



衛研

# 技術情報

VOL.10 NO.3

1986

## サルモネラの血清型別について

### はじめに

1983年国際腸内細菌委員会の中のサルモネラ小委員会において、サルモネラ属の新しい分類とO血清群の呼称の変更等が行われたが、これについては、すでにこの技術情報 (Vol.10, №1) に報告されている。

現在、血清型別はこれに基づいて行われるが、若干の問題があり、保健所由来株等の型別が一部とどこおっているので、この問題点及び対策について述べてみたい。

### O群血清

サルモネラはO及びH抗原(一部Vi抗原)を検

査し、血清型別されるが、H抗原については従来のもので何ら変るところはなく、問題となるのはO抗原である。これも本質的なものではなく、呼称の変更、血清群の統合等により、従来、簡易に習慣的に行われてきた同定法が不可能になったことからくるものである。

現在、O抗原はO1からO67までの因子があり、サルモネラはこれらのO抗原因子の1つをもつものから2つあるいはそれ以上をもつものなど、多岐にわたり、この組み合わせの下にO2群からO67群まで46群に分けられている。このうち食中毒や下痢症に関係の深いO2群からO35群の各群を構成するO因子について示すと表1の通りである。

表1 O群別と構成する因子について

群	因子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	27	28	30	35	その他	
2		△	○										○																			
4		△			○	△							○														△					
7							○	○							△																	
8 <sup>1)</sup>							○	○													△											
9		△							○			○																				
9, 46									○			○																				④6
9, 46, 27 <sup>2)</sup>		○							○		○																○					④6
3, 10				○							○				△																	
1, 3, 19 <sup>3)</sup>		○		○							○				△					○												
11												○																				
13 <sup>4)</sup>		△												○										○	○							
6, 14 <sup>5)</sup>		○					○								○										○	○						
16																	○															
17																		○														
18							△							△					○													
21																																
28																																○
30																																○
35																																○

注) △・存在しないことがある。又はその存在はフェージの介達による。 1) 6、8因子をもつ菌と8因子をもつ2群あり。 2) 1因子をもたない菌あり。 3) 10因子をもたない菌が多い 4) 22因子又は23因子のどちらかをもつ。 5) 6、14因子以外は菌によりその保有はまちまち。

これらの多数の因子血清を自製することは事実上不可能に近いので、市販の血清（我国ではデンカ生研製の血清が多く使われているので、以下本血清を指す）を使って同定しているのが現状であるが、ここで注意しなければならないのは、診断血清には群名が使われているが、群を構成する全ての因子血清を含んでいる訳ではないということである。市販血清の構成する因子については表2に示した通りである。換言すれば、O群型別血清は型別のために重要な因子を有している血清である。例えば、O2群の血清はO2因子のみをもつので、表1から、この血清に凝集すればO2群と決定できるといった具合に、大部分のものは都合良くできている。

表2. 市販O血清中の凝集素

群	血清中の凝集素	群	血清中の凝集素
O2	2	O11	11
O4	4, 5	O13	13, 22, 23
O7	7	O6, 14	6, 14, 24
O8	8	O16	16
O9	9	O18	18
O9, 46	46	O21	21
O3, 10	10	O35	35
O1, 3, 19	19		

しかしながら、表3に示した通り、O9, 46, O3, 10, O6, 14の各群血清に凝集したときは、これらの群血清に含まれるO因子が他の群、即ち、それぞれ、(O9, 46, 27), (O1, 3, 19), (O7, O8, O18)と同一のものを含むので、両者の区別のために、これらの群血清にも凝集反応を行って、群の決定を行わなくてはならない。

表3. O群血清の凝集と他群菌の可能性

凝集したO群血清	鑑別が必要なO群
O9	O9, 46, 27
O3, 10	O1, 3, 19
O6, 14	O7, O8, O18

**O8群の血清型別**

O群別された株は、H血清を用いて1相、2相を決定し、血清型名を決める訳であるが、同一群の中で同じH抗原をもつ2つの菌が存在することも少なくない。このような同一血清型又はフェージの関与等のため、多くのものは亜種が異なっている場合が多いので、このときは生化学性状から血清型名を決定できる。しかしながら、O8群の

ものは、O抗原がO6, 8のものとO8のものがあり、この区別にはO6血清が必要である。O抗原が同定できなくても、H抗原が異っていれば型別は可能であるが、困ったことに、H抗原が同じで、O抗原のみが異なるものが多数あり、そのうえ、これらの株は全て亜群1のものである。両者の区別はO6抗原を有しているか否かであるから、O6, O6, 7（これらの血清は市販品なし）又は市販のO6, 14群血清での凝集の有無を確かめる必要がある。この中で、市販のO6, 14血清中のO6因子はその力価が弱く、応用は無理とされる（私信）ので、O6又はO6, 7血清の入手が不可欠となる。

**過去3年間の当所における型別結果**

各保健所及び当所では、食中毒、散发下痢患者、食品従事者等からのサルモネラの検査を行っているが、そのうちの大部分のものについては、当所で血清型別を実施している。57, 58, 59年度に実施した結果について、表4に示した。前述の通り、D<sub>1</sub>及びE<sub>1</sub>は新しい分類のO9, 46, O1, 10群に該当するから、それぞれO9, 46, O1, 3, 19群の可能性について検討が必要となるが、この問題は市販血清にて対応可能である。問題のO8群は、従来のC<sub>2</sub>及びC<sub>3</sub>群のものであるが、過去3年間の血清型別の結果、C<sub>2</sub>群に該当するものが約26多あり、この問題を解決しなければ、型別の意味も低下するものと考えられるので、当所でO6又はO6, 7血清の作製を試みている。

**O6又はO6, 7血清の作製**

S. newport及びS. thompsonを使ってO6及びO6, 7血清の作製を試みているが、O6血清の作成にはS. newportを使って出来たO6, 8血清からO8因子の吸収が必要である。この際、O8因子に比べてO6因子の力価が低いことが予想されること、さらにO8因子の吸収で、O6因子の力価も低下するといったことが懸念され、O6血清の作製はかなりむづかしいと考えられる。従って、O6血清が実用にならない場合にはO6, 7血清を使って型別する他はないと思われる。いずれにしても、これらの血清の作製には、ウサギを使って免疫を行い、高い力価のものを得る必要があるため、2~3ヶ月の観察が必要である。

表4. 過去3年間に検出されたサルモネラのO群別

O 群	57 年		58 年			59 年			計
	食中毒	散発患者 保菌者	食中毒	散発患者	保菌者	食中毒	散発患者	保菌者	
B		18 35	1	29	33	1	31	29	177
C <sub>1</sub>		5 57	1	9	44	3	11	45	175
C <sub>2</sub>		6 38		8	71	1	1	38	163
D <sub>1</sub>		7 30		10	9	2	6	20	84
E <sub>1</sub>		3 6		2	3			2	16
E <sub>2</sub>								4	4
E <sub>4</sub>		1 1		1	1			2	6
G					1				1
K								1	1
その他							2		2
計		40 171	2	59	162	7	51	137	629

**おわりに**

サルモネラのO型別に関する問題点は、以上の通りであるが、新しい呼称のO8群は、従来のC<sub>2</sub>及びC<sub>3</sub>群のものに他ならない。従って、この問題は従来から存在したことであり、今回新たに出現したものではない。従来行われてきた血清型別は、C<sub>2</sub>群血清としてO8因子血清を用い、これに凝集を示す菌をC<sub>2</sub>群菌と簡易に同定する習慣のうえに

たつて、型別が行われていたと考えられる。今回のサルモネラの呼称等の変更は、より正確な血清型へと導く改正であったと思われる。

問題点及び対策に関しては、以上の通りであるが、今後、血清の問題の解決がはかられ、O8群菌の型別が可能となった時点で、この問題に決着をつけたいと考えている。

(細菌部 斎藤 眞)

**Campylobacter jejuni の血清型別について****はじめに**

Campylobacter jejuni (C. jejuni) は、1972年、ベルギーでDekeyserらによって始めて下痢患者の糞便から検出され、同じ研究グループのBatzlerによって胃腸炎の起病性が再認識された。以来これによるヒトの胃腸炎が世界各地で報告され、現在では下痢、腸炎の主要な原因菌であると考えられている。本菌の詳細についてはすでに技術情報 (Vol. 4, No. 2, 1980, Vol. 7, No. 1, 1983) 及び愛知衛研所報 (No. 33, 1983, No. 34, 1984) 等でお知らせしたので省略し、今回はいまだ完全なものとはいえないが、C. jejuni の血清型別の現状及び当所で実施した血清型別成績について紹介します。

なお、血清型別とは、本来、菌が保有するすべての抗原分画、すなわち、O, K, (もしあれば) 及びHを表現すべきものであるが、本菌の場合はすべての血清型別が明らかにされているわけでは

ない。血清群と表現すべきであるとする研究者もあるが、ここでは血清型として述べることにする。

**血清型別分類の試み**

散発例や集団例から、C. jejuni の検出率が高まるにつれ、疫学マーカーとしての血清型別分類の研究が1978年頃から、世界各地でそれぞれ独自に行なわれはじめてきた。今までに報告された血清型別の主な様式を表1に示した。

この表から明らかなように、C. jejuni の血清型別は2つの方法に大別される。その1つは、Liorら(カナダ)、Rogelら(イスラエル)及び伊藤ら(東京都立衛生研究所)によって開発されたスライド凝集反応によるものである。これらの型別用抗原は生菌あるいは、ホルマリン処理菌体を用いることから、菌体表在性物質(恐らくはLPS)の抗原特異性に基礎をおいたものである。

他の1つはPennerら(カナダ)、Lauwersら

(ベルギー)、及び中西ら(神戸市環境保健研究所)によって試みられている間接赤血球凝集反応(IHA, indirect hemagglutination)によるもので

ある。加熱抗原を用いる間接赤血球凝集反応では主としてO抗原の特異性に基礎をおいたものである。

表1. 血清型別の試み

研究者	免疫に用いた抗原	型別法	型別用抗原
Abbott et al	生菌および加熱菌	凝集反応	生菌、加熱菌
Bryner	生菌	IHA*	加熱菌
Kosunen et al	ホルマリン死菌	凝集反応、(スライド、ラテックス、プロテインA)	生菌、加熱菌
Lior et al	ホルマリン死菌	凝集反応	生菌
Lauwers et al	加熱菌、生菌	IHA	生菌またはホルマリン死菌
Penner & Hennessy	生菌	IHA	加熱菌液上清
Rogel	生菌またはホルマリン死菌	凝集反応	生菌
伊藤ら(東京)	ホルマリン死菌	凝集反応	生菌またはホルマリン死菌
仲西ら(神戸)	生菌	IHA	加熱菌液上清

\* 間接赤血球凝集反応(受身血球凝集反応)

**スライド凝集反応と間接赤血球凝集反応との比較**

スライド凝集反応と間接赤血球凝集反応による型別法は、いずれも一長一短があるので、両者の特徴を比較したCDCのPattonらの大要を表2に示した。

スライド凝集反応では吸収試験による因子血清を型別用抗血清として使用することから、その調整が若干面倒であるが、その他は特殊な器具、器材を必要とせず、手技も簡易であり、1分程度で現われるスライドガラス上の凝集像を判定するこ

とにより、短時間で型別を行なうことができる。

一方、間接赤血球凝集反応では抗血清の調整は簡単であるが、型別用抗原は100℃、2時間の加熱を必要とすること、マイクロトレイが必要であり、反応時間も約3時間と比較的長時間を要する。

表示していないが、血清型に関与する特異抗原は、両者異なったものをみているので、間接赤血球凝集反応で単一の血清に凝集したものが、スライド凝集反応では数種類の血清型に反応を示すこともあるし、またその逆も認められている。

表2. スライド凝集反応と間接赤血球凝集反応との比較

比較項目	スライド凝集反応 (Lior, Rogel, 伊藤ら)	間接赤血球凝集反応 (Penner, Lauwers, 仲西ら)
抗血清の作製	ホルマリン処理抗原家兔免疫吸収血清	ホルマリン処理抗原家兔免疫未吸収血清
型別用抗原	生菌あるいはホルマリン死菌	100℃2時間加熱抽出抗原
反応性	単一血清型と反応	数種類の血清型と反応することが多い
器具・器材	特殊なものはない	マイクロタイター用器材
抗血清の保存	4℃	凍結
手技	単純	複雑
安定性	やや安定	安定
使用時間	短時間(1分)	長時間(約3時間)
コスト	やや高い	安い

**国際委員会で採用された血清型別**

1985年7月10日オタワで開催された国際カンピロバクター型別委員会での決定事項をふまえ、国際委員会では次の2種類の血清型別法を採用することになった。

その1つは、ホルマリン死菌すなわち非加熱抗原を用いる方法の代表として、Liorのスライド凝集反応(C. jejuni 39, C. coli 18, C. laridis 5, 計62種類の血清型)と、他は加熱抗原を用いる方法の代表として、Pennerらの間接赤血球凝集反応

(C. jejuni 42, C. coli 17, 計59種類の血清型)である。

前者は操作が簡単であることから、抗血清さえあれば容易にルチン化できる利点はあるが、反面、反応に関与する抗原が複雑であることから、2、3種の血清型に凝集する菌株が出現する欠点がある。これに対して、後者は加熱抗原を用いるため、反応に関与する抗原が比較的均一であること、感度が高いなどの利点がある反面、血球を抗原に感作する手間がかかり、ルチン化に難点がある。

#### 日本における血清型別

日本におけるC. jejuniの報告例は、昭和54年1月東京都の某保育園における集団発生例を嚆矢として、各地の衛生研究所などにおいても集団例や散発下痢患者から本菌の検出例が多数報告されるようになった。昭和57年3月、厚生省はカンピロバクターを食中毒菌起因菌に加えた。これらことから、疫学調査の重要な手段として、血清型別の必要性が増大してきた。

今まで述べてきた血清型別は個々の研究者が独自にあるいはグループとして行なってきたものであり、国際委員会において採用された血清型別法についても未だ市販血清はなく、これらの方法が広く普及するまでには数年以上を要するものと言われている。

折しも、血清型別の必然性から、厚生省科学研究費「微生物検査におけるレファレンス・システムに関する研究」班の中に「カンピロバクターの血清型別システムの開発」の研究班が昭和60年10月に発足した。当所は東海・北陸ブロックの衛生研究所を代表してこれに参加した。なお、参加した衛生研究所は秋田、東京、大阪、神戸市、広島、山口、熊本及び当所を加えた8ヶ所の衛生研究所である。

研究班での討議の結果、下記の2点が了承された。

(1). 国際委員会の決定事項を尊重し、実用性とWHOの志向を考慮してLiorのスライド凝集反応を採用し、このシステムの開発をめざすこと。

(2). Liorのシステムの導入には時間を要するので、その間の臨時措置としてLiorの方法に類似した東京都立衛生研究所が開発したシステムを採用する。東京都立衛生研究所は、そのために必要な

吸収血清及びレファレンス株を各ブロック代表の衛生研究所に配布すること、及び東京都のシステムとLiorのシステムの比較を行なう。

この結果、当所は混合血清6本(2ml分注)、吸収血清32本(1.5ml分注)及び血清型別用レファレンス株32株を東京都立衛生研究所から分与を受けた。

#### 愛知県における血清型別成績

当所では散発例31名から分離したC. jejuni 36株(5名からは2株)を保存してきた。これらの菌株の血清型別の成績を表3に示した。

表3. 保存菌数の血清型別

血清型(TCK)	株数
1	2 ※1
3	1
6	1 ※2
11	1 ※3
12	2
16	1
20	1
21	2
23	1
24	5 ※1, ※3, ※4
27	4 ※5
1, 6	3
6, 24	2 ※2
型別不能	10 ※4, ※5
合計	36

注. ※1～※5の各1株は同一人からの分離株

供試株数が少なく、未だはっきりした傾向を伺うことはできないが、TCK 24型、27型が多い。更に2種類の血清型に凝集するものや、型別不能のもの10株が認められた。また、同一人から分離された2株の血清型はすべて異なっていた。なお、分与された吸収血清の量にも限りがあるので、当所ではレファレンス株を用いて吸収血清の作成を進めている。

#### むすび

C. jejuniの血清型別の現状及び東京都のシステムを用いた当所保存菌株の血清型別成績について紹介した。本システムを用いた場合、集団発生の分離株では2～3種類の血清型が出現することや、約30%の型別不能株が認められるなどの報告もあり、これらの点の解明が急務であると考えられる。

以上のことから、今後、保健所、病院などで、食中毒事例や散発患者から、*C. jejuni*が検出された場合は、一平板から出来るだけ多くの集落を、釣菌していただき、可及的、すみやかに菌株の送付をお願いするものであります。なお、本菌は、室温で保存すると死滅し易いと言われているが、当所での試験の結果、臨床用TGC半流動培地（寒天を最終濃度0.5%）に接種し、冷蔵保存すれば約1ヶ月は生存が可能であることが判明している。

（細菌部 船橋 満）

#### 参考文献

- 坂崎利一編，食中毒Ⅱ，一新たに認定された食中毒菌一，220-269，中央法規出版株式会社，1983.
- 伊藤 武：カンピロバクター感染症に関する研究の動向，一第2回カンピロバクター国際会議について一，*Modern Media* Vol. 30, (3) 156-167, 1984.
- 伊藤 武：カンピロバクター感染症に関する研究とその後の進展，一第3回カンピロバクター国際学会について一，*Modern Media* Vol. 32, (2) 62-76, 1986.

## 最近の漢方製剤について

### はじめに

「近頃の漢方薬は本物が使われているのだろうか?」、「成分も確かに入っているのだろうか?」何となく感ずる疑問である。

合成医薬品ではまれに副作用の不安があるが、漢方薬は慢性疾患・不定愁訴などの症状に有効でしかも副作用のないこと、さらに服用しやすいエキス製剤が開発されたことなどの理由から最近急に需要が増大している。その結果、昭和42年に健康保険の適用が認められてより徐々に追加され54年には厚生省の医薬品承認数4,117品目中漢方・生薬製剤はその40%を占め、現在では医療機関の約60%が使用するようになった。このように普及している漢方薬、とくに漢方製剤について、現在の状況の一部を紹介したい。

### 漢方製剤

漢方製剤は約2000年前中国に完成した東洋医学を基盤にした治療薬で長い歴史と経験に基づいて処方された複合製剤として発展してきたものである。したがって、各生薬の特定の成分の薬効に注目し、西洋医学的思考の上になつた生薬製剤とは本質を異にするものである。わが国では奈良朝時代に伝来してからすでに1000年の伝統をもつことになる。

厚生省は、古代中国の古方（後漢の張仲景が著した傷寒論の113方、金匱要略の262方）を土台に近世までの数千処方の中から、東洋医学者及び現在出版されている漢方関係の成書等によって有

効性が認められている210処方を選択し、成分・分量、用法・用量、効能・効果の基準を示し、承認申請内規とした。現在わが国ではこのうち約150処方の製剤が製造・販売されている。

わが国で製造される漢方製剤の原料生薬は一部を除きほとんど輸入で、その大部分が中国産である。昭和57年の調査では輸入生薬の種類は約300、輸入量は約70,000tに及び、この量はわが国の総使用量の約85%を占めている。国内産は黄柏、当帰、芍薬、十葉、川芎、葛根などがあるが、必ずしも中国のものと同じ基原でないものもみられ、種類、生産量共に自給にはほど遠く、もっぱら輸入に依存している。

中国産は野生品と栽培品が8:2の割合で野生採集品の方が多い。しかし最近では消費量の増加から資源不足の予想される植物に対しては栽培化、品種改良の研究が進み、実用化されようとしている。

要するに漢方製剤は数種あるいはそれ以上の生薬を組み合わせて製造したもので、個々の生薬は天然物なるが故に多くの成分を含有するため、製剤の組成は極めて複雑である。さらに各生薬は基原植物が同じでも産地、気候、土壌、採集時期等によって含有成分の状態が変わることも多く、又製剤の加工法も若干異なりその品質を一定にすることは仲々困難である。

一方、使用する側としては、冒頭のように原料の生薬が本物で、品質が良く、内容成分が一定であり、かつ製剤になってもその品質が変わらないこ

とを要求するものである。

古来、漢方・生薬製剤の多くは、服用時に浸出ないしは煎出して調製したものであるが、最近では生薬をエキス化し、次に顆粒剤、錠剤等の剤型にして服用を簡易にした製剤すなわちエキス剤がほとんどである。

エキス剤の一般的な製造法は漢方処方にとくに煎じ方に指定があるものを除き、処方の全生薬を混ぜた上で通常は水又は希アルコール(30%以下)で抽出し、抽出液を40°以下で減圧濃縮、この濃縮したエキスを乾燥粉末化あるいは賦形剤にコーティングして顆粒剤、錠剤に加工したものである。しかし、これらエキス化した製剤と古来の浸剤、煎剤等と同等の薬効が期待できるか、又その剤型での経時的安定性はどうかなどについては今後十分検討されるべき問題であろう。

### 品質評価

生薬及び漢方製剤は、合成医薬品のような成分処方ではなく、多成分の混合物のため、その品質評価は単純に物性やエキス量を測定したところで意味がない。化学的に生薬の品質を規定するためには、薬理的な研究と連携しながら、有効成分を明確にした上でその含量を測定するのが妥当と考える。しかしこれは大変な作業で、現在のところ、有効成分がわかっていても分離が困難なもの、有効成分の作用を左右する副成分の見逃せないもの、有効成分が不明なものなどが多く、上記の方法を使い得る生薬は限られている。しかし最近の分離技術、分析機器の進歩は目覚ましいものがあり、多くの研究者によって古代より伝わる生薬及び漢方製剤に薬理的、化学的なメスが入られ、客観性のある品質の再評価がなされようとしている。当研究所薬品化学科においても、その一端を担うべく鋭意努力してきたが、ここに当所で行ってきた生薬及び漢方製剤中の有効成分の分析例を紹介したい。

表1は頭痛・感冒などに繁用される葛根湯の主生薬・葛根中の有効成分で、鎮痙作用のあるダイゼイン、ダイズイン及び葛根に特有の成分であるプエラリンの含有量を測定したものである。その結果、日本産と中国産では含有量の状態がかなり違っている。日本産は木質が固く、灰色であるが、中国産は澱粉質に富み、もろく白い。両者の間で

はダイゼインが約8倍、ダイズインが約20倍、プエラリンは約200倍の差がみられた。<sup>1)</sup>

表2はサンシシ(クチナシの果実)中の有効成分で緩和な浮下作用のあるゲニポサイドを分析した結果である。(スイシシは外觀がサンシシと酷似しており、サンシシと同様に使われる)その含有量は日本産と中国産の間に明らかな差は認められないが、産地を問わず個体差があり約4~7%でかなりのバラツキがみられた。<sup>2)</sup>

表3はサンシシ含有の市販漢方製剤(温清飲、黄連解毒湯、防風通聖散、加味逍遙散)についてゲニポサイドを測定した結果である。夫々の製剤はいずれも構成生薬は同じであるが処方量が異なることが多い。したがって製剤間の比較を容易にするために、製剤中のゲニポサイドを定量したのちその値から使用された原料サンシシ100gに対するゲニポサイド量(g)を換算し、これをサンシシからのゲニポサイドの移行量とした。結果は表2のゲニポサイド量4~7%に近い値を期待したが、エキス製剤では最小のものは約1/10しか含有していなかった。処方生薬の種類が多い防風通聖散(18種)、加味逍遙散(10種)にその傾向がみられる。又、同一処方内での含量差も約4~10倍のバラツキがみられた。

一方、煎剤はどの処方の場合も概ね十分に成分が抽出され服用することができると考えられた。<sup>2)</sup>

以上のことから、原料生薬は産地、個体間で成分含量にかなりの差がみられるが、エキス製剤ではそれ以上であった。エキス製剤は全般に移行率が低いがその原因は原料に由来するばかりでなく製造工程中のロス、原料エキスの抽出不十分等も考えられる。したがって、原料、製造工程、製剤各段階での品質管理を一層厳重に行うことが肝要である。

厚生省は、最近メーカーに対し自社製品について含有成分中2成分を選択し、それを定量し、原料生薬からの移行率を測定するよう指示した。したがってその効果が徐々に現われ、安定した製品が市場に供給されることが期待されるが、我々もその時期が一日でも早くなるよう努力するつもりである。

### 文献

- 1) 早川ら：薬誌，104(1)，50(1984)。
- 2) 早川ら：薬誌，105(10)，996(1985)。

表1. 葛根中のダイゼイン、ダイズイン、  
プエラリン含有量

産地	№	ダイゼイン (%)	ダイズイン (%)	プエラリン (%)
日本(長野)	1	0.18	0.50	5.03
	2	0.15	0.92	4.50
	3	0.28	0.92	4.60
韓国	4	0.03	0.15	2.10
中国(江西)	5	0.01	0.01	0.03
	6	0.03	0.03	0.13
	7	0.08	0.06	0.40

表2. サンシシ中のゲニボサイド含有量

試料	産地	№	ゲニボサイド (%)
サンシシ	日本	1	3.70
		2	6.99
		3	5.93
	中国	4	5.84
		5	4.92
		6	4.92
		7	5.72
		8	4.40
		9	5.86
スイシシ	中国	1	4.97
		2	6.35
		3	6.11
		4	5.36
		5	3.91
		6	6.60

表3. サンシシ含有の市販漢方製剤中のゲニボサイド

製剤名	№	剤型	ゲニボサイド (%)	製剤中のサンシシ量 (g/100g)	ゲニボサイド移行量 (ゲニボサイドg/サンシシ100g)
温清飲	1	顆粒剤	0.73	30.0	2.43
	2	〃	0.18	44.4	0.41
	3	〃	0.36	25.0	1.44
	4	〃	0.72	16.7	4.31
	5	〃	0.11	16.7	0.66
	6	錠剤	0.27	16.7	1.62
	7	〃	0.41	37.0	1.11
	8	〃	0.38	37.0	1.03
	9	煎剤	0.46	8.3	5.54
	10	〃	0.52	8.3	6.27
黄連解毒湯	1	顆粒剤	0.72	40.0	1.80
	2	〃	0.96	25.0	3.84
	3	〃	0.60	22.2	2.70
	4	〃	1.61	63.3	2.54
	5	〃	0.80	22.2	3.60
	6	〃	1.41	22.2	6.35
	7	散剤	1.16	26.7	4.34
	8	錠剤	0.59	33.3	1.77
	9	〃	1.04	74.1	1.40
	10	〃	1.50	50.0	4.50
	11	煎剤	1.77	28.6	6.19
防風通聖散	1	顆粒剤	0.20	24.0	0.83
	2	〃	0.28	13.3	2.11
	3	散剤	0.21	20.0	1.05
	4	錠剤	0.28	10.0	2.80
	5	〃	0.17	39.2	0.43
	6	〃	0.19	22.3	0.85
	7	煎剤	0.21	4.7	4.47
加味道遙散	1	顆粒剤	0.60	40.0	1.50
	2	〃	0.58	40.0	1.45
	3	〃	0.85	22.2	3.83
	4	〃	0.41	44.4	0.92
	5	散剤	0.51	66.7	0.76
	6	錠剤	0.50	66.7	0.75
	7	煎剤	0.56	8.9	6.29

(食品薬品部 早川順子)



## 走査型電子顕微鏡

微生物系の研究、検査業務に不可欠な大型機器の一つとして待望久しかった電子顕微鏡および関連機器一式が、59年度末に当所に設置され、使用を始めてから一年あまりが経過しました。

去る55年に導入されたガスクロマトグラフ質量分析計が化学系の研究、検査業務にとっての大きな武器であると同様に、電子顕微鏡は生物系にとって大きな価値を持っております。今回は、その設備のうちの一つである走査電子顕微鏡の概要について紹介します。

その構造、原理は多くの参考文献に詳細に書かれていますが、かいつまんで申しますと、光学的な実体顕微鏡に対応して試料の表面の構造をより細かく観察するための機器であります。

光の代りに極細い電子線を当てて走査し、そこから放出される二次電子を検出器で受け、ブラウン管の面に像として写し出し観察するものです。

この際、高電圧で発生させた電子線を電磁レンズで幾段にも縮小して、さらに細い電子線に絞り込み分解能を高めております。

### 1. 構造

その構造は、図1、のようで、大きく分けると鏡筒部、試料室、検出・観察・記録系、操作卓、それに排気系の5つの部分から成っている。

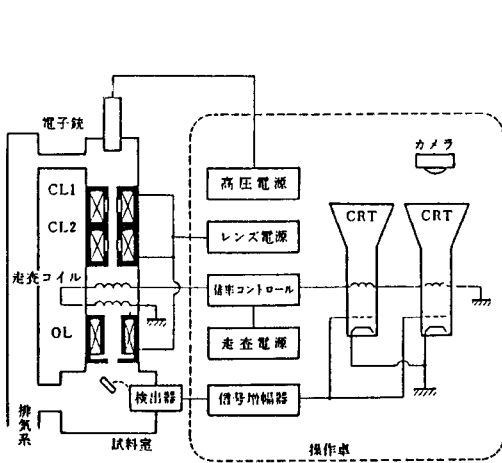


図1 SEMの構成

### 1) 鏡筒部

鏡筒内は、排気ポンプで常に高真空に保たれている。鏡筒の上部には、熱電子を発生させるフィラメントおよび高電圧を加えて電子を加速する陽極とからなる電子銃があり、鏡筒中には電子線を極く細いビームに絞り込む電磁レンズ系（通常、第1集束レンズ、第2集束レンズ、対物レンズの3つより成る）が置かれている。

### 2) 試料室

鏡筒の基部にあり、鏡筒とは連続して同じく高真空に保たれている。試料室には、試料の固定台、それに試料の上下、左右の位置移動および傾斜、回転を行うための微動装置が付属しており、観察する試料面を外部から自由に選ぶことが出来る。

### 3) 検出、観察、記録部

検出器は、試料室の奥にあり、試料から放出される二次電子あるいは反射電子を受け蛍光に変換するシンチレータと、この光を鏡筒外部へ導くライトチューブより成っている。ライトチューブで導かれた蛍光は操作卓の中にある光電子増倍管へ入り、ここで再び電子に変換される。変換された信号は増幅器により電気的に増幅され、ブラウン管へ導かれる。（図2）

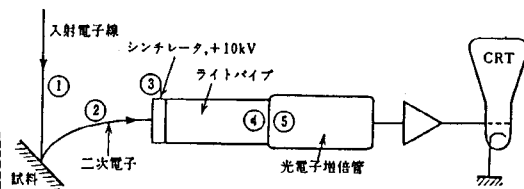


図2 検出部

写し出された映像は、操作卓にあるブラウン管でテレビ画像あるいは走査像として観察され、これにカメラを取付けて撮影すれば記録を保存することが出来る。

### 2) 操作卓

操作卓のパネル面には、電子線の発生をコントロールしたり（フィラメント電流の調節、高圧の印加および電圧の切替）、ブラウン管面の像の輝

度、コントラスト、スポットサイズの大きさの交換、倍率の切替、非点補正（X軸およびY軸方向）などの調節をするコントロールつまみやスイッチ類が配置されている。

ホ) 排気系

鏡筒内の高真空を常に保つために操作卓の下部には、排気ポンプが二段に装備されている。初段の油回転ポンプは大気圧から  $10^{-2}$  Torr くらい迄の圧力に下げる粗引き用のもので、目的を達すると自動的にバルブが切り変ってさらに真空度を高めるための油拡散ポンプにボタンタッチされる。

2. 試料面の像が拡大されるまでの原理

透過電子顕微鏡では、電子線が試料を貫いてその像を対物レンズ、中間レンズ、投影レンズなどの多段階のレンズ系で直接に拡大して行くので光学的顕微鏡と対比して考えることが出来、理解が比較的容易である。

ところが、走査電子顕微鏡では、すべてのレンズ系（集束レンズおよび対物レンズ）が電子線の通路上で試料の前の部分にあり、直接に試料像を拡大するのには役立っていない。これらのレンズ系は、いずれも電子線のビーム束の直径をどんどん縮小して行き、試料面に焦点を結ばせる役割を持っている。

電子銃の中では、タングステン フィラメントに電流を流して加熱することにより熱電子を発生させており、ここでは電子線の直径は約  $20\mu\text{m}$  程度である。（図3）

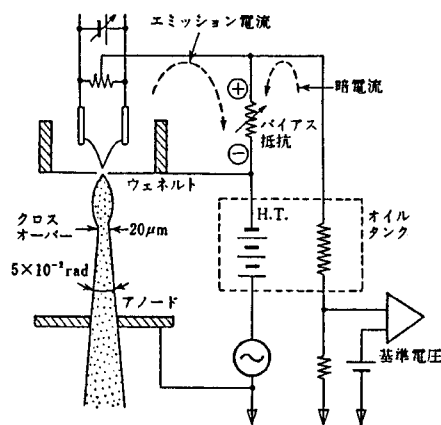


図3 電子銃の原理

この電子銃は高電圧（2～25KV）のかかった陽極で引っ張られ、集束レンズ（第1、第2）、対物レンズの中を通り、試料面に当る。

各レンズを通る度に電子線の直径は数十分の一から数分の一ずつに縮小され、試料に当る時には約7～10 nmの極く細いものとなる。したがって、これらのレンズは顕微鏡の分解能を高めるのに寄与している。

この細く絞られた電子のビームを対物レンズの中に置かれた走査コイルによって偏向させ、試料面をテレビの走査線のように走査する。

試料面から放射される二次電子は前述のように検出器で電気信号の強弱に変換され、電子線の走査と同期させてブラウン管上に写し出す。拡大の倍率は、試料面を電子線が走査する巾とブラウン管上の走査巾との比によって定まってくる。

ブラウン管の一辺の長さは一定なので、倍率を拡大するには電子銃が試料面を走査する巾を小さくすれば良いわけである。

3. 操作について

構造や原理を十分に理解するのは大変なことだが、操作法や観察の手順は実に簡単で、初心者でも一時間もあれば、テレビを扱うような気安さで扱う事ができる。写真を撮影するには二通りの方法があって、カメラのアタッチメントを交換する事により、ポラロイドバックフィルム（8枚撮り）と6×7判ロールフィルム（10枚撮り）とを使い分ける事ができる。結果を少しでも早く見たい場合は前者を、より良質で恒久的な写真を必要とする時は後者の方が便利である。

このように書いて行くとよい事づくめなのだが、観察や写真の成果を期待するためには良い試料を準備することが絶対に必要である。

4. 試料について

走査電子顕微鏡は試料の表面構造を高倍率、高分解能で観察することが出来るので、細菌やカビ、植物、昆虫、動物組織などの生物材料は勿論のこと、食品、薬品、繊維材料、金属、セラミックやIC回路に至るあらゆるものを対象とし、各分野で広く使用されている。

金属や鉱物などの無機物はもっとも手軽に扱える試料であり、試料台へ導電性の接着剤で試料を

装着したのち、表面にカーボンや金、金-パラジウム等を薄く蒸着するだけで観察できる。

生物試料では昆虫の羽や動物の骨、歯、毛髪などを除けば、殆どすべて固定-脱水-乾燥の手順を経た後に表面に金などの蒸着を施して観察するのが一般的である。細胞や組織の外形や構造を保存し、高い真空の環境と電子線の照射で破壊されるのを防ぐためにはこのようなプロセスが是非とも必要である。

#### イ) 固定

試料より条件は異なるが、動物細胞や組織ではアルデヒドとオスミウム酸で2段階に固定するのが一般的で、数千倍くらいの低倍率での観察には1~3%のグルタルアルデヒドの単独固定でも充分である。固定の時間は試料の大きさや厚み、材質によって様々なのでそれに合わせて工夫しなければならない。もっとも注意すべきは試料の変形や収縮で、固定液の浸透圧を生物細胞の内圧と等張に調整する必要がある。たとえば、赤血球などでは高張な固定液では金平糖のようになってしまいうし、低張液では破壊されたり膨化したりする。

#### ロ) 脱水

金属蒸着をする前に試料を充分に乾燥させる必要があるが、生物試料を自然乾燥すると変形、収縮が著しいので、細胞内外の水分をアルコール、アセトンなどの溶媒で段階的に置換する脱水操作を行わねばならない。通常、(35%)→50%→70%→80%→90%→100%(I)→100%(II)のようにそれぞれ15~20分ずつ浸して行く。さらにアセトン、酢酸アミルなどの中間液を通して次の臨界点乾燥へ移行する。

#### ハ) 乾燥

試料中の液体が気化する時に働く表面張力の影響をできるだけ小さくして、試料の変形を防ぐため臨界点乾燥を行う。これは脱水して酢酸アミルに置換した後、試料を圧力室へ入れてさらに液体炭酸ガスに置きかえ、温度と圧力をじょじょに上げて乾燥する。液体を気化させる時に温度と圧力を適当に選ぶことによって、液体-気体間の界面のない状態(臨界点)で滑らかに移行する。

液体炭酸ガスは低温、低圧(31℃、76kg/cm<sup>2</sup>)で臨界点が得られるので、生物試料の変形が最も少ない。

このように処理した試料は、無機物試料と同じように表面に金などの薄膜を蒸着した後、走査電子顕微鏡で観察することが出来る。

以上、走査型電子顕微鏡のあらましを紹介いたしました。当所に設置された機種はT-200(日本電子製)で公称性能は分解能7nm、最高倍率75,000倍ですが実用的には1~2万倍くらい迄のようです。付属機器としては、臨界点乾燥装置、イオンスパッタリング装置がありますので、一通りの観察には事を欠きません。

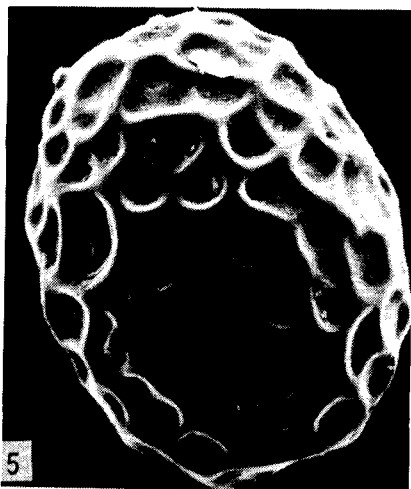
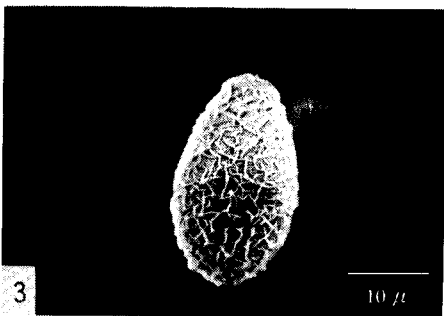
文末に主な寄生虫卵の表面構造の写真を参考までに掲げました。これは目的とする寄生虫卵を集卵法で集めたのち、実体顕微鏡下に毛細管ピペットで丹念に虫卵を1ヶずつ拾い数百以上集ったところで洗浄を繰り返す、目に見えないゴミを取るため更に超音波で洗浄したのち、所定の前処理を行い写真を写したものです。

#### 主な参考文献

- 医学、生物学 電子顕微鏡観察法 編日本電子顕微鏡学会 丸善出版
- 図説走査電子顕微鏡 編 田中敬一、永谷隆 朝倉書店
- 走査顕微鏡講習会テキスト 日本電子KK



1. 静止状態の赤痢アメーバ(矢印)の走査電子顕微鏡による写真。  
約1,400倍。周囲の顆粒状のものは培地中の米粉。
2. 偽足を出して活発に動いている赤痢アメーバ。約1,400倍



3. 肝吸虫卵。表面にメロンのような美しいしま模様が見られる。1,200倍
4. 鞭虫卵。いわゆる肢阜ちょうちんのような外形で、表面はかなり滑らか。1,200倍
5. 回虫受精卵。表面には網目状の凹凸がある。  
1,200倍

(生物部 伊藤正夫)