

## コレラ菌検査について

昭和52年6月、有田市を中心に発生したコレラの流行以来各地に散発例がみられ、また鶴見川のコレラ汚染もあって、厚生省は昭和53年8月11日に従来の「コレラ防疫対策実施要綱」を廃止して新しい要綱を定め、続いて「コレラ菌検査の手引き」(Ⅰ)、(Ⅱ)及び(Ⅲ)を作成した。手引き(Ⅰ)は糞便、(Ⅱ)は水及び底泥、(Ⅲ)は食品を対象にしたコレラ菌検査法である。

以上の経過から、愛知県では昭和54年3月31日付で「愛知県コレラ防疫対策実施要綱」を定め、本県において実施する防疫対策を規定した。さらに5月18日には「コレラ菌検査の手引(Ⅰ)」(以下手引き)が示された。そこで今後は、従来用いられてきた微生物検査必携第2版(以下必携)の方法に代って、手引きを参考にして検査を行うことになった。なお、上述の手引(Ⅱ)及び(Ⅲ)は近く通知される予定である。

周知のとおり、最近、コレラ菌検査は依頼件数が増加し、日常の検査になってきている。必携の方法を日常検査や集団発生時に用いるにはいくつかの問題点—増菌時間、培地の種類など—があり、手引きはこれらの問題点を検討し改正されたものと考えられる。また、本年2月当所で実施したコレラ菌検査に関する技術研修会は必携の方法について行ったので、必携の方法と比較しながら手引きの留意点について述べる。

検査の順序は図に示した。

### 増菌培養

必携ではアルカリ性ペプトン水による増菌培養の時間が8時間と示されている。従って、午後遅く検体が搬入された場合には作業が深夜に及ぶこ

ともあった。手引きの増菌培養時間は6~15時間と幅があり、夕方の検体は翌朝増菌培地から分離培地平板に塗抹してもよいので、この問題は解消された。また、二次増菌培養の培地 Monsur のペプトン水が手引きではアルカリ性ペプトン水に改正され、培地作成に要する手間が省けた。

### スライド凝集反応

コレラ菌の同定は迅速さを必要とするので、細菌の同定の原則からやや離れ、分離平板上の疑わしい集落から直接スライド凝集反応を行う。必携ではビブリオ寒天平板上の集落について行うよう示されているが、私共の経験では、ビブリオ寒天平板上の集落は色調が不鮮明であり、粘稠性で平板からかき取りにくく、診断用血清とも混ざりにくい。手引きではこの点に触れ「TCBS 寒天平板上の集落を用いる方が有利である」と述べている。

スライド凝集反応は疑似症を決定する上で重要な手技である。手引きでは、凝集は普通10秒以内に起る。約30秒反応させても非常に弱い反応しかみられないときは「疑わしい」とするよう具体的な指示がなされている。とくに10秒以内と強調されているように、コレラ菌の凝集は早く、かつ強く表れるが、いずれにしても疑わしい場合を含め凝集を認めたときには、すみやかに衛生研究所へ平板を送付する。

なお、必携が改訂されるまでの長い期間用いられてきた「コレラ菌検査実施要領」(昭和38年11月14日付)には、分離培地上の集落についての検査のほか、水様便について顕微鏡検査を行うように記載されている。後者の方法は、(1) 非常な熟練を要し、判定が困難なこと。(2) 現在のコレラ患

者はかならずしも水様便を排出していないこと、などの点を考慮に入れ、手引きではこのような方法は削除されている。

**確認培養**

手引きに示されたコレラ菌同定に必要な確認培地の種類は5種類であり、使用する培地により4種類又は3種類で同定が可能である。必携ではリジン脱炭酸試験用培地としてTaylerの培地を自製することになっているが、手引きでは市販のリジン培地を用いるように改正されている。

確認培養の判定をめぐり、池の端文化センターの集団発生にみられたリジン陰性のコレラ菌に対する注意や、エルトールコレラ菌ではTSI寒天培地の培養時間が12時間以上経過すると斜面部、ことに先端部から赤変することなど、検査に当たって留意すべき実際的な注意事項が随所に記述されている。

**検査結果の報告**

コレラ菌の検査には正確な結果は勿論のこと、

迅速かつ適切な患者の治療と防疫措置のために遅滞のない報告が要求される。手引きでは特にこの点が強調され、推定的同定(疑似症決定)の段階で防疫担当者に連絡するよう示されている。例えば、検体が午前中に搬入された場合、一次増菌後の推定的同定の時期は材料搬入日の翌朝に、二次増菌からの分離培養の結果でも材料搬入日の翌々日には可能であると記されている。

以上、手引きの主な留意点について述べた。

本年度から中心保健所では平常時におけるコレラ防疫対策の一環として、コレラ汚染地域から帰国した食品関係者や水道管理関係従事者に対して勧奨検便が実施されている。正確な検査を行うには防疫担当者と検査担当者とがつねに緊密に連携して、よい材料を検査に供するよう努めなければならない。また、迅速な結果を期待するには防疫担当者が検査室に前もって件数、到着時間などを連絡しておくことが大切であると思われる。

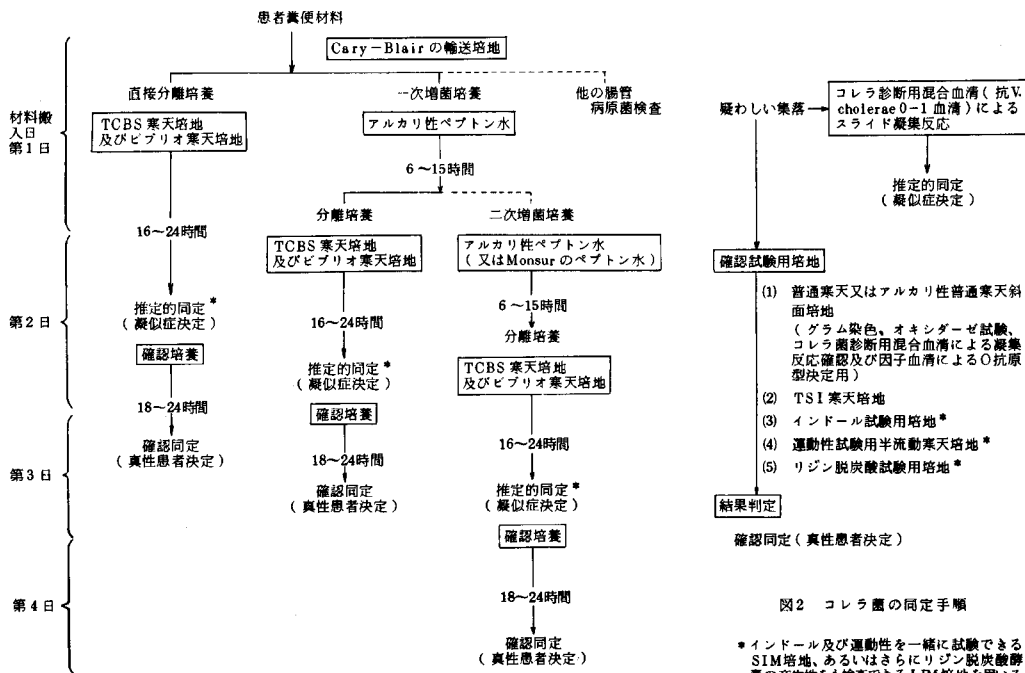


図1 糞便材料の菌検査順序

図2 コレラ菌の同定手順

\*国内初発真性患者又は保菌者としての決定のためには、この段階でコレラ菌らしい集落の認められる分離平板、あるいはそれを普通寒天斜面培地に塗抹したものを国立予防衛生研究所へ届ける。

\*インドール及び運動性を一緒に試験できるSIM培地、あるいはさらにリジン脱炭酸酵素の産生性をも検査できるLIM培地を用いると便利である。

(細菌部 船橋 満)

## 食品中のタール系着色料

食品に添加が許可されている合成着色料は現在18品目で、その内タール系色素は11種である。すべて水溶性、酸性色素で、単色で使用されることはすくなく、通常2～3種類が目的に応じて組み合されて食品を着色し、食生活に供されている。これらの色素は、常識的な使い方がされているかぎり安全量の範囲を超えないという考え方から量的な規制は受けていない。従って、検査に当たっては定性分析を実施するもので、その手法については「食品中の添加物分析法」(厚生省通達)などに示されている。ここでは、分析をおこなううえで特に注意する点、ならびに学会などでの最近の動きについて紹介する。

### 1 試料の採取量

添加物分析法で量の明記されている試料についてはその量でよいが、大部分のものは20～200gと定められているので、その範囲内で判断しなくてはならない。

一般的に、添加されている色素量は10～200ppm前後で、分析上の定性限界はほぼ10ppm程度である。最終試験溶液の濃度を500～1,000ppmに調製しようとするれば、採取量を推定することもできる。肉眼的に濃いと思われる試料は150～200ppmの色素量を有し、生姜漬、梅漬などは20gもあれば充分であり、清涼飲料水では50ppm以下のものが多いので50～100mlは必要である。かまぼこ、ジャム、ソーセージなどは使用量が少いので100g採取する。いずれにしても、色素は肉眼で判別できる利点があるので濃淡をみたうえで適宜に採取する。

採取にあたっては、かまぼこなどのように表面が着色されている場合は、その部分をけずり取って行えばよく、ショートケーキなどのように、添加されている色素が明らかに区別されて使われている場合は、各色ごとに採取して試験溶液を調製し、できるかぎり単色でそれぞれ同定ができるようにした方がよい結果が得られる。

### 2 試料溶液の調製

許可タール色素はすべて水溶性、酸性であるので、この特性を充分に利用し、できる限り試料溶液の段階で妨害成分を除去するのが原則である。

通常の場合、5倍程度の温湯を加えてよくかき混ぜ、静置したのち上澄をろ過、または遠心分離して試料溶液とする。このとき、ろ紙が強く染着すると直接染料の疑いがある。デンプン、蛋白質の溶出をさける目的で、グリーンピース、奈良漬など農産食品には1%アンモニアアルカリ性80%エタノール溶液を使用する場合がある。一般試料にも応用できるが食品の表面を凝固させ色素溶出を悪くする場合もある。アルコール濃度は50～60%程度の方が効率のよい場合が多い。チョコレート、ショートケーキ、ハム、ソーセージなど脂肪性食品では予めエーテルまたはヘキサンで脱脂操作を行う必要がある。このとき、有機溶媒層に着色が認められれば油性タール色素の存在が考えられ、つぎの操作で確認する。有機溶媒層を1N-NaOH溶液でよく洗い、この洗液が着色すれば、これにエーテルまたはヘキサンを加えて振る。これをくり返しても溶媒層の色が淡くならないときは、この溶媒層を試験溶液として油性色素の試験を実施する。

試料溶液の調製に、アルカリ溶液を用いた場合は必ず中和し、またアルコールを用いた場合は水浴上で充分にアルコールを揮散させたのちに抽出操作にうつる。

### 3 色素の抽出

毛糸染色法が最もよく行われる。脱脂した純毛白色毛糸を用い酸性で色素を染着、液性を変えアルカリ性で溶出、分離させるものである。すぐれた方法で繁殖性があるが、加熱操作をとるなことから青色2号、赤色3号などは分解するおそれがある。また、毛糸の洗浄処理が充分でないと、毛糸の漂白に使用されているヒドロサルファイトの影響で還元作用が起り黄色5色、赤色102号などが一部分解される。この生成物はペーパークロマトでの同定(展開溶媒アセトン6:イソア

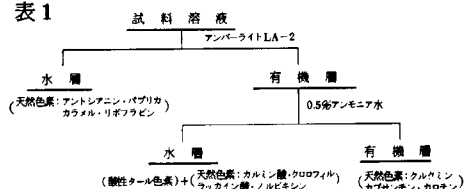
ミルアルコール5：水5)の際、黄色4号の位置に黄色スポットとしてあらわれ、誤認の可能性がある。

毛糸染色法の他に最近種々の抽出法が検討されているので紹介する。

a) イオン交換剤による方法<sup>注1)</sup>(表1)

アンバーライトLA-2を使い、殊に最近使用が増え始めた天然色素群との分離を試みている。

表1



アンバーライトLA-2試薬：アンバーライトLA-2、5mlをベンゼン、nブタノール(7:3)混合溶媒1ℓに溶解し、さらに3%酢酸400mlおよび飽和硫酸アンモニウム溶液25mlを加えて振り混ぜ静置したのち分離した有機溶媒層を使用する。

b) 吸着剤による方法<sup>注2)</sup>

ポリアミド末が多く使われる。この方法は加熱操作がないこと、アルコール溶液にも使用できるなどで毛糸染色法の欠点を補うことができる。

試料溶液を酢酸酸性としポリアミド末約0.5gを加えてふり混ぜたのちろ過、または遠心沈澱によって分離する。色素が吸着されたポリアミドをとり出し、稀酢酸で洗ったのちアルコール、1%アンモニア溶液(1:1)を加えて色素を溶出させ試験溶液とする。

この方法では、青色2号がやや吸着性が悪いことを除いて良好な抽出法で、桜桃シロップ漬缶詰中の色素についてすぐれた事例発表がある。<sup>注3)</sup>

c) 溶剤による方法

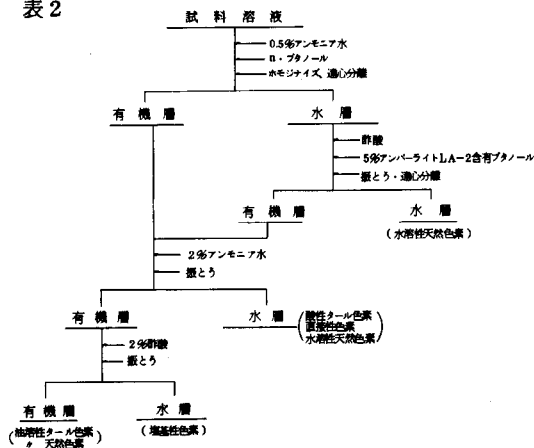
衛生試験法などに、既に系統的な分離法が各種示されている。この方法では、試料溶液中に浮遊物、酸、アルカリおよび塩類が残存すると分離操作が非常に妨害される。

最近の報告例<sup>注4)</sup>について紹介する。(表2)

4 色素の分離、同定

抽出された色素溶液を500~1,000ppm程度に濃縮したのち、常法によりペーパークロマト(上昇法、展開溶媒アセトン6：イソアミルアルコール5：水5)をおこなう。赤色のキサントン系色素

表2



群(3号、104号、105号、106号、エオシン)はRf0.6~0.7の位置にすべて上昇するので、シリカゲルプレートによる薄層クロマトをおこなうことが必要である。この場合の展開溶媒は、水を飽和したメチルエチルケトンが適している。青色1号は色素製造時の分解物混入により、Rf0.5の主スポットの上部に2つの青色スポットのあらわれる場合がある。

昨年の事例として、輸入品のキャンデー中から赤色の色素が分離されRf0.4附近にスポットを得た。標準色素との比較ではボンソーSX(旧赤色4号)に相当するので、吸光度測定などによって検討した結果、米国で許可使用されているFD&C、Red No40(Allura red AC)であった。輸入食品には注意する必要がある。

天然色素の一部(アナー、βカロチン、クルクミン、ラッカインなど)には、酸性タール色素と同様の挙動を示すことがある。これらは一般的にスポット自体のまとまりがわるくテーリングが大きい。この傾向は薄層クロマトでは更に明瞭で、ぼやけが可能であるが、このような場合、展開溶媒をかえておこないRf値から色素の確認をおこなうようにしなければならない。

食品中の着色料による違反事例は最近すくない。しかし、天然色素使用の増加は世界的な傾向であり、また添加物自体の見直しもすすめられている。このような現況から、色素検査上の今後の問題点としては、①定量法について、②天然色素分析についてなど多くの課題をなげかけている。

注1) 西島基弘他：食衛誌18.5(1977)

注2) 厚生省：食品中の添加物分析法第2集（しよう油、ソース中のタール色素）

注3) 青山幹他：第11回愛知県試験検査研究発表会（昭51.2）

注4) 外海泰秀他：第36回食品衛生学会（昭53.12）

（食品薬品部 宇野圭一）

## 生体試料(血液・尿)中の重金属分析について II

### — 検体の前処理から測定まで —

前報において、重金属分析を実施する場合に、まず考慮しなければならないガラス器具及びその洗浄、試薬などについてのべた。今回は実際に検体を扱い、機器によって数値を算出する場合に注意すべき点について説明する。

#### 1 サンプルングについて

多量の検体から分析に用いる試料をサンプルングするとき、そのサンプルは検体を代表していなければならない。血液・尿などは液状であるので問題がないように見えるが、長時間放置すると沈殿が析出して来る。しかし、尿については加温振とうし、血液については充分振とう直後であればほとんど問題はない。

試料の重量を天秤によって秤する場合の有効数字は特殊な場合を除いておおむね3桁まで正確に秤量すれば通常の分析にはさしつかえない。なお、容量でサンプルングする場合には、比重も同時に測定しておく必要がある。

#### 2 試料の前処理

一定量を採集した試料は、希釈・溶解のみでそのまま分析に用いることが出来る場合もあるが、ほとんどの場合は、何らかの化学処理を必要とする。原子吸光分析の場合には、湿式分解を行なうことが多い。

前報においてふれたように、添加する試薬の量はなるべく少量にした方が汚染が少なくてよい。しかし、特に硝酸・過塩素酸の2種で行なう場合には、絶対に乾固させてはならない。完全分解の前に乾固すると、内容物が黒化し、次に爆発して思わぬ事故を招くことがある。衛研では、これに

硫酸を少量添加して分解を行なっている。分解は内容物が無色透明となり、加熱によっても着色しなくなれば完了したと見てよいが、中には血液のようにわずかに黄色を呈することもある。

湿式分解のほか、乾式灰化、低温灰化等の方法があるが、それぞれ測定金属の損失がないように注意して行なえばよい。

#### 3 キレート抽出について

湿式分解によって得られた分解液は、一定量にメスアップすれば、そのまま原子吸光分析用の検液とすることが出来る。しかし、生体試料中には多量のNaやPなどが含まれていて、微量含有金属の測定にはかなり影響を及ぼすことがある。これらの干渉物質を効率よく除去する方法として、キレート抽出が広く用いられている。

キレート剤は、多種類市販され、それぞれ目的にあったものを選んで使用すればよいが、出来るだけ多種類の金属類とキレートを作り、しかも防汚物質を除去するものとして広く用いられているものにAPDC（ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム）やDDTC（ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム）がある。特にAPDCは、アルカリ金属、アルカリ土類金属、陰イオンをつくり易い元素とはキレートをつくらず、およそ30金属とキレートをつくる。DDTCについてもほぼ同様であるが、やゝ対象金属が少ない。

APDC、DDTCによって生成したキレート化合物は、さらに都合よいことに、有機溶媒で抽出できることである。ここで注意したいのは、キレート生成にはある程度時間を要し、試薬を添加してから少なくとも5分間は振とうし、次の操作に移

ることが必要である。次に一旦生成したキレート化合物は、長時間安定とは言えない。通常MI BK (メチルイソブチルケトン)によって抽出するが、例えば、Mn、Fe、Cu、Znではキレート化合物が加水分解を受けて、再び水層へ移行することがある。このため、抽出したMI BK層は速やかに使用するか、水層を完全に除去しておく必要がある。

#### 4 標準液について

定量分析において、標準液は最も重要なもので、この調製法を雑に行なうと、得られる数値は信頼性がなくなる。

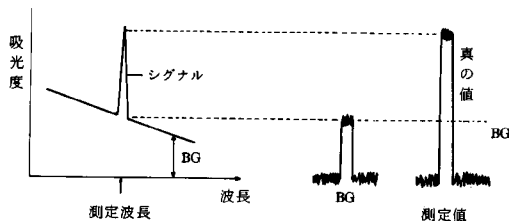
最も望ましい標準液調製法は、高純度の金属片を精秤し、酸などに溶解させることであるが、分析の度にこの操作を行なうことは大変である。よく用いる標準液については、上記の方法で調製した一定濃度(例えば1,000 ppm)の標準液を用いるか、市販されているものを利用してもよい。使用時これを希釈して用いることができる。高濃度の標準液は、比較的長時間放置しても濃度変化は少ないがCdやHgのように、低濃度に希釈すると、容器に吸着されたり、揮散したりして、濃度が変化してしまうものもある。使用時には面倒がらずにその都度希釈して用いなければならない。

定量分析に用いる検量線用の濃度範囲を決めるのは厄介であるが、あらかじめ測定する数値が予測できる場合には、その数値を基準とし、その0.5から5倍程度に相当する検量線を用いれば大体検量線の範囲に納めることが出来る。全く数値が不明の場合には、10倍間隔の標準液を調製し、概略の数値を求めてから本試験に入った方が賢明である。

#### 5 原子吸光分析について

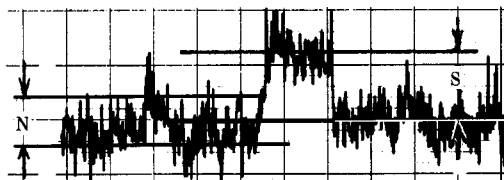
原子吸光法は、高感度で、最もよく利用されている金属測定法であって、フレイム法、フレイムレス法があるが、説明するまでもない。しかし、バックグラウンド(BG)のある可能性があることは注意しなければならない。例えば図のように、けむりや、完全に原子化されない何かの粒子があったときには、検出器は、シグナルとBGの区別が

つかず、測定してしまうからである。すなわち、実存する量よりも大きい数値となってしまう。これらBGを除去する方法として、重水素ランプ補正や、ゼーマン効果を用いた方法によって真の値が得られるように工夫された原子吸光法も用いられている。



#### 6 検出限界

微量金属の定量には、機器の感度をあげて測定することが多い。シグナル(S)と同様に、ノイズ(N)も大きくなってしまふ。では、検出限界はどのようにして決めたらよいだろうか。通常Sは $2 \times N$ で表わし、下図のようにすればよい。



すなわち、ノイズの2倍あれば、シグナルとして検出したことになる。このノイズの巾は、ノイズの標準偏差( $\sigma$ )の4倍となり、シグナルの巾はノイズの中心からシグナルの中心までとしている。さらに定量分析には、検出限界の5~10倍以上をもって測定値とするのが通常である。

このほかまだ注意すべき点は多々あるが、詳細は他の専門書を見ていただきたい。なお得られた数値等については次の機会に紹介したい。

(生物部 河村典久)