

広島県衛生研究所研究報告

第 39 号

1992 年 7 月

目 次

総 説

カキ衛生と広島湾

小川 博美…………… 1

原 著

当層の品質評価に関する研究 (第 1 報)

—Ligustilide の精製法および安定性について—

金森 久幸, 坂本 征則…………… 23

蒼朮の品質評価に関する研究

金森 久幸, 坂本 征則, 加藤 睦子

土井 司, 納池昭二三…………… 27

資 料

輸入食品中の残留農薬分析

仲本 典正, 坂本 征則…………… 31

広島県におけるエコーウイルス30型による無菌性髄膜炎の流行 (1989—1991)

高尾 信一, 妹尾 正登, 徳本 静代…………… 37

他誌掲載論文要約 (1991年11月～1992年7月)…………… 43

広島県衛生研究所

〔〒734〕 広島市南区宇品神田 1 丁目 5—70

カキ衛生と広島湾

小川 博 美*

Oyster Sanitation in Hiroshima Bay

HIROMI OGAWA*

(Received Oct. 10, 1991)

緒 論

広島湾のカキ養殖は、今から400年前の天文年間(1532～1555)に干潟漁業として始まったと伝えられている[1, 2]。当初は、石罫養殖法として始まったが、養殖技術の発展と共に築建養殖法、杭打ち垂下養殖法、さらに現在の筏垂下養殖法へと発展した。生産量は飛躍的に拡大して、1990年には筏数が1万2,000台、全国生産量の71.3% (3万348トン)を占めている[3, 4]。

広島湾でのカキ養殖事業の発展は、カキの生育にとって適度な潮流、太田川などからの豊かな淡水流入、水温変化、塩分濃度など恵まれた自然環境にあることから、植物性プランクトンの発生が良好でありカキの生育環境に適していることによる[5, 6]。

しかし、豊かな海の幸“カキ”(Grassostrea gigas)は冬季に採取されるが、内臓を含めて生食されることから、その養殖海域が河川などからの汚染を受けやすく、食品衛生的に重要な問題を有している。

事実、米国、ヨーロッパ及び我が国などで、生カキ摂取による食中毒など消化器系疾病の発生例が多く報告されている[7-11]。

そこで「カキ衛生と広島湾」をテーマに、カキ衛生と汚染指標菌、カキ衛生プログラムの確立、汚染の経年推移、汚染指標菌と病原微生物の海水中での分布と消長、カキ・海水のフローラ等について小川らの調査データと関連した文献を加えて総説する。

1) 広島湾の水理とカキの生理

広島湾は平均深度17.1m(北部)～29.3m(西部)で、多くの島や岬に囲まれた閉鎖性の強い内湾であり、湾岸は都市化の進む広島市などの市街地に囲まれている。さらに、流域面積1,481km²の太田川から流入する淡水量は年平均78m³/secもある。また、潮汐の干満は最大308cmの潮位差があり、潮流は0.1～0.5ノット、大潮最強流時の潮流速度は広島湾北部で10～15cm/sec、海田湾では5cm/secである。また、気温変化に伴う海水と河川水の水温差及び風雨などの物理的影響を受けて、垂直あるいは水平方向の複雑な循環と混攪を繰り返している。海水は気温の低い10～4月には、河川水温の低下と海水表面の冷却による「循環期」と、気温の上昇する5～9月には循環が止まる「成層期」とを繰り返している[4, 12-14]。

広島湾の水理に大きく影響する河川からの淡水流入と滞留について、木村[14]は淡水滞留日数(Y)と1日当たり淡水補給量(X)の関係を $Y = aX^{-b}$ で示し、その相関は広島湾北部で $r = -0.70$ 、 $Y = 41.2(X)^{-0.378}$ 、1日当たりの淡水移入率は3.4%と報告している。また、上嶋[15]は広島湾奥部水域の流動、水塊構造などについて解析し、湾奥部中央に直径約3kmの一過性の水平循環流が形成され、この循環流により表層河川水は下層まで混合されることを明かにしている。淡水保存量は干潮期に最大で、1億720万m³、湾奥部容積の約3%、太田川平均流量(78m³/sec)の約16日分と報告している。

*広島県衛生研究所: Hiroshima Prefectural Institute of Public Health

橋本[16]の広島湾海況調査(1972~1984年)報告によると、湾の透明度は2月6~7m, 8月3~5mと夏期に低下する。この原因は植物性プランクトンに由来しており、透明度(Y)と植物色素量(X)との関係は $Y = 6.93(X)^{-0.371}$, $r = 0.91$ と報告している。海水温度は、2~3月は5m層まで10°C以下を示し、4月下旬から15°Cを越え、6月20°C, 8~9月には25°C以上となり、10月下旬からは20°C以下に低下している。塩分濃度の水平分布は2月17~18‰, 8月14~15‰, 溶存酸素は表層で5~6ml/lである。

カキ(*C. gigas*)の発育生理は、水温が20°Cを超えると卵巣が成長し始め、産卵は23°Cを超える初夏、適度な風速(5m/sec)と潮流及び急速な温度上昇などの刺激でいっせいに始まり、産卵量は10⁶/個体に達する[17, 18]。受精卵は1日でD型幼生に成長し稚貝となる。稚貝の至適発育温度は24~26°C, 至適塩分濃度は15~20‰で、これらの至適温度、塩分濃度域外では死滅率や変性率が急速に上昇する。一旦成長したカキは広範囲な温度域、塩分濃度域に適應する。カキの成長は早く、前年採苗され6月役に養殖された幼カキの平均体重(肉重量)は10月3.2g(2~10g), 2月14.5g(5~30g)に達する。また、カキ個体当たりのグリコーゲンの貯留は、1月566±83mg, 4月983±204mg, 7月174±21mg, 10月198±29mgと冬から春に最大となり、産卵の終わる夏季に最小を示す[19]。ニラを通過する水量(F; l/day)と水温(t)の関係で呼吸量をみると $F = 0.107(t) + 1.90$ で示され、7~10月23.5~80l/day/body, 11~4月93.5~216l/day/bodyを示す。酸素消費量(Y; ml/g/day)と水温(t)の関係は $Y = 0.163 + 1.15(t)$ で示されている。また、個体当たりの摂取有機物量は2.12~8.64mgN/day, 排泄量は季節により異なるが乾燥重量で約300~400mg/dayである。これを窒素量でみると尿、糞、擬糞として0.87~4.52mgN/dayとなる[18]。

このように、広島湾とカキ養殖の関係は、地形的にも、また、水温の変化や塩分濃度、さらにはプランクトンの産生など、カキの発育生理に適した環境であり、カキ養殖発展の必要条件を備えている。しかし、これらの条件も河川水からの細菌汚染という重大な衛生的問題を内包している。

2) 広島湾のカキ衛生プログラム

近代的カキ衛生プログラムは、1925年米国で始められた。それは、1924~1925年の冬、ニューヨーク市を中心に下水で汚染したカキによる腸チフスの流行で1,500名が罹患し、これが契機となったものである[20]。公衆衛

生局は、全米貝類衛生委員会(Committee on Sanitary Control of the Shellfish Industry in the United States)の勧告を受け、貝類衛生協同計画(SSCP; Shellfish Sanitation Cooperative Program)を作成し、衛生対策を進めた。その後SSCPは部分改定されて現在に至っている[21-26]。

わが国でのカキ衛生対策の歴史は次のようになっている。(1)1952年(昭和32年)、広島県は「かき衛生指導要綱」を定め、1958年(昭和33年)、国は「かきに関する衛生上の指導について」(要綱)を定めた。その基準は養殖海水:大腸菌群300以下/100ml, カキ浄化用水:大腸菌群70以下/100mlで、あわせてその試験法が初めて定められた[27]。

(2)1960年(昭和35年)には「広島県輸出向生鮮冷凍かき処理業者登録条例」が制定され、カキ輸出体制の整備が進められた。また、1962年(昭和37年)には食品衛生法の食品添加物規格基準に「生食用冷凍かきの成分規格及び製造基準」が制定された[28]。これは生食用冷凍カキに限定したものであるが、カキに定められた初の成分規格である。その基準は一般細菌数50,000以下/g, 大腸菌群MPN 16,000以下/100g, 養殖海水は大腸菌群MPN 70以下/100mlで米国の基準に合致させたものである。併せて、正式に最確数法を用いた細菌学的検査法も採用され、わが国における貝類衛生プログラムの基礎が確立された。

(3)さらに1963年(昭和38年)には「生食用魚介類の取扱いの指導について」(通達)により魚介類を主体とした指導要領が示された[29]。しかし、これらの対策にもかかわらず、1966年(昭和41年)12月中~下旬にかけて、関東以西11都府県で広島県産カキが原因食品と推定された食中毒が多発し患者数は1,596名に及んだ[11]。

(4)この事件を契機にして、1967年(昭和42年)には国内向け生食用生カキを対象に「生食用かきの成分規格、加工基準及び保存基準」[30]が定められた。その基準は「一般細菌数50,000以下/g, 大腸菌230以下/100g」で、従来の大腸菌群(TC)に替えて糞便性大腸菌群(FC)が採用された。同時に加工基準として、「原料用カキは大腸菌群70以下/100mlの海域で採取されたもの、もしくは同等の海水で浄化処理されたもの」と定められた。さらに、市販生カキの表示は「生食用」であるか否かの用途別表示が義務付けられた。さらに米国等へのカキ輸出開始もあって、(5)1961年(昭和36年)米国公衆衛生局調査団の「広島県の貝類衛生管理に関する報告」[31]を受けて、図1に示すように北緯34°10', 東経

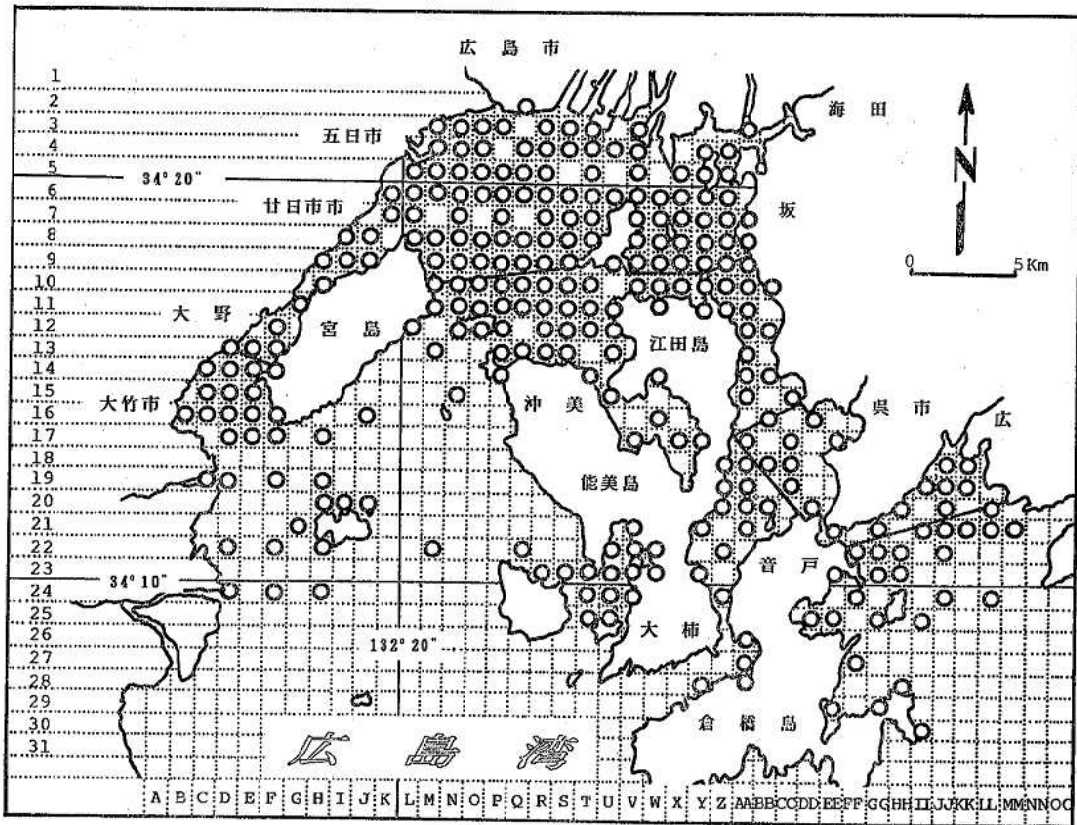


図1 広島湾の衛生調査図

○：1962～1991年調査点 - - -：指定と指定外海域の境界

132°20' を基軸に広島湾を1 km の格子に区分した海域調査図が設定された。これによりカキ養殖海域の衛生調査システムが確立された。1962年(昭和37年)には「日米貝類衛生取り決め」[32]が締結され、輸向けカキの養殖海域指定、及び海域の本格的衛生調査が始められた。1981年(昭和56年)以降輸出は中止されたが、その後も同様の調査システムにより衛生実態調査が継続され、その結果に基づいて指定海域(TC MPN 70以下/100 ml)と指定外海域(TC MPN 70/100 ml を超える)に区分した衛生指導対策が進められている。さらに、広島県では「特別処理かき表示要綱」、「生かきの取扱いに関する指導要領」、「生食用かき人工浄化実施要領」などを整備して衛生指導がなされている[33]。

以上のようなカキ衛生対策の整備により、広島湾のカキ養殖海域衛生調査システムが確立した。同様に他のカキ生産県においても各種の調査や、衛生対策が進められている[34-37]。これらの衛生対策の強化により、その

後カキによる大規模な食中毒の発生はみられず、数例の小規模な散発的発生にとどまっている[38-41]。

3) カキ衛生と汚染指標菌

カキは内臓を含めて生食されることから、その細菌学的品質の保持が重要である。その清潔度や安全度は養殖される海水の清浄度に大きく影響を受けることから、養殖海域の衛生評価のための細菌学的モニタリングや、採取されたカキの安全性確認の検査が重要である。食品衛生での汚染指標微生物としては大腸菌群(TC)、糞便性大腸菌群(FC)、大腸菌(*E. coli*)及び腸球菌群(FS)などがある。これらの中から糞便汚染や病原性細菌及びウィルスの存在との関連性、試験法の精度、検出感度、簡便性、迅速性などを評価して公定検査法に採用されている[42-51]。生食されるカキでは病原微生物との関連が重視され、簡便、迅速な試験法としてFCが、養殖海水では検出感度を考慮したTCが採用され、それぞれの国でその基準が定められている[52-54]。さらに、これら

の指標微生物以外にも *Bacteroides* [55], *Clostridium perfringens* [56, 57], *Bifidobacterium* [58], Coliphage [59-61] 等もその特性から応用が試みられている。

米国ではカキ養殖海域の細菌学的基準として T C, F C を採用し, 海域の15回以上の調査データから次の4海域に区分している。(1)許可海域: T C中央値が70以下/100 ml, かつ230以上/100 ml が10%以下。(2)条件付許可海域(下水処理などの汚染条件によって許可される)。(3)制限海域: T C中央値が70/100 ml を超え700以下/100 ml, かつ2,300以上/100 ml が10%以下。(4)禁止海域: T C中央値が700/100 ml を超えているか, または2,300以上/100 ml が10%以上を占める海域とされている。この基準を F C で代用する場合は T C 70/100 ml は F C 14, T C 230/100 ml は F C 49 に換算して, 海域の衛生評価が行われている[62, 63]。

国内では海水の汚染指標菌に T C を採用し, T C MPN が70以下/100 ml を指定海域とし, T C 70/100 ml を超える海域を指定外海域に区分している[30]。

これらの汚染指標菌も細菌分類学的には多くの菌種を含む菌群であり, 多くの問題を是認した検査法でもある[64, 65]。さらに, 公定試験法 (APHA 法) は最確数法を用いて, L B 培地 (Lactose broth) もしくは L S T 培地 (Lauryl sulphate tryptose broth) で, 48hr の前培養が必要であり, 検出感度に優れている反面, 所要時間や選択性で難点があり, 多くの改良試験法が検討されてきた。国内でのカキ成分規格検査には迅速性を考慮した E C 試験法が採用されているが, 特異性の点では問題を含んでいる。Andrews ら[66], Hunt ら[67] は APHA 法に替えて A-1 培地の使用を検討し, その後の

追加試験でも, A-1 法は *E. coli* の選択性と迅速性に優れているとの報告がなされている [68-73]。さらに, glutamate 培地[74], MMGB 培地[75], YLTB 寒天培地[76], LSAB 寒天培地[77]なども開発されている。また, Matner ら[78] は Petrifilm 法を開発するなど, 44.5°C 24 hr 培養による多くの試験法が報告[79]されてきた。また, Rippey ら[80]は検出感度の改善をめざして MF 法を, Brodsky ら[81-83]は HGMF 法を応用している。さらに, Peter ら[84]は酵素反応を利用した MUG 法 (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) で 4 hr で *E. coli* を特異的に定量する方法を報告し, その後多くの追加報告[85-89]がされている。

以上のように汚染指標菌の試験法は, 検出感度, 特異性, 所要時間などの急速な改良が進み, 公定試験法の改訂も必要と考えられる。

4) 広島湾の経年的汚染の変化

環境面からみた広島湾は, 産業発展や都市化の影響を大きく受けて変化した。1960年代の高度経済成長期に入って臨海工業地帯の埋め立て造成の進行, 沿岸部への人口集中・都市化が急速に進む一方で, 下水道や工場排水処理などの整備が立ち遅れ, 環境破壊と水質汚濁が進行した。特に閉鎖的な二次湾である広島湾は, 希釈, 拡散などの自然浄化機能を越える急速な汚染により, 1970年頃から赤潮の多発に象徴されるように, 有機物汚染や重金属汚染などの環境汚染が拡大した [90-93]。

細菌学的汚染もこれら環境汚染と並行して推移している。1962~1991年の30年間, 河口部 (2~6 km) の海域調査 (n=1,492) から大腸菌群最確数 (T C MPN) でみた推移を図2に示した。これは Boxplot 法により,

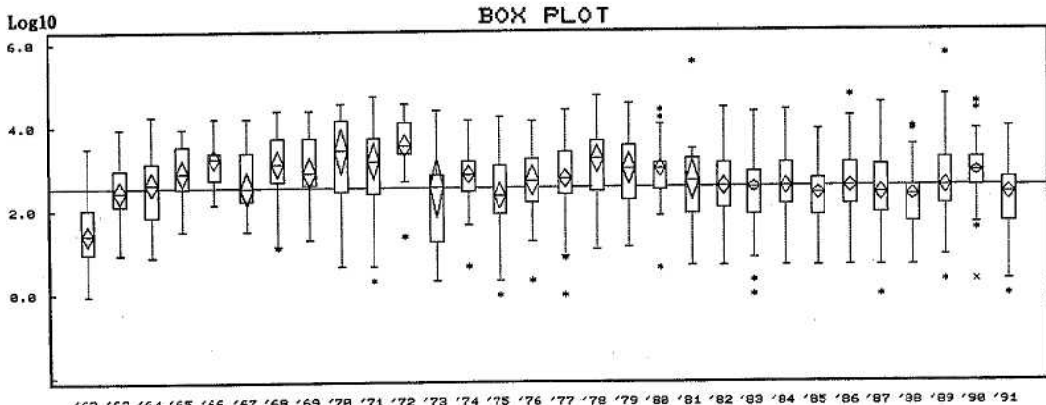


図2 広島湾河口部2~6kmの経年的T C汚染度の推移 (1962~1991)

—: 全期間のT C中央値; 2.54±0.05 (n=1,492)

△▽: 中央値の95%信頼幅

年度毎の測定データを大ききの順に並べて中央値に線を引き、下ヒンジ (25%タイル近似値) 及び上ヒンジ (75%タイル近似値) で箱を作り、上下ヒンジよりこの箱の長さを1.5倍した点を内境界点とした。内境界点に最も近い観測値を隣接値として、その点まで“ひげ”を付けて分布を表現したものである。1964年から1979年の期間は30年間の全データの中央値 (Log 値 $2.54 \pm 0.05/100 \text{ ml}$) を上回っている。

小川ら [94, 95] の報告では、河口から7km以遠の海域では顕著な経年変化は認められないが、河口から2~4km (A海域)、5~6km (B海域) ではTC, FCとも有意な経年変化を示している。A海域でのTCは1970~71年 Log 値 $3.54/100 \text{ ml}$, 1973年, 1979年 Log 値 $3.73/\text{ml}$ の高いレベルを示している。これを前期10年間 (1962~71年) でみると $\text{Log}(Y) = 2.006 + 0.193 \text{ Log}(X)$ ($p < 0.01$) と増大傾向を示した。しかし、後期15年 (1972~86年) では $\text{Log}(Y) = 3.443 - 0.004 \text{ Log}(X)$ ($p < 0.05$) と減少している。B海域でも同様に前期 $\text{Log}(Y) = 2.105 + 1.230 \text{ Log}(X)$ ($p < 0.05$) と増大し後期は漸次減少している。A海域でのFCは1970年 Log 値 $2.60/100 \text{ ml}$, 1973年 $2.69/100 \text{ ml}$, 1979年 $2.66/100 \text{ ml}$ と高い汚染レベルを示している。前期ではTCと同様 $\text{Log}(Y) = 1.259 + 0.147 \text{ Log}(X)$ ($p < 0.01$) と増大し、後期15年では減少している。

また、小川ら [96] は広島湾の平面的汚染パターンを5年毎の経時的 (1962~1986年) 解析で検討し、1967~1971年が最も汚染が拡大したと報告している。すなわち、河口部、呉湾、大竹市沖海域を中心に最も高い汚染度のAパターン区画 (TC MPN 中央値700以上/100 ml, または TC MPN 2,300以上/100 ml のデータが10%以上含まれる海域) が、1962~1966年, 15区画, 1967~1971年, 22区画と拡大したが1982~1986年では8区画に縮小している。

こうした汚染の推移は、水質汚濁防止法 (1970年), 海洋汚濁防止法の制定 (1970年), 広島市内水域の環域基準に基づく類型指定及び常時監視体制の確立 (1971年), 「上乗せ排水基準を定める条例」制定 (1971年), 内海し尿投棄廃止 (1972年), 太田川流域下水道の整備発足 (1976年), CODに係る総量規制の実施 (1978年) などの各種汚染源対策 [97] による改善効果と考えられる。

以上のように、広島湾における汚染指標菌の経年推移は、1972年以降減少傾向を示している。しかし、現在でも河口2~4km海域では TC MPN $10^3/100 \text{ ml}$, FC MPN $10^2/100 \text{ ml}$ のレベルにある。これは1966年カキ

食中毒多発当時の汚染レベルであることから、今後のカキ衛生対策の重要性を明示している。

5) 海水, カキ中での汚染指標菌の分布, 相関, 濃縮

カキ養殖環境の大腸菌群 (TC) と糞便性大腸菌 (FC) の分布, 相互の相関, 汚染構成比及びカキへの濃縮について小川ら [98] の報告がある。それによれば、河口河川水において Log 値で TC MPN $4.2 \pm 0.7/100 \text{ ml}$, FC MPN $3.1 \pm 0.7/100 \text{ ml}$ であり、河口海水では平均で TC MPN $2.1 \pm 1.0/100 \text{ ml}$, FC MPN $1.1 \pm 0.9/100 \text{ ml}$ レベルで分布している。これらの試料のTCとFCの汚染相関は $r = 0.81 \sim 0.88$ と高く、FC/TC 汚染比率は河川水で8.9%, 海水で10.0% (7.7~11.5%), カキで4.3% (3.5~6.7%) を示している。

さらに、同時に採取した同一場所の海水とカキのペアデータ ($n = 522$) での海水 TC (X) とカキ FC (Y) の相関は、 $r = 0.730$ ($p < 0.01$), $\text{Log}(Y) = 0.668 \text{ Log}(X) + 1.339$ と高く、養殖海域海水の清浄度が、カキの細菌学的品質に大きく影響している。また、カキ FC/海水比率 (濃縮比 $100 \text{ g}/100 \text{ ml}$) は指定外海域で48.8倍、指定海域で26.9倍、全海域では海水からカキに43.1倍に濃縮されていることが明かにされている。

また、腸球菌 (FS) を同時に調査したデータでの TC: FC: FS 比は、河川水 ($n = 123$) で $1.5 : 1 : 1.2$, 海水 ($n = 143$) で $10 : 1 : 0.03$, カキ ($n = 386$) で $21.8 : 1 : 0.3$ である。FSは河川水でFCと同一菌量を示すが、海水及びカキでは最も分布菌量が少ない。汚染指標菌の相関は、海水, カキともTCとFCが最も高く $r = 0.721 \sim 0.871$ で、FSとTC, FCとの相関は $r = 0.530 \sim 0.686$ であった。Burkhardt [99] にも海水のFCと *E. coli* の相関は $r = 0.99$ ($p < 0.001$) と高く、水温 $11 \sim 21^\circ \text{C}$ の春季ではFC, *E. coli* に比較して phage や *Cl. perfringens* が有意に濃縮されると報告している。Goyal ら [100] も海水中のTCとFCは $r = 0.847$, $\text{Log}(TC) = 0.96 + 0.87 \text{ Log}(FC)$ と報告している。図3に1962~90年、同一場所から同時に採取した海水, カキのペアデータ ($n = 1,038$) による海水 TC (X) とカキ FC (Y) の相関を示した。この結果はカキの細菌学的品質は養殖海水の汚染度に影響されることを示している。

Wenstel ら [101] は海水中のTCとColiphageの分布相関は $r = 0.62 \sim 0.69$ ($p < 0.001$) と報告している。Kenard ら [102] は各種環境水のFCとColiphage (ϕ) の相関は $r = 0.95$ ($p < 0.001$), $\text{Log}(\phi) = 0.007 + 0.866 \text{ Log}(FC)$ と報告している。Dutka [103] は沿

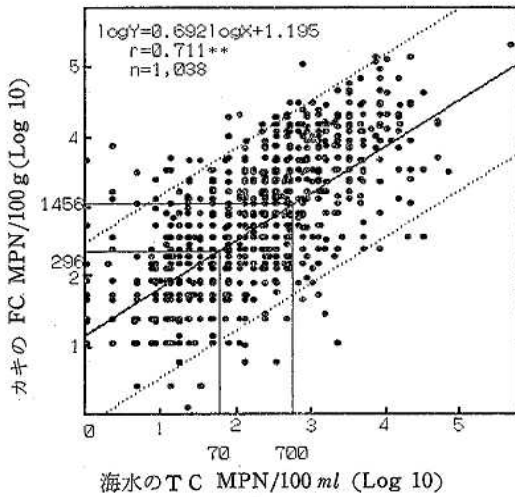


図3 海水(TC)とカキ(FC)の分布相関

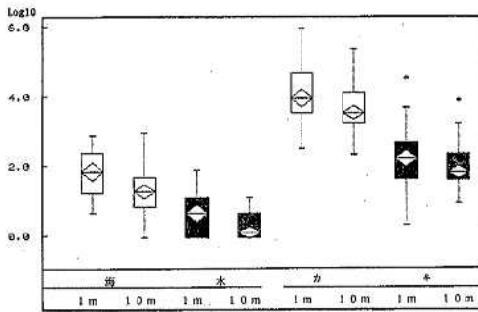


図4 河口海域の水深(1m, 10m)による汚染度の差

□: TC ■: FC △▽: 中央値の95%信頼幅

岸海水のFCとColiphageの相関は $r=0.57\sim 0.98$ ($p<0.05$)と高く、FC:Coliphage比は1.5~203:1と報告している。Bell [104]はFC:Coliphage比は、未処理下水で87:1、処理下水で4.2:1、河川水で0.15:1であり、両者の比は20°C 7日で87:1から1:1に変化したと報告している。

Kelchら [105]は4河川が流入するTillamook湾でのFCレベル(X)と河川等の135因子との多重相関を検討し、関連の最も高いのは、河川水のFC量(Y)で、その関係は $\text{Log}(Y)=3.755+0.558 \text{Log}(X)$ 、 $R^2=0.965$ と報告している。Saylerら [106]は、Chesapeake湾でTC, FC, FSの3指標菌間の相関は季節を通じて $r=0.82\sim 0.99$ と高いと報告している。FC/TC比率は糞便の新鮮汚染や未処理の下水流入時に高い値を示す

といわれ、河川水で8.9~24%の報告 [107, 108]がある。Hunt [62]は許可海域でのFC/TC比率は17.4%、禁止海域では20%であったと報告している。以上のように海水のTC, FC, FS, Coliphageは、その海域の汚染度により異なるが、一定の相関と比率で分布しており、広島湾での海水のFC/TC比率は10%と考えられる。

6) 水深による汚染の影響

図4は広島湾河口4~6km海域で同時採取した海水とカキの上層(1m)、下層(10m)の測定値($n=46$)からTC, FCの上層と下層の菌量を比較したものである。いずれの指標菌とも河口部では上層部が有意的に汚染度が高く($p<0.05$)、両者の順位相関は海水TCで $r_s=0.334$ 、カキFCで $r_s=0.568$ を示した。なお、河口から12km以遠の海域では海水、カキとも水深による汚染の差は認められない。橋本 [13]は淡水流入量と河口海水の塩分濃度の関係は、0mでは $r=-0.93$ と高い逆相関を示すが、5mでは $r=-0.26$ であり、10m及びそれ以下では相関がないと報告している。このことは夏季の調査であるが河口部での上下の混釈は0~5m部分で行われており、汚染源としての河川水が海水及びカキに影響する水深は0~5mで大きいことを示している。

さらに、塩分濃度の水平勾配は、河口部表層海水で28~31‰、5m層では32‰の外洋水が沿岸部下層まで入り込んでいる [6]。内湾の海洋水理は複雑で、内湾の深度、湾の構造、流入淡水量、潮位などにより、湾固有の海水交換率や、内湾から外洋への物質流出量が定まることが明かにされている [109, 110]。広島湾では塩分濃度分布と同様に、河口から10km海域までは河川からの直接的影響を受けるが、それ以遠では塩分濃度の垂直分布も均一化し、細菌学的汚染度も水深差が認められなくなる。河口部での海水とカキの水深差は、海水に比較してカキで明瞭に認められる。これは海水の汚染度が潮流や満干により急激な変動を示すのに対し、カキでの変化は一定の範囲内で推移していることに起因していると考えられる。

7) 海水中での汚染指標菌の消長

汚染指標菌の消長は、海水の殺菌作用とあわせて海水の温度、塩分濃度、有機物濃度等の理化学的要素や微生物間の拮抗作用などの影響を大きく受けている。さらに、潮流や上下循環による希釈、拡散などが複合して自然浄化が行われている。海水の殺菌作用や汚染指標菌の消長 [$T(10^{-1})$; 1/10減少に必要な時間]については多くの報告がみられる [111-118]。Savageら [119]は海水

中でのTCの消長はT(10^{-3})は9日間、FCでは6日間と報告している。Gerbaら[120]は海水でのTCのT(10^{-2})は3日と報告している。Manciniら[115]はt度海水中におけるTC死滅係数K(Mortality rate)は、 $Kt=[0.8+0.006(\text{Salt } \%)] \times 1.07^{(t-20)}$ と報告している。E. coliについてMcFetersら[121]は5~6°Cの自然湾海水中に設置したメンブランフィルター中でのT(10^{-2})は3~4日と報告している。その他各種条件下では2月の無ろ過海水中でのT(10^{-2})は9日[122]、13°C、塩分15pptのT(10^{-2})は3日[123]、14°CのT(10^{-1})は36hr[124]、20°C、T(10^{-3})は3日[125]、14.5°C海水でのT(10^{-2})は3日[126]と速く、StreptococcusやKlebsiellaより短いとの報告もある。Garcia-Lalaら[127]もE. coliのT(10^{-3})は50hrで、無処理海水中での減少比(10^{-3} h^{-1})はSalmonella 160, E. coli 128, 腸球菌43と報告している。Servaisら[128]も細菌の海水中でのMortality ratesは0.01~0.03 h^{-1} と報告している。

小川ら[129]は30mm/日降雨後、河口4~5km海域での海水及びカキ中のTC、FCは、7~10日を要して平常時レベルに回復したと報告している。Sobseyら[130]は降雨によるカキのTC、FCへの影響は、河口に近い指定外海域では、1inch/dayでも影響を受けるが、指定海域では2inch以上/dayの時影響がみられると報告している。

小川ら[95]は河口(汚染源)からの距離による汚染指標菌の分布・消長は河口→指定外(4km)→指定外(8km)→指定海域に移行するにともない図5に示すように、FCで3.2→1.5→0.8→0.0、TCで4.2→2.7→1.9

→0.9と減少することを明かにしている。

さらに、河川のTCレベル(X_1)と河口からの距離(X_2)でみた海域のTC汚染レベル(Y)の関係は $r=0.728$ ($p<0.01$)、 $\text{Log}(Y)=4.685 \text{ Log}(X_1)-0.403(X_2)$ で示され、河川からの汚染量とその距離に大きく影響することを示している[131]。

また、糞便汚染の指標であるColiphageについて、湾内での調査成績はないが、O'Keefeら[132]は海水中の汚染指標菌TC、FCとColiphageの分布相関は極めて高く、TCと $r=0.819$ ($p<0.001$)、FCとは $r=0.993$ ($p<0.001$)で、Coliphageも河口海水中に広く分布していると報告している。Berregoら[133]は18°Cろ過海水中のphage 4φのT(10^{-2})は30日と報告している。その他に20°Cでのphage T2のT(10^{-2})は17~30日[134]、14°Cでのphage T2のT(10^{-2})は20日[135]、冬季3°C、塩分5pptの海水でのphage T7のT(10^{-2})は30日[136]の報告がある。また、Vaughnら[137]はColiphageのT(10^{-2})は夏季(18~21°C)で20日、冬から春季(4~15°C)で30日と報告している。このように、いずれの指標菌とも水温が低いほど長期間生残することが明かにされている。また、指標微生物の中ではColiphageがTC、FCに比較してより長く生残している。

以上、河川水とともに海域に流入した各種汚染指標菌は、海水の殺菌作用やフローラの相互拮抗作用、海水による希釈・拡散・沈澱などの影響を受けながら一定のレベルで分布していると考えられる。

8) 河口海水、カキ中での病原細菌の分布

前項でも明かなように、海水の各種殺菌作用や希釈、拡散などの自浄作用により、河口部海域では継続的汚染と自浄作用が繰り返されている。このような条件下での食中毒起因菌など病原菌の分布は、ほぼ汚染指標菌と類似していると考えられている。

小川らが継続調査した主要食中毒起因菌に関する結果の概略を表1に示した。Salmonellaは汚染の進行に極めて敏感に関連しており、汚染が最も進んだ1970~1980年代は高率に分離されたが、1981年以降海水からは分離されていない。一方、病原大腸菌(EPEC)は、Salmonellaに比較して各期間を通じて高い分離率を示している。腸炎ビブリオは1981年以降、暖冬現象の影響を受けて冬季の分離率が增大傾向にある。

芽胞形成菌であるウェルシュ菌(Cl. perfringens)やセレウス菌(B. cereus)の分布は、汚染指標菌量との関連性は低く、各期間を通じて広範に分布している。これ

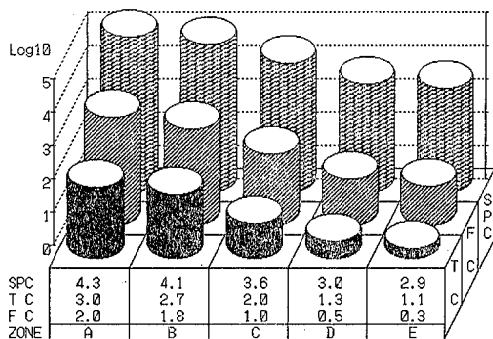


図5 河口からの距離別汚染指標菌の分布レベルと推移

(A : 1~2km, B : 3~4km, C : 5~6km, D : 7~8km, E : 9~10km)

表1 広島湾での主要食中毒菌の経年的分離率の推移

		1971—1975年	1976—1980年	1981—1985年	1986—1990年
Salmonella 菌	カキ	12.7%(14/110)	5.8%(6/104)	1.1%(1/90)	0.0%(0/112)
	海水	3.8 (3/78)	6.4 (7/110)	5.6 (5/90)	0.0 (0/112)
E P E C	カキ	11.6 (13/112)	18.4 (18/98)	30.0 (27/90)	36.6 (41/112)
	海水	11.3 (17/104)	16.3 (17/104)	17.8 (16/90)	33.9 (38/112)
ウエルシュ菌	カキ	73.2 (82/112)	95.9 (94/98)	90.5 (76/84)	68.8 (77/112)
	海水	35.0 (28/80)	23.1 (24/104)	42.9 (36/84)	28.6 (32/112)
腸炎ビブリオ	カキ	8.9 (10/112)	1.0 (1/98)	21.1 (19/90)	11.6 (13/112)
	海水	10.0 (8/80)	4.8 (5/104)	24.4 (22/90)	34.8 (39/112)

(注) カキは10g当たり、海水は500ml~2.5l当たりの定性試験。
 ウエルシュ菌は海水では Hobbs 型別のみ、カキは加熱処理の分離でUTを含む。
 腸炎ビブリオはいずれもK型別株のみ集計。

は芽胞が栄養形に比較し長期間・広範囲に生残することによると考えられる。

河口河川水やカキへの病原細菌やウイルスの出現については、三輪谷 [138]、橋本 [139]、Boardman [140]、Gerba [141] の総説をはじめ多くの報告 [47, 142-148] がみられる。これらによると河口域の海水やカキから、各種病原微生物が分離されている。広島湾海水中での *Salmonella* 分布は、表1に示したように1970~1980年代には環境汚染の拡大とともに汚染のピークを示している。宮崎ら [149] は1977~1978年、河口から8.4~11kmの海水(5l)中から *S. Typhi*, *S. Paratyphi* を含む各種 *Salmonella* を50%(21/42) 分離している。また福田ら [150] は1974~1980年、海水(500ml)、カキ(10g)中の *Salmonella* 分布は、海水で5.7%(13/228)、カキで8.3%(14/169)と報告している。橋本ら [151, 152] は芦田川河口部海水(500ml)中の *Salmonella* 分離率は、1972~1974年には12.1%(28/232)であるが、1986~1987年の調査では8.4%(2/24)に減少したと報告している。Fraiser ら [153] は指定海域のカキでは8.3%(5/60) *Salmonella* を分離したが、その菌量は2.2/100g以下と報告している。Sayler ら [154] は Chesapeake 湾の海水で3%(4/131)の分離にとどまっている。

病原大腸菌について小川ら [155] は、1969~1979年の調査で海水14.0%(33/236)、カキ14.4%(27/188)、海底土3.7%(2/54)の分離率と報告している。また、小久保ら [156] は生カキから分離した *E. coli* 株の2.9%

(4/138) が Enterotoxin (LT, ST) 産生株と報告している。

広島湾での腸炎ビブリオの分布と生態については小川ら [157] の報告がある。好塩性の本菌は、海水、カキ、海底泥に広く分布しているが、海水温度が15°C以下の1~4月には海底泥からのみ分離される。水温が15°Cを超える5月から急速に菌量が増加し海水、カキから高率に分離され始め、6~8月には海水で10³/100mlの菌量に達する。また、Venkateswaran ら [158, 159] は広島湾の病原ビブリオ調査で *Vibrio* 14種、361株を分離し、その菌種は Non-O1 *Vibrio cholerae* (20.2%), *V. parahaemolyticus* (18.1%), *V. fluvialis* (8%), *V. mimicus* 及び *V. vulnificus* であったと報告している。その内、Non-O1株の57%が溶血毒や細胞毒産生株であったと報告している。

Hood ら [160] は Apalachicola 湾のカキから Non-O1 *Vibrio cholerae* を分離したが、その時の海水 FC MPN は <230/100ml、カキ FC MPN は 210/100g と報告している。また Tamplin ら [161] はカキから Non-O1 *Vibrio cholerae* を 31.0%(18/58)、菌量 1.1~3,000/g、海水では 41.5%(26/63)、菌量 43~7×10⁵/100ml と報告している。DePaola ら [162] は海水(71.3%)、貝類(24.9%)及び汚泥(21.1%)から分離したが、いずれの株もトキシン非産生株であったと報告している。また、水温が20°Cを超えると海水から50%分離されたとの報告 [163]もある。*V. vulnificus* について Kaysner ら [164]は、海水、カキ、汚泥では5.9%(31/

529)と低い分布率であったと報告している。

Aeromonas の分布について得能ら [165] は、海水で 36.7% (11/30), 菌量 3.6~360/100 ml, カキで 50% (15/30), 菌量 <30~93,000/100 g であり, 季節的には 7 月が最も多く, 1~3 月が最も少ないと報告している。また, 菌種は分離 53 株中 75.5% が *A. hydrophila* で 24.5% が *A. sobria* と報告している。Williams ら [166] は表層海水 (11.1~31°C) で 53.6% (15/28), 菌量 0.4~46,000/ml と報告している。Kaper ら [167] は海水 (20.6~28.9°C) から 94.7% (18/19) 分離し, その菌量は $0.3\sim 5\times 10^3/ml$ で, その 71% (83/116) が Y-1 細胞で毒性を示したと報告している。Abeyta ら [168] も海水 (17%), カキ (38%) で分離し, その菌量は 3~4,600/100 g, ml と報告している。石原ら [169] は市販カキで 34% 分離し, その菌量は $10^2\sim 10^4/g$ と報告している。小林ら [170] は市販カキの直接法では 20% (6/30) であるが, 増菌法では 83.3% (25/30) と増大すると報告している。Abeyta ら [171] は 1983 年, ルイジアナ州のカキを原因とした 7 事例の集団食中毒事例で, カキから 9.3/100 g の病原性 *A. hydrophila* を回収している。Hood ら [172] はカキの処理, 保存中 (4°C) に一般細菌数と *Aeromonas* だけが濃縮, 増菌されたと報告している。以上のように *Aeromonas* は河口海水, 及びカキに広く分布していることが明らかにされている。

広島湾のウエルシュ菌の分布について岸本ら [173] は, 海水 (2 ml) では全て陰性であったが, 生カキ (1 g) からは 58.3% (35/60) 分離され, その 94.3% (33/35) が Hobbs 型別されたと報告している。Saito [174] は供試した市販生カキ全てから分離したが, その 22.4% (50/223 株) が Hobbs 型別され, さらに Enterotoxin 産生株はわずか 4.0% (9/223 株) であったと報告している。谷口 [175] は有明湾の海泥から 92.0% (46/50), 菌量 1~120/g 分離し, その 16.1% (10/62) がエンテロトキシン産生株であったと報告している。また, 小林ら [176] は, アサリ, シジミ, ホタテガイ 116 検体の全てから本菌を分離し, その 5.8% (3/52) がエンテロトキシン産生株であったと報告している。

ボツリヌス菌 (*Cl. botulinum*) の分布調査報告は少ないが, Venkateswaran ら [177] は瀬戸内海の海水から 12% (3/26), 広島湾で C, D 型ボツリヌス菌を 22% (2/9) 分離している。Carney ら [178] は海水から 12% (4/33) 分離し, その毒素型別は B, C, E 型と報告している。さらに, Saylor [154] からも Chesapeake 湾の海水から

12.1% (4/33) 分離している。

また, 最近注目されているリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) の湾内での調査はないが, Motes [179] は Mobile 湾の海水, カキ, 小エビから 4.8% (11/227) 分離したと報告している。Colburn [180] は Arcata 湾の海水 67.6% (25/37), 浮遊物 30.4% (14/46), カキ 2.9% (1/35) から分離し, カキの分離菌種は *L. innocua* と報告している。また, Weagant ら [181] は冷凍魚介類の 61% (35/57) からリステリア菌を分離し, その 26% (15/57) が *L. monocytogenes* であったと報告している。

以上のように冬季に生食されるカキで特に重要視しなくてはならない病原細菌は, 海水やカキでの病原細菌の分布状況からみて, 病原大腸菌とエロモナスであると考えられる。さらに, リステリア, エルシニアなど低温発育性の病原細菌 [182] についてもより詳細な調査が必要と考えられる。

広島湾での enterovirus の分布調査に関する報告 [183] は少ないが, 前述したように Coliphage が河口海水中に多く分布していることから, 各種の enterovirus の分布が推察される。Chalapatirao ら [184, 185] は河口海水から rotavirus を 29.2% (21/72) 分離し, ウイルス量は 119~1,000 PFU/378 l と報告している。さらに, enterovirus は全体の 26% (27/103) を占め, 最も分離率の高いのは可溶性浮遊物の 72% (13/18) であり, 海水では 14% (5/35), 海底泥では 5.7% (2/35) となっている。その virus 型は echovirus 2, 7, 29 型, poliovirus 1, 2, 3 型, coxsackievirus B 3, B 4 型と報告している。Goyal ら [186] は enterovirus の分離は禁止海域で海水 63.3% (19/30), カキ 40% (12/30), 許可海域では海水 50% (7/14), カキ 20% (2/10) と報告している。一方, Wait ら [187] は, ハマグリからの enterovirus の分離率は指定海域で 40%, 禁止海域で 23.1% で, ウイルス分離と汚染指標菌の相関は低いと報告している。Fugate ら [188] はテキサス産カキから echovirus 4 型及び poliovirus 1 型 (2/17), ルイジアナ産カキから poliovirus 3 型 (1/24), 日本産冷凍カキから poliovirus 1 型を分離し, ウイルス分離と汚染指標菌量とは関連性がなかったと報告している。Schaiberger ら [189] は海水中に 21~59 PFU/400 l, 汚泥で 78~112 PFU/g の enterovirus を分離している。同様に Gerba ら [190] は Gulf 湾海水での enterovirus の分布量は, 2~16 PFU/20 l, 浮遊物で 180~332 PFU/400 ml と報告している。一方, Cole ら [191] は

1～2月の海水(水温12～16°C)から enterovirus を15% (6/40) 検出している。

最近注目されているカキと肝炎ウイルスの関係についてみると、Nasser ら [192] は ELISA 法で海水から hepatitis A virus を15% (3/20) 検出している。また、Jiang ら [193] は Galveston 湾の海水 (50 gal) から DNA プローブ法で hepatitis A virus を検出している。さらに、Divizia [194] も Tiber 川の河口水 (50～125 l) から3株のヒト hepatitis A virus を分離している。

カキを推定原因食とした norwalk, rota, SRV, echo などのウイルス性下痢症や肝炎の発生報告 [147, 195-201] も国内外に多く、今後国内においても詳細な調査が望まれる。

9) 病原細菌と汚染指標菌の相関性

病原細菌と汚染指標菌の相関性についても多くの報告がある。福田ら [150] はカキでの *Salmonella* 分離率は、FC MPN >230/100 g では8.6% (13/152)、FC <230/100 g では5.9% (1/17) で、両者に有意差は認められなかったと報告している。一方、Andrews ら [148] は、TC MPN <70/100 ml の海域で採取したカキでは *Salmonella* は7.5% (15/199) 分離されたが、FC MPN <14/100 ml では2.4% (6/255) でありFCが指標菌として優れていると報告している。Hood ら [202] は FC MPN <230/100 g のカキでは *Salmonella* は分離されず、指標菌をFCから *E. coli* に替えることは無意味だと報告している。Andrews ら [203] はハマグリにおける *Salmonella* 分布は、その採取海水が TC MPN <200/100 ml では分離されず、TC MPN ≥200/100 ml の海域では3.4% (5/148) の分離率であったと報告している。橋本ら [151] は TC MPN >10³/100 ml の海域では、海水500 ml から *Salmonella* は87.5% 分離されたが、それ以下の場合には2.0% であったと報告している。Slanitz ら [204] は FC MPN <740/100 ml の海水 (2 l) からの分離率は11.9% (5/42) で、それを超える場合は89.5% (17/19) と報告している。さらに、Van Donsel ら [205] は河口海水のタンボン法により FC MPN <200/100 ml では12.8% (33/258)、201～2,000/100 ml で44.4% (40/90)、>2,000/100 ml では60.0% (45/75) と分離率が上昇したことを報告している。Borrego ら [206] は海水中の phage K2 (X) と *Salmonella* (Y) との分布相関は $r = 0.906$ ($p < 0.001$)、 $Y = 0.521 + 0.798(X)$ と高く、phage 量 <200 PFU/100 ml の海水での分離率は1.38～3.7%、≥200 PFU/100 ml では10.6

～14.8% と報告している。Dutka ら [103] は海水中の *Salmonella* (1:) に対する FC, Coliphage の各分布比は、それぞれ $172 \sim 49 \times 10^5$ 、 $118 \sim 11 \times 10^4$ であり、enterovirus (1:) に対しては、それぞれ $172 \sim 49 \times 10^5$ 、 $118 \sim 11 \times 10^4$ と報告している。D'aoust ら [207] は *Salmonella* を分離した小エビ7例の FC MPN は $2 \sim 1.6 \times 10^4/100$ g、*E. coli* MPN は $2 \sim 1.6 \times 10^4/100$ g と報告している。また、小川ら [155] は河口海水55 ml 中の病原大腸菌は、FC MPN <18/100 ml で7.4% (14/188)、≥18/100 ml では23.9% (45/188) と報告している。Labelle ら [208] は河口海水20 l 中の enterovirus 量は FC MPN >4,600/100 ml では、30～528 PFU/100 ml であり、FC MPN <90/100 ml では0～7 PFU/100 ml と報告している。さらに、enterovirus 量 (Y) と FC/100 g (X) については $Y = 11.93 + 0.008(X)$ の関係にあると報告している。また、Fattal ら [209] は19°C 海水の enterovirus (Y) と TC (X) の相関は $r = 0.774$ 、 $\text{Log}(Y) = 0.205 \text{Log}(X) - 2.939$ と報告している。Kott ら [210] は下水での enterovirus に対する Coliphage の比率は、 $1 : 10^3 \sim 10^5$ と報告している。一方、Fugate ら [188] は *E. coli* MPN <230/100 g のカキや、TC MPN 2～350/100 ml の海水からも poliovirus を分離している。

以上のように、汚染指標微生物である TC, FC, *E. coli*, Coliphage などの分布量と海水、カキへの病原微生物出現との相関を認めた報告が多い。このことから養殖海域の清浄度を定期的に汚染指標菌でモニタリングする意義と重要性が認められている。

10) 海水中での病原細菌の消長

Salmonella, *Shigella* などの病原微生物の海水中の消長について多くの報告がある [122, 123]。Nabbut ら [211] は無処理海水中的での *S. Typhi* は48 hr 後で、1.2～0.04% に減少したと報告している。Munro ら [212] は22～24°C ろ過海水中的での *Shigella dysenteriae* の T (10^{-6}) は6日、*S. Typhi* の T (10^{-3}) は10日、*E. coli* の T (10^{-4}) は7日と報告している。また、Vasconcelos ら [126] は14.5°C 海水の Diffusion-chamber 中の *S. Enteritidis* の T (10^{-1}) は4日、Rhodes ら [122] は2月の無ろ過海水中的の *Salmonella* の T (10^{-2}) は8～10日と報告している。

次に各種 virus についてみると、Lo ら [213] は2～19°C、塩分濃度8～10 ppt の冬季天然海水中で poliovirus 1型は53日で $10^7 \rightarrow 0$ PFU、echovirus 6型は88日で $10^6 \rightarrow 10^2$ PFU、coxsackievirus B 5型は116日で

$10^6 \rightarrow 10^0$ PFU に減少したと報告している。また Smith ら [214] は塩分濃度 24~29 ppt の海水中の T(10^{-4}) は echovirus 1 型で 8~18 日, coxsackievirus B 3 型で 7~20 日, poliovirus 1 型で 4 日, さらに Sediment に吸着した virus は, この 1.5~2 倍の長期間生残すると報告している。

Akin ら [215] は 24°C を過海水中での poliovirus 1 型の T($10^{-2.9}$) は 5 日と報告しており, 前項で述べた virus の汚染指標である Coliphage の消長と一致している。Patti ら [216] は無処理海水中の hepatitis A virus の T($10^{-2.5}$) は 4 日, poliovirus 1 型の T($10^{-1.5}$) も 4 日と報告している。

以上のように海水中での病原微生物の消長は, 海水の水温, 塩分濃度, 浮遊物量などの影響を受けるが, 一般的には芽胞菌である *Clostridium*, *Bacillus* や各種ウイルスが最も長く生残し, ついで *Salmonella*, *E. coli* の順と考えられる。

11) 海水及びカキの細菌叢 (フローラ)

河口海水やカキのフローラは, 河川水に由来する陸棲細菌と海洋細菌が混在する多菌種で構成されている。食品細菌学あるいは環境細菌学の分野では, 食中毒細菌をはじめとする病原細菌やその汚染指標菌が検索の対象となっている。しかし, これまで原因不明とされた生カキによる食中毒の病因物質究明や, 生食されるカキの品質保持と安全性の確保には, 構成するフローラの把握が重要である。坂井 [217] は, 海洋フローラの検索ではその使用培地, 培養方法及び培養温度により成績は大きく異なることを報告している。小川ら [218] は海水やカキのフローラについて, 海水添加プレート培地では, 海水で $10^2 \sim 10^4/\text{ml}$, カキで $10^3 \sim 10^6/\text{g}$ と海水無添加に比較して菌量は 5~10 倍多く, その菌種も異なることを報告している。すなわち, 海水添加の場合は, *Micrococcus* (26.5%), *Bacillus* (15.9%), *Vibrio* (13.3%), *Chromobacterium* (9.3%), *Moraxella* (8.5%), *Pseudomonas* (7.1%), *Flavobacterium* (6.4%), Coliform (2.8%) などが主要な菌種である。しかし, 海水無添加の場合は *Micrococcus* (24.7%), *Bacillus* (19.5%), *Alcaligenes* (10.9%), *Flavobacterium* (9.3%), *Chromobacterium* (8.8%), *Streptococcus* (8.8%), *Pseudomonas* (7.6%), Coliform (7.1%) とやや様相が異なっている。橋本ら [219] は太田川河口域の細菌叢の動態は, 河川から海域に移行するに従い, 急速に菌叢が変化することを報告している。それによれば河口河川水では, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Enterobacteriaceae* が多く, 海水ではこれら

は減少して *Vibrio* が最も主要な菌叢となっている。

Vasconcelos ら [220] は, 海水で $10^3 \sim 10^5/\text{ml}$ の菌量を示すフローラは *Pseudomonas* type 1 (21.6%), *Vibrio* (26.2%), *Moraxella/Acinetobacter* (19.0%), *Flavobacterium* (14.4%), カキでは *Vibrio* (31%), *Flavobacterium* (27%), *Moraxella/Acinetobacter* (17.3%) であると報告している。Vanderzant ら [221] は Galveston 湾での 3% NaCl 加 TSA 培地を用いてのカキフローラについて, 菌量は $10^4 \sim 10^7/\text{g}$ で, *Vibrio* (22.3%), *Aeromonas* (21.2%), *Moraxella* (18.9%), *Pseudomonas* (14.9%), *Enterobacteriaceae* (3.2%) という成績であったと報告している。桐原ら [222] は天然カキと養殖カキ及びそれらの浄化前と浄化後のフローラの相違を検討し, 標準寒水培地では天然カキで *Vibrio*, 養殖カキで *Enterobacteriaceae*, 人工海水培地ではいずれも *Pseudomonas* が主要細菌叢であり, 浄化により *Enterobacteriaceae* と *Bacillus* が特に減少したと報告している。Pace ら [223] が塩素処理や熱処理 (80°C 10 分) 後の主要なカキフローラは *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* であったと報告している。Kueh ら [224] はカキの部位別フローラの検索を行い主要なフローラは *Pseudomonas* (48.6%), *Vibrio* (18.4%), *Flavobacterium/Cytophaga* (9.2%), Coliforms (9.2%) などが主要な菌種であったと報告している。Garland ら [225] は, 電顕検査法ではカキ表面の細菌数は少なく, その原因はエラの粘液産出と繊毛運動にあると報告している。一方, Rowse ら [226] は実験的に汚染させたカキの糞便から *Salmonella*, *E. coli*, 一般細菌などが飼育海水中に大量に再放出されることを報告している。このことは構成するフローラはカキの消化管内で増殖はしないが, 死滅することなく濃縮と放出を繰り返していると考えられる。

Hagler ら [227] は河口海水から平均 2,900/100 ml, 73 種の酵母を分離し, 主要な属は *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Trchosporon* などであると報告している。Austin ら [228] は沿岸海水の細菌を 51 種に分類している。また, Hood [229] は殻つきカキの保存試験で 20°C , 7 日で $1.3 \times 10^2/\text{g}$, 8°C , 14 日で $5 \times 10^2/\text{g}$ の *Rhodotourula rubra* の増殖を報告している。一方, 小沼ら [230] や鈴木 [231] は市販生カキについて, 17 種の培地を用いて検討した結果, 広島産カキの主要フローラは, *Lactobacillus streptobacterium* ($10^4 \sim 10^8/\text{g}$) で, ついで *Aeromonas hydrophila* ($<10^2 \sim 10^6/\text{g}$), その他 *Bacillus*, *Moraxella*, *Pseudo-*

monas, *Enterobacter*, *Klebsiella* ($<10^3 \sim 10^4/g$) と報告している。このことは剥き身カキの流通過程でのフローラの変化を示唆している。

以上のようにカキのフローラは、養殖海水からの影響を受けて多菌種で構成されている。これらのフローラはカキ保存中の品質変化に大きく影響しているものと考えられる。

結 語

以上、世界各国のカキ衛生に関する研究成果を通覧しながら、「カキ衛生と広島湾」をテーマに細菌学的立場から広島湾でのカキ衛生について総説した。現在の広島湾の細菌学的衛生状態は1975～1979年の汚染ピーク時よりは改善されているものの、指定外海域、なかでも河口部海域では米国の基準による禁止海域の汚染レベルの海域も現存している。これらの海域で採取されるカキが十分に人工浄化されないか、あるいは加熱調理されないで生食された場合、ヒトへの健康障害が危惧される。

生食されるカキの衛生確保には、下水道の整備などの汚染対策の推進は基より、カキ出荷期の海域衛生把握、さらには市販生食カキの成分規格の厳守、生食用・加熱用の明確な用途区分による適正な流通と消費者の啓蒙などの基本的施策の徹底が重要と考えられる。またカキのより高率の人工浄化法の確立も今後重要な課題と考えられる。

謝 辞

稿を終るに当たり本論文執筆に当たり有益なご助言ならびにご校閲を頂いた本研究所、海佐裕幸所長に深謝いたします。

文 献

- [1] 岡垣 茂(1977): 広島かき. 1—157. 広島かき出荷振興協議会, 広島.
- [2] 荒川好満 (1989): 広島かき養殖史便覧. 1—89. 広島貝類談話会, 広島.
- [3] 中国四国農政局 (1990): 広島農林水産統計年報(水産編) 1989—1990. 306—307. 広島農林統計協会, 広島.
- [4] 水産庁(1980): 昭和55年度赤潮対策技術開発試験(潮流解析) 報告書(1)広島湾一流況図, 流程図. 1—27.
- [5] 広島県農政部 (1985): 公害指導基礎資料(広島県海域の水理環境データ集). 311—374. 広島.
- [6] 水産庁第六管区海上保安部(1988): 広島湾の海洋環境(水温・塩分・透明度について). 1—90.
- [7] Bundesen, H.N. (1922): Typhoid epidemic in Chicago apparently due to oyster. JAMA, 84, 641—650.
- [8] Ramsey, G.H., McGinnis, G.F. and Neal, P.R. (1928): Publ. Health Rep., 43, 2395.
- [9] Wood, P.C. (1976): Guide to shellfish hygiene. WHO offset publication No. 31, World Health Organization, Geneva.
- [10] 遠山祐三 (1935): 欧米における牡蠣に関する研究. 実医誌. 19, 162—179.
- [11] 持永泰輔 (1959): 広島産生カキによる食中毒事件. モダンメディア, 15, 89—92.
- [12] 楠木 豊(1977): 広島湾北部の潮流. 広島県水試研究報告, 9, 1—10.
- [13] 橋本俊将(1979): 広島湾周辺における海水の成層状況とその要因. 広島県水試研究報告, 10, 1—14.
- [14] 木村知博(1975): 広島湾海域に流入する淡水の移入について. 水産増殖, 22, 110—119.
- [15] 上嶋英機, 湯浅一郎, 宝田成康ほか(1990): 広島湾停滞性水域の水塊構造と河川水保存量の変動. 土木学会誌海岸工学論文集, 37, 799—803.
- [16] 橋本俊将(1986): 広島県の海況の概要. 広島県水試研究報告, 16, 45—68.
- [17] Menzel, W. (1991): Estuarine and marine bivalve mollusk culture. 228—232, CRC Press, Inc., Boston.
- [18] 広島水産研究会(1978): 広島市の水産振興に関する調査分析報告書, 130—150.
- [19] 中村寿夫, 森本一義, 乾 正子ほか(1980): カキの糖代謝に関する基礎的検討. 衛生化学, 26, 174—180.
- [20] Report on Committee on Sanitary Control of the Shellfish Industry in the United States (1925), Supplement No. 53, Public Health Reports, Nov. 6.
- [21] 神林三男, 鈴木 昭, 古沢陽一(1961): 米国における貝類衛生の考え方. 食品研究, 11(7), 43—51.
- [22] 古沢陽一(1961): 貝類衛生の評価の方法. 食品研究, 11(7), 37—48.
- [23] American Public Health Association (1985): Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th ed., American

- Public Health Association, DC.
- [24] U.S. Food and Drug Administration (1970): Shellfish growing area survey procedures. U.S. Publ. Health Service, Washington, DC.
- [25] U.S. Public Service (1986): National shellfish sanitation program manual of operation part I. Sanitation of shellfish growing areas., U.S. Publ. Health Service, Washington, DC.
- [26] U.S. Food and Drug Administration (1987): National Shellfish sanitation program manual of operation. Part II. Sanitation of the harvesting, processing and distribution of shellfish., U.S. Publ. Service, Washington, DC.
- [27] 厚生省 (1958): 「かきに関する衛生上の指導について」. 厚生省衛発96号, 昭和33年2月1日付.
- [28] 厚生省 (1962): 「食品, 添加物等の規格基準の一部改正」. 厚生省告示第192号, 昭和37年5月26日付.
- [29] 厚生省 (1963): 「生食用魚介類の取扱の指導について」. 環発第312号, 昭和38年7月30日付.
- [30] 厚生省 (1967): 「食品, 添加物等の規格基準の一部改正」. 厚生省告示第349号, 昭和42年8月2日付.
- [31] C. B. ケリー, W. A. フェルシング(1962): 広島県の貝類衛生管理に関する報告書. 米国保健教育福祉省公衆衛生局, 環境衛生および食品保護局. 10-11.
- [32] 厚生省食品衛生課(1963): 日米貝類衛生取り決めの成立について. 食品研究, 13(1), 33-40.
- [33] 広島県環境保健部(1986): かき衛生関係法令集. 1-71.
- [34] 佐藤忠勇(1968): 的矢湾養蠔研究所その歴史及び現在, 並びに的矢湾の海洋学的特性について. 日本プランクトン学会報, 15, 20-37.
- [35] 中津川修二, 上葛昭一(1975): 静岡県における生カキの食品衛生学的検討. 静岡県衛研所報, 18, 22-35.
- [36] 橋本勢津, 川俣行三, 中島端彦ほか (1987): 生カキの検査および指導結果について. 食品研究, 35(1), 57-63.
- [37] 小川博美, 福田伸治, 岸本敬之(1989): 広島湾におけるかき衛生調査データ処理システム (Ver. 2) の検討. 広島県衛研所報, 36, 1-12.
- [38] 甲斐明美, 伊藤 武, 斉藤香彦ほか(1983): 生カキが原因食品と推定された毒素原性大腸菌食中毒2事例の調査成績. 東京都衛研年報, 34, 121-125.
- [39] 岡田正次郎 (1987): カキによる急性胃腸炎と Small Round Virus; 歴史的背景とSRVによる小児嘔吐下痢症. 食品と微生物, 4, 93-102.
- [40] 花木孝祐, 村上 司, 藪城昇次ほか(1987): 生カキが推定原因食とされた集団食中毒患者糞便中に電顕的に検出されるSRVの検出状況. 感染症情報, 6月号, 112-113.
- [41] 関根整治, 林 志直, 安東民衛ほか(1986): 都内において冬季に集団発生した非細菌性胃腸炎のウイルス学的検索. 感染症学雑誌, 60, 453-459.
- [42] Hunt, D.A. (1980): Microbiological standards for shellfish growing areas-What do they mean?. J. Food Prot., 43, 127-128.
- [43] Cabelli, V.J., Dufour, A.P., McCabe, L.J. et al (1983): A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. J. WPCF., 55, 1306-1314.
- [44] Presnell, M.W. and Miescier, J.J. (1971): Coliform and fecal coliforms in an oyster-growing area. J. WPCF., 43, 407-416.
- [45] Sobsey, M.S., Hackney, C.R., Carrick, R.J. et al (1980): Occurrence of enteric bacteria and viruses in oysters. J. Food. Prot., 43, 111-113.
- [46] Hunt, D.A. and Springer, J. (1978): Comparison of two rapid test procedures with the standard EC test for recovery of fecal coliform bacteria from shellfish-growing waters. J. AOAC., 61, 1317-1323.
- [47] Brown, L.D. and Dorn, C.R. (1977): Fish, shellfish, and human health. J. Food Prot., 40, 712-717.
- [48] Bordner, R.H. (1978): Standardization of microbiological methods for analysis of water. J. Food Prot., 41, 314-319.
- [49] Morrison, S.M. (1978): Microbiology standards for waters. J. Food Prot., 41, 304-308.
- [50] Gresson, P.E. (1978): Microbiological monitoring for water-quality assessment. J. Food Prot., 41, 309-313.

- [51] Yoshpe-purer, Y. (1989): Evaluation of media for monitoring fecal *streptococci* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2041—2045.
- [52] 鈴木 昭(1970): かきなどにおける大腸菌及び大腸菌群について. *モダンメディア*, **16**, 268—277.
- [53] U.S. Public Health Service. (1986): National shellfish sanitation program manual of operations. Part I. Sanitation of Shellfish growing areas. U.S. Publ. Health Service, Washington, DC.
- [54] Meynard, C., Reys J.P., Phan-Tan-Luu, R. et al. (1989): Bacteriological monitoring of sea water: Correlation between fecal and total coliforms and interpretation of the results according to the present standards. *Wat. Res.*, **23**, 663—666.
- [55] Allsop, K. and Stickler, D.J. (1985): An assessment of *Bacterioides fragilis* group organisms as indicators of human fecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.*, **58**, 95—99.
- [56] Bisson, L.W. and Cabelli, V.J. (1980): *Clostridium perfringens* as a water pollution indicator. *J. WPCF.*, **52**, 241—248.
- [57] Esterbrook, T.J. and West, P.A. (1987): Comparison of most probable number and pour plate procedures for isolation and enumeration of sulphite-reducing *Clostridium* spores and group D faecal *streptococci* from oyster. *J. Appl. Bacteriol.*, **62**, 413—419.
- [58] Crrillo, M., Estrada, E. and Hazen, T.C. (1985): Survival and Enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 468—476.
- [59] Seeley, N. D. and Primrose, S.B. (1982): A review; The isolation of bacteriophages from the environment. *J. Appl. Bacteriol.*, **53**, 1—17.
- [60] IAWPRC Study Group (1991): Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Wat. Res.*, **25**, 529—545.
- [61] Stetler, R.E. (1984): Coliphage as indicators of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 668—670.
- [62] Hunt, D.A. (1974): Preliminary report on a comparison of total coliform and fecal coliform values in shellfish growing area waters and a proposal for a fecal coliform growing area standard. Proceeding 8 th national shellfish sanitation workshop., New Orleans, Louisiana.
- [63] 厚生省食品衛生課(1976): 米国における貝類養殖海域の海水並びに貝類の細菌学的検査について. *食品研究*, **26**(8), 68—77.
- [64] Hussong, D. Damare, J.M., Weiner, R.M. et al. (1981): Bacteria associated with false-positive most-probable-number coliform test results for shellfish estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 35—45.
- [65] Austin, B., Hussong, D., Weiner, R.M. et al. (1981): Numerical taxonomy analysis of bacteria isolated from the completed 'Most Probable Numbers' test for coliform bacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, **51**, 101—112.
- [66] Andrews, W.H. and Presnall, M.W. (1972): Rapid recovery of *Escherichia coli* from estuarine water. *Appl. Microbiol.*, **23**, 521—523.
- [67] Hunt, D.A., Lucas, J.P., McClure, F.D. et al. (1981): Comparison of modified A-1 method with standard EC test for recovery of fecal coliform bacteria for shellfish. *J. AOAC.*, **64**, 607—610.
- [68] Yoovidhya, T. and Fleet, G.H. (1981): An evaluation of the A-1 most probable number and the Anderson and Baird-Parker plate count methods for enumerating *Escherichia coli* in the sydney rock oyster, *Crassostrea commercialis*. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 519—528.
- [69] Miescier, J.J., Carr, V.E., Musselman, J.F. et al. (1978): Fecal coliform methods for examination of sea water: interlaboratory evaluation of split sample analysis. *J. AOAC.*, **61**, 772—778.
- [70] Andrews, W.H., Wilson, C.R., Poelma, P.L. et al. (1981): Interlaboratory evaluation of the AOAC method and the A-1 procedure for

- recovery of fecal coliforms from foods. J. AOAC., 64, 1116—1121.
- [71] Motes, M.L., McPhearson, R.M. and Depaola A. (1984): Comparison of three international methods with APHA method for enumeration of *Escherichia coli* in estuarine waters and shellfish. J. Food Prot., 47, 557—561.
- [72] 岩原茂雄, 鈴木文子, 田崎宣子ほか (1977): A-1 培地に関する研究. 食品研究, 27(8), 712—729.
- [73] 岸本敬之, 得能弘志, 小川博美 (1977): 大腸菌検出能の比較研究. I カキ及び海水についての検討. 広島県衛研所報, 24, 50—56.
- [74] Humphrey, T.J. and Gawler, A.H.L. (1986): A rapid simple method for the detection and enumeration of *Escherichia coli* in cleaned shellfish. J. Hyg., Camb, 97, 273—280.
- [75] West, P.A. and Coleman, M.R. (1986): A tentative national reference procedure for isolation and enumeration of *Escherichia coli* from bivalve molluscan shellfish by most probable number method. J. Appl. Bacteriol., 61, 505—516.
- [76] Hall, L.P. (1984): A new direct plate method for the enumeration of *Escherichia coli* in frozen foods. J. Appl. Bacteriol., 56, 227—235.
- [77] Wright, R.C. (1984): A new selective and differential agar medium for *Escherichia coli* and coliform organisms. J. Appl. Bacteriol., 56, 381—388.
- [78] Matner, R.R., Fox, T.L., Mciver, D.E. et al. (1990): Efficacy of petrifilm *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration. J. Food Prot., 53, 145—150.
- [79] Havelaar, A.H. and During, M.D. (1988): Evaluation of the anderson bard-parker direct plating method for enumerating *Escherichia coli* in water. J. Appl. Bacteriol., 64, 89—98.
- [80] Rippey, S.R., Adams, W.N. and Watkins, W.D. (1987): Enumeration of fecal coliforms and *E. coli* in marine and estuarine waters: An alternative to the APHA-MPN approach. J. WPCF., 59, 795—798.
- [81] Brodsky, M.H., Entis, P., Sharpe, A.N. et al. (1982): Enumeration of indicator organisms in foods using the automated hydrophobic gridmembrane filter technique. J. Food Prot., 45, 292—296.
- [82] Entis, P. and Boleszczuk, P. (1990): Direct enumeration of coliforms and *Escherichia coli* by hydrophobic grid membrane filter in 24 hours using MUG. J. Food Prot., 53, 948—952.
- [83] Brodsky, M. H., Boleszczuk, P. and Entis, P. (1982): Effect of stress and resuscitation on recovery of indicator bacteria food using hydrophobic grid-membrane filtration. J. Food Prot., 45, 1326—1331.
- [84] Peter, C.S. and Hartman, P.A. (1982): Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 43, 1320—1329.
- [85] Motes, M.L. and Peeler, J.T. (1991): Field evaluation of the MUG assay for enumerating *Escherichia coli* in seawater and oysters from southeastern United States. J. Food Prot., 54, 246—248.
- [86] Moberg, L.J. (1985): Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in food. Appl. Environ. Microbiol., 50, 1383—1387.
- [87] Berg, J.D. and Fiksdal, L. (1988): Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone- β -galactoside. Appl. Environ. Microbiol., 54, 2118—2122.
- [88] Lee, R.M. and Hartman, P.A. (1989): Inexpensive, disposable presence-absence test for coliforms and *Escherichia coli* in water. J. Food Prot., 52, 162—164.
- [89] Cheng, W.H.S., Ha, D.K.K., Yeung, K. Y. et al. (1991): Methods for enumerating *Escherichia coli* in subtropical waters. Epidemiol. Infect., 106, 345—354.
- [90] 広島県環境保健部 (1982): 環境行政のあゆみ. 73—247.
- [91] 山田真知子, 鶴田新生, 吉田陽一 (1982): 瀬戸内海主要海域の生物学的富栄養階級図, Japn. Soc. Sci. Fisheries, 48, 1123—1132.

- [92] 荒川好満 (1973): 養殖カキ生産の推移ならびに海産生物群集の遷移から見た広島湾の富栄養化。うみ, 11, 103—108.
- [93] 木村知博 (1977): 広島湾北部の透明度の経年変化とその支配要因について。沿岸海洋ノート, 14, 101—107.
- [94] 小川博美, 岸本敬之, 得能弘志ほか (1986): 細菌学的汚染の経年推移からみた広島湾の衛生学的評価。広島県衛研所報, 33, 17—24.
- [95] 小川博美, 岸本敬之, 得能弘志ほか (1987): 細菌学的汚染の経年推移からみた広島湾の衛生学的評価。広島県獣医学会誌, 2, 13—21.
- [96] 小川博美, 岸本敬之, 得能弘志ほか (1988): 広島湾の衛生指標菌による汚染パターン分類, 広島県獣医学会誌, 3, 54—63.
- [97] 環境庁 (1985): 瀬戸内海の環境保全。1—123, 東京。
- [98] 小川博美, 岸本敬之, 得能弘志ほか (1986): かき養殖海水とかきにおける大腸菌群MPNと糞便性大腸菌MPNの相関性。食品と微生物, 3, 87—94.
- [99] Burkhardt, W., Watkins, W.D. and Rippey, S.R. (1992): Seasonal effects on accumulation of microbial indicator organisms by *mercenaria mercenaria*. Appl. Environ. Microbiol., 58, 826—831.
- [100] Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Melnick, J.L. (1977): Occurrence and distribution of bacterial indicators and pathogens in canal communities along the Texas coast. Appl. Environ. Microbiol., 34, 139—149.
- [101] Wentzel, R.S., O'Neill, P.E. and Kitchens, J.F. (1982): Evaluation of coliphage as a rapid indicator of water quality. Appl. Environ. Microbiol., 43, 430—434.
- [102] Kenard, R.P. and Valentine, R.S. (1974): Rapid determination of the presence of enteric bacteria in water. Appl. Microbiol., 27, 484—487.
- [103] Dutka, B.J., Shaarawi, A.E., Martins, M. T. et al. (1987): North and south american studies on the potential of coliphage as a water quality indicator. Wat. Res., 21, 1127—1134.
- [104] Bell, R.G. (1976): The limitation of the ratio of fecal coliforms to total coliphage as a water pollution index. Wat. Res., 10, 745—748.
- [105] Kelch, W.J. and Lee, J.S. (1978): Modeling techniques for estimating fecal coliforms in estuaries. J. WPCF., 50, 862—868.
- [106] Sayler, G.S., Nelson, J.D., Justice, A. et al (1975): Distribution and significance of fecal indicator organisms in the upper Chesapeake bay. Appl. Microbiol., 30, 625—638.
- [107] Shundaer, L. (1974): Bacteriological assessment of spoon river water quality. Appl. Microbiol., 28, 288—297.
- [108] Gallagher, T.P. et al (1968): The significance of numbers of coliform bacteria as an indicator of enteric pathogens. Wat. Res., 2, 169—175.
- [109] 西條八東 (1984): 内湾の環境科学 (上巻)。1—162, 培風館, 東京。
- [110] 日本水産学会編 (1977): 浅海養殖と自家汚染。水産学シリーズ21, 109—117, 恒星社厚生閣, 東京。
- [111] Faust, M.A., Aotaky, A.E. and Hargadon, M.T. (1975): Effect of physical parameter on the in situ survival of *Escherichia coli* MC-6 in an estuarine environment. Appl. Microbiol., 30, 800—806.
- [112] Borrego, J.J., Arrabal, F., Vicente, L.F. et al. (1983): Study of microbial inactivation in the marine environment. J. WPCF, 55, 297—302.
- [113] Dawe, L.L. and Penrose, W.R. (1978): "Bactericidal" property of seawater: Death or debilitation?. Appl. Environ. Microbiol., 35, 829—833.
- [114] Canale, R.P. (1973): Model of coliform bacteria in Grand traverse bay. J. WPCF, 45, 2358—2371.
- [115] Mancini, J.L. and Ridgewood, N.J. (1978): Numerical estimates of coliform mortality rates under various conditions. J. WPCF, 50, 2477—2484.
- [116] Harremoës, P. (1970): Field determination

- of bacterial disappearance in seawater. *Wat. Res.*, 4, 737—749.
- [117] McCambrige, J.X. and McMeekin, T.A. (1980): Relative effects of bacterial and protozoan predators on survival of *Escherichia coli* in estuarine water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 907—911.
- [118] McCambrige, J.X. and McMeekin, T.A. (1979): Protozoan predation of *Escherichia coli* in estuarine water. *Wat. Res.*, 13, 659—663.
- [119] Savage, H.P. and Hanes, N.B. (1978): Toxicity of seawater to coliform bacteria. *J. WPCF*, 43, 854—861.
- [120] Gerba, C.P. and Mcleod, J.S. (1976): Effect of sediment on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 114—120.
- [121] McFeters, G.A. and Stuert, D.G. (1972): Survival of coliform bacteria in natural water: Field and laboratory studies with membrane-filter chambers. *Appl. Microbiol.*, 24, 805—811.
- [122] Rhodes, M.W. and Kator, H. (1988): Survival *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2902—2907.
- [123] Anderson, I.C., Rhodes, M.W. and Kator, H.L. (1983): Seasonal variation in survival of *Escherichia coli* exposed in situ in membrane diffusion chambers containing filtered and nonfiltered estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1877—1883.
- [124] Anson, A.E. and Ware, G.C. (1975): Laboratory studies on the effect of the container on the mortality of *E. coli* in sea water. *Wat. Res.*, 9, 895—899.
- [125] Hood, M.A. and Ness, G.E. (1982). Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 578—584.
- [126] Vasconcelos, G.J. and Swartz, R.G. (1976): Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus in situ. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 913—920.
- [127] Garcia-Lara, J., Menon, P., Servais, P. et al. (1991): Mortality of fecal bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 855—888.
- [128] Servais, P., Billen, G. and Rego, J.V. (1985): Rate of bacterial mortality in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1448—1454.
- [129] 小川博美, 得能弘志, 佐々木実己子ほか (1976): カキ食中毒に関する実験的検討. (1)病原大腸菌とカキ食中毒との関連性についての検討. 広島県衛研所報, 23, 9—17.
- [130] Sobsey, M.D., Hackney, C.R., Carrick, R. J. et al. (1980): Occurrence of enteric bacteria and virus in oyster. *J. Food Prot.*, 43, 111—113.
- [131] 得能弘志, 小川博美, 佐々木実己子ほか (1977): カキ衛生に関する疫学調査 (Ⅲ), 昭和52年広島県衛研年報, 57—63.
- [132] O'Keefe, B. and Green, J. (1989): Coliphages as indicators of fecal pollution at three recreational beaches on the Firth of Forth. *Wat. Res.*, 23, 1027—1030.
- [133] Berrego, J.J. and Romero, P. (1985): Coliphage survival in seawater. *Wat. Res.*, 19, 557—562.
- [134] Gerba, C.P. and Schaiberger, G.E. (1975): Effect of particulates on virus survival in seawater. *J. WPCF.*, 47, 93—103.
- [135] Berry, S.A. and Noton, B.G. (1975): Survival of bacteriophages in seawater. *Wat. Res.*, 9, 323—327.
- [136] Niemi, M. (1976): Survival of *Escherichia coli* phage T7 indifferent water types. *Wat. Res.*, 10, 751—755.
- [137] Vaughn, J.M. and Metcalf, T. (1975): Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising estuarine waters. *Wat. Res.*, 9, 613—616.
- [138] 三輪谷俊夫 (1983): 病原菌による環境汚染. 衛生化学, 29, 333—341.
- [139] 橋本秀夫 (1991): 食中毒細菌に関する環境微生物学的研究. *J. Fac. Appl. Sic., Hiroshima*

- Univ., 30, 85—102.
- [140] Boardman, G.D., Shannon, R.D., McBrayer, T.R. (1988): Detection and occurrence of waterborne bacterial and viral pathogens. J. WPCF., 60, 1121—1132.
- [141] Gerba, C.G. and Goyal, S. (1978): Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: A Review. J. Food Prot., 41, 743—754.
- [142] Janssen, W.A. (1970): Fish as potential vectors of human bacterial diseases. Special publ. No. 5., American Fisheries Society, Washington, D.C.
- [143] West, P.A. and Wood, P.C. (1985): Control of food poisoning risks associated with shellfish. J.R.S.H., 1, 15—21.
- [144] 村上和典, 大河内卓士, 大東輝行ほか (1987): 市販生カキにおける新指定食中毒菌の汚染について. 食品研究, 37(1), 55—64.
- [145] Tyler, J. (1985): Occurrence in water of viruses of public health significance. J. Appl. Bacteriol., Symp. Suppl., 37S—46S.
- [146] 橋本秀夫 (1991): 環境微生物学の進め—食品微生物から環境微生物へ—, メデイヤサークル, 36, 285—295.
- [147] Bryan, F.L. (1980): Epidemiology of food-borne diseases transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in the United States, 1970—1978. J. Food prot., 43, 859—876.
- [148] Andrews, W.H., Diggs, C.D., Presnell, M.W. et al. (1975): Comparative validity of members of the total coliform and fecal coliform groups for indicating the presence of *Salmonella* in eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Milk Food Technol., 38, 453—456.
- [149] 宮崎佳都夫, 中森純三, 西尾隆昌 (1980): *Salmonella typhi* の生態学的研究. 広島県衛研所報, 27, 53—57.
- [150] 福田伸治, 岸本敬之, 得能弘志ほか (1981): カキ衛生からみた広島湾の *Salmonella* 汚染について. 広島県衛研所報, 28, 19—25.
- [151] 橋本秀夫, 川上英之, 村田昌芳ほか (1976): 海水のサルモネラと汚染指標菌に関する研究. 広島大学水畜産学部紀要, 15, 207—218.
- [152] Venkateswaran, K. and Hashimoto, H. (1988): Influence of indicator bacteria on the incidence of *Salmonella* in aquatic environment. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 253—258.
- [153] Fraiser, M.B. and Koburger, J.A. (1984): Incidence of *Salmonella* in clams, oyster, crabs and mullet. J. Food Prot., 47, 343—345.
- [154] Saylor, G.S., Nelson, J.D., Justice, A. et al. (1976): Incidence of *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, and *Vibrio parahaemolyticus* in an estuary. Appl. Environ. Microbiol., 31, 723—730.
- [155] 小川博美, 得能弘志, 佐々木実己子ほか (1980): かき生育環境における病原大腸菌の分布, *E. coli* MPN と病原大腸菌汚染との関連性. 食衛誌, 21, 5—12.
- [156] 小久保弥太郎, 松下 秀, 甲斐明美ほか (1978): 生カキの大腸菌汚染と分離菌株のエンテロトキシン産生性. 食衛誌, 19, 117—121.
- [157] 小川博美, 得能弘志, 岸本敬之ほか (1989): 広島湾における腸炎ビブリオの生態. 広島県獣医学会誌, 4, 47—57.
- [158] Venkateswaran, K., Kiiyukia, C., Takaki, M. et al. (1989): Characterization of toxigenic *Vibrios* isolated from the freshwater environment of Hiroshima, Japan. Appl. Environ. Microbiol., 55, 2613—2618.
- [159] Venkateswaran, K., Takai, T., Navarro, I.M. et al. (1987): Ecology of *Vibrio cholerae* Non-O1 and *Salmonella* spp. and role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukuyama coastal waters, Japan. Appl. Environ. Microbiol., 55, 1591—1598.
- [160] Hood, M.A., Ness, G.E. and Rodrick, G.E. (1981): Isolation of *Vibrio cholerae* serotype O1 from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Appl. Environ. Microbiol., 41, 559—560.
- [161] Tamplin, M.L., Rodrick, G.E., Blake, N.J. et al. (1982): Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. Appl. Environ. Microbiol., 44, 1466—1470.

- [162] DePaola, A., Presnell, M.W., Motes, M. L. et al. (1983): Non-O1 *Vibrio cholerae* in shellfish, sediment and waters of the U.S. Gulf coast. *J. Food Prot.*, **46**, 802—806.
- [163] Kelly M.T. (1982): Effect of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* occurrence in Gulf coast environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 820—824.
- [164] Kaysner, C.K., Abeyta, C., Wekell, M.M. et al. (1987): Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of United States west coast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1349—1351.
- [165] 得能弘志, 小川博美, 佐々木実己子 (1987): エロモナスに関する調査研究(Ⅱ), 広島県衛研年報, **22**, 44—45.
- [166] Williams, L.A. and Larock, P.A. (1985): Temporal occurrence of *Vibrio* species and *Aeromonas hydrophila* in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1490—1495.
- [167] Kaper, J.B., Lockman, H. and Colwell, R.R. (1981): *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *J. Appl. Microbiol.*, **50**, 359—377.
- [168] Abeyta, C., Weagant, S.D., Kaysner, C.A. et al. (1989): *Aeromonas hydrophila* in shellfish growing waters: Incidence and media evaluation. *J. Food Protect.*, **52**, 7—12.
- [169] 石原裕二, 大谷洋一, 柏原広弘ほか (1983): 生カキにおける新種の食中毒菌の検出について. *食品研究*, **33**(1), 75—80.
- [170] 小林一寛, 原田七寛, 毛利衣子ほか (1984): *Aeromonas* 属の生態学的研究, 大阪府立公衛研年報, **22**, 21—27.
- [171] Abeyta, C., Kaysner, C.A., Wekell, M.M. et al. (1986): Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. *J. Food Prot.*, **49**, 643—646.
- [172] Hood, M.A., Baker, R.M. and Singleton, F.L. (1984): Effect of processing and storing oyster meats on concentrations of indicator bacteria. *Vibrios and Aeromonas hydrophila*. *J. Food Prot.*, **47**, 598—601.
- [173] 岸本敬之, 得能弘志, 大杉豊照ほか (1967): ウエルシュ菌の自然界での系統的分布調査について (1). 広島県衛研所報, **17**, 23—28.
- [174] Saito, M. (1990): Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods and the natural environment in Japan. *J. Food Prot.*, **53**, 115—118.
- [175] 谷口忠敬 (1978): エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の海泥および河川泥における分布. *食衛誌*, **19**, 195—200.
- [176] 小林とよ子, 上野一恵 (1984): 貝類における *Clostridium* 属の分布に関する研究. *食品と微生物*, **1**, 119—125.
- [177] Venkateswaran, K., Nakano, H., Okabe, T. et al. (1989): Occurrence and distribution of *Vibrio spp.*, *Listonella spp.*, and *Clostridium botulinum* in the Seto Inland sea of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 559—567.
- [178] Carney, J.F., Carty, C.E. and Colwell, R. R. (1975): Seasonal occurrence and distribution of microbial indicators and pathogens in the Phode river of Chesapeake Bay. *Appl. Microbiol.*, **30**, 771—780.
- [179] Motes, M.L. (1991): Incidence of *Listeria* spp. in shrimp, oyster, and estuarine waters. *J. Food Prot.*, **54**, 170—173.
- [180] Colburn, K.G., Kaysner, C.A., Abeta, C. et al. (1990): *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2007—2011.
- [181] Weagant, S.D., Sand, P.N., Colburn, J. D. et al. (1988): The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Prot.*, **51**, 655—657.
- [182] Schofield, G.M. (1992): Emerging food-borne pathogens and their significance in chilled foods. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 267—273.
- [183] 武井直巳, 宮崎佳都夫, 岸本敬之ほか (1973): 殻付きカキからの食中毒起因菌検索について. 昭和48年度広島県衛研年報, **81**.
- [184] Chalapatirao, V., Seidel, K.M., Goyal, S.

- M. et al. (1984): Isolation of enterovirus from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 404—409.
- [185] Chalapatirao, V., Metcalf, T.G. and Melnick, J.L. (1986): Development of a method for concentration of rotavirus and its applicaiton to recovery of rotavirus from estuarine waters. *Appl. Environ. microbiol.*, **52**, 434—488.
- [186] Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Mernick, J. L. (1979): Human enteroviruses in oyster and their overlying waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 572—581.
- [187] Wait, D.A., Hackney, C.R., Carrick, R.J. et al. (1983): Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J. Food Prot.*, **46**, 493—496.
- [188] Fugate, K.J., Gliver, D.O. and Hatch, M. T. (1975): Enteroviruses and potential bacterial indicators in Gulf coast oyster. *J. Milk Food Technol.*, **38**, 100—104.
- [189] Schaiberger G.E., Edmond, T.D. and Gerba, C.P. (1982): Distribution of enteroviruses in sediments contiguous with a deep marine sewage outfall. *Wat. Res.*, **16**, 1425—1428.
- [190] Gerba, C.P., Smith, E.M. and Melnick, J. L. (1977): Development of a quantitative method for detecting enteroviruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 158—163.
- [191] Cole, M.T., Kilgen, M.B., Reily, L.A. et al. (1986): Detection of enteroviruses and bacterial indicators and pathogens in Louisiana oyster and their overlying waters. *J. Food Prot.*, **49**, 596—601.
- [192] Nasser, A.M. and Metcalf, T.G. (1987): An-ELISA to detect hepatitis A virus in estuarine samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1192—1195.
- [193] Jiang, X., Estes, M.K., Metecalf, T.G. et al. (1986): Detection of hepatitis A virus in seeded estuarine samples by hybridization with cDNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 711—717.
- [194] Divizia, M., Filippis, P., Napoli, A. et al. (1989): Isolation of wildtype hepatitis A virus from the environment. *Wat. Res.*, **23**, 1155—1160.
- [195] Murphy, S.J., Grohmann, P.J., Christoper, P.J. (1979): An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. *Med. J. Aust.*, **2**, 329—333.
- [196] Gunn, R.A., Janowski, H.T., Lieb, E. et al. (1982): Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. *American. J. Epidemiol.*, **115**, 348—351.
- [197] Eyles, M.J., Davey, G.R. and Huntley, E.J. (1981): Demonstration of viral contamination of oysters responsible for an outbreak of viral gastroenteritis. *J. Food Prot.*, **44**, 294—296.
- [198] 安京民衛 (1990): Smoll Round Structured Viruses —最近注目されている胃腸炎ウイルス—。モダンメディア, **38**, 438—463.
- [199] Richards, G.P. (1985): Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United States: requisite for development of viral guidelines. *J. Food Prot.* **48**, 815—823.
- [200] Ohara, H., Naruto, H., Watanabe, W. et al. (1983): An outbreak of hepatitis A caused by consumption of raw oysters. *J. Hyg. Camb.*, **91**, 163—165.
- [201] Lefkowitz, A., Fout, G.S. and Losonsky, G. et al. (1992): A serosurvey of pathogens associated with shellfish: Prevalence of antibodies to *Vibrio* species and Norwalk virus in the Chesapeake bay region. *Am. J. Epidemiol.* **135**, 369—380.
- [202] Hood, M.A., Ness, G.E. and Blake, N.J. (1983): Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 122—126.
- [203] Andrews, W.H., Diggs, C.D., Miescier, J. J. et al. (1976): Vialidity of members of the total coliform and fecal coliform groups

- for indicating the presence of *Salmonella* in the Quahaug, *Mercenaria mercenaria*. J. Milk Food Technol., 39, 322—324.
- [204] Slanitz, L.W., Bartley, C.H. and Stanley, K.W. (1968): Coliforms, fecal streptococci and *Salmonella* in seawater and shellfish. H.L.S., 5, 66—78.
- [205] Van Donsel, D.J. and Geldreich, E.E. (1971): Relationships of *Salmonella* to fecal coliforms in bottom sediments. Wat. Res., 5, 1079—1087.
- [206] Borrego, J.J., Moringo, M.A., Vicente, A. et al. (1987): Coliphages as an indicator of fecal pollution in water: its relationship with indicator and pathogenic microorganisms. Wat. Res., 12, 1473—1480.
- [207] D'aoust, J.Y., Gelinis, R. and Maishment, C. (1980): Presence of indicator organisms and recovery of *Salmonella* in fish and shellfish. J. Food Prot., 43, 679—682.
- [208] Labelle, R.L., Gerba, C.P., Goyal, S.M. et al. (1980): Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol., 39, 588—596.
- [209] Fattal, B.T., Vasl, R.J., Katzenelson, E. et al. (1983): Survival of bacterial indicator organisms and enteric viruses in the Mediterranean coastal waters of Tel-Aviv. Wat. Res., 17, 397—402.
- [210] Kott, Y., Roze, N., Sperber, S. et al. (1974): Bacteriophage as viral pollution indicators. Wat. Res., 8, 165—171.
- [211] Nubbut, N.H. and Kurayiyah, F. (1972): Survival of *Salmonella* Typhi in Sea-water. J. Hyg., Camb., 70, 223—228.
- [212] Munro, R.M., Rumond, F.L. and Gauthier, M.J. (1987): A previous of enteric bacteria on a salted medium increases their survival in sea water. Appl. Microbiol., 4, 121—124.
- [213] Lo, S. Gilbert, J. and Hetrick, F. (1976): Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. Appl. Environ. Microbiol., 32, 245—249.
- [214] Smith, E.M., Geroba, C.P. and Melick, J.L. (1978): Pole of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol., 35, 685—689.
- [215] Akin, E.W., Hill, F.H., Cline, G.B. et al. (1976): The loss of poliovirus 1 infectivity in marine waters. Wat. Res., 10, 59—63.
- [216] Patti, A.M., Santi, S.R., Gabrieli, R. et al. (1986): Hepatitis a virus and poliovirus 1 inactivation in estuarine water. Wat. Res., 20, 1335—1338.
- [217] 坂井 稔 (1969): 海洋細菌の特性. モダンメディア, 15, 102—128.
- [218] 小川博美, 得能弘志, 佐々木実己子 (1974): カキおよびその養殖環境の微生物叢に関する調査. 49年度広島県衛研年報, 119—127.
- [219] 橋本秀夫, 林 則博, 佐々木真哉ほか (1983): 太田川河口域における細菌相の動態. 広島大学水産学部紀要, 22, 217—227.
- [220] Vasconcelos, G.J. and Lee, J.S. (1972): Microbial flora of pacific oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. Appl. Microbiol., 23, 11—16.
- [221] Vanderzant, C.V., Thompson, C.A. and Ray, S.M. (1973): Microbial flora and level of *Vibrio parahaemolyticus* of oyster, water and sediment from Galveston bay. J. Milk Food Technol., 36, 447—452.
- [222] 榊原 徹, 松本昌門, 斉藤 真ほか (1990): 殻つきかきの細菌汚染について. 愛知衛研所報, 40, 1—6.
- [223] Pace, J., Wu, C.Y. and Chai, T. (1988): Bacterial flora in pasteurized oysters after refrigerated storage. J. Food Science, 53, 325—327.
- [224] Kueh, S.W. and Chan, K.Y. (1985): Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. J. Appl. Bacteriol., 59, 41—47.
- [225] Garland, C.D., Nash, G.V. and McMeekin, T.A. (1982): Absence of surface-associated microorganisms in adult oysters (*Crassostrea*

- gigas*). Appl. Environ. Microbiol., 44, 1205—1211.
- [226] Rowse, A.J. and Fleet, G.H. (1982): Viability and release of *Salmonella* Charity and *Escherichia coli* from oyster feces. Appl. Environ. Microbiol., 44, 544—548.
- [227] Hagler, A.H. and M-Hagler, L.C. (1981): Yeasts from marine and estuarine water with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Appl. Environ. Microbiol., 41, 173—178.
- [228] Austin, B. (1982): Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing unit. J. Appl. Bacteriol., 53, 253—268.
- [229] Hood, M.A. (1983): Effects of harvesting waters and strage conditions on yeast population in shellfish. J. Food Prot., 46, 105—108.
- [230] 小沼博隆, 鈴木 昭, 河西 勉ほか (1975): カキの微生物叢について. 食衛誌, 16, 422—423.
- [231] 鈴木 明 (1977): 生カキの微生物叢. モダンメディア, 23, 244—266.

当帰の品質評価に関する研究 (第1報)

—Ligustilide の精製法および安定性について—

金森久幸* 坂本征則*

Studies on the Evaluation of *Angelicae Radix* (Part 1)

—Purification Method and Stability of Ligustilide—

HISAYUKI KANAMORI* and IKUNORI SAKAMOTO*

(Received 30 March, 1992)

Summary

A Simple separation method of ligustilide from *Angelicae Radix* was developed. Ligustilide was purified from hexane extract by florisil column chromatography followed by preparative thin layer chromatography. In chloroform solution under shield from light, ligustilide was kept unchanged at least for one year.

keywords.....ligustilide, *Angelicae Radix*, *angelica acutiloba*, stability

緒 言

当帰はトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa またはその他近縁植物 (Umbelliferae) の根を、通例、湯通ししたもので、主として漢方処方薬であり、婦人薬、冷え性用薬、保健強壯薬、精神神経用薬、尿路疾患用薬などの処方に比較的高頻度に配合されている。成分としては、ligustilide, butyridenephtalide, butylphtalide, sedaonnic acid lactone のフタリド類 [1] のほか falcarinol などのポリアセチレン化合物, scopoletin などのクマリン類など [2] が知られている。品質評価の手法としては、抗アセチルコリン作用、抗喘息、鎮けい作用を有する ligustilide を指標物質とするガスクロマ

トグラフ法(GC)が報告されているが [3], ligustilide は非常に不安定であり、標準品も市販されていない。

そこで、われわれは当帰から ligustilide を比較的容易に単離する方法を開発し、その安定性について検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

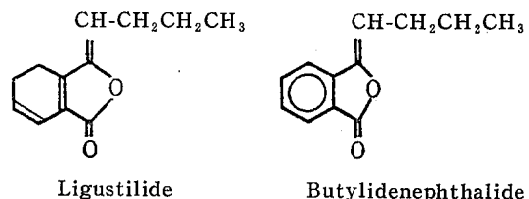


Chart 1

*広島県衛生研究所: Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

実験方法

1. 試料, 試薬

生薬は市販品(大深当帰;大同)を用いた。

カラムクロマトグラフィー担体はフロリジルPR(片山)を, 薄層クロマトグラフィー(TLC)担体は, silica gel 60 F₂₅₄, 分取用TLC担体は, preparative silica gel 60 F_{245S} 濃縮ゾーン付(Merck)を用いた。

安定剤として用いた butylated hydroxyanisole (BHA) および溶媒類は特級品を用いた。

2. ligustilide の分離精製

市販の当帰 500 g にヘキサン 2 l を加えて超音波抽出(30分)し, ろ過した。残留物にヘキサン 1 l を加えて同様に操作し, 抽出液を合わせ, ヘキサンを減圧留去した。

抽出物をヘキサン 20 ml に溶解し不溶物をろ過後, 冷蔵庫に放置し, 析出した結晶を冷時ろ取した。得られたろ液をフロリジル 100 g をヘキサンで湿式充填したカラムに負荷し, 10%酢酸エチル含有ヘキサンで 5 ml/min の速さで溶出した。カラムに時々 360 nm の紫外線を照射して, 蛍光を発する ligustilide の挙動をモニターしながら ligustilide 画分(溶出開始後 310~650 ml の画分)を得た。

ligustilide 画分を濃縮し, 30 mg/ml としたものを 2 ml を分取用 TLC に塗布し展開槽の上部にわずかに薄層板が出るように置き, 展開槽のふたをわずかに開けてクロロホルム:ヘキサン(1:1)を展開溶媒として, ligustilide が中央にくるまで展開した。この操作は, ドラフト中で遮光して行った。蛍光を発する部分をかきとり, ヘキサンで抽出したのち 0.45 μm のフィルターでろ過し, ヘキサンを減圧留去し ligustilide を得た。この方法により得られた ligustilide の収量は 120 mg (0.024%) であった。

3. ligustilide の安定性

ligustilide 20 mg をクロロホルム 10 ml に溶解し, この液 4.5 ml にクロロホルムまたは BHA のクロロホルム溶液(1 mg/ml) 4.5 ml を加えた試験溶液(A, B)を調製した。試験溶液 A および B 2.0 ml をそれぞれつぎの条件で保存し, GC 分析を行い, ligustilide の残存量を調べた。

- ① 透明サンプルびん, 密栓, 室温保存
- ② 褐色サンプルびん, 密栓, 室温保存
- ③ 褐色サンプルびん, 密栓, 冷蔵庫保存
- ④ 褐色サンプルびん, 溶媒留去後密栓, 室温保存

4. GC 分析

GC 分析は, 次の条件によった。装置:柳本製作所製 G-2800, カラム: 3 mm id×2 m (ガラス製), 充填剤: 2% SE-52 アナクローム Q90~100 メッシュ, カラム温度: 180°C, 注入口温度: 200°C, 検出器温度: 230°C, キャリヤーガス: N₂ 30 ml/分。

5. 直接導入質量分析(DI-MS)

装置: 日本電子製 JMS D-300, イオン化電流: 300 μA, 加速電圧: 3 kV, プローブ温度: 30~400°C。

結果および考察

1. ligustilide の分離精製法の検討

山岸らは, ligustilide を含有量の多い川芎から減圧蒸留法, シリカゲルカラムクロマト法などを用いて分離している[3]。この方法は共存するフタリド類を同時に分離できる利点はあるが, ligustilide を得るのにかなりの時間といろいろな装置が必要である。そこで含有量は川芎より少ないが, 共存するフタリド類の少ない当帰から ligustilide を簡便に分離する方法を検討した。

抽出溶媒は, 共存物質の抽出をできるだけ抑えるため, ヘキサンを用いた。当帰のヘキサン抽出物を少量のヘキサンに溶解した後, 不溶物をろ過した。ろ液を冷蔵庫に放置すると結晶が析出したのでこれを冷時ろ取した。この結晶は DI-MS から β-sitosterol と同定された。次に, フロリジルカラムクロマトによる分離を試みた。フロリジル PR は農薬の分析などでクリーンアップに用いられているが, 一度活性化したものを再度活性化し直して使用することはない。そこで廃物利用も兼ねてフロリジルの精油成分の分離への応用を試みている[4]。フロリジルは, 粒子が荒く速い流速が得られ, sep-pak フロリジルを用いれば, 溶出溶媒の検討も容易にできる利点がある。ligustilide の溶出溶媒をヘキサンをベースに検討したところ 10%酢酸エチル含有ヘキサンでの溶出が共存物質, 特に triglyceride との分離が良好であったので, 溶出溶媒は, 10%酢酸エチル含有ヘキサンとした。溶出中はガラスを通過する 360 nm の紫外線を時々照射して, 青色の蛍光を発する ligustilide の挙動をモニターし, 蛍光を発する画分を集め ligustilide 画分とした。この方法を用いるとフラクションコレクターの必要もなく, 3 時間程度で ligustilide 画分が得られる。この画分の TLC 分析の結果を Fig. 1 に示したが, ligustilide の上下にまだ共存物質が存在していた。この図において ligustilide の上の紫外線を吸収する物質は butylidenephthalide, 下の紫外線を吸収せず, 硫酸

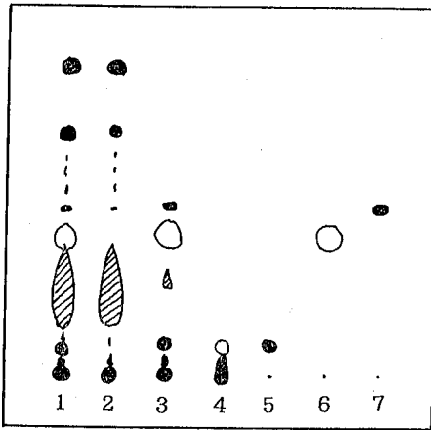


Fig. 1. Thin Layer Chromatograms of Several Fractions separated from Angelicae Radix.

TLC conditions: Plate: Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.25 mm.

Developing solvent: hexane: CHCl₃ (1: 1).

- : Spots which showed fluorescence under UV light.
 - : Spots which were detected under UV light.
 - : Spots which were colored by H₂SO₄.
- 1: Hexane extract, 2: Before ligustilide fraction, 3: Ligustilide fraction. 4: After ligustilide fraction. 5: β -sitosterol, 6: Purified ligustilide, 7: Purified butylidenephthalide.

で発色する物質は triglyceride であった。

次に分取用 TLC による精製法を検討した。分析用の TLC と同一の条件では ligustilide は Rf 値 0.2 程度

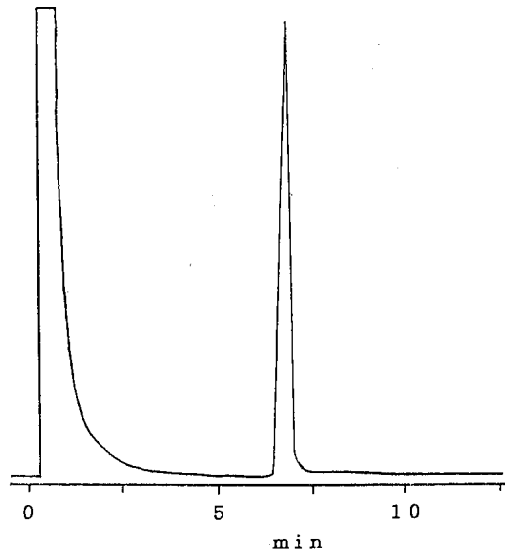


Fig. 2. Gas Chromatogram of Purified Ligustilide.

にしか移動しなかった。また展開溶媒の極性を上げて移動を大きくすると butylidenephthalide との分離が悪くなった。そこで、展開槽の底にガラス板を入れ展開槽の上部にわずかに薄層板の上端が出るようにし、ふたをわずかに開けて展開溶媒が薄層板の上端から徐々に気散するようにして、ligustilide が中央以上に移動するまで展開した。蛍光を発する部分をかきとり、ヘキサンで抽出して TLC, GC および DI-MS を行ったところ共存物質はほとんど認められなかった (Fig. 1, 2, 3)。また 1 枚のプレート当りの負荷量を検討し、ligustilide 画分を、30 mg/ml としたもの 2 ml まで負荷できるがと

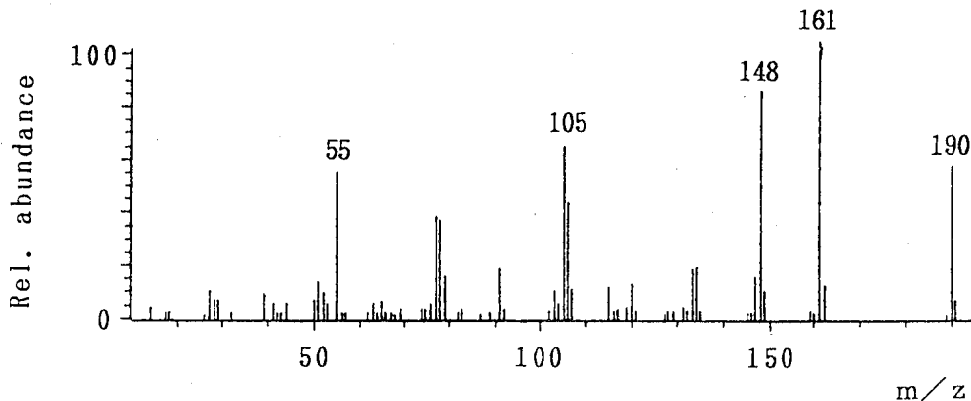


Fig. 3. Mass Spectrum of Purified Ligustilide.

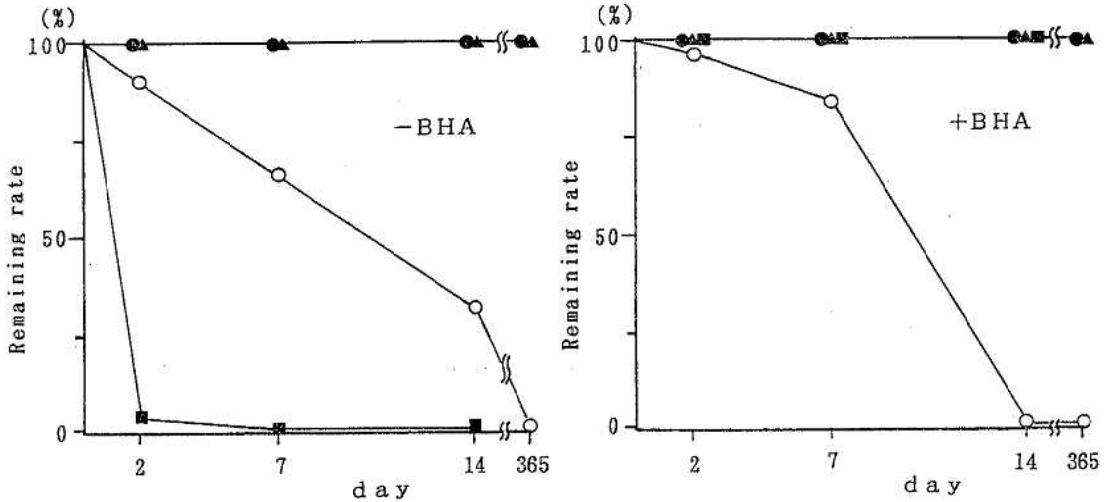


Fig. 4. Stability of Ligustilide without BHA or with BHA.

- : chloroform solution in clear bottle at room temperature.
- : chloroform solution in brown bottle at room temperature.
- ▲: chloroform solution in brown bottle at 5°C.
- : in brown bottle at room temperature.

がわかった。この TLC 法により得られた ligustilide は、プレート 1 枚当り 40 mg であった。また、少量ではあるが、butylidenephthalide も高純度で得ることができた。

3. ligustilide の安定性

ligustilide の安定性について調べた結果を Fig. 4 に示した。ligustilide は透明サンプルびんに入れ室温保存した場合には酸化防止剤 BHA の有無を問わず分解を起し、BHA を加えたものは、7 日目以降 BHA の分解と共に急速に分解した。褐色サンプルびんにクロロホルム溶液で保存したものは、室温で放置しておいても、ほとんど変化しなかった。また、溶媒を留去して保存したものは単独ではすべて分解してしまったが、BHA を共存させたものではほとんど分解しなかった。

これらのことから ligustilide は光と酸素のいずれにも不安定であるが、クロロホルム溶液とし、遮光して保存すれば、室温でも 1 年間は安定に存在することがわかった。また、山岸らの方法〔3〕に準じて当帰から抽出したエキス中の ligustilide も、同様の保存で 1 年間変化しなかった。

以上のように、当帰から ligustilide をフロリジルラムクロマト、分取用 TLC を用いて比較的容易に単離する方法を開発した。また、ligustilide をクロロホルム溶液とし、遮光して保存すれば、室温でも 1 年間は安定に存在することを見い出した。これらの結果を利用すれば、ligustilide を指標物質とする品質評価の手法がより一般的に用いられるようになるものと思われる。

文 献

- 〔1〕 高橋真太郎, ヒキノヒロン, 佐々木靖子: 薬学雑誌, 78, 1156—1161 (1958).
- 〔2〕 田中重雄, 星野千恵子, 池城安正, 田端 守, 木島正夫: 薬学雑誌, 97, 14—18 (1977).
- 〔3〕 山岸 喬, 金島弘恭, 木下良裕, 森三佐雄: 北海道立衛生研究所報, 24, 47—51 (1974).
- 〔4〕 金森久幸, 寺内正裕, 布施淳一, 坂本征則: 生薬学雑誌, 46, 384—388 (1992).

蒼朮の品質評価に関する研究

金 森 久 幸* 坂 本 征 則* 加 藤 睦 子**
土 井 司** 齋 池 昭 二 三**

Studies on the Evaluation of *Atractylodes* *Lancea* Rhizome

HISAYUKI KANAMORI*, IKUNORI SAKAMOTO*, MUTSUKO KATOH**,
TSUKASA DOI** and AKIFUMI MOCHIKE**

(Received 30 March, 1992)

Summary

A capillary gas chromatographic method was established for the simultaneous and quantitative analysis of hinesol (I), β -eudesmol (II) and atractylodin (III) in *Atractylodes Lancea* Rhizome. This method was also applied to determination of these compounds in underground parts of *Atractylodes lancea* De Candolle. Atractylon (IV), the component of *Atractylodes* Rhizome was detected in shoot by gas chromatography-mass spectrometric analysis.

key words hinesol, β -eudesmol, atractylodin, atractylon, *Atractylodes lancea*, capillary-GC, quantitative analysis

緒 言

蒼朮はホソバオケラ *Atractylodes lancea* De Candolle またはその変種 (Compositae) の根茎で、健胃整腸、止瀉、利尿、解熱鎮痛などの効果があるとされ、種々の漢方処方に配合されている。成分としては、hinesol (I) と β -eudesmol (II) の2種のセスキテルペンアルコールおよび atractylodin (III) などのポリアセチレ

ン化合物が知られている [1]。朮類には大きく分けて蒼朮と白朮 (オケラ *Atractylodes japonica* Koizumi ex Kitagawa またはオオバナオケラ *Atractylodes ovata* De Candolle の根茎) とがあるが、日本薬局方において、「ソウジュツ」は atractylon (IV) の呈色反応陰性のもの、「ビャクジュツ」はIVの呈色反応陽性でIIIの呈色反応陰性のものとしている [2]。しかし、白朮と蒼朮の交雑したI~IVのすべてを含む中間型の物もあり、

*広島県衛生研究所 : Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

**広島県福祉保健部薬務課 : Pharmaceutical Affairs Division, Welfare and Health Affairs Department, Hiroshima Prefectural Government.

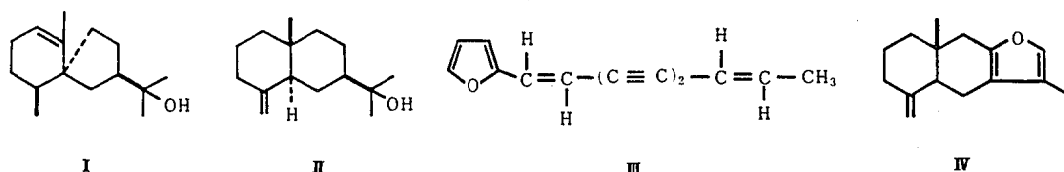


Chart 1

これら精油成分の定量は、蒼朮の品質評価および優良な系統の植物を栽培するうえで欠くことができない。その定量法としては、ガスクロマトグラフ法(GC)が用いられているが[1, 3], 成分の分離に難点がある。

そこで、われわれはキャピラリーGCを用いた定量法を検討し、広島県内の2ヶ所で栽培したホソバオケラから調製した蒼朮の品質評価に応用した。また、ホソバオケラの地下部について部位による含有量の相違およびガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)による成分検索を行い、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

種苗は、国立衛生試験所北海道薬用植物栽培試験場保存の武田系を用い、栽培は1種根あたり60gに分割して、広島県の沿岸部と内陸部の2ヶ所で1990年5月から1991年12月まで行った。

生薬は種苗(試料1)および栽培品(沿岸部(試料2), 内陸部(試料3))の、1年生(1990年12月採取), 2年生(1991年12月採取)の根茎を乾燥して調製した。ホソバオケラの地下部の部位別の成分含量の測定には試料2(2年生)を用い、根、芽、根皮および根茎の内部に分けた後、乾燥したものを試料とした。

標準品は、I(東レテクノ), II(栗田工業)は市販品を、IIIおよびIVは蒼朮および白朮より、吉岡ら[1]の方法で分離精製したものをを用いた。

2. GC分析

GC分析は、次の条件によった。装置: GLサイエンス社製G-380, カラム: DB-17 0.53 mm id×30 m 膜厚1 μm(ヒューズドシリカキャピラリー; J & W社製), カラム温度: 50°(1 min); 50~170°(20°/min); 170~190°(3°/min); 190~230°(8°/min); 230~250°(10°/min); 250°(2 min), 注入口温度: 200°, 検出器温度: 250°, キャリヤガス: He 15 ml/min, データ処理機: クロマトコーダー-12。

GC-MS分析は、次の条件によった。装置: Hewlett Packard社製 HP-5890A (GC) HP-5971A (MS) HP

3000 (CPU), カラム: DB-17 0.25 mm id×30 m 膜厚0.17 μm(ヒューズドシリカキャピラリー; J & W社製), キャリヤガス: He 10 psi, その他の条件はGCに準じた。

3. 検量線

I~IV 10.0 mgを精密に量り、ヘキサンに溶解して正確に25 mlとし、標準原液とした。標準原液に内標準溶液1.0 mlを加えたのちヘキサンで5.0 mlに希釈し、10~160 μg/mlの各種濃度溶液を調製した。それぞれの標準溶液2 μlを上記GC条件で測定し、検量線を作成した。

内標準溶液: フタル酸ジイソブチル50 mgをヘキサンに溶かして100 mlとする。

4. 試料溶液の調製

試料を60メッシュ以下の粉末とし、その50 mgを精密に量り、内標準溶液1.0 ml, ヘキサン4.0 mlを加えたのち、超音波で10分抽出後、遠心分離し、その2 μlをGC分析に供した。定量値は3回の平均値で表した。

結果および考察

1. 抽出条件の検討

姉帯ら[3]の方法を参考に、試料溶液調製時の抽出溶媒として各々5.0 mlのヘキサン、エーテル、酢酸エチル、アセトンおよびメタノールを用いて試料1(100 mg)について検討した結果、超音波抽出にいずれの溶媒を用いても定量値はほとんど変わらず、抽出率は10分以上続けても高くなることはなかった。これらの結果から、抽出溶媒は取り扱いが容易なヘキサンとし、室温で10分間超音波抽出を行うこととした。

2. GC分析条件の検討

キャピラリーカラムとして、無極性(DB-1, HP-1), 微極性(DB-5), 中極性(DB-17), 強極性(DB-WAX)のカラムについて温度条件等を検討した。その結果、DB-17のメガボアカラムを用いスプリットレス注入法により Fig. 1に示す温度条件で各成分が良好に分離された。また、内標準物質を検討し、フタル酸ジイソブチルを用いることとした。

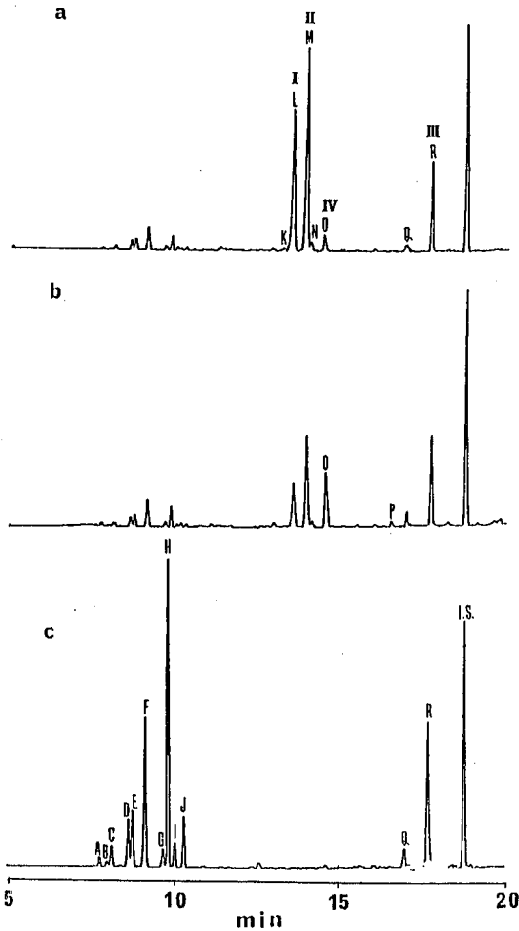


Fig. 1. Capillary Gas Chromatograms of the Hexane Extract of Rhizome (a), Shoot (b) and Root (c) of *Atractylodes lancea*.

I. hinesol; II. β -eudesmol; III. atractylodin; IV. atractylon. column: DB-17 (0.53mm id \times 30 m; 1 μ m), carrier gas: He (15 ml/min), column temperature: 50° (1min); 50~170° (20°/min); 170~190° (3°/min); 190~230° (8°/min); 230~250° (10°/min); 250° (2min), detector: FID.

3. 検量線の作成

検量線は I ~ IV とも内標準物質に対する面積比が 10 ~ 160 μ g/ml の範囲でいずれも原点を通る直線となった。

4. 栽培品の定量分析

種苗および栽培品の定量結果を Table I に示した。2年生の I および II の含有量は、種苗と同程度であ

Table I Contents (%) of Compounds in *Atractylodes Lancea* Rhizome

Sample	I	II	III	IV
1	0.63	1.16	0.05	0.02
2-1 a)	0.65	0.78	0.17	0.03
2-2 b)	0.80	0.92	0.31	0.04
3-1 c)	0.57	0.60	0.16	0.05
3-2 d)	0.92	1.07	0.32	0.09

a) cultivated for 1 year at the coastal area in Hiroshima prefecture

b) cultivated for 2 years at the coastal area in Hiroshimn prefecture

c) cultivated for 1 year at the inland area in Hiroshima prefecture

d) cultivated for 2 years at the inland area in Hiroshima prefecture

た。また、1年生は種苗よりも I と II の含有量が低く、1年の栽培で生薬を製するのは品質的に問題があると思われる。なお III の含有量が種苗で低いのは、III が酸化分解を受け易く、乾燥するのに細かく砕いたためと考えられる。IV は、いずれのものにも少量含有されていたが、日本薬局方の純度試験〔2〕では呈色しなかった。2つの栽培品間の差はわずかに認められるが、栽培地の土壌、気候による成分の大きな変化は認められなかった。これらのことから、広島県でも品質的には満足できるホソバオケラの栽培が可能と思われる。

5. 部位別の成分含量の相違

ホソバオケラの地下部を根、芽、根皮および根茎の内部に分け成分含量を調べた。結果を Table II に示した

Table II Contents (%) of Compounds in Underground Part of *Atractilodes lancea*

Part	I	II	III	IV
Root	<0.01	<0.01	0.48	<0.01
Inside of rhizome	0.85	0.98	0.30	0.03
Bark of rhizome	0.55	0.65	0.29	0.12
Shoot	0.30	0.49	0.31	0.26

が、根には I, II, IV はなく III が 0.48% と根茎の 1.5 倍も含まれていた。また、根皮および芽には IV が 0.12, 0.26% とかなりの量が含まれていた。日本薬局方において「ソウジュツ」は IV の呈色反応陰性のものとされているが、IV が「ビャクジュツ」に特異的な成分ではなく、

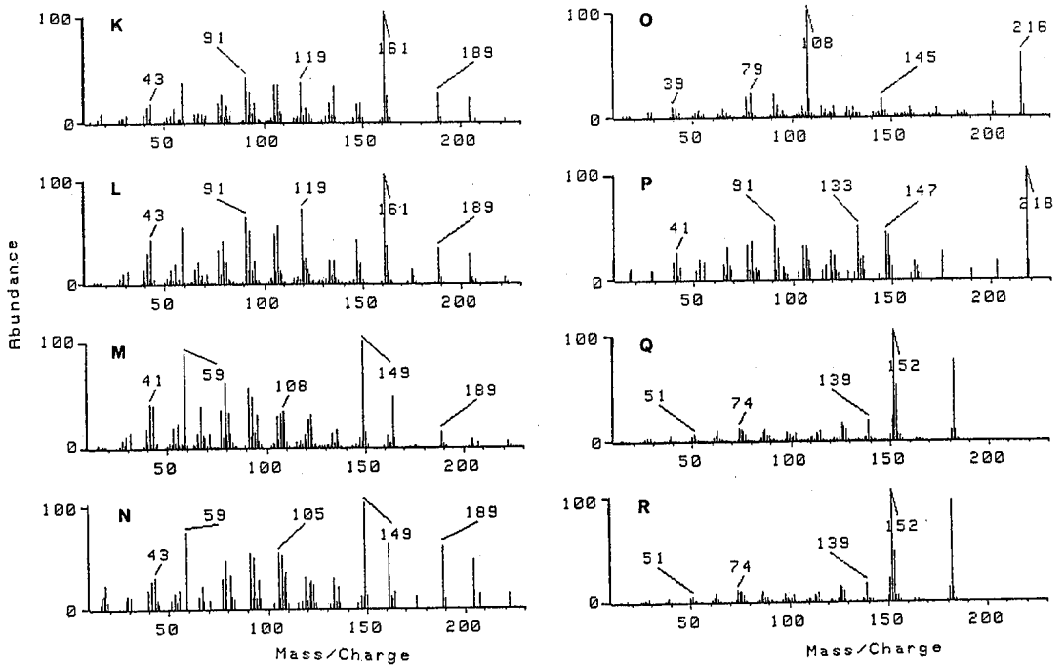


Fig. 2. Mass Spectra of Components of *Atrectyodes lancea*.

交雑していないホソバオケラにおいても部位によってはかなりの量が含まれていることがわかったことから、生薬の調製にあたっては収穫の時期、芽の部分の除去を考慮する必要があると思われる。

6. GC-MSによる成分検索

ホソバオケラの地下部の各部分別にGC-MSを行った。根茎のGC (Fig. 1a)におけるピークLはI, MはII, OはIV, RはIIIであり他の物質の重なりはなかった。また、K, N, QはそれぞれI, II, IIIと類似したマススペクトルを与えることからそれぞれの異性体と推察された (Fig. 2)。芽のGC (Fig. 1b)におけるピークOもIVであり他の物質の重なりはなかった。また、Pは西川らにより韓国白朮より分離された5 α H, 10 β -selina-4(14), 7(11)-dien-8-one[4]と推定され、芽に白朮の成分とされている物質が認められるのは興味深いことである。根のGC (Fig. 1c)における7~11分の10本のピーク(A~J)は、Iが分子量202, 他はすべて分子量204のセスキテルペンであった。このうちGは β -selinene[1], Hは β -bergamonteneと推定され、これらはIIの前駆物質と考えられる。また、DとEはIの前駆物質(脱水体)と予想された。これらのセスキテルペンが、根茎にはほとんど認められないことから、根

で合成された後、根茎で水の付加等の修飾を受けて蓄えられるものと考えられる。

広島県では平成2年度より、薬用植物需給体制整備事業と題された事業を行っている。これは毎年2ヶ所で、県内で育成可能な2種類の薬用植物を実験的に栽培し、その品質評価をし有望植物の栽培指針を作成するものであるが、本研究はこの事業の一つとして行ったものである。

また、本事業を行うにあたり、薬用植物の種苗を提供していただいた国立衛生試験所北海道薬用植物栽培試験場島山好雄場長また、実験栽培に協力いただいた湧永製薬株式会社及び常石造船株式会社に深謝いたします。

文 献

- [1] 吉岡一郎, 西野隆雄, 谿 忠人, 北川 勲: 薬学雑誌, 96, 1229-1235 (1976).
- [2] 第十二改正日本薬局方: 厚生省, p. 968, 1031.
- [3] 姉帯正樹, 山岸 喬: 北海道立衛生研究所報, 34, 19-23 (1984).
- [4] 西川洋一, 瀬戸隆子, 渡辺四男也, 安田一郎: 薬学雑誌, 97, 515-518 (1977).

輸入食品中の残留農薬分析

仲本典正* 坂本征則*

Determination of Pesticides Residues in Imported Foods

NORIMASA NAKAMOTO* and IKUNORI SAKAMOTO*

(Received 30 March, 1992)

はじめに

我が国に輸入される食品の種類と量は近年ますます増加しているが、これら輸入食品には我が国で認可されていない農薬が用いられる場合や収穫後の農産物に農薬を散布する(ポストハーベスト使用)といった、我が国とは異なる使用がなされる場合もあり、その残留が問題となっている〔1〕。我々はこれまでに輸入農産物について、有機塩素系農薬の残留実態調査を行ってきた〔2〕が、今回は輸入穀類製品を対象として、ポストハーベスト農薬としても使用される有機リン系農薬の残留実態調査を行った。また、検出された農薬の加熱調理時の残留量の変化についても併せて検討した。

方法

1. 試料

市販の輸入穀類製品；スパゲッティ（イタリア，カナダ），マカロニ（カナダ），タコスの皮（オーストラリア，アメリカ），パンのプレミックス（アメリカ，イギリス），ビスケット（イギリス）計20検体

2. 試薬

有機溶媒はすべて市販の残留農薬分析用を用いた。

3. 装置及び分析条件

FPD-GC；HP-5890（HEWLETT PACKARD 社製），(1)カラム：DB-17，15 m×0.53 mm i.d.，膜厚

1.0 μm（J&W SCIENTIFIC 社製），カラム温度：45 °C（1.5分），45 °C→160 °C（20 °C/分），160 °C（0.5分），160 °C→250 °C（5 °C/分），250 °C（2分），(2)カラム：DB-1，15 m×0.53 mm i.d.，膜厚1.5 μm（J&W SCIENTIFIC 社製），カラム温度：45 °C（1.5分），45 °C→140 °C（20 °C/分），140 °C（0.5分），140 °C→250 °C（5 °C/分），250 °C（2分），注入口温度：200 °C，検出器温度：250 °C，キャリアーガス：He 15 ml/分，メークアップガス：He 20 ml/分，フレイムガス：H₂ 100 ml/分，Air 90 ml/分

GC-MS；GC HP-5890，MS HP-5971A（HEWLETT PACKARD 社製），カラム：DB-17，30 m×0.25 mm i.d.，膜厚0.25 μm（J&W SCIENTIFIC 社製），カラム温度：45 °C（1.5分），45 °C→180 °C（20 °C/分），180 °C（0.5分），180 °C→250 °C（3 °C/分），250 °C（3分），注入口温度：200 °C，イオン源温度：170 °C，イオン化電圧：70 eV，イオン化法：EI

4. 調査対象有機リン系農薬

ジクロルボス（DDVP），ジメトエート，ダイアジノン，クロルピリホスメチル，フェニトロチオン（MEP），ピリミホスメチル，マラチオン，フェンチオン（MPP），パラチオン，クロルピリホス，α-クロルフェンビンホス（α-CVP），β-クロルフェンビンホス（β-CVP），フェントエート（PAP），EPN，ホサロン 計15種

5. 分析方法

試料に水を添加し放置して膨潤させた後、高速攪拌により抽出を行った以外は、昭和49年厚生省告示第273号の米の有機リン剤試験法（食品衛生法に基づく方法）に準じた。

結 果

1. 抽出法についての検討

食品衛生法に基づく方法では、試料に水を添加することなく有機溶媒で抽出を行うのに対し、農薬取締法に基づいて設定されたピリミホスメチルやマラチオンの米、麦等の穀類に対する残留分析法〔3〕では、試料に水を添加して膨潤させた後に有機溶媒で抽出を行っている。

そこで、ピリミホスメチルが検出されたスパゲッティについて、試料の2倍量の水を添加し、2時間放置して膨潤させた後に高速攪拌抽出を行ったところ、水を添加しないで振盪抽出する食品衛生法に基づく方法と比較してその分析値が約3倍になり（図1）、抽出効率が良くなることがわかった。そのため、抽出は水を添加して膨潤させた後に行った。

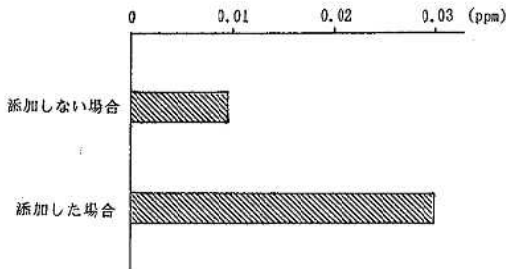


図1 ピリミホスメチルの分析値に対する水添加の影響

2. GC条件の検討

有機リン系農薬はECD-GCによっても測定可能であるが、リン化合物を特異的に検出でき、妨害ピークの出現も少ないFPD-GCを用いることとした。

また、カラムは取扱いが比較的容易で、かつバックドカラムに比べ分離能が非常に良いため、近年汎用されるようになってきたメガボアキャピラリーカラムを用いることとした。

メガボアキャピラリーカラムDB-17(OV-17相当)を用いると、図2〔A〕に示すようにフェニトロチオンとパラチオンのピークは重なるが他の13種の農薬は分離できた。そこで、フェニトロチオンまたはパラチオンと同一保持時間を示すピークが現れた場合には、DB-1

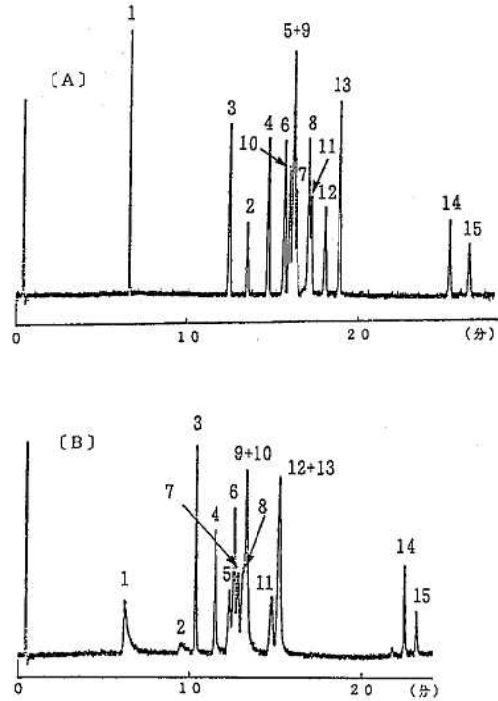


図2 有機リン系農薬のFPD-GCクロマトグラム

〔A〕カラム：DB-17, 15 m×0.53 mm i.d., 膜厚1.0 μm (J&W SCIENTIFIC 社製)
カラム温度：45°C (1.5分), 45°C→160°C (20°C/分), 160°C (0.5分), 160°C→250°C (5°C/分), 250°C (2分)

〔B〕カラム：DB-1, 15 m×0.53 mm i.d., 膜厚1.5 μm (J&W SCIENTIFIC 社製)
カラム温度：45°C (1.5分), 45°C→140°C (20°C/分), 140°C (0.5分), 140°C→250°C (5°C/分), 250°C (2分)

注入口温度：200°C, 検出器温度：250°C, キャリアーガス：He 15 ml/分, メーカーアップガス：He 20 ml/分, フレームガス：He : H₂ 100 ml/分, Air 90 ml/分
1ジクロルボス 2ジメトエート 3ダイアジノン 4クロルピリホスメチル 5フェニトロチオン 6ピリミホスメチル 7マラチオン 8フェンチオン 9パラチオン 10クロルピリホス 11α-クロルフェンビンホス 12β-クロルフェンビンホス 13フェントエート 14EPN 15ホサロン (各0.1 ng)

カラム(OV-1相当)を用いてそのいずれかであることを確認した(図2〔B〕)。

3. FPD-GCによる定量

定量は絶対検量線法により行った。その結果、イタリア産スパゲッティ4検体中3検体からピリミホスメチル

表1 穀類製品中の残留農薬

品目名	原産国	主原料	検体数	検出検体数	農薬名	残留量(ppm)*
スパゲッティ	イタリア	小麦	4	3	ピリミホスメチル	0.030, 0.022, 0.008
	カナダ	小麦	4	0		
マカロニ	カナダ	小麦	4	0		
タコスの皮	オーストラリア	とうもろこし	1	1	フェニトロチオン	0.25
	アメリカ	とうもろこし	2	2	ピリミホスメチル	0.016
パンのプレミックス	アメリカ	とうもろこし	1	0	マラチオン	0.096, 0.037
	アメリカ	小麦	1	0		
	イギリス	小麦	1	0		
ビスケット	イギリス	小麦	1	1	ピリミホスメチル	0.029
オートミール	アメリカ	カラス麦	1	0		

*: 検出限界 0.005 ppm

がそれぞれ0.030 ppm, 0.022 ppm, 0.008 ppm 検出された。また、オーストラリア産タコスの皮からフェニトロチオン 0.25 ppm, ピリミホスメチル 0.016 ppm, アメリカ産タコスの皮 2 検体からマラチオンがそれぞれ 0.096 ppm, 0.037 ppm 検出され、イギリス産ビスケットからピリミホスメチルが 0.029 ppm 検出された(表 1)。

4. 検出された農薬の確認

3. で検出された農薬の確認は Selected Ion Moni-

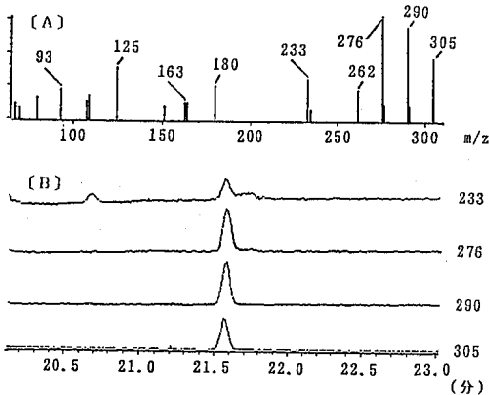


図3 ピリミホスメチル(標準品)のマススペクトル[A]及びスパゲッティ抽出物のSIMクロマトグラム[B]

カラム: DB-17, 30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm (J&W SCIENTIFIC 社製)

カラム温度: 45°C (1.5分), 45°C → 180°C (20°C/分), 180°C (0.5分), 180°C → 250°C (3°C/分), 250°C (3分)

注入口温度: 200°C, イオン源温度: 170°C, イオン化電圧: 70eV, イオン化法: EI

toring (SIM法) によって行った。まずスパゲッティから検出されたピリミホスメチルについては、ピリミホスメチルの標準品の GC-EIMS スペクトルが図3[A]に示すように得られたので、分子イオンの m/z 305 並びにフラグメントイオンの m/z 290, 276 及び 233 による SIM法を行ったところ図3[B]に示すようにそれぞれのピークは同一保持時間を示し、また相対強度も標準品とほぼ一致したことでピリミホスメチルであることを確認した。タコスの皮及びビスケットから検出されたピリミホスメチルについても同様に確認した。

また、タコスの皮から検出されたフェニトロチオンについても標準品のマススペクトル(図4[A])により分子イオン m/z 277 並びにフラグメントイオン m/z 260,

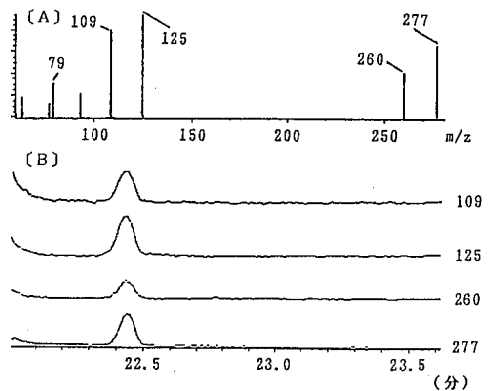


図4 フェニトロチオン(標準品)のマススペクトル[A]及びタコスの皮抽出物のSIMクロマトグラム[B]

※GC-EIMSの条件は図3と同一

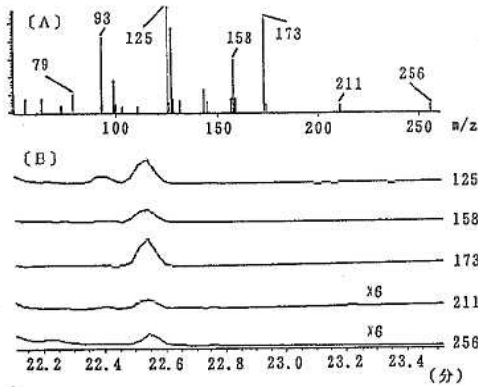


図5 マラチオン(標準品)のマススペクトル〔A〕及びタコスの皮抽出物のSIMクロマトグラム〔B〕
※GC-MSの条件は図3と同一

125及び109によるSIM法を用い、図4〔B〕に示す結果が得られたことからフェニトロチオンであることを確認した。

さらに、タコスの皮から検出されたマラチオンについても同様に分子イオンのm/z 256並びにフラグメントイオンのm/z 211, 173, 158及び125によるSIM法を行いマラチオンであることを確認した。

5. 加熱調理時の農薬残留量の変化

ピリミホスメチルが検出された3検体のスパゲッティを加熱調理した時のピリミホスメチル残留量の変化を調べた。麺の約10倍量の0.1%食塩水をゆで汁として、パッケージの表示どおりのゆで時間でゆでた。その結果、表2のとおり、ゆで汁への移行はごくわずかであった。

表2 スパゲッティ中のピリミホスメチルのゆで汁への移行

ピリミホスメチルの残留量 (ppm)	麺の直径 (mm)	ゆで時間 (分)	ゆで汁への移行率 (%)	
A	0.030	1.7	9	1.2
B	0.022	1.3	6	2.2
C	0.008	1.6	9	2.5

また、ゆでた後の麺に残存するピリミホスメチルの量は3検体ともゆでる前とほとんど同じ値を示し、ゆでることによる消失はほとんど見られなかった。

さらに、タコスの皮を加熱調理した時のマラチオンの残留量の変化についても調べた。パッケージに表示して

あるとおりに180°Cのオープンで6分間加熱した。その結果、加熱前のマラチオン残留量を100%とすると加熱後は84%に減少した。

考 察

我が国で市販されている麺類やビスケットからマラチオンが検出されたとの報告〔4〕やイギリスで購入したパンからフェニトロチオン及びクロルピリホスメチルが検出されたとの報告がある〔5〕が、今回の調査により、スパゲッティ等の輸入穀類製品の中にピリミホスメチル、フェニトロチオン及びマラチオンが残留しているものがあることが判明した。

我が国では、農薬は収穫前に使用されるのが一般的であるが、貯蔵あるいは輸送中に発生する害虫の駆除やカビ防止の目的でポストハーベスト農薬の使用を認めている国は数多くあり〔6〕、また、オーストラリアのように小麦の栽培過程では農薬を使用せず、貯蔵時のみに農薬を使用している国もある〔7〕。このようにして収穫後に使用された農薬は栽培中に使用されたものに比べ、農薬散布から消費者に渡るまでの期間が短く、また使用場所が倉庫等であるため、日光、雨水等による分解や流失が少なく、一般に残留レベルが高くなるものと思われる〔8〕。今回検出された3種類の農薬は、いずれもそれぞれの穀類製品の原産国でポストハーベスト農薬としての使用が認められており〔6〕、穀類が収穫された後に使用された農薬が加工後も製品に残留していた可能性がある。

しかしながら、この残留値をFAO/WHOで設定された1日許容摂取量ADI (ピリミホスメチル; 0.01 mg/kg 体重/日, フェニトロチオン; 0.005 mg/kg 体重/日, マラチオン; 0.02 mg/kg 体重/日)〔9〕と比較してみると、喫食上特に問題ないと考えられる。

マラチオンを含有する団子をゆでた時にゆで汁中にマラチオンが約20%見いだされたとの報告がある〔4〕が、ピリミホスメチルを含有するスパゲッティの場合はゆで汁へは約2%程度しか移行しなかった。この差が生じた要因としては団子とスパゲッティに対するゆで汁の浸透性の違い、さらに、マラチオンとピリミホスメチルの水への溶解度の差(水1リットルに対する溶解度; マラチオン145 mg, ピリミホスメチル8.6 mg)〔10〕といったことが考えられる。

文 献

〔1〕 日本子孫基金: 収穫後に使用される農薬, ポスト

広島県衛生研究所研究報告 No.39 (1992)

- ハーベストに関する研究, 全国農業協同組合中央会, 東京, 1988.
- 〔2〕 中富美津江: 広島県衛生研究所研究報告, 34, 41 (1987).
- 〔3〕 農業環境保全対策研究会: 農薬登録保留基準ハンドブック, 作物残留の分析法, 化学工業日報社, 東京, 1990.
- 〔4〕 河村葉子, 武田明治, 内山 充, 堺 敬一, 石川英樹: 食品衛生学雑誌, 21, 70 (1980).
- 〔5〕 日本子孫基金: 日本子孫基金通信, 30, 9 (1991).
- 〔6〕 東京都生活文化局消費者部: 収穫後使用の農薬に関する調査, 東京, 1990.
- 〔7〕 山田博史: 月刊フードケミカル, 2, 1990. 7.
- 〔8〕 山本順二: 月刊フードケミカル, 65, 1989. 6.
- 〔9〕 関沢 純: 農薬の安全性評価データ集, エル・アイ・シー, 東京, 1991.
- 〔10〕 C.R. Worthing, R.J. Hance: The Pesticide Manual 9th Edition, British Crop Protection Council, Farnham (England), 1991.

広島県におけるエコーウイルス30型による 無菌性髄膜炎の流行 (1989—1991)

高尾 信一* 妹尾 正登* 徳本 静代*

A study of Aseptic Meningitis due to Echovirus type 30 Prevailed in Hiroshima Prefecture (1989—1991)

SHINICHI TAKAO*, MASATO SENO* and SHIZUYO TOKUMOTO*

(Received June 30, 1992)

はじめに

我々は広島県感染症サーベイランス事業 (サーベイランス事業) に基づいて各種検査対象疾病からの病原体検索を実施している。無菌性髄膜炎についても対象疾病の一つとして、患者発生状況の把握とともに定点病院を通じて患者からのウイルス分離を行っている。無菌性髄膜炎患者からの過去のウイルス分離成績をみると、エンテロウイルスが多く分離されており、また年ごとに分離されるエンテロウイルスの型も異なるのが例年の傾向であった。ところが本県において、1989年から流行し始めたエコーウイルス30型 (ECHO-30) を原因とする無菌性髄膜炎では、1991年までの3年間連続して大きな流行が認められる点で、これまでにはない流行パターンを示した。さらに各年に分離された ECHO-30 分離株についてウイルス学的検討を行ったところ、1991年に流行した ECHO-30 は、それ以前に流行した ECHO-30 と比べて、若干の抗原変異のあった可能性を示唆する所見が得られたので、それらの成績も併わせて本県において1989年から1991年までの3年間に流行した、ECHO-30 による無菌性髄膜炎の流行について報告する。

材料と方法

1. 無菌性髄膜炎患者発生状況

無菌性髄膜炎患者の発生状況については広島県感染症サーベイランス事業報告書〔1, 2〕および広島県感染症情報〔3〕を基に集計した。

2. 無菌性髄膜炎患者からのウイルス分離・同定

(1) 検査材料

1989年1月から1991年12月までの間に、県内のサーベイランス定点病院およびその他の病院において、無菌性髄膜炎と診断された患者からの検体を対象とした。その内訳は、1989年は患者61名から採取された髄液68件、咽頭ぬぐい液41件、便16件、尿11件、合計136検体、1990年は患者91名から採取された髄液86件、咽頭ぬぐい液39件、便20件、尿13件、合計158検体、1991年は患者149名から採取された髄液155件、咽頭ぬぐい液67件、便46件、尿18件、合計286検体であった。なおMMRワクチン接種後に発症した無菌性髄膜炎患者からの検体は対象から除外した。

(2) ウイルス分離

分離のための培養細胞は BGM, HEp2, RD-18S, LLC-MK₂, Vero, HeLa の6種類を用いた。各細胞を

*広島県衛生研究所: Hiroshima Prefectural Institute of Public Health

24穴プレートに単層培養し、1検体あたり2～4穴を用いて処理検体を0.2 ml/穴ずつ接種した。34°CのCO₂ふ卵器中で静置培養し、細胞変性効果(CPE)を指標として5～6日間観察し、3代の盲継代後においてもCPEが現れなかったものについては分離陰性と判定した。

(3)分離ウイルス同定

分離されたウイルスのうちエンテロウイルスについては、エンテロウイルス用プール免疫血清および単味免疫血清(共にデンカ生研製)あるいは自家製免疫ウサギ血清を用いたマイクロ法による中和試験〔3〕で同定した。なおECHO-30の同定には国立予防衛生研究所(予研)から分与頂いた抗ECHO-30免疫サル血清も併用した。

3. ECHO-30 分離株に対する抗ECHO-30 免疫血清の中和抗体価測定

ホモのウイルスに対する中和抗体価が100単位になるようにあらかじめ希釈した。デンカ生研製抗ECHO-30(Bastianni株)免疫ウサギ血清(エコーウイルスNT試薬「生研」30型; Lot No. 07108)および予研分与の抗ECHO-30(Bastianni株)免疫サル血清(Lot. No. 5354)を2倍階段希釈したものに、1989年から1991年にかけて分離されたECHO-30分離株あるいはECHO-30の標準株(Bastianni株)100 TCID₅₀/0.025 mlに希釈したウイルス液を等量加え、37°C 60分間中和した後に、

96穴マイクロプレートに培養したHEp2細胞に0.05 mlずつ接種した。その後34°CのCO₂ふ卵器中で培養を続け、5日目に50% CPE抑制を示した免疫血清の最高希釈倍数の逆数を各ECHO-30株に対する中和抗体価とした。

4. ECHO-30 分離株に対する患者血清の中和抗体価測定

1989年から1991年までの間にECHO-30が分離された患者からの回復期血清(発症から7～15日目に採取)10検体について、抗ECHO-30免疫血清中和抗体価の測定法と同様の方法で中和抗体価を測定した。

結 果

1. 広島県における無菌性髄膜炎患者の発生状況およびウイルス分離成績

1989年から1991年までの本県における月別の無菌性髄膜炎患者の報告数、および当所においてウイルス分離を実施した無菌性髄膜炎患者からの分離ウイルスの成績について図1に示した。

月別の無菌性髄膜炎患者の報告数は、1989年6月から急激に増加し、7月には100名を越える報告が認められた。1990年には6～7月に、また1991年にも8～10月に、いずれも報告数が50名を越える月が認められ、3年間続けて無菌性髄膜炎の大きな流行があった。

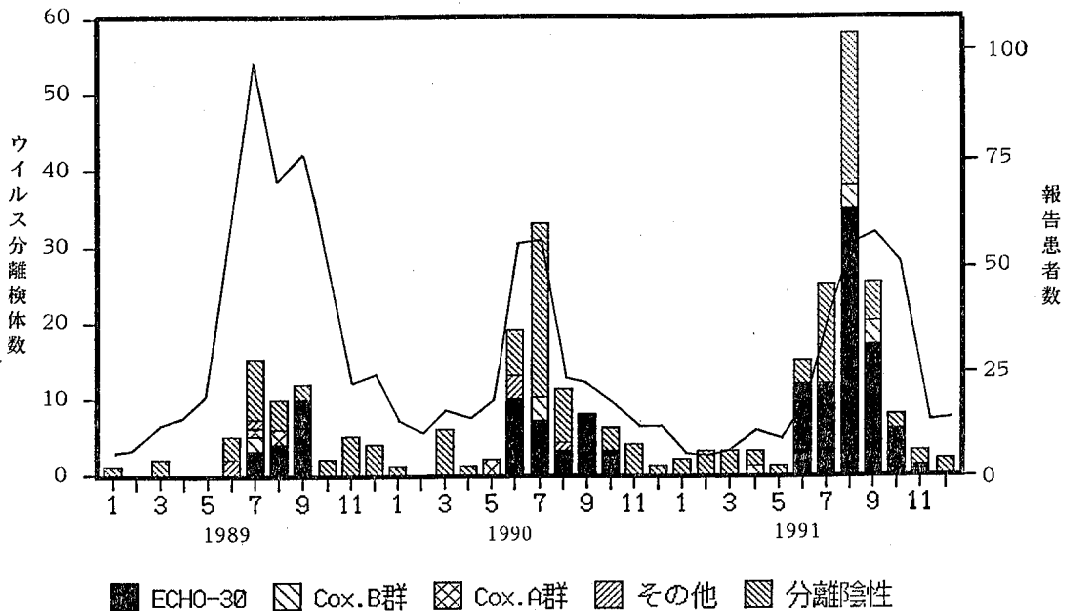


図1 無菌性髄膜炎患者発生状況およびウイルス分離成績

患者からのウイルス分離状況をみると、1989年から1991年の3年間には、エクサッキー A (Cox. A) 群、コクサッキー B (Cox. B) 群およびその他のウイルス (アデノウイルス) が少数例分離されているものの、分離ウイルスの大半が ECHO-30 であり、また分離時期も患者の発生時期とほぼ一致していた。

2. ECHO-30 の分離および同定

今回の1989年から1991年までの間に分離された ECHO-30 については、分離された時期によって、分離に使用した培養細胞に対する感受性および同定に使用した免疫血清に対する中和能について違いが認められた。

ウイルス分離に際して用いた6種類の培養細胞による ECHO-30 の分離状況を表1に示した。それをみると、1989年および1991年には HEp2 および RD-18 S 細胞で高率に分離されており、HeLa 細胞でも分離されていたが LLC-MK₂ 細胞では全く分離されなかった。ところが1991年には HEp2 および RD-18 S 細胞で高率に分離されたのは同じであったが、HeLa 細胞では分離されなくなり、代わって LLC-MK₂ 細胞で分離されるようになり、1991年の分離株と、それ以前の2年間の分離株とでは、培養細胞に対する感受性に違いが認められた。

分離ウイルスの同定に際しては、1989年の分離株は、すべて市販の抗 ECHO-30 免疫ウサギ血清 (デンカ生研; Lot は不明) の100単位で中和され、容易に ECHO-30 と同定が可能であった。1990年7月までに分離された株は、前記の免疫血清で中和されたが、8月以降に分離された株の中には、この免疫血清では全く中和されない株が出現し、予研から分与された抗 ECHO-30 免疫サル血清を用いて初めて ECHO-30 と同定が可能であった。1991年の分離株は、一部の株について市販の抗 ECHO-30 免疫ウサギ血清でも同定を試みたが全く中和されず、全て抗 ECHO-30 免疫サル血清を用いて同定が可能であった。

3. ECHO-30 分離株に対する抗 ECHO-30 免疫血清の中和抗体価

1989年から1991年までの ECHO-30 分離株は、1990年流行の途中から市販の免疫血清に対して全く中和されない株が出現しており、それ以前に流行していた株と比べて抗原的に変異している可能性が考えられた。そこでこの点を確かめるために、同定に用いた2種類の免疫血清での、各時期の分離株に対する中和抗体価を比較し、その成績を表2に示した。

1989年の分離株 (ON89-32001) と1990年7月の分離

表1 ECHO-30 の培養細胞別分離成績

分離年	分離株数	培養細胞別分離株数 (%)					
		HEp2	RD-18 S	HeLa	LLC-MK ₂	Vero	BGM
1989	42	38(91)	32(76)	20(48)	0(0)	0(0)	0(0)
1990	53	49(93)	46(87)	19(34)	0(0)	0(0)	0(0)
1991	137	137(100)	135(99)	3(2)	65(47)	0(0)	0(0)

表2 ECHO-30 分離株に対する抗 ECHO-30 免疫血清の中和抗体価

ウイルス株	分離年月	中和抗体価	
		抗 ECHO-30 ウサギ血清*	抗 ECHO-30 サル血清**
Bastianni***		64	64
ON 89-32001	1989.8	16	64
SE 90-10069	1990.7	16	64
T 90-11066	1990.9	< 4	16
Ku 91-51003	1991.8	< 4	8

*: デンカ生研製抗 ECHO-30 (Bastianni 株) 免疫ウサギ血清

** : 予研分与の抗 ECHO-30 (Bastianni 株) 免疫サル血清

*** : ECHO-30 標準株

表3 患者血清の ECHO-30 分離株に対する中和抗体価

血清番号	採血年月	ECHO-30 ウィルス 抗原				
		Bastianni	ON89-32001	SE90-10069	T90-11066	Ku91-51003
1	1989.7	128	512	64	64	32
2	1989.7	32	128	128	64	32
3	1989.7	256	512	512	512	128
4	1989.7	32	128	128	128	64
5	1989.8	64	256	128	64	32
6	1990.9	64	512	512	256	128
7	1991.7	64	256	256	256	256
8	1991.7	8	8	64	64	128
9	1991.8	32	128	64	256	256
10	1991.9	32	32	64	128	256

株 (SE90-10069) に対しては、両免疫血清の中和抗体価には差が認められなかった。ところが1990年9月の分離株 (T90-11066) と1991年の分離株 (Ku91-51003) に対しては、抗 ECHO-30 ウサギ血清は全く中和せず、また抗 ECHO-30 サル血清も中和しにくかった。

4. ECHO-30 分離株に対する患者血清中和抗体価

2種類の免疫血清を用いた中和試験の結果から1990年の流行の後半に分離された株については、それ以前に流行していた株とは抗原的に違いがあるものと考えられた。そこでこの点をさらに確かめるために、流行の各時期に採取された、ECHO-30 が分離された患者の回復期の血清について、それぞれの分離株に対する中和抗体価を表3に示した。

患者血清はいずれも標準株に対するよりも、同じ時期(年)に分離された分離株に対して最も高い中和抗体価を示した。また血清が採取された時期ごとに、それぞれのウィルス株に対する中和抗体価をみみると、1989年の患者血清(血清番号1~5)は、1989年から1990年までの分離株(ON89-32001, SE90-10069, T90-11066)を比較的によく中和しているものの、1991年の分離株(Ku91-51003)に対しては、いずれも明らかに中和能が弱かった。一方、1990年~1991年の患者血清(血清番号6~10)については、いずれの分離株に対してもよく中和するもの(血清番号6, 7, 9)と、1989年および1990年の分離株には中和能が弱いもの(血清番号8, 10)とが認められた。

考 察

我が国における主な無菌性髄膜炎起因ウィルスとして

は、1981年から開始された全国サーベイランス事業によると、エンテロウィルスが90.0%、アデノウィルスが3.7%、ムンプスウィルスが2.9%であると報告されており[5]、エンテロウィルスによるものが圧倒的に多い。しかしながら流行の主流となるエンテロウィルスの型は年ごとに入れ替わり、同じ型のウィルスが数年続けて流行することは稀れである[5, 6]。これは、ある型のウィルスが流行すると、症状の出現した患者のみならず、その周囲に多くの不顕性感染者が生じて、その型のウィルスに対して多くの者が免疫を保有するようになることでその型のウィルスの流行は消失し、代わって別の型のウィルスが流行するようになるためと考えられる[5]。ところが本県において1989年から流行し始めた ECHO-30 による無菌性髄膜炎は、1991年まで3年間連続して大きな流行が認められた点で、我々がこれまでに経験したことのない流行パターンを示した。

ECHO-30 は、1958年に Plager らが米国の無菌性髄膜炎患者から分離したのが最初で Bastianni 株と名付けられた[7]。その後カナダ[8]やイギリス[9]等でも分離の報告がある。我が国では1978年の愛知県での小児散発例[10]が最初で、1983年には秋田[11]、神奈川[12]等で集団発生がみられ、全国的な流行となり[13]、本県においても、多くの ECHO-30 が無菌性髄膜炎患者から分離された[14]。その後は全国的にもほとんどウィルスは分離されておらず、本県においては1株も分離されることなく今回の流行を迎えた。

今回の3年間にわたる ECHO-30 の流行の間に、我々は二つの興味ある現象を経験した。まず第一は同じウィルスの連続する流行期間中に、分離される培養細胞の種

類に違いが生じたことである。すなわち1991年に分離された ECHO-30は、それ以前の株が HEp2, RD-18S, HeLa 細胞で分離されたのに比べて、HeLa 細胞では分離されなくなり、代わって LLC-MK₂ 細胞で分離されるようになった(表1)。この点については、培養細胞側の感受性が変化した可能性も否定できないが、次に述べる免疫血清に対する中和能を調べた結果を考え合わせると、むしろウイルス側の変異を原因とするものではないかと考えられる。

第二は流行の途中で同じ ECHO-30 でありながら、突如それまでに使用していた免疫血清では全く中和されない株が出現したことである。この点についてウイルス学的に検討してみると、これらの株では、それ以前の株に比べて明らかに標準株である Bastianni 株免疫血清に対して中和されにくくなっていた(表2)。エンテロウイルスについては、分離株が高単位の標準株免疫血清で中和されにくいのにに対して、分離株免疫血清は、その分離株のみならず標準株をもよく中和するようなプライム株の存在が数多くの型で知られている[15]。今回の変異株がプライム株に相当するか否かは、分離株に対する免疫血清を作成して比較しないと結論は得られないが、1991年に採取した患者血清の Bastianni 株に対する中和抗体価をみると、各分離株に対するよりもむしろ低い価を示している(表3)ので、プライム株には相当しないのかもしれない。変異株がプライム株に相当するか否かは別として、流行の途中でウイルスが変異したことが、今回の ECHO-30 の流行が長期化した一因ではないかと考えられる。すなわち患者血清の各分離株に対する中和抗体価をみると(表3)、1989年の患者血清では、1991年の分離株の中和能が明らかに低くなっている。このことは保有している免疫の強さが関係していることは言うまでもないが、1989年の ECHO-30 の流行によって獲得した免疫では、1991年に流行した ECHO-30 に対して必ずしも有効に感染を防御することができない可能性を示している。

今回の変異株の出現に際しては、当初なかなか同定することができず、予研から免疫血清を分与していただいて始めて ECHO-30 と同定できたのが実情である。先にも述べたが、エンテロウイルスについてはプライム株のような変異ウイルスが出現することが数多くの型で知られており、我々もコクサッキーウイルス A16 型の変異ウイルスの出現を過去に経験している[16]。今後は、こうした変異株の出現の可能性も念頭に入れ、予研および各地方衛生研究所と密接に情報を交換し合うことで、より

早いサーベイランス情報の還元が図られるものと思われる。

ま と め

広島県において1989年から流行し始めた ECHO-30 を原因とする無菌性髄膜炎は、1991年までの3年間連続して大きな流行が認められ、これまでにはない流行パターンを示した。さらに各年に分離された ECHO-30 分離株についてウイルス学的検討を行ったところ、1991年に流行した ECHO-30 は、それ以前に流行した株とは抗原的に変異しており、このことが ECHO-30 の流行を長期化させた一因と考えられた。

文 献

- [1] 広島県環境保健部(1990): 広島県感染症サーベイランス事業報告書, 第7報. p. 99—101.
- [2] 広島県環境保健部(1991): 広島県感染症サーベイランス事業報告書, 第8報. p. 99—101.
- [3] 広島県環境保健部(1991): 広島県感染症情報 月報, 12月分.
- [4] 多ヶ谷 勇, 原 稔(1982): ウイルス学実験各論. p. 127—155, 国立予防衛生研究所学友会編, 東京, 丸善.
- [5] 原 稔, 山下和子(1987): 無菌性髄膜炎から検出されるウイルス. 医学のあゆみ, 142, 553—556.
- [6] 宮村紀久子(1987): 1986年夏のエコー7型による無菌性髄膜炎の流行. 医学のあゆみ, 140, 662—666, 1987.
- [7] Plager, H. and Decher, W. (1963): A Newly-recognized enterovirus isolated from cases of aseptic meningitis. Amer. J. Hyg., 77, 26—28.
- [8] Kelen, A.E., Lesiak, J.M. and Labzoffsky, N.A. (1963): Aseptic meningitis due to Frater type virus in Ontario. Canad. Med. Assoc. J., 89, 29—33.
- [9] Irving, D.H., Irvine, A.B.H. and Gardner, P.S. (1967): Outbreak of E.C.H.O. virus type 30 in a general practice. Brit. Med. J., 4, 774—776.
- [10] 西地 豊, 太田 勉, 山本崇晴, 石川道子, 細江昭比古, 大木美秀, 斎藤 修, 中山義雄, 平谷良樹, 久野有文(1981): Echo 30 ウイルス感染症一本邦初の22例の散発例一. 小児科臨床, 34, 1718—1724.
- [11] 原田誠三郎, 佐藤宏康, 阿部真理子, 後藤良一,

広島県衛生研究所研究報告 No.39 (1992)

- 森田盛大, 長沼雄峰(1984): エコーウイルス30型による無菌性髄膜炎の流行について. 秋田県衛生研究所報, 28, 83—88.
- [12] 山田和美, 鈴木利尋, 斎藤隆行, 斎藤直喜, 小田和正, 高宮 篤 (1984): 1983年神奈川県において流行した無菌性髄膜炎. 神奈川県衛生研究所報, 14, 15—19.
- [13] 国立予防衛生研究所・厚生省保健医療局疾病対策課(1991): <特集>エコーウイルス30型による無菌性髄膜炎の流行1989~1991. 病原微生物検出情報月報, 138, 1—22.
- [14] 広島県衛生研究所(1984): 広島県衛生研究所業務年報, 18, 12—15.
- [15] 植竹久雄編(1987): ウイルス学 第3版. p. 409—429, 東京, 理工学社.
- [16] 高尾信一, 妹尾正登, 武井直巳(1988): 1987年広島県内で流行した手足口病について. 広島県衛生研究所研究報告, 35, 13—17.

他誌掲載論文抄録 (1991年11月～1992年7月)

金本康生, 坂野 堯*1: 急性気管支炎患者からの *Chlamydia pneumoniae* の分離と血清抗体価. 感染症誌, 66: 637-642, 1992.

急性気管支炎の患者 (15歳男子) の咽頭スワブから HeLa 細胞と HL 細胞を用い, *Chlamydia pneumoniae* が分離された. この患者の急性期血清中には, microimmunofluorescence (MIF) によって *C. pneumoniae* に対する抗体価160倍の IgM 抗体が検出された. また, 急性期, 回復期両血清にはそれぞれ抗体価40倍, 160倍の IgG 抗体が検出され, 4倍の上昇が認められた. これらの結果は, 本症例が *C. pneumoniae* の感染による急性気管支炎であった可能性を強く示唆しているものと思われる.

*1 県立広島病院小児科

沢田 淳, 関 英一, 新川隆康, 穴沢 昭, 保尊昌之, 花井潤師, 水田満里, 児玉京子, 木下洋子, 田崎隆二, 沼田公介, 山本圭子, 永原耀, 川勝秀一: 神経芽細胞腫の6カ月乳児を対象としたマスキリーニングの問題点. 小児科診療, 54, 2609-2616, 1991.

1988年から HPLC による VMA, HVA の定量的なマスキリーニングが推奨され精度が高まったが, 1988, 1989年の2回の研修会で技術的な問題として, HPLC の使用法, 採尿法, カットオフ値, 精度管理などの問題点や臨床的な問題点などが議論されたので, それらの結果をまとめた.

小川博美, 福田伸治, 佐々木実己子, 門田達尚: 腸炎ビブリオ食中毒における原因食品からの神奈川現象陽性株回収法の検討. 広島県獣医学会雑誌, 6: 33-39, 1991.

腸炎ビブリオ食中毒においては, 神奈川現象陽性 (KP+) 株が真の原因菌であるが, KP+ 株は患者材料から比較的容易に分離されるものの, 原因と推定される食品等から分離されることはほとんどない. この点が本菌食中毒における原因食品の推定に際し, 疫学上の支障になっており, 食品等から本菌 KP+ 株を効率的に分離することが重要な課題になっている. そこで我々は推定原因食品からの腸ビブリオ KP+ 株の効率的な分離方法に

ついて検討した.

1989年県内で発生した本菌による集団食中毒3事例から採取された食品10品目について, その3-5倍乳剤 (原材料で10g相当) に2倍濃度のポリミキシンブイオンを等量加え35°C, 24時間増菌培養後, 3枚の TCBS 寒天平板に分離培養し, 発育した集落について材料当たり100個を我妻変法培地に釣菌した.

その結果, 供試した10品目すべてから KP+ 株が分離され, その分離率は6.16% (66/1,070) であった. 材料別の分離率には幅があり, 最も高いもので18.1% (12/105), 最も低いものでは1.33% (2/150) であった.

実験的に調整した KP- 株と KP+ 株混合菌液からの KP+ 株の分離 (Y) と KP- : KP+ 株混在比率 (X) との関係を求めると, $Y = 14.393 X^{-1.536}$, $r = -0.903$ が得られ, 両者間に有意 ($p < 0.01$) な相関が認められた. またこの式から推定原因食品には KP- : KP+ 株が 1 : 1/54 の比率で存在していたことが推計された.

以上の成績から本分離法は, 推定原因食品からの KP+ 株分離に有効と考えられた.

小川博美, 福田伸治, 佐々木実己子, 門田達尚: 腸炎ビブリオ食中毒における原因食品からの神奈川現象陽性株回収法の検討 (10-3-100法). 食品と微生物, 8(4): 189-195, 1992.

腸炎ビブリオ食中毒において, 原因食品から原因菌の主体をしめている神奈川現象陽性 (KP+) 株を効率的に分離することが疫学的に重要な課題となっている. そこでこの点を解明するため, 1989年から1990年に広島県内で発生した本菌による集団食中毒5事例から採取された食品12品目を対象に検討した. 試料の3-5倍乳剤 (原材料で10g相当) に2倍濃度のポリミキシンブイオンを等量加え増菌培養後, 3枚の TCBS 寒天平板で分離培養し, 発育した集落を原因食品当たり約100個を我妻変法平板培地に釣菌した.

供試した12品目すべてから KP+ 株が分離され, その分離率は最高18.1% (19/105), 最低1.33% (2/150) で全平均5.95% (75/1,261) であった.

本法を用いて実験的に KP- 株と KP+ 株の混合菌液を調整し, KP+ 株の分離率 (Y) と KP- : KP+ 株混在比の対数値 (X) との関係を求めると, $Y = 14.393 X^{-1.536}$,

$r = -0.903$, $n = 24$, $t = 9.86$ ($p < 0.01$) が得られ、両者間に有意な相関が認められた。また、この式から原因食品中には $K P^- : K P^+$ 株が $1 : 1/60$ の比率で混在していたことが推測された。

以上の成績から本分離法は推定原因食品からの $K P^+$ 株分離に有効と考えられた。

斉藤香彦*¹, 新垣正夫*¹, 高橋正樹*¹, 工藤泰雄*¹, 伊藤 武*¹, 大橋 誠*¹, 森田盛大*², 斉藤志保子*², 船橋 満*³, 石原政光*³, 小林一寛*⁴, 田口真澄*⁴, 佐々木実己子, 片山 淳*⁵, 松崎静枝*⁵, 原田誠也*⁶: *Campylobacter jejuni/coli* の血清型別に関する研究: Lior の血清型別システムの導入。感染症学雑誌, 6: 340—348, 1992.

国際カンピロバクター血清型別委員会が統一法の基礎とすると決めた Lior の型別法の標準菌株26種を選び、これらに Lior の型別法には含まれない4種の TCK システムの標準株を加え30種の型の型別用因子血清とスクリーニング用プール血清を作成した。そしてそれらを用い下痢症由来分離株の型別を行った。

C. jejuni による集団下痢症23事例由来の654株については、603株 (92.2%) が型別され、51株 (7.8%) が型別不能であった。型別された603菌株の内570菌株は単一の因子血清と反応したが、2事例から検出された27菌株は2種の因子血清と、1事例由来株の6菌株は3種の因子血清と反応した。

散発下痢患者から検出された1,198菌株を対象に型別を行ったところ、883菌株 (73.7%) が型別され、298菌株 (24.9%) が型別不能、17菌株がR型でスライド凝集反応に供試できなかった。型別された菌株の内113菌株は2種以上の因子血清と反応した。高頻度にみられる血清型は LIO 4, TCK 1, LIO 2, LIO 11, TCK 12, LIO 1 などであった。

今回作成した30種の抗血清は充分実用価値があると考えられた。

*¹東京都立衛生研究所

*²秋田県衛生科学研究所

*³愛知県衛生研究所

*⁴大阪府立公衆衛生研究所

*⁵山口県衛生公害研究センター

*⁶熊本県衛生公害研究所

福田伸治: 食中毒の発生予防に関する研究—高層気象データを用いた細菌性食中毒の発生予測—。広島大学医学雑誌, 39: 617—636, 1991.

地形及び時刻などによる影響の少ない500 mb 等圧面の高層気象データを用い、全国の6地域の8月における細菌性食中毒の発生予測モデルの構築と発生要因について検討した。食中毒発生の危険度に応じた発生予測モデルは、ポアソン回帰モデルを用いて検討した。

細菌性食中毒は層厚(海拔高度)が高いほど、すなわち地表面の気温が高いほど発生の危険度が高くなることが認められた。これに加え、地域によりモデルに含まれる高層気象要素に差異はあるが、低気圧・前線の通過、上昇気流の発生など、天候が不安定になると発生の危険度が高くなることが認められた。また、曜日による発生の危険度の差異など、気象要素以外の要因の関与が大きい地域も認められた。

この発生予測モデルは高層気象データを用いて、細菌性食中毒の発生予測法を確立した最初の研究であり、現在実施されている食中毒発生予報の補完及び改善或は新設に有用な知見であると考えられる。

福田伸治, 小川博美, 佐々木実己子, 門田達尚: 広島県の食中毒発生に関するカレンダー効果—多重ロジスティック回帰分析を用いて—。広島県獣医学会雑誌, 6: 40—45, 1991.

広島県における食中毒発生に対する旬及び曜日の効果(カレンダー効果)を、多重ロジスティック回帰分析を用いて定量的に解析した。対象期間は、1965年から1986年の7—9月の間の2,300日であり、その期間の毎日の食中毒発生の有無を解析対象とした。

旬についてみると、細菌性食中毒では、7月下旬、8月上旬、8月下旬及び9月中旬の発生割合は7月上旬に比し、有意に高いことが認められた。旅館・飲食店・仕出し屋を原因施設とする食中毒では、7月下旬、8月上旬、8月下旬、9月上旬及び9月中旬の発生割合は7月上旬に比し、有意に高いことが認められた。

曜日についてみると、細菌性食中毒では、日曜日及び月曜日の発生割合が火曜日に比し、有意に高いことが認められた。旅館・飲食店・仕出し屋を原因施設とする食中毒では、日曜日、月曜日、金曜日及び土曜日の発生割合が火曜日に比し、有意に高いことが認められた。

これらの結果は、食中毒発生がカレンダーの影響を受けて、大きく変動することを示唆している。

編 集 委 員 会

徳 本 静 代 (委員 長)
森 野 賢 治 (総 務 部)
妹 尾 正 登 (生物学部)
水 田 満 里 (病理学部)
仲 本 典 正 (理化学部)
佐々木 実己子 (食品衛生部)

広島県衛生研究所研究報告

第 39 号

1992年7月発行

発行所 広島県衛生研究所
広島市南区字品神田1丁目5-70
〒734・電話(082)251-4371

印刷所 (株)柳盛社印刷所
広島市中区東白島町8-23
〒730・電話(082)221-2148