

広島県衛生研究所研究報告

第 33 号

1986 年 12 月

目 次

総 説	
配糖体の分析	
坂本 征則	1
原 著	
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	
小川 博美, 岸本 敬之, 得能 弘志, 佐々木実己子	17
<i>Stevia rebaudiana</i> 葉中の非甘味性配糖体について	
松尾 健, 金森 久幸, 坂本 征則	25
資 料	
1980年—1985年広島県において分離されたB型インフルエンザ ウイルスの抗原分析	
妹尾 正登, 高尾 信一, 瀬川 和幸, 武井 直己	31
冷却塔水からの <i>Legionella pneumophila</i> 分離状況	
神 美代子	37
広島県における神経芽細胞腫のマス・スクリーニングについて (第1報) — 尿中及び尿中のVMA, HVA測定値とその判定について —	
水田 満里, 海佐 裕幸	41
他誌掲載論文要約 (1985年11月~1986年10月)	45

広島県衛生研究所

〔〒734〕 広島市南区字品神田1丁目5-70

配糖体の分析

坂本 征 則*

Analysis of Glycosides

IKUNORI SAKAMOTO

(Received Oct. 31, 1986)

和漢生薬にはその有効成分、特異成分としてサポニンをはじめとする配糖体を含むものが多く、次々とその化学構造が明らかにされつつある。しかしながら品質評価の基礎となる定量分析については、最近でこそ装置の普及、検出器の改良、充填剤の開発等によって高速液体クロマトグラフィーによる方法が数多く報告されているが、特異のUV吸収あるいは呈色反応のあるアルカロイドやフェノール系成分に比し、水溶性、難揮発性等の問題をはじめ種々の困難な問題があるためかなりの立遅れがあったと思われる。

本稿では、著者がこれまでに行ってきたテルペノイド配糖体、セコイリド配糖体の分析法の開発研究を中心に記述させていただく。

本研究を始めた当時、当研究所には未だ高速液体クロマトグラフは導入されてなく、高分離能を有するものと言えばガスクロマトグラフのみであり、まずこれを駆使しての分析法研究に着手した。

ニンジンのダマラン系サポニンの分析 [1]

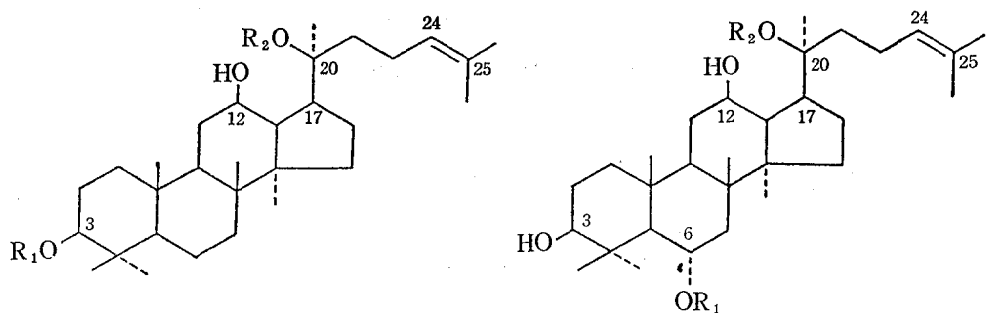
ニンジン (*Panax ginseng* C. A. Meyer) の生理活性ダマラン系サポニンは 20(S)-protopanaxadiol (I) [2] を真性ゲニンとする ginsenoside-Ra₁, Ra₂ [2], Ra₃ [4], -Rb₁, -Rb₂ [5], -Rb₃ [6], Rc, -Rd [5], -Rg₁ [7], malonyl-ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc, Rd [8] quinquenoside-R₁ [7] (PD-saponin) と 20(S)-protopanaxatriol (II) [9] を真性ゲニンとする ginsenoside-Re, Rf [6], -Rg₁ [9], -Rg₂ [6], -Rh₁ [10], 20-gluco-ginsenoside-Rf [6], notoginsenoside-R1 [6] (PT-saponin) に大別され、それぞれの構造が明らかにされ

ている。なお、この他 oleanolic acid をゲニンとするサポニン少量が含まれていることが報告されている[5]。

著者はニンジンに特異なこれらダマラン系サポニンを、その酸加水分解生成体のガスクロマトグラフィー (GC) で分離定量する方法を開発し、それを各種ニンジンおよびニンジン製品等の品質分析へ応用した。

Chart 1 に示すように I を真性ゲニンとする PD-saponin の希硫酸加水分解では、生成した I は、まず、C-20の-OHの反転平衡反応をおこし I およびそのエピマーである 20(R)-protopanaxadiol (III) の混合物を生成し、ついでそれぞれが側鎖の閉環反応をおこして、III より panaxadiol (IV) [11] を、I よりは 20(S)-panaxadiol (V) を与える[2, 12]。I と III の平衡が III に偏っていること、IV が難溶性であることなどの理由から、加水分解物を再結晶することにより IV が得られるが、V の単離は未だなされていなかった。定量分析の際の IV と V のガスクロマトグラム上の挙動を比較するため、シラカバ葉から得られる I の 3-エピマーである betulafolienetriol (VI) から V を誘導した。VI を P-トルエンスルホン酸で処理すると、I と同様の C-20の OH の反転平衡と側鎖の平環を行って VII および VIII を生成する。この両者は薄層クロマトグラフィー (TLC) およびカラムクラフトグラフィーで容易に分離することがすでに報告されており [11]、20(S)-体であることが証明されている VII の C-3 α OH を 3-モノケトン体 (IX) を経由して反転し、V を無色結晶として得た。IV と V とは TLC で明瞭に分離することは困難で、またそのもの自体あるいは trimethylsilyl (TMS) 化体共に GC においても分離は困難であった。したがって、ニンジンサポ

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



I :		R ₁	H	R ₂	H	II :		R ₁	H	R ₂	H
ginsenoside-Ra ₁ :	-glc(2-1)glc	-glc(6-1)arap(4-1)xyl		ginsenoside-Re :	-glc(2-1)rha	-glc					
ginsenoside-Ra ₂ :	-glc(2-1)glc	-glc(6-1)araf(2-1)xyl		ginsenoside-Rf :	-glc(2-1)glc	-H					
ginsenoside-Ra ₃ :	-glc(2-1)glc	-glc(6-1)glc(3-1)xyl		ginsenoside-Rg ₁ :	-glc	-glc					
ginsenoside-Rb ₁ :	-glc(2-1)glc	-glc(6-1)glc		ginsenoside-Rg ₂ :	-glc(2-1)rha	-H					
ginsenoside-Rb ₂ :	-glc(2-1)glc	-glc(6-1)arap		ginsenoside-Rh ₁ :	-glc	-H					
ginsenoside-Rb ₃ :	-glc(2-1)glc	-glc(6-1)xyl		20-gluco-ginsenoside-Rf :	-glc(2-1)glc	-glc					
ginsenoside-Rc :	-glc(2-1)glc	-glc(6-1)araf		notoginsenoside-R1 :	-glc(2-1)xyl	-glc					
ginsenoside-Rd :	-glc(2-1)glc	-glc		glc :	β-D-glucopyranosyl						
quinquenoside-R ₁ :	-glc(2-1)glc(6)Ac	-glc(6-1)glc		xyl :	β-D-xylopyranosyl						
malonyl-ginsenoside-Rb ₁ :	-glc(2-1)glc(6)Ma	-glc(6-1)glc		arap :	α-L-arabinopyranosyl						
malonyl-ginsenoside-Rb ₂ :	-glc(2-1)glc(6)Ma	-glc(6-1)arap		Ma :	malonyl						
malonyl-ginsenoside-Rc :	-glc(2-1)glc(6)Ma	-glc(6-1)araf		araf :	α-L-arabinofuranosyl						
malonyl-ginsenoside-Rd :	-glc(2-1)glc(6)Ma	-glc		rha :	α-L-rhamnopyranosyl						
notoginsenoside-R4 :	-glc(2-1)glc	-glc(6-1)glc(6-1)xyl		Ac :	acetyl						

Fig. 1. Ginsenosides and Sapogenins

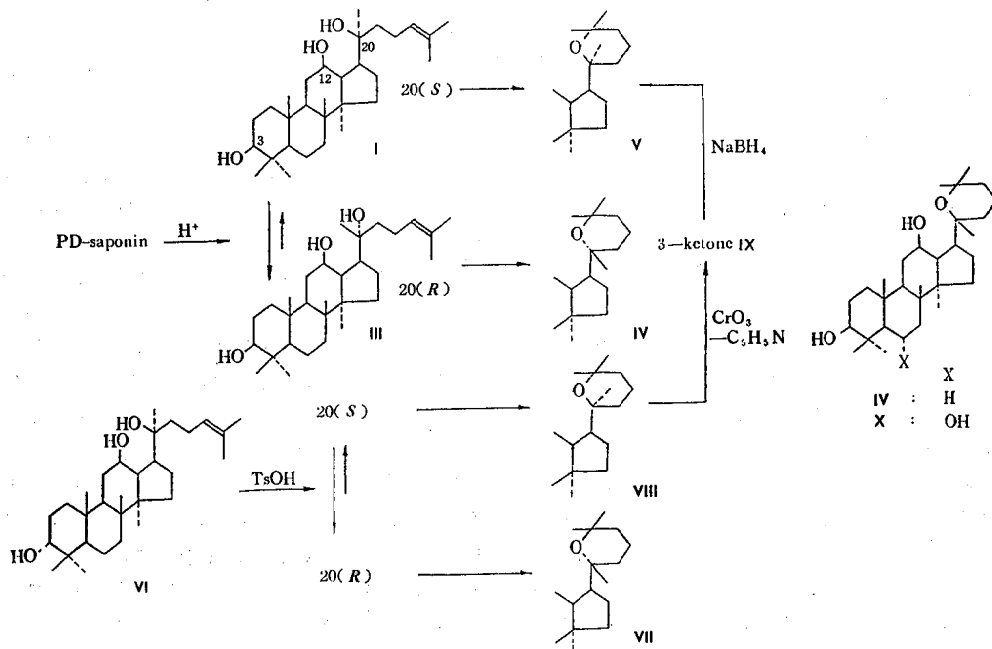


Chart 1

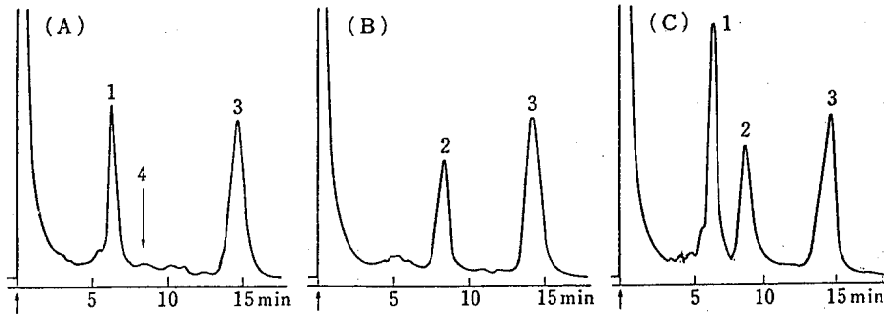


Fig. 2. Gas Chromatograms of Trimethylsilylated Crude Hydrolysates of Rbc (A), Rg^{a)} (B) and Ginseng (White Ginseng) MeOH Extract (C)
 1: TMS-panaxadiol
 2: TMS-panaxatriol
 3: diacetylhederagenin methyl ester (HE, internal standard)
 4: TMS-oleanolic acid
 a) Ginsenoside-Rg₁

ニンの酸加水分解物のGCを行う場合、IVのピークは実際にはVのピークをも含むものである。PT-saponinを加水分解して panaxatriol (X) とする場合についても精査はしていないが同様のことが言えるものと考えられる。

ニンジンサポニンを酸加水分解し生成するIVおよびXをGCで定量する場合の諸条件について、次のような検討を行った。まず加水分解に用いる酸については、塩酸では目的とするIV、Xの収量の悪いことがすでに知られており、*p*-トルエンスルホン酸では糖の加水分解が遅く不適当であったが、硫酸については満足する結果が得られた。溶媒についての検討の結果は水-エタノールの系がよく、その至適混合比は3:1であった。硫酸濃度、反応液量、反応時間については5%、2ml以上、5時間以上が加水分解条件を満足することがわかった。

以上設定した条件で加水分解したニンジンのメタノールエキスのエーテル抽出液のガスクロマトグラムにおいては、少量生成する oleanolic acid のピークは現われず、各ピークの分離も良好であるがXのピークがややテリングすることからTMS化しての定量を検討した。

TMS化は、TMS化剤(N-trimethylsilylimidazole)の添加量による反応への影響も、反応温度による反応時間への影響も少ないので N-trimethylsilylimidazole 150 μ l 添加、室温1時間放置とした。

このようにして得られる各TMS化体のガスクロマトグラムは Fig. 2. のようになるが、この場合 oleanolic acid が存在すると、そのTMS化体のピークが4の位置に現われ、XのTMS化体のピーク2に重なるので予

めこれを希アルカリで除く必要がある。以上の結果定量法を Chart 2 のように定めた。

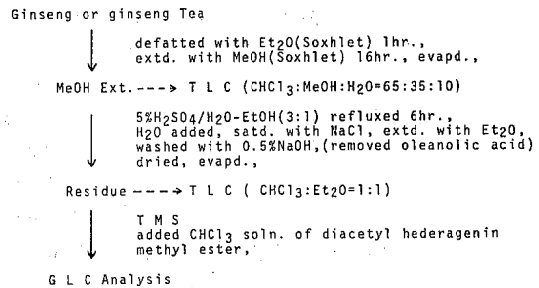


Chart 2

標準のサポニンについても加水分解以後同様に処理し、検量線を作成してその検量線よりサポニン含量を求めた。なおこの場合 PD-saponin の標準品として ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rb₃, -Rc 混合物 (Rbc) を PT-saponin の標準品としては ginsenoside-Rg₁ (Rg) を使用したので PD-saponin, PT-saponin 量はそれぞれ Rbc および Rg 換算量として与えられることになる。検量線は Fig. 3. に示すように PD-saponin 1 μ g, PT-saponin 2 μ g の限界で定量が可能であった。

上記定量法による各種ニンジンの分析結果を Table I に示す。Rbc と Rg の比は白参の2:1に対し白毛、間引人参では3:1で差が見られ、すでに指摘されているように白毛がサポニン含量および Rbc の相対比の高いことが認められた。

Table II は市販ニンジン茶とニンジンエキスの分析結

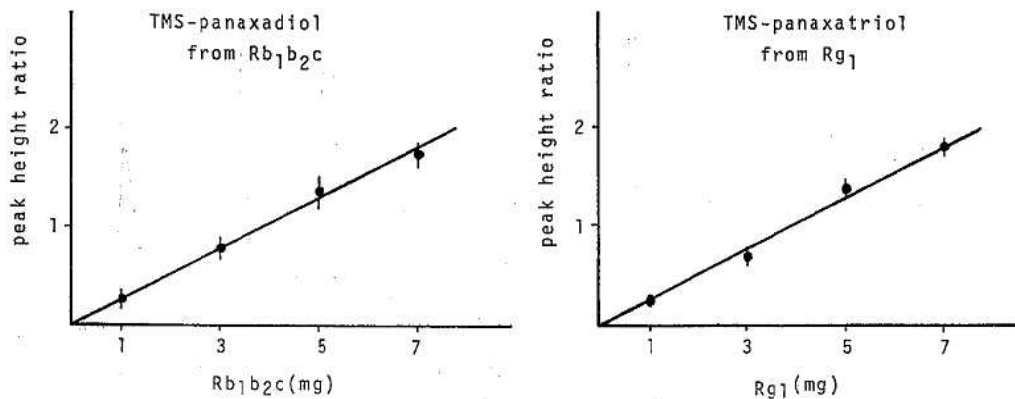


Fig. 3. Calibration Curves

GLC: FID

column: 1.5% SE-30 on Chromosorb W 1 m × 4 mm (glass)

temp.: inj. 300°C, column 260°C

N₂: 45 ml/min. I.S: diacetyl hederagenin methyl ester

TABLE I. Analytical Results of Crude Drugs of Ginseng.

Ginseng	産地	Rb ₁ b ₂ c (換算)(%)	Rg ₁ (換算)(%)	Total (%)
白参 (white ginseng)	Korea	1.3	0.5	1.8
	Korea	1.8	0.9	2.7
	Fukushima	1.0	0.5	1.5
	Nagano	1.0	0.5	1.5
白毛 (root hair)	Korea	11.0	4.0	15.0
	Fukushima	7.0	2.0	9.0
	Nagano	7.0	2.4	9.4
間引人参 (1 year old-ginseng root)	Korea	2.9	1.0	3.9
間引人参 (2 year old-ginseng root)	Korea	2.3	0.9	3.2

TABLE II. Analytical Results of the Commercial Ginseng Tea and Ginseng Extract

		Rb ₁ b ₂ c (換算)(%)	Rg ₁ (換算)(%)	Total (%)
人参茶 (ginseng tea)	A	1.7	0.6	2.3
	B	1.0	0.3	1.3
	C	0.8	0.2	1.0
	D	0.8	0.1	0.9
	E	0.5	0.3	0.8
	F	0.3	0.1	0.4
	G	0.2	0.1	0.3
	H	<0.01	<0.01	
	I	<0.01	<0.01	
人参エキス (ginseng ext.)	J-1	5.0	1.7	6.7
	J-2	2.5	1.0	3.5

果であるが、Rbc と Rg の比からこれらのほとんどは間引人參または白毛が使用されていることが推定された。サポニン含量10%の白毛が使用されていると仮定すると、ニンジン茶の中には多いもので20%、通常10%前後の白毛またはそのエキスが入っているものと思われる。また中にはニンジンの存在を認めがたい製品もあった。ニンジンエキスは同一会社の製品であるがそのサポニン含量にはロットの違いによる大きな差がみられた。

金順基ら〔13〕は新鮮なニンジンのエキスの収量が季節的に大きく変動し、冬期採取のものは夏期採取のもの約2倍のエキスを与えることを見出した。著者らはエキスおよびサポニン含量の季節的变化について検討し

メタノールエキス量は冬季(12~3月)採取のものが、夏期(6~8月)採取のもの約2倍強と多い(Fig. 4.)が、サポニン含量は4~6月が最高で、最低の2~3月の約1.6倍という結果を得た(Fig. 5.)。

金順基ら〔14〕はさらに、夏期に採取した新鮮根を $2 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の低温に保存するとエキス量が著しく増加することをも認め、そのエキス量の増加は主として糖の増加に起因することを明らかにしている。8月に採取した新鮮根とそれを30日間低温処理したもののエキスおよびサポニン含量は Table III のように処理後のものでは PD-saponin は3倍強、PT-saponin では5倍強に希釈されており、乾燥重量あたりの収量でも双方とも減少し

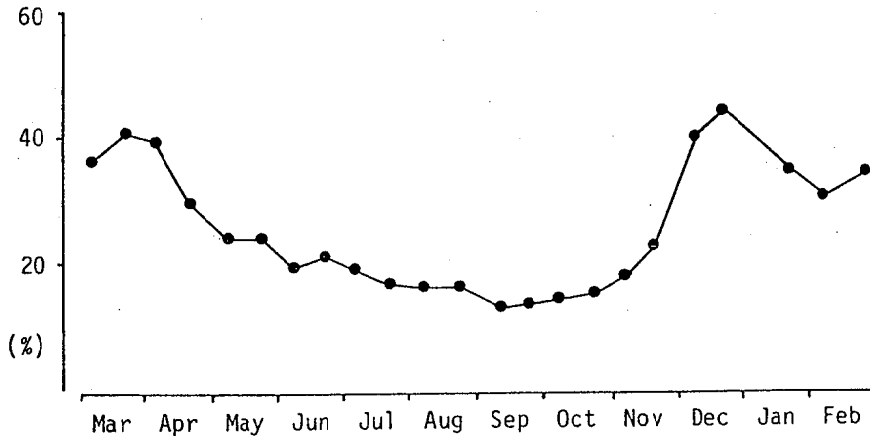


Fig. 4. Seasonal Variation of Yield (%) of Methanolic Extract (Calculated from Dry Weight of Roots).

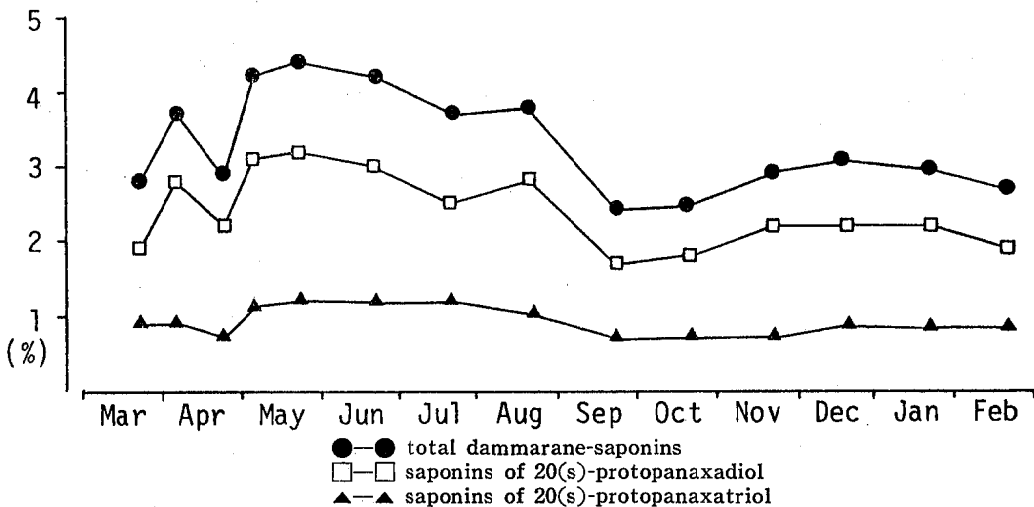


Fig. 5. Seasonal Variation of Ginseng-Saponin Contents (%) in Fresh Roots of *Panax Ginseng* Cultivated at Kumsan, Korea (4 Years) (Calculated from Dry Weight of Roots)

TABLE III. Contents (%) of Constituents in Methanolic Extract of Roots of *Panax ginseng*

Sample	MeOH-extract	Saponins	
		diol ^{c)}	triol ^{d)}
A ^{a)}	(17.3)	22.0 (3.8)	8.2 (1.4)
B ^{b)}	(43.6)	6.5 (2.8)	1.4 (0.6)

(): yields (%) calculated from dry weight of roots.

- a) Fresh roots harvested in August.
- b) Roots^{a)} treated at 2°±1° for 30 days.
- c) Saponins of 20(S)-protopanaxadiol.
- d) Saponins of 20(S)-protopanaxatriol.

ていることが明らかになった。このように冬期に採取したニンジンからあるいは夏期に採取したニンジンを低温で保存した後エキスを製造するとサポニンその他の有効成分が希釈されるという以上の事実は、ニンジンエキスを製造上留意すべき知見と考えられる。

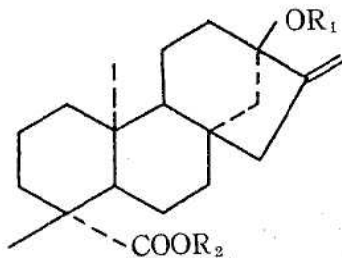
以上ニンジンサポニンのGC分析について記述したが、他の分析法としては著者の開発したサポニンの加水分解条件を利用し、IV, Xとしたのち、β-ナフトエトとしてUV吸収を持たせてTLC-二波長デンシトメーターで定量する高感度微量分析法が渡渡ら[15]によって報告されている。TLCを利用した例では他に真田らの方法[16]、この方法の発色剤を変えて感度を上げた滝野ら[17]の方法があり、棒状薄層クロマトグラフ(シンクログラフ)を用いた難波ら[18]の報告もある。近年、高速液体クロマトグラフィーが一般化し、逆相系カラムを用いたSoldatiら[19]、CHカラムの長沢ら[20]、NH₂-カラムの西本ら[21]、シリカゲルカラムの貝塚ら[22]の報告がある。また別曾らはサポニンを

ベンゾイル化しUV吸収をもたせて高感度でHPLC分析を行った例を報告している[23]。さらに最近では、配糖体の構成糖とホウ酸の反応で生成するイオン性ホウ酸錯体をアニオン交換カラムで分離するという方法も山口ら[24]によって報告されている。

ステビア葉の甘味ジテルペン配糖体の分析

南米パラグアイに自生するステビア (*Stevia rebaudiana*)の葉が強い甘味を呈することで原産地パラグアイでは古くから飲用薬の甘味づけあるいはマテ茶、コーヒー等の甘味料として使用されてきた。ステビア葉に含有される甘味配糖体は、我が国においても合成甘味料の毒性、しょ糖の摂取過多が保健衛生上の問題となっている現在、これらに代る低カロリーの天然甘味料として食品工業における広範な分野で盛んに利用されている。その甘味成分としてはChart 3に示すように主成分 stevioside (XI) [25]をはじめ現在までに7種の甘味配糖体の構造が明らかにされており、いずれも4環性 entkaurene 型ジテルペンの steviol (XII) [25] をゲニンとするものである。このうち, rebaudioside-A (XIII) は神田ら[26]が, rebaudioside-C (XIV), D (XV), E (XVI) は著者ら[27, 28]が, また, dulcoside-A (XVII), B (XVIII) は小林ら[29]が単離構造決定したものであるがXVIIIはXIVと同一物質である。なお、極めて微量な成分であり、甘味強度的にも劣る steviolbioside (XIX) も報告されている[30]。

著者がステビア配糖体の分析に着手した当時は、甘味配糖体としてXI, XIII, XIXの三種が知られていたが、甘味の強さ、質ともにXIIIが最もすぐれており、XIIIをより多く含有する品種の栽培の検討、原葉の品質評価、製品の品質管理等にはXIとXIIIの分離定量法の開発が必要と思われた。そこで酵素を用いる選択的定量法によりXIの量を、さらに、従来行われてきた酸加水分



glc ; β-D-glucopyranosyl
rham ; α-L-rhamnopyranosyl

	R ₁	R ₂
stevioside (XI)	glc ² -glc	glc
steviolbioside (XIX)	glc ² -glc	H
rebaudioside-A (XIII)	glc ₃ < $\begin{matrix} \text{glc} \\ \text{glc} \end{matrix}$	glc
dulcoside-A (XVII)	glc ² -rham	glc
rebaudioside-C (XIV) (dulcoside-B) (XVIII)	glc ₃ < $\begin{matrix} \text{rham} \\ \text{glc} \end{matrix}$	glc
rebaudioside-D (XV)	glc ₃ < $\begin{matrix} \text{glc} \\ \text{glc} \end{matrix}$	glc ² -glc
rebaudioside-E (XVI)	glc ² -glc	glc ² -glc

Chart 3

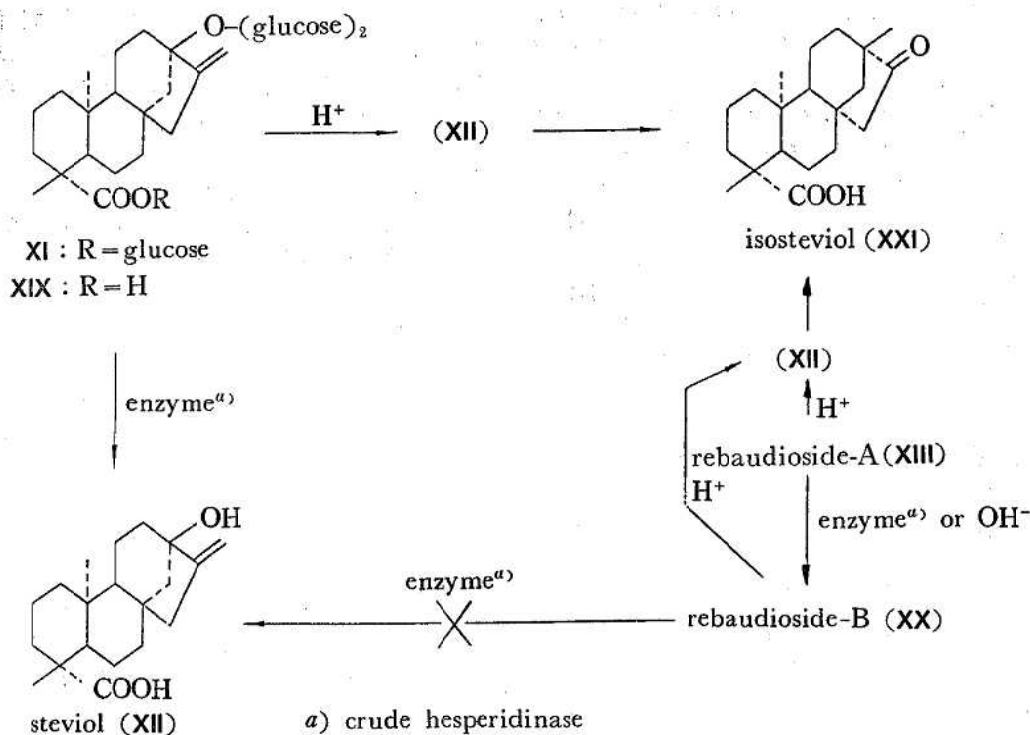


Chart 4

解法[31, 32]を改良した方法でXI+XIIIの量を求めることによる両化合物の分離分析法を開発した。

1 酵素による Stevioside (XI) の定量 [33]

XIは酵素加水分解によりその真性アグリコンであるXIIを与えることがすでに知られていたが[25, 34], 神田らは粗ヘスペリジンナーゼ(Hesと略)中にXIを定量的に加水分解してXIIとする酵素が存在することを見出した[35]。一方、このHesはXIIIを加水分解して rebaudioside-B(XX)[26]を与えるがそれ以上加水分解する活性はなくXIIの生成は全く認められなかった。したがって、Hesを用いればXIとXIIIを分別して定量することが可能である。Chart 4に示すように、XIXもHesでXIIを与えるが通常その含量は微量であるので実際の測定値にはたいして影響を与えないと思われる。

Hesは *Aspergillus niger* を柑橘類果皮を入れた培地で培養し、培養濾液を硫酸で沈殿させ、脱色、脱塩、除菌、凍結乾燥して得られる粗酵素で、その中には hesperidin の rhamnoside 結合を加水分解する hesperidinase さらに、glucoside 結合を加水分解する flavonoid- β -glucosidase などを含有しており、ミカンの缶詰などの製造の際 hesperidin の分解のために用いられている [36]。

Hes を XI の定量に用いるための加水分解条件を以下のように検討した。反応温度は高い方が反応速度が大であったが、実験の実際面を考慮して 40° とした。基質に対する添加酵素の比と反応時間との関係については、Hes を XI の 2 倍量用いれば 48 時間以内に加水分解が完了することが確かめられた。同時に至適 pH が 4.0 であることも確認できた。なお、XI と Hes の濃度については、リン酸緩衝液 (0.2 M, pH 4.0) 12 ml 中 XI 1 ~ 5 mg の間で Hes を XI の 2 倍量加えた場合、反応は定量的に進行

Stevia leaves (1g)

- defatted with Et₂O (Soxhlet) 4hr,
- extd. with MeOH (Soxhlet) 5hr, evapd.

MeOH ext.

- dissolved in Phosphate Buffer (0.2M, pH4.0, 10ml)
- decolorized with Polyclar-AT (1g),
- filtered, washed with Buffer----50ml*

Enzymatic Hydrolysis

- Solution* 1.5ml + Crude Hesperidinase 6mg
- + Buffer---- 12ml (pH4.0)
- incubated at 40° for 48hr,
- extd. with Et₂O (15ml x 4), evapd.

Residue

- dissolved in CHCl₃ with Progesteron 0.4mg

GC Analysis

Chart 5

し、また、反応完了時間に大きな差はみられなかった。以上のことから加水分解の条件を Chart 5 に示すように設定した。

生成したXIIの定量は、progesteroneを内部標準として加え、SE-30あるいはOV-17を用いたGCによっ

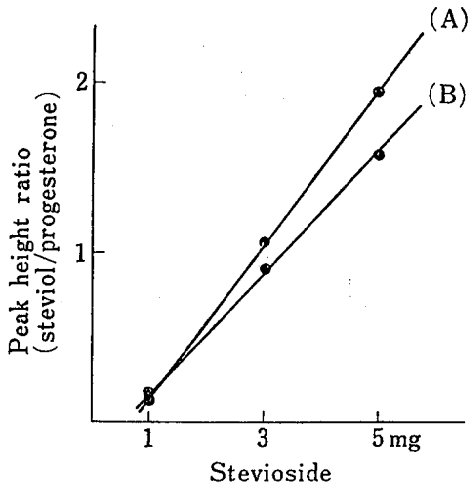


Fig. 6. Calibration Curves of Steviol from Stevioside
(A): adsorbent SE-30 (3%)
(B): adsorbent OV-17 (1.5%)

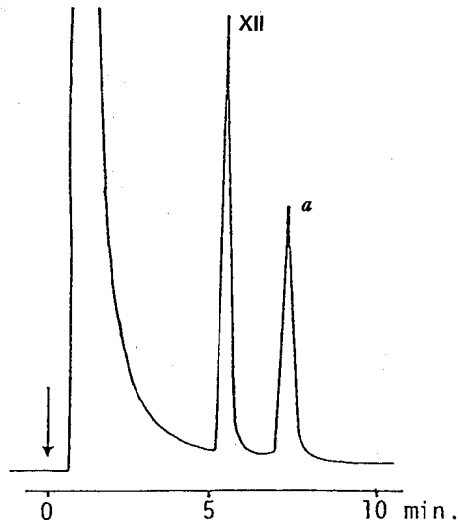


Fig. 7. Gas Chromatogram of Steviol from Stevioside

Column; 1.5% OV-17 on Chromosorb W, 1m
Column Temp; 260°, Inj Temp; 300°,
N₂; 50 ml/min. XII; Steviol
a; Progesterone (Internal Standard)

て行った。検量線はXIの一定量について同様に操作し、Fig. 6. に示すように1~5 mgの間でよい直線性を示し、再現性も良好であった。Fig. 7. にはOV-17を用いた場合のガスクロマトグラムを示す。

なお、手数はかかるが、XIIをCH₂N₂でメチルエステルとし、androsteroneを内部標準としてOV-17で定量することも可能である。この場合の検量線は Fig. 8. に示すように原点を通る非常に良好な直線性を示した。

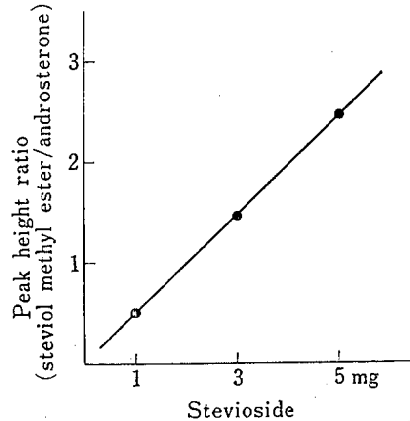


Fig. 8. Calibration Curve of Steviol Methyl Ester from Stevioside

上記の方法による、国立衛生試験所春日部試験場および東京農業大学川谷研究室において種々の条件で栽培された stevia 葉の分析結果の一部を Table IV に示す。

また、著者は川谷らとの共同研究において、steviaの栽培に関して肥料3要素の有無および窒素施肥量が stevia の生育、収量、XIの含有率に及ぼす効果について検討を行い興味ある知見を得たが〔37〕、この研究の中でXIの含有率測定に本法を有効に利用することができた。

HesによるXIの定量法は、上記のような選択性の他に、ジュースにXIが添加された場合のその簡易定量法と

TABLE IV. Content of Stevioside in *Stevia rebaudiana* Cultivated in Japan (%)

	A	B	C	D	E
	3.7	7.3	16.7	18.3	18.4
	3.7	7.5	16.8	18.4	18.4
	3.8	8.1	15.2	18.8	18.0
	3.8	7.3	14.8	18.4	19.2
average	3.8	7.6	15.9	18.5	18.5

analyzed as steviol

しても有用である。しょ糖抜きのおレンジジュースに XI を 0.4 mg/ml の割合で添加すると、飲用に適当な甘味となる。このジュースについて回収実験を行った結果回収率がほぼ 100% であったことから、何らの前処理を必要としない定量法として十分実用が可能であると思われる。

2 臭化水素酸による Stevioside (XI) + Rebaudioside-A (XIII) の定量 [38]

XI の定量法としては宮崎ら [32]、三橋ら [31] の方法が報告されているが、酸加水分解によって変形ゲニン isosteviol (XXI) として定量するこれらの方法は XIII が発見されてからは XI の選択的定量法ではなく XI + XIII の定量法ということになった。しかし、これらの方法は XI + XIII の定量法としても操作が複雑な上に再現性に難点があった。

著者は多量の試料を同時に処理できる簡易定量法ということを検討し種々の加水分解条件を検討した。その結果、室温における臭化水素酸による方法 [25] が最も簡単で再現性もよいことが明らかになった。生成した XXI の定量は XI と同様 GC によって行った。

Stevia 葉のメタノール粗エキス一定量に濃臭化水素酸を加えて室温で 1 夜放置し加水分解して XXI とし、progesterone を内部標準として加え、SE-30 で GC を行ったが、XI の場合とは異なり、若干テーリングをおこすので、ピーク高さ比の測定による方法では誤差を生じ易く、GC に直結したインテグレーターによって分析を行った。検量線は IX の一定量について同様に操作し Fig. 9. に示すように 1~7 mg の間で良好な直線性を

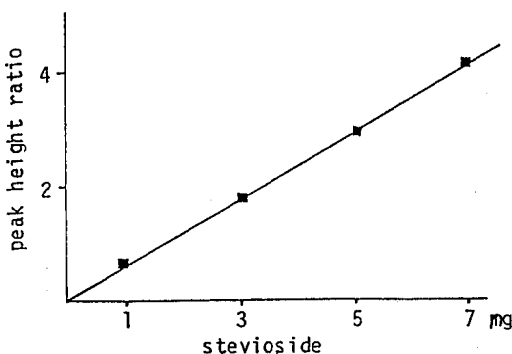


Fig. 9. Calibration Curve of Isosteviol methyl ester from Stevioside

示し、再現性も良好であった。また XII と同様 XXI も CH₂N₂ でメチルエステルとして androsterone を内部標準に OV-17 で定量することも可能であり、この場合も検量線はピーク高さ比だけで原点を通る良好な直線性を

を示すが、メチル化の操作が入るだけに多数の検体処理には不適当である。

上記の方法および前述の酵素法により、国立衛生試験所伊豆試験場で種々の条件で栽培された stevia 葉を分析した結果の一部を Table V に示すが、ここで XI* としたものは実際には XI だけではなく後に Hes によって XII にまで加水分解されることが明らかになった XIV, XVI, XVII および XIX の量も合わせて XI の量に換算して表わしたものである。また、XIII* としたものは(臭化水素酸法より求めた量 - XI*) × XIII の分子量 / XI の分子量の式より得たもので実際には XIII + XV の量を XIII の量に換算したものである。しかし、XI, XIII 以外は微量成分であるので XI*, XIII* を XI, XIII の量としさしつかえないと思われる。

TABLE V. Contents of Stevioside (XI) and Rebaudioside-A (XIII) in Stevia Leaves (%)*)

	F	G	H	I	J
XI*	6.8	8.8	10.7	11.1	6.0
XIII*	4.8	6.2	4.9	7.4	9.2

*) : Based on Dry Weight.
F~J: Stevia rebaudiana Cultivated in Japan.

以上 XI, XIII の GC による分離定量を記述したが、田中ら [39] は TLC-デンストメトリーを用いた個々の甘味成分の分析について報告している。また、橋本ら [40] は Lichrosorb NH₂ を用いた HPLC で XI と XIII の分離を報告しており、著者も μ-Bondapak CH を用いて XI, XIII, XIV の定量分析に成功している [41]。

センブリの苦味セコイリド配糖体の分析 [42]

センブリは我が国で古くから主に苦味健胃薬として用いられてきた民間薬であり、その主な成分としては swertiamarin (XXII), gentiopicroside (XXIII), sweroside (XXIV) [43], amaroswerin (XXV), amargentin (XXVI) [44] の 5 種のセコイリド配糖体が知られている。

これらの配糖体は今までに述べてきたニンジンサポニン、ステビア配糖体とは異なりゲニン部が共通でなく、その上加水分解で糖をはずすにしても非常に不安定である。これらの配糖体の同時分析が未だなされていなかったことから導入されて間もない HPLC による同時分析を検討した。しかし、順相カラムによる 5 種類の化合物

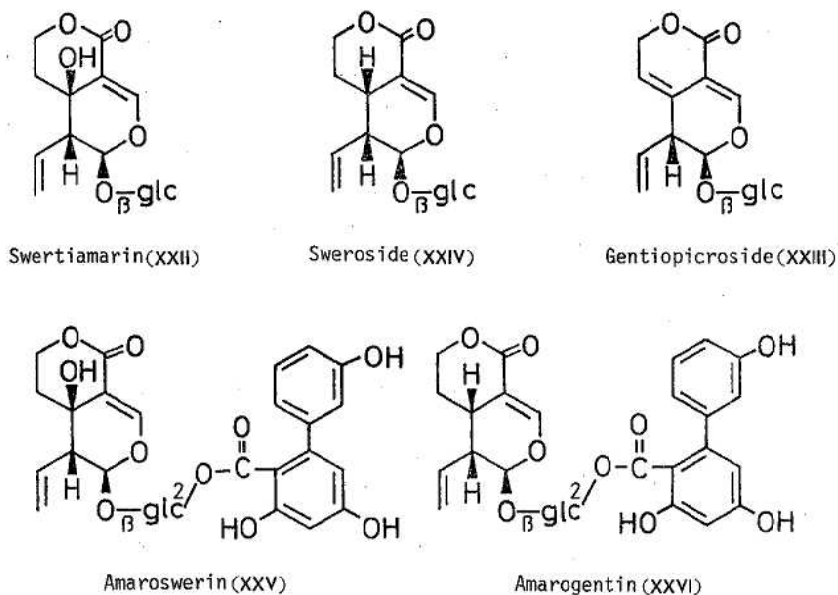


Chart 6

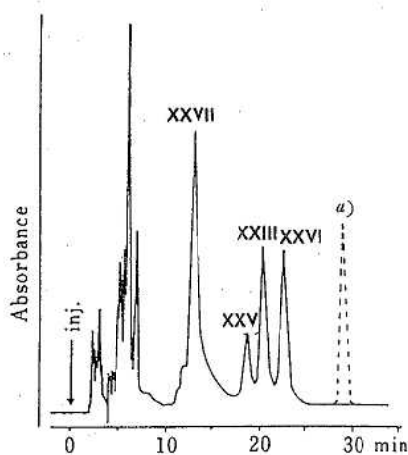


Fig. 10. High Performance Liquid Chromatogram of EtOAc Fraction of Swertiae Herba

Column: μ Bondapak C_{18} (4 mm i.d. \times 30 cm).
Mobile phase: CH_3CN-H_2O (2 : 8). Flow rate :
0.8 ml/min. Temp. : room temperature. De-
tector : UV 254nm (range 0.16).

XXV : amaroswerin, XXVI : amarogentin,
XXVII : swertisin, XXVIII : swertianolin.

a) Methyl acetylsalicylate (internal standard).

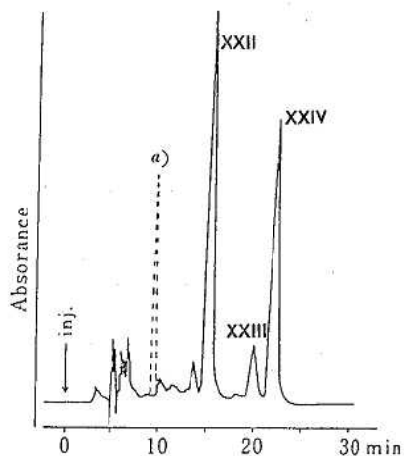


Fig. 11. High Performance Liquid Chromatogram of BuOH Fraction of Swertiae Herba

Column: μ Bondapak C_{18} (4 mm i.d. \times 30 cm).
Mobile phase: CH_3CN-H_2O (1 : 9). Flow rate :
0.7 ml/min. Temp. : room temperature. De-
tector : UV 254 nm (range 0.16).

XXII : swertiamarin, XXIII : gentiopicroside,
XXIV : sweroside.

a) Acetaminophen (internal standard).

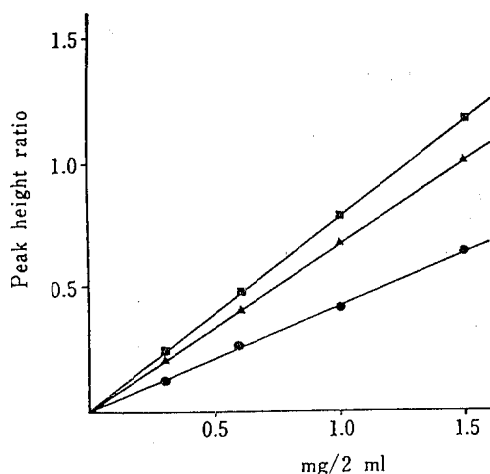


Fig. 12. Calibration Curves

●—●: swertiamarin (XXII), ▲—▲: gentiopicroside (XXIII), ■—■: sweroside (XXIV). Column: μ Bondapak C₁₈ (4 mm i. d. \times 30 cm). Mobile phase: CH₃CN-H₂O (1: 9). Flow rate: 0.7 ml/min. Temp.: room temperature. Detector: UV 254 nm (range 0.16). Injection vol.: 5 μ l. Internal standard: acetaminophen 0.1 mg/ml.

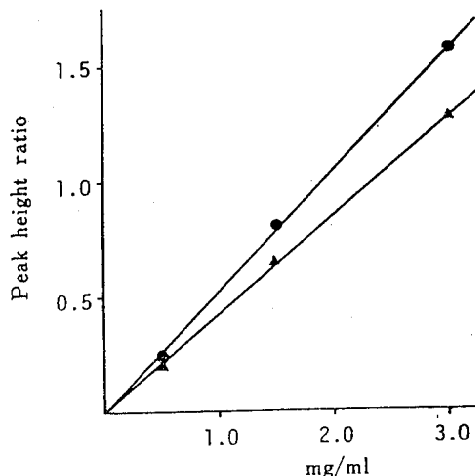


Fig. 13. Calibration Curves

▲—▲: amaroswerin (XXV), ●—●: amaro-
gentin (XXVI). Column: μ Bondapak C₁₈ (4 mm
i. d. \times 30 cm). Mobile phase: CH₃CN-H₂O (2: 8).
Flow rate: 0.8 ml/min. Temp.: room temper-
ature. Detector: UV 254 nm (range 0.16). In-
jection vol.: 5 μ l. Internal standard: methyl
acetylsalicylate 2.5 mg/ml.

の分離は非常に困難であり、分離のよいといわれる逆相カラムを用いても XXII, XXIII, XXIV と XXV, XXVI とでは極性に大きな差があるため同時分析は不可能であった。

そこで、XXII, XXIII, XXIV と XXV, XXVI とをそれぞれ分けて分析することを試みた。この分離には溶媒抽出が適当と考え、酢酸エチルで XXV, XXVI を定量的に抽出できるが XXII, XXIII, XXIV は全く抽出されないことを明らかにした。

センブリのメタノールエキスを水に懸濁し、エーテルで脱脂した後、酢酸エチルで XXV, XXVI を、ついで 1-ブタノールで XXII, XXIII, XXIV を抽出した。それぞれの抽出液について HPLC を行い Fig. 10, Fig. 11. に示すように良好な分離を行うことができ定量が可能となった。この場合検量線も Fig. 12, Fig. 13. に示すように原点を通る直線性を示した。なお、Fig. 10. においてかなり大きな XXVII, XXVIII のピークが認められるが、これらのピークを分取し、FD-MS, HPLC, TLC 等により XXVII は swertisin [45], XXVIII は swertianolin [46] であることを確認した。これらの化合物は酢酸エチルで定量的に抽出されず、一部は 1-ブタノール層にも移行するが、Fig. 11. の XXII, XXIII, XXIV

の分離の場合にはそれらの保持時間は非常に遅く妨害にはならないことも確認できた。

HPLC による定量分析を行う場合、そのピークの確認、純度決定は非常に大切なことであり、これが確実に行われないと分析結果に重大な影響が及ぶことがある。通常は該当するピーク部分を分取、濃縮して TLC による確認をすることでこの作業を終ることが多いが、特に生体成分とか植物成分を分析対象にした場合には多数の類似の成分が混在することが多く、TLC だけでは十分といいきれない。著者は FD-MS によってこの問題を解決することを試みた。Fig. 14. は Fig. 10, Fig. 11. における XXII~XXVI のピークに相当する部分を分取し、測定した FD-MS スペクトルを示す。この種のセコイリド配糖体は極めて不安定で FD-MS についての報告はなかったが、すべての配糖体について分子イオンに由来するピークのみを単純なスペクトルを得ることができ、ピークの確認、純度決定を容易に行うことができた。

以上のことから、苦味配糖体の分析法を Chart 7 の様に設定し、それによって市販および広島、山口両県で採取したセンブリおよび関連生薬を分析した結果を Table V に示す。サンプルにより各成分含量に著しい差

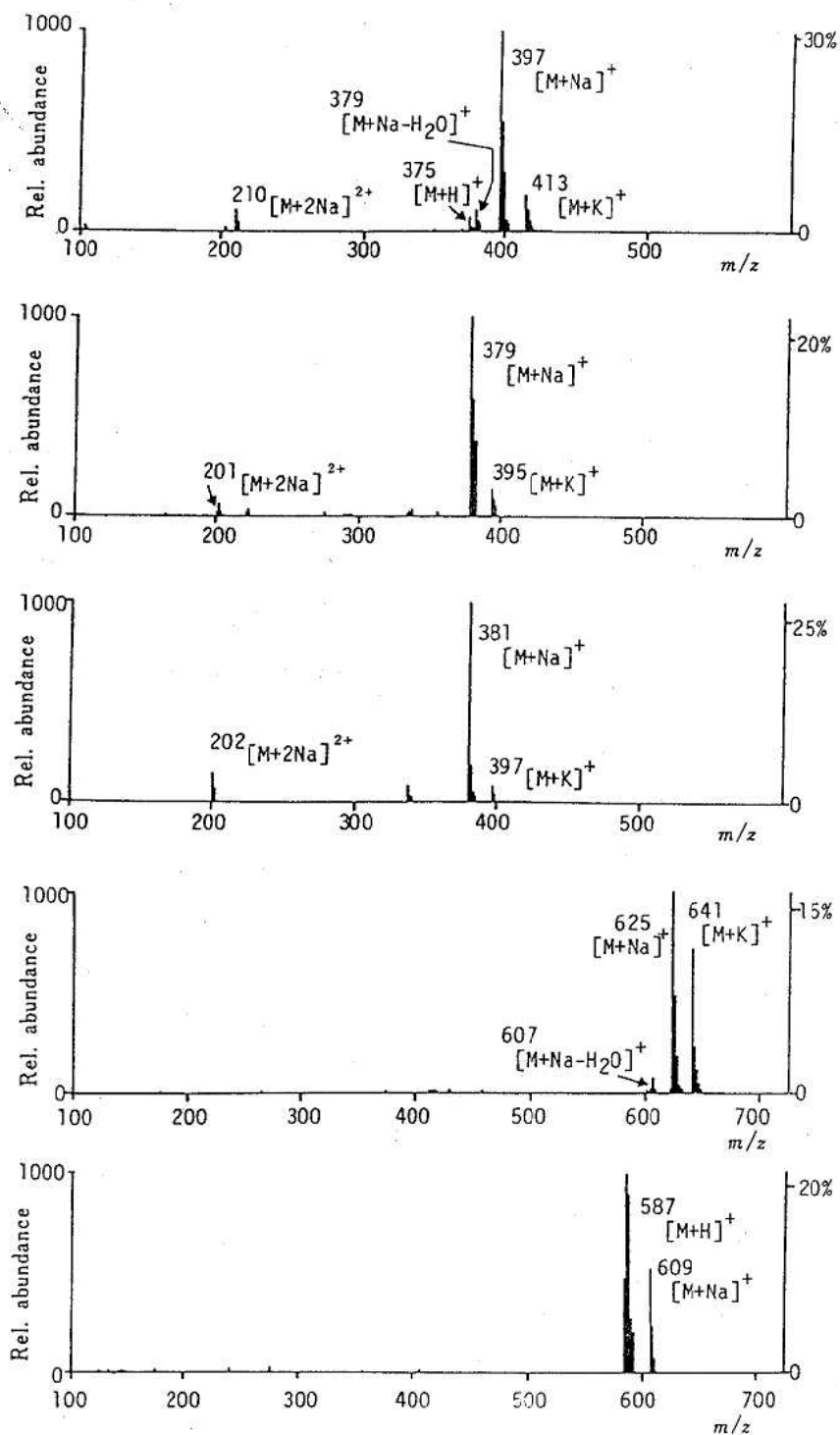


Fig. 14. Field Desorption Mass Spectra
 XXII: swertiamarin, XXIII: gentiopicoside, XXIV: sweroside,
 XXV: amaroswerin, XXVI: amarogentin.

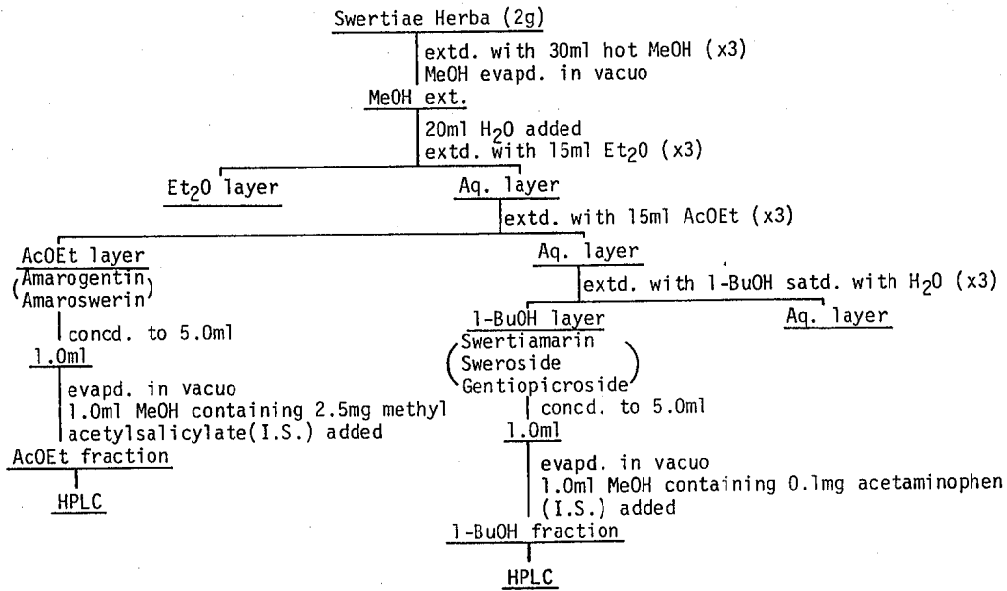


Chart 7

Table VI. Contents of Bitter Secoiridoids (%)

Sample No.	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	
Swertiae Herba	1 (Commercial)	0.45	0.35	5.88	0.13	0.60
	2 (Commercial)	2.57	0.09	0.18	0.55	0.26
	3 (Commercial)	0.17	0.03	0.48	0.35	0.50
<i>S. japonica</i>	4 (Yasufuruichi)	0.45	0.06	1.60	0.38	0.55
	5 (Kaiken-zan)	—	0.06	2.20	—	0.40
	6 (Kurose-cho)	2.45	0.10	0.03	0.35	0.20
	7 (Yoshiwa-son)	—	0.16	3.40	—	0.85
<i>S. pseudochinensis</i>	8 (Hiba-san)	1.35	0.02	0.14	0.80	0.25
	9 (Akyoshi-dai)	0.01	0.01	1.10	—	—

—: <0.01%.

XXII: Swertiamarin, XXIII: Gentiopicroside, XXIV: Sweroside, XXV: Amaroswerin, XXVI: Amarogentin.

が認められたが、井上 [47] によると XXV, XXVI の苦味は XXII, XXIII, XXIV の 1,000 倍位であり、センブリの苦味はほとんど XXV, XXVI によるとされている。そのことを考慮し XXV, XXVI の含量をみると、例数が少なくははっきりしたことは言えないが、平均的には 0.8~1% 位ではないかと考えられた。

センブリの苦味成分の分析については他に TLC を用いた林らの XXII の分析 [48], HPLC による赤田らの XXII [49] および XIII [50] の分析, さらに HPLC による滝野らの XXIII, XXV, XXVI の同時分析 [51] 等が報告されている。

おわりに

著者が配糖体の分析法の研究に着手してから 10 年余りが経過した。その間には、分析法自体の開発ということもさることながら、諸条件設定のためのあるいは検量線作成のための標準品としての配糖体を相当量分離精製するという多くの時間と労力と費用を費やさねばならなかったし、さらにつけ加えるならかなりの熟練も必要であった。しかし、この標準品の単離という作業は、思いがけない新化合物の発見につながることもあった。本文でも少しふれたが、ステビア葉からの Rebaudio-

side-C (XIV), D (XV), E (XVI) の発見もそうであったし、センブリからの isoswertianolin もそうであった。また、isoswertianolin の構造決定を通じて既知の swertianolin (XXVIII) norswertianolin の構造式の訂正も行うことができた [52]。これらの研究には ¹³CNMR とともに早くより当研究所に導入されていた FD-MS も強力な威力を発揮してくれたが [53]、FD-MS の配糖体研究への応用については、いつか稿を改めて記述したいと思う。

本稿の内容については第25回日本薬学会中国四国支部大会 (1986年10月、米子市) において発表した。

本研究は広島大学医学部総合薬学科田中治教授の御指導のもとに行われたものであり、田中先生はじめ田中研究室の方々に心から感謝申し上げる。また、本研究の機会を与えて下さり終始御鞭撻を賜りました当研究所海佐裕幸所長、森本一義前理化学部部長 (現薬務課長) に深謝する。

なお、これら一連の研究のうち特にステビア配糖体の分析に関する研究は1984年度科学技術庁長官賞受賞対象となった研究であることを付記する。

文 献

- [1] 坂本征則, 森本一義, 田中治, 薬誌, 95, 1456 (1975).
- [2] M. Nagai, T. Ando, N. Tanaka, O. Tanaka, S. Shibata, Chem. Pharm. Bull., 20, 1212 (1972). およびその引用文献.
- [3] H. Besso, R. Kasai, Y. Saruwatari, T. Fuwa, O. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 30, 2380 (1982).
- [4] H. Matsuura, R. Kasai, Y. Saruwatari, T. Fuwa, O. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 32, 1188 (1984).
- [5] S. Sanada, N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka, S. Shibata, Chem. Pharm. Bull., 22, 421 (1974).
- [6] S. Sanada, N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka, S. Shibata, Chem. Pharm. Bull., 22, 2407 (1974).
- [7] R. Kasai, H. Besso, O. Tanaka, Y. Saruwatari, T. Fuwa, Chem. Pharm. Bull., 31, 2120 (1983).
- [8] I. Kitagawa, T. Taniyama, M. Yoshikawa, Chem. Pharm. Bull., 31, 3353 (1983).
- [9] Y. Iida, O. Tanaka, S. Shibata, Tetrahedron, 27, 881 (1971).
- [10] S. Yahara, K. Kaji, O. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 27, 88 (1979).
- [11] M. Nagai, O. Tanaka, S. Shibata, Chem. Pharm. Bull., 19, 2349 (1971). およびその引用文献.
- [12] O. Tanaka, M. Nagai, T. Osawa, N. Tanaka, K. Kawai, S. Shibata, Chem. Pharm. Bull., 20, 1204 (1972).
- [13] S. Kim, I. Sakamoto, K. Morimoto, M. Sakata, K. Yamaski, O. Tanaka, Planta Medica, 42, 181 (1981).
- [14] 金 順基, 桧山千都子, 山崎和男, 平岡りつ子, 田中 治, 金 濟熙, 金 一赫, 生薬学雑誌, 31, 245 (1979).
- [15] Y. Saruwatari, H. Besso, K. Futamura, T. Fuwa, O. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 27, 147 (1979).
- [16] 真田修一, 庄司順三, 紫田承二, 薬誌, 98, 1048 (1978).
- [17] Y. Takino, T. Odani, H. Tanizawa, T. Hayashi, Chem. Pharm. Bull., 30, 2196 (1982).
- [18] 難波恒雄, 吉崎正雄, 富森 毅, 小橋恭一, 三井健一郎, 長谷純一, 薬誌, 94, 252 (1974).
- [19] F. Soldati, O. Sticher, Planta Medica, 39, 348 (1980). O. Sticher, F. Soldati, Planta Medica, 36, 30 (1979).
- [20] T. Nagasawa, T. Yokozawa, Y. Nishio, H. Oura, Chem. Pharm. Bull., 28, 2059 (1980).
- [21] 西本喜重, 辻 志津子, 林 信一, 竹本常松, 林輝明, 辻 仁孝, 第11回生薬分析討論会講演要旨 p. 15 (1982).
- [22] H. Kaizuka, K. Takahashi, J. Chromatogr., 258, 135 (1983).
- [23] H. Besso, Y. Saruwatari, K. Futamura, K. Kunihiro, T. Fuwa, O. Tanaka, Planta Medica, 37, 226 (1979).
- [24] H. Yanaguchi, H. Matsuura, R. Kasai, K. Mizutani, H. Fujino, (nee Kimata), K. Ohtani, T. Fuwa, O. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 34, 2859 (1986).
- [25] M. Bridel, R. Lavieille, Bull. Soc. Chim. Biol., 13, 781 (1931) [C.A., 26, 498 (1932)]; E. Mosettig, U. Beglinger, F. Dolder, H.

- Lichiti, P. Quitt, J. A. Waters, J. Am. Chem. Soc., 85, 2305 (1963).
- [26] H. Kohda, R. Kasai, K. Yamasaki, K. Murakami, O. Tanaka, Phytochem., 15, 981 (1976).
- [27] I. Sakamoto, K. Yamasaki, O. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 25, 844 (1977).
- [28] I. Sakamoto, K. Yamasaki, O. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 25, 3437 (1977).
- [29] M. Kobayashi, S. Horikawa, I.H. Degrandi, J. Ueno, H. Mitsuhashi, Phytochem, 16, 1405 (1977).
- [30] H.B. Wood, R. Allterten, H.W. Diehl, H.G. Fletcher, J. Org. Chem., 20, 875 (1955). E. Mosettig, W.R. Nes, J. Org. Chem., 20, 884 (1955).
- [31] 三橋 博, 上野純子, 住田哲也, 薬誌, 95, 154 (1974).
- [32] 宮崎幸男, 渡辺宏之, 熱帯農業, 17, 154(1974). 宮崎幸男, 渡辺宏之, 兼松明子, 同誌, 17, 158 (1974).
- [33] 坂本征則, 神田博史, 村上国子, 田中 治, 薬誌, 95, 1507 (1975).
- [34] R.D. Bennet, E.R. Liever, E. Heftmann, Phyto chem., 6, 1107 (1967).
- [35] 神田博史, 田中 治, 薬誌, 95, 247 (1975).
- [36] 岡田茂孝, 岸 清, 東原昌孝, 福本寿一郎, 農化, 37, 84, 142 (1963); 岡田茂孝, 岸 清, 板谷公和, 福本寿一郎, 同誌, 37, 146 (1963); 富田次男, 食品工業, 13, 12 (1970).
- [37] 川谷豊彦, 金木良三, 田辺 猛, 坂本征則, 村上国子, 田中 治, 熱帯農業, 21, 173 (1978).
- [38] 坂本征則, 広島県衛生研究所研究報告, 30, 11 (1983).
- [39] O. Tanaka, Trends in Analytical Chemistry, 1, 246 (1982).
- [40] 橋本庸平, 守安正恭, 生薬学雑誌, 32, 209(1978).
- [41] 坂本征則, “第25回日本薬学会中国四国支部大会”(1986, 米子).
- [42] I. Sakamoto, K. Morimoto, O. Tanaka, H. Inouye, Chem. Pharm. Bull., 31, 25 (1983).
- [43] H. Inouye, S. Ueda, Y. Nakamura, Chem. Pharm. Bull., 18, 1856 (1970). およびその引用文献.
- [44] H. Inouye, Y. Nakamura, Tetrahedron, 27, 1951 (1971). およびその引用文献.
- [45] M. Komatsu, T. Tomimori M. Ito, Chem. Pharm. Bull., 15, 263 (1967); M. Komatsu, T. Tomimori, Terahedron Lett., 1966, 1611.
- [46] 富森 毅, 小松曼香, 薬誌, 89, 410 (1969)およびその引用文献.
- [47] 井上博之, 日本生薬学会第23年会講演要旨 p. 8 (1976).
- [48] 林 輝明, 辻 仁孝, 松田太郎, 薬誌, 96, 498 (1976).
- [49] 赤田良信, 河野貞子, 棚瀬弥一郎, 薬誌, 100, 770 (1980).
- [50] 赤田良信, 河野貞子, 山岸正治, 棚瀬弥一郎, 薬誌, 100, 678 (1980).
- [51] Y. Takino, M. Koshioka, M. Kawaguchi, T. Miyahara, H. Tanizawa, Y. Ishii, M. Higashino, T. Hayashi, Planta medica, 38, 351, (1980).
- [52] I. Sakamoto, T. Tanaka, O. Tanaka, T. Tomimori, Chem. Pharm. Bull., 30, 4088 (1982).
- [53] 坂本征則, 金森久幸, 第20回全国衛生化学技術協議会年会講演集p.96 (1983).

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

小 川 博 美* 岸 本 敬 之*
得 能 弘 志* 佐々木 実己子*

Statistical Study of Sanitation of Hiroshima Bay by the Time Series Analysis on the Pollution Indicator Organisms

HIROMI OGAWA, TAKASHI KISHIMOTO, HIROSHI TOKUNO
AND MIKIKO SASAKI

(Received Oct. 4, 1986)

Statistical analysis on the data obtained by the long-term bacteriological investigations for 24 years from 1962 to 1985 was performed to clarify the variations of sanitary quality in Hiroshima Bay.

Total 2,588 samples of overlying sea water were collected from five designated areas (A—E) divided at every 2km interval from the mouth of the river, to determine the numbers of such indicator organisms as total coliform (TC), fecal coliform (FC) and aerobic plate counts (SPC). The comparison of the time series analysis of indicator organisms levels was performed between in early 10 years (1962—1971) and in late 15 years (1971—1985).

The results obtained were as follows:

1. In area A, B and C, all the indicator organisms levels show a tendency to increase, in early 10 years, but to decrease in late 15 years. In area A, the trend line equations in early 10 years were $\log y'(TC)=2.006+0.193x^{**}(p=0.01)$, $\log y'(FC)=1.259+0.147x^{**}$ and $\log y'(SPC)=1.664+0.153x^{**}$, while those in late 15 years were $\log y'(TC)=3.443-0.044x^*(p=0.05)$, $\log y'(FC)=2.510-0.053x^*$ and $\log y'(SPC)=2.509-0.031x^*$, respectively.
2. The distribution of fecal indicator organisms in the seawater was gradually decreased from area A to E as far from the estuary.
3. The ratio of FC/TC of the seawater was 10—12%.

Key words: Indicator organisms, Time series analysis, Hiroshima bay

緒 論

環境衛生からみた広島湾は、戦後の急速な産業発展や都市化の影響を受けて、大きな変遷を示した。とくに1960年代に入って、我国経済の飛躍的な発展に伴い、臨海工業地帯の造成、沿岸都市への人口の集中化が進むなかで、下水道や工場廃水処理施設整備の立遅れから水質

汚濁が急速に進行した。とくに閉鎖的二次湾である広島湾は、海洋の有する希釈、拡散等の自然浄化機能を超える急速な汚染拡大により、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等の汚染が進行した[1][2]。

このような水質汚染の急速な進行に対し、従来の水質二法（公共用水域の保全に関する法律・工場廃水等の規

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

制に関する法律)では、対応が不十分となり、行政的には1970年に水質汚濁防止法および、海洋汚染防止法が新たに制定され、各種の廃水規制の強化や下水道の整備また、1972年には内海へのし尿投棄廃止等の対応策が推進されてきた[1]。

他方、水産衛生においても、このような環境汚染と呼応するかのように、1966年12月中旬から下旬にかけて広島県産カキによるとと思われる食中毒が多発し、その規模は、発生病数 129件、患者数 1,596名、11都府県におよんだ[3]。従来、カキの衛生対策は、「生食用冷凍カキの成分規格」の基準のみをもって対処されてきたが、この事件を契機とし、1967年8月、生食される全てのカキを対象とした生食用カキの成分規格、保存基準および加工基準[4]が定められ、生産から流通までの細かな基準が定められた。すなわち、従来成分規格のみの「細菌数5万以下/g、大腸菌群最確数16,000以下」であったものを、まず成分規格は、「細菌数5万以下、大腸菌群最確数230以下」とし、同時に加工基準とし、「原料用カキは、海水100ml当たり大腸菌群最確数70以下の海域で採取されたものか、またはそれ以外の海域で採取されたものにおいて、100ml当り大腸菌群最確数70以下の海水または塩分濃度3%の人工海水を用い殺菌しながら浄化した

もの」と定め、次いで保存基準では、「冷蔵においては10°C以下、冷凍にあっては-15°C以下」と定められた。また市販カキの表示についても「生食用」、「加熱調理用」に表示区分され消費者への啓発も進められた。以降生食用カキによる食中毒の多発がみられぬ事から、一定の評価がされている。

以上のように変遷を示した広島湾の環境衛生対策やカキ衛生対策のなかで、広島湾の河口部海域の細菌汚染レベルは、どのような経年の推移を示したかを衛生指標菌をもって、明らかにすることは、今後のカキ衛生対策上重要な基礎資料となるものと考え次の検討を行った。

材料および方法

供試した測定データは、1962年から1985年の24年間に広島湾奥部より得られた測定値を用いた。Fig. 1に示すように広島湾奥部海域を太田川河口からの距離で、2~4 kmをA海域、5~6 kmをB海域、7~8 kmをC海域、9~10 kmをD海域、11~12 kmをE海域に区分し、A海域 290、B海域 222、C海域 544、D海域 919、E海域 603の総計 2,588ポイントのデータを供試した。

海水の採取方法は、いずれの年も11月から2月の冬期、主として干潮期に水深1 mより採取し、1ポイント

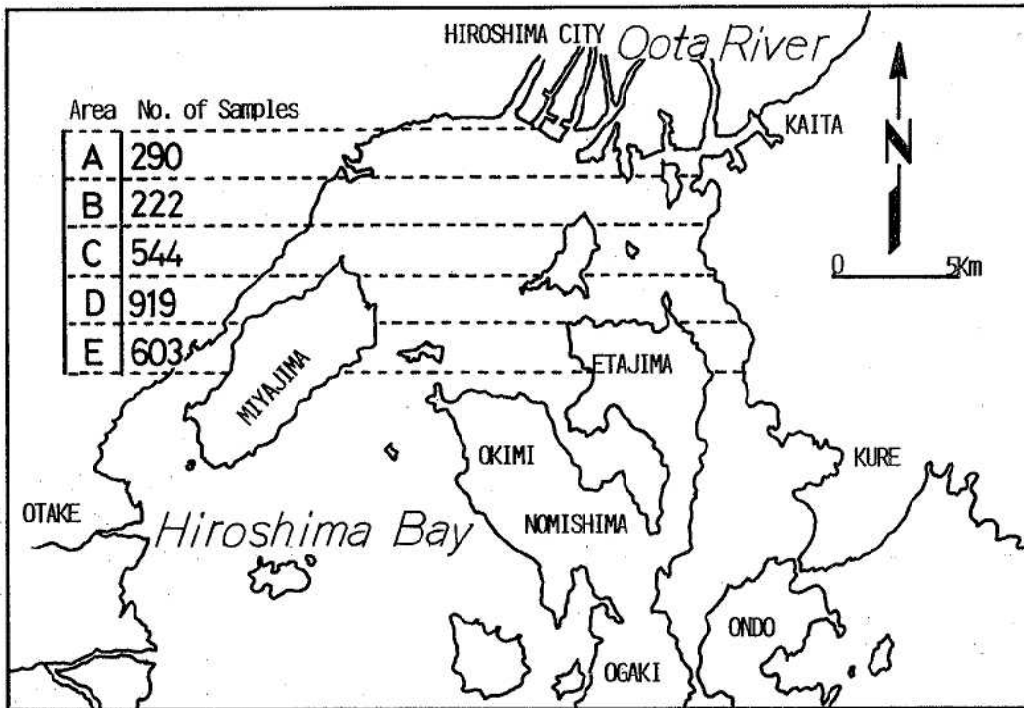


Fig. 1 Designated areas and No. of samples in Hiroshima Bay.

の試料について大腸菌群最確数(以下 TC MPN)、糞便性大腸菌群(以下 FC MPN)および一般細菌数(以下 SPC)のそれぞれ汚染指標菌を計測した。

採取時の水温ならびに比重は、7.1~24°C、1.0195~1.0275を示した。なお、採取検体数が最も多い11月について、建設省、広島气象台、広島県水産試験場の資料より、24年間の太田川平均流入水量(m³/秒)、降水量(mm/月)、海水温(峠島)をとりまとめ Fig. 2 に示した[5-7]。

細菌学的検査法は、APHA 法[8]に準じ、TC MPN は、乳糖ブイオン培地(日水)で35°C 48時間培養し、ガス陽性管について BGLB 培地(日水)に移植し、35°C 48時間培養後そのガス陽性管数を計測した。FC MPN は、TC と同様に乳糖ブイオン培地でガス陽性管を EC 培地(Difco 社製)に移植し、44.5°C ± 0.2°C 24時間培養後、ガス陽性管数を計測した。最確数は、いずれも5本立3段階希釈法により100ml当りの最確数を求めた。SPC については、プレートカウント寒天培地(Difco 社製)で35°C 24時間培養し、1ml当りの一般細菌数を求めた。

データ処理は、全測定値を常用対数変換しその中央値を算出し、各年、各海域毎の代表値として使用した。なお最確数法による測定限界<1.8は1.8として処理した。またこれらのデータの時系列処理及び統計処理は、伊藤[9]、小原[10]らの方法に準じた。

検討項目は、(i)1962年~1985年の24時間を、1971年をポイントに前期10年間(1962-1971年)と後期15年間

(1971-1985年)に区分し、各期間について、AからE海域毎に TC MPN, FC MPN, SPC についての年推移を検討した。

(ii) (i)で求めた傾向式を用いて、24年間の中間年次の各 TC MPN, FC MPN, SPC および FC/TC 比を求め、広島湾河口部における汚染指標菌の分布、拡散、消長について検討した。

結 果

1 TCの海域別経年推移

TCの海域別経年推移について Table 1, Fig. 3 に示した。A海域では、1970年、1971年に log 値3.54, 1973年、1979年には3.73の高い値を示し、各年の24年間平均は、3.01±0.22を示した。これを傾向線でみると、全期間では $\log y' = 2.782 + 0.020x$ とやや増大傾向を示すが有意性は認められず、前期10年でみると $\log y' = 2.006 + 0.193x^{**}$ (p=0.01) と急速な増大を示した。しかし後期15年では逆に $\log y' = 3.443 - 0.004x^*$ (p=0.05) と減少傾向を示した。

B海域では、1971年 log 値で3.45, 1973年3.34, 1979年3.25の高い値を示し、全期間の平均値は、2.73±0.17を示した。これを傾向線でみると、全期間では $\log y' = 2.592 + 0.013x$ と微増を示すが、前期10年では、A海域と同様 $\log y' = 2.105 + 0.123x^*$ と急速な増大を示し、後期15年では、 $\log y' = 3.084 - 0.035x$ と減少傾向を示した。C海域では、1967年 log 値で2.53, 1973年2.90, 1982年2.41の高い値を示し、全期間の平均値は1.95±

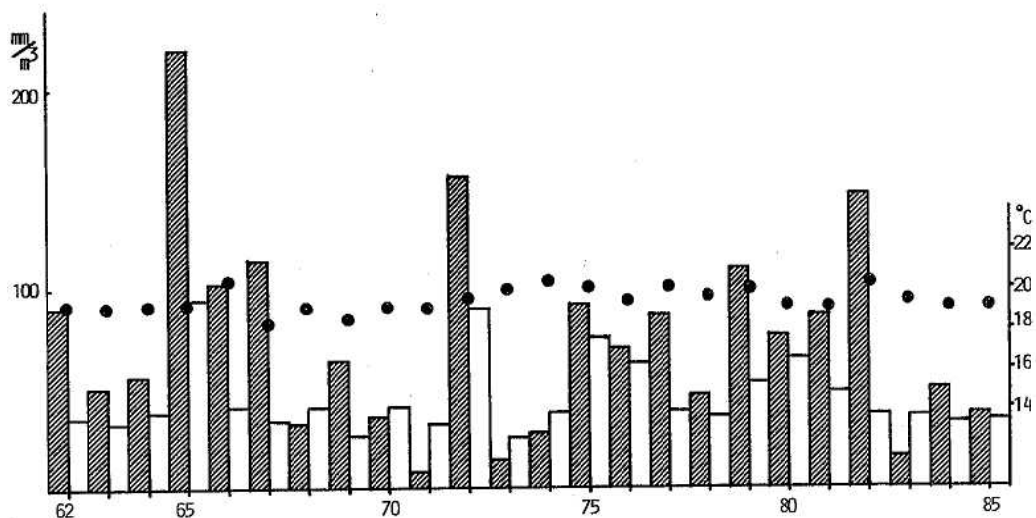


Fig. 2 The amounts of rainfall (▨; mm/month), flow quantity of Oota River (□; m³/sec.) and temperature of seawater (● ●; °C) in every November from 1962 to 1985.

Table 1. Time series analysis of indicator organisms levels in Hiroshima Bay.

Area	Indicator No.	organisms	Trend line equation ^{a)}		
			1962—1971	1971—1985	1962—1985
A	T	C	$\log y' = 2.006 + 0.193x^{**b)}$	$\log y' = 3.443 - 0.044x^*$	$\log y' = 2.782 + 0.020x$
	F	C	$\log y' = 1.259 + 0.147x^{**}$	$\log y' = 2.510 - 0.053x^*$	$\log y' = 1.900 + 0.012x$
	S	P C	$\log y' = 1.664 + 0.153x^{**}$	$\log y' = 2.509 - 0.031x$	$\log y' = 2.297 + 0.001x^*$
B	T	C	$\log y' = 2.105 + 0.123x^*$	$\log y' = 3.084 - 0.035x$	$\log y' = 2.592 + 0.013x$
	F	C	$\log y' = 1.456 + 0.073x^*$	$\log y' = 2.087 - 0.043x$	$\log y' = 1.807 - 0.004x$
	S	P C	$\log y' = 1.836 + 0.097x^*$	$\log y' = 2.492 - 0.062x^*$	$\log y' = 2.353 - 0.020x$
C	T	C	$\log y' = 1.471 + 0.068x$	$\log y' = 2.230 - 0.027x$	$\log y' = 1.792 + 0.014x$
	F	C	$\log y' = 0.996 + 0.005x$	$\log y' = 1.125 - 0.020x$	$\log y' = 1.084 - 0.007x$
	S	P C	$\log y' = 1.742 + 0.043x$	$\log y' = 1.911 - 0.078x^{**}$	$\log y' = 2.114 - 0.048x^*$
D	T	C	$\log y' = 0.855 + 0.068x$	$\log y' = 1.567 - 0.037x$	$\log y' = 1.196 - 0.005x$
	F	C	$\log y' = 0.426 + 0.016x$	$\log y' = 0.691 - 0.040x^*$	$\log y' = 0.615 - 0.014x$
	S	P C	$\log y' = 1.825 - 0.121x^{**}$	$\log y' = 0.991 - 0.023x$	$\log y' = 1.518 - 0.042x^{**}$
E	T	C	$\log y' = 0.924 + 0.042x$	$\log y' = 1.304 - 0.025x$	$\log y' = 1.115 - 0.002x$
	F	C	$\log y' = 0.441 - 0.015x$	$\log y' = 0.428 - 0.034x^*$	$\log y' = 0.494 - 0.020x$
	S	P C	$\log y' = 1.751 - 0.111x^{**}$	$\log y' = 0.836 - 0.008x$	$\log y' = 1.439 - 0.039x^{**}$

a) Trend line equation was evaluated by each median.

b) *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

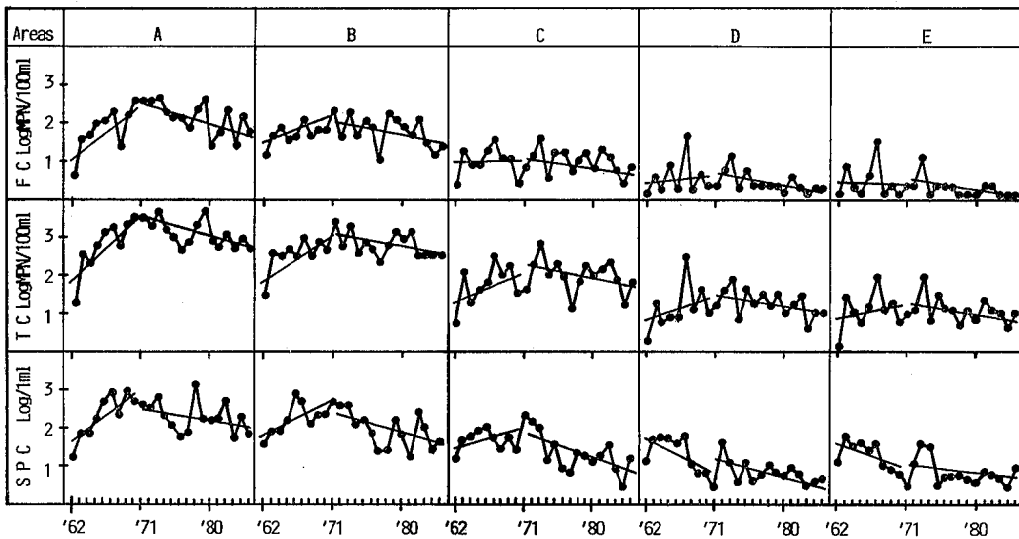


Fig. 3 Trend lines of fecal indicator organisms by designated areas in Hiroshima Bay, 1962—1985.

0.21を示した。これを傾向線で見ると、全期間で $\log y' = 1.792 + 0.014x$, 前期10年で $\log y' = 1.471 + 0.068x$, 後期15年では $\log y' = 2.230 - 0.027x$ と、A, B海域と同様の年推移を示すが有意性は認められなかった。D海域では1967年 log 値で2.54, 1973年1.90を示すが、全期間の平均値は 1.25 ± 0.20 と低い値を示した。傾向線で見るとC海域と同様に、A, B海域の経年推移と類似の傾向を示したが、いずれの期間も有意性は認められなかった。E海域については、1967年 log 値で2.02, 1973年2.01と高い値を示すものの、全期間の平均値は 1.13 ± 0.17 と低く、傾向線による経年変化は認められなかった。

2 FCの海域別経年推移

FCの海域別経年推移についてみると (Table 1, Fig. 3), A海域では、1970年 log 値で2.60, 1973年2.69, 1979年2.66の高い値を示し、全期間の平均値は 2.03 ± 0.21 を示した。これを傾向線で見ると、全期間では、TCにおける推移と同様に $\log y' = 1.900 + 0.012x$ と微増を示すが、有意的傾向は認められなかった。しかし前期10年でみると $\log y' = 1.259 + 0.147x^{**}$ と増大し、後期15年では $\log y' = 2.510 - 0.053x^*$ と減少を示した。B海域では、1971年, 1973年いずれも log 値で2.36, 1978年2.23を示し、全期間の平均値は 1.76 ± 0.16 を示した。傾向線で見ると、全期間では $\log y' = 1.807 - 0.004x$ と減少を示すが、前期10年では $\log y' = 1.456 + 0.073x^*$ と増大し、後期15年では、 $\log y' = 2.087 - 0.043x$ と減少傾向を示した。C海域では1967年 log 値で1.56, 1973年1.65, 1981年1.36を示したが、全期間平均では 1.00 ± 0.17 を示した。傾向線では全期間で $\log y' = 1.084 - 0.007x$ を示し、前期は増大、後期は減少する推移は、A, B海域と同様の傾向を示すが、有意性は認められず、経年的に著明な変化は認められなかった。D海域については、1967年, 1973年 log 値で1.30を示すが、全期間平均値は 0.45 ± 0.18 と低い結果を示した。傾向線で見ると、いずれの期間においても経年変化は認められなかった。

E海域については、1967年 log 値で1.50, 1973年1.04を示したが、全期間平均では、 0.26 ± 0.17 と低く、傾向線では前期10年においても $\log y' = 0.441 - 0.015x$ と減少し、後期15年においては、 $\log y' = 0.428 - 0.034x^*$ と減少を示した。

3 SPCの海域別経年推移

SPCの海域別経年推移についてみると (Table 1, Fig. 3), A海域では1967年 log 値で2.93, 1969年3.00, 1973年2.79, 1978年3.20と高い値を示し全期間の平均

値は 2.30 ± 0.21 を示した。傾向線で見ると、他の指標菌における推移と同様に、全期間では $\log y' = 2.297 + 0.001x^*$ と増大し、とくに前期10年では $\log y' = 1.664 + 0.153x^{**}$ と急速な増大を示し、後期15年では $\log y' = 2.509 - 0.031x$ と減少した。B海域では1966年 log 値で2.96, 1967年2.76, 1971年2.67, 1973年2.60を示し、全期間の平均値は 2.12 ± 0.20 を示した。傾向線で見ると、全期間ではA海域と異り $\log y' = 2.353 - 0.020x$ と減少を示し、前期10年では $\log y' = 1.836 + 0.097x^*$ と増大し、後期15年では $\log y' = 2.492 - 0.062x^*$ と減少を示した。C海域では、1966年 log 値で3.04, 1967年2.74, 1971年2.43, 1972年2.18を示し、全期間平均は 1.56 ± 0.26 を示した。傾向線では、全期間で $\log y' = 2.114 - 0.048x^*$, 後期15年で $\log y' = 1.911 - 0.078x^{**}$ と減少を示した。

D海域では、1963年 log 値で1.78, 1964年1.74, 1967年1.78と高い値を示したが、全期間で $\log y' = 1.518 - 0.042x^{**}$ と減少し、また前期10年においても他の海域と異なり $\log y' = 1.825 - 0.121x^{**}$ といずれの期間とも減少傾向を示した。E海域では、1963年 log 値で1.85, 1967年1.65, 1973年1.65を示し、全期間平均値は 0.99 ± 0.18 と低い値を示した。傾向線では、D海域と同様にA, B海域と異なり全ての期間で減少し、全期間では $\log y' = 1.439 - 0.039x^{**}$, 前期10年でも $\log y' = 1.751 - 0.111x^{**}$ と減少傾向を示した。

4 海域別汚染指標菌の分布消長とFC/TC比

A→E海域と汚染源(河口部)からの距離により、各指標菌がどのような分布・消長を示すかについて、Fig. 4に示した。各海域の値は、全期間の傾向線より求めた期間中間年次の計算値で示した。SPCでは、A→E海域になるに従い100ml当りの log 値で、4.3→4.1→3.6→3.0→2.9と減少を示すが、D, E海域での減少率は、

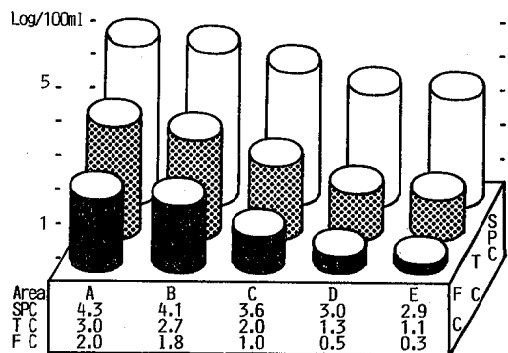


Fig. 4 Distributions of indicator organisms by designated areas in Hiroshima Bay.

TC, FCに比較し低い傾向を示した。TCについては、100ml当り log 値で 3.0→2.7→2.0→1.3→1.1と、河口からの距離により直線的に減少した。FCについても 100ml当り log 値で 2.0→1.8→1.0→0.5→0.3と減少し、特にC海域以遠では急速に減少し、E海域では測定限界レベルを示した。

FC/TC比については、A→E海域になるに従い 10.0%→12.6%→10.0%→16.0%→15.8%を示し、A～C海域では10～12%を示した。

考 察

広島湾の環境汚染調査は各種行われているが、1962年からの長期間にわたるものは少ない[5, 11]。著者らの今回の調査は、冬期における細菌学的調査ではあるが、広島湾河口部海域A～C(2～9 km)海域において、1969—1971年および1978—1980年に高い汚染を示し、前期10年では増大し、後期15年では漸減していることが明らかにされた。これは荒川[12]の広島湾の10年間(1963—1972年)における生物群集の遷移の報告で、1969年→1970年の期間、従来広島湾では認められなかったムカンウミドリムシ *Hemientreptia antiqua*、セウチアカシオヒゲムシ *Heterosigma inlandica* などの赤潮の頻発や、カサネカンザシ *Hydroides norvegica* の異常発生を報告しており、これら生物指標の富栄養化現象でみられる異常発生の推移とよく一致している。また環境庁[2]の瀬戸内海における赤潮の発生状況によると、瀬戸内海全体の赤潮発生は、1976年 326件/年、安芸灘では1974年 24件/年とピークを示している。広島湾では1960年から1965年では、河口部海域に限定していた赤潮発生も、1972年からは広島湾全体に拡大し、1975年から1979年は広島湾沖合までに拡大し、それ以後の発生範囲は縮小している。また広島県の資料[1]「瀬戸内海(広島県)に流入するCOD汚濁負荷量の推移」によると、汚濁の進行した1972年を100とした指数でみると、1975年→1985年は66.3→32.0に減少したと報告している。著者らの調査は、冬期における微生物を指標としたものであるが、他の環境汚染指標である付着生物、赤潮の発生、COD負荷量の推移等と良く一致していることが明らかにされた。

こうした汚染推移は、1970年水質汚濁防止法、海洋汚染防止法の制定や、1971年広島市内水域の環境基準に基づく類型指定と、常時監視体制の確立さらに「上乗せ排水基準を定める条例」(広島県)の制定、1972年内海し尿投棄廃止、1976年太田川流域下水道の整備発足、1978年CODに係る総量規制の実施等の汚染源対策等が効果を

示し、1971年以降汚染レベルが減少傾向を示したものと考えられる。

以上のように、広島湾における汚染指標菌の経年的推移は、漸減傾向を示しているが、A, B海域では依然としてカキ食中毒多発当時(1966年)の水準にあり、A海域のTC MPNは 10^3 、FC MPNでは 10^2 レベルにある。汚染指標菌と病原微生物出現との関連性については、多くの報告がある。橋本ら[13]は、海水においてTCが $10^3/100\text{ml}$ 以上の時、500 ml中の *Salmonella* の検出率は87.5%であったと報告し、Slanetz[14]らは、海水TC MPN 2,960、FC MPN 740以上の時、2 l中の *Salmonella* の分離率は17/19 (89.5%)、それ以下の場合には5/42 (11.9%)と報告している。また Van Donsel[15]らは、河口海水においてFC MPN 200以下の時、ゲーゼンボン法による *Salmonella* の分離率は33/258 (12.8%)、FC MPN 201—2,000の時40/90 (44.4%)、FC MPN 2,000以上の時45/75 (60.0%)であったと報告している。Labelle[16]らは、河口海水20 l当りのEnterovirusの分離を試み、FC MPN 4,600以上では30～528 PFUであるが、FC MPN 90以下の場合には0～7 PFUと少なく、また海底土でのFC MPN (X)とウイルス数(Y)は $Y=11.93+0.008X$ であったと報告している。著者[17]らも広島湾河口海水での病原大腸菌分布について、FC MPN 18以下の場合、海水55ml当り分離率は7.1%、しかしFC MPN 18以上の場合には23.7%と有意的に高まることを報告している。また著者[18]らは、これら海水中における指標菌は、そこに棲息するカキには43.1倍に濃縮されることを明らかにしている。以上のことからAおよびB海域で養殖生産されるカキについては、一層の木目細かな衛生対策が必要と考えられる。

次に海域汚染の拡散についてみると、河口部海域では、汚染源としての河川水は、淡水であることからクサビ現象的に海水上層部に移入し、漸次、潮流や潮の干満[19]、海水との温度差による上下循環[20]等により、希釈、拡散しているものと考えられる。さらに汚染指標菌は、物理的希釈、拡散と並行して、海水の殺菌作用[21-23]を受け死滅、減少を繰り返していると考えられる。今回の成績からは、FCではE海域(11～12 km)まで生残するが、測定感度レベルの極めて低濃度であり、TC, SPCでは、それ以遠においても長期間生残するものと考えられる。このことは、木村[24]の広島湾北部における淡水の移入と滞留についての報告で、淡水滞留日数(Y)は、淡水補給量(X)の関係で $Y=aX^{-b}$ で示され、河口部海域では $Y=41.2X^{-0.378}$ であると述べてい

ることから、太田川より75%の淡水移入を受ける広島湾北部の淡水滞留日数は、60~90日であると考えられることから、うなずける結果といえる。このように、広島湾における希釈・拡散度は、他の海域に比較して小さいと考えられるが、汚染指標菌の海水中での生残日数は、多くの報告〔21-23〕にみられるように短かく、Savege〔22〕らの報告によると、海水中でのTCの消長は、 $10^5 \rightarrow 10^2$ に9日間、FCでは $10^5 \rightarrow 10^2$ に6日間であったと述べている。著者〔25〕らもFCの海水中での生残性について検討し、 $10^6 \rightarrow 10^4$ に6日間を要したと報告している。以上は実験室内の人工条件下での報告であるが、自然条件下での報告としては、Canale〔26〕のトラバース湾におけるTCの拡散解析で $K=0.2+0.223T$ (T =温度, K =日⁻¹)であると報告がある。また著者〔25〕らは、降雨時の影響調査において、広島湾河口部海域でのTC、FCの1/10減少には7日間を要したと報告している。

以上の報告からも、河川水により湾内に移流した汚染指標菌は、海水による希釈、拡散と、その殺菌作用を受け急速に減少するものと考えられる。今回の検討結果から広島湾におけるTCは、AからE海域以遠まで広く分布生残するが、衛生指標菌として重視されるFCでは、A、B海域で高いレベルに分布するものの、C海域以遠では急速に減少すると言える。このことは、FCが他の指標菌に比較し海水中での死滅が速いことによると考えられる。

FC/TC比については、一般的には糞便の新鮮汚染や、下水道の未処理水の流入時に高い値を示すと考えられている。FC/TC比についての報告は、オハイオ州水質利用委員会〔27〕の河川水による報告で5~26%、Gallagher〔28〕のイギリスでの河川水で8.9~24%の報告がある。また著者〔18〕らも河口海水で8.9~11.5%と報告している。今回の結果ではA~E海域で10~16%を示し、河口から遠くなるに従いやや高くなる傾向を示したが、このことは、データ処理において測定感度以下の時、 <1.8 を1.8として処理したことと起因したものと考えられる。FCの1.8以下のデータが少ないA~C海域では、10~12%を示したことから、広島湾河口部海水のFC/TC比は10~12%と考えられる。

文 献

- 〔1〕 広島県環境保健部 (1982) : 環境行政のあゆみ. 73-247.
- 〔2〕 環境庁水質保全局 (1985) : 瀬戸内海の環境保全. 66-82.
- 〔3〕 持永泰輔 (1969) : 広島産生カキによる食中毒事件. モダンメディア, 15(2), 83-92.
- 〔4〕 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)
- 〔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). 311-316.
- 〔6〕 広島地方気象台 (1984) : 広島県の気象百年誌. 95, 広島, 日本気象協会広島支部.
- 〔7〕 建設省河川局 (1962-1985) : 太田川流量年表. 209-332, 社団法人日本河川協会.
- 〔8〕 American public health association (1962) : Recommended procedures for the examination of sea water and shellfish 4th ed., 17-51, New York, Publication office american health association, Inc.
- 〔9〕 伊藤樹史 (1984) : マイクロコンピュータプログラムによる医学統計の方法. 214-225, 東京, 医学書院.
- 〔10〕 S.W. ヘプラー著, 小原禎司訳 (1979) : 統計分析プログラム集. 12・1-13・10, 東京, 工学図書株式会社.
- 〔11〕 広島県環境センター (1971-1985) : 公共用水域の水質検査結果 (年報).
- 〔12〕 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. 日仏海洋学会誌, 11, 103-108.
- 〔13〕 橋本秀夫, 川上英之, 村田昌芳他 (1978) : 海水のサルモネラ汚染ならびに汚染指標菌に関する研究. 広島大学水畜産学部研究報告, 15, 207-218.
- 〔14〕 Slanetz, L.W., Bartley, C.D. and Stanley, K.W. (1968) : Coliforms, fecal streptococci and Salmonella in seawater and shellfish. Shellfish, 5, 66-78.
- 〔15〕 Van Donsel, D.J. and Geldreich, E.E. (1971) : Relationships of Salmonella to coliforms in bottom sediments. Water research, 5, 1079-1087.
- 〔16〕 Labelle, R.L., Gerba, C.P., Goyal, S.M. and Melnick, J.L. et al. (1980) : Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol., 39, 588-596.
- 〔17〕 小川博美, 得能弘志, 佐々木実己子, 岸本敬之 (1980) : カキ生育環境における病原大腸菌の分布.

- 食衛誌, 21, 5—12.
- [18] 小川博美, 岸本敬之, 得能弘志, 佐々木実己子, 福田伸治 (1986): カキ養殖海水とカキにおける大腸菌群MPNと糞便性大腸菌群MPNの相関性. 食品と微生物, 3, 87—94.
- [19] 楠木 豊 (1977): 広島湾北部の潮流. 広島県水産試験場研究報告, 9, 1—10.
- [20] 橋本俊将 (1979): 広島湾周辺水域における海水の成層状況とその要因. 広島県水産試験場研究報告, 10, 1—14.
- [21] Mcffeters, G.A. and Stuart, D.G. (1972): Survival of coliform bacteria in natural waters. *Appl. Microbiol.*, 24, 805—811.
- [22] Savage, H.P. and Hanea, N.B. (1970): Toxicity of seawater to coliform bacteria. *Journal WPCF.*, 43, 854—861.
- [23] Harremoes, P. (1970): Field determination of bacterial disappearance in seawater. *Water Research*, 4, 737—749.
- [24] 木村知博 (1975): 広島湾海域に流入する淡水の移流について. 水産増殖, 22, 110—119.
- [25] 小川博美, 得能弘志, 佐々木実己子, 岸本敬之 (1976): カキ食中毒に関する実験的検討. 広島県衛生研究所・公害研究所研究報告, 23, 9—17.
- [26] Canele, R.P. (1973): Model of coliform bacteria in Grand Traverse bay. *Journal WPCF.*, 45, 2358—2371.
- [27] ORSANCO Water Users Committee (1971): Total coliform: Fecal coliform ratio for evaluation of raw water bacterial quality. *Journal WPCF.*, 43, 630—640.
- [28] Gallagher, T.P. and Spino, D.F. (1968): The significance of numbers of coliform bacteria as an indicator of enteric pathogens. *Water Research*, 2, 9—17.

Stevia rebaudiana 葉中の非甘味性配糖体について

松尾 健* 金森久幸* 坂本征則*

Non-sweet Glucosides in the leaves of *Stevia rebaudiana*

TAKESHI MATSUO, HISAYUKI KANAMORI
AND IKUNORI SAKAMOTO

(Received Oct. 31, 1986)

Two steroid glucosides and a flavonoid glucoside were isolated from the leaves of *Stevia rebaudiana*. These structures were elucidated using field desorption mass spectrometry (FD-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR), as stigmasterol- β -D-glucoside, β -sitosterol- β -D-glucoside and apigenin 7-O- β -D-glucoside (cosmosiin).

Key words: *Stevia rebaudiana*, FD-MS, NMR, stigmasterol- β -D-glucoside, β -sitosterol- β -D-glucoside, apigenin 7-O- β -D-glucoside.

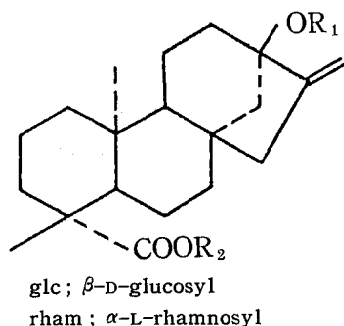
南米パラグアイ原産のキク科植物 *Stevia rebaudiana* の葉 (ステビア) は、強い甘味を示すことが古くから知られている。近年、合成甘味料の有害性、シヨ糖の取り過ぎと言う問題から、ステビアの甘味成分は、低カロリーの天然甘味料として、清涼飲料水等の食品に広く利用されている。

ステビアの甘味成分としては、主成分 stevioside および微量成分 steviolbioside が知られていたが [1], その後、精製した stevioside より粗配糖体のままの方が甘味の質が良好であることから、改めて甘味成分の検

索が行われ、神田らは rebaudioside-A [2] を、次いで、我々は rebaudioside-C [3], -D, -E [4] の3種の新甘味配糖体を単離し構造を明らかにした。

一方、小林らは dulcoside-A, -B と命名した2種の化合物を単離構造決定しているが [5], このうち-Bは我々の-Cと同一物質である (Chart 1)。

これら甘味配糖体の総量と粗配糖体量とに差があることが、ステビアから甘味配糖体を抽出、精製している県内企業によって指摘され、他の配糖体の存在が示唆されていた。そこで、我々は再度ステビアの成分検索を行



	R ₁	R ₂
stevioside	glc ² -glc	glc
steviolbioside	glc ² -glc	H
rebaudioside-A	glc ³ < glc glc	glc
dulcoside-A	glc ² -rham	glc
rebaudioside-C (dulcoside-B)	glc ³ < rham glc	glc
rebaudioside-D	glc ³ < glc glc	glc ² -glc
rebaudioside-E	glc ² -glc	glc ² -glc

Chart 1

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

い、配糖体画分から2種の結晶を得、これらの構造を明らかにしたので報告する。

乾燥ステビアをメタノールで抽出し、実験の部に記載した処理法により、配糖体画分からI、IIと仮称する化合物を得た。

Iは無色針状晶で、薄層クロマトグラム(TLC)上硫酸(噴霧後加熱)による発色で暗赤色のスポット(R_f : 0.79)を示した(Fig. 1)。

電界脱離型質量分析(FD-MS)スペクトルで、 m/z 597に $[M+Na]^+$ 、613に $[M+K]^+$ および599に $[M+Na]^+$ 、615に $[M+K]^+$ に帰属できるピークが認められることから、Iは分子量574と576の化合物の混合物と

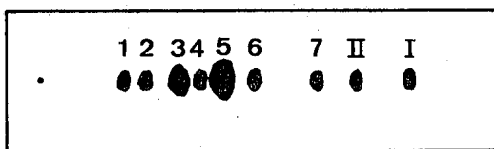


Fig. 1. Thin Layer Chromatogram of I, II and Sweet Glycosides in *Stevia rebaudiana*.

1: rebaudioside-D, 2: rebaudioside-E, 3: rebaudioside-A, 4: rebaudioside-C, 5: stevioside, 6: dulcoside-A; 7: steviolbioside. Plate: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), Solvent: CHCl₃-MeOH-H₂O (15: 6: 1, lower), Detection: H₂SO₄.

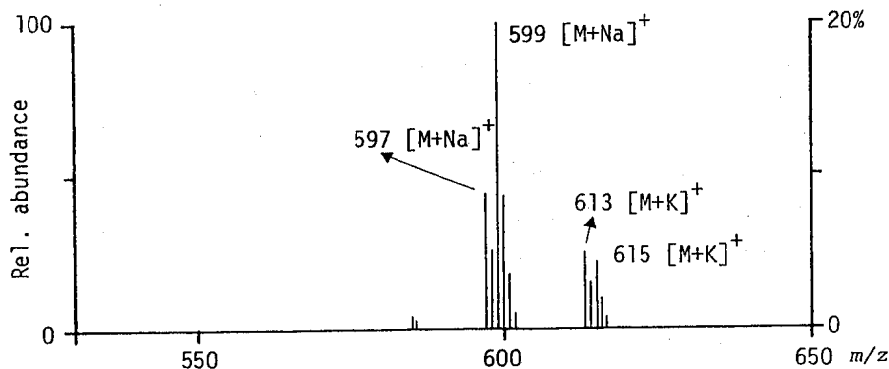


Fig. 2. Field Desorption Mass Spectrum of I.

Emitter: Silicone emitter, Emitter current: 0~27 mA, Cathode voltage: 6 kV, Acceleration voltage: 3 kV, Scan speed: 10 sec.

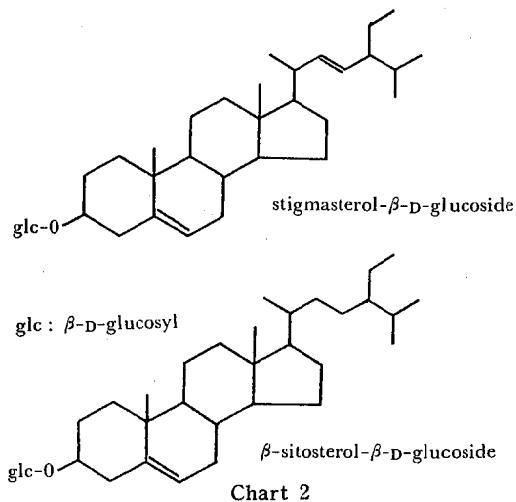
考えられた(Fig. 2)。

¹³C-核磁気共鳴(¹³C-NMR)スペクトルでは、50-20 ppmにトリテルペンに由来すると思われるシグナルが認められるが、これらのシグナルの帰属は困難であった。しかし、12.1および12.0 ppmに認められる2本のシグナルを、ステロール化合物に特徴的な18位のメチル基のシグナル[6]に、それぞれ帰属し、Iを2種のステロール化合物の混合物と考えた。また、糖に由来するシグナルが102.6(d), 78.6(d), 78.2(d), 75.3(d), 71.7(d), 62.8(t) ppmに6本観察された。これらのシグナルは、2種のステロール化合物に、同一の6炭糖が非常によく似た環境で結合しているため、6本のピークとなったものと考えられ、これらをD-グルコースの1, 3, 5, 2, 4, 6位の炭素に帰属した。

さらに、Iを1%硫酸/エタノール-水(1:1)で加水分解後、ガスクロマトグラフィー(GC)及びガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー(GC-MS)により、アグリコンをstigmasterolとβ-sitosterol、

GCにより糖をD-グルコースと確認した。

¹H-NMRスペクトルで、D-グルコースのアノマープロトンに基づくシグナルが5.04 ppm (結合定数(J)=



6.5Hz)に認められ、このシグナルも、2個のD-グルコースのアノマープロトンのシグナルが重なったものと考えられ、D-グルコースの結合配位は共にβ結合と結論された。

これらの結果から、2種のステロール配糖体の構造を *stigmasterol-β-D-glucoside* と *β-sitosterol-β-D-glucoside* と同定した (Chart 2)。

IIは mp 227–229°C, $[\alpha]_D^{26}$ -96° の黄色針状晶で、TLC (Fig. 1) 上硫酸 (噴霧後加熱) による発色で黄色のスポット (*R_f*: 0.68) を、赤外吸収 (IR) スペクトルで、3400, 1650, 1600 cm^{-1} に水酸基, カルボニル基, ベンゼン環に基づく吸収を示した。また、紫外吸収

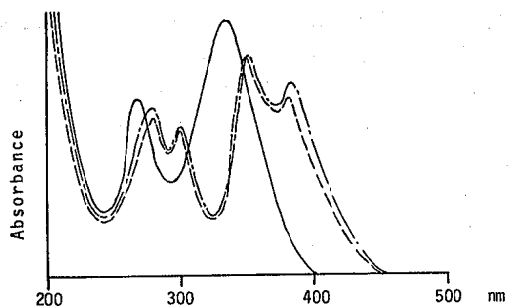


Fig. 3. Ultraviolet Absorption Spectra of II. (—): MeOH (1), (---): MeOH + AlCl₃ (2), (·····): MeOH + AlCl₃ + HCl (3).

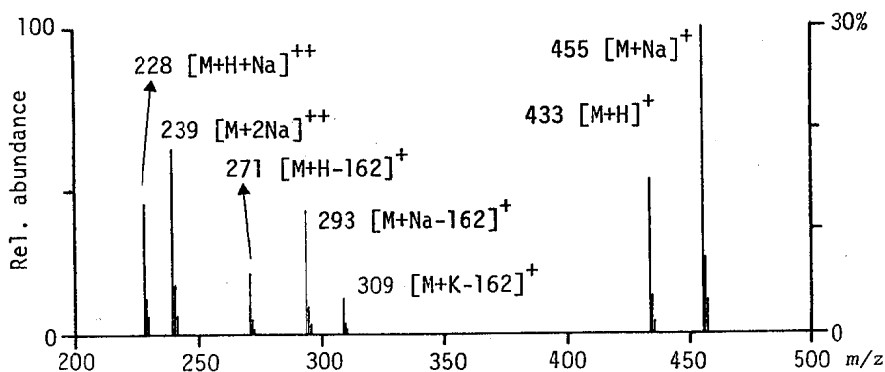


Fig. 4. Field Desorption Mass Spectrum of II.

Emitter: Silicone emitter, Emitter current: 0~27 mA, Cathode voltage: 6 kv, Acceleration voltage: 3 kV, Scan speed: 10 sec.

(UV) スペクトルを Fig. 3 に示したが、スペクトル(1)で 268, 333nm に極大吸収が認められ、シフト化剤の塩化アルミニウムを添加したスペクトル(2)で、(1)のスペクトルが深色移動することから、IIはフラボン系の化合物と考えられた [7]。さらに塩酸を加えたスペクトル(3)で、350–400 nm の吸収にシフトが認められないこと、および ¹³C-NMR スペクトルの帰属結果 (Table I) から、C-4' 位に水酸基が結合していると予想された [7]。

FD-MS スペクトル (Fig. 4) では、*m/z* 455, 433, 239, 239, 228 に分子イオンに関連する $[M+Na]^+$, $[M+H]^+$, $[M+2Na]^{++}$, $[M+H+Na]^{++}$ のピークおよび 309, 293, 271 に糖の脱離した $[M+K-162]^+$, $[M+Na-162]^+$, $[M+H-162]^+$ のピークが認められることから、IIは分子量 432 で、6炭糖 1個が結合する配糖体と考えられた。

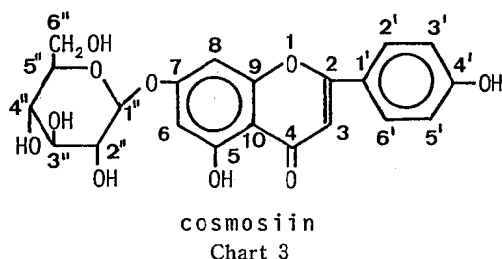
IIを 1%硫酸/エタノール-水 (1:1) で加水分解後、GC により、この 6炭糖を D-グルコースと確認した。さらに、IIの ¹³C-NMR スペクトルを Table I に示す

TABLE I. ¹³C-NMR Chemical Shifts of II (in DMSO-*d*₆)

	Carbon No.	ppm
Aglycone moiety	2	164.2(s)
	3	103.0(d)
	4	181.8(s)
	5	161.2(s)
	6	99.5(d)
	7	162.8(s)
	8	94.7(d)
	9	156.8(s)
	10	105.2(s)
	1'	120.9(s)
2'	128.5(d)	
3'	115.9(d)	
4'	161.0(s)	
5'	115.9(d)	
6'	128.5(d)	
Glucose moiety	1''	99.8(d)
	2''	73.0(d)
	3''	77.0(d)
	4''	69.5(d)
	5''	76.3(d)
	6''	60.5(t)

s: singlet, d: doublet, t: triplet.

ように帰属し, apigenin 7-O-β-D-glucoside (cosmosiin) と推定した. このスペクトルデータおよび他の物理恒数を, cosmosiin の文献記載のデータ [8][9] と比較したところ, すべて一致したので, II を cosmosiin と同定した (Chart 3).



今回得られた3種の配糖体は, これまでにステビアから得られている配糖体とは異なり甘味を示さないが, 甘味配糖体総量と総配糖体量との差の一部を明らかにすることができたものと思われる.

実験の部

融点は微量融点測定器 (柳本) で測定し, 未補正值である. 旋光度は日本分光 D I P-360型を, UVスペクトルは日立 557型を使用し, 共に MeOH 溶液として測定した. IRスペクトルは日本分光 A-202型を使用し, KBr錠として測定した. GC-M/Sは柳本 G-2800を連結した日本電子 J M S D-300型および J M A-2000データ処理システムを用いて行った. FD-M/Sスペクトルは, silicone emitter を用いて, 加速電圧 3 kV, 陰極電圧 6 kV, エミッター電流 0~27 mA, スキャンスピード 10 sec の条件で測定した. ¹H-NMR スペクトル, ¹³C-NMR スペクトルは日本電子 F X-100型を用い, 共に tetramethylsilane を内部標準として測定し, ケミカルシフトは δ 値 (ppm) で表し, 多重度については s: singlet, d: doublet, t: triplet とした. GCには柳本 G-2800 (水素炎イオン化検出器) を用いた. 薄層クロマトグラフィーはプレートに Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), 展開溶媒に CHCl₃-MeOH-H₂O (15:6:1, 下層) を用いて行い, 発色には 10% H₂SO₄ (噴霧後加熱) を使用した. シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Kieselgel 60 (70-230 mesh, Merck) を用いた.

抽出・分離・精製

乾燥ステビア 220g を 2ℓ の MeOH で熱時 3回抽出し, 減圧下 MeOH を留去して MeOH エキス 66g を得た. これを H₂O 200ml に懸濁し Et₂O 100ml で3回脱脂後, 1-BuOH (水飽和) 100ml で5回抽出した. 減圧下

1-BuOH を完全に留去して粗配糖体画分 59g を得た. この画分を MeOH から再結晶し, stevioside (10.9g) を得たのち, 母液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH=9:1) に付し, TLC (Fig. 1) 上のスポットを指標として, I を主成分とする画分 (Fr. 1) と II を主成分とする画分 (Fr. 2) を得た. それぞれの画分を減圧下溶媒を留去し, Fr. 1 を EtOH から再結晶を行い, I (無色針状晶, 収量: 30mg, 収率: 0.014%) を, Fr. 2 を MeOH から再結晶を行い, II (黄色針状晶, 収量: 35mg, 収率: 0.016%) を得た.

I の酸加水分解

I (2mg) に 1% H₂SO₄/EtOH-H₂O (1:1) 2ml を加えて 3時間加熱還流した. 冷後, 反応液に H₂O 5ml を加えて減圧下 EtOH を留去したのち Et₂O 10ml で2回抽出した. この Et₂O 画分を GC および GC-M/S の試料とした.

GC条件; カラム: 1.5% S E-30 (Anakrom Q, 90-100 mesh, 3mm i.d.×1.5m). カラム温度: 240°C. 注入口, 検出器温度: 260°C. キャリアーガス N₂: 30 ml/min.

GC-M/S条件; カラム: 1.5% S E-30 (Anakrom Q, 90-100 mesh, 3mm i.d.×1.5m). カラム温度: 200°C. キャリアーガス He: 20 ml/min. イオン化電圧: 70 eV. イオン化電流: 300 μA. イオン源温度: 210°C.

Et₂O 抽出後の水溶性画分を Amberlite MB-3 カラムに通じて糖画分を得た. この画分を蒸発乾固したのち, N-trimethylsilylimidazole を用いて TMS 化を行った. つづいて反応液に少量の H₂O を加えて過剰の N-trimethylsilylimidazole を分解したのち, hexane 2 ml で抽出した. この抽出液を GC の試料とした.

GC条件; カラム: 2% S E-52 (Anakrom Q, 100-120 mesh, 3mm i.d.×0.75m). カラム温度: 195°C. 注入口, 検出器温度: 230°C. キャリアーガス N₂: 25 ml/min.

II の性状

黄色針状晶. mp 227-229°C (MeOH). $[\alpha]_D^{26} = -96^\circ$ (c=0.2, MeOH). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3400, 1650, 1600, 1490, 1440, 1170, 830. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} \text{nm} (\log \epsilon)$: 268 (4.35), 333 (4.38). $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}+\text{AlCl}_3} \text{nm}$: 275, 299, 346, 384. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}+\text{AlCl}_3+\text{HCl}} \text{nm}$: 276, 299, 342, 382. FD-M/S m/z: 455 ([M+Na]⁺), 433 ([M+H]⁺), 309 ([M+K-162]⁺), 293 ([M+Na-162]⁺), 271 ([M+H-162]⁺), 239 ([M+2Na]⁺⁺), 228 ([M+H+Na]⁺⁺).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.96 (2H, d, $J=8.0$, 2'-, 6'-H), 6.94 (2H, d, $J=8.0$, 3'-, 5'-H), 6.85 (1H, d, $J=3.0$, 8-H), 6.83 (1H, d, $J=3.0$, 6-H), 6.45 (1H, s, $J=3.0$, 3-H). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 181.8 (s, C-4), 164.2 (s, C-2), 162.8 (s, C-7), 161.2 (s, C-5), 161.0 (s, C-4'), 156.8 (s, C-9), 128.5 (d, C-2', C-6'), 120.9 (s, C-1'), 115.9 (d, C-3', C-5'), 105.2 (s, C-10), 103.0 (d, C-3), 99.8 (d, C-1''), 99.5 (d, C-6), 94.7 (d, C-8), 77.0 (d, C-3''), 76.3 (d, C-5''), 73.0 (d, C-2''), 69.5 (d, C-4''), 60.5 (t, C-6'').

IIの酸加水分解

II (2mg) に 1% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}-\text{H}_2\text{O}$ (1:1) 2ml を加えて 2時間加熱還流した。以後の操作を I の酸加水分解の項に記載した方法で処理し, hexane 抽出液を GC (I の場合と同一条件) の試料とした。

本稿を終えるにあたり, NMR スペクトルを測定して頂き種々の助言を賜りました広島大学医学部総合薬学科笠井良次助教授に深謝する。

文 献

- [1] E. Mosettig, U. Beglinger, F. Dolder, H. Lichti, P. Quitt and J.A. Waters: *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2305 (1963). およびその引用文献.
- [2] H. Kohda, R. Kasai, K. Yamasaki, K. Murakami and O. Tanaka: *Phytochemistry*, **15**, 981 (1976).
- [3] I. Sakamoto, K. Yamasaki and O. Tanaka: *Chem. Pharm. Bull.*, **25** 844 (1977).
- [4] I. Sakamoto, K. Yamasaki and O. Tanaka: *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3437 (1977).
- [5] M. Kobayashi, S. Horikawa, I.H. Degrandi, J. Ueno and H. Mitsuhashi: *Phytochemistry*, **16**, 1405 (1977).
- [6] R.J. Abraham, P. Loftus 著, 竹内敬人訳: ^1H および ^{13}C NMR 概説, 化学同人, 京都 (1984), p. 181.
- [7] K.R. Markham: *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, New York, (1982), p. 36.
- [8] N. Tanaka, T. Murakami, Y. Saiki, C.M. Chen and L.D. Gomez P: *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3455 (1981).
- [9] H. Itokawa, K. Suto and K. Takeya: *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 254 (1981).
- [1] E. Mosettig, U. Beglinger, F. Dolder, H. Lichti, P. Quitt and J.A. Waters: *J. Am.*

1980年—1985年広島県において分離された B型インフルエンザウイルスの抗原分析

妹 尾 正 登* 高 尾 信 一*
瀬 川 和 幸* 武 井 直 己*

Antigen Analysis of the Influenza Virus Type B Strains Isolated in Hiroshima Prefecture from 1980 to 1985

MASATO SENO*, SHINICHI TAKAO*, KAZUYUKI SEGAWA*
AND NAOMI TAKEI*

(Received Oct. 31, 1986)

緒 言

インフルエンザはしばしば大きな流行をひきおこし、単に多くの患者が発生するというだけでなく、超過死亡の原因ともなっている〔1-3〕。したがってその防あつは大きな課題であるが、その多くはワクチンに頼っているのが現状である。インフルエンザワクチンの接種が我国では相当広範囲に実施されているにもかかわらず、その効果は必ずしも十分あがっているとは言えず、今日でもインフルエンザはコントロールされ難い疾患の一つとなっている。その大きな原因としてインフルエンザウイルスが抗原変異〔4-10〕をおこしやすいためと考えられている。そのため流行例からの分離株について精力的に抗原分析がなされているが、なお変異するウイルスの後追いの結果となっている。

しかしながら、変異の跡を明らかにすることは次の変異を知る上で重要なステップであるのでその努力は続けられる必要があるものと考えられる。著者らは1980年～1985年間のB型インフルエンザウイルスの分離株の内の8株について、交差HI試験およびその内の2株については交差吸収HI試験をも実施し、抗原分析を行ったのでその成績について報告する。

材料および方法

1. ウイルス分離

滅菌綿棒で咽頭後壁および扁桃腺部分をぬぐい、Penicillin 200単位/ml, Streptomycin 200mcg/ml 加 Veal Infusion Broth (Difco) に綿棒を入れ検体とした。これを3000 r. p. m. 30分遠心後上清を接種材料とした。発育鶏卵(10日卵)の羊膜腔および漿尿膜腔内に各0.1 ml 接種し、34°C 3日間培養、4°C に1夜放置後羊水と漿尿液を別々に採取し、0.5%ニワトリ赤血球液での凝集能(HA)によりウイルスの有無を判定した。HA陰性の場合にはさらに次代に継代し同様に試み、3代まで盲継代した。

MDCK細胞による分離は根路銘〔11〕の方法に準じて行ったが、維持液はDulbecco変法培地を用いた。すなわち、24穴のマルチディッシュのMonolayerに0.2 ml/well 接種し、CPEを観察しつつ、34°C培養を行った。0.5%ニワトリ赤血球液によるHAの有無を判定し、HA陰性の場合には3代まで盲継代した。

2. 抗原分析供試ウイルス

1) 原型株

B/Kanagawa/3/76株(K/3/76), B/Singapore/222/79株(S/222/79), B/Norway/1/84株(N/1/84), B/USSR/100/84株(U/100/84)の4株を用いた。

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

2) 分離株

分離株のうち, B/Hiroshima/48/80株 (H/48/80), B/Hiroshima/1/82株 (H/1/82), B/Hiroshima/5/82株 (H/5/82), B/Hiroshima/3/83株 (H/3/83), B/Hiroshima/4/83株 (H/4/83), B/Hiroshima/17/84株 (H/17/84), B/Hiroshima/1/85株 (H/1/85), B/Hiroshima/6/85株 (H/6/85) の計 8 株を供試した。

3. 免疫血清の作成

感染漿尿液を分別遠心〔12〕にて部分精製後, 白ウサギ耳静脈内接種で4週3回免疫を行い免疫血清を得た。免疫血清はさらに中村ら〔13〕の方法に準じて硫酸で塩析を行い, 部分精製したものを免疫血清として用いた〔14, 15〕。

4. 赤血球凝集抑制 (HI) 試験

免疫血清は常法通りRDE (武田薬品工業製) 処理およびニワトリ赤血球による吸収を行った。HI試験はすべてマイクロタイター法〔16〕で行った。

まず各免疫血清のHI価を求め, 交差HI試験 (抗原分析) においては対応抗原に対するHI価が1:512になるよう調整して用いた。血清希釈は1:32から始めた。

交差吸収HI試験用免疫血清は上記同様に処理したものの, 上記3で得た部分精製ウイルスを用いHI価で4倍以上の過剰の吸収ウイルスを加え1夜4°Cに放置した後, ニワトリ赤血球を用いてウイルスを吸収し, HA試験により残存ウイルスのないことを確認して用いた〔7, 17-19〕。

結 果

1. ウイルス分離状況および抗原分析供試株

1980年から1985年までのインフルエンザウイルスの分離状況および供試株を Table 1 に示した。

1980年, 1981年ともに冬期にはA型 (H1N1とH3N2およびH1N1) ウイルスによる流行であったが, 兩年とも5月に1株ずつB型ウイルスが分離された。1982年初頭のインフルエンザの流行例からはB型ウイルスが, 1982年末から1983年にかけての冬期の流行例からはA型ウイルス (H3N2) が分離されたが, 3月に入ってB型ウイルスが2株分離された。1984年1月はA型インフルエンザ (H1N1) の流行であったが, その年の12月から1985年の冬期にかけてはB型ウイルスが多数分離された。1985年11月, 12月には再びA型ウイルス (H3N2) の流行がみられた。

2. 交差HI試験

Table 2 に分離株 8 株と原型株 4 株計12株の交差HI試験の結果を示した。H/17/84のみ同抗原に対するHI価が1:256であった。

供試原型株 4 株を見ると, K/3/76とS/222/79, S/222/79とN/1/84, S/222/79とU/100/84, N/1/84とU/100/84は互いによく交差がみられた。しかし, 抗K/3/76血清はN/1/84, U/100/84に対してHI価1:128と2管差があった。逆に, 抗N/1/84血清, 抗U/100/84血清に対してK/3/76は, HI価1:512を示しその間に差は認められなかった。

TABLE 1. Influenza viruses isolated in Hiroshima Prefecture from 1980 to 1985

Year	Month	Type	No. of isolates	Strains used for antigen analysis
1980	1—2	A(H1N1)	22	B/Hiroshima/48/80
	2—3	A(H3N2)	25	
	5	B	1	
1981	1—2	A(H1N1)	14	
	5	B	1	
1982	1—2	B	15	B/Hiroshima/1/82, B/Hiroshima/5/82
	11—12	A(H3N2)	18	
1983	1	A(H3N2)	2	B/Hiroshima/3/83, B/Hiroshima/4/83
	3	B	2	
1984	1	A(H1N1)	14	B/Hiroshima/17/84
	12	B	7	
1985	1—2	B	11	B/Hiroshima/1/85, B/Hiroshima/6/85
	11—12	A(H3N2)	31	

TABLE 2. Cross HI test (antigen analysis) of influenza virus strains

Antigens	Antiserum											
	B/Kanagawa/3/76	B/Singapore/222/79	B/Norway/1/84	B/USSR/100/84	B/Hiroshima/48/80	B/Hiroshima/1/82	B/Hiroshima/5/82	B/Hiroshima/3/83	B/Hiroshima/4/83	B/Hiroshima/17/84	B/Hiroshima/1/85	B/Hiroshima/6/85
B/Kanagawa/3/76	512	512	512	512	128	512	128	512	2048	128	512	512
B/Singapore/222/79	256	512	512	512	128	512	256	256	2048	128	256	256
B/Norway/1/84	128	256	512	256	128	256	512	128	256	64	128	128
B/USSR/100/84	128	256	512	512	128	512	128	128	256	64	256	256
B/Hiroshima/48/80	256	1024	1024	1024	512	1024	1024	512	1024	256	512	512
B/Hiroshima/1/82	128	256	512	512	128	512	256	128	512	64	128	256
B/Hiroshima/5/82	128	512	512	512	256	512	512	128	512	64	256	256
B/Hiroshima/3/83	256	256	512	256	64	256	32	512	1024	128	256	256
B/Hiroshima/4/83	256	256	256	256	64	128	32	512	512	64	128	128
B/Hiroshima/17/84	64	64	128	128	<	128	<	64	256	256	128	256
B/Hiroshima/1/85	256	128	256	128	64	256	<	128	1024	512	512	512
B/Hiroshima/6/85	64	64	256	128	<	128	<	64	256	256	256	512

< : <32

原型株と分離株間では、抗H/48/80血清は原型株に対してすべて 1 : 128を示した。

H/1/82, H/5/82はS/222/79およびN/1/84と相互に差がなく、またH/1/82はU/100/84とも 1 : 512を示した。しかし、抗K/3/76血清とは両株共に 1 : 128であった。

抗H/3/83血清はN/1/84とU/100/84には 1 : 128で2管差が認められたが、H/4/83は供試原型株すべてとよく交差した。

H/17/84, H/1/85およびH/6/85の3株のうち、H/1/85のみK/3/76と 1 : 512のHI価を示したが、他の2株は原型株とは2管あるいは3管差を示す場合が多かった。

分離株間ではH/48/80とH/5/82, H/5/82とH/1/82, H/3/83とH/4/83, H/17/84とH/6/85, およびH/1/85とH/6/85の各株間で強い交差がみられ、それ以外では弱かった。

3. 交差吸収試験

H/5/82, H/1/85および原型株の4株を加えた交差吸収HI試験の成績をTable 3に示した。

原型株間では各抗血清をS/222/79で吸収した場合各抗血清共によく吸収されたが、K/3/76での吸収では抗N/1/84血清および抗U/100/84血清に、N/1/84または

U/100/84で吸収した場合は抗K/3/76血清および抗S/222/79血清にそれぞれ未吸収部分の残存が認められた。

H/5/82およびH/1/85の分離株でこれら原型株抗血清を吸収した場合、両分離株では結果が異っていた。すなわち、H/5/82で吸収した場合、いずれの原型株抗血清もよく吸収されたが、H/1/85で吸収した場合にはいずれもかなりの未吸収部分が認められた。

抗H/5/82血清および抗H/1/85血清をK/3/76またはU/100/84で吸収した場合、両者に未吸収部分が認められた。また、S/222/79での吸収では抗H/5/82血清に、N/1/84での吸収では抗H/1/85血清にそれぞれ未吸収部分が残ったが、H/5/82で吸収した場合、抗H/1/85血清はよく吸収された。H/1/85で抗H/5/82血清を吸収した場合、ほとんど吸収されなかった。

考 察

本実験に供試した分離株は、Table 1に示した如く、H/48/80, H/3/83およびH/4/83は、A型インフルエンザ流行の後に分離された散発事例の株であり、H/1/82とH/5/82は1982年1月～2月にかけての流行、H/17/84, H/1/85およびH/6/85は1984年12月～1985年2月にかけてのB型インフルエンザ流行事例からの分離株であった。

TABLE 3. Results of cross absorbing HI test

Absorbing antigens	B/Kanagawa/3/76					B/Singapore/222/79					B/Norway/1/84							
Antisera	B/Kanagawa/3/76	B/Singapore/222/79	B/Norway/1/84	B/USSR/100/84	B/Hiroshima/5/82	B/Hiroshima/1/85	B/Kanagawa/3/76	B/Singapore/222/79	B/Norway/1/84	B/USSR/100/84	B/Hiroshima/5/82	B/Hiroshima/1/85	B/Kanagawa/3/76	B/Singapore/222/79	B/Norway/1/84	B/USSR/100/84	B/Hiroshima/5/82	B/Hiroshima/1/85
B/Kanagawa/3/76	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	64	32	<	<	<	64
B/Singapore/222/79	<	<	<	32	32	<	<	<	<	<	<	<	32	64	<	<	<	32
B/Norway/1/84	<	<	64	32	128	<	<	<	32	64	<	<	<	<	<	<	<	<
B/USSR/100/84	<	<	<	64	32	<	<	<	32	<	<	<	<	<	<	32	<	<
B/Hiroshima/5/82	<	<	64	<	128	<	<	32	<	128	<	<	<	<	<	<	<	<
B/Hiroshima/1/85	<	<	<	<	<	64	<	<	<	<	32	<	<	<	<	<	<	64

Absorbing antigens	B/USSR/100/84					B/Hiroshima/5/82					B/Hiroshima/1/85							
Antisera	B/Kanagawa/3/76	B/Singapore/222/79	B/Norway/1/84	B/USSR/100/84	B/Hiroshima/5/82	B/Hiroshima/1/85	B/Kanagawa/3/76	B/Singapore/222/79	B/Norway/1/84	B/USSR/100/84	B/Hiroshima/5/82	B/Hiroshima/1/85	B/Kanagawa/3/76	B/Singapore/222/79	B/Norway/1/84	B/USSR/100/84	B/Hiroshima/5/82	B/Hiroshima/1/85
B/Kanagawa/3/76	64	32	<	<	<	64	32	<	<	<	<	<	64	256	256	256	64	<
B/Singapore/222/79	32	64	<	<	<	32	<	32	<	<	<	<	64	512	256	256	256	<
B/Norway/1/84	<	<	32	<	64	<	<	<	<	<	<	<	32	128	256	128	256	<
B/USSR/100/84	<	<	<	<	<	<	<	<	32	<	<	<	32	128	256	512	64	<
B/Hiroshima/5/82	<	<	32	<	128	<	<	<	<	<	<	<	32	256	512	256	512	<
B/Hiroshima/1/85	<	<	<	<	<	64	<	<	<	<	32	<	<	<	<	<	<	<

< : <32

これらの供試分離株の抗原分析に当って、まず供試原型株についてみると、K/3/76とS/222/79の2株は交差HIで差がみられず、また交差吸収でも相互によく吸収されている。しかし抗K/3/76血清と抗S/222/79血清のN/1/84およびU/100/84両株に対する交差HIをみると、両者間には若干の差が見られるので、K/3/76とS/222/79は抗原的に近似しているものの、やや異なる部分があるものと思われる。S/222/79、N/1/84およびU/100/84の3株は、交差HI試験では強い交差がみられる。しかし交差吸収でみると、抗N/1/84血清および抗U/100/84血清をS/222/79で吸収した場合はよく吸収されているが、抗S/222/79血清をN/1/84またはU/100/84で吸収した場合、いずれも未吸収部分が残存しており、S/222/79とN/1/84、S/222/79とU/100/84間で

は抗原的に若干の差があると考えられる。しかし、N/1/84とU/100/842株間の交差吸収ではいずれもよく吸収されており、N/1/84とU/100/84に差は見出せなかった。一方、K/3/76とN/1/84およびU/100/84との関係を交差HIでみると、抗K/3/76血清とN/1/84およびU/100/84間ではHI価は1:128、その逆の場合では1:512であってその間に2管差が認められた。交差吸収ではK/3/76とN/1/84間、K/3/76とU/100/84間には未吸収部分があり、これらの株間には差があると思われる。

以上を総合すると、原型株4株の関係は抗原的に、N/1/84とU/100/84は非常に近く、これら2者とK/3/76とはかなり隔りがあると思われる。S/222/79はK/3/76に近いもののN/1/84およびU/100/84には、K/3/

76よりは近い関係にあることが強く示唆された。これらのことは山地〔20〕、武内ら〔21〕のフェレットを用いた抗原分析の成績ともよく一致している。

次に分離株と原型株との関係についてみるとH/48/80、H/1/82およびH/5/82の3株は、抗K/3/76血清間とは1:256ないし1:128のHI価であるが、H/3/83とH/4/83の2株はK/3/76と相互に高いHI価を示し、互いに近い関係が認められる。H/17/84、H/1/85およびH/6/85の3株ではH/1/85にK/3/76と相互に交差が認められるが、交差吸収では相互に未吸収部分を残しており、H/1/85とK/3/76とはやや差があることが伺われ、この3株は元来K/3/76とは2~3管差があるものと考えても差支えないものと思われる。またこの3株はS/222/79、N/1/84およびU/100/84のいずれとも交差の程度は弱いことから、H/17/84とH/1/85に若干の差が認められるものの、供試原型株とは若干抗原的に差のある株であり、1984年12月~1985年2月にかけてのB型インフルエンザの流行は、これらのウイルスによるものと推察される。

分離株間の関係については交差HIから、H/48/80とH/5/82、H/1/82とH/5/82、H/3/83とH/4/83、H/17/84とH/6/85およびH/1/85とH/6/85の各株はよく一致していることから、分離株はH/48/80、H/1/82およびH/5/82、H/3/83およびH/4/83並びにH/17/84、H/1/85およびH/6/85の3つの近縁な株どうしの大まかな組合せも可能かと思われる。しかしそれぞれの組合せの中でもH/48/80、H/1/82およびH/5/82の3株のうち、H/48/80はH/5/82とは交差が見られたものの、抗H/48/80血清は供試原型株とはいずれも1:128を示しその間2管差があり、S/222/79およびN/1/84と交差を示すH/1/82、H/5/82とはやや異っていると思われる。

H/3/83、H/4/83は交差HIの成績からでは互いによく似た株であるにも拘らず、H/3/83はH/4/83と違って抗H/3/83血清はN/1/84とU/100/84に対しては1:128を示すに止まった。さらに、抗H/4/83血清が他の分離株に対して高いHI価を示すのに対して、抗H/3/83血清は、H/48/80およびH/4/83以外の分離株とのHI価は明らかに低い。また、H/3/83およびH/4/83はいずれもH/17/84、H/1/85およびH/6/85とお互い一方方向の交差関係にあるが、その内容はまったく異なっている。すなわち、抗H/4/83血清がH/17/84、H/1/85およびH/6/85と高いHI価を示すのに対して、H/3/83の場合は逆に抗H/17/84血清、抗H/1/85血清および抗H/6/85血清の各血清に対してむしろ高い反応を示している。これらのことはH/3/83とH/4/83は互いに交差するものの、

抗原的には若干の差があることを示唆している。さらに抗H/3/83血清は分離株のH/17/84、H/1/85、H/6/85と2~3管差があり、また原型株のN/1/84およびU/100/84とも2管差のあることから、H/3/83系統の株が生き残る可能性が強く、1984年~1985年の冬にかけて流行した株へとつながったとする推察もあながち不可能ではないものと思われる。

最後にH/5/82とH/1/85の両株についてみれば、交差HIで抗H/5/82血清はH/1/85と交差せず、また交差吸収においても抗H/5/82はH/1/85では全く吸収されておらず、H/5/82とH/1/85ではかなり抗原的に差のある株であると考えられる。

以上の成績からインフルエンザの場合B型株においても抗原的に少しずつ違いのあるウイルスが流行し、また同じ流行期内でも抗原的に全く同一の株が流行しているのではないことが推測される。われわれとしては、今後ともさらに細かい検討を加えたいと考えている。

要 約

1980年~1985年広島県において分離されたB型インフルエンザウイルスのなかから8株について、B/Kanagawa/3/76株、B/Singapore/222/79株、B/Norway/1/84株およびB/USSR/100/84株の4株を対照原型株として、ウサギ免疫血清を用いての交差HI試験および分離株2株と対照原型株4株との交差吸収HI試験による抗原分析を実施し以下の成績を得た。

1. 供試分離株は交差HIの結果からB/Hiroshima/48/80株、B/Hiroshima/1/82株およびB/Hiroshima/5/82株の3株、B/Hiroshima/3/83株とB/Hiroshima/4/83株の2株並びにB/Hiroshima/17/84株、B/Hiroshima/1/85およびB/Hiroshima/6/85株の3株がそれぞれ近縁でそれらの間には2~3管差が認められ、また原型株との比較でも同様の成績を示し、これらの間には抗原的に差があるものと思われた。

2. しかし、B/Hiroshima/48/80株はB/Hiroshima/1/82株、B/Hiroshima/5/82株と比べ原型株に対する態度が異なり、この3株間ではやや異っていた。

3. B/Hiroshima/3/83株とB/Hiroshima/4/83株は近似したが、前者がB/Norway/1/84株、B/USSR/100/84株と交差が弱い点、および両株共B/Hiroshima/17/84株、B/Hiroshima/1/85株、B/Hiroshima/6/85株と一方方向の関係にあったが、その方向が逆である点で差異を示した。

4. B/Hiroshima/5/82株とB/Hiroshima/1/85株は、抗原的に明らかな違いを認めた。

文 献

- [1] Langmuir, A.D. and Housworth, J. (1969): A critical evaluation of influenza surveillance. Bull. WHO, 41, 393—398.
- [2] Housworth, J. and Langmuir, A.D. (1974): Excess mortality from epidemic influenza, 1957—1966. Am. J. Epidemiol., 100, 40—48.
- [3] 河合 道, 福富和夫, 杉浦 昭(1980): インフルエンザと超過死亡(1966~1978). 臨床とウイルス, 8 (1), 53—57.
- [4] Archetti, I. and Horsfall, F.L. (1950): Persistent antigenic Variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. J. Exp. Med., 92, 441—462.
- [5] Davenport, F.M., Hennessy, A.V. and Francis, T. Jr. (1953): Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antigenic variants of influenza virus. J. Exp. Med., 98, 641—656.
- [6] Choppin, P.W., Osterhout, S. and Tamm, I. (1958): Immunological characterization of New York strain of influenza A virus from the 1957 pandemic. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 513—520.
- [7] 庭山清八郎, 芝田充男, 岩瀬勇雄, 馬場貞義 (1975): インフルエンザウイルスの抗原変異について. ウイルス, 25(3), 200.
- [8] 福見秀雄(1975): 最近の流行と抗原構造の変遷. 臨床とウイルス, 3(4), 21—26.
- [9] Dowdle, W.A., Kendal, A.P. and Noble, G.R. (1979): Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th Ed., p. 585—609, Washington, D.C., American Public Health Association.
- [10] 杉浦 昭(1986): インフルエンザウイルスの抗原変異. 日本臨床, 44(9), 63—69.
- [11] 根路銘国昭(1978): MDC K細胞におけるインフルエンザウイルスの分離. 臨床病理, 臨時増刊特集 35号, 111—124.
- [12] 水谷裕迪(1967): ウイルス実験学各論. p.47, 国立予防衛生研究所学友会編, 東京, 丸善.
- [13] 中村 弘, 尾上 薫(1974): 免疫の生化学. p. 181—196, 東京, 共立出版.
- [14] 清谷克寛, 武井直己(1976): 1973年に広島県において分離されたB型インフルエンザウイルスの抗原分析について. 広島県衛研・公害研・研究報告, 23, 18—28.
- [15] 武井直己, 徳本静代, 瀬川和幸 (1980): 1978年および1979年広島県において分離されたA型インフルエンザウイルスの抗原分析. 広島県衛研・研究報告, 27, 39—45.
- [16] 井上栄, 水谷裕迪(1973): ウイルス実験学総論. 改訂二版, p. 219—225, 国立予防衛生研究所学友会編, 東京, 丸善.
- [17] 庭山清八郎, 芝田充男, 岩瀬勇雄, 馬場貞義 (1968): インフルエンザウイルスの抗原分析. ウイルス, 18(5), 391.
- [18] 庭山清八郎, 芝田充男, 岩瀬勇雄, 馬場貞義 (1969): 抗原分析を中心としたインフルエンザの解析. ウイルス, 19(5), 177.
- [19] 庭山清八郎, 芝田充男, 岩瀬勇雄, 馬場貞義 (1973): インフルエンザウイルスの抗原分析. ウイルス, 23(4), 343.
- [20] 山地幸雄(1980): タイおよびフィリピンにおけるインフルエンザの流行. インフルエンザワクチン研究会 (1979, 1980年度) 第19・20回討論会記録, 細菌製剤協会, 99—108.
- [21] 武内安恵, 中山幹男, 斉藤利憲, 薩田清明(1983): 1983年~1984年にかけてのインフルエンザの流行について. インフルエンザワクチン研究会 (1983年度) 第23回討論会記録, 細菌製剤協会, 61—69.

冷却塔水からの *Legionella pneumophila* 分離状況

榎 美代子*

Isolation of *Legionella pneumophila* from Cooling Tower Water

MIYOKO SAKAKI

(Received Nov. 2, 1986)

はじめに

レジオネラ症(在郷軍人病)は1976年夏のフィラデルフィアでの流行に端を発し、原因菌として *Legionella pneumophila* が同定されたが、本症は過去の原因不明の肺炎や熱性疾患の保存材料についての検討結果から、それ以前にもレジオネラ症がすでに発生していたことが明らかにされた[1, 2]。その後もアメリカ合衆国国内はもとより、世界の各地からレジオネラ症事例および環境中からの *Legionella* 属菌の分離報告があいついで行われ、これまでに22種が命名[3]されている。これらの *Legionella* の各菌種はヒトの生活環境中に広く分布[4-6]することが明らかになり、日和見感染菌として注目されている。それにもかかわらず、当初は分離操作の複雑なこともあって、わが国では症例についての詳細な検索や疫学的な調査は、ごく一部で行われるのみで他の臨床細菌に比べ十分に行われないうまま経過しているように思われる。しかしここ数年来、選択培地の開発および改良がなされ[7]、また分離材料の効率的な処理法が考案されて[8-10]、本菌の分離は以前よりも容易になっている[11]。

そこで、今回 *Legionella* を取扱うにあたって、まず技術的な面を検討する目的で、われわれの身近な冷却塔水から *Legionella* 属菌の分離を試みたので結果を報告する。

材料および方法

1. 分離材料

広島市内の試験研究機関(No.1-3)および広島県衛

生研究所(No.4)の2か所の建物の合計4冷却塔について、1986年8月28日(250 ml)と同年10月3日(1,000 ml)にそれぞれ滅菌容器に冷却塔水を採取した。ただし2回目のNo.1は運転を休止、洗浄中の水を、その他は全て稼働中の循環水を採取した。

2. 分離方法

Boppら[8]およびYeeら[10]の方法に準じて処理し、奥田ら[7]の選択培地を使用した。すなわち、1回目の採水材料については、試料200 mlをふた付滅菌遠沈管に入れ、10,000 rpm 20分遠沈したのち上清を静かに傾けて捨て、最終的に1 mlを残しそれに沈殿物を懸濁し、0.2 M HCl+KCl溶液(pH 2.2)1 mlを加えて室温で4分間作用させた(1/200に濃縮)。これに対し2回目は試料を400 mlとし、同様に遠沈したのちアスピレーターでゆっくり吸い上げて上清を除き、数mlを残してパスツールピペットを用いて十分に管壁を洗ったものを滅菌小遠沈管にとり、再び同様に遠沈し、最終的に上清2 mlに沈殿物を懸濁した(1/200に濃縮)。この懸濁液を1 mlずつ滅菌小試験管に移し、一方は酸処理に他方は加温処理に供した。酸処理は0.2 M HCl+KCl溶液(pH 2.2)1 mlを加え、室温で4, 7, 10分間作用させた。加温処理は50°Cの恒温水槽中で10, 20, 30分間保持し、これらを分離材料とした。

処理の済んだものからすみやかに0.1 mlずつを分取し、WYO培地(栄研)にコンラージ棒で塗抹し、35°Cで7日間培養した。

3. 同定方法

培養3日目以降に発育したコロニーで、灰白色、円形で湿潤・光沢のあるコロニーを各平板につき5個以内を

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

BCYE 寒天 (B-CYE 寒天培地, 栄研) と 5% 血液寒天に画線培養し, BCYE 寒天のみに発育したものを再び BCYE 寒天平板で培養して菌量を増やし, 下記の生化学的性状および診断用血清 (デンカ生研) による凝集反応によって判定した. 標準菌株として, 岐阜大学の藪内英子教授より分与された *L. pneumophila* serogroup 1, GIFU 9134 (=ATCC 33152) を用いた.

生化学的性状試験

- 1) オキシダーゼ: 試験用ろ紙 (日水) を使用した.
- 2) カタラーゼ: 3% 過酸化水素水と被検菌をスライドガラス上で混和し発泡の有無をみた.
- 3) ゼラチン加水分解: KTゼラチン (アスカ純薬扱い) を用い, これを被検菌の 0.5 ml 滅菌蒸留水濃厚懸濁液中に入れ, フィルムの透明化を 35°C 72時間観察した.
- 4) 馬尿酸加水分解: 1% 馬尿酸水溶液 0.4 ml に被検菌 1 白金耳を接種し, 35°C 18時間培養してグリシン法により判定した.
- 5) β-ラクタマーゼ: CEFINASE (BBL) を使用した.
- 6) 紫外線による蛍光発色: 暗所で 360 nm のランプを使用して発色をみた.

7) BCP スポットテスト: 0.04% BCP 溶液をしみ込ませたろ紙上に被検菌を塗布して色調の変化をみた.

結 果

試料の一般的性状については表 1 に示した通りで, pH は中性よりややアルカリ側にあり, 一般生菌数は $10^3/ml$ のレベルであった. また 1-3 塔は防錆剤, 分散剤, 殺藻剤 (バルスター GT) を使用しており, このうち殺藻剤は塩素系であったが, 試料中の残留塩素量は低値であった.

処理法別 *Legionella* の分離の成否と汚染菌の状況を表 2 に示した, いずれの処理法でも *Legionella* 以外の汚染菌を完全に除くことはできず, 分離平板上には種々の集落形態の細菌・真菌の増殖が認められたが, その平板上の割合は表 2 に示すとおりであった. このような分離状況で, 菌の定量はできなかったが, 各平板から *Legionella* 様の集落を選び, その性状および血清群別の成績から (表 3) 1 回目の試料の No. 2 と 3, 2 回目の試料の No. 2-4 の冷却塔水からの分離菌株は *L. pneumophila* serogroup 1 と同定された. 性状項目の中で, オキシダーゼについては反応が弱く不安定であったが, 他の項

表 1 冷却塔水の一般性状

試料No.	1回目試料 (8/28)			2回目試料 (10/3)		
	水温 (°C)	pH ¹⁾	残留塩素 ²⁾ (mg/l)	水温 (°C)	pH ¹⁾	一般生菌数 ³⁾ (CFU/ml)
1	34	8.66	0.2	21	7.87	3.0×10^3
2	28	8.36	<0.1	22	8.22	2.8×10^3
3	28	8.49	<0.1	27	8.60	1.6×10^3
4	26	8.36	<0.1	23	8.26	2.2×10^3

- 1) Corning pH meter 125 を使用, 25°C で測定.
- 2) オートリジン比色法.
- 3) Plate Count Ager (Difco) を使用.

表 2 処理法別 *Legionella* 分離成績および汚染菌の状況

試料No.	酸処理 (分)			加温処理 (分)			汚染菌集落の形状と出現度 ¹⁾
	4	7	10	10	20	30	
1 回 目	1	-	-	-	-	-	羊毛状†††
	2	+	-	-	-	-	羊毛状, 綿毛状, 他の細菌†
	3	+	-	-	-	-	綿毛状, 糊状††
	4	-	-	-	-	-	綿毛状†††
2 回 目	1	-	-	-	-	-	綿毛状, 他の細菌†† (酸<加温)
	2	+	-	+	+	+	羊毛状, 綿毛状†† (酸>加温)
	3	+	-	-	-	-	綿毛状†
	4	-	-	-	+	-	粉状†

1) †: 平板の 1/3 以下, ††: 平板の 1/3-2/3, †††: 平板の 2/3 以上.

表3 分離菌株の生化学性状および血清群

試料No.	発 育			オキシン ダーゼ	カタラーゼ	ゼラチン 水 解	馬尿酸 水 解	β-ラクタ マーゼ	紫外線 蛍 光	BCP スポット テスト	血清群
	BCYE	血 寒									
1 回 目	2	+	-	W ¹⁾	+	+	+	+	暗黄色	-	1
	3	+	-	W	+	+	+	+	暗黄色	-	1
2 回 目	2	+	-	-	+	+	+	+	暗黄色	-	1
	3	+	-	-	+	+	+	+	暗黄色	-	1
	4	+	-	-	+	+	+	+	暗黄色	-	1
標準菌株 ²⁾		+	-	W	+	+	+	+	暗黄色	-	1

1) 弱陽性.

2) *L. pneumophila* (ATCC 33152).

目は標準菌株と一致した。血清群はすべて1群であった。

考 察

今回 *Legionella* 属菌の分離を試み、身近な冷却塔水から本菌を分離することができた。

1回目に比べ、他の処理法を加えて作用時間を伸ばした2回目の方法では、結果的に菌を分離した冷却塔の数を一つ増したが、酸処理4—10分、加温処理10—30分の範囲では、分離の状況に大差はなかった。しかし今回のような比較的菌数が少ないと推測される試料では、集菌操作によって *Legionella* 以外の汚染菌が無視できない量になり、これが分離成績を左右するのではないかと思われる。これらの汚染菌も処理法の違いにより、発現してくる集落の量や形状が異なっているのが観察されたので、種類により処理作用に対する抵抗性に差があるものと思われる。したがって分離精度を高めるには、1試料について処理法および作用時間を変え、おのおの複数枚ずつ分離培養することが必要と思われる。サンプリング量も分離に必要な最少量でなく、1回で検出できなかった場合や至適な濃度が推量できるようならば、再度検査が行える量を採取し4°Cで保存しておきたい。

今回使用したWYO培地は選択剤として細菌、真菌に対する抗生剤が入っており、同一試料を選択性のないBCYE培地と比較した場合、格段に汚染菌の発育が抑制されていることがわかる。逆に選択培地上の疑わしいコロニーをBCYE培地へ画線培養する際には、汚染菌の混入を注意しないと目的の菌が生えてこないうちに汚染菌が急速に発育して平板全体を汚染してしまう場合があるので、分離の際には完全に独立したコロニーから鈎菌すること、陰性の証明には別の平板でおこなうことが必要である。また、培養期間中に *Legionella* と推測され

るコロニーが出現した場合には、その都度BCYE培地等へ接種しておくことが必要である。翌日までその平板を放置すれば、表面を他の菌が被ってしまうのをしばしば経験したからである。

これまでにわが国で実施された *Legionella* 属菌についての環境調査の結果では、冷却塔の37—67%から検出されている[5, 6, 12]が、奥田ら[7]は、新選択培地を開発する中で、WYO培地を使用して15基の冷却塔水すべてから検出している。この他にも自然環境水や建物内の給水、給湯系からの検出報告[13, 14]もあることから、本菌が環境中に広く分布しているのは確かであろう。*Legionella* 以外の汚染菌が十分に処理され、適切な選択培地が使われるならば、今後さらに検出率は上がるものと思われる。

レジオネラ症は一過性の熱性疾患および免疫の低下した高齢者や基礎疾患を持つ患者などにみられるβ-ラクタム剤無効の急性の経過をたどる重篤な肺炎で、感染源として冷却塔水や屋内の給水系の汚染などが考えられているが、いずれにしても、日和見感染的な色彩が強い感染症である。したがって冷却塔水から *Legionella* が分離されても、健康者には問題となることはないと思われるが、病院等では十分な監視が必要であろう。今後菌の迅速な分離同定法ならびに蛍光抗体法や尿等臨床材料からの早期診断法の確立普及および検査体制の整備が望まれる。

結 語

今回 *Legionella* の分離を試み以下の結果を得た。

1. 身近な4冷却塔のうちの3冷却塔の冷却塔水から *L. pneumophila* serogroup 1 を分離した。
2. 酸処理4—10分および50°C加温処理10—30分の範囲では *Legionella* 分離の状況に差はみられなかった。

3. 試水中の *Legionella* 以外の汚染菌の除去については、より効率的な方法の開発が必要である。

稿を終えるにあたり、*Legionella* 菌株を分与していただきました岐阜大学微生物学教室藪内英子教授、御助言をいただきました美萩野臨床医学専門学校奥田敬一先生に深謝致します。

文 献

- [1] Thacker, S.B., Bennett, J.V., Tsai, T.F., Fraser, D.W., McDade, J.E., Shepard, C.C., Williams, K.H., Jr., Stuart, W.H., Dull, H.B. and Eickoff, T.C. (1978): An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium. *J. Infect. Dis.*, 138: 512—519.
- [2] Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., Jr. and Kassanoff, I. (1978): Pontiac fever: an epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Amer. J. Epidemiol.*, 107: 149—160.
- [3] Bernner, D.J., Steigerwalt, A.G., Gorman, G.W., Wilkinson, H.W., Bibb, W.F., Hackel, M., Tyndall, R.L., Campbell, J., Feely, J.C., Thacker, W.L., Skaliy, P., Martin, W.T., Brake, B.J., Fields, B.S., McEachern, H.V. and Corcoran, L.K. (1985): Ten new species of *Legionella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 50—59.
- [4] 藪内英子 (1985): レジオネラ感染症とその対策. 呼吸, 4: 1240—1247.
- [5] 伊藤直美 (1983): 我国全土における *Legionella* の分布調査および検出菌の病原性に関する研究. 感染症誌, 57: 682—694.
- [6] Ikedo, M. and Yabuuchi, E. (1986): Ecological studies of *Legionella* species. I. Viable counts of *Legionella pneumophila* in cooling tower water. *Microbiol. Immunol.*, 30: 413—423.
- [7] 奥田敬一, 池戸正成, 藪内英子 (1985): 冷却塔水からレジオネラ属菌を検出するための新選択培地: Wadowsky-Yee-Okuda (WYO) 培地. 感染症誌, 58: 1073—1082.
- [8] Bopp, C.A., Summer, J.W., Morris, G.K. and Wells, J.G. (1981): Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. *J. Clin. Microbiol.*, 13: 714—719.
- [9] Edelstein, P.H., Snitzer, J.B. and Bridge, J.A. (1982): Enhancement of recovery of *Legionella pneumophila* from contaminated respiratory tract specimens by heat. *J. Clin. Microbiol.*, 16: 1061—1065.
- [10] Yee, R.B. and Wadowsky, R.M. (1982): Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1330—1334.
- [11] 池戸正成 (1986): 環境水からのレジオネラ属菌の分離法. 臨床検査, 30: 1081—1085.
- [12] 中浜力 (1983): 岡山地方における *Legionella* 属菌の環境材料よりの分離に関する研究. 感染症誌, 57: 643—655.
- [13] Wadowsky, R.M., Yee, R.B., Mezmar, L., Wing, E.J. and Dowling, J.N. (1982): Hot water system as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1104—1110.
- [14] Plouffe, J.F., Webster, L.R. and Hackman, B. (1983): Relationship between colonization of hospital buildings with *Legionella pneumophila* and hot water temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 769—770.

広島県における神経芽細胞腫のマス・スクリーニングについて (第1報)

—ろ紙尿中のVMA, HVA測定値とその判定について—

水 田 満 里* 海 佐 裕 幸*

Mass Screening of Neuroblastoma in Hiroshima Prefecture

—Urinary Assay of VMA and HVA—

MARI MIZUTA AND HIROYUKI UMISA

(Received Oct. 31, 1986)

はじめに

乳幼児の神経芽細胞腫のマス・スクリーニングが、厚生省の行政事業として、昭和60年1月から全国的に実施されるようになった。この腫瘍はカテコールアミン産性をもつので、スクリーニングは尿中に排出されるカテコールアミン代謝物のバニールマンデル酸 (VMA) やホモバニリン酸 (HVA) を測定することによって容易に行うことができる。

広島県では、昭和60年度は一次検査として、保健所が中田ら〔1〕のDIP法による尿中のVMAの定性検査を実施し、二次検査として、衛生研究所が尿中のVMA, HVAの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量検査を実施した。

その結果、昭和60年度は1例の神経芽細胞腫の患者を発見することができた。

今回、二次検査として送付された検体の尿中のVMA, HVA, クレアチニン値について若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 検体

湿ったろ紙尿：ろ紙 (東洋ろ紙 No. 63 1.5×5cm) をオムツの間に挟み、尿を染み込ませたもの

2. 測定項目および測定方法

VMA, HVA : HPLC

クレアチニン : Jaffe の反応に基づく Follin-Wu 法〔2〕

pH : 東洋ろ紙万能 pH 試験紙

3. ろ紙尿の前処理

湿ったろ紙尿3枚から尿を注射筒でしぼりだした。乾いていた場合は0.1N HClをろ紙3枚に湿潤するまで

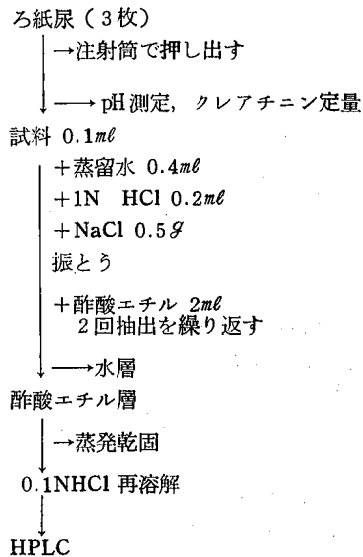


図1 ろ紙尿の前処理

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

滴下して、その後注射筒で押し出した。HPLCによるVMA, HVA測定のための尿の前処理方法(図1)およびクレアチニンの測定方法は、厚生省の神経芽細胞腫マス・スクリーニング研究班の精度管理標準測定法(案)[2]に従って行った。

4. HPLC 条件

カラム: Yanapak ODS-A (4.6 mm φ × 250 mm)
 移動相: 0.02 M リン酸-カリウム溶液 (pH 3.1 1 mM EDTA 2 Na を含む): メタノール = (80:20)
 流量: 1.0 ml/分
 設定加電圧: +800 mV vs Ag/AgCl
 注入量: 10 μl
 検出器: ヤナコ ECD VMD-501
 ポンプ: 東洋曹達 CCPD

結果および考察

1. 検査結果

一次検査のDIP法による定性検査の結果、疑陽性と判定され、二次検査として送付された数は852例であった。DIP法では食べ物や尿の濃さが影響して疑陽性と判定されるケースが多くなる[1]。今回の二次検査では、HPLCによる定量の結果、疑陽性と判定された数はわずかに8例(0.9%)であった。このうちの1例が病院での精密検査によって神経芽細胞腫と確認された。

再採尿依頼をした数は99例(11.6%)であり(表1)。

表1 昭和60年度二次検査結果

被検者数	再採尿依頼数*	疑陽性者数	患者数
852	99(11.6%)	8(0.9%)	1

* 再採尿依頼理由

- 尿中VMAが、明らかな異常値とはいえないが一般の人より高い 18人
- ろ紙に尿が十分浸透していない、又は尿が薄い 32人
- 尿が腐敗していたため検査が出来ない 49人

そのうちの49%は尿が腐敗していたと考えられた。これらの検体は、pHが8.0以上のアルカリ性を示し、クレアチニンが低い値(5 mg/dl)か定量限界値(0.1 mg/dl)以下であった。このようなケースは夏季に多い傾向があった。

2. ろ紙尿中のクレアチニン値について

ろ紙尿中のVMA, HVAの値は尿量や尿の濃さによって影響を受ける。したがって、判定のためには、VMA, HVAの補正值として、尿中の常在成分であるクレアチニンに対するVMA, HVAの値を用いる[3]。

そこで、ろ紙尿中のクレアチニン量について検討した。

ろ紙尿中のクレアチニン量は定量限界値以下のものから最大値170mg/dlと幅広い分布を示した(図2)。その平均値は25.7mg/dl、標準偏差は23.6mg/dlであった。

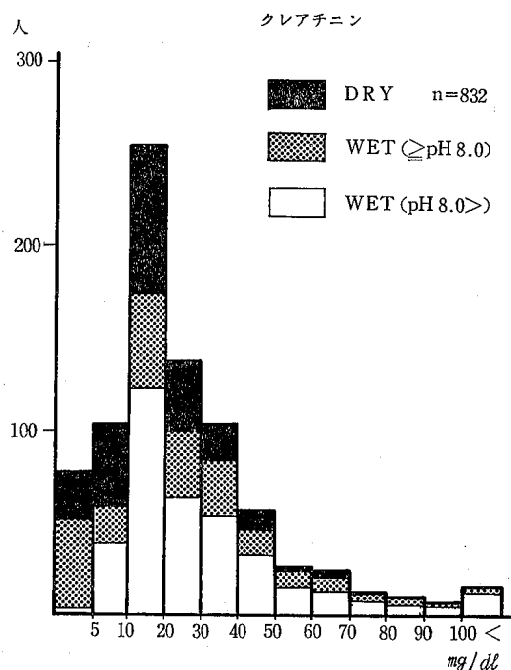


図2 ろ紙尿中のクレアチニン値のヒストグラム

ろ紙尿は、湿っていてpHが8.0以上のアルカリ性のものと、pHが8.0以下のもの、および乾いていたろ紙尿の3グループに分けられる。

クレアチニンが5 mg/dl以下の低い値を示す検体の中では、アルカリ性ろ紙尿の占める割合が高いのが特徴的であった(図2)。これは、尿が腐敗してクレアチニンが分解したためと考えられる。次いで、乾燥したろ紙尿の占める割合が高かった。この理由としては、尿が充分染み込んでいなかった場合と、採尿後放置されて古くなったためにクレアチニンの分解が起きていた場合の2つが考えられる。

山本ら[4]は、健康な乳幼児(6~10カ月)のバック採尿による尿中のクレアチニンの平均値と標準偏差は32.1 mg/dl, 28.5 mg/dlであることを報告している。このことから、乳幼児の尿濃度が非常に変動の多いことがうかがわれる。ろ紙尿の場合は、付着量が様々であるうえに、送付されて来る間の腐敗も加わり、変動がより大きくなっていると考えられる。

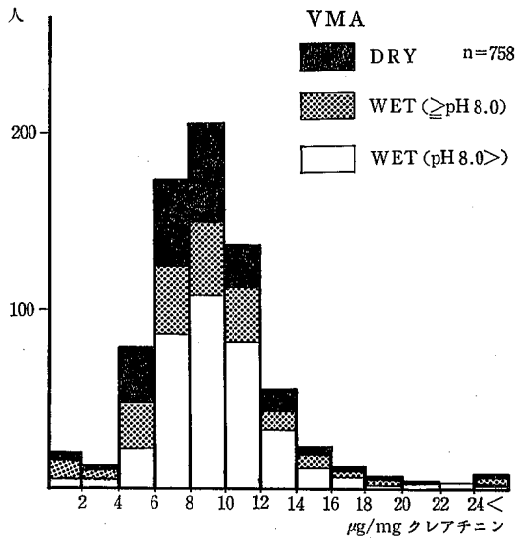


図3 ろ紙尿中のVMAのヒストグラム

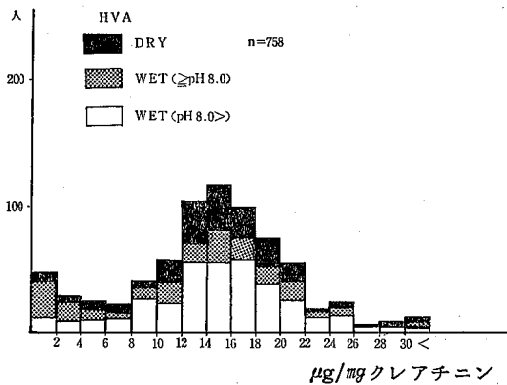


図4 ろ紙尿中のHVAのヒストグラム

3. ろ紙尿中のVMA, HVAの正常値について

クレアチニン量で補正をしたVMA, HVAのヒストグラムを示した(図3, 4).

ただし, クレアチニンが低い値(5mg/dl以下)を示したものは補正による誤差が大きくなるので対象から除外した.

VMA, HVAがそれぞれ24μg/mgクレアチニン以上, 30μg/mgクレアチニン以上の高い値と2μg/mgクレアチニン以下の低い値を示す検体の中で, アルカリ性ろ尿の占める割合が高いのが特徴的であった(図3, 4).

高い値の理由として, クレアチニンが分解等で低い値になったものは, クレアチニン補正によってVMA値およびHVA値が高い値として表現される可能性があり, また低い値の理由としては, VMA, HVAそのものが何らかの原因によって分解した可能性があると考えられる.

VMA, HVAの平均値と標準偏差は, それぞれ9.7

士3.9μg/mgクレアチニン, 15.0±8.1μg/mgクレアチニンであった.

ろ紙尿のグループ別のVMA, HVAの平均値と標準偏差及び変動係数を表2に示した.

アルカリ性ろ紙尿は, 他のグループに比べてHVAの平均値が低く変動係数も大きかった. VMAについては, 平均値の差はないが変動係数が大きかった.

4. 尿中VMA, HVAのカットオフ値について

従来のスクリーニングにおいて, VMA, HVAのカットオフ値としては, 花井ら[3]や梅橋ら[5]の報告を参考にして, VMAで20μg/mgクレアチニン, HVAで40μg/mgクレアチニンを一応の目安として用いた.

今回測定したVMA, HVA値の平均値と標準偏差から, カットオフ値について再検討を行った.

カットオフ値を(1) $\bar{X}+2SD$, (2) $\bar{X}+2.5SD$, (3) $\bar{X}+3SD$ の3種類に設定した時の再検率を表3に示した.

VMAとHVAではカットオフ値を越える割合が異なり, VMAの方が高い割合であったが, どちらか一方がカットオフ値を越える割合(再検率)を2.0%とすると, $\bar{X}+3SD$ を設定した場合と従来通りのカットオフ値の場合が一致した.

表2 ろ紙尿の違いによるVMA, HVAの平均値と標準偏差

	n	VMA		HVA		
		$\bar{X} \pm SD$ (μg/mgクレアチニン)	CV (%)	$\bar{X} \pm SD$ (μg/mgクレアチニン)	CV (%)	
全体	758	9.7	3.9	15.0	8.1	54.0
湿ったろ紙						
pH8.0>	380	9.9	3.4	15.8	8.0	50.6
≥pH8.0	181	9.4	5.1	13.1	8.5	63.4
乾いたろ紙	197	9.3	3.6	14.6	7.2	49.6

表3 カットオフ値と再検率

	$\bar{X}+2SD$		$\bar{X}+2.5SD$		$\bar{X}+3SD$		従来の場合	
	VMA	HVA	VMA	HVA	VMA	HVA	VMA	HVA
カットオフ値 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン)	17.5	31.2	19.4	35.2	21.4	39.3	20	40
カットオフ値を 越える割合	2.3%	1.2%	1.3%	0.9%	1.2%	0.8%	1.3%	0.7%
再検率*	3.5%		2.2%		2.0%		2.0%	

*) VMA又はHVAのどちらか一方がカットオフ値を越える割合をさす。

正規分布に従うならば、 $\bar{X}+3SD$ を設定した場合の再検率はもっと低くなければならないが、再検率が2.0%と高かった。これは今回の検体中にクレアチニンの補正によって生じる高い値を含むためと思われる。

5. ろ紙尿中のVMAとHVAの量的な関係について

ろ紙尿のグループそれぞれについて、VMA値とHVA値の相関関係を表4に示した。

乾燥していたろ紙尿は湿ったろ紙尿よりも高い相関性があった(表4)。

表4 VMAとHVAの相関

	n	r	回帰直線	
			X: VMA	Y: HVA
湿ったろ紙				
pH8.0>	380	0.27***	Y=9.53+0.57X	
≥pH8.0	181	0.23***	Y=7.33+0.57X	
乾いたろ紙	197	0.47***	Y=6.85+9.6X	

***: $p < 0.001$

現在までに報告されているVMA, HVAの平均値[3, 5]を比較すると、HVAはVMAの1.5倍から2.5倍である。これらから、HVAがVMAより量的に多いと推定される。

しかしながら、今回の検体中にはHVAがVMA値より低い値を示したものもあり、その数はpH8.0以上のアルカリ性ろ紙尿では33%、pH8.0以下のろ紙尿では12%、乾燥していたろ紙尿では10%を占めていた。

HVAがVMAよりも量的に多いのが一般的であるならば、VMAとHVAの比が逆の関係にあるものは、何らかの要因によってHVAが分解した可能性が高いことを示唆している。とくに、pH8.0以上のアルカリ性ろ紙尿でHVAの低いものが33%を占めたことは尿の腐敗が関与していることを示唆している。

結 語

二次検査として送付されたろ紙尿についてろ紙尿の違

いによるVMA, HVA, クレアチニン値について考察した。

広島県では、昭和60年度は湿ったろ紙尿を検体とする方法を採用したが、送付されてきたろ紙尿は尿量や尿濃度、尿の腐敗の程度等様々であった。湿ったろ紙尿では、夏季にアルカリ性を示す尿が多くなり、これらはVMA値, HVA値の変動が大きかった。これは尿の腐敗に因るものと思われる。いっぽう、採尿後ただちに乾燥したろ紙尿は安定した値を示した[6]。

したがって、昭和61年度は乾燥したろ紙尿を送付してもらう方法に切り替えた。

正しい検査結果を得るためには、安定した値を得ることの出来る検体送付が非常に重要であり、また、カットオフ値については今後も引き続き検討していく必要があると思われる。

文 献

- [1] 母子愛育会編：神経芽細胞腫マスキリーニング, p.103-108, 東京, 1984.
- [2] 厚生省神経芽細胞腫マスキリーニング研究班(1985): 資料.
- [3] 花井潤師, 辻慶子, 田口武, 落合玲子, 佐藤英里子, 佐藤泰昌, 前田博之, 青木環, 林英夫, 高杉信男, 武田武夫(1984): 札幌市衛研年報, 11, 41-47.
- [4] 山本圭子, 佐藤秀美(1985): マスキリーニングに関する研究. 神経芽細胞腫に関する研究報告, 厚生省神経芽細胞腫マスキリーニング研究班, 195-197.
- [5] 梅橋豊蔵, 田崎隆二, 林田寿幸, 進貞夫, 大友信也(1985): 第13回代謝異常スクリーニング研究会, 札幌, 70.
- [6] 水田満里, 海佐裕幸(1986): 第14回代謝異常スクリーニング研究会, 東京, 44.

他誌掲載論文要約(1985年11月～1986年10月)

武井直己, 妹尾正登, 徳本静代, 瀬川和幸, 海佐裕幸, 稲葉 博, 神笠武清, 畑本典昭: 広島県における日本脳炎中和抗体保有状況調査—1984年. 広島医学, 39: 292～296, 1986.

広島県の日本脳炎中和抗体保有状況の調査計画に基づいて1984年県下3地区(西部, 東部, 北部)の住民334名を対象に50%ブラック減少法によって中和抗体保有状況を調査した.

1. 全体の年齢層別抗体陽性率は, 20歳代が50%台, 30歳代, 40歳代は共に60%台, 50歳代が70%台, 60歳以上は80%台であった. 加齢と共に陽性率も高くなるとみられたが, 30歳代と40歳代の間で停滞が認められた. 抗体価のG.M.は17.8～80.2の間で加齢と共に高値を示した.

2. 抗体価の分布状況では, 20歳代, 30歳代は抗体価10倍以下あるいは10～99倍にピークをもつ各地区とも比較的良好な分布曲線を示した. ただ20歳代の東部と北部で500倍以上の高い抗体価の例が約5%及び10%に認められた. 40歳代以上の年齢層では各抗体価の分布に地区によって若干のばらつきが認められ, また500倍以上の高い抗体価の例が5%～25%程度認められた.

3. 抗体価100倍未満(陰性も含む)の割合が20歳代, 30歳代では各地区とも80%ないしそれ以上を占めた.

4. 抗体価のG.M.は東部, 北部では必ずしも認められなかったが, 全体では17.8～80.2の間で加齢と共に高くなった. また40歳代以上では概してG.M.と算術平均値との差が大きく, 最高抗体価と最低抗体価との差が大きいことが認められた.

西尾隆昌, 海佐裕幸: 広島地方のサルモネラ症: 1982～1985年の散发患者発生状況. 広島医学, 39: 946～954, 1986.

1982～1985年の4年間に, 広島県下で把握されたサルモネラ症散发患者は1,025名で, その年齢は出生直後の新生児から80歳を超える全年齢層にわたっていたが, 過半数(54%)は10歳未満の乳幼児であった. 最多発年齢は1歳で, 全患者の9.6%を占めた. 患者は年間を通じて発生したが毎年8月にもっとも多発し, 7～9月の3ヵ月間に全体の55%が集中した. 半数近くの患者に, 1日10回を超える下痢, 39°C以上の高熱があり, 菌血症も18例認められた. 他に19例の非腸管感染事例の発生をみた. 分離菌株の血清型は45型を数えたが, 例年 *S. typhimurium* の分離頻度をもっとも高く, 全菌株の

39%を占めた. 次いで *S. litchfield*, *S. paratyphi B* [T⁺], *S. infantis*, *S. enteritidis*, *S. thompson*などが上位にあるが, このような血清型分布は1981年以降定着している. 分離菌株の薬剤耐性率は, 1982年以前よりも高率化していた.

西尾隆昌, 海佐裕幸: 広島地方の *Campylobacter* 腸炎: 1982～1985の散发患者発生状況. 広島医学, 39: 1064～1072, 1986.

1982～1985年の4年間に, 広島県下の医療機関で *Campylobacter* の分離された散发患者は3,562名を数えた. これに対し, 同菌による届出食中毒事例は4件, その患者は289名であった. 散发患者は生後2日目の新生児から80歳以上の全年齢層にわたっていたが, 全患者の70%は10歳未満の低年齢層で, そのなかでもとくに0～5歳児が多数を占めた. 10歳代までの低年齢層では男性患者が女性患者の数を大きく上回ったが, 20歳代以上の成人層では男女ほぼ同数であった. 患者発生は5～6月にピークとなり, 8～9月には大きく減少するものの10～11月には再度多発するという2峰性の分布が持続している. 1日あたり10回を超える下痢は23%, 39°C以上の高熱は24%の患者にそれぞれみられたが, これらの発現頻度はサルモネラ症の場合のほぼ1/2程度であった. 血便は24%の患者に認められたが, 乳幼児ではとくに高率であった. 4年間に, 垂直感染と思われる5例を含めて11例の新生児事例の発生をみた. 分離菌株はセフェム系薬剤には耐性, ペニシリン類には耐性のものが多く, アミノ糖抗生剤, クロラムフェニコール, エリスロマイシンにはほとんどが感受性であった. 分離菌株の血清型はきわめて多彩であった.

金本康生: 泌尿生殖器マイコプラズマの研究. III. 妊婦および新生児から分離された *ureaplasma* の血清型. 広島大学医学雑誌, 33: 1129～1134, 1985.

正常な妊婦42名および新生児10名計52名の尿から分離された *Ureaplasma urealyticum* のクローニングを行い, 1検体につき2株計104株を得た. これらの株についての代謝阻止試験による血清型別の結果, 下記の成績を得た.

1. 主要血清型は1型, 3型および6型で, これらが全体の88.7%を占めた. 2型, 4型, 5型も少数分離されたが, 7～14型は認められなかった.

2. 7株(6.7%)は1～14の既知血清型のいずれにも

該当しなかった。

3. 52名中の6名(11.5%)は2種の血清型菌を保有していた。

4. 新生児8名から分離された16株のうち7名(87.5%)からの12株(75.0%)はそれぞれの母親由来株と同一血清型であった。

金本康生：尿道炎患者からの *Chlamydia trachomatis* の検出について。広島県獣医学会雑誌，1：47-50，1986。

男子尿道炎患者から採取した尿道 swab 291検体について，細胞培養法により *Chlamydia trachomatis* の検出を試みた。非淋菌性尿道炎194症例中94例(48.5%)，淋菌性尿道炎97症例中13例(13.4%)にそれぞれ *C. trachomatis* の陽性所見を認めた。非淋菌性尿道炎の約半数は本菌が起因菌と考えられる結果を得た。また291検体のうち45検体については，FITC 標識抗 *C. trachomatis* モノクローナル抗体(Micro Track™)を使用した直後塗抹法と細胞培養法とによる *C. trachomatis* の検出について比較検討を行った。直接塗抹法と細胞培養法との陽性一致率は86.4%(19/22)，陰性一致率は100%(23/23)であった。

武井直己，清谷克寛，妹尾正登，松尾吉恭：インフルエンザA及びB型ウイルスノイラミダーゼ間の酵素学的な差異について。ウイルス，36：119-123，1986。

インフルエンザA及びB型ウイルスノイラミダーゼ(NA)間の酵素学的な差異を明らかにすることを目的として，A，B両型ウイルス各10株ずつについて，フェニルアミンを基質として用いる呈色比色法と，4-メチルウンベリフェリル-N-アセチル- α -D-ノイラミド(4-MU-ノイラミド)を基質として用いる蛍光比色法とによって，そのNA活性を測定した。

蛍光比色法では，A型ウイルスのNAは，10mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)により著明に抑制されたのに対して，B型ウイルスのそれは全く抑制されなかった。

B型ウイルスNAの加水分解活性の呈色比色法/蛍光比色法の比は，A型ウイルスのそれに比して著明に高かった。また，B型ウイルスのNAはN-アセチルノイラミン酸(NANA)による競合阻害の程度も，A型ウイルスのNAにおけるよりも弱く，A，B両型ウイルスNA間の基質特異性に差のあることが示唆された。

A，B両型インフルエンザウイルスNAについては，4-MU-ノイラミドという低分子の合成基質を用いる

蛍光比色法を応用することで，両者が異なる態度を示したことは極めて興味あることと思われる。

徳本静代，武井直己，瀬川和幸，妹尾正登，海佐裕幸，毛利久夫：商船学生を対象にした Hepatitis B Virus 感染に関する血清学的解析。感染症学雑誌，60：468-472，1986。

1978年から1985年の間に広島県のA商船高等専門学校に入学した学生703名(男子)について1年生(15歳)時のHBs抗原(RPHA法)，HBs抗体(PHA法)を検索しその保有状況を検討した。このうち5年生(19歳)時にも再度調査された224名はさらにHBc抗体(EIA法)およびHBs抗原陽性血清のHBc抗原・抗体(ともにEIA法)を検索し対象内HBV水平感染について検討した。HBc抗体陽性血清は200倍希釈血清についても検討を加えた。

703名の入学時のHBs抗原陽性率は平均2.0%，年次別では1%から3%の間のほぼ横ばいの，HBs抗体陽性率は平均7.5%，年次別では15.3%から2.0%へと減少の傾向を示した。

ベア血清で調査された224名の延448血清は保有抗原抗体により6群(I群：HBs抗原，HBc抗体陽性でHBe抗原陽性例，II群：同じくHBe抗体陽性例，III群：HBs抗体，HBc抗体陽性例，IV群：HBs抗体 alone，V群：HBc抗体 alone，VI群：HBs抗原・抗体，HBc抗体すべて陰性例)に区別された。対象内HB感染源はI群で経過した2名とI群からII群へHBe抗原からHBe抗体へ seroconversion した2名の計4名(1.8%)を検出したが，1年生から5年生までの間に有意な抗原抗体の変化を示した例は認められなかった。HBc抗体の検索においても有意な抗体価の上昇例は認められず対象内HBV新感染例は全く検出されなかった。

IV群のHBs抗体 alone：0.4%とV群のHBc抗体 alone：0.9%の間には有意は認められなかった。

小川博美，岸本敬之，得能弘志，佐々木実己子，福田伸治：カキ養殖海水とカキにおける大腸菌群MPNと糞便性大腸菌群MPNの相関性。食品と微生物，3(2)：87-94，1986。

カキの養殖環境における汚染指標菌TCとFCの分布，汚染構成比ならびにこれらの相互の相関について，河口河川水72，同一箇所と同時に採取した養殖海水とカキのベア-各522検体，計1,116検体について調査を行い次の結果を得た。

a) 河川水，海水およびカキにおけるTC(X)とFC

(Y)の相関は、河川水では $r=0.82^{**}$, $\log Y=0.7961 \log X-0.1907$, 海水では $r=0.88^{**}$, $\log Y=0.7317 \log X-0.4350$, カキでは $r=0.81^{**}$, $\log X=0.9133 \log Y-1.0987$ と有意に高い相関を示した。海水の回帰式による TC MPN 70 の時、FC MPN 推定値は8.2を示した。FC/TC 汚染比(%)は、河川水で10%, カキで3.4%を示した。

b) ペアデータによる海水 TC(X)とカキ FC(Y)の相関は、全海域で $r=0.73^{**}$, $\log Y=0.6681 \log X+1.3385$ を示した。この回帰式による海水 TC MPN 70 の時、カキ FC MPN 推定値は、全海域で372.6, 清浄な指定海域では224.8を示した。

c) ペアデータによる海水 FC(X)とカキ FC(Y)の相関は、 $r=0.71^{**}$, $\log Y=0.7849 \log X+1.8779$ と有意な関係を示した。この回帰式によるカキ FC MPN 230 の時、海水 FC MPN 推定値は、全海域で4.1, 指定海域で10.5を示した。カキ FC/海水 FC(比)は、全海域で481.倍, 指定外海域では48.8倍, 指定海域では26.9倍を示した。

d) 汚染指標菌の分布と消長は、河口河川水→指定外A海域→指定外B海域→指定海域と汚染源からの距離により、FC中央値で3.2→1.5→0.8→0.0, TC中央値で4.2→2.7→1.9→0.9と漸減した。

以上の結果より、海水 TC とカキ FC の相関係数と海水 FC とカキ FC の相関係数間に有意の差を認めなかったことから、FCによる海域評価は、現行のTCによる評価法と同等の評価が可能であることが明らかとなった。この場合、TC MPN 70 の評価基準を FC MPN で示すと7.2~10.6と考えられた。

Mizuta, M., H. Kanamori: Mutagenic activities of dictamnine and γ -fagarine from *Dictamnii Radicis*. *Mutation Research* 144: 221-225, 1985.

生薬の白鮮皮が Ames 法による変異原テストで陽性を示したので変異原物質の分離、同定をおこなった。メタノール抽出物を Sephadex LH-20, TLC 等で分離、精製をおこない、二つの変異原性物質を単離した。UV, IR, EI-Mass, $^1\text{H-NMR}$ 等により、これらをフロキノリン類アルカロイドである dictamnine と γ -fagarine であると同定した。これら両物質は *Salmonella typhimurium* TA100 と TA98 の両菌株に対して S-9 mix (ラット肝)添加で変異原性を示し、 μg 当りの復帰変異コロニー数は15~30個であり、植物中に含まれる変異原性物質の活性としてはかなり高いことがわかった。

Mochiike, A., T. Matsuo, H. Kanamori, N. Hoshita and I. Sakamoto: Determination of PCQs by HPLC and its Application to the Analysis of Yusho Patient Blood and Toxic Rice Oil and to the Distribution of Synthetic PCQs in Mice. *Chemosphere*, 15: 599-606, 1986.

カネミ油症原因油(以下油症油と略す)および患者血液中の PCQ を精度よく分析し、その骨格異性体比を知る目的で、合成した6種類の完全塩素化 PCQ を標準として、ECD-GC, HPLC による分析について検討を行った。ECD-GC では5本のピークに分離したが、6種類の骨格異性体を完全に分離することはできなかった。そこで、HPLC による検討を試み、6種類の骨格異性体を完全に分離し、精度よく定量できる方法を確立した。

本法により、油症油および患者血液中 PCQ は、いずれも6種類の骨格異性体の混合物ではあるが、組成比が異なること。組成比はいずれも o, m-体が最も高く、p-体が最も低いことが明らかになった。また、マウスに PCQ を投与し、生体内分布および糞中への排せつについても本法を用いて検討を行った。その結果、いずれの異性体も肝臓に最も多く蓄積すること(特に p-体は蓄積性が高い)。各臓器、組織に残留した PCQ の組成比は、油症油と患者血液との関係と同様な傾向にあることが認められた。また、糞中への排せつに関しては、p-体の排せつ量が他の異性体に比べて多いこと。いずれの異性体もその殆んどが投与後はじめの2日間で排せつされることが明らかになった。これらのことから、PCQ は骨格の違いによって吸収および代謝が異なる可能性が示唆された。

Kanamori H., I. Sakamoto, M. Mizuta and O. Tanaka*: Studies on the Mutagenicity of *Swertiae Herba*. III.: Components Which Become Mutagenic on Nitrite Treatment. *Chem. Pharm. Bull.*, 34: 1663-1666, 1986.

センブリのメタノールエキスは、亜硝酸処理を行うと、*Salmonella typhimurium* TA98 に対して S9 mix 無添加で変異原性を示すようになる。

このような変異原活性を示す物質として、2物質を単離し、amarogentin 及び amaroswerin と同定した。またこれらの活性は3,3',5-トリヒドロキシビフェニルカルボン酸の部分が修飾されることにより発現するものと思われた。

これら2つの配糖体から得られる 3,3',5-tri-hydro-

xybiphenyl も亜硝酸処理により変異原性を示したが、本生薬中に含まれているアシル基の結合していないセコイリド配糖体やキサントン誘導体は、この様な活性を示さなかった。

市販生薬中の amarogentin 及び amaroswerin の定量分析も行った。

* 広島大学医学部総合薬学科

Kanamori H., I. Sakamoto and M. Mizuta:
Further Study on Mutagenic Furoquinoline Alkaloids of Dictamni Radicis Cortex: Isolation of

Skimmianine and High-Performance Liquid Chromatographic Analysis. Chem. Pharm. Bull., 34: 1826—1829, 1986.

白鮮皮中の変異原物質として, dictamnine, γ -fagarine に加えて skimmianine を新たに単離, 同定した。これら3種のフロキノリンアルカロイドの定量分析法を検討し, 逆相カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーによる分離分析が可能なることを見出した。

市販の白鮮皮中のこれら3種のフロキノリンアルカロイドの定量分析を行い, その含有量と変異原性の関係について検討した。

広島県衛生研究所研究報告投稿規定 (1981年 8 月)

(目 的)

この規定は広島県衛生研究所業務年報等編集委員会要項に基づいてこれを定める。

(投稿資格)

広島県衛生研究所研究報告の論文の著者は原則として広島県衛生研究所職員とする。

(掲載内容)

1. 本誌は原則として広島県衛生研究所において行なった研究・調査の業績を掲載する。
2. 論文は未発表のものに限り、内容は次のとおりとする。
 - (1) 総 説 …… 内容形式は自由とする。
 - (2) 原 著 …… オリジナリティのあるものに限る。
 - (3) ノート …… オリジナリティのあるもので(2)にまとめ得ないもの。
 - (4) 資 料 …… 調査結果をまとめたものとする。

(論文執筆要領)

1. 論文原稿はA4判400字詰の原稿用紙を用い表題、著者名、緒言、方法、結果、考察、結語および文献等の順序に書くものとする。表題については和文でタイトル、氏名、所属、続いて欧文でタイトル、氏名、所属の順に記すものとする。本文は表題、著者名、所属の書き終わった後に3行あけて書き始めること。原著、ノートについては250語までの欧文抄録をタイプ用紙で付すこと。
2. 図表はA4判の用紙を用い、図の場合は図の下にそれぞれの一連番号を欧文でFig.1., 表の場合は表の上に Table 1. のようにつけ表題を、また、説明が必要な場合は図、または表の下に欧文で説明等を付けるものとする。本文中の図表のそう入位置は本文中に3行をあけて2行目にそう入図表の指示を赤筆で記す。ただし原著、ノート以外のものについては図表のタイトル説明を欧文にする必要はない。

例

	図	表					そ	う	入

} 3行

3. 謝辞は本文の次に1行あけて書きはじめる。

この研究に御理解を……

1行あける

4. 引用文献は本文中に〔1—4〕のように表わし、引用順に末尾に一括して記載する。
文献の書き方
理化学系

- 1) 雑誌：著者名：タイトル (略してもよい)、雑誌名、巻(号)頁、年(西暦)。
- 2) 単行本：著者名(編集者名、訳者名、監修者名)：書名(版)、編集(監修者名)母体、出版社名、発行地、発行年(西暦)、頁。

生物学系

- 1) 雑誌：著者名(西暦年)：タイトル(略してもよい)、雑誌名、巻(号)、頁(1—5)。
- 2) 単行本：著者名(編集者名、訳者名、監修者名)(西暦年)：書名(版)、頁(p.1—5)、発行地、発行書店。

5. 論文は平かな現代かな使いにより横書きとし、句読点は(.) (,)とする。以上の執筆要領のほかは日本薬学雑誌および日本細菌学雑誌等の執筆規定に準ずるものとする。
6. 原稿枚数は原則として総説40枚、原著および資料30枚、ノート10枚以内とする。

(論文の受理および採否)

1. 論文は各部の編集委員を通じて編集委員会に提出する。
2. 論文の採否は編集委員会の責任で決定する。

(校 正)

校正は三校までとし、内容の変更は認めない。

(別 刷)

論文1編につき50部とする。

編 集 委 員 会

坂 本 征 則 (委 員 長)
山 田 志 朗 (総 務 部)
金 本 康 生 (生 物 学 部)
水 田 満 里 (病 理 学 部)
金 森 久 幸 (理 化 学 部)
小 川 博 美 (食 品 衛 生 部)

広島県衛生研究所研究報告

第 33 号

1986年12月発行

発行所 広島県衛生研究所

広島市南区宇品神田1丁目5-70

〒734・電話(082)251-4371

印刷所 ㈱柳盛社印刷所

広島市中区東白鳥町8-23

〒730・電話(082)221-2148