

研 究 報 告

第28号

1981年11月

目 次

原 著

- TSI寒天培地上で非定型的な性状を示す *Salmonella paratyphi A* および
Salmonella paratyphi B 菌株について
中森純三, 宮崎佳都夫, 鬼村賢太郎, 土井秀之 ……1
- 日常食品のサルモネラ菌に対する突然変異原性
1. 加工食品について……………水田 満里 ……5
- ウシ膀胱原発性癌の2剖検例
妹尾正登, 海佐裕幸, 福田伸治, 河重豪, 田中 聖 ……11

資 料

- カキ衛生からみた広島湾の *Salmonella* 汚染について
福田伸治, 岸本敬之, 得能弘志, 佐々木実己子 ……19
- メロンから検出されたディルドリンおよびエンドリンについて
児玉陽太郎, 川上啓介 ……27
- ゆでめん中の過酸化水素について……………七瀬葉子, 高田久美代, 山田從麿 ……31
- 他誌掲載論文 (1980.9~1981.8)……………35

広島県衛生研究所

[734] 広島市南区字品神田1丁目5-70



TSI 寒天培地で非定型的な性状を示す *Salmonella paratyphi A* および *Salmonella paratyphi B* 菌株について

中 森 純 三* 宮 崎 佳 都 夫*
 鬼 村 賢 太 郎** 土 井 秀 之***

Unusual Strains of *Salmonella paratyphi A* and *Salmonella paratyphi B*: Their Atypical Characteristics on Triple Sugar-iron Agar Medium

JUNZO NAKAMORI*, KAZUO MIYAZAKI*,
 KENTARO ONIMURA**, and HIDEYUKI DOI***

(Received for publication July 31, 1981)

One strain of *Salmonella paratyphi A* and one strain of *Salmonella paratyphi B* both of which showed atypical characteristics on triple sugar-iron agar (TSI) were isolated from patients with non-typhoidal manifestation. Growth of the atypical strains on TSI and in broth were markedly slow as compared with the typical strains, and turned the slant of TSI to yellow, however, these strains never fermented sucrose and lactose in Andrade peptone water; decarboxylation and dihydrolyation of basic amino acids were less active in the atypical isolates than the typical strains.

緒 言

細菌の鑑別・同定を目的とする性状検査では、可及的少数の培地でかつ多項目の性状検査が望まれるところであって、その点に関してTSI寒天培地（以下TSIと略記する）は非常に合理的に考案されており、腸内細菌等の性状検査には、まず最初に用いられ、かつ使用頻度のもっとも高い培地のひとつである。しかしながら、きわめて稀ではあるが被検菌側の要因によってこの培地における性状が非定型的な場合があり〔1〕、このことが鑑別・同定に混乱を招くおそれもあるといえる。

今回、著者らは乳糖・蔗糖いづれも非発酵性であるにもかかわらずTSIの斜面部を黄変する *Salmonella*

paratyphi A および *Salmonella paratyphi B* の両菌株に遭遇した。これらの菌株がいづれもチフス性疾患以外の疾病の患者から分離されたものであることも興味深く、TSIにおける非定型的な性状の発現原因について若干の細菌学的検討を加えたのでその結果を報告する。

実験材料および実験方法

供試菌株

Salmonella paratyphi A 非定型性状株（以下P.A非定型株と略記する）：腎結石患者（56才，♂）の尿より分離された1株（Phage type: 3）。

S. paratyphi B 非定型性状株（以下P.B非定型株と略記する）：下腿骨膜炎患者（51才，♂）の患部骨髓よ

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

** 広島鉄道病院：Hiroshima Hospital of Japan National Railways

*** 国立呉病院：National Kure Hospital

り分離された1株 (Phage type : 3a).

P. A, P. B 両非定型株の分離をみた事例はいずれも除菌の困難な事例であって、前者では6か月、後者では8か月後迄の排菌が確認されている。

細菌学的検討の対照菌株として、いずれもチフス性患者から分離された *S. paratyphi A* および *S. paratyphi B* の各10株あてを実験に供した (これらの菌株はそれぞれをP. A正常株, P. B正常株と略記する)。

性状検査

1. T S I上の性状: 日水製薬および栄研化学両メーカーのT S Iを用いた。

2. 糖発酵試験: アンドレイドのペプトン水 [2] (自製) を用いてブドウ糖, 乳糖および蔗糖について行った。ブドウ糖からのガス産生は同培地にパラフィンを重ねることによって検知した。

3. アミノ酸脱炭酸および加水分解試験: Moellerの方法 [3] によって, L-リシン, L-オルニチン (脱炭酸) およびL-アルギニン (加水分解) について行った。

4. システム同定法による鑑別・同定: API-20E (Analytab Products Inc.) およびエンテロチューブ II (Roche Diagnostica) に Bacompté-E (パンテックデータサイエンスK.K.), Enteric Analyzer (Diagnostic Research Inc.) の組合せで行った。

5. 液体培地における増殖とpHの変動: Nutrient broth (Difco) に Bactopeptone (Difco) 0.5% を添加し, 出発pHを7.6としたものを用いた。ブドウ糖は無添加, 0.05%, 0.1%添加の3系列とした。培養は36°CでBiophotorecorder, TN-112D (東洋科学産業K.K.) を用いて振盪培養し, 増殖曲線を記録した。培養開始時の生菌数はほぼ $7.0 \times 10^3/ml$ とし, 培養終了時にも生菌数とpHの測定を行った。

結 果

1. 形態

普通寒天培地上でP. A, P. B両非定型株ともに, それぞれの定型株に比して若干小型で薄いコロニーを形成したが, いわゆる dwarf 型あるいは gonidial 型に該当するものではなく, smooth 型と判断された。光学顕微鏡観察では菌の形態に異常は認められず, グラム染色性も正常であった。

2. 生化学的性状 (Table 1)

P. A, P. Bともに非定型株ではT S I斜面部が20時間培養で黄変したが, 以後徐々に上端部より赤変した。

Table 1. Characteristics of the isolates

Test or substrate	Reaction*			
	<i>S. paratyphi A</i> atypical strain	typical strains	<i>S. paratyphi B</i> atypical strain	typical strains
TSI Agar				
Slant	A	K	A	K
Butt	A	A	A	A
Gas	-	+/-	-	+
H ₂ S	-	-	+	+
Andrade carbohydrate broth				
Lactose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Gas from glucose	+	+	+	+
Moeller decarboxylase broth				
Lysine	-	-	+ ^w	+
Arginine	-	+ ^d	+ ^d	+
Ornithine	+	+	+ ^w	+

* A : acid, K : alkaline, + : positive, +^w : weakly positive, +^d : delayed positive, - : negative

アンドレイドのペプトン水 (7日間培養) での乳糖・蔗糖の発酵テストはいずれも陰性であった。またT S Iでガス非産性であったP. A, P. B両非定型株ともにアンドレイドのペプトン水にパラフィンを重ねることによってブドウ糖からのガス産生が確認された。

Moellerの方法による塩基性アミノ酸の分解では, P. A非定型株のアルギニン加水分解が陰性となり, またP. B非定型株ではアルギニン加水分解が遅延するほか, リシン, オルニチンの脱炭酸も弱陽性にとどまった。これらの点が定型株と異なるところであった。

3. システム同定法による鑑別・同定

P. A, P. B両非定型株を用いての API-20E (Bacompté-Eによる解析), Enterotube II (同解析システムによる解析) およびこれらの性状についての Enteric Analyzerによる解析ではいずれも定型的なP. A, P. B株と同様な結果が得られ, 正しい同定が可能であった。

4. 液体培地における増殖とpHの変動 (Fig. 1, Table 2)

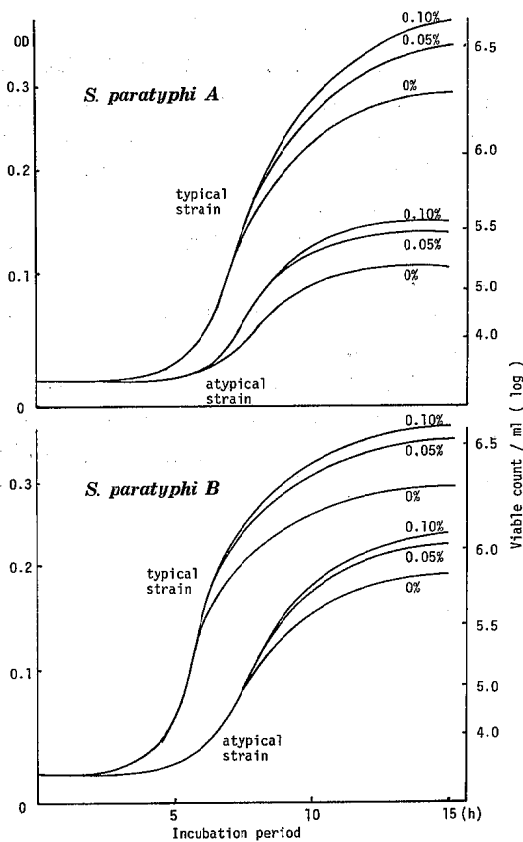


Fig. 1. Growth of *S. paratyphi A* and *S. paratyphi B* strains in modified nutrient broth containing indicated concentration (%) of glucose.

Medium: Nutrient broth (Difco) supplemented with 0.5% Bactopeptone. Initial population of test organisms were about 7×10^3 per milliliter.

Table 2. Change of pH of the modified nutrient broth after growth of the test organisms*

Organism	pH of the medium containing glucose:		
	0%	0.05%	0.10%
<i>S. paratyphi A</i>			
atypical strain	7.4	6.1	5.3
typical strain	9.0	9.0	9.0
<i>S. paratyphi B</i>			
atypical strain	8.0	7.6	6.9
typical strain	8.3	8.0	7.8

* Modified nutrient broth: Nutrient broth (Difco) supplemented with 0.5% Bactopeptone (Difco), initial pH=7.6. The pH value was measured after 20 h incubation.

P.A, P.B 両非定型株の増殖はそれぞれの定型株に比して遅延を示し、発育菌数も P.A で約1/10, P.B でも1/5にとどまった。これらにブドウ糖を0.05~0.1% 添加することによって増殖は若干促進された (Fig. 1)。Nutrient brothにおけるpHの上昇は P.A, P.Bともに非定型株のそれが軽度であり、ブドウ糖発酵によるpHの低下は非定型株においてより著明であった (Table 2)。

以上の結果より、P.A, P.Bそれぞれの非定型株は通常の培養時間ではTSI斜面部を黄変するにもかかわらず、実際には乳糖・蔗糖非分解性であることが明らかとなった。またこれらの菌株は塩基性アミノ酸の脱炭酸あるいは加水分解活性が定型株に比して明らかに低いことが確認された。さらにペプトン含有培地における増殖が定型株に比して劣り、したがって培地のpHの上昇もごく軽度なものとどまることも明らかにされた。これらの諸点から、非定型株のTSI斜面部の黄変は微量のブドウ糖の発酵によるものと判断された。

考 察

本実験に供されたP.A, P.B両非定型株には塩基性アミノ酸の脱炭酸あるいは加水分解の活性の低下が認められたが、TSIのような混合ペプトン含有培地のpHの上昇を支配する因子としては、前述の事項以外にアミノ酸の脱アミノや他の有機酸の脱炭酸等も無視することはできず、特定の反応系の活性低下に限定するには至らなかった。

ここに述べたようなTSIで異常な性状を示す菌株はきわめて稀な存在とされている(坂崎利一博士私信)が、今後も本報告で述べたような非定型的な性状を示す菌株による感染事例の発生も考えられ、またブラジルでは1971年から乳糖発酵性の *S. typhimurium* による事例 [1] もみられており、わが国でもリン脱炭酸能の欠除した *S. enteritidis* による集団発生例が確認されている [4]。このような非定型株の同定に際しては、従来法のみでは混乱を生ずる可能性は否定できない。今回の供試菌株はいずれもシステム同定法では容易に鑑別・同定が可能であって、これらの有用性を明示する事例であったといえる。

なお本報告で扱ったP.A, P.B両非定型株はいずれも典型的なチフス性疾患もしくは腸管感染症の起因菌として分離されたものではなく、近年の感染症の多様化傾向を示す事例ともみられる点でも注目したい。

要 約

T S I寒天培地上で非定型的な性状を示す *Salmonella paratyphi A* および *Salmonella paratyphi B* 菌株がチフス性疾患以外の患者より分離された。これらの菌株は常用培地での増殖が遅延し、乳糖・蔗糖非分解性であるにもかかわらずT S I寒天培地の斜面部を黄変した。またこれらの菌株には塩基性アミノ酸の脱炭酸あるいは加水分解の活性低下が認められた。

おわりに、貴重な御助言をいただいた国立予防衛生研究所・坂崎利一博士に厚く御礼申しあげるとともに、御指導御校閲いただいた当研究所生物学部長・西尾隆昌博士にも深謝する。

文 献

- [1] Falcao, D. P., L. R. Trabulsi, F. W., Hickman, and J. J. Farmer, III. (1975): Unusual *Enterobacteriaceae*: Lactose-positive *Salmonella typhimurium* which is endemic in São Paulo, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 2: 349—353.
- [2] 坂崎利一 (1967): 培地学各論(1), P. 152, 東京, 納谷書店.
- [3] 坂崎利一 (1967): 培地学各論(1), P. 120—122, 東京, 納谷書店.
- [4] 赤羽荘資, 浅川 豊, 岩本喜久子, 野口政輝 (1972): リシン脱炭酸能陰性 *Salmonella enteritidis* による集団食中毒事例について. 静岡県衛生研究所年報, 16: 13—21.

日常食品のサルモネラ菌に対する突然変異原性

1. 加工食品について

水 田 満 里*

Mutagenicity Assay of Ordinary Foods

1. Processed Foods

MARI MIZUTA*

(Received for publication August 31, 1981)

Extracts of ordinary foods were tested using the Salmonella / mammalian microsome mutagenicity assay.

Mutagenicity was not shown in most of the tested extracts except for pickles, some of which were mutagenic to TA 98 with S-9 mix.

The mutagen of pickles was isolated and identified as the flavonoid, "Kaempferol".

In the course of the examination, it was noticed that histidine content was 60 μ g or more per plate increased the number of spontaneous revertant colonies, but the histidine content of any extracts tested was less than 60 μ g per plate.

はじめに

環境中の変異原物質が世界的に探索されはじめて以来今日迄、無数の変異原物質の存在が明らかにされた。従来、化学物質の変異原追求に端を発したこの分野も、最近では日常食品にまで適用され、コーヒーやお茶、アルコール性飲料にも変異原物質が存在することが明らかにされている [5, 6, 8]。

一般的に、加工食品は材料が種々雑多であり、着色料、保存料等の食品添加物も数多く含まれており、外的条件（保存日数、光、温度）の影響も受けやすく、食品中で複雑な反応系が進んでいる可能性も考えられる。

今回、そのような可能性を包含していると推定される加工食品に注目して、サルモネラ菌に対する突然変異原性を調査した。

なお、食品等の粗抽出物について、サルモネラの突然変異原性の試験法の確立はされていないのが現状である。そこで、今回日常食品をサルモネラの Ames テストに使用する場合の問題点もあわせて検討したので報告

する。

実験方法

試料：昭和54、55年に広島市内のスーパーマーケット等で購入した106試料、内訳は表1に示した。

使用菌株および培地：*Salmonella typhimurium* TA100 およびTA98の一夜培養した菌液を用いた。

培地はグルコース加 Vogel Bonner 寒天培地を用い、ソフトアガーは0.6% NaCl 寒天に0.5 mM L-ヒスタジン、ビオチンを加えたものを使用した。

S-9 mix の調整：ウイスター系ラットの4週令にPCB誘導した肝臓の9,000 G上清にNADPH産生系の酵素系(G6p NADH NADPH)を加えた。

変異原性の検出：Ames [1] のスタンダード・メソッドに矢作 [9] のプレ・インキュベーション法を併用した。

検体(100 μ l以内)にリン酸緩衝液0.5ml(又は代謝活性化のためにはS-9 mix 0.5 ml)に菌液0.1ml加え37 $^{\circ}$ C20分振盪培養し、ソフトアガーを2ml加えて培地に

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

Table 1. Histidine content of extracts

	Number	Histidine $\mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$				lethality
		<10	10-30	30-60	60<	
Pickles	27	19				8
"Tsukudani" (Preserved food boiled down in soy)	7	5		1		1
Paste foods	21	15	5			1
Instant foods	26	14	4	1		7
"Miso" (bean paste)	21	14	5	1		1
Taste foods	4	1				3

Table 2. Mutagenicities of processed foods

Foods Samples	g/plate (wet)	His ⁺ revertants / plate ^a				Histidine ^b in Extracts $\mu\text{g}/\text{plate}$
		TA 100		TA 98		
		S-9(-)	S-9(+)	S-9(-)	S-9(+)	
Pickle 1	0.5	0	223	0	319	—
(Suguki)	0.25	0	144	0	135	—
Pickle 2	3.2	0	50	0	155	—
(Takana)	1.6	0	0	0	50	—
Pickle 3	2	0	167	0	244	—
(Nozawana)	1	40	132	0	122	—
Pickle 4	1.2	0	150	0	240	—
(Hiroshimana)	0.6	0	59	0	137	—
Menma	1	0	0	0	70	—
	0.5	0	0	0	53	—
"Tsukudani"	1.5	197	124	0	29	50
	0.75	102	102	0	9	25
"Miso" 1	1.7	51	24	0	44	—
"Miso" 2	1.7	89	20	5	31	—
"Miso" 3	1.7	35	90	0	16	—
Control		86±9	85±10	22±6	38±11	

^a Average of 3 expts., Spontaneous revertants have been subtracted.

^b (-): <10 μg .

場合において、いずれもTA100よりもTA98に対してS-9 プラスで強く活性を示した。これらの漬物には問題となるヒスチジンは含まれていなかった。

味噌類は21試料中、3試料がTA98, TA 100 のS-9 プラスで低い活性を示したにすぎず、しかも検査可能な最大量で低い活性であった。

味噌類は他にも、活性があるとは言えないが自然突然変異コロニー数を越えた変異コロニー数を示すものも多

かったので、味噌類に含まれる他のアミノ酸の影響による疑いもすべて切れない。

佃煮(クジラ)はTA100に対してダイレクトに活性を示したが、これはテスト検液に含まれているヒスチジン量の影響を受けている可能性が強い。

たかな漬の変異原物質の同定について

変異原活性を示した漬物の中で、たかな漬について変

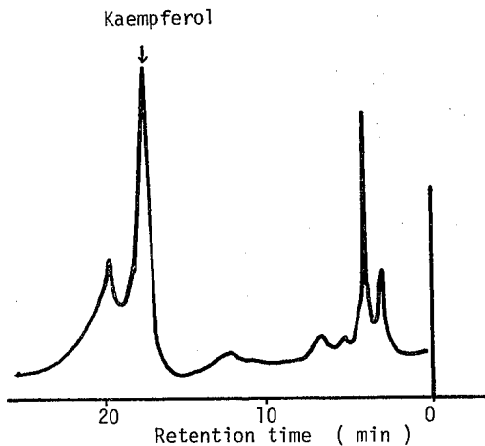


Fig. 3. HPLC pattern of Sephadex LH-20 eluate.
Solvent : 20% methanol-acetic acid-methanol (65 : 5 : 30).
Column : μ -Bondapak C₁₈.

異原物質の分離同定を試みた。たかな漬のメタノール、クロロホルム抽出物の変異原活性はメタノール抽出液に含まれているので、メタノール抽出物を Sephadex LH-20 (2.6×70cm) カラムでメタノールで溶出させるとカラムの流出の終りに活性画分が流出してくる。その画分を濃縮して TLC (Merk Art 5735) で溶媒 ベンゼン：酢酸：水 (41.7 : 26 : 1) でみると Rf=0.64 で Kaempferol (Rf=0.64) と同じ位置にあった。なお HPLC で同定を試みた結果、Kaempferol であることを確認した (Fig. 3)。

結 論

食品の粗抽出物を Ames テストにかける際の問題点として、試料検液中のヒスチジン量がテスト結果におよぼす影響が考えられるので、ヒスチジン量と自然突然変異コロニー数の関係を検討した結果、ヒスチジン量が増加するにつれて、変異コロニー数が増加し、ヒスチジン量が多すぎると逆に下向する曲線のパターンを示した。とくに、TA100においてその傾向が著しく、プレートあたりヒスチジン量 60 μ g 含まれると自然突然変異コロニー数が2倍に増加するが、今回の試料検液中にはヒスチジン 60 μ g/プレートを超えるものはなかった。

長尾ら [4] は、日常食品についてのサルモネラに対する突然変異原性を調べた結果、約50%のものに変異原性があることを報告しているが、今回調査した加工食品

106 試料のうち、約8%のものが変異原活性を示したにすぎない。しかも、漬物を除くと低い活性を示すものが多かった。長尾らは、し好品としてのお茶、コーヒー、酒、醗酵食品の味噌類の一部について調べた結果であるため、今回の調査した試料と内容が異なっているため、高い陽性率を示したものと思われる。

漬物の中でたかな漬について変異原物質を分離同定したところ kaempferol であることが判明した。Lu [2]、高橋ら [7] は中国の喉頭癌の発癌率の高い地域の漬物について変異原物質を同定したところ、Kaempferol であることを報告している。しかし、Kaempferol 等の Flavonoids は植物成分として到るところにあるものであるから、漬物に特異的であるとは考えられないと言われている。

しかしながら、著者は原材料と、漬物にした場合の変異原性を調べた結果、原材料に比して、顕著な Kaempferol の増加をみているために、漬物にすることによって、植物成分として含まれる配糖体の aglycone 量が多くなって、変異原活性が増すのではないかと推察しているが、このことについては、現在、更に詳細を検討中である。

おわりに、終始、御助言、御指導をいただきました当研究所、海佐裕幸所長に深く感謝致します。また、高速液体クロマトグラフィーによる同定に関しましては、当所研究員金森久幸氏にご協力いただきました。ここに併せて感謝致します。

本論文の要旨は、日本環境変異原学会、第9回研究発表会 (昭和55年11月28日、岡山市) において発表した。

引用文献

- [1] Ames, N. B., Maccann, J. and Yamazaki, E. (1975) : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella / mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, **31** : 347-364.
- [2] Lu, S., Camus, A. and Tomatis, L. and Bartsh, H. (1981) : Mutagenicity of extracts of pickled vegetables collected in cancer in Northern China. *Jnci.*, **66** : 33-36.
- [3] 松岡美代子, 宮地隆興 (1976) : 先天性代謝異常症のマス・スクリーニング検査 [ガスリー法]. 臨

- 床病理, **24**: 962—973.
- [4] 長尾美奈子, 高橋由利, 矢作多貴江, 杉村 隆 (1978): 日常食品のサルモネラ 菌に対する突然変異原性. 日本環境変異原学会. 第7回研究発表会: 講演要旨集.
- [5] Nagao, M., Takahashi, Y., Yamanaka, H. and Sugimura, T. (1979): Mutagens in coffee and tea. *Mutation Research*, **68**: 101—106.
- [6] Nagao, M., Takahashi, Y., Wakabayashi, K. and Sugimura, T. (1981): Mutagenicity of alcoholic beverages. *Mutation Research*, **88**: 147—154.
- [7] Takahashi, Y., Nagao, M., Fujino, T., Yamaizumi, Z. and Sugimura, T. (1979): Mutagens in Japanese pickle identified as flavonoids. *Mutation Research*, **68**: 117—123.
- [8] Uyeta, M., Taue, S. and Mazaki, M. (1981): Mutagenicity of hydrosates of tea infusion. *Mutation Research*, **85**: 233—240.
- [9] 矢作多貴江 (1975): 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について. 蛋白質・核酸・酵素, **20**: 1178—1189.

ウシ膀胱原発性癌の2剖検例

妹尾 正登* 海佐 裕幸* 福田 伸治*
河重 豪** 田中 聖**

Primary Carcinomas of the Urinary Bladders in Two Cattle

MASATO SENO*, HIROYUKI UMISA*, SHINJI FUKUDA*,
TSUYOSHI KAWASHIGE** AND KIYOSHI TANAKA**

(Received for publication July 30, 1981)

Patho-morphological investigation was carried out on two cases of urinary bladder tumor in cattle, which were obtained at the routine meat inspection. Results obtained were summarized as follows:

The animals of Case 1 and 2 were eleven years old cattle of a Japanese Black breed and weighing 410 kg and 360 kg respectively. Clinically, haematuria was showed in both cases. Autopsy findings: In Case 1, there were enlargement of the urinary bladder and papillary or cauliflowerlike changes of the mucosa with hemorrhages. In Case 2, there were enlargement of the urinary bladder with papillary proliferation and hemorrhage in the trigone, hard softball-sized mass which was fixed to the outside of the urinary bladder, hydronephrosis and pyelonephritis. Histological findings: In Case 1, papillary lesions were covered by neoplastic epithelium with nuclear abnormalities and increasing in the number of epithelial layers. Neoplastic cells with striking nuclear abnormalities have invaded the wall of the urinary bladder. In Case 2, epithelial lesions were characterized by the presence of keratinized cells with nuclear abnormalities. Neoplastic cells showing the keratinization and pearl formation have invaded the wall of the urinary bladder. Therefore, the diagnoses of transitional cell carcinoma and squamous cell carcinoma were made respectively. The causal genesis and the morphogenesis of these two urinary bladder carcinomas were discussed in relation to general factors of spontaneous bovine urinary bladder tumorigenesis. A histological survey of urinary bladder tumor in Miyoshi Meat Inspection Center, Hiroshima Prefecture showed an incidence of one case per 6 000 cattle slaughtered.

序 文

ウシの膀胱腫瘍は、諸外国〔20, 21〕同様に我国でも血尿症との関係において北海道根室地方および東北地方の地域的発生など多数の報告がなされ〔7, 8, 11—13, 29, 31〕, 近年関心が高まっている。その自然発生

要因に関する実験的追求も行われ一定の成果が上がっている。しかし、その発生状況および腫瘍発生機序などについてはまだ解明されるべき点が数多く残されている。一方、ヒトの膀胱腫瘍は尿路腫瘍の中で最も多く、しかも増加の傾向にあり職業性膀胱癌と共に環境的因子が考

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

** 広島県三次食肉衛生検査所: Miyoshi Meat Inspection Center, Hiroshima Prefecture

えられ病因的に興味もたれている〔10〕。そこで比較病理学的立場から、不明な点の多い家畜の膀胱腫瘍について形態学的特徴を踏まえて、その発生状況の実態を明らかにしていくことは極めて有意義と考える。

このような観点から著者らは、ウシ膀胱腫瘍の2例を経験し、観察する機会を得たので若干の考察を試みた。

材料および方法

患畜は2例共広島県三次食肉衛生検査所へと畜として搬入されたものである。

症例 1) 広島県双三郡作木村で繁殖用として飼育されていた黒毛和種、メス11才、体重410kgのウシである。

症例 2) 広島県比婆郡高野町で繁殖用として飼育されていた黒毛和種、メス11才、体重360kgのウシである。

生体検査後、と殺して肉眼的観察を行い、異常部の組織検体を10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋、薄切を行い、H. E. 染色と、必要に応じてP. A. S. 染色、ジアスターゼ消化試験および渡辺の鍍銀染色を常法に従って実施し鏡検した。なお組織学的検査は、肉眼的に異常所見を認めた部位についてのみの部分的なものである。

成 績

I 臨床所見

症例 1) 排尿障害、血尿および直腸検査により膀胱の腫大を認めた。その他に著変は認められなかった。

症例 2) 排尿障害、血尿および直腸検査により膀胱外側部にソフトボール大の腫瘤物を触知した。その他に著変は認められなかった。

II 剖検所見

症例 1) 膀胱は直径10×15cm大とやや腫大し、硬度は石様であった。粘膜面は帯黄白色で、膀胱尖から膀胱体まで大豆大から母指頭大の乳頭状乃至カリフラワー状腫瘤で全面がおおわれ、随所に出血が認められた(Fig. 1)。腫瘤部粘膜面の硬度は軟であった。また膀胱壁は約4cm前後に肥厚していた。その他の臓器には、肉眼的に著変を見出し得なかった。

症例 2) 膀胱は直径10×15cm大とやや腫大し、壁も約2cmと肥厚し硬度は石様であった。膀胱三角部を中心とし直径12cmの範囲の粘膜は、大豆大から母指頭大の乳頭状腫瘤でおおわれその中心部に出血が認められた(Fig. 2)。その部位の膀胱外側にソフトボール大の腫瘤が認められ、粘膜面における出血巣は腫瘤部内部と連続

していた。腫瘤の硬度は石様であった。

右腎は萎縮し、断面は腎実質を認め難く、腎嚢胞を形成し膿を入れていた。左腎はやや腫大し、表面は白色の斑点が散在しやや混濁しており被膜の剥離は難であった。断面における皮質部は混濁していた。尿管は特に左側が著明に拡張していた。その他の臓器には、肉眼的に著変を見出し得なかった。

III 病理組織学的所見

症例 1) (膀胱) 腫瘍性変化を示す部位では、粘膜表層部に大小種々の乳頭状増殖が認められ、その乳頭状部の腫瘍化した被覆上皮細胞は3～10層の重層化を示し、同部の腫瘍基質は比較的毛細血管に富む浮腫性の粗性結合織から成っている(Fig. 3)。また基質内には少量ながら小型リンパ球および形質細胞の浸潤が認められる。

表層部被覆上皮の腫瘍組織には、細胞質が酸好性で軽度の hyperchromasia を示す円形または卵円形の核をもつ異型度の低い腫瘍細胞から成る部位(Fig. 4)と、比較的クロマチン構造が粗で明るい円形または卵円形の核をもち多形性の強い腫瘍細胞から成り、異型性のやや強い部位(Fig. 5)とが混在している。さらにクロマチン構造が粗となり核小体1～2個をもつ異型性を増した部位の表層腫瘍細胞は、巣状乃至索状構造を呈しながら固有層内に浸潤増殖している(Fig. 6)。

さらにこれらの腫瘍細胞は、粘膜固有層から筋層上部の粘膜下織まで同様に浸潤増殖している。浸潤性増殖部の腫瘍細胞は、退形成が極めて強く、比較的明るくクロマチン構造が粗であり核小体1～2個をもつ円形または卵円形の核は著しい大小不同を示し、大きいものは正常移行上皮細胞のそれに比して2倍以上であり、また細胞質は表層部腫瘍細胞に比して酸好性が増加している。分裂像は高度に認められる(Fig. 7)。腫瘍基質においては、好酸球および形質細胞を主とする円形細胞の浸潤および線維性結合織の著明な増生が認められる。

粘膜固有層における腫瘍組織は部分的に腺管様構造を呈していたが、管腔内容物および腺様上皮腫瘍細胞は、P. A. S. 染色陽性でジアスターゼ消化試験において抵抗性を示し、移行上皮細胞から腺上皮細胞への化生と見做される。

その他被覆上皮細胞の脱落、固有層における慢性出血等が認められる。

症例 2) (膀胱) 腫瘍性変化を示す粘膜における腫瘍細胞は、その表層部で扁平上皮化生を示し、さらに最表層部において角化を呈しているのが特徴として注目され

る (Fig. 8). それらに隣接した粘膜表層部では、腫瘍化した被覆上皮細胞が3~10層の重層化を示し、大小種々の乳頭状増殖が認められ、その腫瘍基質は、リンパ球、形質細胞および好酸球の浸潤を伴った毛細血管に富む浮腫性の粗性結合織から成っている (Fig. 9).

表層の扁平上皮化生を示す腫瘍部上皮は、基底部では円形または卵円形で明るく正常移行上皮に比してやや大きい核で細胞質は弱塩基好性の異型度の中程度の腫瘍細胞から成っており、表層部では核が扁平化し細胞質は弱酸好性となり、最表層部は角化が著明である。化生を示さない表層腫瘍部位では、円形または卵円形の核は前者の基底部腫瘍細胞に比して小さく、細胞質は弱酸性乃至弱塩基好性の腫瘍細胞が重層化を示してはいるが異型度は低い。これらの表層部における分裂像は少ない。

表層の化生を示す部位の腫瘍細胞は、基底膜を打ち破り粘膜固有層内に巣状乃至索状に浸潤増殖し、表層同様に扁平上皮化生を示しそれら集簇の中心部において角化が認められる (Fig. 10). これらの腫瘍細胞は、粘膜固有層からさらに粘膜下織および筋層にまで浸潤増殖している。浸潤増殖部の腫瘍細胞は、表層部のそれに比してやや核が大きくクロマチン構造は粗で核小体1~2個をもち異型度が強い。間質においては、好酸球の浸潤が認められる。

(膀胱外側部腫瘤) 上記同様の腫瘍細胞が巣状乃至索状に浸潤増殖し、腫瘍細胞集簇の中心部で角化が認められる。間質は線維性結合織より成っている。

(腎臓および尿管) 腎では尿管の変性壊死および間質へのリンパ球を主とする炎症性細胞の浸潤が認められる。尿管では、粘膜における好酸球を主とした炎症性細胞の動員像および結合織増生が著明である。

IV 病理組織学的診断

以上の所見より病理組織学的には次の如く診断し得る。

症例 1) 膀胱原発性の乳頭状移行上皮癌

症例 2) 膀胱原発性の扁平上皮癌

さらに W. H. O. 分類 [21] に従えばそれぞれ、transitional cell carcinoma, papillary and infiltrating, with glandular metaplasia, grade III. と squamous cell carcinoma, grade II. に相当する。因みにヒトの A. F. I. P. 分類 [9] に従えばそれぞれ invasive papillary carcinoma, grade III. と squamous cell carcinoma, grade II. に相当する。

考 察

膀胱腫瘍の真の発生病因はなお不明であるが、ヒトにおける発生要因の研究は、1895年 Rehn [27] がアニリン系色素の工場労働者に膀胱腫瘍の発生頻度が高いことに気づき、原料のアニリンを発生原因と見做しアニリン膀胱癌と称し、膀胱腫瘍に職業性癌という概念を導入したことにより始まり、その後種々の膀胱化学発癌物質が認められるに至り比較的研究成果があがっている。

一方、ウシ膀胱腫瘍の自然発生要因は、主にワラビおよび bovine papilloma virus に関して論じられているので、先ずそれらの研究を概説し、次に自験例について考察を試みる。

I ウシ膀胱腫瘍発生要因研究の概観

血尿症のウシにしばしば膀胱腫瘍が見出されることは、古くから知られていたが [19, 20], 1960年 Rosenberger と Heesch [28] は長期間ワラビを摂取したウシの膀胱粘膜にポリープ様の腫瘍が発生し、血尿を起こすことを見出し、ワラビ中の発癌性物質の存在を最初に示唆した。さらに、1963年 Pamukcu [20] もウシの血尿症および膀胱腫瘍の発生地域とワラビの分布地域との間に密接な関係があることを強調した。そして、1965年 Evans と Mason [4] は、ワラビ中毒の症状からワラビ中にはラジウム類似の物質が含まれていると考え、そのような物質は恐らく発癌性を有するという推察から、ワラビ乾燥粉末34%基本飼料66%の混合ペレットを作製し、64日間これを7週令ラットに投与して、腸管特に回腸に多発性腺癌を発生せしめてワラビの発癌性を明確に証明した。ウシでは、1967年 Pamukcu ら [22] がウシ18頭にワラビを摂食せしめ、3例の癌腫を含む10例に平均550日で膀胱腫瘍の発生を認めた。その後、Price ら [25], Pamukcu ら [23] および Hirono ら [6] も同様にウシおよびラットでワラビの発癌性を確認した。さらにワラビの発癌性はウシ、ラットのみならずマウス、ハムスター、モルモット、ウズラなど各種動物において証明されている [3, 30]。また前田 [12] はワラビの給与、採食の機会を排除することにより腫瘍性血尿症の発病を防止した事例を認めており、ワラビは現在ウシ膀胱腫瘍自然発生の一要因と考えられるに至っている。

一方、1959年 Olson ら [17], 1960年 Price ら [26] はウシの皮膚乳頭腫懸濁液の膀胱粘膜下織への接種により粘膜のポリープと粘膜下織の線維腫様変化を報告し、

ウイルスまたは同様の因子の存在を示唆した。その後 Brobst と Olson [1] は、ウシの皮膚乳頭腫懸濁液をホルマリン固定した懸濁液でワクチネーションしたウシと、未処置のウシの膀胱に皮膚乳頭腫懸濁液を接種し線維腫の発生を認め、ワクチネーションしたウシは一般に未処置のものに比してその腫瘍が小さかったと報告した。また Olson ら [18] は逆にウシ自然発生膀胱腫瘍の懸濁液を皮膚および膈に接種し、線維乳頭腫の発現を認めている。一方ヒトにおいても、膀胱腫瘍組織中の電顕によるウイルスの証明の報告 [5] などより関連性が論じられている。しかしながら、ウシ膀胱腫瘍とウイルスとの関係は、確証に乏しく今後の検討課題といえよう。

II 自験例の検討

発癌要因のワラビと自験例との関係についてみると、症例1は粗飼料(稲ワラ)を主体に濃厚飼料およびふすまを給飼され、ワラビを食する機会は成牛となってからは見出されない。前田 [12] はワラビの環境から隔離されてから1~2年またはそれ以上経過して膀胱腫瘍の発症した例を経験し、その環境にない患者でもワラビとの関係をさかのぼって調査する必要性を指摘している。症例1では、不明な育成期にワラビを採食した可能性も残るが、Pamukcu ら [22] および Price ら [25] の発癌実験での投与量は1日当り200~1,000gであり、期間は276~1,920日であることを併せ考えて、ワラビによる発癌も完全に否定し得ないが、その可能性は極めて低いと推察される。

症例2は、飼料として牧草を給飼されており、当地方にはワラビの植生が多いことと、前述した一連のワラビによる発癌実験および前田 [12] の中国地方における腫瘍性血尿症とワラビの調査結果等を考えると、ワラビが本腫瘍の発生に関与した可能性も否定は出来ないであろう。

一方、Yoshikawa ら [31] はウシ膀胱腫瘍53例を検索し、悪性度が中等度以下の症例の内約20%に塩基性核内封入体を認め、前述した皮膚乳頭腫および膀胱腫瘍移植実験の結果 [17,18] を踏まえて、bovine papilloma virus 様ウイルス感染の可能性を示唆しているが、自験例2例には、それを認め得なかった。しかし、膀胱腫瘍と封入体との関係は、重要な今後の追求課題であろう。

症例1の腫瘍部粘膜上皮層では、重層化を示しているが異型度の低い、いわゆる乳頭腫に相当する部位と異型度をやや増した部位とが混在していた。さらに悪性度を

増した部分では重層化を示さず退形成の強い腫瘍細胞が固有層内に浸潤増殖していた。これらの所見より形態発生的には、先ず粘膜上皮層において移行上皮の増生、重層化が起り乳頭状化し、それらが悪性度を増し、ついに浸潤性の増殖形態をとったものと考えるのが妥当と思われる [9, 31]。

症例2の膀胱粘膜上皮層における腫瘍細胞は扁平上皮癌の形態を示し、それらの腫瘍細胞は、固有層さらに深部にまで浸潤増殖していた。この癌病巣に隣接した粘膜上皮では移行上皮の重層化および軽度の異型化が認められた。これらの所見より形態発生的には、移行上皮層において先ず扁平上皮化が生じ、次いでそれらが腫瘍化し、悪性度を増した腫瘍細胞が固有層内さらには深層にまで浸潤増殖したとの想定も可能であろう。事実ヒトにおいて扁平上皮癌の膀胱に扁平上皮化生はよく観察されているところである [9]。しかし、先ず上皮層における移行上皮細胞の増生および重層化が起りそれらが化生、癌化の道をたどったのか、最初に化生が起り次いで腫瘍化が起った後またはそれと同時に周囲上皮に増生が起ったのかは今回の検索では明確にし得なかった。なおヒトにおいて住血吸虫症の患者の膀胱癌に扁平上皮癌が多く [9, 10]、虫卵による慢性刺激が原因と考えられているのは興味深い。

症例2では、腫瘍組織中心の壊死部より出血が起っていた。また膀胱腫瘍による排尿障害次いで尿停滞が起り、その結果逆行性に腎盂腎炎をひき起したものと考えられる。

腫瘍部間質における炎症性細胞の浸潤および結合織の増生は多く報告されているところであるが [7, 11, 13, 31]、これは腫瘍化の前段階と見做すより症例1, 2共に、腫瘍による尿停滞に起因した炎症像と腫瘍性の間質反応との混成像と見做すべきであろう。ただし、この腫瘍性間質反応が腫瘍細胞に対する防御の反応であるか、腫瘍の破壊により遊離した物質に対する反応であるか、また二次的感染による感染性反応であるかは、今後精細に検討する必要がある。

Pamukcu [21] によればウシ膀胱腫瘍は、ある特定地域では高いところで2才令以上のと殺牛の25%に見られる程高率に発生する。しかしこれら特定地域外では極めてまれである [2, 14, 15, 24]。また、組織型別では、悪性上皮性腫瘍の内移行上皮癌が75%前後、扁平上皮癌および腺癌がそれぞれ10%程度、その他数%と言われており [16, 21]、ヒトにおけるそれ [10] と類似し

ている。三次食肉衛生検査所におけるウシの膀胱腫瘍の発生頻度は、約6,000分の1の割合であった。この数値は若干高いように思われる。今後症例を重ね組織型別頻度等も含めさらに精細に検討する必要がある。

要 約

と畜検査時に見出されたウシの膀胱腫瘍の2例を病理形態学的に検索し、得られた成績は以下の如く要約される。

1) 患畜は症例1, 2共黒毛和種, 11才の雌牛で体重はそれぞれ410kgと360kgであった。

2) 臨床的には2例共血尿を認め、肉眼的には症例1は膀胱の腫大、粘膜面における出血を伴った乳頭状乃至カリフラワー状腫瘍の形成、症例2は膀胱の腫大、膀胱三角部における乳頭状変化および出血、膀胱外側部におけるソフトボール大腫瘍形成、尿管拡張および腎盂腎炎像が目された。

3) 組織学的には、症例1の乳頭状病巣部移行上皮細胞は異型化および重層化を示し、それらの腫瘍細胞は異型度を増しながら下床へ浸潤増殖しており移行上皮癌と診断した。症例2の膀胱病巣部は、腫瘍細胞が特徴的な角化および癌真珠形成を示しつつ浸潤増殖しており扁平上皮癌と診断した。

4) ウシ膀胱腫瘍の自然発生要因の研究を概説し、それら要因と自験例との関連性および形態発生について論じた。

5) 広島県三次食肉衛生検査所におけるウシ膀胱腫瘍の発現頻度は、約6,000分の1の割合であることを示した。

文 献

- [1] Brobst, D.F., and Olson, C. (1965). Histopathology of urinary bladder tumors induced by bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer Res.* 25, 12—19.
- [2] Cotchin, E. (1960). Tumours of farm animals: A survey of tumours examined at the Royal Veterinary College, London, during 1950—60. *Vet. Rec.* 72, 816—822.
- [3] Evans, I.A. (1968). The radiomimetic nature of bracken toxin. *Cancer Res.* 28, 2252—2261.
- [4] Evans, I. A., and Mason, J. (1965). Carcinogenic activity of bracken. *Nature (Lond.)* 208, 913—914.
- [5] Fraley, E. E., Elliott, A. Y., Castro, A. E., Cleveland, P., Hakala, T., and Stein, N. (1974). Ribonucleic acid virus associated with human urothelial tumors: Significance for diagnosis and treatment. *J. Urol.* 111, 378—381.
- [6] Hirono, I., Shibuya, C., Fushimi, K., and Haga, M. (1970). Studies on carcinogenic properties of bracken, *Pteridium aquilinum*. *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 179—188.
- [7] 乾純夫, 岩田明敏 (1963). 膀胱腫瘍を認めた牛の血尿症3例. 家畜試研究報告 47, 59—66.
- [8] Ito, T., Miura, S., Ohshima, K., and Numakunai, S. (1971). Ultrastructural studies of bovine urinary bladders with special reference to enzootic bovine hematuria. *Jpn. J. Vet. Sci.* 33, 127—135.
- [9] Koss, L. G. (1975). Tumors of the urinary bladders. A.F.I.P., Washington, D.C., U.S.A..
- [10] 古武敏彦, 長船匡男, 松田稔, 園田孝夫(1977). 膀胱腫瘍. 医学のあゆみ 103, 169—174.
- [11] 前田勉(1978). 牛の腫瘍性血尿症に関する研究. IV. 膀胱腫瘍とその病理形態発生について. 日獣会誌 31, 78—83.
- [12] 前田勉(1978). 牛の腫瘍性血尿症に関する研究. V. 発病原因について. 日獣会誌 31, 277—282.
- [13] 前田勉, 津村巖, 大竹修, 高橋充雄 (1974). 牛の腫瘍性血尿症に関する研究. II. 岡山県北部山間地区の和牛における発生例について. 日獣会誌 27, 749—752.
- [14] Misdorp, W. (1967). Tumours in large domestic animals in the Netherlands. *J. Comp. Pathol.* 77, 211—217.
- [15] Monlux, A.W., Anderson, W.A., and Davis, C.L. (1956). A survey of tumors occurring in cattle, sheep, and swine. *Am. J. Vet. Res.* 17, 646—677.
- [16] Moulton, J. E. (1978). Tumors in domestic animals, 2nd edition, 295—308, Los Angeles, Univ. California Press.
- [17] Olson, C., Pamukcu, A. M., Brobst, D. F.,

- Kowalczyk, T., Satter, E. J., and Price, J.M. (1959). A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer Res.* 19, 779—783.
- [18] Olson, C., Pamukcu, A. M., and Brobst, D. F. (1965). Papilloma-like virus from bovine urinary bladder tumors. *Cancer Res.* 25, 840—849.
- [19] Pamukcu, A. M. (1957). Tumors of the urinary bladder in cattle and water buffalo affected with enzootic bovine hematuria. *Zentralbl. Vet.-Med.* 4, 185—197.
- [20] Pamukcu, A. M. (1963). Epidemiologic studies on urinary bladder tumors in Turkish cattle. *Ann. New York Acad. Sci.* 108, 938—947.
- [21] Pamukcu, A. M. (1974). International histological classification of tumours of domestic animals. III. Tumours of the urinary bladder. *Bull. WHO* 50, 43—52.
- [22] Pamukcu, A. M., Goksoy, S. K., and Price, J. M. (1967). Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. *Cancer Res.* 27, 917—924.
- [23] Pamukcu, A. M., and Price, J. M. (1969). Induction of intestinal and urinary bladder cancer in rats by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 275—281.
- [24] Plummer, P. J. G. (1956). A survey of six hundred and thirty six tumours from domesticated animals. *Can. J. Comp. Med.* 20, 239—251.
- [25] Price, J. M., and Pamukcu, A. M. (1968). The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). *Cancer Res.* 28, 2247—2251.
- [26] Price, J. M., Wear, J. B., Brown, R. R., Satter, E. J., and Olson, C. (1960). Studies on etiology of carcinoma of urinary bladder. *J. Urol.* 83, 376—382.
- [27] Rehn, L. (1895). Blasengeschwulste bei fuchsinarbeitern. *Arch. Klin. Chir.* 50, 588—600.
- [28] Rosenberger, G., and Heesch, W. (1960). Adleriarn (*Pteris aquilina*) die crsache der sog. stallrotes der rindern (Haematuria vesicalis bovis chronica). *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.* 67, 201—208.
- [29] 津村巖, 山根乙彦, 前田勉, 佐々木博一, 迫悟, 林隆敏 (1972). 牛の腫瘍性血尿症に関する研究, とくに臨床病理学的観察について. *日獣会誌* 25, 275—280.
- [30] 牛島純一, 松川清, 湯浅亮 (1971). わらびの腫瘍原性について. 第71回日本獣医学会記事 129—130.
- [31] Yoshikawa, T., and Oyamada, T. (1975). Histopathology of papillary tumors in the bovine urinary bladder. *Jpn. J. Vet. Sci.* 37, 469—479.

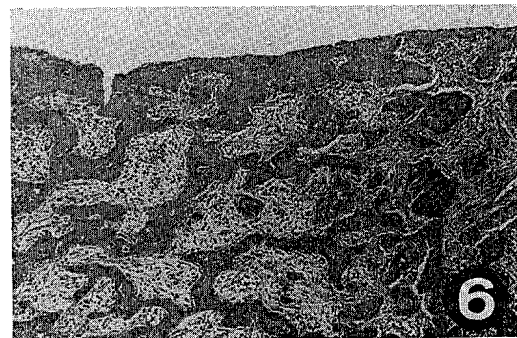
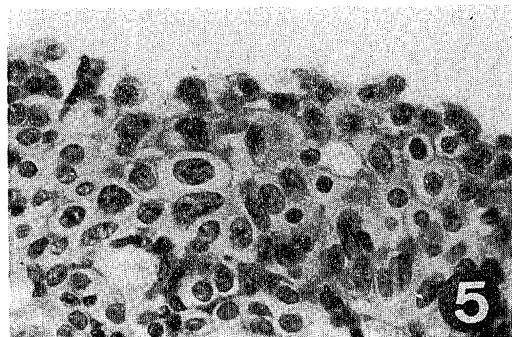
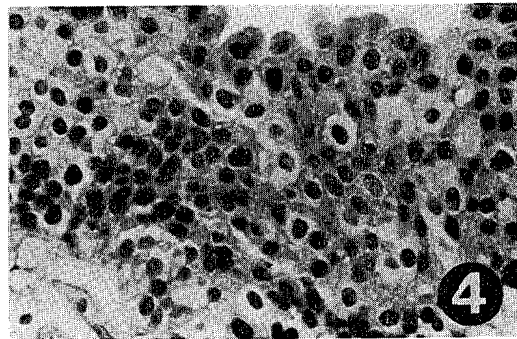
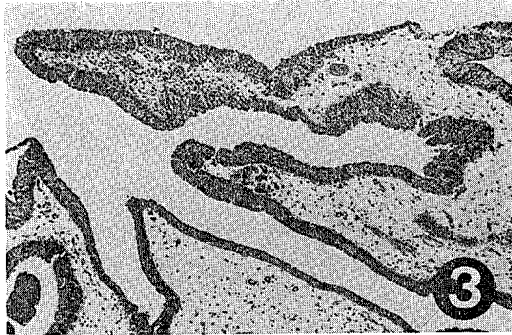
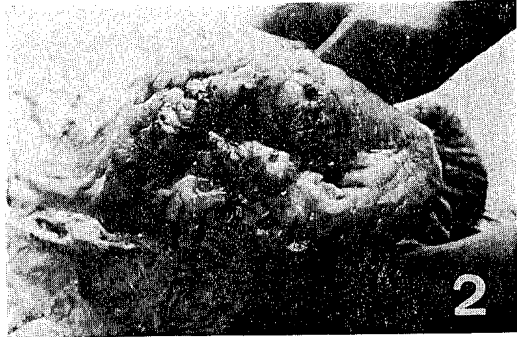
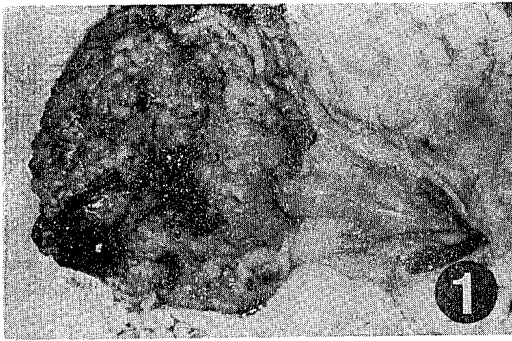


Fig. 1. Bladder in Case 1. The gross appearance after resection. Papillary or cauliflowerlike changes of the mucosa with hemorrhages.

Fig. 2. Bladder in Case 2. The gross appearance after resection. Papillary proliferation and hemorrhage in the trigone.

Fig. 3. Bladder in Case 1. The epithelium shows papillary proliferation with edematous stalk and an increase in the number of the epithelial cell layers. Hematoxylin and eosin staining (H.E.), $\times 40$.

Fig. 4. Bladder in Case 1. The epithelium shows increase in the number of cell layers and slight nuclear abnormalities. H.E., $\times 400$.

Fig. 5. Bladder in Case 1. The epithelium shows higher nuclear abnormalities than the epithelium shown in figure 4. H.E., $\times 400$.

Fig. 6. Bladder in Case 1. The epithelium with significant nuclear abnormalities has invaded its own stalk and showed cord-like proliferation. H.E., $\times 40$.

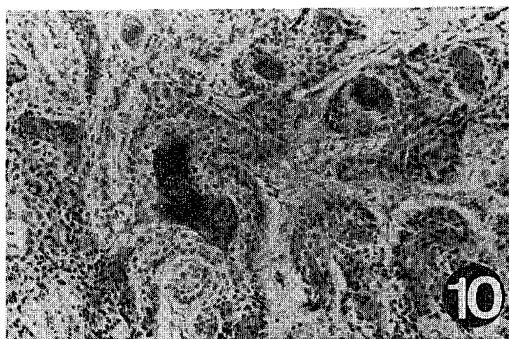
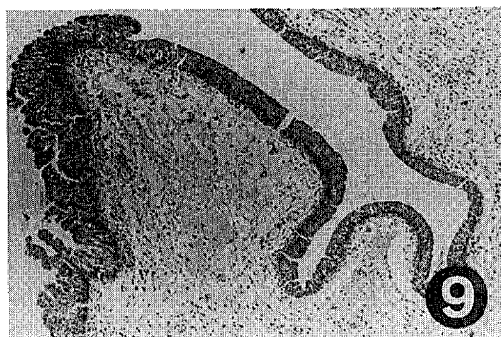
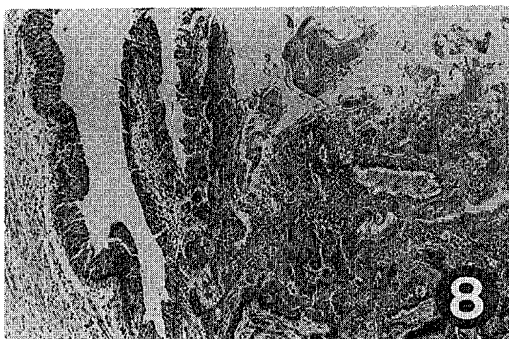
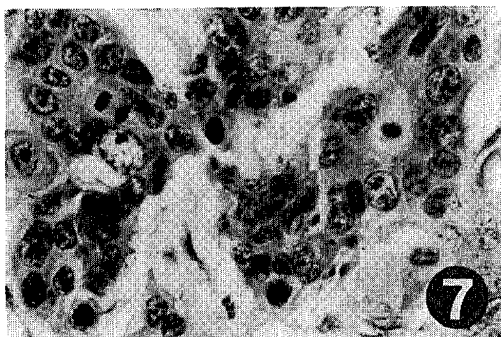


Fig. 7. Bladder in Case 1. Infiltrative neoplastic cells show significant nuclear abnormalities and marked mitotic figure. H.E., $\times 400$.

Fig. 8. Bladder in Case 2. Tumor is characterized by the presence of metaplastic squamous epithelium and keratinized cells. H.E., $\times 40$.

Fig. 9. Bladder in Case 2. The adjacent urothelium to figure 8 shows papillary proliferation with edematous stalk and increase in the number of its layers. H.E., $\times 40$.

Fig. 10. Bladder in Case 2. Invasive neoplastic cells show keratinization and pearl formation. H.E., $\times 100$.

カキ衛生からみた広島湾の *Salmonella* 汚染について

福田 伸 治* 岸 本 敬 之*
得 能 弘 志* 佐々木 実己子*

Incidence of Salmonellae in Oyster Growing Area in Hiroshima Bay

SHINJI FUKUDA*, TAKASHI KISHIMOTO*,
HIROSHI TOKUNO* AND MIKIKO SASAKI*

(Received for publication August 30, 1981)

緒 言

Salmonella 汚染の大都市における濃密化が指摘されて久しく〔1—3〕, 世界共通の問題として注目されている〔4—7〕. 地方都市においても例外でなく, 年々その拡がりを見せ, 本県下においても過去の調査より指摘されてきたところである〔9—12〕. ところで, その環境汚染実態をみると, 都市下水系および河川の常時汚染が注目される. このことは, 河川水流入のみられる海域への *Salmonella* の常時流入をも意味するものである.

本県特産カキはその成育環境が内湾・河口附近の通常塩分濃度の低い海域が適当であることから, 相当数のカキ養殖筏がみられ, これがカキ衛生に及ぼす影響は無視できない. そこで, 河口附近を中心に *Salmonella* 汚染実態を把握し, もってカキ衛生に資する目的でかねてより取組を行っており〔11〕, ここに1974年以降の結果をとりまとめ報告する.

試料および方法

試料は河川水, 海水および殻付カキとした.

(イ) 河川水は1974年から1977年の10月から2月にかけて, Fig. 1に示す8定点より76検体を干潮時に採取した.

(ロ) 海水は1974年から1980年の10月から3月にかけて,

Fig. 1に示す40定点より228検体を干潮時に採取した.

(ハ) 殻付カキは海水採取と同時に19定点の養殖筏より169検体を採取した.

なお, それぞれの検体は採取後, 可及的速やかに実験に供した.

Salmonella 検査法: まず, 増菌段階としてつぎの方法によった.

河川水は試料500mlを2倍濃厚S B G培地500mlに加え

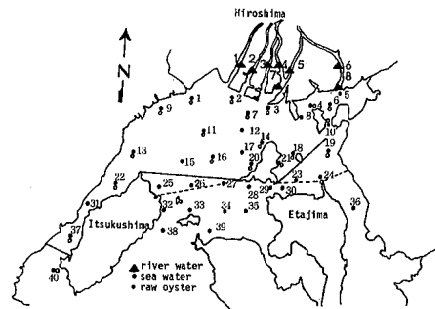


Fig. 1. Sampling stations in Hiroshima bay.
— : closure line ; ... : closure line amended.

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

培養 (37°C, 24 h) した。

海水は河川水同様の方法に加え、海水 2 ℓ および 20 ℓ をメンブランフィルターを用いる過後、フィルターを滅菌瓶にて等分し、SBG 培地、ハーナのテトラチオン酸塩培地、変法セレナイト培地—L [13] のそれぞれ 200 ml に入れ培養する方法を用いた。なお、SBG 培地、ハーナのテトラチオン酸塩培地においては 43°C, 24 h, 変法セレナイト培地—L においては 37°C, 18 h 培養とした。

殻付カキは殻をよく洗浄後、無菌的にむき身し、リン酸緩衝液にて 2 倍乳剤とし、その 20 ml を EEM 培地に加え培養 (43°C, 24 h) する方法と、カキ 50 g に EEM 培地 200 ml を加えストマッカーにて乳剤とし培養 (43°C, 24 h) する 2 方法にて前培養し、その 2 ml を SBG 培地、ハーナのテトラチオン酸塩培地および変法セレナイト培地—L の各 10 ml に移植し、海水同様増菌培養を行った。

ついで分離培養については DHL 寒天培地、SS 寒天培地、MLCB 寒天培地および Bismuth sulfite 寒天培地をそれぞれ用い、分離菌は生化学的性状、血清学的試験を行い、同定および菌型決定を行った。

大腸菌群, *E. coli* および一般細菌数検査法: 米国公定法 [14] に準拠し行った。

結果および考察

Salmonella 検出状況: 河川水では 76 検体中 28 検体 (36.8%) が陽性を示し、*Arizona* も 1 検体より分離した。この分離率は多くの報告 [2, 10, 11] に比し低い値であったが、過去の広島地域の調査からも指摘されているごとく [10, 11], *Salmonella* の常在化、濃密化の傾向が憂慮される。

地点別では Table 1 に示すごとく、定点 5 (御幸橋)、6 (仁保橋)、7 (千田町沖)、8 (猿猴川口) がともに

Table 1. Isolation of salmonellae from river water

Station	No. of samples		No. of sero- types isolated
	positive	total	
1	2	8	2
2	3	8	3
3	2	8	1
4	2	8	2
5	6	15	6
6	7	15	7
7	3	7	4
8	3	7	3

40%以上と分離率が高く、得能ら [11] の指摘のごとく、猿猴川および京橋川流域において、*Salmonella* 汚染、常在化傾向が強くみられた。

分離菌型は Table 4 に示すごとく、*S. typhimurium*, *S. anatum*, *S. agona*, *S. derby*, *S. paratyphi B*, *S. clabornei*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. monteideo*, *S. ohio*, *S. virchow*, C₁群 (Rough type) [の 12 菌型 33 株および *Arizona* 1 株の計 34 株であり、食中毒発生頻度の高い *S. typhimurium* が最も多く 8 株が分離され、先の中森ら [10] および得能ら [11] の報告と一致していた。これは *S. typhimurium* の生活環境への常在化を意味するものである。なお、分離菌型のうち注目されるのは *S. virchow* である。本菌型は過去橋本ら [8], 中森ら [10] および得能ら [11] の本県下における分布調査報告にはみられず、新たに分離をみたものである。これに前後し、本菌型による食中毒 2 事例 [15] に遭遇したことから、新たな汚染菌型の広がりを示唆するものである。

海水については 228 検体中 13 検体 (5.7%) が陽性を示し、*Arizona* は 1 検体から分離をみた。この分離率は来住ら [3] および橋本ら [9] の報告と比較して低い値であるが、今回の我々の調査はかなり沖合いの海域をも含めたものであり、その結果がこの低率をもたらしたものであろう。

検出地点は大部分が定点 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 18 の 5~6 Km 以内の沿岸海域のいわゆるカキ養殖指定外海域であったが、カキ養殖指定海域からも 1 例 (定点 19) の検出をみた。これは定点 19 が地形的にも猿猴川の直接の影響を受けやすい海域であるためと考えられる。また、この定点 19 の海域は 1981 年度からカキ養殖指定海域より除外された (昭和 56 年 9 月 16 日 付広島県条例)。

沖合い部については *Salmonella* は不検出であったが、これは流入する河川水が水の自浄作用などにより希釈、拡散されるためと考えられる。

分離菌型は Table 4 に示すごとく、*S. galiema*, *S. typhimurium*, *S. thompson*, *S. monteideo*, *S. agona*, *S. anatum*, *S. enteritidis*, *S. san-diego*, *S. london* の 9 菌型 15 株および *Arizona* 1 株の計 16 株であり、橋本ら [9] の福山市の沿岸海域の調査とは 4 菌型が一致しており、また、河川水のそれとは *S. typhimurium*, *S. agona*, *S. anatum*, *S. monteideo* の 4 菌型が一致していた。

Table 2. Isolation of salmonellae from sea water

Station	No. of samples		No. of sero- types isolated	Station	No. of samples		No. of sero- types isolated
	positive	total			positive	total	
1	0	3		21	0	3	
2	2	10	3	22	0	3	
3	2	23	3	23	0	1	
4	1	9	1	24	0	3	
5	1	3	1	25	0	3	
6	0	6		26	0	3	
7	1	18	1	27	0	3	
8	0	3		28	0	1	
9	0	3		29	0	1	
10	1	18	1	30	0	1	
11	2	25	3	31	0	3	
12	0	9		32	0	1	
13	0	3		33	0	1	
14	0	24		34	0	1	
15	0	3		35	0	1	
16	0	10		36	0	1	
17	0	1		37	0	1	
18	2	17	2	38	0	1	
19	1	4	1	39	0	1	
20	0	2		40	0	1	

Table 3. Isolation of salmonellae from oysters

Station	No. of samples		No. of sero- types isolated	Station	No. of samples		No. of sero- types isolated
	positive	total			positive	total	
1	0	3		14	3	24	3
2	1	9	1	16	0	9	
3	1	22	2	18	2	16	3
4	2	9	2	19	0	1	
6	0	6		20	0	2	
7	1	17	1	21	0	2	
9	0	2		22	0	1	
10	1	17	1	37	0	1	
11	3	24	3	40	0	1	
13	0	3					

殻付カキは169検体中14検体(8.3%)が陽性を示し、Arizonaも4検体から分離された。Sobseyら〔16〕はカキ40gを検体として、*Salmonella* 汚染を調査し、指定海域から採取したものからは4.3% (1/23)、指定外海域から採取されたものからは4.2% (1/24)が陽性を示したと報告している。また、Andrewsら〔17〕は米国各地より集められたカキについて *Salmonella* 汚染を調査し、11.1%(60/539)が陽性であったと報告している。我々の調査でも前述のごとく8.3%であり、米国における調査とほぼ一致した結果であった。

検出地点はTable 3に示すごとく、定点2, 3, 4,

7, 10, 11, 14, 18の地点であり、全例ともカキ養殖指定外海域から採取されたものである。

分離菌型はTable 4に示すごとく、*S. montevideo*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. galiema*, *S. newport*, *S. derby*, *S. paratyphi B* の7菌型16株およびArizona 4株の計20株であり、河川水とは *S. montevideo*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. derby*, *S. paratyphi B* の5菌型が、海水とは *S. montevideo*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. galiema* の4菌型が一致していた。

これらの結果は善養寺〔1〕および秋山〔2〕の指摘の

Table 4. Frequency distribution of *Salmonella* serotypes isolated

<i>Salmonella</i> serotype	1974			1975			1976			1977			1978		1979		1980	
	* R	S	O	R	S	O	R	S	O	R	S	O	S	O	S	O	S	O
<i>S. agona</i>										4	1							
<i>S. anatum</i>										5	1							
<i>S. claibornei</i>										2								
<i>S. derby</i>	2		1	2														
<i>S. enteritidis</i>	2	1	2															
<i>S. galiema</i>													4	2				
<i>S. infantis</i>									1									
<i>S. london</i>										1								
<i>S. montevideo</i>				1								1					2	4
<i>S. newport</i>													1					
<i>S. ohio</i>									1									
<i>S. paratyphi B</i>	1		1						2									
<i>S. san-diego</i>						1												
<i>S. thompson</i>													1					1
<i>S. typhimurium</i>	3	1	1	5									1	3				
<i>S. virchow</i>									1									
C ₁ (not identified)									1									
Arizona	1																1	4

* R : river water ; S : sea water ; O : oyster.

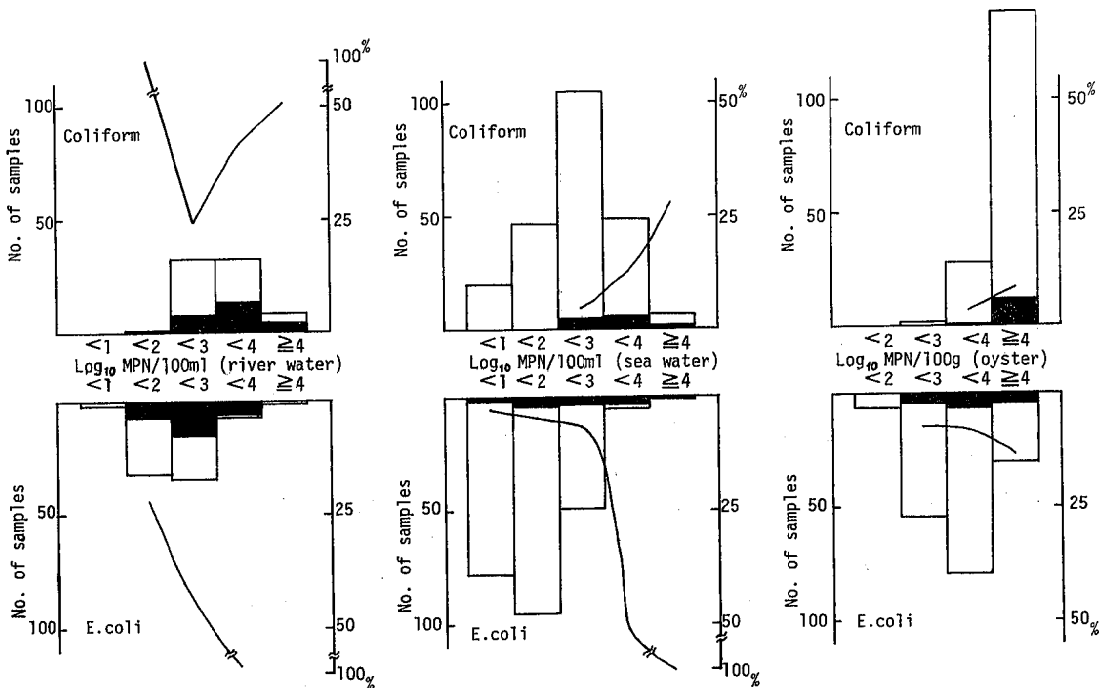


Fig. 2. Relationship between *Salmonella*-positive rate and MPN of indicator organisms in surface water and oysters.

□ : No. of samples examined ; ■ : No. of *Salmonella*-positive samples.

ごとく流動性がみられるものの、河川水→海水→殻付カキと一連の *Salmonella* 汚染があることを示唆するものと考えられる。宮崎ら〔18〕は都市下水系および沿岸海域の *S. typhi* の検索を実施し、*Salmonella* 汚染が沿岸海域へも拡散していることを指摘している。また、Andrewsら〔19〕はハマグリについて調査を行い、ハマグリにも *Salmonella* 汚染があることを指摘している。我々の調査でも、沿岸海域へ *Salmonella* 汚染が波及していることは明らかで、広島湾内で養殖されるカキへの汚染が憂慮されると同時に、他の水産物への汚染の進行が推定されるが、今回の7年間の調査では、カキ養殖指定海域の養殖後より採取されたカキからは *Salmonella* は分離されなかった。

Salmonella 検出率と汚染指標菌との関係：Fig. 2 に示すごとく、河川水、海水およびカキいずれも汚染指標菌が1オーダーづつ高くなるにつれて検出率も高くなる傾向を示しており、橋本ら〔10〕の報告と一致していた。

わが国および米国における生食用カキの加工規準では、これら原料用カキを採取する海域の大腸菌群最確数は100ml当り70以下とされている。Andrewsら〔17〕はカキおよびその採取海域の大腸菌群および *E. coli* と *Salmonella* を調査し、*Salmonella* 検出率は *E. coli* と関連性があると報告している。我々の調査でも、区分に若干の差はあるが、同様の傾向が認められた (Table 5)。また、Andrewsら〔17〕は大腸菌群最確数100ml

当り70以下の海域より採取されたカキおよび大腸菌群最確数70以下に相当する *E. coli* 最確数100ml当り14以下の海域より採取されたカキにも7.5% (15/199)、2.4% (6/255) 陽性があったと報告している。同様我々の調査でも、大腸菌群最確数70以下の海域から採取したカキおよび *E. coli* 最確数14以下の海域から採取したカキからもそれぞれ6.5% (2/13)、3.7% (2/54) が陽性を示した。また、大腸菌群最確数70以下と71以上の間、*E. coli* 最確数14以下と15以上の間にはともに有意差は認められなかった。これらは、カキ生態系の特徴である濃縮力と *Salmonella* 生態系における抵抗力のためであろうと考えられる。

わが国の生食用カキの衛生基準は、*E. coli* 最確数100g当り230以下、一般生菌数1g当り50,000以下とされている。そこで、カキの *Salmonella* 検出率と汚染指標菌について検討し、Table 6 に示した。

E. coli 最確数230以下の検体1例 (5.9%) から *Salmonella* の検出をみた。なお、大腸菌群最確数と *Salmonella* 検出率では、Andrewsら〔17〕の報告のとおり、関連性はなく、*E. coli* 最確数に 関連性があるようであるが、*E. coli* 最確数230以下と231以上の間には有意的差は認められなかった。

以上のごとく、カキの *Salmonella* 検出率は、養殖海域海水およびカキの汚染指標菌 (特に *E. coli*) と関連性があるものと考えられる。

Table 5. Correlation of *Salmonella* detection rate from oysters to density of *E. coli* and coliforms in sea water

Indicator organism	Indicator organism density in sea water per 100ml	Number of oyster samples examined	<i>Salmonella</i> -positive	
			number	percent
Coliform	0—70	31	2	6.5
	71—230	36	2	5.6
	231—1000	54	5	9.3
	>1000	48	5	10.4
	Total	169	14	
	Overall average			8.3
<i>E. coli</i>	0—14	54	2	3.7
	15—70	59	4	6.8
	71—230	26	3	11.5
	231—1000	24	3	12.5
	>1000	6	2	33.3
	Total	169	14	
	Overall average			8.3

Table 6. Correlation of *Salmonella* detection rate to density of *E. coli* and coliforms in oysters

Indicator organism	Indicator organism density in oysters per 100g	Number of oyster samples examined	<i>Salmonella</i> -positive	
			number	percent
Coliform	0—700	1	0	0.0
	701—2300	5	0	0.0
	2301—10000	27	3	11.1
	10001—100000	98	8	8.2
	>100000	38	3	7.9
	Total	169	14	
Overall average				8.3
<i>E. coli</i>	0—230	17	1	5.9
	231—790	43	3	7.0
	791—10000	79	6	7.6
	>10000	30	4	13.3
	Total	169	14	
	Overall average			

岸本〔20〕は広島湾内の海水も徐々に汚染が進行していると報告しており、今回の調査を総合して考えると、海水および養殖カキへも *Salmonella* 汚染の拡散が進行しつつあるものと考えられる。また、岸本〔20〕は汚染指標菌は降雨量と関係があり、流水の量的関係で大きく影響を受けることを指摘しているが、*Salmonella* の検出率と降雨量との間には直接の関係が認められなかった。

Salmonella 汚染は前述の成績のごとく、汚染指標菌の汚染拡大とともに養殖カキに波及しつつあることは明らかで、とくに沿岸海域での養殖カキの生産にあたっては、より厳格な衛生対策が必要であると考え。すなわち、陸上でのプール内浄化法の確立がまずもって緊急課題であろう。

3. 19定点の養殖筏より採取したカキの *Salmonella* 検出率は平均8.3% (14/169) であり、陽性を示したカキはいずれもカキ養殖指定外海域から採取されたものであった。分離菌型は *S. montevideo*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* など7菌型で、河川水のそれとは5菌型が、海水のそれとは4菌型が一致しており、河川水→海水→カキへと汚染が拡散していることは明らかである。

4. *Salmonella* の検出率は、汚染指標菌の増加とともに高くなる傾向が認められた。

5. カキからの *Salmonella* 検出率は、カキを採取した海域海水およびカキの *E. coli* 汚染度と密接な関係が認められた。

文 献

- 〔1〕 善養寺浩 (1967) : 都市環境におけるサルモネラの生態とその食中毒. メディヤサークル, 12, 437—446.
- 〔2〕 秋山昭一 (1969) : 河川および汲取し尿のサルモネラ. メディヤサークル, 14, 339—345.
- 〔3〕 来住輝彦, 伊藤尚夫, 井上三郎 (1970) : 都市環境のサルモネラ汚染について (第3報) 大阪港海水中のサルモネラ汚染調査. 日本公衛誌, 17, 964.
- 〔4〕 Thomason, B. W., J. W. Biddle., and W.B. Cherry (1975) : Detection of salmonellae in the environment. Appl. Microbiol., 30, 764—767.
- 〔5〕 Kampelmacher, E. M. and L. M. van Noorle

要 約

カキ衛生に対処する目的から広島湾内の *Salmonella* 汚染について調査し、その結果以下の成績が得られた。

1. 8 定点より採取した河川水の *Salmonella* 検出率は平均36.8% (28/76) であり、分離菌型は *S. typhimurium* をはじめとして、12菌型であった。

2. 40 定点より採取した海水の *Salmonella* 検出率は平均5.7% (13/228) であり、検出地点は大部分が河川水の直接影響をうける沿岸海域であった。分離菌型は *S. galiema*, *S. typhimurium*, *S. thompson* をはじめとして9菌型で、河川水のそれとは4菌型が一致していた。

- Jansen (1976) : *Salmonella* in effluent from sewage treatment plant, wastepipe of butcher's shop and surface water in walcheren. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 162, 307—319.
- [6] Dondero, N. C., C. T. Thomas, M. Khare, J. F. Timoney and G.M. Fukui (1977) : *Salmonella* in surface waters of central New York state. Appl. Environ. Microbiol., 33, 791—801.
- [7] Sayler, G. S., J. D. Nelsen, JR., A. Justice and R. R. Conwell (1976) : Incidence of *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, and *Vibrio parahaemolyticus* in an estuary. Appl. Environ. Microbiol., 31, 723—730.
- [8] 橋本秀夫, 平田泰治, 原田 慧, 清水 健(1971) : 地方都市における河川, 下水のサルモネラ汚染について. 広島大学水畜産学部紀要, 10, 153—160.
- [9] 橋本秀夫, 川上英之, 村田昌芳, 牛島治義, 中尾典隆, 柳 加起, 河野光貴 (1976) : 海水中のサルモネラ汚染ならびに汚染指標菌に関する研究 I. 海水中のサルモネラと汚染指標菌の分布. 広島大学水畜産学部紀要, 15, 207—218.
- [10] 中森純三, 西尾隆昌 (1975) : 都市下水における *Salmonella* の汚染実態. 広島県衛生研究所・公害研究所研究報告, 22, 22—25.
- [11] 得能弘志, 岸本敬之, 小川博美, 佐々木実己子 (1975) : 広島県におけるサルモネラの系統別汚染分布について. 広島県衛生研究所・公害研究所研究報告 22, 26—34.
- [12] 宮崎佳都夫, 中森純三, 西尾隆昌 (1980) : 都市下水の *Salmonella* : 患者株と血清型およびフェージ型の比較. 広島県衛生研究所研究報告, 27, 47—52.
- [13] 西尾隆昌, 中森純三 (1975) : セレナイト培地の選択性の強化. メディアサークル, 20, 237—242.
- [14] APHA (1970) : Recommended procedures for the examination of sea water and shellfish, 4th edition.
- [15] 岸本敬之, 得能弘志, 小川博美, 佐々木実己子, 田村和満, 坂崎利一 (1979) : 広島県下に発生した *Salmonella virchow* による食中毒2事例について. 食品衛生研究, 29, 29—35.
- [16] Sobsey, M. D., C. R. Hackney, R.J. Carrick, B. Ray and M. L. Speck (1980) : Occurrence of enteric bacteria and viruses in oysters. J. Food Prot., 43, 111—113.
- [17] Andrews, W. H., C. D. Diggs, M. W. Pressnell, J. J. Miescier, C. R. Wilson, C.P. Goodwin, W. N. Adams, S. A. Furfari and J. F. Musselman (1975) : Comparative validity of members of the total coliform and fecal coliform groups for indicating the presence of *Salmonella* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Milk Food Technol., 38, 453—456.
- [18] 宮崎佳都夫, 中森純三, 西尾隆昌 (1980) : *Salmonella typhi* の生態学的研究 : 都市大規模河川・河口域ならびに沿岸海域についての *Salmonella typhi* の検索成績. 広島県衛生研究所研究報告, 27, 53—57.
- [19] Andrews, W. H., C. D. Diggs, J. J. Miescier, C. R. Wilson, W. N. Adams, S. A. Furfari and J. F. Musselman (1976) : Validity of members of the total coliform and fecal coliform groups for indicating the presence of *Salmonella* in the quahang, *Mercenaria mercenaria*. J. Milk Food Technol., 39, 322—324.
- [20] 岸本敬之 (1976) : カキ衛生からみた広島湾. 食品衛生研究, 26, 38—47.

メロンから検出されたディルドリン およびエンドリンについて

見 玉 陽太郎* 川 上 啓 介**

Residue of Dieldrin and Endrin in Melon and Soil

YOUTARO KODAMA* AND KEISUKE KAWAKAMI**

(Received September 1, 1981)

はじめに

農薬取締法で土壌残留性農薬に指定されているディルドリンは、化学的に比較的安定で、生体への蓄積性も認められている。また、人畜や魚類に対する毒性が強い農薬としても知られている〔1〕。このため、わが国では、昭和46年以降、ドリ剤の使用を厳しく制限する措置がとられている。しかしながら、最近においてもなお、農作物中にドリ剤が検出される例があり、関係者の注目を集めている〔2, 3〕。

著者らは、今回（昭和56年7月）野菜、果実等の残留農薬の調査を行ったところ、本県産のメロンからディルドリンおよびエンドリンをそれぞれ $0.046\mu\text{g/g}$ 、 $0.006\mu\text{g/g}$ 検出した。

わが国の食品衛生法では、食品規格として野菜、果実等の残留農薬基準が定められているが、メロンの場合、ドリ剤の規格は定められていない。そこで、今回のドリ剤に汚染されたメロンのように、土壌中に残留している農薬が農作物に移行することは食品衛生上重要な意味を持つと考えられるので、ドリ剤に汚染されたメロンの生産環境の追跡を行ない、若干の考察を加えたので報告する。

実験方法

1. 試料 メロン（品種；プリンスメロン）：昭和56年5月中旬に作付したハウス栽培品で昭和56年7月29日採取した。3個について1個当りの平均重量は517gで

あった。

土壌（分類；細粒褐色森林土）：メロン採取時に、メロンの栽培されている畑土（土表面より15cmまでのもの）をハウス施設内3カ所から採取し、風乾後2mmのふるいで篩別して分析試料とした。

2. 検液の調製 メロン：厚生省の公定法〔4〕によった。

土壌：風乾土20gをソックスレー抽出器にとり、アセトン100mlで8時間抽出した後、アセトン抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮後、2%食塩水350ml中に移し、n-ヘキサン100mlで2回抽出し、抽出液を無水硫酸ソーダーで脱水後、ロータリーエバポレーターで約10mlに濃縮する。これに蒸留水2ml、銅粉末0.5gを加え〔5〕、還流冷却器を装置して8時間還流し、冷却後、濾紙（5C）で濾過し、残留物を少量のn-ヘキサンで洗い込み、濾液をKD濃縮器で5mlに濃縮する。この濃縮液をフロリジルカラムにのせ、15%エチルエーテル含有n-ヘキサン300mlで溶出させた後、KD濃縮器で5mlに濃縮してGC用検液とした。

3. ガスクロマトグラフィーの条件 装置：柳本製作所G-2800ECD-C Ni⁶³10mCi, カラム：DEGS+H₃PO₄ (2+0.5%) Chromosorb W AW, 60-80 mesh, 3mmφ×2m, カラム槽温度190°。

4. GC-MSの条件 装置：日本電子JMS-D300 カラム：DEGS+H₃PO₄ (2+0.5%) Chromosorb W, AW, 60-80 mesh, 3mmφ×2m, カラム槽温度190°, He; 25ml/min, イオン化電圧; 20eV。

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

** 広島県環境保健部環境衛生課：Health Department, Hiroshima Prefecture

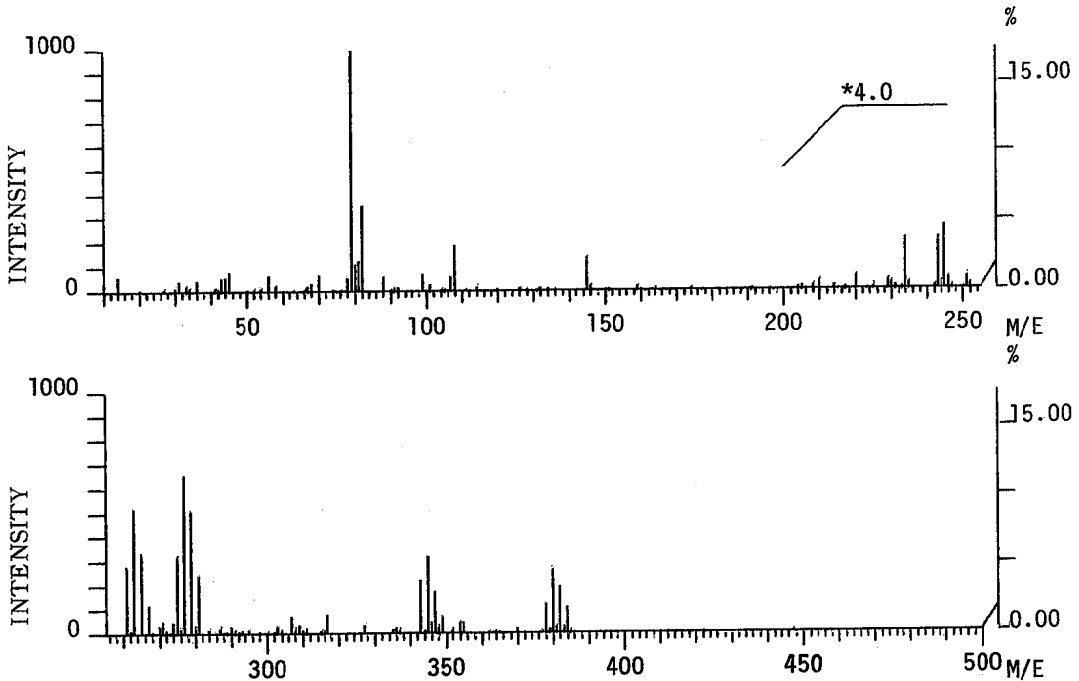


図1 メロンから分離したディルドリンのGC-MSスペクトル

結果および考察

1. GC-MSによるディルドリンの確認

メロンおよび土壌から調製した検液のガスクロマトグラムはディルドリンおよびエンドリンの標準品の保持時間に一致するピークを与えた。2つのピークのうち、ディルドリンに相当するピークをGC-MSで同定を行った。得られたスペクトルを図1に示す。このスペクトル

はディルドリンの標準品から得たマススペクトルと完全に一致し、ディルドリンであることが確認された。

2. メロンおよび畑土中のドリ剤の濃度

メロンの部位別およびその栽培土壌中のドリ剤の分析結果を表1に示す。表1で明らかなように、メロンおよび畑土のいずれからでもアルドリ剤は検出されなかったが、ディルドリンおよびエンドリンが検出されることが

表1 メロン部位別および土壌中のドリ剤分析結果

試料	組成 A (%)	アルドリ ($\mu\text{g/g}$)	ディルドリン B ($\mu\text{g/g}$)	エンドリン ($\mu\text{g/g}$)	メロン1個中のディルドリン含有量
					$517^{a)} \times A \times B \times \frac{1}{100}$ (μg)
メ 果 肉	35.4	nd ^{b)}	0.036	0.002	6.59
ロ 果 皮	53.6	nd	0.020	0.001	5.54
ン 中 子	11.0	nd	0.098	0.007	5.57
可食部 ^{c)}	46.4	nd	0.051 ^{d)}	0.003 ^{e)}	12.16 ^{f)}
土 No.1	—	nd	0.054	0.008	—
No.2	—	nd	0.059	0.008	—
No.3	—	nd	0.054	0.007	—
壤 平 均	—	nd	0.056	0.008	—

a) メロン1個当り平均重量(g)

b) nd: 不検出 (<0.001)

c) 可食部=果肉+中子

d) $(0.036 \times 35.4 + 0.098 \times 11.0) / (35.4 + 11.0)$

e) $(0.002 \times 35.4 + 0.007 \times 11.0) / (35.4 + 11.0)$

f) $6.59 + 5.57$

わかった。

メロン中のディルドリンおよびエンドリンは果皮、果肉、中子（なかご）の順に高い濃度を示す傾向がみられ、メロン中心部の中子では他の部位に比して3～7倍の濃度であることがわかった。

3. メロン栽培土壌のドリリン剤による汚染

メロン栽培土壌中のドリリン剤は表1に示したように、採取した3地点共にほぼ同じ濃度を示し、平均でディルドリンが0.056 μ g/g、エンドリンが0.008 μ g/gであった。しかしながら、アルドリリンは検出されなかった。このことは土壌中でアルドリリンは酸化を受け、ディルドリンに変ることが知られており、アルドリリンとして土壌に残留する期間は比較的短いことが認められている〔6, 7, 8, 9〕。このことから、たとえ今回調査した畑土にアルドリリンが使われていたとしても十分な日数が経過しておれば、アルドリリンの検出はないものと考えられる。

土壌中におけるドリリン剤の残留は腐植の吸着によってもおこるとされ、灰色低地土（腐植含量1.89%）に比し腐植含量の多い黒ぼく土（腐植含量15.29%）の方がドリリン剤の残留が大きいという報告がある〔10〕。今回調査したメロン栽培土壌は細粒褐色森林土に分類され、腐植含量は3～4%といわれている。

一般に、ディルドリンが土壌中で95%消失するに要する年数は、平均8年といわれている〔8〕。ちなみに、この値は半川〔10〕の灰色低地土を使ったディルドリンの消長に関する研究データから著者らが推計した値とほぼ一致した。

昭和46年農薬取締法の改正にもとづいて、農林事務所が全農家からドリリン剤の回収を実施すると共に、農薬の適正な使用を強力に指導していることなどから、今回調査した畑土中のドリリン剤は、かなり古い時期に使用されていたものに起因することが推察できる。

なお、ドリリン剤は現在、白アリ駆除に用いられていることから、ドリリン処理された木くず等が畑土に施される可能性を考えたが、調査の結果そのような事実はなかった。

4. メロンのディルドリン汚染の意義

メロン1個当りの部位別のディルドリン含有量は果肉、果皮および中子に、それぞれ6.59 μ g、5.54 μ gおよび5.57 μ gであった。メロン可食部（果肉と中子とを合わせた部分）中のディルドリン含有量は12.16 μ gである。ディルドリンはその高い毒性のために、1日許容摂取量（ADI）〔11〕は0.0001mg/kgと低く、体重50kgの人では

5 μ g/dayとなる。したがって、メロン半分以下摂取で、1日許容摂取量を越える値となる。しかしながら、メロンは一般的に常食される食品ではなく、摂取する機会も限られている食品である。また、ドリリン剤も使用禁止されていることから、メロンのドリリン剤について、食品衛生法にもとづく食品規格としての残留農薬基準がなく、有機リン剤であるダイアジノン、パラチオンについてのみ基準値が定められているにすぎない。ディルドリンのような化学的に安定で、土壌中に残留し農作物に移行する農薬は、メロンについても残留基準を設定する必要があると考える。

キュウリ、メロン、ニンジン、パレイショおよび落花生などが土壌中のドリリン剤をよく吸収するといわれ、イチゴやホーレン草なども比較的ドリリン剤を吸収しやすいことが知られている〔6, 7〕。このため、ドリリン剤が使用された農地に後作物として、ウリ類、いも類および根菜類を栽培しないよう指導がなされている〔12〕。しかしながら、最近においても、昭和53年に新潟市で〔2〕、土壌から0.004～1.25 μ g/gのディルドリンを検出し、さらに、昭和55年には、瀬戸内海地域の調査〔13〕で農地66地点中13地点から0.015～0.18 μ g/gのディルドリンを検出し、なかでも兵庫県、和歌山県および香川県でのディルドリンの検出率が比較的高いことが報告されている。これらのことは、ドリリン剤の使用を厳しく制限して以来、10年を経過する現在もなおドリリン剤が残留している畑土がかなりあることを示唆しており、畑作物の栽培にドリリン剤の残留を考慮した指導が強力に推進されなければならないと考える。

ま と め

1. 県内で生産されたメロンおよびその栽培土壌からディルドリンおよびエンドリンを検出した。
2. メロンを部位別に分析した結果、ドリリン含有量はメロン中心部が最も高く、以下果肉、果皮の順であった。またメロン可食部中のディルドリン含有量は0.051 μ g/g、エンドリン含有量は0.003 μ g/gであった。
3. メロン栽培土壌中のディルドリン濃度は平均0.056 μ g/g、エンドリン濃度は平均0.008 μ g/gであった。
4. 今回のメロンのディルドリン汚染の要因は、10年以前に散布されたドリリン剤が現在も土壌中に残留し、メロンに移行したものと推察された。

終りに、本調査遂行にあたり御配慮いただいた県庁環

境衛生課長西谷昇氏、課長補佐藤原正壮氏、また御協力いただいた福山保健所係長恒松義明氏、技師中村能治氏、また御助言いただいた県立農業試験場主任研究員植木博秀氏に厚く御礼申し上げます。またGC—MS測定をしていただいた当所研究員金森久幸氏、また分析に御協力いただいた広島女子大学学生桑原知子、藤元さとみ両氏に感謝申し上げます。

文 献

- [1] 日本薬学会編：衛生試験法・注解，p.90 (1980) 金原出版。
- [2] 本間敬則，向井敏子，真保正紀，析山健一，相馬一文，荒川治男：第39回日本公衆衛生学会講演要旨集，p.644 (1980)。
- [3] 環乳第58号：(昭和55年10月30日)。
- [4] 厚生省告示第309号：(昭和50年11月27日)。
- [5] 日本分析化学会関東支部：公害分析指針，p.8 (1972) 共立出版。
- [6] 西本孝男，上田雅彦，田植 栄，近沢紘史：食衛誌，12，56 (1971)。
- [7] 坂井 弘：農薬公害ハンドブック，p.228 (1974) 地人書館。
- [8] 辺野喜正夫，栗飯原景昭，内山充：食品衛生学，p.380 (1981) 朝倉書店。
- [9] 半川義行：中国農業研究，46，61 (1973)。
- [10] 半川義行：広島県農業試験場報告，35，69 (1974)。
- [11] WHO Tech. Report Series No. 417，p.19 (1969)。
- [12] 45農政第4875号：(昭和45年9月5日)。
- [13] 環境庁：有機塩素殺虫剤による環境汚染状況に関する調査報告 (昭和55年10月28日)。

ゆでめん中の過酸化水素について

七瀬 葉子* 高田 久美代* 山田 從磨*

Hydrogen Peroxide in Japanese Noodle

YOUKO NANASE*, KUMIYO TAKATA* AND TSUGUMARO YAMADA*

(Received for publication March 10, 1981)

緒 言

めん類、水産加工品の漂白、殺菌剤として使用されている過酸化水素 (H_2O_2) は、その安全性が問題とされているが [1]、これに代わる有効かつ低廉な殺菌剤がなく、最終食品中に残留がないことを条件に現在でも使用が認められている。食品中の H_2O_2 の定量には一般にヨウ素法 [2] が利用されているが、この方法は微量の H_2O_2 の定量に若干の問題を含んでいる。

最近、石崎ら [3] は食品中の H_2O_2 にメタノールを作用させ、定量的に生成したホルムアルデヒドと 3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾンとの反応物を硝酸第二鉄による酸化反応によって呈色させ比色定量する方法 (MBTH 法) を報告している。

著者はこの MBTH 法を追試し、ヨウ素法と比較するとともに、MBTH 法で無アルデヒドメタノール (スペクトル用、または特級メタノールを精製したもの) の使用の必要性が指摘されている [3] ことに注目して、市販の等級別のメタノールをそのまま使った場合の H_2O_2 の定量への影響についても検討を加えた。また、この方法によって H_2O_2 処理されたゆでめん中の H_2O_2 量の経時変化について検討し、若干の知見を得たので、あわせて報告する。

実験方法

1. 装置および試薬

分光光度計：鶴島津製作所製 spectronic 20。

0.4% 塩酸 MBTH 溶液：MBTH アルデヒド定量用 (和光純薬 (株) から調製)

カタラーゼ：Beef Liver 1.5×10^5 unit per ml (P-

L Biochemicals Inc.)

メタノール：スペクトル用特製試薬 (S.P.)、特級試薬 (G.R.)、一級試薬 (E.P.) (半井化学薬品特製)

H_2O_2 標準液：33% (W/W) H_2O_2 水を蒸留水で希釈して 0.1% 溶液とする。これをチオ硫酸ナトリウムで標定した。次いで、S.P.メタノールを用いて希釈し、1.0~15 $\mu g/ml$ になるように調製した。(使用直前調製)

また、G.R.メタノール、E.P.メタノールを用いて S.P.メタノールと同様に希釈し、 H_2O_2 標準液を調製した。

2. 試験溶液の調製

細切したゆでめん 8 g を精秤し、メタノール 80 ml を加え、3 分間ホモジナイズして H_2O_2 を抽出、ろ過して得られたろ液を試験溶液とした。

3. 定量法

試験溶液および標準溶液 1 ml を 25 ml 目盛付試験管にとり、蒸留水 3 ml を加え 37°C で 3 分間加温後、カタラーゼ溶液 10 μl (1,500 単位) を加え 37°C で 15 分間加温した後、0.4% MBTH 溶液 1 ml を加え、更に、37°C で 25 分間放置後、0.2% 硝酸第二鉄溶液 5 ml を加えて、5 分間室温に放置して発色させた。この溶液にアセトンを加え全量を 20 ml とし、波長 635 nm の吸光度を測定した。別に、空試験として試験溶液にカタラーゼ処理をせず、その他の操作は上記試験溶液と同様に行ない吸光度を測定した。

H_2O_2 量は、試験溶液をカタラーゼ処理して得られた吸光度から空試験溶液の吸光度を差し引いて求めた。なお、吸光度測定時の対照液は試験溶液の代わりにメタノール 1 ml を目盛付試験管にとり、試験溶液と同様に操作

* 広島県廿日市保健所：Hatsukaichi Health Center, Hiroshima Prefecture

Table 1. Recovery of H₂O₂

[Methanol	Noodle boiled	H ₂ O ₂ Added (μg)	Found average* (μg)	Coefficient of variation (%)	Recovery (%)
S.P.	Udon-1	70.03	62.70	4.5	89.5
	2	70.03	69.48	1.2	99.2
	3	38.83	38.01	2.7	97.9
	4	38.41	37.05	3.6	96.5
	Nihonsoba	36.91	36.03	3.0	97.6
	Chukasoba-1	36.91	38.02	2.1	103.0
G.R.	Udon-4	38.41	36.37	2.9	94.7
	Chukasoba-2	38.83	37.58	3.3	96.8

*: n=5

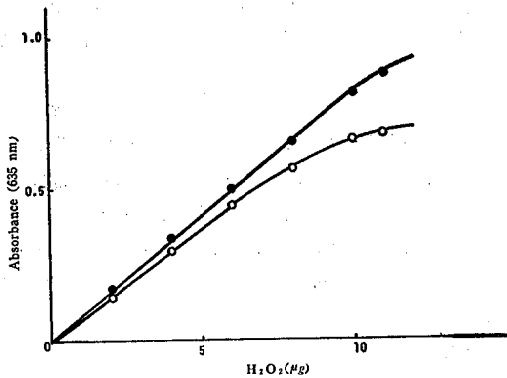


Fig. 1. Effect of various methanol on MBTH method
 —●—: methanol for Spectroscopy and Guaranteed methanol
 —○—: Extra Pure methanol

したものを用いた。

結果及び考察

1. MBTH 法による H₂O₂ の定量に及ぼす純度別市販メタノールの影響

(1) 検量線の作成

メタノールの純度がMBTH 法に及ぼす影響について検討するため、S.P., G.R.およびE.P.メタノールを用いてH₂O₂の検量線を作成した。結果はFig. 1に示したように0~10μgの範囲でS.P.およびG.R.メタノールを使用した場合には原点を通る良好な直線が得られ、G.R.メタノールがS.P.メタノールと同様に無

精製で使用できることがわかった。しかし、E.P.メタノールを使用した場合には、検量線の傾きが小さく、同時にまた、直線性を示すH₂O₂の濃度範囲が狭いことが明らかになった。

(2) 標準添加回収実験

以上の実験から、MBTH法でH₂O₂の抽出に使われるメタノールとして、G.R.メタノールがS.P.メタノールと同様、無精製で使える可能性が得られたので、ゆでめんに添加したH₂O₂の回収実験によって、実用性の検討を試みた。その結果は、Table 1に示した通りである。Table 1で明らかなように、S.P.メタノールを用いた場合のうどん-1を除くといずれも95%以上の高い回収率を示しており、MBTH法によるH₂O₂の定量にG.R.メタノールをS.P.メタノールと同様無精製で使っても実用上支障がないものと考えられる。また、ゆでめん中のH₂O₂濃度がその部位によってばらつくことは一般に知られており、この実験で得られた回収率の若干のばらつきは容認できるものと考えられる。

2. ヨウ素法と MBTH 法との相関性

市販ゆでめん15種について、MBTH 法とヨウ素法によってH₂O₂濃度を測定し、両試験法による測定値間の相関性を検討した。Fig. 2で明らかなように、ゆでめん中のH₂O₂濃度が40ppm以上を示すもの(n=10)については、ヨウ素法とMBTH 法との間に高い相関性(r=0.973)がみられたが、H₂O₂濃度が40ppm未満のもの(n=5)については、これら両試験法の間に関係性がみられなかった。このことは、MBTH 法は低濃度のH₂O₂量に対して再現性のある測定値を与えるが、ヨウ素法では低濃度のH₂O₂の定量にばらつきを生じ易い欠点があることによるものと推察される。

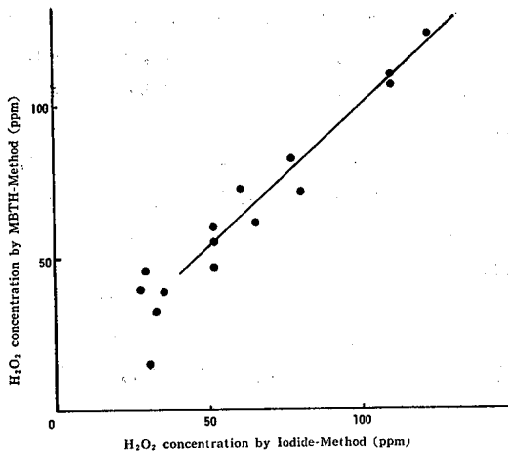


Fig. 2. Correlation of analytical results of Iodide-Method to MBTH-Method

3. 市販の包装ゆでめん中のH₂O₂残留量の経時変化

前述のように、MBTH法が広い定量範囲をもち、しかも再現性がよいことが明らかとなったので、市販の包装ゆでめんを5℃で保存した場合のH₂O₂残留量の経時変化をMBTH法によって検討することにした。

市販のうどん、ひやむぎ、日本そばおよび中華そばをポリエチレン製の袋に入れて5℃で保存し、1、2、7日後のH₂O₂量を測定した。結果をFig.3に示した。保存試験開始後1～2日目ではいずれのゆでめんもH₂O₂濃度が、急激な減少を示した。また、その後のH₂O₂濃度の減少は比較的ゆるやかに推移することがわかったが、中華そばは他のゆでめんに比べてややH₂O₂の減少速度が大きいことが認められた。保存開始時のH₂O₂濃度に比べて、開始後7日目のゆでめん中に残留するH₂O₂濃度は、日本そば60%、中華そば22%、うどん35～41%、ひやむぎ4%であった。岩崎ら〔4〕は、うどんと日本そばではH₂O₂処理後のH₂O₂減少速度に大きな差があることを認め、日本そばでのH₂O₂減少速度が大きいことを指摘している。我々の実験では、指摘されているような傾向は認められなかった。また、棚田ら〔5〕は、ゆでめん中のH₂O₂濃度が低いものほど経時的なH₂O₂濃度の減少が大きいことを報告しているが、我々の実験結果でも同様な傾向が認められた。

4. メタノール抽出液中のH₂O₂の安定性

市販の包装ゆでめん中のH₂O₂濃度は、低温保存によっても経時的に大きく減少することが認められたので、MBTH法を用いて、ゆでめん中のH₂O₂のメタノール

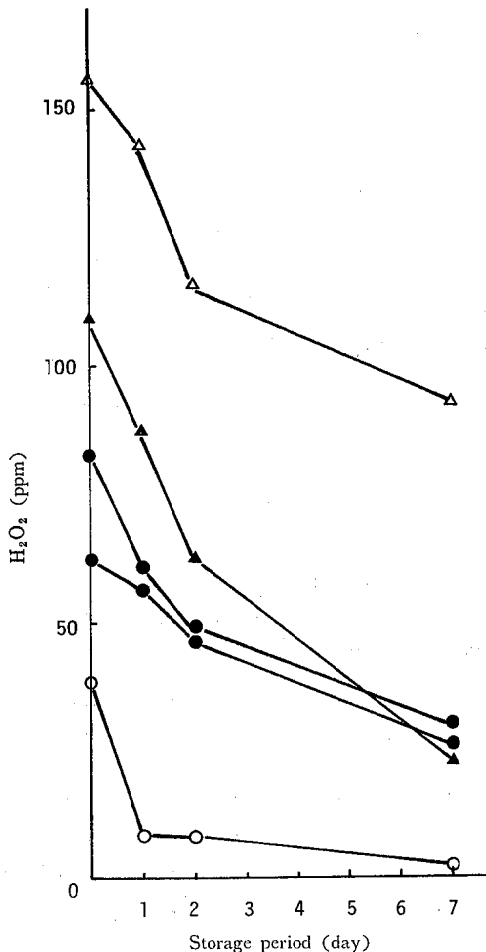


Fig. 3. Time course of H₂O₂ in packed noodle during storage

—●—: Udon, —○—: Hiyamugi,
—▲—: Chukasoba, —△—: Nihonsoba.

抽出液中での安定性を検討した。

市販のうどん、ひやむぎ、日本そばおよび中華そばをメタノールで抽出し、その抽出液を5℃で1、4、7日間保存した後、それぞれのH₂O₂濃度を測定した。その結果はFig.4に示したように、メタノール抽出液中のH₂O₂濃度はゆでめんの種類に関係なく7日間安定であることが明らかになった。棚田ら〔6〕は、ゆでめん中のH₂O₂のメタノール抽出液について、その安定性を、ヨウ素法を用いて検討し、24時間までは安定であることを報告している。しかしながら、我々は、本実験で明らかかなように、メタノール抽出液中のH₂O₂濃度は、7日

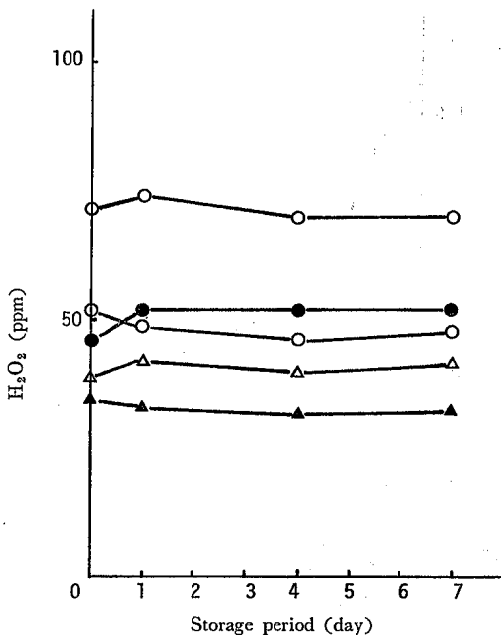


Fig. 4. Stability of H₂O₂ in methanol extract
 —●— : Udon, —○— : Hiyamugi,
 —▲— : Chukasoba, —△— : Nihonsoba.

間の長期にわたり安定に保たれ、同時に、ゆでめんの種類による影響を受けないことを明らかにした。このことは、収去検査等でゆでめん中のH₂O₂濃度を定量する場合、有効な手段になると考えられる。

ま と め

1 ゆでめん中のH₂O₂の定量法として、MBTH法とヨウ素法について検討を行なった。その結果、MBTH法はゆでめん中のH₂O₂量を0~10μgの範囲において

高い精度で定量でき、しかも操作が簡易な定量法であることが認められた。一方、ヨウ素法は、低濃度のH₂O₂量の定量において、値のばらつきが多いことが確認された。

2 MBTH法のための試料抽出用メタノールは、特級メタノールを無精製で使ってもスペクトル用メタノールと同様十分に満足すべき結果が得られることがわかった。

3 市販の包装ゆでめんをそのまま5℃で保存すると、そのH₂O₂量は短時間で急激に減少することが認められたが、メタノールで抽出しておけば、7日間放置後でもH₂O₂濃度の変化は認められなかった。

稿を終えるにあたり、有益な御助言をいただいた広島県衛生研究所理化学部長森本一義博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- [1] 小田嶋成和：“昭和53年度がん研究助成金による研究報告書”，P.903 (1978)。
- [2] 日本薬学会編：“衛生試験法注解”金原出版，(1973) P.192。
- [3] 石崎睦雄，村上りつ子，上野清一，片岡不士雄，小山田則孝，久保田かほる，勝村馨：食衛誌。19, 167 (1978)。
- [4] 岩崎恭子，荻原俊英：食品衛生研究 30, 290 (1980)。
- [5] 棚田益夫，内田晴彦，和田時子：食衛誌。12, 376 (1971)。
- [6] 棚田益夫，内田晴彦，和田時子：食衛誌。12, 413 (1971)。

他誌掲載論文 (1980年9月～1981年8月)

- Nishio, T., J. Nakamori, and K. Miyazaki (1981): Survival of *Salmonella typhi* in oysters. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 172: 415—426.
- 宮崎佳都夫, 中森純三, 西尾隆昌 (1981): ハトによる都市公園の *Salmonella* 汚染: ヒト散発症例との分離菌型の比較. *感染症学雑誌*, 55: 83—91.
- 中森純三, 宮崎佳都夫, 西尾隆昌 (1980): 新生児の病原細菌保菌状況およびその伝播要因 (II). *臨床と細菌*, 7: 506—512.
- 武井直己, 瀬川和幸, 徳本静代, 古前敏明, 岡崎富男, 佐々木真也 (1980): 1978年広島市を中心に流行した主として Echo-6 型ウイルスによる無菌性髄膜炎ならびにブラック法によるウイルスの分離同定について. *臨床とウイルス*, 8: 357—365.
- Kanamoto, Y., H. Kotani, M. Ogata, and Y. Fukumoto (1981): Isolation of mycoplasmas from raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*), fox (*Vulpes vulpes japonica*) and Japanese badger (*Meles meles anakuma*). *Jpn. J. Vet. Sci.*, 43: 267—271.
- Kim, S. K., I. Sakamoto, K. Morimoto, M. Sakata, K. Yamasaki, and O. Tanaka (1981): Seasonal variation of saponins, sucrose and monosaccharides in cultivated ginseng roots. *Planta Medica*, 42: 181—186.
- Kanamori, H., K. Morimoto, N. Kinae, and I. Tomita (1980): The formation of the mutagenic substances in the reaction between L-ascorbic acid and L-tryptophan. *Chem. Pharm. Bull.*, 28: 3143—3144.
- Kinae, N., T. Hashizume, T. Makita, I. Kimura, and H. Kanamori (1981): Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents—I. *Water Res.*, 15: 17—24.
- Kinae, N., T. Hashizume, T. Makita, I. Tomita, I. Kimura, and H. Kanamori (1981): Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents—II. *Water Res.*, 15: 25—30.
- 児玉陽太郎, 森本一義, 宗近郁子, 中嶋揮躬 (1981): カキ中の重金属の化学形に関する研究 (第2報). Cd 曝露カキにおける Cd の組織別分布とゲル濾過パターンについて. *衛生化学*, 27: 61—63.
- 児玉陽太郎, 森本一義, 宗近郁子, 中嶋揮躬 (1981): カキ中の重金属の化学形に関する研究 (第3報). 低分子分画中の Zn の化学形について. *衛生化学*, 27: 56—60.
- 笠井良次, 金田 宣, 田中 治, 山崎和男, 坂本征則, 森本一義, 岡田茂孝, 北畑寿美雄, 古川秀子 (1981): ステビア葉の甘味ジテルペン配糖体—レバウディオンド-A, -D, -E および関連配糖体の合成ならびに甘味と化学構造との相関. *日本化学会誌*, 5: 726—735.
- 金森久幸, 森本一義, 木苗直秀, 富田 勲 (1981): アスコルビン酸とトリプトファンの反応生成物とその変異原性. *薬学雑誌*, 101: 596—604.

編 集 委 員 会

西 尾 隆 昌 (生物学部)*
徳 本 静 代 (生物学部)
妹 尾 正 登 (病理学部)
児 玉 陽 太 郎 (理化学部)
佐々木 実己子 (食品衛生部)
表 敏 夫 (総務部)

*委 員 長

研 究 報 告

第 28 号

1981年11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(0822)51-4371

印刷所 (株) 柳 盛 社 印 刷 所
広島市中区東白島町8-23
〒730・電話(0822)21-2148

Bulletin
of
The Hiroshima Prefectural Institute of Public Health
No. 28
November 1981

CONTENTS

Originals

- Unusual Strains of *Salmonella paratyphi A* and *Salmonella paratyphi B*:
Their Atypical Characteristics on Triple Sugar-iron Agar Medium.
JUNZO NAKAMORI, KAZUO MIYAZAKI, KEN-
TARO ONIMURA, and HIDEYUKI DOI 1
- Mutagenicity Assay of Ordinary Foods. I. Processed Foods.
MARI MIZUTA..... 5
- Primary Carcinomas of the Urinary Bladders in Two Cattle.
MASATO SENO, HIROYUKI UMISA, SHINJI FUKUDA,
TSUYOSHI KAWASHIGE, and KIYOSHI TANAKA.....11

Reports

- Incidence of Salmonellae in Oyster Growing Area in Hiroshima Bay.
SHINJI FUKUDA, TAKASHI KISHIMOTO,
HIROSHI TOKUNO, and MIKIKO SASAKI.....19
- Residue of Dieldrin and Endrin in Melon and Soil.
YOUTARO KODAMA and KEISUKE KAWAKAMI.....27
- Hydrogen Peroxide in Japanese Noodle.
YOUKO NANASE, KUMIYO TAKATA, and TSUGUMARO YAMADA31
- Titles of Papers Published in Other Journals**35
-
-

Hiroshima Prefectural Institute of Public Health

Ujinakanda 1-5-70, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan