1 = H, R_2 = CH_3$

ディノフィストキシン-3: $R_1 = acyl, R_2 = CH_3$



ペクテノトキシン-1: $R = CH_2OH$

ペクテノトキシン-2: $R = CH_3$



イエソトキシン

図 3 下痢性貝毒の構造

1MU/20ml 培地 (毒化規制基準値 0.05MU/g) と一致した。

2. YTXは, 20MU/20ml 培地で40%の阻害率で, テトラヒメナに対し弱毒性であった。

3. PTX1, PTX2は, 0.5~20MU/20ml 培地でテトラヒメナに対し阻害効果を示さなかった。

参 考 文 献

- 1) 野々村文雄, 杉谷 哲: テトラヒメナによる下痢性貝毒定量法に関する基礎的研究, 食衛誌, **26**, 437~442, 1985
- 2) 白木康一, 中屋謙一, 杉谷 哲, 山田不二造: 50%酸性ホスファターゼ活性阻害値測定による下痢性貝毒定量法, 食衛誌, **26**, 638~642, 1985
- 3) 安元 健: 下痢性貝毒, 海洋科学, **16**, 600~604, 1984
- 4) Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T.: Isolation and Structural Elucidation of the causative Toxin of the Diarrhetic Shellfish Poisoning, Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **48**, 549~552, 1982
- 5) Murata, M., Kumagai, M., Lee, J. S., Yasumoto, T.: Isolation and Structure of Yessotoxin, A Novel Polyether Compound Implicated in Diarrhetic shellfish Poisoning, Tetrahedron Letter, **28**, 5869~5872, 1987
- 6) 安元 健: マリントキシン研究の現状, 食品衛生研究, **36**, 19~31, 1986

〈他誌掲載論文〉

黄色ブドウ球菌の選択分離培地, EPGS 培地について

所 光男, 長野 功, 後藤喜一, 渡辺 実

感染症誌, 61(12), 1376~1381, 1987

黄色ブドウ球菌を培養時間24時間でより選択的に検出できる選択分離培地を改良するための基礎実験を黄色ブドウ球菌33株, その他22菌種 51株を用いて行った。その結果, 塩化ナトリウムの濃度を5%に下げ, 選択剤としてグリシニン0.3%, 塩化リチウム0.5%, 硫酸ポリミキシン B0.001%を加え改良した EPGS培地は, 従来我が国で常用されている卵黄加マンニト食塩 (MSEY) 培地, エッグヨーク食塩寒天培地に比べ, *Bacillus subtilis*の抑制力が強く, 黄色ブドウ球菌に対する発育支持力も優れていた。

健康者糞便, 食中毒患者糞便からの黄色ブドウ球菌の検出を EPGS培地, MSEY培地を用いて比較した結果, EPGS培地では健康者糞便の27.4% (146/533), 食中毒患者糞便の100% (10/10) から黄色ブドウ球菌が検出された。しかしながら, MSEY培地では健康者糞便の11.8% (63/533), 食中毒患者糞便の80% (8/10) から検出されただけであった。しかも, 24時間の培養の時点で比較すると, EPGS培地では食中毒患者糞便10検体総てに卵黄反応が形成され黄色ブドウ球菌として鑑別できたが, MSEY培地では全く卵黄反応が形成されず鑑別できなかった。

Toxic Effects of Lead Chromate Exposure on Renal Tubules

Junzo IMAI

Both lead and chromium(VI) are agents toxic to proximal renal tubules. Lead chromate, a compound of lead and chromium (VI), is assumed to produce much more proximal renal da-

mage than lead or chromium (VI) alone. This work was, thus, designed to test the assumption with the field survey.

Seven of the lead chromate workers had an increased lead absorption comparable to the lead fume workers, but presented much lesser toxic effects on the proximal renal tubules than the lead fume workers. The results suggests, against the author's assumption, that chromium from lead chromate may protect against the nephrotoxic effects of lead.

Inhalation exposure to lead chromate has long been considered little toxic because of its low solubility. The present study, however, confirmed that the compound was absorbable from the lung enough to develop lead intoxication.

Among the lead fume workers there occurred a case of renal tubular impairment, as characterized by β_2 -microglobulinuria and glycosuria without definite azotemia. The case indicates that renal tubular dysfunction may be manifested in the early stage of chronic lead nephropathy.

ACTA SCHOLAE MEDICINALIS UNIVERSITATIS IN GIFU, 35(4), 620~628, 1987

魚網を用いた接触ばっ気法による汚水処理に関する基礎的研究 (第1報)

南部敏博, 森下有輝 (岐阜衛研)
河村清史 (国立公衆衛生院)
金子光美 (摂南大学, 工学部)
吉川 博 (岐阜大学, 医学部)

日本公衛誌, 34(11), 709~716, 1987

魚網を用いた接触ばっ気法の有機物除去および硝化特性について検討し, 次の結論を得た。

1) 本装置における有機物除去能には、活性汚泥法と同様に、流入水 BOD 濃度と滞留時間が重要な影響因子であり、BOD容積負荷がおおよそ $2g/\ell \cdot day$ 以下では良好な処理水を得ることができた。また、処理水の良否は、接触材に付着する生物量とも密接に関係し、接触材が生物によって閉塞すると有機物除去効果は極端に低下した。

2) 接触材に付着する生物量は、BOD 容積負荷および接触材表面積により定まり、混合が十分な条件下でいずれの因子が増加しても付着生物量は多くなった。

3) 窒素の硝化作用は、有機物の除去と同時に進行するのではなく、BOD 除去が終了したのち始まった。また、硝化の程度は、BOD 容積負荷の逆数と滞留時間の積の関数で表現することができ、効率の良い硝化作用には、この指数をおおよそ 100 以上に保つ必要があった。

養殖ニジマスにおけるナリジクス酸及び その代謝物の組織内濃度について

春日洋二, 杉谷 哲 (岐阜衛研)
荒井 真, 森川 進 (岐水試)

水産用医薬品のナリジクス酸 (NA) をニジマスに経口投与 ($50mg/kg$) し、NA 及びその代謝物の組織内分布や濃度、残留性を検討した。抗菌性を有する非抱合型代謝物は胆汁や肝臓で検出されたが、その濃度は未変化の NA より低く、関連化合物のピロミド酸

(PMA) のように代謝物が未変化の PMA より長く残留することはなかったことから、現行休業期間を遵守する限り食品衛生上問題にならないと考えられた。PMA は非抱合体の方が抱合体より量的に多いことが報告されているが、NA では非抱合体の方が抱合体の約 $1/8$ と少なかった。未変化の NA は各組織共投薬後 96 時間までは指数関数的に減少したが、その後は減少傾向が緩慢になったため、現行休業期間の再評価はできなかった。

食衛誌, 28, 267~272 (1987)

高速液体クロマトグラフィーによる豚肉中の デストマイシンA, ハイグロマイシンBの定量

中屋謙一, 杉谷 哲, 河合 信 (岐阜衛研)

寄生虫駆除を目的とし飼料添加物として用いられるデストマイシンA (DM), ハイグロマイシンB (HM) の豚肉中での残留検査のため高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量法を検討した。試料から DM, HM を 10% トリクロロ酢酸抽出し、CG-50, 次いで Dowex 1-X8 カラムで精製、*o*-フタルアルデヒド試薬で蛍光誘導体とし HPLC で定量した。カラムは TSK gel ODS120T ($4.0 \times 250mm$), 移動相はメタノール-水-アセトニトリル ($65:30:5$) で蛍光検出器を用いた。試料に DM 0.25, $0.5\mu g/g$, HM 0.5, 1.0 unit/g 添加したときの平均回収率はそれぞれ 73.8, 82.5%, 77.4, 81.6% であり、定量限界は DM $0.1\mu g/g$, HM $0.3unit/g$ であった。

食衛誌, 28(6), 487~491 (1987)

学 会 報 告

- 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿のクレアチニン異常低下の解析
今井準三, 田中久子, 後藤喜一, 森下有輝,
河合 信 (岐阜衛研)
第57回日本衛生学会総会 昭和62年4月 東京都
- 接解ばっ気法による都市下水中の窒素除去
南部敏博, 森下有輝 (岐阜衛研)
河村清史 (国立公衆衛生院)
金子光美 (摂南大学)
第24回下水道研究発表会 昭和62年4月 大阪市
- 漢方製剤の薬事衛生学的研究 (第3報) シャクヤクエキスによる変異原抑制作用について
坂井至通, 河合 信 (岐阜衛研)
永瀬久光, 小瀬洋喜, 佐藤孝彦, 清水千佐登,
水野瑞夫 (岐阜薬大)
日本薬学会第107年会 昭和62年4月 京都市
- 二波長クロマトスキャナによる医薬品中ピタミンB₂分解物の定量
堀 実代子, 坂井至通, 今井準三, 河合 信
(岐阜衛研)
永瀬久光, 小瀬洋喜 (岐阜薬大)
日本薬学会第107年会 昭和62年4月 京都市
- 昭和61年度岐阜県ウイルス感染症定点観測事業による今冬季の乳幼児下痢症の病因調査について
川本尋義, 渡辺 豊, 三輪智恵子 (岐阜衛研)
猿渡正子 (県保産予防課)
田中 浩, 久野保夫 (県立岐阜病院小児科)
第33回東海公衆衛生学会 昭和62年6月
愛知県長久手町
- 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第1報) ろ紙尿からのクレアチニン分解菌の分離法と分離株の生物学的性状について
後藤喜一, 所 光男, 長野 功, 渡辺 実,
今井準三, 田中久子, 河合 信 (岐阜衛研)
第33回東海公衆衛生学会 昭和62年6月
愛知県長久手町
- 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第2報) ろ紙尿からのクレアチニン分解菌の汚染状況について
田中久子, 今井準三, 後藤喜一, 坂井至通,
河合 信 (岐阜衛研)
堀 実代子 (岐阜県大野保健所)
第33回東海公衆衛生学会 昭和62年6月
愛知県長久手町
- 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第3報) 塩化ベンザルコニウム添加ろ紙を用いた細菌汚染防止の試み
今井準三, 田中久子, 後藤喜一, 坂井至通,
河合 信 (岐阜衛研)
森下有輝 (岐阜県公害研)
第33回東海公衆衛生学会 昭和62年6月
愛知県長久手町
- 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究
今井準三, 田中久子, 大野勝弘, 坂井至通,
後藤喜一, 河合 信 (岐阜衛研)
第15回代謝異常スクリーニング研究会
第10回技術者懇談会神経芽細胞腫分科会
昭和62年9月 大阪市

- 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究（第1報）クレアチニン分解菌の分離と汚染状況

田中久子, 今井準三, 大野勝弘, 後藤喜一,
河合 信 (岐阜衛研)

第46回日本公衆衛生学会総会 昭和62年10月
長崎市
- 神経芽細胞腫スクリーニング検査ろ紙尿から分離されるクレアチニン分解菌について

後藤喜一, 所 光男, 渡辺 実 (岐阜衛研)

第24回日本細菌学会中部支部総会 昭和62年10月
福井市
- 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究（第2報）クレアチニン分解菌汚染防止についての検討

今井準三, 田中久子, 大野勝弘, 坂井至通,
後藤喜一, 河合 信 (岐阜衛研)

第46回日本公衆衛生学会総会 昭和62年10月
長崎市
- 漢方エキス製剤中グリチルリチンの測定

坂井至通, 田中久子, 今井準三, 河合 信
(岐阜衛研)

堀 実代子 (岐阜県大野保健所)

第24回全国衛生化学技術協議会 昭和62年10月
東京都
- エコーウイルス7型による無菌性髄膜炎 (AM) の流行について

三輪智恵子, 渡辺 豊 (岐阜衛研)

第35回日本ウイルス学会総会 昭和62年11月
京都市
- 単クローン抗体を用いる ELISA 法による下痢症患者便中ヒトロタウイルスの Serotyping

浦沢正三, 浦沢价子, 谷口孝喜, 若相富美代
(札幌医大衛生)

桜田教夫 (道衛研) 森田修行 (富山衛研)
時枝正吉 (千葉衛研) 川本尋義 (岐阜衛研)
峯川好一 (大阪公衛研) 大瀬戸光明 (愛媛衛研)

第35回日本ウイルス学会総会 昭和62年11月
京都市
- 今冬季の乳幼児下痢症, 特にロタウイルス感染成績について

北村政和, 田中 浩, 久野保夫, 伊上良輔
(県立岐阜病院小児科)

川本尋義, 三輪智恵子 (岐阜衛研)

第19回日本小児感染症学会 昭和62年11月 大阪市
- 濃尾平野3大河川の酸素同位体組成および主要化学成分の季節変動

寺尾 宏 (岐阜衛研) 森下有輝 (岐阜公害研)
加藤喜久雄 (名大水圏研)

1987年度日本地球化学会年会 昭和62年11月
東京都
- 神経芽細胞腫スクリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究（第3報）クレアチニン分解菌汚染防止目的の塩化ベンザルコニウム添加ろ紙の試用成績

今井準三, 田中久子, 大野勝弘, 後藤喜一,
河合 信 (岐阜衛研)

第58回日本衛生学会総会 昭和63年3月 岡山市

岐阜県衛生研究所投稿規定

1. 投稿者は当所職員であることを原則とする。
2. 投稿の区分は次の通りとする。
 - 研究（調査）報告（原稿用紙20枚以内）
 - 資料（ 〃 15 〃 ）
 - 研究速報（短報とする）（ 〃 10 〃 ）
 - 他誌掲載論文抄録（ 〃 2 〃 ）
3. 原稿は、定められた期日までに学術委員会に提出すること。
4. 原稿はB5版400字詰横書き原稿用紙を用いる。
5. 研究報告、表題、著者名、英文表題（前置詞、接続詞、冠詞、動詞以外、イニシアルを大文字、他は小文字、著者名は、本人が常用しているローマ字を用いて、名、苗字の順とし、Kōtaro TAKAMURAのようにする）、英文抄録、総括、序文、材料および方法、成績、考察、謝辞、文献の順とする。
所属、住所は和文、英文の順に欄外に入れる。英文は前置詞、接続詞、冠詞、動詞以外イニシアルを大文字、他は小文字とする。
6. 資料および研究速報、研究報告に準ずるが、英文抄録は特に必要としない。
7. 他誌掲載論文抄録、表題、著者名、掲載雑誌名（巻、頁、年号）および抄録とする。
8. 表題は簡潔にし、続報のものは必ず副題をつけ、その前にアラビア数字で1.2.などの番号をつける。
9. 外来語はカタカナ、外国人名は外国語（タイプ又はブロック体）とする。
10. 表は方眼紙または同型の白紙を用い、表の上には「表1., Table 3」などの番号と表題を明瞭に書く。
図（写真を含む）は、他の方法で表わし難いもの

みとし、1報につき5図以内とする。1図1枚とし、そのまま製版できるように墨書（黒インキでもよい）する。図の下に「1., Fig. 1」などの番号と表題および図中の文字（数字を含む）を鉛筆で明瞭に書く。

英文抄録を付した報告については原則として表、図共に英文とし、標題は前置詞、接続詞、冠詞、動詞以外イニシアルを大文字にし、他は小文字とする。

11. 表、図および写真は、本文とは別にして本文中挿入すべき場所の欄外に赤色でその位置を明示する。
12. 文献は本文中引用箇所右肩に小さく番号⁽¹⁾⁽²⁾のように片括弧をつける）を付し、最後にまとめて次の方式に従って記載する。

○雑誌の場合

著者名：表題、雑誌名、巻（ゴジックにする）、頁、年号（西歴）（例：Stark, R. L. and Duncan, C. L. : Purification and Biochemical Properties of *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin, *Infect. Immunity*, 6, 662-673, 1972）

○単行本の場合

著者名：書名、版数、頁、発行所、年号（西歴）ただし、頁については、全内容を総括的に引用した場合は不要とする。（例：Conn, E. E. and Stumpf, P. K. : *Outlines Biochemistry*, 1st ed., 83-85, John Wiley & Sons, Inc., 1963）

13. 著者校正は初校のみとする。その際新たな追加あるいは変更をしないこと。
14. その他所報編集に関し、必要な事項は学術委員会において決定する。

<監 修>

河 合 信

<編 集 委 員>

杉 谷 哲, 野 田 伸 司, 寺 尾 宏
渡 辺 豊, 坂 井 至 通

岐 阜 県 衛 生 研 究 所 報 No.33
昭 和 6 3 年 1 1 月
Report of Gifu Prefectural
Institute of Public Health No.33
1 9 8 8

編 集 発 行 岐 阜 県 衛 生 研 究 所
岐 阜 市 野 一 色 4 丁 目 6 番 3 号 〒 5 0 0
T E L <0582> 46-1 1 0 1
Editorial Gifu Prefectural Institute
Office of Public Health :
6-3, Noishiki 4 chome,
Gifu 500, Japan
印 刷 所 水 野 印 刷 紙 工 株 式 会 社
岐 阜 市 下 川 手 413 〒 500 ☎ <0582> 71-6248
