

ISSN 0917-0707

富山県衛生研究所年報

(平成11年度)

第23号

ANNUAL REPORT
OF
TOYAMA INSTITUTE OF HEALTH
(APRIL 1999 ~ MARCH 2000)
NO. 23

2000



富山県衛生研究所

は　じ　め　に

平成11年度の年報をお送りします。昭和23年に厚生省の「地方衛生研究所設置要綱」により、制度化され、多くの都道府県で衛生研究所が昭和24年より発足し、本年までに50年を経過しました。富山県衛生研究所は、昭和34年の発足ですが、地方衛生研究所全国協議会は、50周年を記念して式典を平成11年6月東京で開催致しました。本研究所からも西野治身（厚生大臣表彰状）、城石和子（厚生大臣感謝状）、石倉康宏（会長表彰）刑部陽宅（学術貢献賞）、中山喬、渡辺護（以上会長感謝状）の、6名が表彰を受けました。積年の業務と業績が、外部より評価されたものとして喜んでおります。特に学術貢献賞は50周年記念事業として特に設けられたもので、科学的業績と、行政的貢献の両面で秀れたものが選考され、全国で選ばれた13件の中に本研究所の職員が入っている事を誇りに感じております。

人事的には、西淵富蔵次長、刑部陽宅細菌部長が定年退職され、尾崎一郎が後任次長に、西野治身が環境保健部長に昇任すると共に、細菌部長は、北村所長が業務取扱いとなりました。細菌部に山川清孝主幹研究員が採用され、平本裕子は、平成12年度1月より国際協力事業団へ出向になり、青年海外協力隊の一員として獣医学、細菌学の分野で貢献しています。

胃癌発生要因の研究が一段落し、大腸癌の発生要因を探る症例対照研究が、昨年度に引き続き、県下の多数の病院の協力を得て、本格的に実施されました。平成11年7月、11月、12月、平成12年3月と、ウイルス性食中毒が繰り返し発生し、電子顕微鏡による小型球形ウイルス（SRSV）の検出と、遺伝子増幅（PCR）等の最先端の方法を用いて、適切に迅速に診断し、行政的対応に貢献しました。当研究所で10数年来続いてきた下水、環境水からのポリオウイルスの分離と、遺伝子解析は、日本国内での野生型ポリオウイルスの流布を否定する明確な証拠として、全世界的ポリオ根絶計画の中で評価される光栄に浴しました。県内の某市で、反復して発生する腸管出血性大腸菌O26の流行発生の積極的疫学調査として、市内の下水道のO26検査を定期的に行って、隠れた感染源を捜し出そうとする調査・研究を地元と協力してはじめています。化学関係では、食品、飲料水中の農薬その他の有害物質の残留、混入の検査項目が増加し、検出感度向上も求められているため、多成分を一度に迅速に分析出来る方法の開発研究を行い、成果をあげていますと共に、保健所、病院等で、理化学検査を担当する職員のための研修会も開催しました。環境保健関係は、前年度までの成果に立って、骨粗鬆症の予防に生活習慣の改善が有効である事を示す生化学的証拠を得ると共に、内分泌攪乱物質の生体影響、深層海水の健康増進等に関する基礎研究が本年度にはじまりました。

感染症新法の本年度施行に対応して「富山県感染症情報センター」を平成12年度内に当研究所内に設置して、発足させる事が正式に決まり、本年度は、ワーキンググループにより基本的な構想をまとめる作業が行われました。

平成12年6月

富山県衛生研究所長

北　村　敬

目 次

1. 運 営

(1) 沿革および組織機構	1
(2) 施 設 の 概 要	2
(3) 職 員 数	2
(4) 職 員 一 覧	3
(5) 予 算 概 要	5
(6) 各部の業務概要	14
(7) 検 査 状 況	26
(8) 講 師 派 遣	30
(9) 研 修 指 導	33
(10) 研 修 受 講	35
(11) 客員研究員等招へい	36
(12) セミナー開催	36

2. 調査研究報告

先天性代謝異常等マススクリーニングの成果について（平成11年度の検査成績）	37
九曜 雅子, 米田 豊, 堀 みつ子, 大江 浩, 北村 敬, 竹 邦子	
カラムスイッチングHPLCによる乾燥濾紙血液中アミノ酸分析法の基礎検討と応用	47
米田 豊, 九曜 雅子	
ヒト染色体に関する調査研究－血液, 骨髓液－	60
林 美貴子, 本田幸子, 大江 浩, 北村 敬	
ヒト染色体に関する調査研究－羊水, 流産胎児－	68
本田幸子, 林 美貴子, 大江 浩, 北村 敬	
富山県内5ヶ所におけるイヨシロオビアブの1999年の発生消長	74
渡辺 護	
日本脳炎流行予測調査	79
渡辺 護, 長谷川 澄代, 高田 ちはる	
ポリオ流行予測調査	87
中山 喬, 安藤秀二, 松浦久美子, 北村 敬, 高島阿里子, 田中桂子, 荻浦泰也, 松田和久, 沼田直子	

インフルエンザ流行予測調査	93
松浦久美子, 長谷川澄代, 中山 喬, 石倉康宏, 安藤秀二, 北村 敬, 田中桂子, 荻浦泰也, 高島阿里子, 浅野真由美, 松田和久, 沼田直子	
ポリオウイルスワクチン株および強毒株に対する中和抗体保有状況	100
中山 喬, 松浦久美子, 安藤秀二, 長谷川澄代, 石倉康宏, 北村 敬	
富山県における河川水や下水から分離したポリオウイルスのVP1領域遺伝子の解析(3)	108
松浦久美子, 石倉康宏, 中山 喬, 長谷川澄代, 安藤秀二, 北村 敬	
富山県でみられたノーウォーク様ウイルス(NLV)による 急性胃腸炎の集団発生について(1999年度)	113
長谷川澄代, 松浦久美子, 中山 喬, 安藤秀二, 石倉康宏	
日本産マダニから直接PCR法で増幅した 紅斑熱群リケッチア遺伝子の系統解析	118
石倉康宏, 安藤秀二, 渡辺 護, 品川保弘, 藤田博己, 松浦久美子, 長谷川澄代, 中山 喬, 北村 敬	
富山県における溶血レンサ球菌分離株の菌型と薬剤感受性	129
田中大祐, 細呂木志保, 磯部順子, 刑部陽宅, 香取幸治, 赤間美徳, 遠藤美代子	
<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis および Enterohaemorrhagic <i>Escherichiae coli</i> O157:H7 におけるPFGEパターンの変化	134
刑部陽宅, 平田清久, 細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 北村 敬	
イオンクロマトグラフィーによる飲料水中の陰イオン, カルシウム 及びマグネシウムイオンの一斉分析	139
松永明信, 高柳信孝, 山本 敦, 岡田 滋	
中学・高校生における踵骨超音波計測値と関連要因について	143
堀井裕子, 西野治身, 山上孝司, 松倉知晴, 田中朋子, 鏡森定信	
小学校6年生の血清脂質と生活習慣	149
田中朋子, 堀井裕子, 中崎美峰子, 西野治身, 山上孝司, 鏡森定信	

3. 資 料

平成11年度動物由来感染症実態調査	
—富山県における犬猫の <i>Coxiella burnetii</i> に対する抗体保有状況—	155
安藤秀二, 石倉康宏, 坪島貞夫, 北村 敬	
富山県における平成11年度のウイルスおよびリケッチア検査状況	157
安藤秀二, 中山 喬, 長谷川澄代, 松浦久美子, 石倉康宏, 北村 敬	
富山県におけるイカ菓子によるサルモネラ食中毒について	160
磯部順子, 田中大祐, 細呂木志保, 平本裕子	

漁港の腸炎ビブリオ実態調査について（平成11年度）	164
細呂木志保, 平本裕子, 田中大祐, 磯部順子, 山川清孝, 刑部陽宅, 北村 敬, 山下志をり, 富田良一	
富山県における1999年の病原微生物検出情報	167
田中大祐, 平本裕子, 細呂木志保, 磯部順子, 山川清孝, 刑部陽宅, 北村 敬	
ワイン中残留農薬のGC/MSによる確認	171
齊藤行雄, 山本 敦, 小玉修嗣, 松永明信	
平成11年度食品衛生検査（理化学検査区分）の精度管理調査について	175
大戸幹也, 松永明信, 尾崎一郎	
平成11年度水道水質検査の精度管理事業について	178
健名智子, 高柳信孝, 松永明信	
中国・内モンゴル自治区におけるフッ素暴露調査	184
新村哲夫, 西野治身, 田中朋子, 中崎美峰子, 伊木雅之, 梶田悦子, 劉 仲玉, 張 森, 鏡森定信, 毕 力夫	

4. 業 績

(1) 受賞, 学位授与, 資格取得など	187
(2) 誌 上 発 表	188
(3) 特別講演等	199
(4) 学会発表等	200

T i t l e s

Report

A Survey Report on the Neonatal Mass Screening for Inborn Errors of Metabolism, Congenital Hypothyroidism and Congenital Adrenal Hyperplasia in Toyama Prefecture (April 1999-March 2000).	37
Masako KUYO, Yutaka YONEDA, Mitsuko HORI, Hiroshi OE, Takashi KITAMURA and Kuniko TAKE	
Basic Study on Analytical Method of Amino Acids by Colum Switching HPLC and it's Application to Dried Blood Specimens.	47
Yutaka YONEDA and Masako KUYO	
Chromosome Analysis of Human Blood and Bone Marrow Cells.	60
Mikiko HAYASHI, Sachiko HONDA, Hiroshi OE and Takashi KITAMURA	
Chromosome Analysis of Amniotic Fluid Cells and Fetal Cells	68
Sachiko HONDA, Mikiko HAYASHI, Hiroshi OE and Takashi KITAMURA	
Comparison of the Seasonal Prevalence of Ororo-Tabanid Fly, <i>Hirosia iyoensis</i> at Five Areas in Toyama Prefecture in 1999.	74
Mamoru WATANABE	
Epidemiological Surveillance of Japanese Encephalitis in Toyama Prefecture in 1999.	79
Mamoru WATANABE, Sumiyo HASEGAWA and Chiharu TAKADA	
Epidemiological Surveillance of Poliovirus in Toyama Prefecture	87
Takashi NAKAYAMA, Shuji ANDO, Kumiko MATSUURA, Takashi KITAMURA, Ariko TAKASHIMA, Keiko TANAKA, Yasunari OGIURA, Kazuhisa MATSUDA and Naoko NUMATA	
Epidemiological Surveillance of Influenza Virus Infection in Toyama Prefecture	93
Kumiko MATSUURA, Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA, Mitsuhiro ISHIKURA, Shuji ANDO, Takashi KITAMURA, Keiko TANAKA, Yasunari OGIURA, Ariko TAKASHIMA, Mayumi ASANO, Kazuhisa MATSUDA and Naoko NUMATA	
Neutralizing Antibodies against Vaccine Strains or Virulent Strains of Poliovirus	100
Takashi NAKAYAMA, Kumiko MATSUURA, Shuji ANDO, Sumiyo HASEGAWA, Mitsuhiro ISHIKURA and Takashi KITAMURA	
VP1 Gene Analysis of Poliovirus Isolates from River Water and Sewage in Toyama Prefecture (3)	108

Kumiko MATSUURA , Mitsuhiro ISHIKURA , Takashi NAKAYAMA, Sumiyo HASEGAWA, Shuji ANDO and Takashi KITAMURA	
Outbreaks of Gastroenteritis Causued by Norwalk-like Virus(NLV) in Toyama Prefecture in Fiscal 1999	113
Sumiyo HASEGAWA, Kumiko MATSUURA, Takashi NAKAYAMA, Shuji ANDO and Mitsuhiro ISHIKURA	
Phylogenetic Analysis of <i>gltA</i> and <i>rompA</i> Genes of Spotted Fever Group Rickettsiae Am- plified by PCR from Ticks in Japan	118
Mitsuhiro ISHIKURA , Shuji ANDO, Mamoru WATANABE, Yasuhiro SHINAGAWA, Hiromi FUJITA, Kumiko MATSUURA, Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA and Takashi KITAMURA	
Serotype Distribution and Drug Sensitivity among Hemolytic <i>Streptococcus</i> Isolates in Toyama Prefecture	129
Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE, Yotaku GYOBU, Koji-KATORI, Yoshinori AKAMA and Miyoko ENDO	
The shift of Pulsed-field-gel-electrophoresis pattern of <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis and Enterohaemorrhagic <i>Escherichiae coli</i> O157:H7	134
Yotaku GYOBU, Kiyohisa HIRATA, Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE, Daisuke TANAKA and Takashi KITAMURA	
A Method for Simultaneous Determination of Anions, Calcium and Magnesium Ions in Drinking Water by Ion Chromatography	139
Akinobu MATSUNAGA, Nobutaka TAKAYANAGI, Atsushi YAMAMOTO, Shigeru OKADA	
Relationship between Ultrasound Measurements of Bone Mass at Calcaneus and Related Factors in Junior and Senior Highschool Students	143
Yuko HORII, Harumi NISHINO, Takashi YAMAGAMI, Tomoharu MATSUKURA Tomoko TANAKA, and Sadanobu KAGAMIMORI	
Relationship between Serum Lipid and Lifestyle in Students of the Sixth Grade	149
Tomoko TANAKA Yuko HORII, Mineko NAKAZAKI, Harumi NISHINO, Takashi YAMAGAMI and Sadanobu KAGAMIMORI	

Notes

Serosurveillance of Companion Animals against <i>Coxiella burnetii</i> in Toyama Prefecture	155
Shuji ANDO, Mitsuhiro ISHIKURA, Sadao TSUBOSHIMA and Takashi KITAMURA	
Virological and Rickettsiological Examinations of Infectious Diseases in Toyama Prefecture, April 1999 to March 2000	157
Shuji ANDO, Takashi NAKAYAMA, Sumiyo HASEGAWA, Kumiko MATSUURA , Mitsuhiro ISHIKURA and Takashi KITAMURA	
Salmonella Food Poisoning Caused by Cuttlefish Chips in Toyama Prefecture	160
Junko ISOBE, Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI and Yuko HIRAMOTO	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Surveillance at Fishing Ports in Toyama Prefecture	164
Shiho HOSOROGI, Yuko HIRAMOTO, Daisuke TANAKA, Junko ISOBE, Kiyotaka YAMAKAWA, Yotaku GYOBU, Takashi KITAMURA, Shiwori YAMASHITA and Ryouichi TOMITA	
Isolation of Pathogenic Bacteria in Toyama Prefecture in 1999	167
Daisuke TANAKA, Yuko HIRAMOTO, Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE, Kiyotaka YAMAKAWA, Yotaku GYOBU and Takashi KITAMURA	
Confirmation of Pesticide Residues in Wines by GC/MS	171
Yukio SAITO, Atsushi YAMAMOTO, Shuji KODAMA and Akinobu MATSUNAGA	
Precision Control of Benzoic Acid, Sorbic Acid, p-Hydroxybenzoic Acid and Sodium Saccharin in Food	175
Mikiya OHTO, Akinobu MATSUNAGA and Ichiro OZAKI	
The Results of External Quality Control of Potassium Permanganate Consumed and Nitrate-nitrogen in Water	178
Tomoko KEMMEI, Nobutaka TAKAYANAGI and Akinobu MATSUNAGA	
Studies on Fluoride Exposure in Inhabitants of Inner Mongolia, China	184
Tetsuo SHIMMURA, Harumi NISHINO, Tomoko TANAKA, Mineko NAKAZAKI, Masayuki IKI, Etsuko KAJITA, Zhongyu LIU, Miao Zhang, Sadanobu KAGAMIMORI and Lief BI	

1. 運

営

1. 運 営

(1) 沿革および組織機構

昭和22年10月1日	富山県部設置条例の規定により衛生部が設置され、衛生試験検査を所管。
昭和23年1月1日	衛生部公衆衛生課が設置され、細菌検査所、衛生試験室を併置。
昭和23年4月7日	厚生省が「地方衛生研究所設置要綱」を提示。
昭和34年3月30日	旧研究所の庁舎が完成。
昭和35年3月28日	富山県衛生研究所設置条例が交付され、4月1日から職員9名の構成で発足。
昭和36年4月1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により、課・係制が設けられ職員17名に拡充強化（庶務係、細菌課、ウイルス血清課、食品衛生課、生活環境課）。
昭和37年11月30日	旧研究所の増築。
昭和38年4月1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により、所長代理制が設けられ、また、課名の一部を変更。

庶 務 係 → 庶 務 課

ウイルス血清課 → ウイルス病理課

昭和39年5月18日	「地方衛生研究所設置要綱」改正。
昭和39年10月1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により、公害調査課を新設。
昭和43年7月10日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により、「所長代理」制を「次長」制に変更。
昭和44年4月1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により、従来の課制を廃止し、部制を設置し、部に主任研究員を配置（病理生化学部、微生物部、食品科学部、公害調査部）
昭和46年4月15日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により、公害調査部所管の業務が公害センターに移管され、また、各部の名称を変更（病理部、ウイルス部、細菌部、化学部、環境保健部）。
昭和51年9月10日	「地方衛生研究所設置要綱」が改正され、「公衆衛生情報の解析提供」が設置目的に追加。
昭和55年12月20日	研究所新庁舎小杉町中太閤山で建設着工。
昭和57年6月10日	小杉町中太閤山に新庁舎完成。
平成元年4月1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により、病理部をがん研究部に名称を変更。
平成4年4月1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により、庶務課を総務課に名称を変更。

(2) 施 設 の 概 要

建 物	構 造	延 面 積
研 究 棟	鉄筋コンクリート造3階（1部4階）建	3, 0 4 4. 5 9 m ²
（動物飼育）	〃 平屋建	2 4 1. 7 6
車 庫	鉄骨造平屋建	3 4. 5 6
薬 品 庫	コンクリートブロック造平屋建	2 0. 6 0
ボ ン ベ 庫	〃	1 7. 5 4
R I 排 水 庫	〃	2 6. 6 5
廃 水 処 理 庫	〃	1 3. 5 7
渡 り 廊 下	鉄 骨 造	4 0. 5 0
機 械 室	鉄骨造平屋建	3 9. 2 4
合 計		3, 4 7 9. 0 1

(3) 職 員 数

（平成12年5月1日現在）

区 分	所・次長 部・課長	主 幹 研究員	副主幹 研究員	係 長	主 任 研究員	主 事	研究員	主 任 業務技師	業務技師	嘱 託	計
所 長	1										1
次 長	1										1
総 務 課	1			1		1		1	1		5
がん研究部	1		4		2						7
ウイルス部	所 長 事務取扱		5		1						6
細 菌 部	所 長 事務取扱				1		4			1	6
化 学 部	1	3			4						8
環境保健部	1		1		3		1				6
合 計	6	3	10	1	11	1	5	1	1	1	40

(4) 職 員 一 覧

(平成12年5月1日現在)

職 名	氏 名	当 所 勤 続 年 数	主 な 担 当 事 務
所 長	北 村 敬	6.2	所内事務総括
次 長	尾 崎 一 郎	3.2	所内事務の連絡調整及び調査研究の企画調整
総 務 課 長 (出納員)	鹿 渡 英 光	1.2	人事, 予算, 出納員業務及び課内事務総括
係 長 (会計員)	加 納 晴 美	1.2	物品購入, 予算経理, 決算及び会計員業務並びに財産 管理事務
主 事 (会計員)	清 田 今日子	2.2	給与, 旅費, 賃金の支給, 収入事務及び会計員業務
主任業務技師	谷 井 富 造	7.2	実験動物の飼育管理, 滅菌洗浄室の管理
業 務 技 師	渡 辺 繁 雄	0.2	公用車の操車, 整備保全業務
がん研究部長	大 江 浩	3.2	部内事務総括及びがんの疫学研究
副主幹研究員	渡 辺 護	31.4	衛生動物の検査研究及び防除対策に関する調査研究
〃	本 田 幸 子	29.8	染色体異常(羊水)の検査及び環境変異原物質の影響調査研究
〃	林 美貴子	29.7	染色体異常(血液)の検査及び先天異常の成因の調査研究
〃	米 田 豊	6.2	先天性代謝異常マスキリーニングの検査及び調査研究
主任研究員	品 川 保 弘	10.1	がん発生要因の実験的調査研究
〃	九 曜 雅 子	16.10	先天性代謝病の検査及び調査研究
ウイルス部長	所長事務取扱		部内事務の総括及び病原微生物の調査研究・指導
副主幹研究員	石 倉 康 宏	36.2	リケッチア感染症の調査研究
〃	松 浦 久美子	35.2	ウイルス疾患の病因究明及び予防のための調査研究
〃	中 山 喬	30.2	ウイルス感染症の血清学的検査及び血清疫学の調査研究
〃	長谷川 澄 代	28.6	ウイルス感染症の検査及び検査法開発の研究
〃	庄 司 俊 雄	22.10	感染症情報センターの管理・運営
主任研究員	安 藤 秀 二	3.2	ウイルス感染症の免疫学的調査研究
細菌部長	所長事務取扱		部内事務総括及び病原細菌の調査研究
主任研究員	磯 部 順 子	9.2	細菌に起因する食中毒の原因究明及び食品の細菌学的試験検査
研 究 員	田 中 大 祐	7.2	呼吸系病原細菌の調査研究, 感染症情報センターの管理・運営
〃	細呂木 志 保	8.1	水, 医薬品及び環境細菌の検査研究及び細菌DNAの研究
〃	平 本 裕 子	1.2	青年海外協力隊派遣
〃	西 坂 美和子	0.2	病原細菌検出情報の収集, 還元
嘱 託	刑 部 陽 宅	1.2	真菌の試験, 検査

職 名	氏 名	当 所 勤 続 年 数	主 な 担 当 事 務
化 学 部 長	松 永 明 信	26.1	部内事務総括及び食品、環境中の汚染物質の調査研究
主 幹 研 究 員	大 浦 徹	5.2	化学物質による食中毒の検査及び食品中の有害物質の調査研究
〃	高 柳 信 孝	18.2	温泉中の成分分析及び水道水中の有害物質の調査研究
〃	齊 藤 行 雄	22.2	食品中の添加物及び残留農薬等の調査研究
主 任 研 究 員	山 本 敦	21.2	食品中の成分及び器具・容器・包装等の調査研究
〃	小 玉 修 嗣	6.4	飲料水中の残留農薬及び農薬等の分解生成物の調査研究
〃	健 名 智 子	16.2	飲料水中の揮発性有機化合物等の調査研究、水質検査の精度管理
〃	大 戸 幹 也	14.8	食品中の重金属及び家庭用品に関する調査研究
環境保健部長	西 野 治 身	35.2	部内事務総括、環境化学物質の健康影響及び成人病予防に関する疫学的調査研究並びに深層水の海洋療法の調査研究
副主幹研究員	新 村 哲 夫	28.1	環境汚染にかかわる生体中重金属及び深層水の海洋療法
主任研究員	田 中 朋 子	22.5	法の調査研究 成人病及び各種疾病の診断に必要な生化学的検査研究
〃	中 崎 美峰子	15.1	生体中有害物質の検査研究
〃	堀 井 裕 子	12.1	環境汚染にかかわる健康調査の生化学的検査研究
研 究 員	中 山 恵理子	1.2	環境保健にかかわる検査

(5) 予 算 概 要

総 務 課 平成11年度 予算概要

事業名	予算額	財 源 内 訳		事業内容
		使, 手数料	一般財源	
衛生研究所費	千円 70,868	千円 2,708	千円 68,160	衛生研究所の運営, 維持管理, 試験検査等
試験研究費	14,933		14,933	調査研究(15項目) 1. 染色体に関する研究 2. 突然変異原性に関する研究 3. 疾病媒介ダニ, 昆虫類等の調査研究 4. ウイルス感染症の疫学的研究 5. ウイルスウオッチプログラム 6. リケッチアの感染免疫に関する研究
				7. 溶血レンサ球菌の生態に関する研究 8. 河川水の微生物学的定点観測 9. 病原性海水ビブリオに関する研究 10. 細菌の病原遺伝子に関する研究 11. 飲料水及び温泉に関する調査研究 12. 食品中の成分及び添加物に関する調査研究 13. 食品中の残留農薬及びその他の有害物質に関する調査研究 14. 環境汚染物質の生態影響に関する調査研究 15. 成人病予防に関する疫学的研究
設備充実費	8,637		8,637	試験研究及び検査用機械器具の更新等
感染症対策特別研究費	2,286		2,286	感染症(主にエイズウイルス)に関する調査研究
がん等特別研究費	10,063		10,063	調査研究(5項目) 1. がん発生の要因の実験的研究 2. 水質基準成分及び食品規格成分の多成分一斉分析法の開発 3. 骨粗しょう症の骨代謝指標による効率的な予防法の確立に関する研究 4. 遺伝子解析による病原微生物の分子疫学的な研究 5. がん原物質と遺伝子の易損症性に関する研究
合 計	106,787	2,708	104,079	

平成11年度 歳入決算

款 項 目 節	決 算 額	備 考
	円	
使用料及び手数料	19,472,270	
手 数 料	19,472,270	
衛 生 手 数 料	19,472,270	
衛 生 研 究 所	2,956,860	収入証紙 1,445,260
		納入通知 1,511,600
環 境 衛 生 検 査	16,515,410	収入証紙 0
		納入通知 16,515,410
諸 収 入	97,352	
雑 入	97,352	
雑 入	97,352	
納 付 金	17,268	
雑 入	80,084	
合 計	19,569,622	

平成11年度 歳出決算

款	項	目	節	決 算 額	摘 要
総 務 費	総 務 管 理 費	人 事 管 理 費		円	
				7,839,420	
				7,001,017	
				5,130,062	
			共 済 費	693,563	
			賃 金 費	4,333,105	
			旅 費	103,394	
			財 産 管 理 費	1,870,955	
			需 用 費	1,870,955	
				838,403	
			計 画 調 査 費	838,403	
			報 償 費	140,000	
			旅 費	408,029	
民 生 費	児 童 福 祉 費	児 童 福 祉 対 策 費	需 用 費	111,414	
			役 務 費	27,000	
			使用料及び賃借料	26,960	
			負担金補助及び交付金	125,000	
				16,834,795	
				16,834,795	
				16,834,795	
			賃 金 費	1,885,870	
			旅 費	174,925	
			需 用 費	14,694,000	
			役 務 費	80,000	
				152,167,703	
				130,300,688	
			健 康 増 進 対 策 費	1,247,805	
			賃 金 費	188,200	
			旅 費	51,605	
			需 用 費	1,008,000	
			予 防 費	9,887,263	
			賃 金 費	439,440	
衛 生 費	公 衆 衛 生 費	予 防 費	報 償 費	32,000	
			旅 費	522,823	
			需 用 費	8,718,000	
			役 務 費	70,000	
			使用料及び賃借料	95,000	

款	項	目	節	決 算 額	摘 要
		環境保健対策費		円 13,569,284	
			賃 金	460,000	
			旅 費	145,955	
			需 用 費	3,696,699	
			諸 費	13,000	
			役 務 費	55,000	
			使用料及び賃借料	8,883,630	
			備 品 購 入 費	315,000	
		衛生研究所費		105,606,336	
			共 済 費	55,830	
			賃 金	5,504,950	
			報 償 費	110,000	
			旅 費	4,012,851	
			需 用 費	65,057,000	
			諸 費	342,878	
			役 務 費	1,934,000	
			委 託 料	17,216,606	
			使用料及び賃借料	319,155	
			備 品 購 入 費	10,486,066	
			負担金補助及び交付金	567,000	
				20,978,475	
	環 境 衛 生 費	環境衛生総務費		11,770,655	
			賃 金	826,830	
			旅 費	147,300	
			需 用 費	9,525,000	
			役 務 費	22,000	
			委 託 料	1,236,525	
			負担金補助及び交付金	13,000	
		食品衛生指導費		7,241,450	
			旅 費	116,450	
			需 用 費	6,025,000	
			備 品 購 入 費	1,100,000	

款	項	目	節	決 算 額	摘 要
		環境衛生指導費		円 1,438,370	
			旅 費	154,620	
			需 用 費	722,000	
			備 品 購 入 費	561,750	
		水 道 指 導 費		528,000	
			需 用 費	520,000	
			役 務 費	8,000	
	保 健 所 費			634,000	
		保 健 所 費		634,000	
			需 用 費	634,000	
	医 務 費			12,540	
		保健婦等指導管理費		12,540	
			旅 費	12,540	
	公 害 防 止 費			242,000	
		公害防止対策費		242,000	
			需 用 費	242,000	
合		計		176,841,918	

重 要 備 品 一 覧

(購入価格100万円以上)

品 名	購入年月日	数量	型 式
等電点分画装置	49. 9. 4	1	KLB 8100
水銀分析計	50. 3. 31	1	島津 UV-201型
倒立型顕微鏡	50. 10. 30	1	日本光学 MD型
真空凍結乾燥機	50. 10. 31	1	アトモパック 卓上型NO2003型
クリオスタット	53. 1. 10	1	アメリカンオプチカル「ADクリオカット」840C型
赤外線分光光度計	54. 1. 26	1	日立 260-0613型
高速冷却遠心分離機	54. 11. 26	1	久保田
自動連続比色装置	55. 12. 15	1	パーキンエルマーモデル55E
ガンマーカウンター	57. 9. 30	1	アロカ ARC-305
全自動コロニーカウンター	57. 9. 30	1	東海医理化 COP-1000
高速冷却遠心分離機	57. 9. 30	1	久保田 KR-20000T
超音波洗浄機	57. 9. 30	1	神明台 UD-2400FA
超低温槽	57. 9. 30	1	フォーマ 8107型
〃	57. 9. 30	1	〃 8200型
〃	57. 9. 30	1	〃 8255型
炭酸ガス培養装置	57. 9. 30	1	〃 3158型
〃	57. 9. 30	1	ナプコ 5200型
高速液体クロマトグラフ	57. 10. 2	1	島津 LC-4A
赤外線放射温度計	57. 10. 8	1	三栄測器 6T53
ガスクロマトグラフ	57. 10. 12	1	島津 GC-7APrFFT型
液体シンチレーションカウンター	57. 10. 12	1	アロカ SC-703
低バックグラウンド液体シンチレーションカウンター	57. 10. 14	1	アロカ LSC-LB1
超遠心機	57. 10. 15	1	日立 SCP-70H
ウサギ、マウス感染動物飼育装置	57. 10. 15	2	東洋理工 TAR-23改良型
データー処理装置	57. 10. 30	1	横河、ヒューレット、パッカー
ウサギ自動洗浄飼育機	57. 11. 12	1	日本ケージ、BAW309改良型
紫外線吸収計	57. 12. 2	1	日科機 イスコUA-5-6型
フラクションコレクター	57. 12. 21	1	ファルマシア・ジャパン FRARC
超低温槽	58. 3. 24	1	フォーマ 810型
〃	58. 3. 24	1	〃 8138型
炭酸ガス培養装置	58. 3. 31	1	〃 3158型

品名	購入年月日	数量	型式
酸素免疫システム	58. 3. 31	1	三光純薬 MR580 ミニウオッシャー2-315
炭酸ガス培養装置	59. 1. 10	1	フォーマ 3158型
超低温槽	59. 7. 16	1	〃 8319型
高速冷却遠心機	59. 9. 20	1	久保田 KP-20000T
ガスクロマトグラフ	59. 9. 28	1	島津 GC-7APFE
電子顕微鏡	60. 2. 28	1	日立 H-600A
超低温槽	60. 8. 30	1	レブコ ULT-1490型
ガスクロマトグラフ	61. 9. 6	1	島津 GC-15APEF
分光光度計	61. 9. 6	1	島津 UV-160
パンチ&インデクサー	62. 8. 31	1	米国ファンダメンタルプロダクツ社製MODEL VII A
分光光度計	62. 9. 10	1	日立 U-2000
原子吸光分光光度計	62. 9. 30	1	日立偏光ゼーマン Z-8000
デンストメーター	63. 7. 20	1	島津 二波フライングスポットスキャナーCS-9000
電気泳動装置	63. 10. 11	1	ファルマシア社ファーストシステム
高速液体クロマトグラフ	63. 10. 21	1	東ソーCCP-8000
落射蛍光顕微鏡装置	1. 8. 11	1	オリンパス BHT-RFK-A2型
蛍光測定システム	1. 9. 8	1	島津 デンストメータ (CS-9000)用
フォトダイオードアレイ検出器	1. 9. 14	1	島津 SPD-M6A
遠心分離機用ローター	1. 11. 19	1	日立工機 スイングローターRPS50-2
純水製造装置	1. 12. 19	1	ミリポア ミリーQSP
ガスクロマトグラフ	2. 3. 31	1	島津 GC-14APSC タンデムGC システム
分光光度計酵素反応システム	2. 9. 20	1	島津 UV-2200
高速液体クロマトグラフクラジェント装置	2. 9. 20	1	島津 LC-9A
ガスクロマトグラフ質量分析計	2. 11. 5	1	島津 GCMS-QP2000GF
超低温槽	2. 11. 6	1	レブコ ULT-2050
炭酸ガスインキュベーター	3. 2. 8	1	サンヨーフォーマMIP-3193
スローモーション解析装置付ビデオ撮影記録機	3. 9. 30	1	ソニー
パルスフィールド電気泳動装置	3. 9. 30	1	バイオラッド CHEF-DR II
分光蛍光光度計	3. 11. 3	1	日本分光 FP-777
高速液体クロマトグラフ用分光蛍光検出器	4. 3. 6	1	島津 RF-550
パラフィンブロック作製装置	4. 3. 12	1	サクラ精機 ティシュー・エンベンディング・コンソール #4596

品 名	購入年月日	数量	型 式
クリーンベンチ	4. 3. 31	1	日立冷熱 CCV-1301EC 型
万能顕微鏡	4. 9. 30	1	オリンパス
ガスクロマトグラフ	4. 11. 30	1	島津 GC-14B
DNA 合成装置	4. 11. 30	1	ファルマシアLKB ジーンアッセンブラスベシヤル
マイクロプレートウオッシャー	5. 3. 10	1	米国ダイナテック ウルトラウオッシャ II
紫外可視分光光度計	5. 3. 25	1	島津 UV-160A
濃縮導入装置	5. 3. 25	1	テクマー社 LSC-2000
パージ&トラップ濃縮装置用自動試料注入装置	5. 11. 10	1	テクマー社 AQUA Tek 50
ガスクロマトグラフ質量分析計	5. 11. 30	1	島津 GC/MS QP-1100WA
高速液体クロマトグラフ	5. 12. 24	1	日立製作所 L-6300
デシントグラフ	6. 1. 20	1	アトー(株) プリントグラフ AE-6910型
超低温フリーザー	6. 2. 28	1	三洋電機 MDF -382AT
高速冷却遠心機	6. 2. 28	1	久保田 MODEL 6800型
炭酸ガス培養装置	6. 8. 10	1	フォーマ MIP-3139型
花粉用画像解析及び計測システム	7. 1. 31	1	入力基盤 英国John Blishen Image Grabber24 SIMモジュール アドテック ADM-64M72F
高速液体クロマトグラフ用旋光度検出器	7. 3. 1	1	日本分光(株) OR-990型
高速冷却遠心分離機	7. 3. 7	1	久保田 MODEL 6800型
遺伝子導入装置及び解析装置	7. 3. 22	1	バイオラッド社
有機溶媒漏出防止装置	7. 4. 28	1	東京理化 CA-1100
液体クロマトグラフ用屈折率検出器	7. 5. 16	1	Shodex RI-7, OVEN AO-30C
落射蛍光顕微鏡	7. 6. 7	1	オリンパス光学工業 BX50-34-FLA型
超低温フリーザー	7. 6. 15	1	サンヨー MDF-493型
キャピラリー電気泳動システム	7. 9. 30	1	ヒューレットパッカード製
減圧遠心濃縮機	7. 10. 2	1	東京理化製
高速液体クロマトグラフ装置	7. 10. 13	1	ウオーターズ製
超低温フリーザー	7. 10. 13	1	サンヨー MDF-493型
感染症サーベイランスオンラインシステム	8. 3. 29	1	NEC PC-9821XT 16/R16
洗 浄 機	8. 3. 29	1	三光純薬製
オートダイリユーター	8. 3. 29	1	三光純薬製 SGR250
超低温フリーザー	8. 8. 28	1	サンヨー MDF-592型

品名	購入年月日	数量	型式
原子吸光光度計	8. 11. 27	1	島津製作所製 AA-6700
染色体DNA電気泳動システム	8. 12. 26	1	バイオラッド社製 GS-700
マイクロプレートリーダー	9. 2. 26	1	コロナ社製 MTP-100F, MTP-120, カイロン社製
アミノ酸分析システム	9. 3. 14	1	日本分光製
ガスクロマトグラフシステム	9. 3. 17	1	島津製作所製
オートインジェクター	9. 7. 18	1	日本分光製 AS-950-10
落射蛍光顕微鏡	9. 8. 29	1	ニコン社製 E-600-D
超低温槽	9. 10. 9	1	レブコ製 ULT-1786
画像処理装置	9. 10. 13	1	アビオ製フィルムレコーダー 他
サブレッサー型イオンクロマトグラフ	9. 11. 27	1	日本ダイオネックス社製 DX-500
蛍光式 DNA シーケンサー	9. 12. 15	1	パーキンエルマー社製 310-1-T
ELISA 測定システム	10. 2. 26	1	バイオラッド社製
液体クロマトグラフ用三次元検出器	10. 4. 30	1	島津製作所 SPD-M10AVP
高速液体クロマトグラフ	10. 6. 30	1	島津製作所 LC-VP
高速液体クロマトグラフ用オートインジェクター	10. 6. 30	1	島津製作所 SIL-10AVDP
ガスクロマトグラフ	10. 8. 21	1	ヒューレットパッカード社製 HP6890型
データ処理装置	11. 3. 30	1	日本分光製 HPLCプロジェクターBORWIN
全自動化学発光システム	11. 3. 31	1	日本分光製ガリバー 1500シリーズ
フリーザー	11. 7. 29	1	レブコ ULT-2050-3
分光光度計	11. 9. 24	1	日立 U-3010
フリーザー	11. 9. 28	1	レブコ ULT-2050-3
細胞チェッカー	11. 10. 5	1	オリンパス CK40-32RPC
超低温フリーザー	11. 12. 14	1	三洋電機製 MDF-493型
マイクロウェーブ分解装置	11. 12. 22	1	アステック社製

(平成12年 3月31日現在)

(6) 各部の業務概要

がん研究部

[行政および依頼検査]

先天性代謝異常等マススクリーニング

平成11年度の検体総数は11,592件で、県内63カ所の医療機関で採血され、送付されたものである。受検児は出生数の108.2%（里帰り分娩を含む）であり、前年度同様高い割合であった。検査項目は、フェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メイプルシロップ尿症、ガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）、先天性副腎過形成症の6疾患である。その結果、要精密検査児として31名（ホモシスチン尿症疑い1名、ガラクトース血症疑い3名、クレチン症疑い16名、先天性副腎過形成症疑い11名）がスクリーニングされ、クレチン症9名の患児が発見された。

染色体検査

平成11年度の検査受付件数は、血液104件、羊水64件、自然流産胎児24件の計192件で、うち、染色体異常を示したものは、血液9件（均衡転座保因者3件、ダウン症候群2件、逆位保因者1件、2p部分トリソミー1件、13q部分トリソミー1件、ターナー症候群1件）、羊水3件（14;21転座型ダウン症1件、21トリソミー型ダウン症1件、4短腕部分欠失1件）、流産胎児11件（45,X, 47,XY,+16等）の計23件であった。

染色体検査の依頼理由（主訴）は、血液では反復流産、不妊症、羊水では高齢妊娠が最も多かった。

衛生動物検査

行政検査として、日本脳炎流行予測事業の媒介蚊の発生調査を6カ所の畜舎で昨年に引き続き行った。11年度のコガタアカイエカの発生状況は全県的に減少した。また、本県におけるダニ媒介性の感染症の浸淫状況を把握するために、県下10地点でダニの採集を行った。

この他、保健所依頼の食品混入昆虫など5件と、行政機関および各種事業所からの分類同定を合計して1,146件の検査を行った。

[調査研究]

がん発生要因に関する研究

胃がん発生背景要因の疫学的研究の結果に基づき、上水道水及び自然水を溶媒とした培養液を用いた場合の種々の培養細胞の増殖に及ぼす影響を引き続き検討している。また、アフリカミドリザル腎組織由来VERO細胞を用い、染色体核型を指標とした変異原性の検出方法についての検討を継続している。

富山県における大腸がん発生背景要因をさぐるための症例対照研究を継続している。平成11年度は症例として、男性患者17名（平均年齢63.7歳）、女性患者21名（平均年齢62.0歳）について面接聞き取り調査を実施した。

先天性代謝異常症等のマススクリーニング検査に関する研究

先天性のアミノ酸代謝異常症の1次スクリーニング検査法として、カラムスイッチングHPLC法の開発を行った。確立した方法では従来法のマイクロプレート酵素法に比較し、作業時間の短縮と検査費用の低減が可能であり、また、再採血率を低くすることが可能であった。なお、平成12年4月5日付けでHPLCが新生児マススクリーニングの一次検査法として、厚生省から認可されたことから、本法をアミノ酸代謝異常症の1次検査法として導入した。

遺伝子易損傷性に関する研究

細胞DNAに対する損傷の直接的検査法としてアルカリゲル電気泳動法を確立した。変異原物質を用い、引き続き調査中である。

姉妹染色分体交換法に関する研究

先天異常のうち最も発生頻度が多い先天性心疾患の発生要因の一つとして疑われているリチウムについて、ヒトリンパ球と培養細胞を用い姉妹染色分体交換法（SCE）とSCG法で、SCE低頻度誘発物質のジエチルスチルベステロールや酸素等との相乗効果による検討を行っている。

環境汚染物質等の突然変異原性に関する研究

前年度より、マウス末梢血を用いた小核試験法により、タバコ煙中の環境変異原物質の作用に対するタウリンの複合効果、抑制効果について検討したが、その効果はみられなかったので、マウスの胃、肺細胞を用いたコメット法により検討を行っている。

衛生動物に関する研究

前年度に引き続き、イヨシロオビアブ（オロロ）の駆除に関する基礎的研究および実践的検討を行い、ほぼ実地的な駆除法を確立した。

シャガス病を媒介するサシガメ 2 種の潜みおよび産卵生態を実験的に検討を行ったところ、2 種には相違がみられ、駆除の際にはそれぞれに対応した方法が必要であることが示唆された。

ウ イ ル ス 部

〔行政および依頼検査〕

平成11年4月から感染症新法施行され、感染症患者発生動向調査もこの新法のもとで行うことが決まり、これまでの検査定点は全て解消され、新たに検査定点を設けなければならなくなった。国の診断基準や検査指針が遅れたために、県内に新しい定点を設けるのが遅くなり、そのため今年度はウイルスの検査依頼が例年に比べて極端少なかった。

7月に発生した無菌性髄膜炎患者の髄液からムンプスウイルスが分離された。分離されたウイルスのP遺伝子を解析したところ、ワクチン株（宮原株）であることが判明した。8月に発生した2名の脳炎患者からウイルスが分離された。このウイルスはPCR法によってエンテロウイルスであることは確認されたが、型別は出来なかった。乳児嘔吐下痢症を含む感染性胃腸炎は年間を通じて発生した。6～7月と11～3月を中心にノーウォーク様ウイルス（小型球形ウイルス、SRSV）が多く検出された。春から初夏にかけてA群およびC群ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルスが検出された。

7月に富山市保健所管内の某社員食堂において、ウイルス性食中毒を疑う集団発生（101名）があった。患者の便4名中4名、調理人の便2名中1名から、電子顕微鏡でノーウォーク様ウイルス（小型球形ウイルス、SRSV）が検出された。また3名の患者のペア血清を用い、免疫電顕法でSRSVに対する抗体の有意上昇を認め、SRSVの感染を確認した。11月富山市保健所管内の某料理屋において、20名のウイルス性食中毒が発生した。このうち、4名の患者便から電子顕微鏡でSRSVが検出された。そして3名の患者のペア血清を用いて免疫電顕を行ったところ、全員にSRSVに対する抗体の有意上昇が認められた。また、保存されていたカキ（10個）からPCR法でSRSVの遺伝子が検出された。しかしながら、患者は誰一人としてカキを喫食しておらず、原因食はカキ以外の食品か、生カキを料理した料理人の手で別の食材が汚染され、それを喫食して発症したかそのどちらかである。12月にハンドボールの試合のために全国から集まった102名の高校生が、高岡保健所氷見支所管内の某旅館で生カキを喫食し、48時間後に嘔吐、下痢の症状を示した。そして59名の患者のうち、31名が入院した。5名の患者便を電子顕微鏡で調べたところ、

全ての便からSRSVが検出され、またカキからもSRSVの遺伝子が検出された。2,000年2月、富山市内のレストランで高校生のテーブルマナー教室が開かれ、生カキ食した25名のうち、16名が下痢、腹痛の症状を呈した。6名の患者便から、電子顕微鏡でSRSVが検出された。この事例で、同じロットのカキを食し、発病せず、便にSRSVを排出している調理人を発見した。このような不顕性感染者（キャリアー）が感染源として重要であることを再確認させられた。その後、3月までに3事例のカキによるウイルス性食中毒が発生し、いずれの事例もSRSVが原因ウイルスであることを明らかにした。

臨床的につつが虫病患者と疑われた6名の患者について抗体検査と*Orientia tsutsugamushi*の遺伝子の検出を行った。春季に発生した1名の患者はKarp型、秋季に発生した4名の患者はKawasaki型のつつが虫病リケッチアに感染していた。

〔動物由来感染症実態調査〕

平成11年度より、動物由来感染症実態調査としてQ熱の調査を開始した。本年度は県内の開業獣医と動物管理センターの協力により、犬76頭、猫91匹、合計167件の血液が集まり、Q熱の病原体*Coxiella burnetii*に対する抗体検査に供した。血清希釈16倍以上を抗体陽性とした場合、犬で11%（8/76）、猫で51%（46/91）が*C.burnetii*に対する抗体を保有しており、県内に居住するヒトの中にも、かなりの数の不顕性感染者いる可能性が示唆された。

〔HIV抗体検査〕

平成11年4月から平成12年3月までの間に156件の検査依頼があった。このうち、ウエスタンブロットとPCRによる確認試験が1件あった。

〔流行予測調査〕

日本脳炎：6月から9月までの県内6定点におけるコガタアカイエカの発生数は前年度よりも減少した。特に、黒部、上市、富山の3定点では前年度よりも31～55%と、顕著な減少であった。また蚊の発生ピークも例年よりもおよそ2週間遅く、9月の初旬であった。一方、県内産豚の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有率は、蚊の発生数を反映して、7月0%、8月で5%、9月に入っても5～10%、10月でやっと40～45%に達し、非常に低率であった。ウイルスの新鮮感染を示唆するIgM抗体保有豚も9月に入り2頭、10月2頭確認され、少数であった。このようにコガタアカイエカ発生数の減少により、今年度は富山県内への日本脳炎ウイルスの侵淫は非常に少なかったと考えられた。

ポリオ：平成11年度は、厚生省委託事業として感染源調査のみを行い、感受性調査は県単独事業として行った。感染源調査はポリオワクチン接種後2か月以上経過した時点で、1歳～6歳までの乳幼児から糞便を採取してウイルス分離を実施した。その結果、ポリオウイルス2型1株、エコーウイルス22型1株と同定不能のウイルスが1株分離された。感受性調査は全年齢層を対象に採血し、127名（0歳～49歳）の血清についてポリオウイルスに対する中和抗体価を測定した。ポリオウイルスの各型に対する抗体保有率は、全年齢層全体で1型が91%、2型が96%、3型が80%であった。また、抗体保有者の平均抗体価は、1型で230倍、2型で163倍、3型で27倍であった。

インフルエンザ：インフルエンザ流行前に感受性調査として、0歳から62歳までの年齢群の住民血清248名について4種類のインフルエンザウイルスに対する抗体を測定した。その結果、感染防御能があるとされている40倍以上の抗体保有率は、2年連続で流行したA/Sydney/5/97（H3N2）株に対して若年層で57～84%、成人、老人層で20～30%、3年連続流行がみられないA/北京/269/95（H1N1）株に対してはどの年齢層とも10%前後であった。昨シーズン学童、生徒の間で流行したB/山梨/66/98株に

対しては若年層で40～50%の保有率であったが、成人、老人層では10%以下であった。この成績はA/sydney(H3N2, 香港型)を除いたどのインフルエンザウイルスが県内に浸淫しても大きな流行を起こす可能性を示唆しており、警戒が必要であった。このような背景のなか、12月から患者が発生し始め、1月に入り患者は急激に多くなり、3月の中旬まで発生が続いた。今冬の最初の“集団かぜ”は2000年1月14日にS中学校で発生した。その後、県内各地で流行が継続し、3月中旬で終息した。休校、学年または学級閉鎖の措置がのべ127施設でとられ、累積患者数は4,680人に達した。4施設の“集団かぜ”患者のウイルス検査を行ったところ、3施設はA(H1)型(ソ連型)、1施設はA(H3)型(香港型)の感染であることが明かとなり、今冬の“集団かぜ”は低年齢層の抗体保有率を反映して、A(H3)型よりもA(H1)型のインフルエンザウイルスによる流行が多かったと推察された。一方、患者定点でのウイルス分離状況をみると、昨年の12月にA(H3)型とA(H1)型が分離され、その後両ウイルスは3月の中旬まで分離された。分離ウイルスの抗原分析の結果、県内で今シーズン流行したA(H1)型とA(H3)型のインフルエンザウイルスの抗原は、使用されたワクチン株の抗原と少し異なっていることが明らかとなった。今年度もインフルエンザ脳炎、脳症と診断された患者が4名発生した。4名の検査材料からウイルスは分離出来なかったが、このうち2名の患者(髄液と咽頭ぬぐい液)からA(H1)型、A(H3)型ウイルスの遺伝子がPCR法で検出された。しかし、残りの2名の脳炎患者はインフルエンザウイルスとの因果関係を明確にすることができなかった。

〔調査研究〕

河川および下水のウイルス汚染調査

河川水や下水から分離されたポリオウイルスの遺伝子解析：前年度は富山県内の河川水や下水から分離されたポリオウイルスのVP3/VP1遺伝子領域をPCR-RFLP法で解析した。その結果、ワクチン株とは異なった性状を示す分離株(変異株)も多く存在したが、解析した結果、全てのポリオウイルスがワクチン由来株であったことを報告した。今年度は分離したワクチン変異株の塩基配列、アミノ酸配列を調べて、ワクチン株の中に毒性の強い野生株へreversion(先祖帰り)したウイルス株が存在するかどうか検索した。1型の16変異株のうち、10株の変異はMahoney株(強毒株)へのreversionであった。また、この内の9株の変異は抗原エプトープ部位のアミノ酸の置換をもたらすものであった。2型の31変異株、3型の31変異株の中には野生株へreversionしている株は認められなかったが、3型の3変異株は抗原エプトープ部位の変異であった。

ワクチン変異株に対する住民の中和抗体保有状況：ワクチン株に由来する麻痺症状発症予防の観点から、下水から分離したMahoney株へのreversion株であるSabin 1型変異株(G4-12)に対する住民の中和抗体保有状況を調査した。その結果、変異株G4-12株に対する中和抗体は、Sabin株(ワクチン株)よりも強毒株のMahoney株と同様な傾向を示したが、3株に対し感染防御が出来る4倍以上の抗体の保有率(93%以上)は高く、現状のワクチン接種率を維持していく限り、ワクチン株が強毒株に変異したとしてもその感染を十分に防御出来ることが明らかとなった。この成績は、生ワクチンを用いる限り、変異による危険性は避けられず、不活化ワクチンへの切り替える時期が到来していることを示唆するものである。

ウイルス感染症の疫学的研究：現在日本国内では神経毒性の強い野生株ポリオウイルスによるポリオ患者の発生はなく、野生株のウイルスも存在しないとされている。一方、東南アジア、インド、アフリカなどでは、現在も野生株のポリオウイルスが常在しており、またワクチン株の中にも神経毒性を獲得した変異株も見つかっている。これらの地域での旅行中の感染や、これらのウイルスに汚染され食材等の輸入により、国内においても強毒株やワクチン変異株の感染を受ける危険性が考えられる。そのため、強毒

株や変異株に対する抗体レベル知っておく必要がられる。そこで、第1段階として、ポリオウイルスの強毒株（Mahoney株, Lansing株, Saukett株）に対する県内住民（196名）の中和抗体を測定した。その結果、県内住民はいずれの強毒株ウイルスに対しても感染防御しうる抗体を高率（76%以上）保有していた。また平均抗体価もワクチン株に比べ、30歳代以下の年齢層で2～4倍の低下がみられた程度で34倍～117倍（幾何平均）と高い値であった。

リケッチアに関する研究：マダニはヒトに紅斑熱群リケッチアを媒介する。四国や千葉県において、フタトゲチマダニは日本紅斑熱の媒介種として最も重視されている。そこで、日本紅斑熱の患者発生地の高知県と患者非発生地の富山県に生息するフタトゲチマダニから紅斑熱群リケッチアの遺伝子（gltA, rompA）をPCR法で増幅し、増幅遺伝子断片の塩基配列を比較解析した。高知県産のフタトゲチマダニから94%、富山産のフタトゲチマダニから46%の率で紅斑熱群リケッチア遺伝子が増幅された。増幅遺伝子断片の塩基配列は両者の間で完全に一致しており、両県に生息するフタトゲチマダニは同じ種類の紅斑熱リケッチアを保有することが明らかとなった。更に、両県に生息するフタトゲチマダニから増幅した遺伝子と、日本紅斑熱の病原体である*R.japonica*のそれとを比較すると、gltA遺伝子で2塩基、rompA遺伝子で25塩基の置換がみられ、両遺伝子とも*R.japonica*とは完全に一致しなかった。しかし、*R.japonica*とのホモロジーは95%と高く、富山県にも*R.japonica*に近縁の紅斑熱リケッチアを保有するフタトゲチマダニが生息することが明らかとなった。

〔夏休み子供研究室〕

生命科学の先端技術の一端にふれてもらう目的で「ダニに潜む微生物の遺伝子を取り出す」実験をがん研究部と共催で企画し、6名の中学生が参加した。初日は野外でのマダニの採集と分類、マダニからのDNAの抽出、2日目にかけて遺伝子の増幅（nested PCR）とアガロース電気泳動を行い、ダニに共生する微生物遺伝子の検出を体験させた。

細 菌 部

〔感染症、食中毒発生に関わる行政検査〕

2類感染症：腸管感染症では、赤痢3件（すべてソンネ）の発生があり、コレラ、チフスの発生はなかった。赤痢3例の内1例はインド旅行による感染で、他の2例は海外渡航歴なしの国内感染であった。国内感染の感染源は輸入食品であるかどうか明らかでなかった。

3類（腸管出血性大腸菌）感染症：平成11年度は感染者38名で、原因菌の血清型はO157：H7 20名、O26：H11 17名、O26：HNM 1名であった。その内感染者4名以上の集団発生はO26：H11によるものが2例、O157：H7によるものが1例であった。過去数年間、高岡市においてO26による集団事例が多いが、平成11年も1件の発生があった。しかし、原因は明らかにならなかった。

細菌性食中毒：患者数2名以上を集計すると、4件の発生であった。内訳は腸炎ビブリオが2件（血清型O3：K6, O4：K55 各1件、患者数 計138名）、サルモネラが1件（*S. Enteritidis*, 患者数17名）、ブドウ球菌が1件（患者数27名）であった。

〔その他の行政および依頼検査〕

行政検査：(1)食品：6～7月に清涼飲料水54件の成分規格検査を行った。すべて細菌学的規格基準に合格していた。(2)水質関係：県生活環境部および富山市の依頼で海水浴場（8定点、延べ132検体）の糞

便性大腸菌群数測定を行った。いずれも水質が良好な「AA」または「A」ランクで「適」であった。腸管出血性大腸菌O157の検査も25検体について行ったが、すべて陰性であった。

富山県内で水道の水源として利用される河川水60件について糞便性大腸菌群と嫌気性芽胞菌を検査し、いずれかが陽性であった14検体についてクリプトスポリジウムの検査を実施した。すべて陰性であった。

平成8年度より始まった通称「VPマリン」事業では、県内4漁港の海水、海泥の腸炎ビブリオを6月から10月にかけて定期的に調べた。その結果、海水中の腸炎ビブリオ数は6月から10月にかけて、ほとんどの定点で100ml当たり $3\sim 6.4\times 10^2$ 個の範囲であった。

依頼検査：民間企業等より依頼されて検査した食品、医薬品、水はそれぞれ6、16、27検体で、全体として前年比80%であった。昨年度に比べ医薬品関係の検体が多かった。

〔流行予測、感染症サーベイランスと病原細菌検出情報〕

流行予測事業：県単独事業として溶血連鎖球菌の感染症感染源濃度調査を東西2か所の保育園園児88名を対象に実施したところ、咽頭に溶連菌を保有していた園児の数は6名（A群T4:2名、B群NT6型:2名、G群2名）であった。また、病院で分離された多くの溶連菌を型別すると、咽頭からA群、喀痰、膿分泌物からB群が多く検出され、A群ではT12型、B群ではNT6とJM9が優勢であった。一方、国の流行予測事業としてジフテリア血中抗体価測定を0～16歳児129名を対象に行ったところ、抗体は殆どワクチン接種者に認められ、非接種者に認められなかった。

病原細菌検出情報：病原細菌検出情報によれば、県内の病院、保健所における糞便からの病原菌検出数は、1,525株前年比82%で、最も多かったのは大腸菌の583株、以下黄色ブドウ球菌 545株、サルモネラ 141株、カンピロバクター 134株、腸炎ビブリオ 94株の順であった。

〔調査研究〕

サルモネラ：富山市内と高岡市内を流れる河川水における分布調査とヒトから分離される菌株の収集を行った。その結果、富山市内河川水では、分離率 4/24 (16.7%) で、血清型 *S.Typhimurium*, *S.Muenchen*, *S.Anatum* の順に多かった。しかし高岡市内河川水からの検出はなかった。一方、県内の病院、保健所で分離された菌を集計すると血清型 *S.Enteritidis*, *S.Oranienburg* が多かった。後者の *S.Oranienburg* の殆どは4月に発生したイカ乾燥食品を原因とした食中毒例からの分離であった。他に厚生科学研究事業として *S.Typhimurium* の薬剤感受性を11菌株11薬剤について調べた。その結果、3株は4剤（CP, ST, TMP, FOM）が2株、ABPC, SM, TC, CPが2株）に、1株は1剤（SM）に耐性で、残る7株は感受性であった。

大腸菌：(1)腸管出血性大腸菌：平成8年8月から11年10月までの3年間に高岡市でO26:H11あるいはHNMによる集団感染症が6例と多発した。この原因を探るため分離株の分析を行った。高岡市で分離された大腸菌O26の6種類の糖分解能、6種類の病原遺伝子保有能、薬剤感受性は各事例において同じで、他の地区分離株のそれとも同じであった。又、パルスフィールドゲル電気泳動像は各事例において似てはいるが、少しずつ異なり、感染源は事例毎に異なると考えられた。(2)その他の病原性大腸菌：平成11年度に県内の1病院で下痢患者から分離された大腸菌について血清型と毒素産生性を調べた。VT, ST, LTを産生しない血清型O1が多かった。

溶連菌：溶連菌感染症において血清型T1は主要流行菌型の一つである。T1流行についての知見を得る目的で、1983～1998年の間に国内各地（秋田県、富山県、大分県、沖縄県）で分離された菌株の型別をパルスフィールドゲル電気泳動法で行った。その結果、供試菌はデンドログラム等で大きく2つのクローン（A型、B型）に分けられ、A型とB型のクローンは1990～1992年の間に各地で殆ど時期を同じくして

置き換わっていたことが判明した。

腸炎ビブリオ：培養法の改良と免疫磁気ビーズの使用により、海水中から耐熱性溶血毒（TDH）を産生する血清型O3:K6の分離が可能となった。この方法により平成11年7月～9月の期間、県内4漁港海水について調べたところ、すべての漁港にTDH産生性腸炎ビブリオO3:K6が分布することが明らかになった。又、海水由来株と食中毒由来株の染色体DNA制限酵素切断パターンを比較したところ同一または殆どが同じであった。一方、厚生科学研究事業として、県内2漁港の腸炎ビブリオ定量調査とPCRを用いたTDH産生株の検索を行った。その結果、海水の菌数は $1.1 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^8$ / mlであった。PCRによってTDH産生性菌陽性となる例を認めたが、菌を分離することは出来なかった。

腸管系病原細菌に共通の課題

公衆衛生上重要なコレラ、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、サルモネラによる下痢の集団発生があったときには、菌検索が行われ、更に分離菌のPFGEパターンが調べられるが、1つの集団発生で2種類以上のパターンの菌が分離されることが少なくない。この様なときの解釈に役立てる為に、菌保存におけるPFGEパターンの変化を調べた。いずれの菌においても保存中にパターンに変化のある子孫が生じることを認めた。変化はDNAバンド1から2本であった。以上の事より、疫学的事実が明確で差がバンド1から2本であるなら、両方の菌は同じクローンと考えて良いと推定した。

[GLP内部精度管理]

富山県食品関係試験検査業務管理要綱に示される精度管理規定に基づき、県内4保健所、食肉検査所、富山市保健所及び衛生研究所の7機関に対して内部精度管理を実施した。検査項目は黄色ブドウ球菌およびサルモネラの検出同定とし、該菌を牛乳に混入し配布した。結果は7機関（検査実施者13名）すべて正解（黄色ブドウ球菌陰性、サルモネラ陽性）であった。

[細菌感染症検査マニュアルの作成]

平成11年4月に感染症新法が施行された。この法に対応して、県内の保健所および衛生研究所が感染症発生時に使用する検査マニュアル（約80頁）の執筆を行った。

[研修]

平成10年度は保健所の機能強化のため、検査担当者を対象に研修会を実施したが、平成11年にはこのような研修会はなかった。しかし県外からの研修依頼があり、1名にはパルスフィールドゲル電気泳動、1名には溶連菌のemm型別（M蛋白遺伝子の塩基配列に基づく型別）の実技研修を行った。

化 学 部

[行政および依頼検査]

1. 食品等の検査

(1) 添加物及び成分規格

煮干し等魚介乾製品中の酸化防止剤（BHA, BHT）、魚肉ねり製品、漬け物等の保存料（安息香酸、ソルビン酸）、甘味料（サッカリン）及び生めん類等の品質保持剤（プロピレングリコール）の検査を行ったところ、いずれも使用基準に適合していた。県内で生産されたミネラルウォーターについて、

7, 8月に延べ32検体の成分規格試験(混濁, 沈殿物, ヒ素, 鉛, カドミウムおよびスズ)を行ったところ, いずれの成分も検出されず, すべての検体が規格基準に適合していた。なお, 本年度の総検体数は136, 項目数は632であった。

(2) 残留農薬

県内産主要農産物の玄米, なす等の4種16検体について, 厚生省通知の農薬多成分系統分析法を用いて, 有機リン系(フェントロチオン等), 含窒素系(イプロジオン等), ピレスロイド系(ペルメトリン等), カーバメイト系(フェノブカルブ等)の70種農薬(76成分)を調査したところ, いずれの検体からも農薬は検出されなかった。

(3) 重金属等

富山湾産魚介類について, 16魚種20検体(あじ, カマス等)の総水銀を測定したところ, すべての検体から検出され, 濃度は0.02~0.16ppm(暫定的規制値0.4ppm)であった。また10魚種10検体のトリブチルスズオキシド, ジブチルスズオキシド, ジフェニルスズオキシド(いずれも規制値なし)を測定したところ, いずれの検体もすべて不検出(0.02ppm未満)であった。

(4) 食品容器

ポリカーボネート製容器2検体について材質及び溶出試験を行ったところ, 規格基準に適合していた。

2. 家庭用品検査

除菌消臭スプレーや繊維保護用スプレーなどの家庭用エアロゾル製品10検体について, テトラクロロエチレン, トリクロロエチレンあるいはメタノールの規格試験を, また羊毛製品(衣類)5検体についてデイルドリンの試験を行ったところ, いずれの製品からも検出されず, 規格基準に適合していた。

3. 水質検査

(1) 水質基準項目

水道浄水69件, 水道原水15件については, 病原微生物を除いた健康に関連する項目及び水道水が有すべき性状に関する項目の検査(総項目数2,496)を行ったところ, pH及び色度の基準に適合しないものが各1件あった。

また井戸水等167件について陰イオンあるいはテトラクロロエチレン等の検査を行ったところ, いずれも基準に適合していた。なお総検査件数は251(総項目数3,232)であり, 前年比で約200%(150%)に増加した。

(2) 監視項目

水源として利用されている表流水3件および地下水14件について, 亜硝酸性窒素, ウラン, モリブデン, ニッケルおよびトルエン等31項目の検査を行った。トリクロロ酢酸は5件, ジクロロ酢酸は7件, ジクロロアセトニトリルは3件及び抱水クロラールは2件から検出され, それらの値はそれぞれ指針値の1/100, 1/10~1/3, 1/100及び1/10程度であった。他の項目はいずれも不検出であった。

(3) 井戸水のゴルフ場使用農薬

県内ゴルフ場周辺の井戸水について, 平成11年5月(23件)および11月(23件)にゴルフ場使用農薬(シマジン等27成分)の検査を行ったところ, いずれの井戸水からも農薬は検出されなかった。

4. 温泉分析

中分析6件, 小分析1件(新規分析3件, 再分析4件)を行ったところ, 温泉法第2条に適合するものは6件であり, そのうち5件は療養泉であった。主な泉質は, ナトリウム-塩化物泉, カルシウム・ナトリウム・マグネシウム-炭酸水素塩・塩化物泉等であった。また温泉資源保護を目的として, 温泉密集地域の14泉源の主要成分について, 平成7年度から経年変化調査を行っているが, 本年度の測定値は前

年度の測定値と大きな相違は認められなかった。

〔調査研究〕

1. 食品中の成分および添加物に関する調査研究

イオンクロマトグラフィーでは、イオン交換体の基材に水酸基が存在する場合には、溶出液にホウ酸を用いると、基材の水酸基とホウ酸が陰イオン錯体を形成し、イオン交換体に導入されている陽イオン残基を中和して、陰イオン交換容量を減少させることを既に明らかにしている。

溶出液にホウ酸・マンニトールを用い、ホウ酸濃度は一定に保持し、マンニトール濃度を順次減少させることにより、陰イオン交換容量を順次減少させて多価陰イオンを一斉分析する条件の検討を前々年度より進めている。この方法はキャパシテイ・グラジェント溶出法と呼ばれており、ポリリン酸のような多価陰イオンの一斉分析に適用可能であることを見出した。更に、イオン交換体の基材に導入される水酸基の量、陰イオン交換基の量及び溶出液組成とグラジェント条件と目的成分の溶出との関係について詳細に検討し、多種の陰イオン成分の一斉分析に適した新しい陰イオン交換カラムをカラム製造メーカーと共同で作製した。

2. 食品中の残留農薬およびその他の有害物質に関する調査研究

昇温プログラム気化（PTV）大量注入法を用いたGC-ECDシステムにより、アルコール飲料中の6種農薬の迅速・微量分析法を確立した。試料をC18ディスク・カートリッジで固相抽出し、フロリジルミニカラムで精製した後、GC分析を行った。前処理操作の迅速化を図るために、2種のカラム処理には同一の溶出溶媒を使用し、溶媒の濃縮・置換操作を省略した。前処理及びGC測定に要する時間、即ち検査時間は2時間以内である。アルコール飲料に定量下限値（ビンクロゾリン、キャプタン、プロモプロピレート；0.25ng/g、プロシミドン、カプタホール；0.5ng/g、イプロジオン、同代謝物；1.0ng/g）の2倍及び20倍濃度の農薬を添加したときの回収率は、76.7%～124.3%、標準偏差0.6～21.9であった。本分析法を15検体のアルコール飲料に適用したところ、9検体からジカルボキシイミド系農薬を検出した。

3. 飲料水および温泉に関する調査研究

本県の保健所における飲料水検査では、水道法施行規則に規定された10項目と鉄、カルシウム及びマグネシウム等（硬度）の12項目を測定している。そのうち塩素、亜硝酸及び硝酸の各イオンの測定に平成10年7月に導入されたイオンクロマトグラフ（IC）を使用しており、検査精度の向上と検査業務の省力化に寄与している。更なる検査業務の省力化を図るために、ICによる塩素、亜硝酸及び硝酸の各イオン並びにカルシウム、マグネシウムイオンを一斉分析する方法の開発を試みた。各種の陰イオン交換カラムと溶出液にエチレンジアミン四酢酸・ナトリウム塩を用いて条件の検討を行い、保健所に導入されたIC装置で一斉分析が可能な条件を確立した。分析カラムの維持管理、耐久性（経済性）及び測定結果の解析法等の検討を引き続き行う予定である。

4. 日常の検査業務に適する簡便、迅速な多成分一斉分析法の開発

(1) キャピラリー電気泳動法（CE法）による光学異性体の分析

シクロデキストリンの包接機能を利用し、CE法で乳酸のD体、L体を光学分割する方法を開発した。この方法をヨーグルト、ワイン、日本酒、清涼飲料水などの分析に適用し、共存物質の影響を受けることなく良好に分析できることを明らかにした。乳酸のD体とL体では味が異なるため、日本酒の製造工程、特に酵母による発酵過程におけるD体とL体の挙動を把握して、工程管理指標としての利用を検討中である。

(2) 偏光吸光度検出法（PPD）を利用した光学異性体の分析

非変調型PPD法の高機能化を目指して、変調型への適用を検討した。まず、分光光度計内にプリズム

と位相差板を配置することで、化合物の円二色性(CD)に基づく波長軸方向の変調波の作成に成功し、CDスペクトル測定法を確立した。この方法を高速液体クロマトグラフィーのダイオードアレイ検出器に応用することにより、高感度で汎用性に優れた多波長方式のCD検出器を開発した。清涼飲料水、果実飲料中のリンゴ酸、酒石酸の光学的純度測定に適用することを検討中である。

(3) 農薬の分解生成物について、化学的性質の把握及び簡易分析法の開発

除草剤のチオベンカルブは塩素による浄水処理あるいは肝臓内酵素群で代謝され、チオベンカルブスルホキシドが生成する。両化合物とも変異原性を有するが、チオベンカルブスルホキシドには光学異性体(D体とL体)が存在する。キャピラリー電気泳動法を用いてこの異性体分析法を確立した。実試料中の各異性体の比率等についての解析を継続中である。

[理化学検査の精度管理]

1. 技術研修

保健所、病院等で理化学検査を担当する職員の技術水準向上のために、研修会を実施した。

1) 毒劇物迅速検査方法。厚生省が全保健所に配布した5種類の簡易検査キットの中から、イオンクロマトグラフィーにより既に日常分析を行っている硝酸、亜硝酸性窒素以外の3種類の検査キットについて、検査方法の原理、注意点及び使用法の説明、実習を行った。①ヒ素化合物;反応キット内の塩酸溶液で臭化第二水銀試験紙を濡らさないこと、②シアン化合物;反応がピリジン-ピラゾロン法を基本にしているため操作は迅速に行うこと、③コリンエステラーゼ阻害剤(リン系農薬等);酵素反応によるため検体は予め中性にする必要があること等を検査上の注意点として説明した。

2) GPC装置を用いた農産物中の農薬検査の前処理方法。本年度から保健所、衛生研究所が共同で検査に使用するGPC装置の原理・操作法の説明とこれを用いた実習を行った。

3) HPLCによる合成色素の検査方法。TLC法から分析精度が高いフォトダイオードアレイ検出器付HPLC法に変更するために検査方法、HPLC装置の原理・操作法の説明と実習を行った。

2. 食品検査の精度管理

平成10年12月の「富山県食品衛生検査業務管理要綱」の制定によって、本県の保健所、食肉検査所及び衛生研究所に検査業務管理基準が適用され、平成11年12月に内部精度管理調査を行うことになった。各検査機関自らが行なう日常の精度管理とは別に、検査方法等を統一して行った。検体はあん、検査項目は安息香酸、ソルビン酸、パラオキシ安息香酸及びサッカリンナトリウムの4項目、前処理及び測定方法は指定した溶媒抽出-HPLC法で行った。参加した機関全てが、検査実施標準作業書(検査SOP)が規定している回収率範囲80~110%を満たし、装置の測定精度も高く、前処理も良好に行われ、満足すべき結果が得られた。また本検査SOPに関しては、それぞれ検査項目ごとに回収率を設定する提案を行った。今後、本調査は、データ数を増やし、各種SOPの作成、変更を活用し、各検査機関の検査水準の向上に寄与するものと考えられる。

3. 水質検査の精度管理

富山県水道水質検査精度管理実施要領に基づく精度管理が、県内の水道水質検査を実施する11機関の参加により、平成11年度は過マンガン酸カリウム消費量、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の2項目について実施され、当所は試料の調製・配布、報告値の集計・解析を行った。

過マンガン酸カリウム消費量については、試料としてマンニトール5mg/L溶液を調製し配布した。解析の結果、機関内でのばらつきは小さかったものの、機関間のばらつきが大きく、測定機関ごとの加熱条件の違いがその大きな要因と考えられた。

硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素については、市販の2Lペットボトル入りミネラルウォーターを試料と

して配布した。解析の結果、ほとんどの機関で精度良い検査が行われていたが、2、3の機関に対して、データ処理や実験操作上における改善すべき点を指摘した。

環 境 保 健 部

〔行政検査〕

1. カドミウム環境汚染に関わる地域住民健康調査（神通川流域住民健康調査）

(1) 1次検診

神通川流域住民健康調査は、昭和54年度から実施してきた環境庁委託による健康調査方式が平成9年度より新しい方式に改められたが、平成11年度は新方式に基づく調査を実施し、対象者2,615名中958名が1次検診を実施した。

(2) 精密検診（2次、3次）

1次検診の結果、尿中 β_2 -ミクログロブリン陽性または蛋白定性陽性のもの166名が精密検診の対象となった。精密検診は指定医療機関である富山医科薬科大学付属病院、県立中央病院、富山市民病院の3医療機関で行われ、受診者125名の尿、血液について所定の検査を行った。

(3) 管理検診

イタイイタイ病要観察者に対して、経過観察中の管理検診対象者5名のうち2名が受診し、該当する尿および血液検査を実施した。

(4) イタイイタイ病認定申請に伴う検査

申請のあった3名について、該当する尿および血液検査を実施した。

〔調査研究〕

1. イタイイタイ病に関する研究

神通川流域住民健康調査において、腎機能検査は最も重要な検査の1つである。24時間蓄尿を試料とする検査法では、採尿の不正確性が検査精度を低下させると考えられるが、実態が把握されていない。そこで、基礎的検討として、精密検診受診者について、24時間蓄尿の尿量別に、1日排泄量が一定とされる尿中クレアチニンの実測値を計算値と比較し、採尿が完全であるか否かを分析したところ、尿量が1000ml以下では、クレアチニンの排泄量が計算値より少ないものが多く、採尿にもれがあると推測された。その結果、クレアチニン・クリアランスは見かけ上低値を、リン再吸収率（%）は高値を示す傾向にあることが明らかとなった。

2. 骨代謝指標による骨粗鬆症の効果的な予防法の確立に関する研究

(1) 現在の骨代謝（骨の再構築）の状態を生化学的指標によって評価することにより、事前に骨量減少を予測するシステムの構築をめざし、富山県では平成10年度より、県厚生部、保健所との共同研究を開始した。尿・血液中骨代謝指標の測定を、超音波法による骨密度の測定に加えた新方式の骨粗鬆症検診を実施し、今年度は2年目調査を行った。「要指導」の基準を、骨吸収指標である尿中ハイドロキシプロリンの値で55mg/gCrに設定し、骨量の変化を経過観察している。

(2) 検診での骨密度の測定機器や測定部位などについての検討は未だ充分ではない。現在、測定機器としてX線による暴露がなく、搬入が容易な超音波骨量測定装置（Achilles）が多く利用されている。Achillesによる骨密度計測値としては、踵骨の超音波伝搬速度（SOS）と超音波減衰係数（BUA）を測定し、両方の値からStiffnessが算出され、検診などではこのStiffnessが用いられるこ

とが多い。一方、SOSは骨密度を、BUAは骨梁構造を反映するといわれ、異なる骨の状況を推測できる。そこで、上記骨密度の指標と関連する要因を、成長期である中学および高校生で検討した。その結果、BUAは体格や二次性徴など内的要因と関連が高かったが、SOSはこれらの要因の影響が小さく、環境要因の検討に適している可能性が示された。

- (3) 日常の生活習慣は予防医学上重要な要因である。そこで、地域環境が異なり、伝統的な生活習慣を有する中国・内モンゴル自治区の都市、農村、草原地区女性について、橈骨骨密度および尿・血液中の骨代謝指標を測定し、環境要因との関係を解析した。その結果、地区別では、穀類と野菜・果実中心のビタミン、ミネラル豊富な食習慣を有し、歩数が他の2地区より有意に多い活動量を示した農村部で、骨密度が高い傾向がみられた。

3. 生活習慣病予防に関する疫学的研究

小児期からの生活習慣病を予防する研究の一環として、小学校6年生の生活習慣調査と血清コレステロールの測定を行った。運動との関係では、男子は運動習慣を持つものがHDLコレステロールが高く、動脈硬化指数(AI)が低かった。女子では初経発来の有無で運動の影響が異なっており、月経を有するもののみ運動で総コレステロール、AIともに低値を示した。牛乳摂取との関連では、男子の1日2本以上飲むものが、善玉といわれるHDLコレステロールが高い傾向にあった。

4. 環境汚染物質の生体影響に関する研究

- (1) 内分泌攪乱作用が疑われている化学物質(いわゆる環境ホルモン)のヒト体内暴露量と毒性影響との関係を明らかにするため、尿中フタル酸エステル代謝物および血液中の有機スズの簡易測定法を検討中である。
- (2) 環境化学物質と健康との関連を明らかにするために、生活習慣や地域環境の大きく異なる中国・内モンゴル自治区の3地区において、微量金属の調査を行い生活習慣との関係を昨年度に報告した。一方、骨代謝の調査により、内モンゴル草原部の有経女性では、牛乳や乳製品中心の食生活にもかかわらず、骨吸収の亢進が明らかとなり、その原因を検討してきた。今回は、内モンゴルで汚染事例が報告され、骨代謝に影響を与えるといわれるフッ素との関連を調べた。飲料水と早朝尿のフッ素濃度を測定したところ、草原部の飲料水に高濃度のフッ素汚染が見出され、尿の高濃度フッ素と骨吸収の亢進との間に関連がみられたことから、フッ素が骨吸収に影響している可能性が示された。

5. 非水産分野における深層海水の利用に関する研究

(マリンミネラルによる健康増進法の開発研究)

深層水の物理・化学的性状については多くの分析が行われ、多方面で活用が検討されている。しかし、健康増進への作用は、その効果が期待されているものの、未だ、科学的データに基づく研究報告がない。そこで、富山医科薬科大学および滑川市との共同研究により、医科学的効能を証明し、深層水を活用した望ましい健康増進プログラムを確立する研究を開始した。平成11年度は、深層水タラソセラピーの体験モニターを募集し、血圧や脈拍などの生理学的指標の測定と快適性に関するアンケート調査を実施した。

(7) 検 査 状 況

() 内項目数

部 名	区 分	行 政 検 査	依 頼 検 査
がん研究部	先天性代謝異常検査	11,592 (69,552)	—
	染色体検査	150 (150)	42 (42)
	衛生動物検査	983 (1,326)	163 (337)
	小 計	12,725 (71,028)	205 (379)
ウイルス部	感染源検査	661 (661)	
	血清検査	1,356 (2,635)	
	小 計	2,017 (3,296)	
細菌部	感染症にかかわる検査	352 (424)	
	食中毒にかかわる検査	117 (194)	
	血清学的検査	129 (129)	
	食品検査	71 (74)	6 (12)
	水質検査	395 (719)	27 (27)
	医薬品検査		16 (40)
	小 計	1,064 (1,540)	49 (79)
化学部	食品にかかわる検査	230 (2,086)	5 (125)
	家庭用品検査	15 (20)	
	水質検査	197 (1,576)	134 (2,915)
	温泉分析	14 (140)	7 (197)
	小 計	456 (3,822)	146 (3,237)
環境保健部	カドミウム住民健康調査	1,088 (3,875)	
	小 計	1,088 (3,875)	

検 査 内 容

() 内項目数

が ん 研 究 部

[行政検査]

1. 先天性代謝異常検査 11,592 (69,552)

2. 染色体検査

(1) 血 液 100 (100)
(2) 羊 水 35 (35)
(3) 胎 児 15 (15)

3. 衛生動物等検査

(1) 衛生・不快動物 978 (1,321)
(2) 食品混入異物 5 (5)

[一般依頼検査]

1. 染色体検査

(1) 血 液 4 (4)
(2) 羊 水 29 (29)
(3) 胎 児 9 (9)

2. 衛生動物等検査

(1) 衛生・不快動物 155 (329)
(2) 食品混入異物 8 (8)

ウ イ ル ス 部

[行政検査]

1. 感染源検査

(1) インフルエンザ 125 (125)
(2) ポリオ 72 (72)
(3) その他のウイルス 119 (119)
(4) リケッチア, その他 345 (345)

2. 血清学的検査

(1) インフルエンザ ヒト 288 (1,152)
 ブタ 80 (240)
(2) ポリオ 127 (381)
(3) 日本脳炎 ブタ 260 (260)
(4) エイズ 156 (157)
(5) その他のウイルス 92 (92)
(6) リケッチア, その他 353 (353)

[一般依頼検査]

() 内項目数

細菌部

[行政検査]

1. 感染症にかかわる検査

(1) 溶連菌	296	(296)
(2) 結核菌	5	(7)
(3) 出血性大腸菌	50	(120)
(4) バンコマイシン耐性腸球菌	1	(1)

2. 食中毒等にかかわる検査

(1) サルモネラ	70	(140)
(2) 病原大腸菌	28	(28)
(3) 黄色ブドウ球菌	14	(17)
(4) 腸炎ビブリオ	4	(8)
(5) その他	1	(1)

3. 血清学的検査 129 (129)

(ジフテリア流行予測)

4. 食品検査

(1) 収去検査	54	(54)
(2) 集団発生原因食調査	17	(20)

5. 水質検査

(1) 海水	238	(347)
(2) 河川水	10	(30)
(3) 飲料水	42	(86)
(4) 水道水源水	74	(194)
(5) 下水	31	(62)

[一般依頼検査]

1. 食品検査 6 (12)

2. 水質検査

(1) 風呂水	1	(1)
(2) 消毒処理水	26	(26)

3. 医薬品検査 16 (40)

() 内項目数

化 学 部

[行政検査]

1. 食品にかかわる検査

(1) 食品成分および添加物	133	(629)
(2) 残留農薬	54	(1,396)
(3) 重金属類	40	(50)
(4) 食品容器	2	(8)
(5) 有害物質等	1	(3)

2. 家庭用品検査

(1) メチルアルコール	5	(5)
(2) テトラクロロエチレン およびトリクロロエチレン	5	(10)
(3) デイルドリン	5	(5)

3. 水質検査

(1) 水質基準項目	141	(705)
(2) 監視項目	34	(527)
(3) ゴルフ場使用農薬	22	(344)

4. 温泉分析

14 (140)

[一般依頼検査]

1. 食品にかかわる検査

(1) 食品成分および添加物	3	(3)
(2) 有害物質等	2	(122)

2. 水質検査

(1) 水質基準項目	110	(2,527)
(2) ゴルフ場使用農薬	24	(388)

3. 温泉分析

(1) 中 分 析	6	(180)
(2) 小 分 析	1	(17)

環 境 保 健 部

[行政検査]

1. カドミウムにかかわる検査

(1) 神通川流域住民健康調査

1次検診 尿検査 958 (1,916)

精密検診 尿, 血液検査 125 (1,875)

(2) イタイイタイ病要観察者の管理検診

尿, 血液検査 2 (33)

(3) イタイイタイ病患者認定申請に基づく検査

尿, 血液検査 3 (51)

[一般依頼検査]

(8) 講 師 派 遣

主 題	講 師	会 合 名	年 月 日	場 所
微 生 物 学	石 倉 康 宏	総 合 衛 生 学 院 第 一 看 護 学 科	平11. 4～7 週1回	総合衛生学院
生 化 学	品 川 保 弘	厚生連高岡看護専門学校	平11. 4～9 週1回	厚生連高岡 看護専門学校
ダイオキシンの健康影 響についてー「環境ホ ルモン」を考えるー	新 村 哲 夫	新湊ロータリークラブ	平11. 5. 10	第一イン新湊
環 境 保 健 医 学	西 野 治 身	富山医科薬科大学 医 学 部 保 健 医 学	平11. 5. 28	富山医科薬科大学
食 品 衛 生	山 本 敦	金沢大学 教養的科目 「自然と環境問題」	平11. 5. 28	金 沢 大 学 総合教育棟
微 生 物 学	安 藤 秀 二	富山市医師会看護専門 学 校 准 看 護 科	平11. 6～9 週1回	富山市医師会 看護専門学校
衛 生 昆 虫 学	渡 辺 護	富山医科薬科大学 医 学 部	平11. 6. 8	富山医科薬科大学
外 来 性 ウ イ ル ス	北 村 敬	東京大学医科学研究所 熱 帯 病 学 コ ー ス	平11. 6. 17	東京大学医科学 研究所 (東京都)
富 山 県 に お け る 感 染 症 の 動 向	刑 部 陽 宅	富 山 県 栄 養 士 会	平11. 6. 29	サンフォルテホール
Variola virus stocks as a national security issue	北 村 敬	日米医学協力計画 合 同 委 員 会	平11. 7. 2	National Intitu- tes of Health, USA (ベセスダ)
イタイイタイ病 (カドミウ ム汚染) 調査からダイオキ シン・環境ホルモンを考える	新 村 哲 夫	旭 川 大 学 「旭川しんさん特別講座」	平11. 7. 6	旭 川 大 学
衛 生 害 虫 の 駆 除 駆除作業の安全対策	渡 辺 護	ビル管理技術者講習会	平11. 7. 23	県 民 会 館

主 題	講 師	会 合 名	年 月 日	場 所
微 生 物 学	石 倉 康 宏	高岡市立看護専門学校 第 一 看 護 学 科	平11.9～平12.3 週1回	高 岡 市 立 看護専門学校
骨粗鬆症予防のための 生 活 と 環 境	西 野 治 身	第66回富山医科薬科大学 社会医学セミナー	平11. 9. 3	富山医科薬科大学
感 染 予 防 医 学 (細菌性下痢症)	刑 部 陽 宅	富山医科薬科大学 医 学 部	平11. 9. 7	富山医科薬科大学
昆 虫 と は 昆虫のからだと変態	渡 辺 護	きらめきエンジニア事業	平11. 9. 21	富山市立古沢 小学校3年生
成長期の血液, 尿検査 成績と将来の生活習慣 病との関連について	田 中 朋 子	きらめきエンジニア事業	平11. 9. 27	大島町立大島 小学校4年生
生 化 学	品 川 保 弘	高岡市立看護専門学校	平11.10～平12.2 週1回	高 岡 市 立 看護専門学校
微 生 物 学	庄 司 俊 雄	厚生連高岡看護専門学校 看 護 学 科	平11.10～平12.2 週1回	厚生連高岡 看護専門学校
昆 虫 と は 昆虫のからだと変態	渡 辺 護	きらめきエンジニア事業	平11. 10. 5	新湊市立放生津 小学校3年生
昆 虫 と は 昆虫のからだと変態	渡 辺 護	きらめきエンジニア事業	平11. 10. 19	黒部市立荻生 小学校3年生
成長期の血液, 尿検査 成績と将来の生活習慣 病との関連について	田 中 朋 子	きらめきエンジニア事業	平11. 10. 19	黒部市立荻生 小学校5～6年生
成長期の血液, 尿検査 成績と将来の生活習慣 病との関連について	田 中 朋 子	きらめきエンジニア事業	平11. 10. 27	高岡市立太田 小学校4～6年生
HIV 感 染 症 研 究 最 近 の 話 題	北 村 敬	日本臨床衛生検査技師会 微生物検査研修会	平11. 10. 31	呉羽ハイツ (富 山 市)
ウイルスの特性について	安 藤 秀 二	富 山 県 消 防 学 校 救急科救急標準課程	平11. 11. 11	富 山 県 消 防 学 校

主 題	講 師	会 合 名	年 月 日	場 所
バイオセーフティの原理	北 村 敬	バイオセーフティ技術 主任管理者講習会	平11. 11. 16	サンプラザ中野 (東京都)
新興・再興感染症と 防疫体制	北 村 敬	金沢医科大学 基礎臨床総合講義	平11. 11. 25	金沢医科大学 医学部(石川県)
ウイルス疾患の制圧と 根絶	北 村 敬	富山医科薬科大学 ウイルス学特別講義	平11. 12. 16	富山医科薬科大学 医学部(富山市)
ヒトレトロウイルス疾患	北 村 敬	富山医科薬科大学 ウイルス学特別講義	平11. 12. 16	富山医科薬科大学 医学部(富山市)
AIDS and HIV Infections	北 村 敬	JICA Clinical Laboratory Technology Course	平11. 12. 20	JICA 東京 研修センター (東京都)
エイズの医学的本質と 予防・治療の進歩	北 村 敬	富山県国際健康プラザ 特別講演会	平11. 12. 23	富山県国際 健康プラザ (富山市)
ダイオキシンの健康影 響についてー環境ホル モン問題の現状ー	新 村 哲 夫	富山医科薬科大学 看護学科	平12. 1. 31	富山医科薬科大学
シラミの駆除について	渡 辺 護	管内保健婦研修会	平12. 2. 22	小杉町保健 センター

(9) 研 修 指 導

対象者および所属	研 修 期 間	研 修 内 容	担 当
北京医科大学 賈 光	平11. 4. 1 ～ 4. 22	染色体異常およびDNA損傷の技術 修得	がん研究部
富山市保健所 橋 本 妙 子	平11. 4. 19 平12. 1. 21	コリンエステラーゼ阻害剤の分析 魚介類中の有機スズ化合物のGCによる分析	化 学 部
石川県保健環境センター 黒 崎 直 子	平11. 4. 19 ～ 4. 23	パルスフィールド電気泳動法の検査 手法について	細 菌 部
食品研究所 船 津 保 浩	平11. 4. 27～28 平11. 7. 6～8	HPLCによる食品中の不揮発性腐敗ア ミンの分析 食品中の砒素及び総水銀の分析	化 学 部
県及び富山市保健所 理化学検査担当 9 名	平11. 5. 14	毒物迅速検査法について	化 学 部
県及び富山市保健所, 食肉 検査所, 消費生活センター 理化学検査担当 6 名	平11. 5. 28	農産物中の農薬分析のための前処理法 ゲル浸透クロマトグラフィーについて	化 学 部
ファーマパック(株) 浅井敏正, 野上 恵	平11. 6. 1～10	細菌学の基礎と無菌試験の実際	細 菌 部
県及び富山市保健所, 食肉検査所 理化学検査担当 6 名	平11. 6. 9～11	HPLCによる合成色素の分析	化 学 部
新川保健所 大江 勇 中部保健所 平井重成 高岡保健所 岡田 滋 砺波保健所 矢野幸雄	平11. 6. 10	イオンクロマトグラフの維持管理	化 学 部
食品研究所 加 藤 一 郎	平11. 6. 24	GC/MSによる臭気成分の分析	化 学 部
富山医科薬科大学医学部 柄戸美智代, 渡辺珠代	平11. 8. 2～6	細菌検査における遺伝子診断法及び 食中毒の疫学調査	細 菌 部
滑川高校, 教諭 及び生徒 4 名	平11. 8. 26	食品及び水質の理化学検査	化 学 部

対象者および所属	研 修 期 間	研 修 内 容	担 当
星薬科大学院生 秋 葉 奈 美	平11. 9. 27 ～10. 1	偏光吸光度検出法の原理と応用技術	化 学 部
高岡保健所 竹田亨代, 中山恵理子	平12. 1. 6	HPLCによる食品中のヒスタミンの分析	化 学 部
佐賀県衛生研究所 諸 石 早 苗	平12. 3. 6 ～ 3. 10	<i>emm</i> 遺伝子塩基配列によるA型溶 レ ン菌の型別方法修得	細 菌 部

(10) 研 修 受 講

受講者氏名	研修期間	研修内容	研修機関	講師所属氏名
安藤 秀二	平11. 4. 20	バイオセフティー講習会	国立感染症研究所	国立感染症研究所 バイオセフティー 管理室長 杉山 和良他
林 美貴子	平11. 6. 18 ～20	コメットアッセイワー クショップ	日本環境変異原学 会, MMS研究会	国立食品医薬品衛生 研究所 林 真他
安藤 秀二 松浦久美子	平11. 7. 8 ～9	衛生微生物技術協議会 第20回研究会	名古屋国際会議場	国立感染症研究所 所長 竹田 美文他
本田 幸子 林 美貴子	平11. 9. 18 ～9	臨床細胞遺伝学セミナー	日本人類遺伝学会	東京医科歯科大学 池内 達郎 他
松浦久美子	平11. 12. 1	インフルエンザ対策事 業説明会及び講演会	国立感染症研究所	国立感染症研究所 所長 竹田美文他
安藤 秀二	平11. 12. 1	検査情報システムの システム機能改善に 伴う講習会	国立公衆衛生院	国立感染症研究所 感染症情報センター 所長 井上 栄他
田中 大祐	平12. 1. 13 ～14	レジオネラの診断に関 わる検査技術研修会	福井県衛生研究所	国立感染症研究所 細菌部 倉 文明他
安藤 秀二 磯部 順子	平12. 3. 7 ～8	稀少感染症診断技術講習会	国立感染症研究所	国立感染症研究所 ウイルス第一部長 倉根一郎, 細菌部 長 渡邊治雄他

(11) 客員研究員等招へい

客員研究員招へい事業

客員研究員氏名	所 属 職 名	招 へ い 期 間	指 導 内 容
中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室 教授	平11. 8. 9 ～ 8. 10	「内分泌攪乱化学物質問題の概要と取り組み」及び地方衛研での取り組みの現状と今後の展望並びに平成10年度厚生科学研究の報告書についての解説
吉田 真一	九州大学医学部 細菌学教室教授	平11. 10. 28 ～10. 29	出血性大腸菌の感染と病理（腎症・脳症）について レジオネラ菌感染症について
喜田 宏	北海道大学大学院 獣医学研究科動物疾病 制御学講座教授	平11. 11. 18 ～11. 19	「インフルエンザ流行の仕組みと対策」講演およびインフルエンザウイルスの解析と新型ウイルスの検査体制確立の技術指導
嵯峨井 勝	青森県立保健大学 保健科学部 教授	平11. 11. 29	有害物質及び内分泌攪乱化学物質の生体影響についての研究指導

(12) セミナーの開催

衛生研究所，薬事研究所，環境科学センター 3 研究機関合同セミナー

演 題	講 師 氏 名	所 属 職 名	年 月 日
内分泌攪乱化学物質問題の概要と取り組み	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室 教授	平11. 8. 9
出血性大腸菌－感染から発病まで－ 特に腎症・脳症について	吉田 真一	九州大学医学部 細菌学教室 教授	平11. 10. 28
インフルエンザ流行の仕組みと対策	喜田 宏	北海道大学大学院 獣医学研究科動物疾病 制御学講座 教授	平11. 11. 18
ディーゼル排気微粒子の健康影響 －気管支ぜんそく，肺がん，環境ホルモン作用－	嵯峨井 勝	青森県立保健大学 保健科学部 教授	平11. 11. 29

2. 調 査 研 究 報 告

先天性代謝異常等マススクリーニングの 成果について

(平成11年度の検査成績)

九 曜 雅 子 米 田 豊 堀 み つ 子 大 江 浩
 北 村 敬 竹 邦 子¹

A Survey Report on Neonatal Mass Screening
for Inborn Errors of Metabolism,
Congenital Hypothyroidism and
Congenital Adrenal Hyperplasia
in Toyama Prefecture
(April 1999 ~ March 2000)

Masako KUYO, Yutaka YONEDA, Mitsuko HORI, Hiroshi OE
Takashi KITAMURA and Kuniko TAKE¹

要 旨 平成11年度の検体総数は 11,592 件で、スクリーニングの結果、クレチン症 9 名の患者が発見された。これで、スクリーニング開始当初から現在までの患者数は、代謝異常症が23年間で45名、クレチン症が20年間で71名、副腎過形成症が11年間で11名となった。それぞれの疾病の発見率を全国平均と比較した結果、クレチン症の発見率が有意 ($p<0.05$) に高かった。

なお、平成11年9月からアミノ酸代謝異常症3項目のスクリーニングに高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) を導入し、検査の迅速化をはかった。

先天性代謝異常マススクリーニングは、昭和52年4月に厚生省母子保健事業の一環として導入され、都道府県および政令市が主体となり、代謝異常症の早期発見、早期治療により心身の障害を未然に防止するという目的で実施されている。検査料は、厚生省と地方自治体の公費負担である。

富山県においては、昭和52年10月より富山県先天性代謝異常等検査事業実施要綱に基づき、フェニルケトン尿症等5疾病についてマススクリーニングを開始した。その後、昭和55年4月に先天性甲状腺機

能低下症(クレチン症)、平成元年4月に先天性副腎過形成症の検査が追加された。また厚生省の通知[1]を受けてヒスチジン血症のスクリーニングを平成5年度で取り止めており、現在は6疾病についてマススクリーニングを実施している。

実 施 方 法

1. 対象疾病

フェニルケトン尿症, ホモシスチン尿症, メイプルシロップ尿症, ガラクトース血症, 先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症), 先天性副腎過形成症の6疾病を対象とした。

2. 対象者

県内で出生した新生児のうち, 保護者がこの検査を希望した者を対象とした。

3. 検査期間

本報では, 平成11年4月より, 平成12年3月までの検査実施状況をまとめた。

4. スクリーニング方法

(1) 検査検体

県内の各医療機関において採血された濾紙血液を用いた。

(2) 検査方法

①アミノ酸代謝異常症

1) 平成11年4月～8月

フェニルケトン尿症, メイプルシロップ尿症およびホモシスチン尿症について, Microplate・酵素法 (カイロン社製キット「PKU-R」「MSUD-R」「HCU-F」使用) により, 濾紙血中のフェニルアラニン, 分岐鎖アミノ酸 (BCA), メチオニン関連物質を測定した[2]。

2) 平成11年9月～平成12年3月

カラムスイッチングHPLC[3]により, 濾紙血中のフェニルアラニン, ロイシン, メチオニンを測定した。

<検体の前処理>

96穴U底マイクロプレートの各セルに, 血液濾紙 (直径1/8 inch) を1枚ずつ切り出し, エタノール-アセトン-水 (7:7:2) を10 μ L滴下し, 10分間放置する。内部標準物質としたL-Norleucineを5 μ mol/L含有する移動相B液100 μ Lを各セルに加え, 10分間超音波抽出を行う。これをそのままオートインジェクターにセットする。

<HPLC条件>

装置: 日本分光製GULLIVER 1500 series

カラム: Develosil ODS-UG-5

4.6mm i.d.×100mm

前処理カラム: Develosil ODS-UG-5

4.0mm i.d.×10mm

カラム温度: 40℃

移動相: A液; アセトニトリル-B液 (40:60)

B液; 5mMペンタンスルホン酸含有25mM

過塩素酸ナトリウム溶液 (pH2.2)

移動相流速: 1.25ml/min

蛍光検出波長: Ex 340nm, Em 450nm

OPA反応液流速: 0.3ml/min

前処理カラム洗浄液流速: 0.3ml/min

注入量: 10 μ L

分析時間: 11分

②ガラクトース血症

Microplate・酵素法 (カイロン社製キット「GAL-R」使用) により, 濾紙血中のガラクトースを測定した[2]。さらに, 全検体についてBeutler法を併用した[4,5]。

③先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症)

ELISA (栄研化学社製キット「クレチンTSH ELISA II」使用) により TSH (Thyroid stimulating hormone) 値の測定を行った[2]。

④先天性副腎過形成症

ELISA (栄研化学社製キット「17-OHP D-ELISA II」-7位抗体-使用) により 17- α -OHP (17- α -hydroxy progesterone) 値の測定を行った[2]。

(3) 検体のサンプリング

Guthrie法等で使用していたPUNCH INDEXER MODEL VIIA (ファンダメンタル社) を応用[2]し, 検体をサンプリングした。

(4) 判定基準

表1に示した。アミノ酸代謝異常症について

平成12年10月1日

表1. 判定基準

対象疾病	検査法	測定物質	判定基準値	
			疑陽性	緊急に精密検査を要する
フェニルケトン尿症*	Microplate 酵素法 HPLC	Phenylalanine Phenylalanine	≥ 1.9 mg/dl ≥ 2.0 mg/dl	
ホモシスチン尿症*	Microplate 酵素法 HPLC	Methionine Methionine	≥ 1.9 mg/dl ≥ 1.0 mg/dl	
メイプルシロップ尿症*	Microplate 酵素法 HPLC	Leucine, Isoleucine, Valine Leucine	≥ 8.0 mg/dl ≥ 3.0 mg/dl	≥ 16.0 mg/dl ≥ 7.0 mg/dl
ガラクトース血症	Microplate 酵素法	Galactose (Gal)	≥ 3.0 mg/dl	Gal 3.0 mg/dl以上で
	ポイトラー法	Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase	蛍光のない場合	ポイトラー法で蛍光のない場合
先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症)	ELISA	Thyroid-Stimulating Hormone(TSH)	≥ 8 μ U/ml	≥ 30 μ U/ml
先天性副腎過形成症	ELISA	17- α -hydroxy progesterone(17- α -OHP)	直接法 ≥ 10 ng/ml	直接法 10 ng/ml 以上で 何らかの症状がある場合
			抽出法 ≥ 3 ng/ml	抽出法 ≥ 10 ng/ml

*フェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メイプルシロップ尿症については、平成11年4月から8月まではMicroplate 酵素法、9月以降は HPLCで検査を実施。測定物質、判定基準値はMicroplate 酵素法が上段、HPLCが下段に対応。

表2. 先天性代謝異常等検査実施状況

区 分 期 間	受付総数 (件)	検査 実人員数 (人)	出生数 (人)	受検率 (%)	疑陽性数 (人)			要精検数 (人)		
					代 謝 異常症	クレチン症	副 腎 過形成症	代 謝 異常症	クレチン症	副 腎 過形成症
昭和52年度 ～54年度	29,229	28,450	39,688	71.7	262	—	—	6(4)	—	—
昭和55年度 ～63年度	122,841	115,435	116,956	98.7	1,811	841	—	75(32)	130(25)	—
平成元年度	11,633	10,859	10,802	100.5	228	129	84	12(4)	29(2)	14(1)
平成2年度	11,356	10,594	10,122	104.7	187	190	71	5(1)	35(4)	16(1)
平成3年度	11,546	10,780	10,613	101.6	172	219	58	14(3)	26(4)	20(3)
平成4年度	11,311	10,577	9,840	107.5	183	141	80	7(0)	26(6)	22(1)
平成5年度	11,194	10,485	9,723	107.8	142	124	68	6(0)	28(6)	14(0)
平成6年度	11,916	11,103	10,373	107.0	218	155	79	9(0)	30(2)	21(1)
平成7年度	11,502	10,718	9,945	107.8	171	218	95	3(0)	37(3)	20(0)
平成8年度	11,857	11,001	10,270	107.1	262	145	100	4(0)	28(3)	18(1)
平成9年度	11,746	10,907	10,235	106.6	274	142	128	24(0)	25(1)	12(2)
平成10年度	11,639	10,918	10,126	107.8	172	127	83	28(1)	20(6)	14(1)
平成11年度	11,592	11,011	10,173	108.2	51	101	84	4(0)	16(9)	11(0)
計	279,362	262,838	268,866	—	4,133*	2,532	930	197*(45*)	430(71)	182(11)

() は 患者数
*昭和52年度～平成5年度分のヒスチジン血症の数(疑陽性137人、要精検39人、患者33人)を含む

は、Microplate・酵素法とHPLCの判定基準を並記した。

この判定基準に従い、疑陽性と判定した検体は再採血を依頼し、再検査を行った。再検査でも疑陽性となった場合は、直ちに精密検査機関を受診するよう主治医に報告した。緊急に精密検査を要する場合は、初回検査でも、直ちに主治医に連絡し、小児科受診を勧奨した。

(5) データ処理

検査検体の受付事務処理、検査結果の報告、集計およびデータ管理は、当所で開発したデータ管理システム[2,6,7]を用いた。

結 果

1. 検査実施状況

今年度の受付総数は、11,592件で、県内63か所の医療機関（おもに産婦人科医院）より送付されてきたものである。

表2および表3に年度別、月別検査実施状況を示した。

今年度の出生数は、10,173人であり、受検率は108.2%となった。100%を越えているのは、里帰り分娩が増加したためで、県内の新生児のほとんどが、この検査を受けているものと思われる。

また、再採血検体数は581件で、受付検査総数の5.0%にあたり、そのうち224件（38.6%）が疑陽性になったための再採血検体であった。

一方、再採血を依頼した理由とそれぞれの検体

数を表4に示した。疑陽性のためは234件であった。これらのうち、回収できなかったのは、16件（死亡1件、里帰り出産のため居住地の病院で再検査2件を含む）で回収率は93.2%であった。

疑陽性のため以外で再採血を依頼した86件のうち、検体不良のためが25件であった。25件の内訳は、採血後日数が経ちすぎているものが16件、血液不足が4件、採血が4日未満が5件であった。これらは、直ちに再採血を依頼した。また哺乳状態が不良の61件については哺乳状態が良くなってから再採血を依頼した。これら疑陽性のため以外で再採血を依頼した検体のうち、回収できなかったのは2件で、97.7%の回収率となった。

低出生体重児（2,000g以下）の場合には、哺乳が不十分であったり機能が未熟であったりするもので、2,500gに達した時か1か月時のうち、いずれか早い時期に再採血を依頼し、2度検査を行っている。今年度は169人（1.5%）に再採血を依頼したが、そのうち22人は哺乳不良であった。

再採血を依頼しても1か月以上検体が送られてこない場合は再依頼しているが、疑陽性で再採血を依頼した場合に回収率が悪かった。前述のように、疑陽性で再採血依頼し回収できなかった症例のうち、その理由が明らかな3例以外の13例はすべてNICUからの検体であり、これらの症例も病院で追跡されていると思われる。

採血は、生後4～6日目（生まれた日を0と数える）に行うことになっているが、4日未満に行われたものが5件（0.04%）で、これらはすべて生

表3. 月別検査実施状況

年月	平成11年									平成12年			計
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
受付検体総数（件）	964	922	1,030	978	1,052	965	925	940	821	1,097	915	983	11,592
内 初回検査数（件）	904	874	971	929	1,007	929	875	895	786	1,038	867	936	11,011
再採血総数（件）	60	48	59	49	45	36	50	45	35	59	48	47	581
再 2回目	58	45	58	46	43	36	46	45	31	53	45	46	552
3回目	1	3	1	3	2	0	4	0	3	5	2	1	25
4回以上	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	4
出生数（人）	884	856	823	862	893	886	818	815	886	817	772	861	10,173

表4. 再採血依頼の理由

疑陽性のため	234 件		
疑陽性以外	86 件		
内 訳	検体不良	25	
	内 訳	検体が古い	16
		血液不足	4
		4日未満の採血	5
	哺乳不良	61	

後3日目の採血であった。

採血日から受付までの日数は、ほとんどが7日以内であるが、25件が8日以上（最長25日）かかっていた。これらのほとんどは、5月と1月受付分であり、ゴールデンウィークの連休や年末年始の休み期間の影響と考えられた。このような長期の休みとなる場合には、採血医療機関に対し、事前に文書で検体の取り扱いの指導を通知しており、これらの検体は、休み期間中冷蔵保存されていたと思われる。25日かかった検体は、冷蔵庫の中で保管されたまま送付し忘れたもので、毎回送付せずに数件まとめて送付している機関の検体であった。

2. 検査結果

検査成績について、表2には年度別、表5には月別の疑陽性および要精密検査数を示した。今年度の疑陽性人数は、代謝異常症が51人（0.5%）、クレチン症が101人（0.9%）、先天性副腎過形成症が84人（0.8%）であり、そのうち、それぞれ4人、16人、11人に精密検査の必要が認められた。

表6には、要精密検査者の検査状況と結果をま

とめて示した。

患者と診断されたのは、クレチン症の症例1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 13の9人であった。

(1) 代謝異常症

ホモシスチン尿症の疑いで1人、ガラクトース血症の疑いで3人が要精密検査となった。ガラクトース血症の症例2は門脈-大循環シャントの疑い、症例3は乳児肝炎の疑いと診断された。

(2) クレチン症

診断名のついた例について、検査の結果および経過を示す。

<症例1>日令4日の採血時ですでにTSH 88 μ U/ml以上であり、即要精密検査となった。小児科初診は日令7日で、検査の結果TSH 227.2 μ U/ml, FT₄ 0.6ng/dl, FT₃ 2.6pg/mlで患者と診断された。

<症例3>日令5日の初回検査でTSH 30 μ U/ml以上であり、即要精密検査となった。小児科受診は日令10日で、検体が当所に送付され、検査の結果TSH値は8.4 μ U/mlと低下していた。小児科でしばらく経過観察されていたが、確認のため日令24日に再々検査を行ったところ、TSHは18.3 μ U/mlと高くなっており、その後の検査の結果でもTSH 40 μ U/ml以上、大腿骨頭出現なしで患者と診断され治療が開始された。なお、日令10日の検体を再確認したが、TSH値は7.8 μ U/mlと低かった。

<症例4>日令17日の再検査でTSH値が約80 μ U/mlと上昇しており、要精密検査となった。日令24日に小児科受診し、検査の結果TSH 116.9 μ U/ml, FT₄ 0.6ng/dl, FT₃ 2.8pg/mlでクレ

表5 月別疑陽性件数および要精密検査数

対象疾病	年月	平成 11 年								平成 12 年			計	再採血率 (%)	
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2			3
フェニルケトン尿症		1	0	3	0	0	0	0	0	1	2	0	0	7	0.06
ホモシスチン尿症		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1(1)	4(1)	0.04
メイプルシロップ尿症		0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	6	0.05
ガラクトース血症		2	1(1)	1	2	1	4	2	3	5(1)	6	2(1)	5	34(3)	0.31
クレチン症		8(4)	9	10(1)	8	16(1)	4(2)	6	9(3)	6	11(1)	6(2)	8(2)	101(16)	0.92
副腎過形成症		8(1)	8	8(3)	8	7(1)	9(1)	6	5	12	2(1)	6(2)	5(2)	84(11)	0.76
計		20(5)	20(1)	22(4)	18	24(2)	17(3)	15	18(3)	24(1)	23(2)	15(5)	20(5)	236(31)	2.14

() は 要精密検査数

表6. 要精検患者の検査状況と結果

疾病名	症例	患者	性別	生年月日	採血日	日令	検査成績	診断名等
モキシチン尿症	1		男	H12.2.25	3.1	5	Met 1.1 mg/dl 1.07	異常なし
					3.30	34	Met 1.27 mg/dl 1.36 1.34	
ガラクトース血症	1		女	H11.4.21	4.26	5	Gal 0.58 mg/dl ボイトラー正常	異常なし
					5.5	14	Gal 4.39 mg/dl ボイトラー正常 5.33	
					5.18	27	Gal 5.04 mg/dl ボイトラー正常 4.92	
	2		女	H11.11.14	11.19	5	Gal 3.6 mg/dl ボイトラー正常 4.725	門脈-大循環シャント(疑)
					11.29	15	Gal 7.89 mg/dl ボイトラー正常 8.44	
	3		女	H12.2.2	2.7	5	Gal 4.10 mg/dl ボイトラー正常 3.60	乳児肝炎(疑)
					2.17	15	Gal 17.3 mg/dl ボイトラー正常 17.9	
クレチン症	1	*	男	H11.4.2	4.6	4	TSH 88 μ U/ml以上 88 μ U/ml以上	クレチン症
	2		女	H11.3.30	4.4	5	TSH 10.6 μ U/ml 11.15	一過性高TSH血症
					4.8	9	TSH 14.1 μ U/ml 13.0 14.3	
	3	*	女	H11.4.6	4.11	5	TSH 35.1 μ U/ml 33.5	クレチン症(疑)
	4	*	女	H11.3.25	3.30	5	TSH 15.7 μ U/ml 19.1	クレチン症
					4.12	18	TSH 79.8 μ U/ml 81.5 76.55	
	5	*	女	H11.5.29	6.3	5	TSH 96 μ U/ml以上 96 μ U/ml以上	クレチン症(異所性甲状腺腫)
	6		女	H11.8.19	8.23	4	TSH 34.1 μ U/ml 33.85	一過性甲状腺機能低下症(母:甲状腺機能亢進症のため抗甲状腺剤服用)
	7		男	H11.7.26	8.9	14	TSH 9.05 μ U/ml 8.65 7.7	
					9.21	57	TSH 9.3 μ U/ml 9.4 10.6	
	8	*	女	H11.8.19	8.24	5	TSH 1.0 μ U/ml 17-OHP 8.5 ng/ml 抽出法	クレチン症
					9.27	39	TSH 43.6 μ U/ml 17-OHP 1.2 ng/ml 39.2 抽出法	
	9	*	男	H11.10.29	11.3	5	TSH 10 μ U/ml 9.85	クレチン症
					11.11	13	TSH 15.1 μ U/ml 17.7 17.9	

平成12年10月1日

表6. つづき

疾病名	症例	患者性別	生年月日	採血日	日令	検査成績	診断名等
クレチン症	10	*	女	H11.10.25	10.31 6	TSH 11.8 μ U/ml 11.65	クレチン症
					11.15 21	TSH 23.6 μ U/ml 26.6 26.8	
	11	*	男	H11.11.18	11.23 5	TSH 88 μ U/ml以上 88 μ U/ml以上	クレチン症
	12		男	H11.11.27	12.24 27	TSH 7.1 μ U/ml 8.2	異常なし
					1.7 41	TSH 8.8 μ U/ml 8.8	
	13	*	男	H12.1.21	1.26 5	TSH 18.7 μ U/ml 18.6	クレチン症
					2.7 17	TSH 21.5 μ U/ml 20.1	
	14		男	H12.2.3	2.9 6	TSH 3.9 μ U/ml 17-OHP 16.0 ng/ml 5.2 直接法 16.5 抽出法 0.65ng/ml	一過性高TSH血症 (疑)
					2.21 18	TSH 31.3 μ U/ml 17-OHP 19.0 ng/ml 35.1 直接法 17.8 抽出法 6.10ng/ml	
	15		男	H12.2.21	2.26 5	TSH 11.4 μ U/ml 11.8	一過性高TSH血症 (疑)
					3.1 9	TSH 13.3 μ U/ml 12.6	
先天性副腎過形成症	1	男	H11.4.6	4.12	6	17-OHP110ng/ml以上 17-OHP68.85ng/ml 直接法 抽出法	在胎週数 28.1 週 生下時体重 622 g
					7	17-OHP 80.1 ng/ml 17-OHP63.95ng/ml 直接法 93.85 抽出法	
	3	女	H11.5.21	6.3	13	17-OHP 33.9 ng/ml 17-OHP 5.00ng/ml 直接法 30.8 抽出法	在胎週数 28 週 生下時体重 1110 g
					31	17-OHP 23.8 ng/ml 17-OHP 5.65ng/ml 直接法 25.65 抽出法 22.80	
	4	女	H11.5.21	6.3	13	17-OHP 10.9 ng/ml 17-OHP 5.80ng/ml 直接法 9.45 抽出法	在胎週数 28 週 生下時体重 978 g
					31	17-OHP 78.9 ng/ml 17-OHP10.60ng/ml 直接法 73.05 抽出法	
	5	男	H11.8.5	8.10	5	17-OHP 55.9 ng/ml 17-OHP35.6 ng/ml 直接法 53.95 抽出法	異常なし 在胎週数 25.2 週 生下時体重 688 g
	6	女	H11.9.13	9.20	7	17-OHP 12.6 ng/ml 17-OHP 4.2 ng/ml 直接法 11.1 抽出法	異常なし 在胎週数 30 週 生下時体重 1150 g
					11	17-OHP 21.2 ng/ml 17-OHP 3.1 ng/ml 直接法 21.9 抽出法 23.55	

表6. つづき

疾病名	症例	患者性別	生年月日	採血日	日令	検査成績	診断名等
先天性副腎過形成症	7	女	H11.12.7	12.13	6	17-OHP 29.9 ng/ml 17-OHP 15.8 ng/ml 直接法 29.9 抽出法	異常なし 在胎週数 27.4 週 生下時体重 880 g
				1.4	28	17-OHP 12.2 ng/ml 17-OHP 6.4 ng/ml 直接法 12.2 抽出法	
	8	女	H12.1.31	2.7	7	17-OHP 7.4 ng/ml 17-OHP 3.2 ng/ml 直接法 6.65 抽出法	異常なし 在胎週数 34.5 週 生下時体重 1892 g
				2.14	14	17-OHP 8.0 ng/ml 17-OHP 3.6 ng/ml 直接法 9.1 抽出法	
	9	女	H12.2.19	2.24	5	17-OHP 27.2 ng/ml 17-OHP 12.2 ng/ml 直接法 22.1 抽出法	異常なし 在胎週数 27 週 生下時体重 862 g
	10	男	H12.1.27	2.4	8	17-OHP 6.9 ng/ml 17-OHP 2.7 ng/ml 直接法 6.0 抽出法	在胎週数 30.2 週 生下時体重 1480 g
				3.2	35	17-OHP 35.7 ng/ml 17-OHP 6.1 ng/ml 直接法 30.7 抽出法	
	11	女	H12.3.21	3.27	6	17-OHP 62.0 ng/ml 17-OHP 12.9 ng/ml 直接法 51.5 抽出法	在胎週数 24 週 生下時体重 616 g

チン症と診断された。

<症例5>日令5日の採血でTSH $96\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上のため即精密検査となった。小児科受診は日令16日で、TSH $417\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT₄ $0.4\text{ng}/\text{dl}$ 、FT₃ $2.2\text{pg}/\text{ml}$ で異所性甲状腺腫性のクレチン症と診断された。

<症例6>日令4日の検査の結果、TSH $30\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上で即要精密検査となった。日令8日に小児科を受診し、検査の結果はTSH $6.6\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT₄ $2.3\text{ng}/\text{dl}$ 、FT₃ $6.1\text{pg}/\text{ml}$ で一過性甲状腺機能低下症と診断されたが、母親が甲状腺機能亢進症のため抗甲状腺剤を服用しており、今後亢進症の症状が出てこないか経過観察するとのことであった。

<症例8>日令5日の検査ではTSH値が $1.0\mu\text{U}/\text{ml}$ で正常であったが、低体重児のため日令39日に再検査を行ったところTSH $30\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上で要精密検査となった。小児科での検査の結果TSH $22.43\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT₄ $0.8\text{ng}/\text{dl}$ 、FT₃ $1.4\text{pg}/\text{ml}$ で、患者と診断された。

<症例9>日令13日の再検査の結果でもTSH値が15.1, 17.7, $17.9\mu\text{U}/\text{ml}$ と低下していないため要精密検査となった。精密検査の結果、クレチン症と診断され、日令28日より治療が開始された。

<症例10>日令21日の再検査で、TSH値が $20\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上に上昇したため、要精密検査となった。

日令28日の検査の結果、TSH $172.5\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT₄ $0.8\text{ng}/\text{dl}$ 、FT₃ $2.4\text{pg}/\text{ml}$ で患者と診断され、治療が開始された。

<症例11>日令5日の初回検査の結果TSH $88\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上で即要精密検査となった。精密検査の結果TSH $941.2\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT₄ $0.08\text{ng}/\text{dl}$ 、FT₃ $1.63\text{pg}/\text{ml}$ で、患者と診断された。甲状腺スキャンにより、正常位置に甲状腺が確認されている。

<症例13>日令17日の再検査でTSH値が $20\mu\text{U}/\text{ml}$ 以上に上昇したため要精密検査となった。精密検査の結果、日令24日でTSH $37.3\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT₄ $0.6\text{ng}/\text{dl}$ 、FT₃ $4.7\text{pg}/\text{ml}$ で患者と診断された。

<症例15>日令9日の再検査の結果でもTSH値が13.3, $12.6\mu\text{U}/\text{ml}$ と低下していないため、要精密検査となった。精密検査の結果、TSH $22.0\mu\text{U}/\text{ml}$ 、FT₄ $1.47\text{ng}/\text{dl}$ 、FT₃ $3.17\text{pg}/\text{ml}$ で一過性高TSH血症疑いと診断されたが、黄疸、体重増加不良でクレチン症も疑われるため日令14日より治療が開始された。

(3) 副腎過形成症

要精検となった11人はすべてが2,000g以下の低出生体重児であった。さらにそのうち1,000g以下の極小未熟児は7人であった。

全国および富山県の患者発見状況は表7に示

した。

富山県における現在までの患者発見率は、代謝異常症が1/5,800、クレチン症が1/3,300、副腎過形成症が1/10,800である。全国の患者発見率と比較すると、クレチン症についてはその発見率が有意に高いといえる ($p<0.05$)。

精度管理については、アミノ酸、TSH、17-OHPとも、異常検体は全てカットオフ値以上で拾い上げられており、見逃しはなかった。また、事務処理上の記入もれ、記入間違いもなかった。

考 察

先天性代謝異常等のマススクリーニングが、開始されてから20年以上経過し、多数の患者が早期に発見され、早期に治療開始されており、その功績は多大なものである。この新生児のスクリーニングを実施するうえで重要なのは、より精度の高い検査システムであり、検査技術だけではなく、検査前、検査後の精度管理が必要であると言われている[8, 9]。

検査前については、採血医療機関での採血から検体送付までの精度管理であり、適切な時期に適切な採血を行い速やかに送付するということである。検体の取り違えはあってはならないことであるが、採血の時期が遅かったり、検体送付の遅れは本県でもたまに見られる。低出生体重児の場合に、ある程度の体重に達するのを待って採血されるケースや、検体をまとめて送付しようとするため冷蔵庫に保管したまま出し忘れてしまった例であり、症状のない早期に発見するというマススクリーニング本来の目的に反し、手遅れとなり、取り返しのつかない事態を招きかねない。このようなことのないよう採血医療機関に対しては注意を促す必要がある。

また、スクリーニング検査を正しく行うには、検査技術者が検査や対象となる疾病の病態について詳しい知識を持ち多数の検体の中から疑わしい検体を適切に選び出さなければならない。さらに、スクリーニング全般についての知識経験や地域内での連携のための保健医療体制についての知識も必要なことから、日本マス・スクリーニング学会は、認定技術者制度を導入しており、本県の検査従

表7. マススクリーニングによる全国および富山県の患者発見状況

区 分	富 山 県		全 国	
期 間	平成11年度	昭和52年度～平成11年度	昭和52年度～平成10年度	
受 検 者 数	11,011 人	262,838 人	28,443,394 人	
患者数、発見率 疾病名	患 者 (人)	患 者 (人)	患 者 (人)	発見率
フェニルケトン尿症	0	4	371	1 / 76,700
ホモシスチン尿症	0	0	158	1 / 180,000
ヒスチジン血症	—	33	2,200	1 / 12,900 ¹⁾
メイブルシロップ尿症	0	1	59	1 / 482,100
ガラクトース血症	0	0	802	1 / 35,500
クレチン症	9	71	5,672	1 / 4,400 ²⁾
先天性副腎過形成症	0	11	832	1 / 16,300 ³⁾

1)昭和52年度～平成5年度 受検査数 197,180人
 2)昭和55年度～平成11年度 受検査数 234,388人
 3)平成元年度～平成11年度 受検査数 118,953人
 4)昭和52年度～平成4年度 受検査数21,119,892人
 5)昭和54年度～平成10年度 受検査数25,108,764人
 6)昭和63年度～平成10年度 受検査数13,562,632人

事者は学会の認定技術者となっている。

今年度は途中からではあるが、アミノ酸代謝異常症の検査法にHPLCを導入し、より精度の高い迅速なスクリーニング検査となった。従来法のMicroplate・酵素法(MP法)の場合と再検率を比較すると、アミノ酸代謝異常症3項目でMP法のときは0.50%(平成10年9月~平成11年8月)であったのに対しHPLCでは0.16%(平成11年9月~平成12年3月)と低下した。再採血の割合の目安は、アミノ酸代謝異常症3項目では0.1~0.2%程度[10]であり、HPLC導入後の結果は妥当なものであった。再検率が高いと偽陽性が増加し、家族にとっては大きな負担となる。このように、再採血率を最小限に留めることが可能となったことで、家族に必要以上の不安を与えない検査となった。

検査後の精度管理としては、スクリーニングの結果異常が認められた例に対しての追跡調査がある。当所では精検病院の受診の確認と診断結果の把握までは実施しているが、その後の継続的なフォローアップ体制は十分できていない。特にMaternal PKUの問題を考慮すると、今後さらに行政機関、医療機関、検査機関の連絡を密にし、協議会を設置する等の対策が早急に必要ではないかと考える。

文 献

1. 厚生省児童家庭局長(1992). 児発第 764号.
2. 九曜雅子, 米田 豊, 大江 浩, 北村 敬, 井澤 朋子(1998). 富山衛研年報, 平成9年度, 42-58.
3. 米田 豊, 九曜雅子(2000). 富山衛研年報, 平成11年度, 47 - 59.
4. 本田幸子, 林 美貴子, 村瀬 均, 上村 清, 村井貞子, 松島幸夫(1977). 富山衛研年報, 昭和52年度, 22 - 26.
5. 本田幸子, 林 美貴子, 西田義雄, 林 圭子 (1978). 富山衛研年報, 昭和 53 年度, 122 - 125.
6. 米田 豊, 高橋雅子(1995). 富山衛研年報, 平成 6年度, 58 - 65.
7. 米田 豊(1999). 富山衛研年報, 平成10年度, 54-57.
8. 成瀬 浩(1998). 日本マス・スクリーニング学会誌, Vol.8 Supplement 2, 6 - 10.
9. 黒田泰弘(2000). 先天性代謝異常検査技術者研修会資料, 52 - 59.
10. 市原 侃(1996). 日本マス・スクリーニング学会技術部会第15回研修会資料, 69 - 74.

カラムスイッチングHPLCによる乾燥ろ紙 血液中アミノ酸分析法の基礎検討と応用

米田 豊・九曜 雅子

Basic Study on Analytical Method of Amino Acids by
Column Switching HPLC and it's Application to
Dried Blood Specimens

Yutaka YONEDA, Masako KUYO

要 旨 新生児のアミノ酸代謝異常症マススクリーニングの一次検査に適応可能なHPLC分析法の開発を目的に、ポストカラム誘導体化法の基礎条件の検討をODSカラムを用いて行った。その結果、ステップグラジエントとカラムスイッチングを組合せることにより、良好な分離パターンを有する迅速分析法を確立できた。本法を新生児濾紙血液に適用したところ、Met, Leu及びPheのカットオフ濃度近辺における回収率はそれぞれ81.6, 103.8及び101.8%であり、再現性は相対標準偏差で1.7から4.2%の値が得られた。また、マイクロプレート酵素法との相関も良好であった。現在、本法を一次スクリーニング検査に導入している。

1 緒言

新生児のアミノ酸代謝異常症であるフェニルケトン尿症(PKU)、メープルシロップ尿症(MSUD)およびホモシスチン尿症(HCU)のマススクリーニング検査法として、現在、ガスリー法及びマイクロプレート酵素法(MFL)が用いられている。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の一次検査への利用に関しては、種々の検討[1,2,3]がなされており、著者らも、これまでオルトフタルアルデヒド(OPA)を蛍光ラベル化剤とするオンカラム誘導体化法[4]および6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbonate(AQC)を用いるプレカラム誘導体化法[5]を検討してきた。しかし、前者はカラムの保守に難点があり、後者は蛍光ラベル化反応に加熱操作が必要であるなど、前処理操作にやや煩雑な面があった。また、近年、機器メーカーからODSまたはイオン交換カラムを用いるOPAポストカラム誘導体化法用の分析

キットが発売されている。これらの方法では、1分析終了毎にカラム洗浄を行う必要があり、分析効率の低下要因になっている。そこで、今回、カラムスイッチング法により、分析カラムによる分離と前処理カラムの洗浄を同時に行うことで分析効率を高めることを試み、良好な分離パターンを有する迅速分析法を確立できた。また、本法を新生児検体に適用し、MFLとの比較を行った。

2 実験

2.1 装置

下記の装置で構成される日本分光製 GULLIVER 1500 series HPLCを用いた。

送液ポンプ：PU-1580 4台

低圧グラジエントユニット：LG-1580-02

デガッサー：DG-980-50

オートサンプラー：AS-1550

カラム恒温槽：CO-1560

蛍光検出器 : FP-1520S
6 方バルブ : HV-992-01

2. 2 試薬

オルトフタルアルデヒド (OPA) は和光純薬生化学用, アセトニトリルは同社製高速液体クロマトグラフィー用を用いた. 1-ブタンスルホン酸ナトリウムは東京化成製, 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム及び1-ヘキサンスルホン酸ナトリウムは和光純薬製イオンペアクロマトグラフ用を用いた. 抗生物質の標準品として Ampicillin Sodium (ABPC), Amoxicillin (AMPC), Cefaclor (CCL), Gentamicin Sulfate (GM) 及び Tobramycin Sulfate (TOB) は Sigma 社製を, Cefotaxime (CTX) 及び Amikacin Sulfate (AMK) は和光純薬生化学用を用いた.

また, 次の方法によりアミノ酸標準液, 抽出液及びOPA反応液を調製した.

検量線作成用 $5\mu\text{M}$ アミノ酸標準液 : 2.5mM アミノ酸混合標準液 H 型 (和光純薬製) $50\mu\text{l}$ 及び 2.5mM L-Norleucine (Nle) 含有 0.1N 塩酸溶液 $50\mu\text{l}$ に 5mM ペンタンスルホン酸ナトリウム含有 50mM 過塩素酸ナトリウム ($\text{pH}2.2$) を加え, 全量を 25ml とした.

添加試験用アミノ酸標準液 : Val, Met, Ile, Leu 及び Phe を各々生理食塩水に溶解, Tyr は 0.2N 塩酸に溶解し, それぞれ $1000\text{mg}/\text{dl}$ の添加試験用アミノ酸標準原液を調製した. これらの添加試験用アミノ酸原液のうち Val, Met, Tyr, Ile 及び Phe は各々 1ml , Leu は 2ml を分取し混合後, 0.2N 水酸化ナトリウム溶液 1ml を加え, 更に生理食塩水を加えて全量を 10ml にし, $100\text{mg}/\text{dl}$ (但し Leu は $200\text{mg}/\text{dl}$) の添加試験用アミノ酸標準液を調製した.

内部標準物質含有抽出液 : 2.5mM Nle 含有 0.1N 塩酸溶液 $50\mu\text{l}$ に 5mM ペンタンスルホン酸ナトリウム含有 50mM 過塩素酸ナトリウム ($\text{pH}2.2$) を加え, 全量を 25ml とした.

OPA 反応液は OPA 1g をエタノール 40ml に溶解し, これをホウ酸 12.3g , 水酸化カリウム 12.0g , 2-メルカプトエタノール 2ml ,

25% polyoxyethylene(23)lauril ether 水溶液 2ml に水を加えて全量を 1L にした溶液に加え, 混和後, 使用した.

なお, マイクロプレート酵素法のアミノ酸測定キットはバイエルメディカル社製エンザプレート PKU-R, MSUD-R 及び HCU-F を用いた.

2. 3 実験方法

2. 3. 1 コントロール濾紙の調製

ヘマトクリットを 55% に調整したヒト全血 9.9ml に $100\text{mg}/\text{dl}$ 添加試験用アミノ酸標準液を $100\mu\text{l}$ 加え静かに攪拌した後, 新生児マススクリーニング用採血濾紙に, $50\mu\text{l}$ づつ滴下し, 水平に保って室温で乾燥後, シリカゲルと共にナイロン袋に入れ冷蔵庫に保管した. また, 空試験用としてヘマトクリットを 55% に調製し, アミノ酸を添加しない濾紙血液も, 前記に準じて調製した.

2. 3. 2 試験溶液の調製

96 穴 U 底マイクロプレートの各セルに入れた直径 $1/8$ inch の血液ろ紙 1 枚にエタノール-アセトン-水 ($7:7:2$) を $10\mu\text{l}$ づつ滴下し, 10 分間放置後, 内部標準物質とした Nle を $5\mu\text{M}$ の濃度含有する移動相 B 液 $100\mu\text{l}$ を加え, 10 分間超音波抽出を行い, これをそのまま, オートサンプラーにセットした.

2. 3. 3 HPLC 条件

カラムスイッチング流路は Fig. 1 に示すように配管し, 次の HPLC 条件で測定した.

カラム : Develosil ODS-UG-5 $4.6\text{mm i.d.} \times 100\text{mm}$

前処理カラム : $4.0\text{mm i.d.} \times 10\text{mm}$

カラム温度 : 40°C

移動相 : A 液 ; アセトニトリル - B 液 ($40:60$), B 液 ; 5mM ペンタンスルホン酸含有 50mM 過塩素酸ナトリウム溶液 ($\text{pH}2.2$)

グラジエントパターン : A 液の割合は $0 - 2$ 分は 7% , $2 - 8$ 分は 17% , $8 - 11$ 分は 7% に設定した.

移動相流速 : $1.25\text{ml}/\text{min}$

蛍光検出波長 : Ex 340nm , Em 450nm

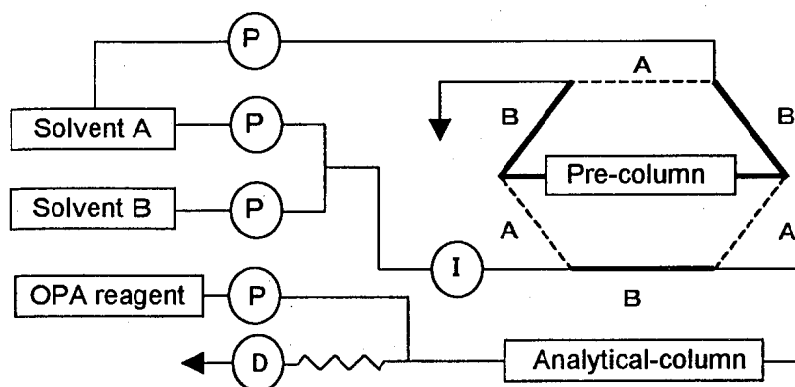


Fig 1. Flow diagram of column-switching system

P;Pump, I;Injector, D;Detector

Solvent A; Solvent B-acetonitrile(60:40)

Solvent B; 50mM sodium perchlorate(pH2.2) containing 5mM sodium pentanesulfonate

OPA反応液流速 : 0.3 ml/min

前処理カラム洗浄液流速 : 0.3 ml/min

注入量 : 10 μ l

3 結果

3. 1 HPLC条件の検討

低圧グラジエントシステムを用い、以下に示すHPLC条件の検討を行った。

3. 1. 1 アイソクラティック溶出法における移動相組成の検討

移動相組成の検討にあたり 5 mMペンタンスルホン酸ナトリウム含有25mM過塩素酸ナトリウム(pH2.2)-アセトニトリル(100:5)[6] (移動相1)を基礎溶出条件をとって、検量線作成用アミノ酸標準液を用いて移動相の検討を行った。

3. 1. 1. 1 pHの影響

移動相1のpHを1.5, 2, 2.5及び3に変化させ、移動相流速は1.0ml/minに設定し、pHと各アミノ酸の保持時間の関係を調べた。その結果はFig. 2に示すように、pHの低下と共に保持時間は増大するが、各アミノ酸相互の相対的分離パターンには際だった変化は認められなかった。以後、pHは2.2を採用することとした。

3. 1. 1. 2 過塩素酸濃度の影響

移動相1の過塩素酸濃度を5, 10, 20及び30mMに設定し、各アミノ酸の保持時間の変化を調べた。その結果は Fig. 3に示すように過塩素酸濃度の低下と共に、やや保持時間の増大が認められるが、分離パターンの変化はあまり認められなかった。以後、過塩素酸濃度は20mMで実験を行った。

3. 1. 1. 3 カウンターイオンの種別及び濃度

カウンターイオンとしてアルキルスルホン酸ナトリウムを用い、その濃度を5 mMとし、アルキル基の炭

素数をC4, C5及びC6とした場合の保持時間の変化を調べた。その結果は Fig.4-1に示すように、炭素数の増加と共に、アミノ酸のカラムへの保持が強くなり、保持時間が増大した。また、C4及びC5についてはカウンターイオン濃度を1, 5及び10mMとし、保持時間の変化を調べた。C4 (Fig.4-2), C5 (Fig.4-3) 共、カウンターイオンの濃度増加に伴い、保持時間が増大するが

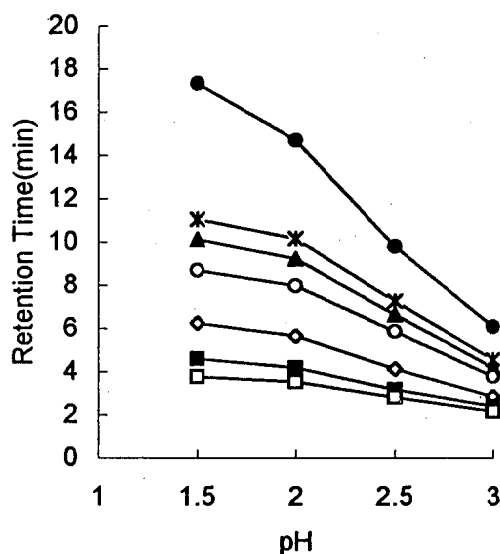


Fig 2. Effect of pH of mobile phase on retention time of amino acids

●—Phe —*—Nle —▲—Leu —○—Ile
—◇—Tyr —■—Met —□—Val

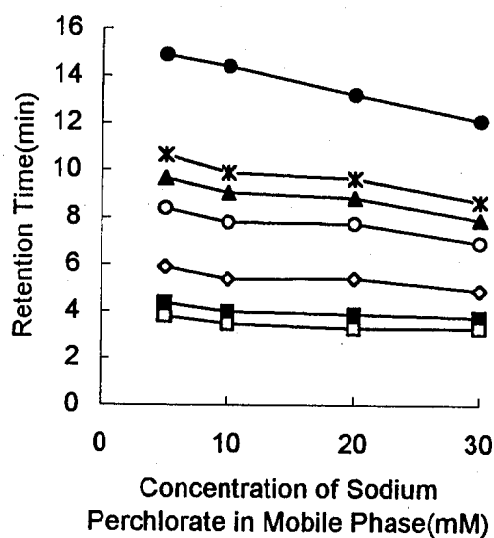


Fig 3. Effect of concentration of sodium perchlorate in mobile phase on retention time of amino acids

● Phe * Nle ▲ Leu ○ Ile
◇ Tyr ■ Met □ Val

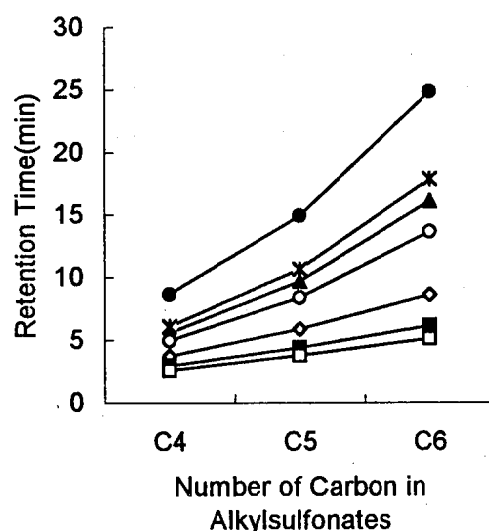


Fig4-1. Effect of kind of counter ion on retention time of amino acids

● Phe * Nle ▲ Leu ○ Ile
◇ Tyr ■ Met □ Val

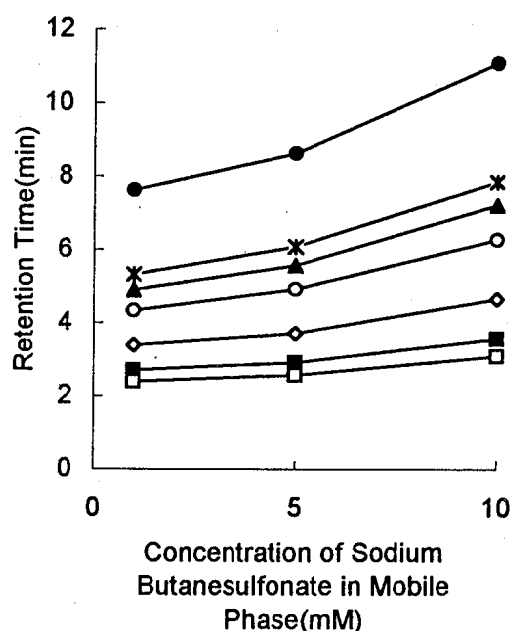


Fig4-2. Effect of concentration of Sodium butanesulfonate in mobile phase on retention time of amino acids

● Phe * Nle ▲ Leu ○ Ile
◇ Tyr ■ Met □ Val

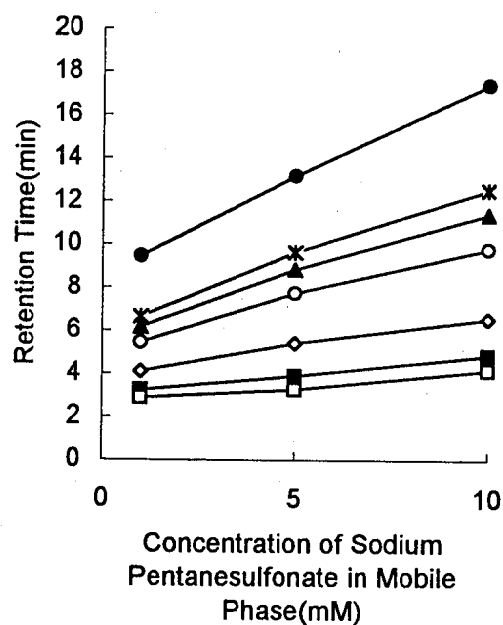


Fig4-3. Effect of concentration of Sodium pentanesulfonate in mobile phase on retention time of amino acids

● Phe * Nle ▲ Leu ○ Ile
◇ Tyr ■ Met □ Val

アミノ酸相互の分離パターンに大きな変化は認められなかった。C 6 についてはFig.4-1に示すように更に、保持が強くなり、分析時間が長くなると推察されるため除外した。従って、カウンターイオンはペンタンスルホン酸ナトリウムを採用し、

Pheの保持時間を10分以内とするため、アセトニトリル濃度を高めて、5 mMペンタンスルホン酸ナトリウム含有20mM過塩素酸ナトリウム (pH 2.2)-アセトニトリル(100:7.5) (移動相 2) を以下の実験条件とした。

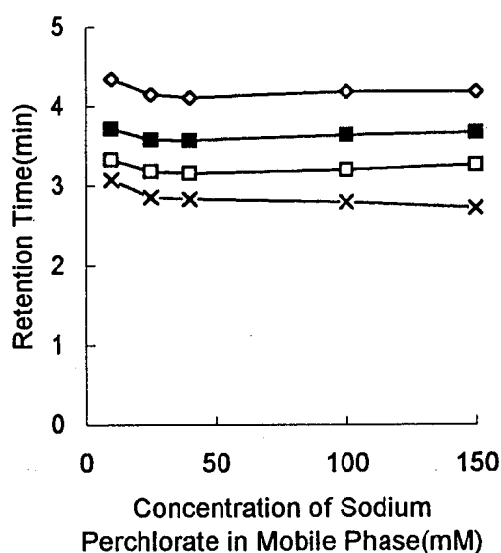


Fig5. Effect of concentration of Sodium perchlorate in mobile phase on retention time of amino acids

—x—X2 —□—Val —■—Met —◇—Tyr

3. 1. 2 新生児検体で認められる定量妨害ピークについて

新生児の乾燥濾紙血液を用い試験溶液の調製の項に記載の方法で調製した試験溶液を、移動相2を用いHPLCに供したところ、Valの直前にValのピークと重なる妨害ピーク(X2)が認められた。そこで、再度過塩素酸濃度とX2の保持時間との関連を調べるため、移動相2の過塩素酸濃度を10, 25, 40, 100及び150mMの条件で検討を行った。その結果、Fig. 5に示すように過塩素酸濃度が高くなるにつれ、ValとX2との分離に改善が認められ、100mMで比較的良好な分離が得られた。また、pHの変更やカウンターイオン種別をC4及びC6として再度検討を行ったが、アミノ酸とX2との分離の改善は認められなかった。また、5mMペンタンスルホン酸ナトリウム含有100mM過塩素酸ナトリウム(pH2.2)-アセトニトリル(100-x : x)のxを4, 6, 8及び10としてクロマトグラムを比較したところ、x=6ではX2とValが重なり、x=10ではMetとTyrが重なるためx=8が適当であった。そこ

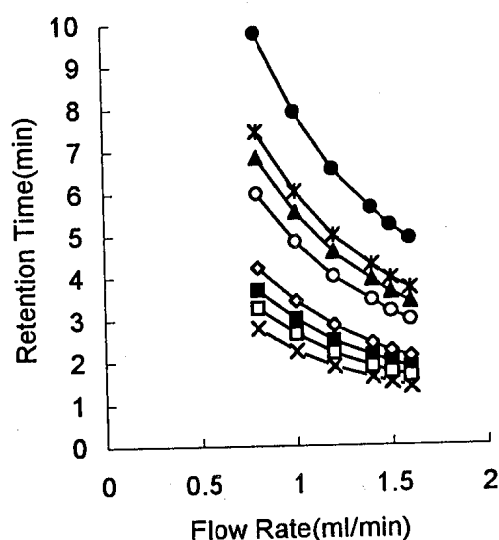


Fig6. Effect of flow rate on retention time of amino acids

—◇—Phe —x—Nle —▲—Leu —○—Ile
—◇—Tyr —x—X2 —■—Met —□—Val

で、5mMペンタンスルホン酸ナトリウム含有100mM過塩素酸ナトリウム(pH2.2)-アセトニトリル(100:8) (移動相3)をアイソクラティック溶出条件とした。この条件における移動相流速と各アミノ酸及びX2との保持時間の関係はFig. 6のとおりである。しかし、この条件でもValとX2がやや重なり、X2の完全分離はできなかった。そこで、次にステップグラジエントによる分離を試みることにした。

3. 1. 3 ステップグラジエント溶出における移動相組成の検討

ステップグラジエントは低圧グラジエント装置を用いて検討を行った。移動相3の過塩素酸ナトリウム溶液とアセトニトリルの比率を0-2分は97:3, 2-10分は100:8とし、過塩素酸ナトリウムの濃度を10, 20, 50及び100mMの条件での保持時間を調べた。その結果はFig. 7に示すように過塩素酸ナトリウム濃度が50mMの場合、X2はMetとTyrとの中間に位置し、X2を完全分離することができた。従って、5mMペンタンス

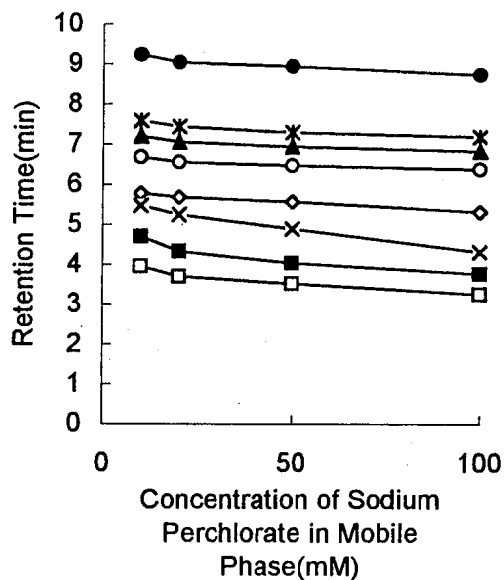


Fig 7. Effect of concentration of Sodium perchlorate in mobile phase on retention time of amino acids

●—Phe —×—Nle ▲—Leu ○—Ile
◇—Tyr —×—X2 ■—Met □—Val

ルホン酸ナトリウム含有50mM過塩素酸ナトリウム(pH2.2)-アセトニトリル(100-x:x) (移動相4)をベースにステップグラジエントを行うこととした。

3. 1. 4 カラムスイッチング法の検討

3. 1. 4. 1 前処理カラムへのアミノ酸の保持状態

フロントカット方式のカラムスイッチングにより、Pheより保持時間の長い夾雑物質が分析カラムへ送られないようにすることで、分析カラムの洗浄を不要にし、前処理カラムの洗浄は分析カラムによる分離と同時に進行されるシステムを検討した。そのため、前処理カラムへのアミノ酸及び夾雑物質の保持パターンを知る必要があった。そこで、先ず前処理カラムからのPheの溶出時間を調べたところ、移動相の流速が1.0ml/minの場合、アセトニトリル濃度を2%以上とすることで、概

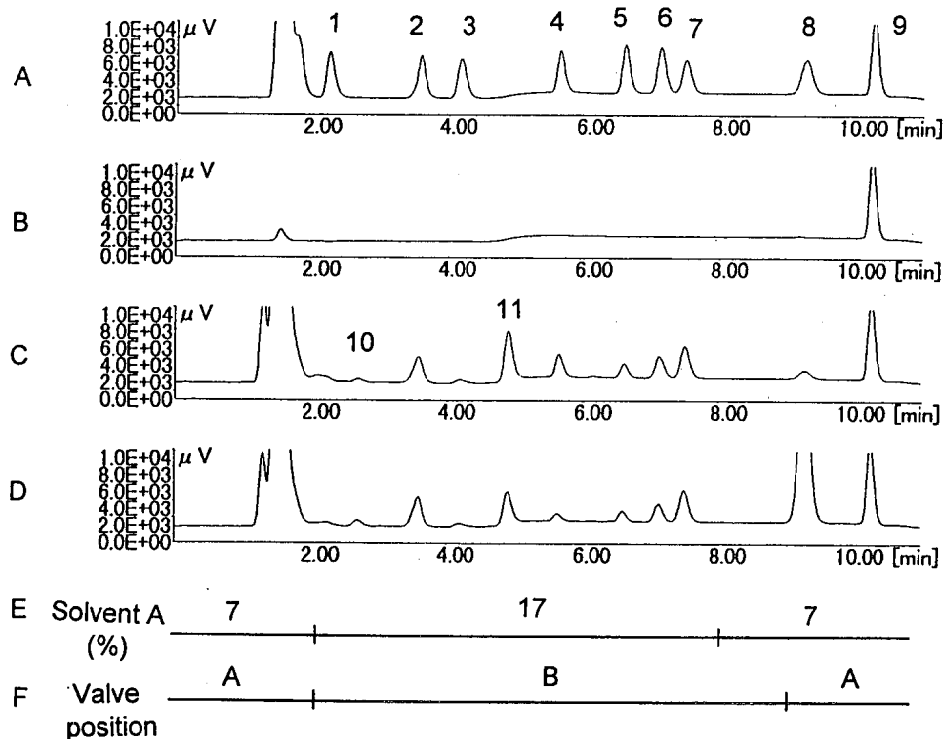


Fig 8. Chromatograms of standard solution(A), blank(solution B)(B), normal blood(C) and blood of PKU patient(D) with gradient pattern(E) and valve position(F)

1;Arg, 2;Val, 3;Met, 4;Tyr, 5;Ile, 6;Leu, 7;Nle(IS), 8;Phe, 9;Peak by pre-column wash solution, 10;X1, 11;X2
Valve position is described in Fig.1

ね2分以内に溶出されることが判明した。また、アセトニトリル濃度を40%とした場合、血液由来のPhe以降に溶出される夾雑物は5分以内に溶出された。そこで、前処理カラムの洗浄には移動相4の $x=40$ として調製した溶液を用い、ステップグラジエントのA液と兼用することとした。

以上の知見を踏まえ、ステップグラジエントの方法を検討した結果、0-2分は移動相4の $x=7$ 、2-8分は $x=17$ 、8分以降は $x=7$ とする方法で良好なクロマトグラムが得られた。また、カラムの保持状況に応じ、2-8分の x の値を微調整することとした。なお、移動相の流速は 1.25ml/min に上げて、分析時間の短縮を図った。

3. 1. 4. 2 バルブ切り替えのタイミング

低圧グラジエントでは実際にカラムに流れる移動相の組成はミキシング設定パターンよりも若干の遅れを生ずる。このことを考慮し、バルブ切り替え動作は Fig. 8 に示すように、0-2分はA位置、2-9分はB位置、9-11分はA位置とした。これにより11分サイクルでの分析が可能であった。Fig. 8 に検量線用アミノ酸標準液、新生児検体及び移動相B液を注入して得られたクロマトグラムをグラジエントパターン並びにバルブ切り替えパターンと共に示した。なお、このバルブ切り替え方法では、2-9分の7分間で前処理カラムの洗浄が行われるが、前処理カラムの洗浄液の流速を検討したところ 0.3ml/min で十分な洗浄効果が得られた。

3. 1. 5 反応コイルの長さ

反応コイルには内径 0.5mm のステンレス導管を用い、長さを1及び5m、並びに反応コイルを用いない場合について比較を行った。反応コイルを用いない場合に比較し、反応コイルを用いた方が感度が高くなるが、5mでは、ややピークのシャープさが損なわれる傾向が認められたため、反応コイルの長さは1mを採用した。

3. 1. 6 OPA濃度が感度に及ぼす影響

反応液の流速は 0.3ml/min とし、OPA濃度

を0.06, 0.1, 0.2及び0.32%の条件でNleのピーク面積を用いて、OPA濃度が感度に及ぼす影響を、移動相の流速が0.8, 1, 1.2, 1.4及び 1.6ml/min の場合について調べた。その結果は Fig. 9 に示すように、何れの流速においてもOPA濃度が0.2%の時、最高感度が得られたため、OPA濃度は0.2%を採用した。

3. 2 高圧グラジエントシステムでの分析

高圧グラジエント装置による分析では移動相中の過塩素酸濃度を50mMとした場合、Metの溶出位置に僅かな妨害ピークが出現する場合があったため、25mMに変更した。その他の低圧グラジエント装置による分析との違いは、移動相組成の設定値への追従性が低圧グラジエント装置より機敏となること、並びに低圧グラジエント装置では特に必要としなかったミキサーが必要となることである。高圧グラジエントシステムでは、ミキサーが無い場合、ベースラインのノイズが顕著に現れた。従って、内径 0.8mm 、長さ 2.5m のステンレスコイルをミキサーとして移動相A液と移動相B液の混合に用いた。これにより、高圧グラジエント装置においても、本分析法を利用できた。

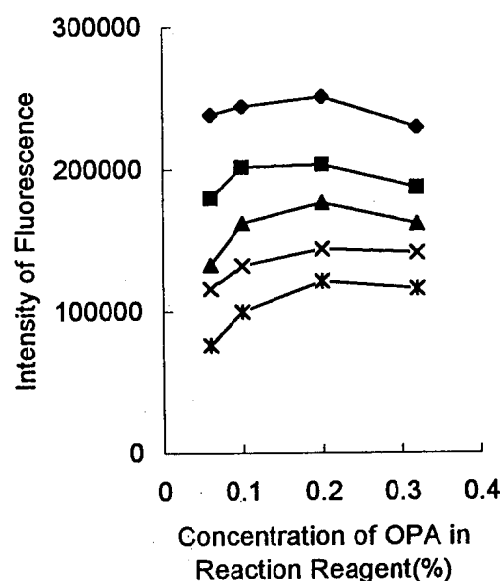


Fig 9. Effect of concentration of OPA in reaction reagent on fluorescent intensive of Nle at various flow rate

—●— 0.8 —■— 1 —▲— 1.2
—×— 1.4 —*— 1.6 (ml/min)

Table. 1 Reproducibilities of determination of amino acids from standard solution and dried disc bloods

Sample	Reproducibilities	Val	Met	Ileu	Leu	Phe
5 μ M Standard Solution	Means of Peak-Area	61474	62833	63479	62173	65445 n=20
	RSD(%)	1.7	1.8	1.5	1.7	1.5
Dried Disc Blood	Means of Concentration	2.54	1.47	1.02	4.13	3.40 (mg/dl) n=5
No.1	RSD(%)	2.0	1.7	2.2	1.8	4.2
	Means of Concentration	4.15	3.14	2.11	6.10	5.15
No.2	RSD(%)	3.0	3.6	3.2	3.0	4.0
	Mean of Concentration	0.15				
No.3	RSD(%)	3.6				

Each discs is prepared for low level amino acids(No.1),high level amino acids (No.2) and low level Met(No.3)

Table. 2 Recoveries of amino acids from dried blood specimens by HPLC and MFL

Method A by HPLC n=5							
Amino Acid	Val	Met	Tyr	Ileu	Leu	BCAA	Phe
Blank Blood	2.39	0.13	0.99	0.79	1.59	—	1.01
Added Blood	3.53	0.94	1.92	1.80	3.67	—	2.03
Found	1.14	0.81	0.93	1.01	2.08	—	1.02
Recovery(%)	114.1	81.6	93.6	100.6	103.8	—	101.8
Method B by HPLC n=5							
Amino Acid	Val	Met	Tyr	Ileu	Leu	BCAA	Phe
Blank Blood	2.39	0.13	0.96	0.79	1.59	—	1.02
Added Blood	3.41	0.91	1.82	1.72	3.52	—	1.96
Found	1.02	0.78	0.86	0.93	1.93	—	0.94
Recovery(%)	101.4	78.2	86.0	93.4	96.6	—	94.0
Method C by HPLC n=5							
Amino Acid	Val	Met	Tyr	Ileu	Leu	BCAA	Phe
Blank Blood	2.13	0.10	0.94	0.75	1.55	—	0.93
Added Blood	3.04	0.79	1.75	1.63	3.38	—	1.79
Found	0.91	0.69	0.81	0.88	1.83	—	0.86
Recovery(%)	91.3	69.7	80.6	88.1	91.5	—	85.5
Method D by MFL n=8							
Amino Acid	Met					BCAA	Phe
Blank Blood	1.13					5.45	1.30
Added Blood	1.98					9.28	2.27
Found	0.85					3.83	0.97
Recovery(%)	85.2					95.8	96.8

Reagent for denaturing hemoglobin; ethanol-acetone-water(7:7:2) (A,C,D) and ethanol (B)

Extract solution; solvent B(pH2.2) containing IS (A,B) and glycine buffer (pH9.6) for MFL(C,D)

3. 3 再現性

3. 3. 1 標準液のピーク面積

5 μ M アミノ酸標準液10 μ lを繰り返し20回注入し、ピーク面積の再現性を求めた。その結果はTable 1に示すように、相対標準偏差はVal 1.7, Met 1.8, Ile 1.5, Leu 1.7及びPhe 1.5 %と良好な再現性が得られた。

3. 3. 2 濾紙血液中の定量値

濾紙血液中の定量値の再現性についてはマス・スクリーニング学会HPLC研究会から配布された3種の検討用濾紙血液を各々5回測定し調べた。この結果はTable 1に示すように、1.7から4.2%の相対標準偏差が得られた。

3. 4 添加回収率の測定

コントロール用濾紙血液及び空試験用濾紙血液中のアミノ酸を本法を用いて測定し、定量値の差から回収率を求めた(Method A)。また、血色素の固定液にエタノールを用いて本法を準用した場合(Method B)、並びに固定方法は本法と同一とし、抽出液にマイクロプレート酵素法で使用されるグリシン緩衝液(pH9.7)を用い、超音波抽出を行わず、静置抽出により抽出し、抽出液と同量の内部標準物質含有抽出液を加えた後、HPLCで定量する場合(Method C)の3方法において回収

率を比較した。その結果はTable 2に示すように、固定液にはエタノールよりもエタノール-アセトン-水(7:7:2)を用いる方が何れのアミノ酸においても高い回収率が得られ、血色素の固定状態も良好であった。また、静置抽出では超音波抽出に比較し、回収率は劣っていた。なお、本法の回収率はMet, Leu及びPheの順に、それぞれ81.6, 103.8及び101.8%であった。

3. 5 マイクロプレート酵素法との比較

3. 5. 1 コントロール濾紙血液による測定

HPLCとMFLを比較するため、前項の回収率の測定に用いた濾紙血液と同一の濾紙血液を用いて、みかけ上の回収率を測定した。その結果はTable 2のMethod Dに示すように、Met 85.2, BCAA 95.8及びPhe 96.8%の値が得られ、Method Cの回収率より高かった。このことは、MFLの濃度表示値は回収率補正された濃度と推察された。

3. 5. 2 標準濾紙血液による比較

マイクロプレート酵素法用の標準濾紙血液(バイエルメディカル社製)中のアミノ酸を本法で測定し、表示値と測定値の比較を行った。7濃度の標準濾紙を各2スポットずつ測定した結果をHCU, MSUD及びPKU用標準濾紙の順にFig.10-1,

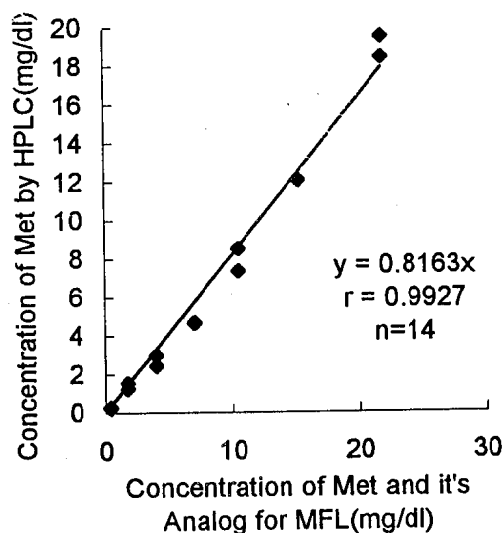


Fig10-1. Correlation of concentration of amino acid in standard discs for HCU between by HPLC and MFL

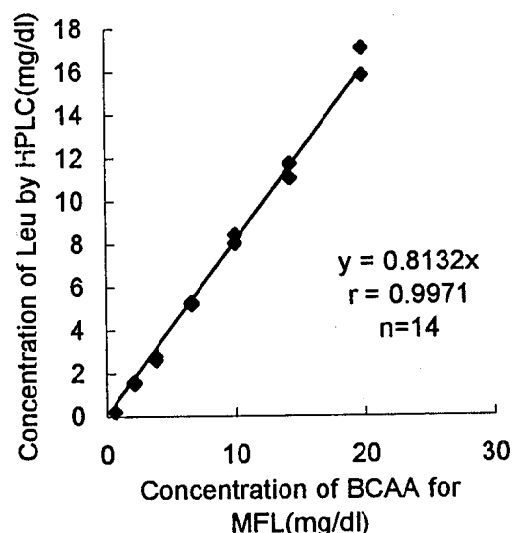


Fig10-2. Correlation of concentration of amino acid in standard discs for MSUD between by HPLC and MFL

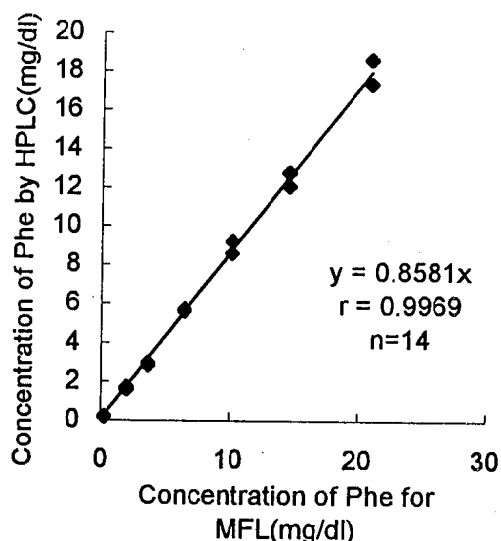


Fig10-3. Correlation of concentration of amino acid in standard discs for PKU between by HPLC and MFL

10-2及び10-3に示した。何れの標準濾紙においてもアミノ酸の表示値と測定値の間に高度の相関が認められ、精度良く定量されていることが示唆された。

3. 5. 3 新生児検体による比較

一般新生児検体1246検体について本法とマイクロプレート酵素法でアミノ酸を測定し、両法の相関並びに本法の測定値のヒストグラムを作成した。

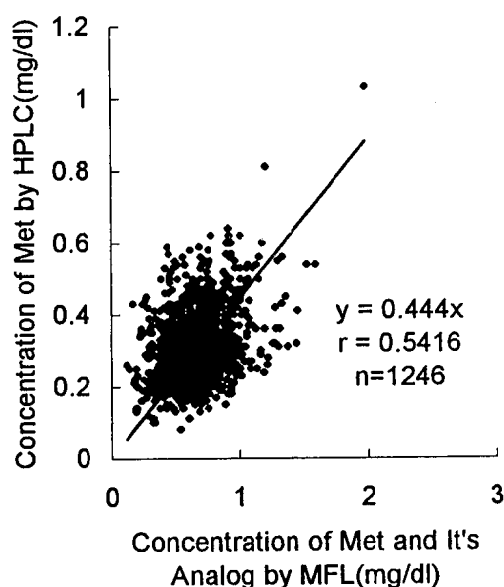


Fig11-1. Correlation of determined concentration of Met (and its analogue) in blood of newborn by HPLC and MFL

相関はFig11-1, 11-2 及び11-3 にヒストグラムはFig12-1, 12-2 及び12-3 にそれぞれのアミノ酸別に示した。Leu, BCAA 及び Phe の両法間の相関係数は0.869, 0.788 及び0.638と高度の相関が認められ、Met に関してはマイクロプレート酵素法ではMet の他、Met 関連物質やホモシステインも含めて測定されるため、相関係数は0.542であった。また、本法による一般新生児検体中アミノ酸の平均値はMet, Leu, BCAA, Phe の順にそれぞれ0.31, 1.42, 4.41 及び 0.86 mg/dl であり、BCAA中に占めるLeuの割合は平均32.2%であった。

3. 6 抗生物質の影響

治療に用いられる血液中の抗生物質が本法に及ぼす影響を調べるため、アミノ基を有し、新生児に使用される可能性のある抗生物質7種 (ABPC, AMPC, CTX, CCL, GM, AMK 及び TOB) について、保持時間の確認を行った。

その結果、ABPC, AMPC, CTX 及び CCL については妨害ピークは出現しなかった。GM では Ile の直前に、AMK は Met と Tyr の間に、TOB は Ile と Phe の間に溶出が認められたが、何れも Met, Leu 及び Phe の定量を妨害する位置への溶出は認められなかった。

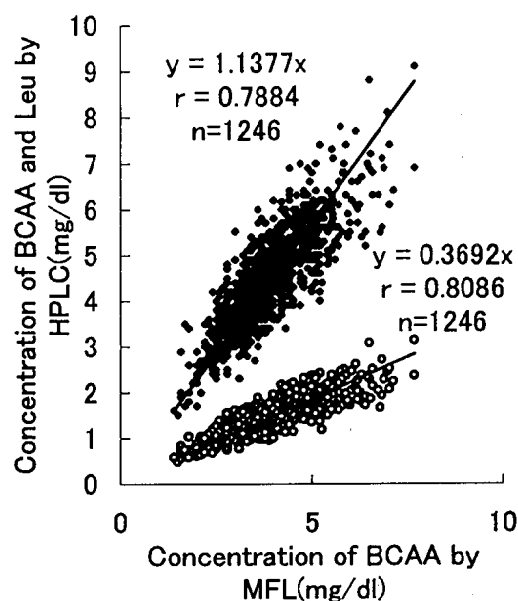


Fig11-2. Correlation of determined concentration of BCAA and Leu in blood of newborn by HPLC and MFL
●BCAA ○Leu

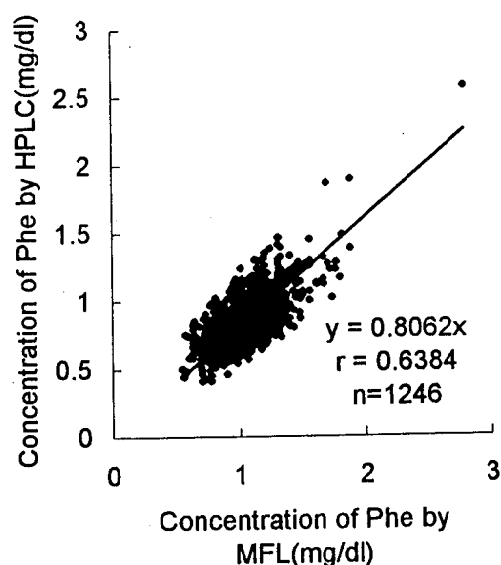


Fig11-3. Correlation of determined concentration of Phe in blood of newborn by HPLC and MFL

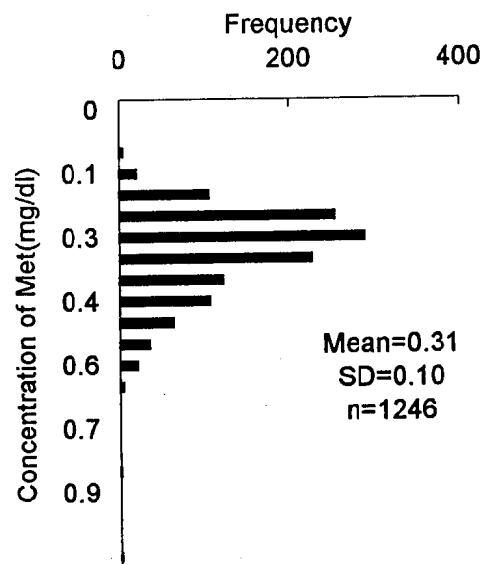


Fig12-1. Distribution of concentration of Met in blood of newborn

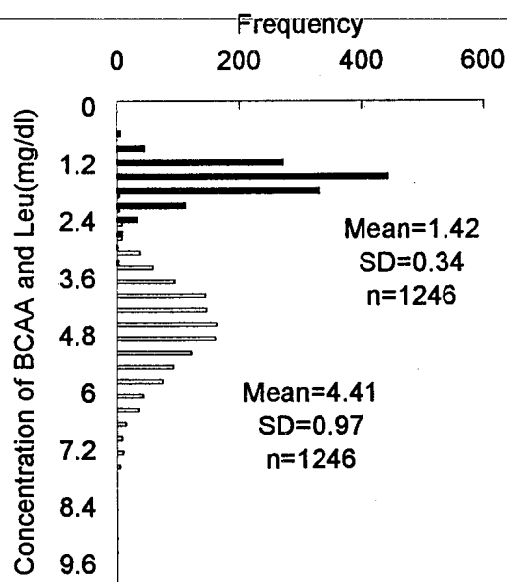


Fig12-2. Distribution of concentration of BCAA and Leu in blood of newborn
■Leu □BCAA

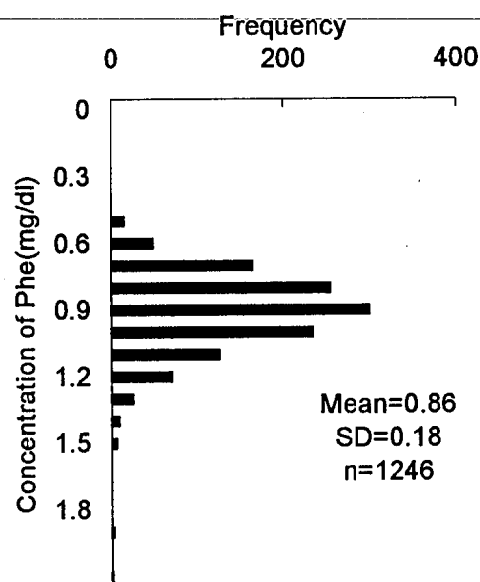


Fig12-3. Distribution of concentration of Phe in blood of newborn

3. 7 データ処理

新生児マススクリーニング検査でアミノ酸分析をHPLCで行った場合、ガラクトース、TSH及び17-ヒドロキシprogテストロン等アミノ酸以外の項目は当所ではマイクロプレートによる測定を行っており、データ処理が煩雑になる恐れがある。そこで、HPLCのデータをマイクロプレート酵素法のデータと同一形式にすることで統一し、

データ処理の効率を損なうことなく、また、従来のデータ管理システムをそのまま生かしたデータ処理を可能にした。HPLCのデータは波形処理プログラム「BORWIN」で処理し、定量値はBORWINの機能を用い、表計算ソフト「エクセル」に転送した。次にエクセルのマクロ機能により、1アッセイデータの初回検体のヒストグラムの表示並びに確認検査検体の抽出を行い、初回検体の

測定値と共にマイクロプレート酵素法と同一のデータ形式で出力し、これを事務処理用プログラムに渡すという流れにした。各ステップはボタン操作を主体としたことにより、簡易な操作で、効率的にデータ管理が可能であった。

3. 8 カラムの耐久性及び検査費用

カラムの耐久性を調べたところ低圧グラジエントシステムにおいて1本のカラムで1200検体以上(高圧グラジエントシステムでは7000検体以上)の分析が可能であった。検査費用(ランニングコスト)の計算にあたっては7000検体/1本として計算したところ、Table 3に示すように1検体約33円となり、マイクロプレート酵素法(360円/検体)の約1/10の費用での検査が可能であった。

4 考察

アミノ酸代謝異常症マスキングの一次検査の検査法には、1)多検体を効率良く検査できること、2)一定以上の精度を確保できること、3)データ管理が容易なこと、4)検査費用が廉価であることなどが求められる。HPLCはフロー分析である性質上、1検体ずつの分析となり、ガスリー法のように多検体の一斉処理はできない点で、一次検査の検査法とし採用し難い面があった。しかし、単一成分の分析、多項目の同時分析が可能であり、また、自動化が可能のため、分析システムの工夫次第では、この欠点をカバーしうる可能性

がある。そのためには、自動化し易いHPLC条件すなわち血液成分を含めアミノ酸相互の分離が十分である分析条件を先ず確立する必要がある。従来、報告されている検査法は短時間分析を優先するため、必ずしも、分離は十分でない場合もあった。そこで、特に分離に問題のあったMet近辺の分離の改善をアイソクラティック条件で試み、移動相のpH、過塩素酸塩濃度、カウンターイオン種別及びその濃度を変えて検討を行ったが、顕著な効果は得られなかった。そこで、ステップグラジエント法を導入したところ、Val、Met近辺の分離及びアイソクラティック条件でValの定量を妨害する物質(X2)をMetの後に溶出させることができ、Tyr以降の分離も含め、ほぼ完全な分離を達成できた。

次に問題となるのは1分析サイクルを短縮することにある。1分析に要する分離時間が短くても、次のサンプル注入までに、カラムの洗浄等のコンディニングが必要では分析の効率性が損なわれてしまう。そこで、カラムスイッチング法により、分析カラムの毎回の洗浄時間を必要としないシステムの検討を行った。カラムスイッチングの流路は6方バルブ1個のみで対応できるシンプルな流路のフロントカット方式とし、安定した迅速分析法を確立できた。また、HPLCによる多検体の連続分析では、試験溶液中に浮遊物があると、カラムの目詰まりを生じカラムの入り口圧を上昇させる原因になる。そこでエタノール-アセトン-水

Table 3. Necessary expenses for reagents by HPLC

	Amount	/	Possible Number of	Cost per
			Analysis Samples	1 sample (yen)
Column	1	/	7,000	5.3
Pre-Column	1	/	7,000	0.6
Xe Lamp	1	/	5,454	9.2
Solvent A	1,710ml	/	1,000	3.2
Solvent B	12,040ml	/	1,000	3.9
Wash Solution*	3,300ml	/	1,000	6.1
OPA Reagent	3,300ml	/	1,000	3.2
Extract Solution	100ml	/	1,000	0.2
Plate Seal	200seats	/	18,000	0.7
Total				32.4

* same to solvent A

による血色素固定法を採用することにより、ほぼ無色透明の抽出液が得られ、また、前処理カラムの洗浄を注入方向と逆向きの流れで行うことにより、カラムの目詰まりによる圧力上昇を無くすことができた。なお、この方式では前処理カラムへの負荷が大きくなり、前処理カラムの耐久性が問題となることが懸念されたが、分析カラムと同様、7000検体以上（高圧グラジエントシステム）の処理が可能であった。ただ、前処理カラムの使用頻度が高くなると、Pheの溶出位置近辺にバルブ切替に伴う僅かなショックピークが出現した。しかし、2-8分の時点の移動相A液の割合を調整して、Pheと重ならないようにすることは可能であり、また、前処理カラムの交換により低減させることも可能であった。なお、このショックピークのピーク面積はPheの血中換算で0.1mg/dl程度であり、Pheのスクリーニング精度への影響は少ないと考えられる。

また、蛍光ラベル化剤のOPA溶液の安定性については、約1週間は室温で安定であるが、それ以上経過した場合、クロマトグラムベースラインに特徴的ノイズが現われ、劣化状況を容易に判定できた。

本法は、良好な分離パターンと精度を保った迅速

HPLC法であり、MFLに比較し、作業時間は約1/4、検査コストは約1/10であった。なお、厚生省により平成12年4月1日から、HPLCがアミノ酸代謝異常症の新生児マススクリーニング一次検査法として、正式に認可されたことから、現在、1次スクリーニングに本法を導入している。

文 献

- 1) 服部絹代, 柴田 実, 高野弘紀, 安部昭子, 萩野周三(1998). 日本マス・スクリーニング学会誌, 8(2), 71.
- 2) 大竹治美, 酒本和也, 武井節子ほか(1998). 日本マス・スクリーニング学会誌, 8(2), 72.
- 3) 阿部朋子, 鈴木恵美子, 成瀬浩, 丸野清(1994). 日本マス・スクリーニング学会誌, 4(2), 141-142.
- 4) 米田 豊, 高橋雅子, 北村敬(1997). 分析化学, 46, 89-94.
- 5) 米田 豊, 高橋雅子, 北村敬(1997). 日本マス・スクリーニング学会誌, 7(1), 29-38.
- 6) 日本分光(1999). LC application data, No430009H.

ヒト染色体に関する調査研究—血液, 骨髓液— (平成11年度)

林 美貴子 本田 幸子 大江 浩 北村 敬

Chromosome Analysis of Human Blood and Bone Marrow Cells

Mikiko HAYASHI, Sachiko HONDA,
Hiroshi OE, Takashi KITAMURA

要 旨 平成11年度の受付数は血液104件(人)であり, うち9人に染色体異常が発見された。発見された染色体異常の内訳は均衡転座保因者3人(流産を繰り返す夫婦1人とt(2;17)由来の2-p部分トリソミー児の家族2人), ダウン症候群2人, 逆位(inv(8))保因者1人, モザイク型ターナー症候群(iso(Yq))1人, 2-p部分トリソミー1人と13部分トリソミー1人であった。また, 正常変異として1番染色体ヘテロクロマチン部の完全逆位と9番染色体のヘテロクロマチン部の逆位保因者および18番染色体のヘテロクロマチン部分の増加が各1人発見された。依頼理由は流産を繰り返す夫婦, 不育症の夫婦および羊水検査における転座型や正常変異の確認等が主なものであった。また, 昭和48年度から, 平成11年度までに検査を行った1,614件(実人数1,588人)中, 1,576件(同1,561人)が検査可能であった。うち228人に染色体異常が発見され, 異常率は14.6% (228/1,561) になった。

染色体検査法の発達は近年著しく, 詳細な部分の検出もFISH法などで部分的に可能になってきている[1]。また, 全国的に検査数が増加してきていることから, 検査に対する関心が一般的に高くなってきている。現在では先天異常児や発達遅滞児の確定診断, 習慣流産および不育症夫婦の原因検索, 白血病, 出生前診断, 流産胎児の診断や上記の家族検索等の目的で行われている[2]。

富山県衛生研究所では先天異常の発生原因を追求し, その発生の減少を目的として27年間染色体検査を行ってきた。ここに平成11年度中の結果とともに過去27年間の検査内容, 依頼理由の変化についても報告する。

実 施 方 法

各病院から搬送された末梢血液(ヘパリン採血)は原則として3日間培養を行い, 通常の方法に従った。全血1mlに対し, 培養液10ml(15%牛胎児血清加RPMI 1640)を添加し, 3-4日間37℃にて培養後, コルセミドおよび臭化エチジウムを各0.02μg/ml, 5μg/mlになるように添加後, さらに1-2時間培養した。その後, 遠心管に移し, 1,400rpm 5分間遠心後上清を除き, PBSを10ml添加した。さらに1,400rpm 5分間遠心後上清を除き, 0.075M KClを加え, 15-20分間37℃にて低調処理を行い, 固定液(3:1メタノール:酢酸)を静かに加えた後ゆるく攪拌し, 冷蔵庫に

30分間以上静置した。1,400rpm 5分間遠心後上清を除く処理を数回繰り返した。最後に、細胞の濃度を調整し、スライドガラス上に数滴滴下し、65℃の湯煎器上で乾燥した。また、培養が5日以上になる場合は冷蔵庫(4℃)に1-2日間保存後、培養を開始した。染色はおもにトリプシン処理ギムザ後染法によるGバンド法によった[3]。分析は概ねパリ会議に基づき、写真判定は5枚以上とし、分析数は20個以上としたが、ファンコニー貧血の診断では100個以上の細胞を観察した。

FISH法はVYSIS製プローブを用い、前川らの方法に従った[4]。

平成11年度の検査依頼数は104件(人)であり、全て県内の病医院からの依頼であり、病医院別内訳については表1に示したとおりである。

表1. 検査依頼病院内訳(昭和48～平成11年度)

県別	病院名	年 度	
		H.11	S.48～H.11
県内	県立中央病院	55	888(5)
	富山赤十字病院	24	272(50)
	高志学園		92
	富山医科薬科大学	12	91(3)
	富山市民病院	2	77
	氷見市民病院	4	22
	厚生連高岡病院	2	20
	富山保健所		17
	砺波総合病院	2	13
	富山通信病院		9
	国立富山病院		7
	済生会富山病院		6
	済生会高岡病院	2	4
	黒部市民病院	1	3
	社会保険高岡病院		2
	富山労災病院		2
	厚生連滑川病院		2
	小杉保健所		1
	他		28
	小計(件)	104	1,556(58)
県外	国立金沢病院		42
	福井愛育病院		12
	珠洲市立総合病院		2
	他		2
	小計(件)		58
計(件)		104	1,614(58)

() : 内骨髓液

結果および考察

1. 平成11年度

平成11年度の依頼数は104人であり、依頼理由と染色体異常の有無等については表2に示したが、

表2. 染色体検査内容(平成11年度)

依頼理由	検査	判定	異常	逆位*
血液	104	104	9	3
内訳				
流産を繰り返す	54	54	2	1
不育症	12	12		1
羊水の確認(両親)	11	11		1
前子先天異常(両親)	4	4		
胎児の確認(両親)	2	2		
タウ 症候群の疑い	2	2	2	
原発性無月経	2	2	1	
低身長	2	2		
低身長・低体重	1	1		
妖精様顔貌	1	1	1	
精神発達遅滞等	1	1	1	
ファンコニー貧血の疑い	1	1		
CHARGE症候群	1	1		
羊水過少(臍帯血)	1	1		
心奇形	1	1		
上記の家族等	8	8	2	

* ; 正常変異

依頼理由のほとんどは反復流産・不育症の理由によるもの(66人)であった。また、羊水細胞の染色体分析による出生前診断の増加に伴い、「正常変異?」あるいは「転座?」と判定に苦慮した症例が増加したため、また、流産胎児の染色体分析でも羊水と同様に苦慮した例があったため、判断材料としての両親の染色体検査の件数が増加した(13人)。その判定に苦慮した症例は22p+, 13p+, 1ph+, 他の施設での検査に対する判断ミスなどであったが、いずれも異常ではなかった。

染色体異常が発見されたのは表3に示したとおり9人であり、11年度の異常率は8.7%になった。流産を繰り返した夫婦54人中2人に染色体異常が発見され、うち1人はt(3;13)の均衡転座保因者で

表3. 染色体異常の内訳(平成11年度)

症例No.	主訴・主要症状	核 型	疾 患 名
No. 1	流産4回	46,XX,t(3;13)(q25;q14)	均衡転座保因者, 胎児 3:1分離由来+3
2	流産3回	46,XY,inv(8)(p21q24.2)	逆位(8) 保因者, 胎児rec(8)dup(8q)
3	特異な顔貌, 体重増加不良	47,XY,+21	ダウン症候群
4	特異な顔貌, 筋緊張低下	47,XX,+21	ダウン症候群
5	原発性無月経	45,X/46,X,idic(Y)(q11.1)	モザイク型ターナー症候群
6	妖精様顔貌	46,XX,der(13)(q14→q10::q10→qter)	13部分トリソミー (q10→q15)
7	精神発達遅滞, 骨粗鬆症等	46,XY,der(17)t(2;17)(p23;q25)pat	2p23→terトリソミー, 17q25→terトリソミー
8	上記の父	46,XY,t(2;17)(p23;q25)	均衡転座保因者
9	〃 妹	46,XX,t(2;17)(p23;q25)pat	均衡転座保因者

正常変異			
10	不育症	46,XY,inv(9)(p11q13)	正常変異, 逆位(9) 保因者
11	羊水検査の確認	46,XX,inv(1)(p11q12)	正常変異, 完全逆位(1) 保因者
12	流産3回	46,XY,18ph+	18番ヘテロクロマチンの増加

同時に行った4回目の自然流産胎児の染色体検査結果は3:1分離由来の47,XX,+3,t(3;13)(q25;q14)(q25;q14)mat.の核型を示した(図1)[5]. も

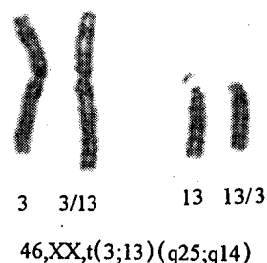


図1. 症例1の部分核型

う1人は46,XY,inv(8)(p21q24.2)の8番染色体逆位で同時に行った3回目の自然流産胎児の染色体検査結果は46,XY,rec(8)dup(8q)inv(8)(p21q24.2)pat.の核型を示した(図2)[5].

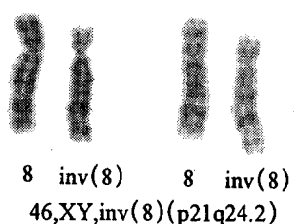


図2. 症例2の部分核型

ダウン症候群を最初から疑われた2人はいずれもトリソミー型ダウン症候群であったが, その臨床症状は1人目は特異な顔貌および体重増加不良

が, 2人目は特異な顔貌, 筋緊張低下, 泉門, 関節過伸展などが観察された.

原発性無月経を主訴とした30歳女性は子宮・卵巣低形成, エストロゲン低値, 二次性徴は殆ど認められず, 外性器小児様で翼状頸(-), 外反肘(-), 147cm, 52kg等の症状を示したが, 検査結果は45,X/46,X,idic(Y)(q11.1)でそのモザイクの割合は68:32であった(図3). また, 外形が

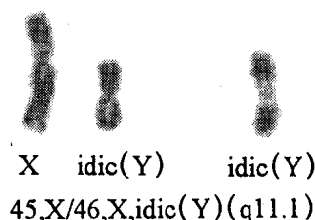


図3. 症例5の部分核型 左Gバンド 右Cバンド

全く女性であることから主治医の要請でYqのDNAプローブを用いY染色体由来を確認した.

妖精様顔貌とともに低身長(-3.45SD), エピカンサス, 小顎症が認められた2歳8ヶ月女児は13p+の核型を示したが, その由来は13番クロモゾームペインティング法とGバンドから46,XX,der(13)(q14→q10::q10→qter)の13q10→q14のトリソミーと判定したが, 典型的13部分トリソミーよりも症状が軽く, 染色体異常の示す臨床症状に幅のあることを示す症例であった(図4)[6].

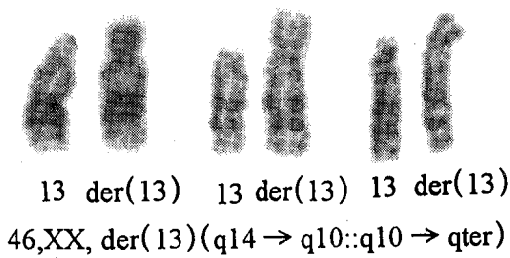


図4. 症例6の部分核型

精神発達遅滞，癲癇，骨粗しょう症，著明なやせ，低身長を主訴として検査を受けた12歳男児は46,XY,add(17)(q25)の核型を示した．家族の検査から父および妹がt(2;17)(p23;q25)の均衡転座保因者であった．そのため，男児の核型は46,XY,der(17)t(2;17)(p23;q25)pat. 2p部分トリソミー・17q端部モノソミーと判定された（図5）．

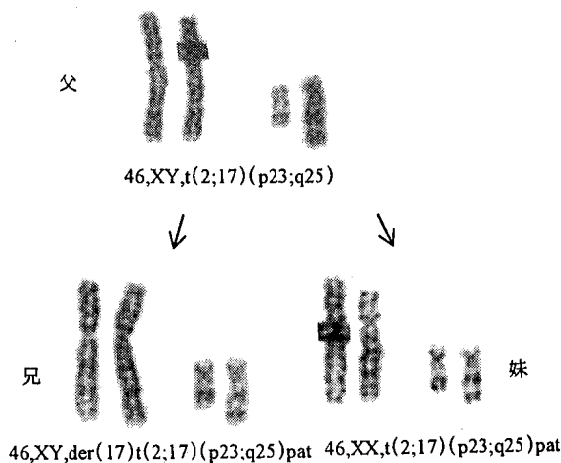


図5. 症例7, 8, 9の部分核型

その他，正常変異として3人が発見された（表3）．不育症の1人が9番動原体部逆位，羊水検査で1番染色体の不均衡？と思われた1例が1番染色体ヘロクロマチン部分の完全逆位であった

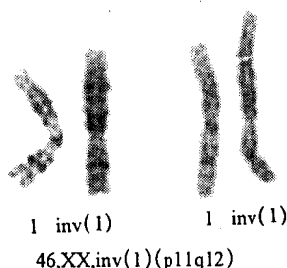


図6. 症例11の部分核型

（図6）．この1番染色体完全逆位について過去に報告例は無かった[7]．また，流産を3回経験した夫婦のうち夫に18番染色体の短腕部の伸長が観察され，転座を疑ったが，18番のクロモゾームペインティング法および18pテロメアプローブおよび18α-サテライトプローブのFISH法およびCバンド法により，これも過去に報告例の少ない18番のヘテロクロマチン部分の短腕部分への増加と判定され，核型は46,XY,18ph+とした（図7）．

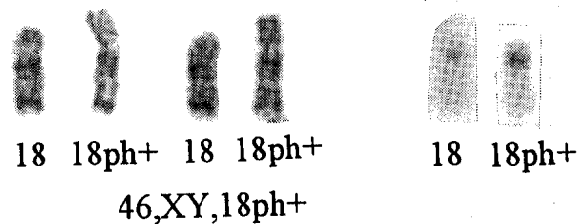


図7. 症例12の部分核型

左2ヶGバンド 右Cバンド

18pテロメアプローブおよび18α-サテライトプローブによる検索は金沢医科大学尾崎守氏のご好意によった．

2. 昭和48年度～平成11年度

検査開始当初からの受付件数は血液1,556件と骨髄液58件の計1,614件になったが，白血病等による血液・骨髄液の重複，他の病院からの再検査による重複を除くと実人数は血液1,535人と骨髄液53人の計1,588人であった．検査可能であった1,561人中228人に染色体異常が発見されたため，その異常率は14.6%になった（表4）．最も多い依頼理由は流産を繰り返す夫婦（566人）であり，判定可能であった565人中26人に染色体異常が発見され，その異常率は4.6%，夫婦単位にすると277組中25組で約9%，つまり，約11組に1組の割合で異常があったことになった．表5にその核型を示したが，均衡型のRobertson転座が4人，他の均衡転座が20人，トリプルXが1人，マーカー染色体保有者が1人であった．また，流産を繰り返す夫婦において，均衡型転座保因者の場合，他の理由によるよりも挙児の可能性が高いといわれている．そのため，流産歴のある人の羊水検査において，羊水検査の結果だけでは判断できず急ぎ両

表4. 染色体検査結果一覧(実人数*)
(昭和48~平成11年度)

依頼理由	検査	判定	異常	他**
・血液				
流産を繰り返す	566	565	26	12
家族(染色体異常有)	148	148	10	
タソ(21トリソミー)症候群の疑	128	126	101	
家族(染色体異常無)	111	111	0	1
先天奇形	102	97	10	
不妊・不育症	72	72	0	3
発育不良、発育遅延	48	48	2	2
白血病	40	35	6	
無月経	35	35	3	
ターナー症候群の疑い	29	29	15	5
低身長	26	26	0	
18トリソミー症候群の疑い	16	16	15	
半陰陽	13	11	3	
胎児血液(出生前診断)	11	11	1	
心臓病	10	10	1	
膈欠損・鎖膈	7	7	0	
クラインフェルター症候群の疑	6	6	5	
他の性染色体異常の疑	6	6	0	
猫なき症候群の疑	6	6	1	
13(D)トリソミー症候群の疑	4	4	4	
副腎性器症候群の疑	4	4	1	
ガラーザリ症候群の疑	4	4	1	
脆弱X染色体症候群の疑	4	4	0	
生理不順	3	3	1	
ファンコニー貧血	2	2	1	
色素性乾皮症	1	1	1	
その他	133	129	5	1
小計	1,535	1,516	213	24
・骨髓液				
白血病等	53	45	15	
合計(人)	1,588	1,561	228	24

*: 白血病等の理由による再検査は除く

**: 9番染色体等逆位保因者、睾丸性女性化症候群

表5. 流産を繰り返す夫婦中、染色体異常のあった26例の核型と既往歴

No	核型	既 応 歴
・夫		
①	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	2 流産
②	46,XY,t(1;4)(q11;p15.2)	2 流産
③	46,XY,t(1;7)(q45;q11)	3 流産
④	46,XY,t(1;12)(q425;p13)	1 生産 6 流産 1 妊娠中
⑤	46,XY,t(1;12)(q42;p13)	1 生産 3 流産
⑥	46,XY,inv(9)(p11q13), t(4;10)(q31;q25)	3 流産
⑦	46,XY,t(4;15)(q12;q24)	2 流産
⑧	46,XY,t(4;18)(q31.3;q21.3)	2 流産
⑨	46,XY,t(5;16)(p13;p13)	3 流産 2 生産
⑩	46,XY,t(8;14)(p11;q32)	4 流産
⑪	46,XY,t(8;21)(q24.2;q21.2)	4 流産
⑫	46,XY,inv(8)(p21q24.2)	4 流産

・妻		
①	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	1 生産 2 流産 1 妊娠中
②	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	1 生産 6 流産 1 妊娠中
③	45,XX,der(13;21)(q10;q10)	2 流産
④	46,XX,t(1;15)(q42;q26)	2 流産
⑤	46,XX,t(3;4)(p13;p16)	3 流産
⑥	46,XX,t(3;10)(q29;q22)	3 流産
⑦	46,XX,t(3;13)(q25;q14)	4 流産
⑧	46,XX,t(3;21)(q27;q11.2)	2 流産
⑨	46,XX,t(4;15)(q33;q15)	3 生産 2 流産
⑩	46,XX,t(7;20)(p23.1;q11.2)	3 流産
⑪	46,XX,t(8;15)(q11.2;q26.1)	2 流産 1 死産
⑫	46,XX,t(10;18)(q23;q11.2)	3 流産
⑬	47,XXX	2 流産 1 胎児死亡
⑭	47,XX,+mar	2 流産

表6. 染色体異常と主な核型

染色体異常名	人	主な核型
・常染色体異常		
ダウソ症候群	101	
(トリソミー型 95)		47,XY,+21 47,XX,+21
(モザイク型 3)		46,XY/47,XY,+21
(転座型 3)		46,XX,-13,+der(13;21) 46,XX,-21,+der(21;21)
18トリソミー症候群	15	
(トリソミー型 12)		47,XY,+18 47,XX,+18
(転座型 1)		46,XX,-18,+iso psu dic(18) (p113)
(モザイク型 2)		46,XX/46,XX,-18,+dic(18)
13トリソミー症候群等	6	
(トリソミー型 2)		47,XY,+13 47,XX,+D
(モザイク型 1)		46,XX/47,XX,+D
(転座型 2)		47,XY,-13,+der(13;13)
(部分トリソミー 1)		46,XX,der(13)(q14→q10::q10→qter)
13リング症候群等	2	46,XX,r(13) 46,XX,r(D)
9pトリソミー症候群	2	46,XX,t(9;21) 46,XY,-9,-12,+iso(9p),+der(12)
2pトリソミー	2	46,XY,der(17)t(2;17)(p23;q25)pat 2人
猫なき症候群(5p部分モノソミー)	1	46,XX,del(5)(qter→p14:-)
7pトリソミー+7qモノソミー	1	46,XY,rec(7)dup(7p)inv(7)(p22q34)
ブラダー・ウィリー症候群	1	46,XX,del(15)(q11.1q12)
由来不明部分過剰	6	47,XY,+mar 46,XX,t(9;?) 47,XX,+mar 46,XX/46,XX,add(15)
均衡転座保因者	34	45,XX,der(14;21) 45,XX,der(13;15) 45,XX,der(13;21) 46,XY,t(8;21) 46,XY,t(1;7) 46,XY,t(2;17) 46,XX,t(9;21) 46,XX,t(4;18)
逆位保因者	3	46,XX,inv(7)(p22q34) 46,XY,inv(8)(p21q24.2)
ファンコニー貧血	1	切断、ギャップが多い
白血病	21	46,XY,t(9;22)(q34;q11) 46,XX/46,XX,Ph+ 45,XX,-7/46,XX 47,XX,+19 47,XXX,t(4;11) 48,XX,+21,+mar
悪性腫瘍を持つ	1	不特定の染色体異常を持つ
計 (人)	197	(197人/1,561人 全体に占める異常率12.6%)
・性染色体異常		
クラインフェルター症候群	6	
(トリソミー型 5)		47,XXY
(モザイク型 1)		46,XY/47,XXY
ターナー症候群	20	
(モノソミー型 5)		45,X
(モザイク型 15)		45,X/46,XX 45,X/47,XXX 45,X/46,X,r(X) 45,X/46,X,del(X)
トリプルX	2	47,XXX
半陰陽	3	45,X/46,XY
計 (人)	31	(31人/1,561人 全体に占める異常率 2.0%)

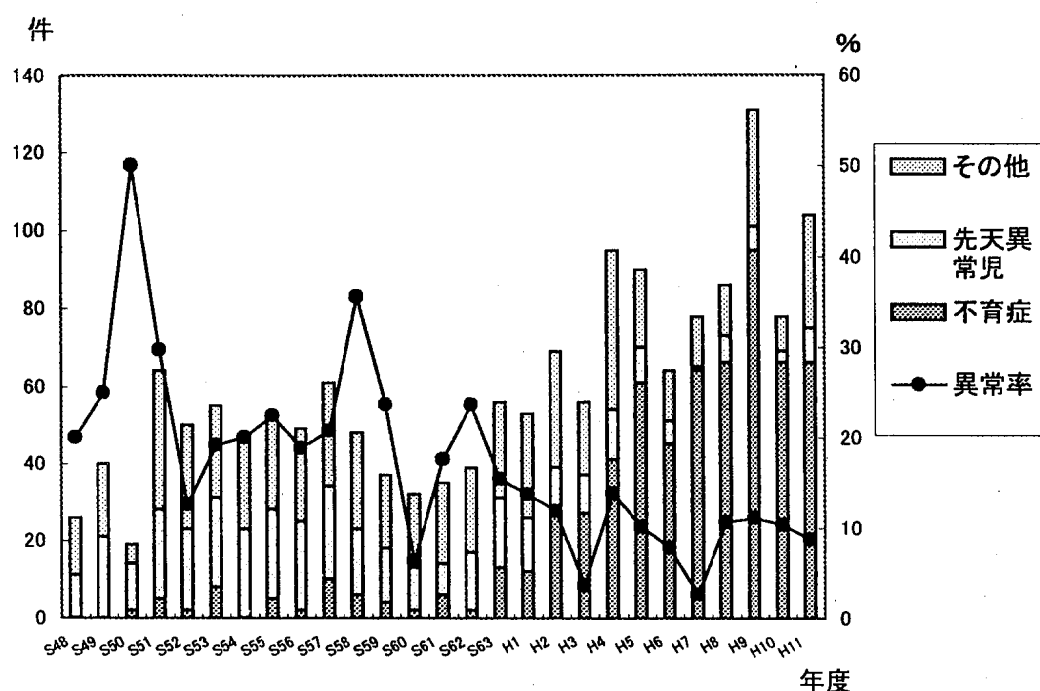


図8. 依頼理由と異常率の推移

親の検査を行うこともあったので、反復流産の原因検索の一環として染色体検査を事前に取り入れることが望まれた。

また、体外受精技術の発展に伴う施行側の増加とともに、体外受精不成功による不育症の理由の依頼も増加した。しかし、その理由で染色体異常は発見されなかった。古典的染色体異常（21トリソミー、18トリソミー等）の疑いではその疑いと染色体異常の一致率が高かったが、単に先天奇形を主訴とした場合、その異常率は10.3%と低かった。また、ターナー症候群の場合、臨床的にやや典型例と思われた例（15/29）では51.7%と高異常率であったが、典型的ではない原発性無月経、続発性無月経や生理不順等を含める（19/100）とその異常率は19%になった。最近の研究から、ターナー症候群ではその臨床症状の幅は従来考えられていたよりも広いと認識されるようになってきている。実際、正常に妊娠・出産を繰り返した例や身長体重も正常範囲以内で外見からは診断が付きにくい例も経験しているところであり[8]、検査を行う立場からはその辺もふまえ、低頻度モザイクの見逃しなどに注意していかなければなら

ないと考えられた。

発見された染色体異常の主な核型と人数を表6に示したが、ダウン症候群が最も多く101人（44.3%・101/228）であった。常染色体異常197人のうち、先天異常児が134人（68%）、均衡転座等保因者39人（19.8%）、白血病等24人（12.2%）であった。性染色体異常31人中、ターナー症候群20人（64.5%）、クラインフェルター症候群6人（19.4%）、他5人（16.1%）であった。

年度別の依頼理由と異常率の推移については検査数の顕著な増加に関わらず、異常数の増加は少ないため、異常率はかえって減少傾向にあった（図8）。この理由として検査開始当初は異常率の高い先天異常児の確定診断が主であったのに対し、最近では反対に異常率が比較的低い反復流産・不育症の夫婦の検査が多くなってきたためであった。これには医学の進歩とともに女性の社会進出等の社会的背景も影響を及ぼしているものと推察された。

染色体検査自体は一般化してきたが、臨床症状との不一致、低頻度モザイクの見逃し、本当に正常か？、依頼理由の高度化によるFISH法の応用

平成12年10月1日

例の増加などの問題点が生じてきている。今後はFISH法の応用と限界に挑戦するためにも画像解析装置などの導入が望まれた。

謝辞：18ph+ 症例における金沢医科大学尾崎守先生のご協力に深謝いたします。また、各症例の臨床像のご提供と採血に対しご協力いただきました各病院等関係の方々に深謝いたします。

文 献

1. 涌井敬子 (1999). 第6回臨床細胞遺伝学セミナーテキスト, 35-43.
2. 福嶋義光, 涌井敬子 (1996). 臨床染色体診断法, 207-231, 金原出版.
3. Seabright, M. (1971). Lancet, 2, 971-972.
4. 前川雅彦, 新宅香織, 山下達夫 (1997). 臨床FISHプロトコール, 79-84.
5. 本田幸子, 林美貴子, 大江浩, 北村敬 (2000). 富山衛研年報, 22, 68-73.
6. 月野隆一 (1994). 臨床遺伝医学, 172-173.
7. 児玉善明 (1996). 臨床染色体診断法, 26-37, 金原出版.
8. 林美貴子, 本田幸子, 鏡森定信 (1995). 母性衛生, 36 (2), 287-292.

ヒト染色体に関する調査研究 平成11年度 —羊水・流産胎児—

本田 幸子 林 美貴子
大江 浩 北村 敬

Chromosome Analysis of Amniotic Fluid Cells and Fetal Cells

Sachiko HONDA, Mikiko HAYASHI,
Hiroshi OE and Takashi KITAMURA

要 旨 平成11年度の羊水および自然流産胎児細胞の染色体の検査は、受付件数が羊水64件、流産胎児24件で、昭和49年度から併せると、羊水1,036件、流産胎児157件となった。検査の結果、今年度は染色体異常が、羊水に3件(47,XY,+21, 46,XY,?del(4), 46,XY,t(14;21)), 流産胎児に11件(45,X:2件, 47,XX,+3, 47,XY,+3,t(3;13), 47,XY,+8, 46,XY,rec(8) 47,XY,+16, 48,XY,+16,+22, 47,XY,+18, 47,XX,+21, 69,XXX)みられた。羊水では全年度で45件の異常が、流産胎児では56件の異常がそれぞれみられている。染色体検査依頼の理由(主訴)は、羊水では高齢妊娠、胎児に異常が疑われる、染色体異常児出産既往等、流産胎児では習慣流産既往等が多かった。

富山県においては、昭和48年度から、富山県総合母子保健対策の一環として、染色体検査事業が実施され、当研究所においては、48年度から血液による検査が始まり、49年度からは羊水、さらに50年度からは自然流産胎児組織、絨毛組織等が加わり、染色体検査が行われてきた[1]。

ここに平成11年度の羊水、流産胎児の検査結果をまとめ、報告する。

実 施 方 法

1. 羊水

染色体標本作成法は、羊水10ml以上を静置後、沈澱した細胞に培養液(チャン培地)を加え再浮

遊し、シャーレ(35mm)2枚以上になるようにし、炭酸ガス培養を行った。5~7日間静置培養後、倒立顕微鏡で細胞の増殖状況を観察し、適当な時期に培養液の交換を行い、コロニーの増大を待ち、分裂中期の細胞が多いことを確認してコルセミド処理を行った。トリプシン液で細胞を遊離後、遠心分離し、細胞を集め、低張処理(0.075 M 塩化カリウム 3 : 0.9% クエン酸ナトリウム 1)を行った。固定液(カルノア液)は2回交換し、パスツールピペットでスライド上に滴下し、蒸気乾燥した。染色は通常のギムザ染色およびGバンド分染を行い、必要により、Cバンド法による分染やクロモゾームペインティング法を施行した。1検体につき10個以上の中期核板の顕微鏡写真を撮り、判定した。

2. 自然流産胎児

検体はおもに流産胎児の皮膚、肺等の組織、および胎児の付属物として、絨毛、羊膜等の組織であった。これらは、大きさによりハサミで細切し、シャーレ(Plastic petri dish 35x10mm)の上に並べ、培養液を添加し、培養を行った。小さな組織片はピペットで攪拌し、細胞懸濁液を作り、それをシャーレに分注し、同様に培養した。培養液はChang 培地を用い、炭酸ガス培養を行った。倒立顕微鏡下で細胞の増殖状況を観察しながら、適当な時期に培養液の交換を行った。以下は羊水細胞と同様の方法で標本作成を行い、染色体分析を行った。

結果および考察

1. 羊水

今年度の染色体検査受付数は64件で、その内訳は、富山県の医療施設の産婦人科から63件、石川県から1件であった。染色体分析は全てが可能であった。検査開始時から平成11年度までの検査総数は1,036件となった。表1に今年度の検査依頼機関と受付件数を示した。

染色体分析の結果、今年度は下記の染色体異常3件(症例1～3)がみられた。

表1. 染色体検査依頼病院(羊水・流産胎児)
(平成11年度)

県	病 院	羊水	流産胎児
富山県	県立中央病院	15	10
	富山医科薬科大学	13	2
	済生会高岡病院	11	3
	厚生連高岡病院	6	
	富山市民病院	7	
	黒部市民病院	5	4
	富山赤十字病院	1	3
	高岡市民病院	1	1
	氷見市民病院	1	
	砺波総合病院	1	1
	あさひ総合病院	1	
	菅田産婦人科医院	1	
石川県	珠洲総合病院	1	
計(件)		64	24

〈症例1〉

年齢・妊婦：39歳

夫：40歳

羊水採取時の妊娠週数：17週

主訴・依頼理由：高齢妊娠

既往歴・他：4回目の妊娠(男児2人、女児1人
出産)

分析結果：47,XY,+21(ダウン症候群)

経過・予後等：中絶(21週)を希望、流産胎児の
顔貌はダウン症様、染色体検査は
未実施

〈症例2〉

年齢・妊婦：32歳

夫：36歳

羊水採取時の妊娠週数：21週

主訴・依頼理由：14/21 転座型保因者

既往歴・他：4回目の妊娠(前児ダウン症、自
然流産1回)

核型分析結果：46,XY,der(14;21)(q10;q10)
(ダウン症候群)

経過・予後等：

〈症例3〉

年齢・妊婦：30歳

夫：38歳

羊水採取時の妊娠週数：34週

主訴・依頼理由：子宮内胎児発育遅延、単一臍帯
動脈、心奇形、

既往歴・他：2回目妊娠

核型分析結果：46,XY,? del(4)(p16)

経過・予後等：胎児死亡、外表奇形(口蓋裂等)、
児の染色体分析未実施

そのほか、異常とはならなかったが、判定に苦慮した症例が3件あった。その核型は 46,XX,inv(1)(p11;q12),ph+で、1番染色体二次狭窄部が長く、しかも完全逆位となっていた。他の2件は

表2. 羊水検査依頼の理由および検査結果 (平成11年度)

理由 (主訴)	検査件数	異常件数	異常核型
高齢妊娠	35	1	
35歳未満	3		
35 - 39 歳	26	1	47,XY,+21* ¹
40歳以上	6		
胎児異常の疑い	10	1	
胎児水腫	4		
胎児後頭部浮腫	1		
胎児頸部肥厚	1		
心奇形	1		
双胎間輸血症候群	1		
発育遅延	1	1	46,XY,?del(4)* ³
ポルフィリン症疑い	1		
染色体異常児出産既往	10		
21トリソミー	5		
18トリソミー	2		
13トリソミー	1		
17トリソミー	1		
パリスタキリアン症候群?	1		
親戚に染色体異常保有者	3		
転座保因者	2	1	
妻 14/21	1	1	46,XY,t(14;21)* ²
妻 2/19	1		
トリプルマーカー高値	2		
親戚に筋ジストロフィー症	1		
強い希望	1		
計 (件)	64	3	

*1~*3 症例1~症例3

46,XY,22pstk+, 46,XX,22pstk+でいずれも22番染色体短腕のサテライトストークスが長い症例であった。最終的にはすべてが正常範囲と考えられたが、判定途中には夫婦の血液の分析も行い、その染色体が親由来であることを確認してから決定した症例であった。

今年度の検査依頼 (主訴) の内訳を表2に示した。検査依頼の理由の中で一番多いのは、高齢妊娠の35件で、受付件数の54.7%にあたる。その年齢は34歳から44歳で、年齢分布では、37歳が一番多くなっている (表3)。母親の加齢と共に異常の出生率が高くなることはよく知られているが、今年度は、このうち1件 (症例1) に異常が見ら

れた。検査開始から、今年度までに当所においてみられた染色体異常45件のうち、高齢妊娠を主訴とした異常件数は10件であり、その核型は全てトリソミー型の異常となっている。

次に多いのは、胎児に奇形等の異常が疑われるという理由で、10件依頼があり、そのうち1件に異常が見られた (症例3)。

同じく10件で、以前に染色体異常児 (両親由来ではない染色体異常) を出産した経験者が続いた。前児の染色体異常の内訳は、21,18,17,13トリソミーとパリスタキリアン症候群 (後に検討したところ12pトリソミーと考えられる) であった。今回、これらに異常はみられなかった。

表3. 母体年齢別の染色体検査依頼状況（羊水・平成11年度）

年 齢 (歳)	受付総数 (分析総数)	高齢依頼数	異常数	異常の核型
23	1			
24				
25				
26	2			
27	5			
28	2			
29	2			
30	1		1	46,XY,?del(4)(p16)
31	4			
32	4		1	46,XY,der(14;21)*
33	1			
34	5	3		
35	3	3		
36	4	4		
37	11	9		
38	4	3		
39	8	7	1	47,XY,+21
40	5	4		
41	1	1		
42				
43				
44	1	1		
計 (件)	64	35	3	

* 親の染色体転座保因による異常

次に多いのは、親戚に染色体異常保有者がいるという理由で、3件の依頼があった。検査の結果異常は見られなかった。

さらに、均衡転座染色体保因者の依頼が2件あり、このうち1件は転座型ダウン症候群であることが判明した（症例2）。

そのほか、トリプルマーカ－高値2件、親戚に筋ジストロフィー患者がいるため、本人の強い希望、とそれぞれ1件づつ依頼があり、これらに異常は見られなかった。

羊水等の染色体検査には、母体細胞混入の危険性があること、染色体異常がすべて把握されるわけではないこと、異常を発見してもほとんどが治療困難であること、などの問題もあり、さらに倫理的、社会的な問題等も多く残されている。

最近の染色体分析では、遺伝子診断技術の急激な進歩に伴い、高度な分析を要求されるようになって

ている。当研究所においても、Fish法、クロモゾームペインティング法等の技術の導入を行い、対応している。また、それに伴い、医師の適切な指導や遺伝相談も要求されている。今後、少子化傾向、高齢妊娠の増加等による羊水検査の需要の増大には、これらの結果を総合的に判断できる検査体制が必要と思われる。

2. 自然流産胎児

今年度、受付件数は24件で、すべて分析可能であった（表1）。

平成11年度の検査依頼の理由および受付件数、検査結果等は表4に、母体年齢別依頼状況は表5に示した。今年度は24件中、11件（46％）に染色体異常がみられた。

検査理由で一番多かったのは、過去にも流早産をしたことがあるための10件で、そのうち6件に

表4. 流産胎児検査依頼の理由および検査結果(平成11年度)

理由(主訴)	受付総数 (分析総数)	異常数	異常の核型
習慣性流産	10	6	45,X、47,XY,+3、47,XX,+3,t(3;13) 47,XY,+8、46,XY,rec(8)、48,XX,+16,+22 47,XY,+16
子宮内胎児死亡	7	1	45,X、47,XY,+18、47,XX,+21
胎児奇形・異常	3	3	69,XXX
流産(初)の精査	2	1	
体外受精・顕微授精	1		
羊水過少	1		
計(件)	24	11	

表5. 母体年齢別の染色体検査依頼状況(流産胎児・平成11年度)

年 齢 (歳)	受付総数 (分析総数)	異常数	異常の核型
21	1	1	46,XY,rec(8)
22	1		
23			
24			
25	1		
26	1	1	45,X
27	1		
28	4	1	47,XX,+3,t(3;13)
29			
30	4	2	45,X、47,XX,+21
31	2	1	47,XY,+3
32	3	2	48,XY,+16,+22、69XXX
33			
34	2	1	47,XY,+8
35			
36	3	1	47,XY,+16
37			
38			
39			
40	1	1	47,XY,+18
計(件)	24	11	

異常があり、トリソミー型(+3,+8)2件、モノソミー型、テトラソミー型それぞれ1件の数的異常と転座型異常2件であった。

次に多いのは、子宮内胎児死亡で7件中1件に異常がみられた、

流産した胎児に奇形等の異常が見られたための理由で、3件あり、3件すべてに異常が見られたが、すべて数的異常であった。

次に、流産(初)の原因精査が2件あり、そのうち1件が3倍体の異常であった。

そのほか、顕微授精、羊水過少がそれぞれ1件あり異常は見られなかった。

依頼された流産胎児の週数は7週から23週までにわたっていたが、7~12週が多く、80%を占めていた。

自然流産において報告されている染色体異常胎

児の率は、研究者によりかなりの開きがあり、それは研究材料、集め方、研究方法による違いであるが、妊娠初期に起こった流産胎児の染色体異常の割合が大きいことは一般に認められている。牧野[3]によると、一般に妊娠の15%は流産で終り、その流産の約80%は妊娠3か月以内に起こるとし、自然流産の約28%は染色体異常を持つと報告していることから、例数はまだ少ないが、当所においても、この傾向は、ほぼ一致していると考えられる。

当所における流産胎児の染色体分析はまだ症例数が少ないためこれらの結果から、確たる結論等は論じられないが、一般にいわれているように、かなり染色体異常がみられている。従って、この検査を行うことが、今後の治療方針の決定や、遺

伝相談の資料となり、さらに、母子保健対策事業を進めるために役立つと考えられる。

謝辞：ここに発表した症例の検体採取や調査に御協力を頂いた、各病院の関係の方々に深謝いたします。

文 献

1. 本田幸子, 林美貴子, 北村 敬, (1997). 富山衛研年報. 20,78-84.
2. 古庄敏行(1996), 臨床染色体診断法, 金原出版.
3. 牧野佐二郎 (1979). 染色体, 人類の細胞遺伝, 医学書院, 東京.

富山県内5ヶ所におけるイヨシロオビアブの 1999年の発消長

渡 辺 護

Comparison of the Seasonal Prevalence of
Ororo-Tabanid Fly, *Hirosia iyoensis* at Five
Areas in Toyama Prefecture in 1999.

Mamoru WATANABE

要 旨 1999年に県下5地域において、二酸化炭素誘引キャノピトラップによるイヨシロオビアブの捕獲調査を行った。5地域を概括すると、7月下旬からイヨシロオビアブの発生が始り、8月上旬後半から中旬が多発生期間、8月下旬から少なくなり、9月下旬に終息する消長を示した。

富山県の標高200～700mの山間地渓流域には、夏期、吸血性アブのイヨシロオビアブ(*Hirosia iyoensis*;通称オロロ)が多発生し、地区住民をはじめ山間リゾート地への来訪者に不快な思いを強いている。県では1995年から実践的な駆除研究を開始し、2000年3月にそれらの研究を終了した[1]。この研究の過程で、1999年には県内5ヶ所で本種の発生を調査する機会があったので、その成績について報告する。

調査地と調査方法

各調査地点とも全ステンレス製黒色塗色の据置型、もしくはステンレスパイプ骨格布傘製の機動型キャノピトラップを用い[1]、誘引源としては液化炭酸ガス(1,500ml/分放出)またはドライアイス(2kg/5時間)を用いた。トラップの設置時間は各地点とも15時30分から20時までの間のほぼ4時間であった。

1. 西砺波郡福光町中河内地域：小矢部川刀利ダムの上流、標高355mの「中河内・下」とそこから

500m上流、標高375mの「中河内」の2ヶ所に、前地点ではキャノピトラップ据置型を4台、後地点では機動型6台を用い、7月19日から9月29日まで、ほぼ毎週月曜日に捕獲調査を行った。

2. 東砺波郡利賀村地域：百瀬川流域の標高664mの「国際キャンプ場」において据置型2台、百瀬川を挟んだ標高700～730mの「利賀村スキー場」では機動型7台、山を越え約3km隔てた利賀川流域の標高445m「北島」で据置型、機動型各1台を用い、7月20日から9月24日までほぼ毎週火曜日に捕獲調査を行った。

3. 上新川郡大山町立山山麓地域：常願寺川水系和田川の標高335m「亀谷」で据置型4台、そこから5km上流の牛首谷川に接する標高560mの「立山山麓家族旅行村」では機動型8台を用い、前地点では7月15日から9月25日まで、後地点では7月31日から8月27日までほぼ毎週金曜日に捕獲調査を行った。

4. 中新川郡上市町早乙女湖地域：上市川の標高280mの第2ダム湖「早乙女湖」周囲に機動型4台、ダム湖から約1km上流の標高290mの「豆山橋」に

表1. 1999年富山県内5地域におけるイヨシロオビアブの発生消長の比較

1. 福光町中河内地域			2. 利賀村地域			
調査日	中河内	中河内・下	調査日	キャンプ場	スキー場	北島
7月19日	0.0	0.0	7月20日	0.0	-	-
26日	0.1	0.3	28日	0.0	-	0.0
8月2日	6.5	6.5	8月3日	4.7	5.1	2.0
9日	38.9	43.2	10日	12.9	50.7	46.4
16日	44.8	33.3	17日	43.8	20.8	29.1
23日	5.8	15.1	24日	25.3	17.2	20.8
30日	2.1	0.8	9月1日	4.7	3.1	5.7
9月6日	0.6	0.2	8日	3.2	2.7	5.2
13日	1.2	0.4	14日	0.2	0.5	0.8
20日	0.2	0.1	24日	0.0	0.0	0.0
29日	0.0	0.0				
捕獲実数	16,501	31,069	捕獲実数	2,900	2,594	1,342

3. 大山町立山麓地域			4. 上市町早乙女湖地域			5. 宇奈月町宇奈月湖地域		
調査日	亀谷	旅行村	調査日	早乙女湖	豆山橋	調査日	湖底地点	ボセ谷向
7月15日	0.0	-						
22日	-	-	7月17日	0.0	0.0			
31日	2.1	2.3	30日	1.1	1.0	7月29日	1.0	2.0
8月6日	26.8	17.4	8月4日	12.3	5.4	8月5日	34.9	22.3
13日	55.3	64.2	11日	45.7	40.9	12日	42.7	37.1
20日	9.8	13.4	18日	24.0	26.9	19日	20.3	34.5
27日	2.9	2.7	25日	12.8	11.1	26日	1.0	4.1
9月3日	2.1	-	31日	1.7	8.3			
10日	0.6	-	9月9日	2.4	6.5			
18日	0.1	-	16日	-	-			
25日	0.0	-						
捕獲実数	9,521	695	捕獲実数	1,231	2,395	捕獲実数	2,322	1,639

注. 捕獲は全ての地域で二酸化炭素誘引キャノピットラップを用い、ほぼ15時～20時の間行なった。

1. の中河内は機動型6台、中河内・下は据置型4台、2. の利賀国際キャンプ場は据置型2台、スキー場は機動型7台、北島は機動型、据置型各1台の2台、3. の大山町亀谷は据置4台、家族旅行村は機動型8台、4. の上市早乙女湖は機動型4台、豆山橋は機動型2台、5. の宇奈月ダム湖底では据置型4台、上流ボセ谷向いは機動型2台の捕獲数を合計して捕獲実数とし、それを母数にして相対比で発生消長を示した。

網掛け数字は最大の捕獲比率を示したことを表す。

-は降雨などで調査を行わなかったことを示す。

機動型2台を配し、7月17日から9月16日までは毎週水曜日に捕獲調査を行った。

5. 下新川郡宇奈月町宇奈月湖地域：黒部川の標高205mに完成した宇奈月ダム、その貯水前の「湖底」に据置型4台、それより2km上流の標高220m「ボセ谷の向い」に機動型2台を配し、7月29日から8月26日までは毎週木曜日に捕獲調査を行った。

なお、上市町早乙女湖地域および宇奈月湖地域は、全てのトラップでドライアイスを用い、他の3地域では据置型には液化炭酸ガス、機動型にはドライアイスを用いた。

結果および考察

表1に各調査地域での、調査期間中に得られた捕獲数を100として、各々の調査日の捕獲割合を示した。

1. 中河内地域の「中河内」では8月9日と次週の16日で全体の83.7%が捕獲され、同じ様に「中河内・下」では76.5%が捕獲された。それぞれに前後の8月2日と8月23日を加えると、「中河内」では実に全体の96.0%、「中河内・下」では98.1%に達する。この両地点の消長曲線を図1に示した。「中河内」では最多捕獲日が「中河内・下」よりも1週間遅く、9月の捕獲数がわずかに多く推移するが、

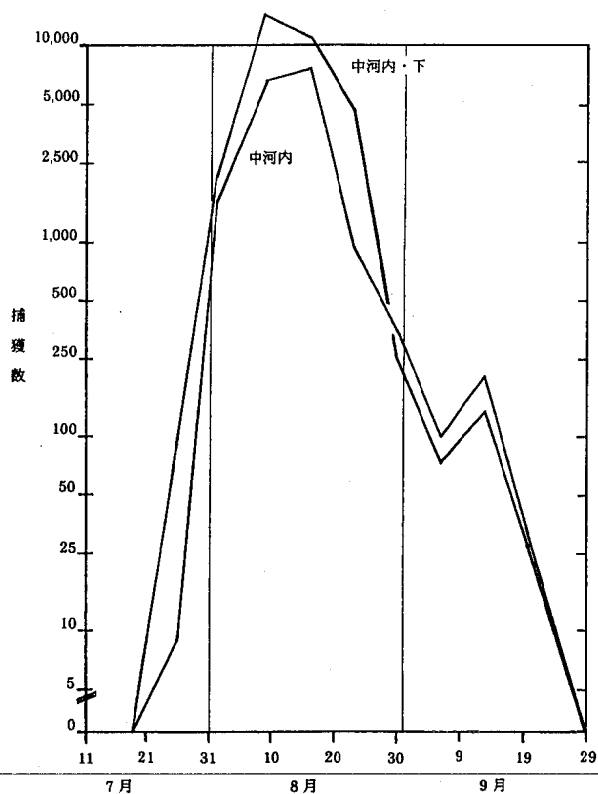


図1. 福光町中河内地域におけるイヨシロオビアの発消消長(1999年)

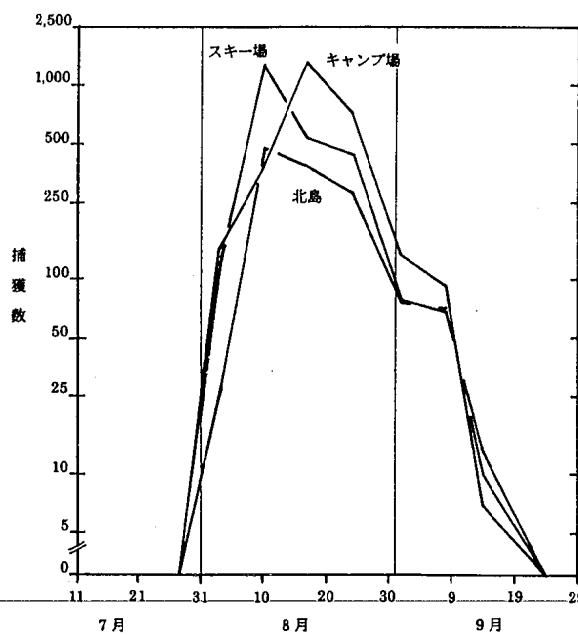


図2. 利賀村地域におけるイヨシロオビアの発消消長(1999年)

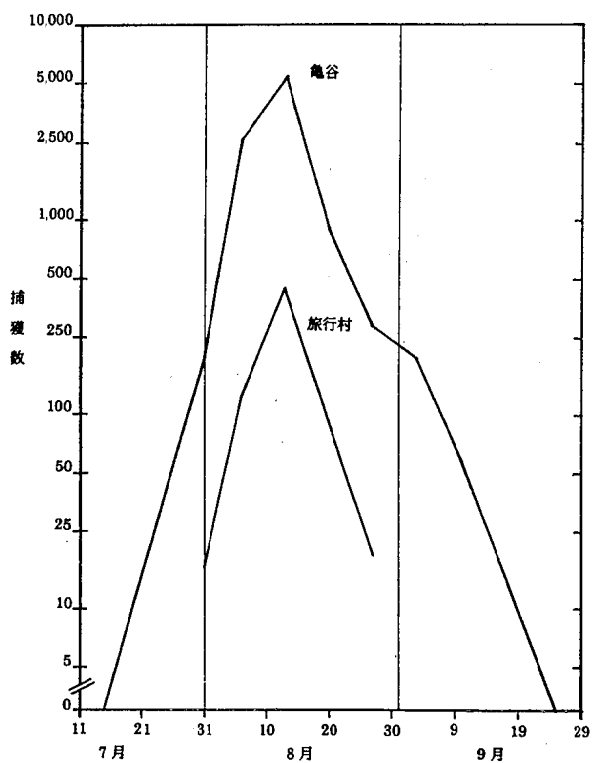


図3. 大山町立山麓地域におけるイヨシロオビアの発消消長(1999年)

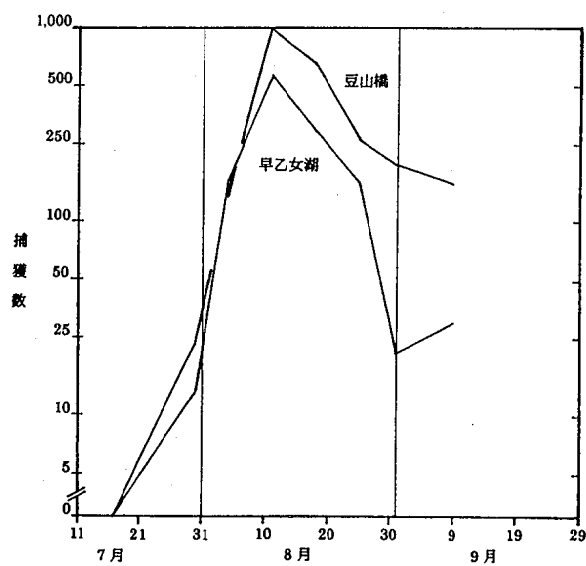


図4. 上市町早乙女湖地域におけるイヨシロオビアの発消消長(1999年)

多発期間が短い消長を示した。一方、「中河内・下」は最多捕獲日が早く、しかも多発期間が長い。9月の捕獲数は少ないことが示された。捕獲実数は「中河内・下」の方が2倍も多かった。

2. 利賀村地域の「キャンプ場」は8月17日と24日の2回の調査で全体の74.1%、8月10日を加えて87.0%になり、「スキー場」では8月10日と8月17日の2回で71.5%、8月24日を加えて88.7%になった(表1)。「北島」は8月10日と8月17日の2回で65.5%、8月24日を加えて86.3%になった。図2に消長曲線を示したが、「キャンプ場」と「スキー場」は百瀬川を挟んで300mしか離れていないが、「スキー場」地点が「キャンプ場」地点よりも1週間早く、捕獲数が推移したといえる。「北島」地点も捕獲実数は前2地点に比べ、約半分と少ないが、捕獲推移は「スキー場」と同じ傾向を示した。

2. 大山町立山山麓地域の「亀谷」は8月6日と8月13日の2回の調査で全体の82.6%を占め、8月20日を加えると92.4%に達した(表1)。「亀谷」から5km上流の「旅行村」地点は8月のみの調査で、各調査日の捕獲比率が前地点と微妙に異なると考えられるが、8月6日と8月13日の2回の調査で全体の81.6%、8月20日を加えると95.0%に達した。図3に両地点の消長図を示した。発生の日が前述の2地域に比べ、急峻に見え多発期間が短いことが示唆される。「旅行村」の捕獲実数は「亀谷」の約1/14と少なく、今回の調査を行った11地点の中で最も少なかった。

4. 上市町早乙女湖地域の「早乙女湖」は8月11日と8月18日の2回の調査で全体の69.7%、8月25日を加えて82.5%、さらに8月4日を加えると94.8%に達した(表1)。1km上流の「豆山橋」地点は8月11日と18日で67.8%、8月25日を加えて78.9%、さらに8月31日を加えても87.2%である。図4に発生消長曲線を示した。最多捕獲日は両地点とも8月11日と同じであったが、「豆山橋」は8月後半から9月前半に掛けて「早乙女湖」よりも捕獲数が多く、捕獲割合も高い(表1)。これは「早乙女湖」地点でキャノピトラップによる誘殺駆除作業を、8月25日から30日まで行った影響が現れたためと思われる。捕獲実数は「豆山橋」の方が

約2倍も多かった。

5. 宇奈月町宇奈月湖地域では7月29日から8月26日までの約1ヶ月の調査のみであるが、「湖底」では8月12日と19日の2回の調査で77.6%、8月19日を加えると97.9%に達した(表1)。2km上流の「ボセ谷向い」では8月12日と19日の2回の調査で71.6%、8月5日を加えると93.9%になった。図5に発生消長曲線を示した。「湖底」地点が調査

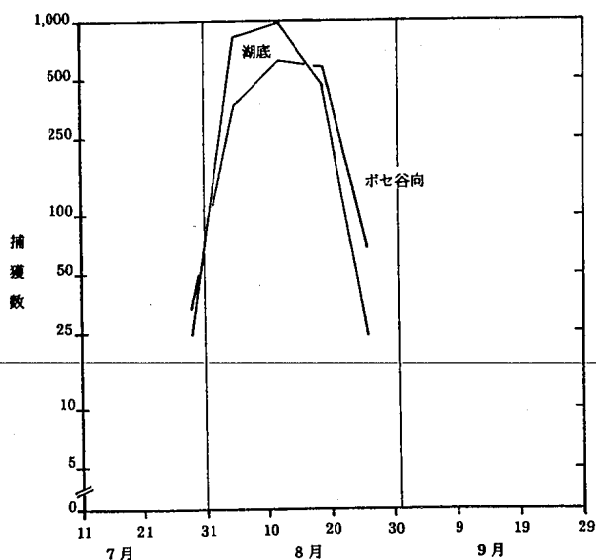


図5. 宇奈月町宇奈月湖地域におけるイヨシロビの発生消長(1999年)

前半に多く推移し、「ボセ谷向」地点は後半に多く推移した。これは前地域と同様、「湖底」地点において8月19日～21日にキャノピトラップによる誘殺駆除作業を行ったため、その影響が現れたと思われる。捕獲実数は「湖底」地点が「ボセ谷向」の約1.5倍捕獲された。

5 地域全体を、同日に同一方法で調査を行っていないので、完全な比較は出来ない要素が存在するが、富山県西部の1. 福光町中河内地域、2. 利賀村地域では8月9-10日から急激に発生数が増加し、その日か次週の16-17日が最多捕獲日になっている。一方、県中央部・東部の3. 大山町立山山麓地域、4. 上市町早乙女湖地域、5. 宇奈月町宇奈月湖地域では8月4-6日から発生数が顕著に多くなり、次週の11-13日が最多捕獲日になり、さらに翌週の18-20日まで多数が捕獲さ

れた。この様に、富山県におけるイヨシロオビアブの発生活長は、県東部でやや早く推移する傾向がみられたが、県下全体を概括すれば、7月25日頃に発生が始り、8月5日前後から多くなり、9日から17日頃に最大に達し、8月26日頃から少なくなり始め、9月25日前後に終息する、消長を示すといえる。8月5日から25日までが多発生期間で、山間リゾート地でのイベントはこの間を避けるのが望ましいと言える。なお、この成績は1999年であり、1998年はこの消長よりも1週間早めに推移した[1]。年度による消長推移の相違、および同一地域における地点間の最多捕獲日のズレなどについては今後検討する予定である。

山県では7月下旬からイヨシロオビアブが発生し始め、8月上旬後半から中旬が多発生期間、8月下旬から少なくなり、9月下旬に終息する消長を示した。

謝辞：調査に多大なご協力をいただいた利賀ふるさと財団アウトドア部、立山山麓家族旅行村、上市町国体室、黒部川水のコンサート実行委員会に厚く御礼申し上げます。また、日頃から適切な助言で励ましを頂いている北村 敬所長、大江 浩部長に深謝致します。また、実際の調査などに協力をいただいた品川保弘博士、安藤秀二博士に厚く感謝いたします。

ま と め

1999年に県下5地域において、二酸化炭素誘引キャノピトラップによるイヨシロオビアブの捕獲調査を行った。その結果、完全な同一条件で捕各調査を行っていないこともあり、各調査地域・地点によって発生活長曲線が微妙に異ったが、富

引用文献

1. 渡辺 護, 品川保弘, 安藤秀二, 北村敬(2000), オロロ(イヨシロオビアブ)の駆除に関する調査報告書, 富山県におけるイヨシロオビアブの吸血被害阻止に関する実践的研究, 105pp. 富山県厚生部薬務食品課。

日本脳炎流行予測調査

渡辺 護, 長谷川 澄代, 高田 ちはる¹

Epidemiological Surveillance of Japanese
Encephalitis in Toyama Prefecture in 1999

Mamoru WATANABE, Sumiyo HASEGAWA
and Chiharu TAKADA¹

要 旨 日本脳炎の発生および流行を監視する目的で、富山県内6か所の畜舎定点において6月から9月までの4ヶ月間、コガタアカイエカの捕集調査を行うと共に、食肉総合センターに搬入される豚の日本脳炎HI抗体保有調査を行った。

蚊の捕集数は全6定点で前年よりも減少した。とくに、黒部、上市、富山の3定点で前年度の31～55%と顕著に減少した。福野、小矢部の2定点の減少は前年度比の84、90%とそれほど大きくはなかった。大山定点は72%の減少であり、概して県東部で減少が著しく、県西部では小幅であったと言える。

発生病長曲線は各定点で異なっていたが、全6定点で9月初旬に最大の捕集数を示した。

豚血清の日本脳炎ウイルスHI抗体調査では、8月17日に抗体保有豚がみられたが、その後1ヶ月間みられなくなった。9月21日から再びみられるようになると共に、2-ME感受性の豚が認められた。

日本脳炎患者の発生はみられなかった。

富山県では1昨年(1997年)、1982年以来の日本脳炎患者が氷見市で確認されると共に、コガタアカイエカの増加傾向が1997～98年と続いた。しかも、8月上・中旬に捕集数が最大になる消長を示した[1]。このようなコガタアカイエカの発生状況と、日本脳炎ウイルスの侵入とが連携する事態になれば、患者発生は今後も起こりうることを示唆される。そこで、患者の発生を未然に防ぐことを目的に、1998年に引き続き日本脳炎ウイルスを媒介するコガタアカイエカの発生状況と、ウイルスの侵入動態を6月から9月まで監視して来たので、その結果について報告する。

I. 蚊の発生調査

1. 調査地と調査方法

蚊の捕集定点は表1に示す通りである。「大山東黒牧」は1998年から新たに開始した定点であり、「黒部荻生」は1998年に、以前の黒部市植木から移動変更した定点である。他の4定点は15～20年間同一である。調査期間、調査方法は前年までと同じで、「富山大井」と「大山東黒牧」は6月1日から9月末日まで、ブラックライト・トラップ(東京エース製)で連日捕集を、他の4定点は6月中旬から9月末まで、基本的に毎週水曜日に前述のトラップを一晩点灯することで行った。

表1. 1999年度における調査地点の概要(平成11年度トラップ設置畜舎の概要)

番号	地 点 名	類別	地 点 の 概 要
1	富山大井	牛舎	富山市大井、合田初男所有。乳牛 24 頭、子牛 4 頭。 平野部水田地帯、北側 500m に新興住宅街がある。 南東 1km に熊野川。近くには他畜舎は無い。
2	大山東黒牧	牛舎	大山町東黒牧上野、畔田 茂所有。乳牛 30 頭。 丘陵稜線部、周辺は大学などの教育機関と雑木林、民 家が点在する。水田は半径 300m の範囲には無い。
3	黒部荻生	豚舎	黒部市荻生、南 進所有、肥育豚 90 頭、親豚 30 頭。 平野部水田・畑作地帯、南西側に幅 10m ほどの黒瀬川、 北東側に養魚場がある。
4	上市湯上野	牛舎	上市町湯上野、稲場栄伸所有。乳牛 48 頭、和牛 20 頭。 水田地帯はずれの丘陵地、背面は杉植林地/雑木林。 西 100m に厩あり、北 300m に上市川。
5	福野二日町	牛舎	福野町二日町、河合精一所有。乳牛 26 頭。 平野部水田地帯、人家、工場などが点在。 近くに他畜舎は無い。西 1km に旅川。
6	小矢部金屋本江	牛舎	小矢部市金屋本江、西田芳夫所有。乳牛 40 頭。 平野部水田地帯、人家点在。近くに他畜舎は無い。 西 500m に宮川。福野定点とは直線距離で 6.5km。

2. 調査結果および考察

表2に各調査定点における毎週水曜日の蚊全体の捕集成績を示し、表3に最近9年間のコガタアカイエカの捕集数を定点別に示した。6定点全てにおいて、前年よりも捕集数が減少した。とくに、県東部の「黒部荻生」では前年の31.3%に、「上市湯上野」でも47.6%にと顕著に減少した。県中央部の「富山大井」は54.5%、「大山東黒牧」は71.6%であったが、県西部の「福野二日町」は83.5%、「小矢部金屋本江」は89.7%と、減少程度は県東部に比べ明らかに小さかった。

1998年度に最もコガタアカイエカ捕集数が多かった「富山大井」は、今年度も最も多く捕集され、6～9月間毎週水曜日集計で52,436個体であった。一方、最も少なかった定点は、「富山大井」から直線距離で2kmしか離れていない「大山東黒牧」で1,319個体、前者の約1/40であった。2番目に多く捕獲された定点は、「小矢部金屋本江」で27,944個体、ついで「福野二日町」の17,676個体であり、県東部に比べ西部での蚊の発生が多い傾向がみられた。

県全体の発生推移状況は、調査開始当初から7

月第4週まで、捕集数の増加速度は1998年よりも明瞭に遅く、しかも、7月第5週と8月第1週は7月第4週に比べ減少した。しかし、8月第4週からは全定点で、捕集数が再び増加傾向を示し、9月第1～2週に捕集数が最大になり、以後徐々に減少し、調査を終了した。

以下、各定点別に捕集結果を述べる。

〔1. 富山大井〕表4に連日捕集成績を示した。調査当初から前年よりも明瞭に捕集数が少なく〔1〕、その傾向は9月末まで続いた。日最大捕集数は毎週水曜日の集計(表2)と同じ、9月1日であり、前年の8月6日より約1ヶ月遅いピークの形成であった〔1〕。第2のピークは8月23日であり、前年よりも7月の生産力が小さく、増加速度が遅いことが示唆された。その事が年間捕集数にも現れ、前年の52.4%、344,498個体に減少したと思われる。

〔2. 大山東黒牧〕この定点は前述の「富山大井」から、直線距離で約2kmしか離れていない丘陵地の稜線上に位置する(標高162m、標高差90m)。また、そのほぼ中間に幅75～100mの熊野川が流れ、それに沿って水田が広がっている。定点牛舎

表2. 6 定点における蚊雌成虫の捕集数(1999年, 平成11年)

調査日	1. 富山大井					2. 大山東黒牧					
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計	
6.16	0	1,003	34	0	1,037	0	25	3	ヤマト	1	29
23	0	56	0	0	56	0	97	4	ヤマト	1	102
30	0	620	15	0	635	0	43	2	ヤマト	1	46
7.7	0	1,546	24	0	1,570	0	13	0	0	0	13
14	0	1,051	41	0	1,092	1	14	0	0	0	15
21	0	2,697	49	0	2,746	0	16	0	0	0	16
28	0	535	10	0	545	0	26	0	0	0	26
8.4	0	1,480	14	0	1,494	0	5	0	0	0	5
11	0	1,716	9	0	1,725	0	19	0	0	0	19
18	0	2,945	6	0	2,951	0	74	1	0	0	75
25	0	3,261	0	0	3,261	0	77	3	0	0	80
9.1	0	17,019	63	0	17,082	0	14	1	0	0	15
8	0	10,665	30	0	10,695	0	135	0	0	0	135
15	0	3,198	0	0	3,198	0	413	0	0	0	413
22	0	4,272	0	0	4,272	0	217	0	オオクロ	1	218
29	0	372	15	0	387	0	131	0	ヤマト	1	132
計	0	52,436	310	0	52,746	1	1,319	14	5		1,339

調査日	3. 黒部荻生					4. 上市湯上野				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
6.16	0	16	0	0	16	0	9	0	0	9
23	0	50	16	0	66	0	43	0	0	43
30	0	125	49	0	174	0	12	2	0	14
7.7	0	82	6	0	88	-	-	-	-	-
14	0	85	4	0	89	0	44	3	0	47
21	0	59	1	0	60	0	106	1	0	107
28	0	304	0	0	304	0	148	0	0	148
8.4	0	216	0	0	216	0	103	0	0	103
11	-	-	-	-	-	0	123	0	0	123
18	0	50	0	0	50	0	46	0	0	46
25	0	175	0	0	175	0	186	0	0	186
9.1	0	182	0	0	182	0	329	0	0	329
8	0	344	0	0	344	0	1,018	0	0	1,018
15	0	168	0	0	168	0	275	0	0	275
22	0	15	0	0	15	0	113	0	0	113
29	0	83	15	0	98	0	121	0	0	121
計	0	1,954	91	0	2,045	0	2,676	6	0	2,682

調査日	5. 福野二日町					6. 小矢部金屋本江				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
6.16	0	108	0	0	108	0	246	0	0	246
23	0	237	4	0	241	0	296	3	0	299
30	0	59	19	0	78	0	104	3	0	107
7.7	0	156	5	0	161	0	742	8	0	750
14	0	164	4	0	168	0	343	1	0	344
21	0	89	0	0	89	0	276	8	0	284
28	0	534	0	0	534	0	641	0	0	641
8.4	0	298	0	0	298	0	257	0	0	257
11	0	1,996	0	0	1,996	0	2,576	0	0	2,576
18	0	552	0	0	552	0	285	0	0	285
25	0	1,528	0	0	1,528	0	2,678	0	0	2,678
9.1	0	3,064	0	0	3,064	0	5,333	0	0	5,333
8	0	4,541	0	0	4,541	0	7,488	0	0	7,488
15	0	2,552	0	0	2,552	0	3,295	0	0	3,295
22	0	1,002	0	0	1,002	0	2,515	0	0	2,515
29	0	796	0	0	796	0	869	0	0	869
計	0	17,676	32	0	17,708	0	27,944	23	0	27,967

As=シナハマダラカ, Ct=コガタアカイエカ, Cp=アカイエカ, その他のヤマトはヤマトヤブカ, オオクロはオオクロヤブカを指す. - はトラップの故障などで捕獲が出来なかったことを示す.

表3. 6 定点における近年のコガタアカイエカ雌成虫の捕集数変動

年度	定 点 名							
	1. 富山大井		2. 大山東黒牧		3. 黒部	4. 上市	5. 福野	6. 小矢部
1991	7,640	51,218	-	-	1,702	14,322	11,273	4,318
1992	9,998	59,735	-	-	1,968	5,025	6,531	5,992
1993	8,827	72,509	-	-	642	1,100	7,112	5,093
1994	26,275	169,307	-	-	13,655	3,527	95,954	94,055
1995	26,247	161,391	-	-	6,398	1,790	10,138	21,751
1996	36,305	275,957	-	-	2,034	1,562	8,617	7,683
1997	23,743	172,373	-	-	7,054	1,466	34,680	45,250
1998	96,196	657,900	1,843	11,814	6,250	5,620	21,157	31,158
1999	52,436	344,498	1,319	11,379	1,954	2,676	17,676	27,944

注. 1. 原則的に6月中旬から9月末までの、毎週水曜日にライトトラップ一晩捕集による成績。

2. 富山大井、大山の右側の数値は、6月1日から9月30日までの連日捕集による成績。

3. 2. 大山は1998年から調査開始、4. 上市は1994年から、3. 黒部は1998年から定点の場所(畜舎)を変更した。

に最も近い水田とは300m離れ、その間の標高差50mの斜面は竹林、雑木林、杉植林地などである。また、牛舎の周辺には畑地、杉植林、雑木林や民家および教育施設がある。これらの環境状況が、調査定点6か所の中で最も捕集数が少ない原因と思われる(表3)。表4に連日捕集成績を示した。日最大捕集日は表2の毎週水曜日集計の、9月15日よりさらに10日も遅い9月25日であった(捕獲数446個体)。ただ、この定点は前年度も日最大捕集日は9月7日であり[1]、他定点に比べ最大捕集日は遅い傾向にある。年間捕集数は前年の96.3%、11,379個体であった。「富山大井」とは年間連日捕集数で1/30(表3)、日最大捕集数で1/38(表4)の捕集差がみられた。しかし、蚊の種類が6種類も認められ、6定点の内では環境の多様性が高いことが示唆される。

[3. 黒部荻生]「黒部植木」から移動して2年目になる。捕集数は前年度よりも明瞭に減少した(表3)。また、日最高捕集数も、前年の8月12日1,808個体に対し、今年は9月8日の344個体であった。発生活消長曲線は9月8日に第1の山、7月28日に第2の山を形成する年2峰型を示した(表2)。

[4. 上市湯上野] 年間捕集数(表3)は前年の47.6%、2,676個体と顕著に減少し、日最高捕集数も前年の8月12日、1,808個体に対し、9月8日の1,018個体、56.3%に減少した。発生活消長曲

線は「黒部荻生」と同様、9月8日に第1、7月28日に第2の山を形成する年2峰型を示した(表2)。

[5. 福野二日町] 年間捕集数(表3)、日最高捕集数(9月8日; 5,541個体)とも前年度(8月12日; 5,733個体)に比べ少なくなった。発生活消長曲線は、前年度の毎週増減を繰り返す複雑な曲線から、9月8日に第1、8月11日に第2の山を形成する、年2峰型を示した(表2)。

[6. 小矢部金屋本江] 年間捕集数は前年度の89.7%、27,944個体に減少したが(表3)、日最高捕集数(9月8日; 7,488個体)は前年度(8月12日; 4,511個体)に比べ顕著に増加した。また、発生活消長曲線も「福野」同様、前年度の毎週増減を繰り返す複雑な曲線から、9月8日に第1、8月11日に第2の山を形成する、年2峰型を示した(表2)。例年、「福野」と「小矢部」は酷似した発生活消長を示すが、今年度も良く似た消長を示した。

最近のコガタアカイエカの発生活消長は、8月上旬に多くなる盛夏発生型、さらに9月中旬にも多くなる初秋追加型であった。しかし、今年度の発生型は9月上・中旬に最も大きな山、7月下旬もしくは8月中旬に第2の山が形成される、これまでは逆の消長曲線を描いた。この違いが生じた原因については、現時点では明らかに出来ないが、1つには今年度の降雨状況が影響している事が推

平成12年10月1日

表4. 2定点におけるライトトラップの連日調査による蚊雌成虫捕集成績(1999年, 平成11年)

調査日	1. 高山大井牛舎					2. 大山東黒牧牛舎				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
6月1日	0	258	7	0	265	0	120	0	0	120
2	0	327	3	0	330	0	50	0	ヤマト	51
3	0	82	0	0	82	0	32	0	0	32
4	0	409	8	0	417	0	31	0	0	31
5	0	179	5	0	184	0	51	0	0	51
6	0	378	10	0	388	0	48	0	ヤマト	49
7	0	141	9	0	150	1	72	0	ヤマト	75
8	0	229	39	0	268	-	-	-	-	-
9	0	128	3	0	131	0	19	0	ヤマト	20
10	0	150	42	0	192	0	10	1	ヤマト	12
11	0	259	22	0	281	0	32	0	ヤマト	33
12	0	424	38	0	462	2	21	0	0	21
13	0	320	42	0	362	0	37	0	0	37
14	0	422	46	0	468	0	23	0	0	23
15	0	883	83	0	966	0	48	2	0	50
16	0	1,003	34	0	1,037	0	25	3	ヤマト	29
17	0	687	21	0	708	0	38	1	ヤマト	39
18	0	111	9	0	120	0	52	0	ヤマト	53
19	0	377	28	0	405	0	20	0	0	20
20	0	220	24	0	244	1	31	1	0	32
21	0	658	27	0	685	0	45	0	ヤマト	46
22	0	728	30	0	758	0	71	0	ヤマト	75
23	0	56	0	0	56	0	97	4	ヤマト	102
24	0	1,112	15	0	1,127	0	87	0	0	87
25	0	997	21	0	1,018	0	210	0	ヤマト	211
26	0	1,007	38	0	1,043	0	179	3	0	182
27	0	773	29	0	802	0	180	4	0	184
28	0	381	21	0	402	0	82	0	0	82
29	0	624	28	0	650	-	-	-	-	-
30	0	620	15	0	635	0	43	2	ヤマト	45
計	0	13,941	693	0	14,634	4	1,732	21	ヤマト	1,755

調査日	1. 高山大井牛舎					2. 大山東黒牧牛舎				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
7月1日	0	601	11	0	612	0	69	2	ヤマト	72
2	0	814	13	0	827	0	18	0	ヤマト	19
3	0	882	14	0	896	0	41	0	0	41
4	0	522	22	0	544	0	44	0	0	44
5	0	1,003	51	0	1,054	0	12	1	ヤマト	14
6	2	1,102	31	0	1,135	0	19	2	0	21
7	0	1,548	24	0	1,572	0	13	0	0	13
8	0	1,690	20	0	1,710	0	14	0	0	14
9	0	2,316	27	0	2,343	0	17	0	0	17
10	0	2,022	19	0	2,041	0	17	0	0	17
11	0	2,858	31	0	2,889	0	22	0	ヤマト	23
12	0	1,785	27	0	1,812	-	-	-	-	-
13	0	1,443	54	0	1,497	0	58	8	0	66
14	0	1,051	41	0	1,092	1	14	0	0	15
15	0	1,148	63	0	1,209	0	31	3	0	34
16	0	1,899	48	0	1,947	0	35	0	0	35
17	0	3,084	72	0	3,156	1	19	0	ヤマト	21
18	0	2,175	39	0	2,214	0	17	1	0	18
19	0	3,847	30	0	3,877	0	35	2	0	37
20	0	1,007	51	0	1,058	0	17	0	0	17
21	0	2,697	49	0	2,746	0	16	0	0	16
22	0	1,503	21	0	1,524	0	19	1	0	20
23	0	1,237	15	0	1,252	0	6	0	0	6
24	0	1,386	16	0	1,402	0	11	1	0	12
25	0	3,125	27	0	3,152	0	10	0	0	10
26	0	2,604	3	0	2,607	0	16	0	0	16
27	0	1,368	5	0	1,373	0	19	0	0	19
28	0	535	10	0	545	0	26	0	0	26
29	0	1,131	2	0	1,133	0	18	0	0	18
30	0	177	0	0	177	0	18	0	0	18
31	0	1,851	27	0	1,878	0	37	0	0	37
計	2	50,407	863	0	51,272	2	708	21	ヤマト	730

調査日	1. 高山大井牛舎					2. 大山東黒牧牛舎				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
8月1日	0	1,834	28	0	1,860	0	18	0	0	18
2	0	824	15	0	839	0	14	0	0	14
3	1	1,630	21	0	1,652	0	11	0	0	11
4	0	1,480	14	0	1,494	0	5	0	0	5
5	0	508	6	0	514	0	5	0	0	5
6	0	119	0	0	119	0	8	0	0	8
7	0	406	1	0	407	0	13	0	0	13
8	0	474	6	0	480	0	12	0	0	12
9	0	320	1	0	321	0	11	0	0	11
10	0	1,578	6	0	1,584	0	15	0	0	15
11	0	1,716	9	0	1,725	0	19	0	0	19
12	0	1,620	38	0	1,658	0	131	0	ヒトスジ	132
13	0	4,908	24	0	4,932	0	48	0	0	48
14	0	8,443	48	0	8,491	0	168	0	ヒトスジ	169
15	0	3,015	15	0	3,030	1	101	0	0	102
16	0	5,883	26	0	5,909	0	108	1	0	109
17	0	3,504	12	0	3,516	-	-	-	-	-
18	0	2,945	6	0	2,951	0	74	1	0	75
19	0	8,831	75	0	8,906	0	42	0	0	42
20	0	8,705	36	0	8,741	-	-	-	-	-
21	0	9,442	27	0	9,469	0	156	0	0	156
22	0	10,281	18	0	10,299	0	111	0	0	111
23	1	14,970	24	0	14,995	0	93	1	0	94
24	0	5,185	11	0	5,178	0	95	0	0	95
25	0	3,261	0	0	3,261	0	77	3	0	80
26	0	6,060	0	0	6,060	0	75	0	0	75
27	0	9,876	6	0	9,882	0	136	1	0	137
28	0	4,716	0	0	4,716	0	276	0	0	276
29	0	8,585	0	0	8,585	0	77	0	0	77
30	0	4,899	0	0	4,899	0	48	0	0	48
31	0	3,726	0	0	3,726	0	3	0	0	3
計	2	137,824	489	0	138,295	1	1,848	7	ヒトスジ	1,855

調査日	1. 高山大井牛舎					2. 大山東黒牧牛舎				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
9月1日	0	17,018	63	0	17,082	0	14	1	0	15
2	1	5,328	12	0	5,341	0	84	1	0	85
3	0	7,410	48	0	7,458	0	114	0	0	114
4	0	3,936	9	0	3,945	0	209	0	0	209
5	0	4,698	24	0	4,722	0	95	0	0	95
6	0	230	0	0	230	0	104	0	0	104
7	-	-	-	-	-	0	43	0	0	43
8	0	10,685	30	0	10,695	0	135	0	0	135
9	0	7,745	24	0	7,769	0	336	0	オオクロ	337
10	0	11,987	36	0	12,033	0	228	0	0	228
11	0	8,026	18	0	8,044	0	363	0	0	363
12	0	6,884	21	0	6,885	0	375	0	0	375
13	0	5,757	12	0	5,769	0	326	0	0	326
14	0	9,872	39	0	9,911	0	324	0	0	324
15	0	3,198	0	0	3,198	0	413	0	0	413
16	0	7,404	12	0	7,416	0	374	0	オオクロ	376
17	0	4,287	0	0	4,287	0	143	0	0	143
18	0	5,523	0	0	5,523	0	302	0	オオクロ	303
19	0	1,503	0	0	1,503	0	310	0	オオクロ	311
20	0	4,104	0	0	4,104	0	187	0	0	187
21	0	4,113	0	0	4,113	0	257	0	オオクロ	258
22	0	4,272	0	0	4,272	1	217	0	0	218
23	0	3,249	0	0	3,249	0	360	0	0	360
24	0	3,474	9	0	3,483	0	427	0	オオクロ	428
25	0	1,168	3	0	1,191	0	446	0	0	446
26	0	738	3	0	741	0	128	0	オオクロ	129
27	0	702	12	0	714	0	99	0	0	99
28	0	476	17	0	493	0	374	0	0	374
29	0	372	15	0	387	0	131	0	オオクロ	132
30	0	357	12	0	369	1	87	2	0	89
計	1	142,329	419	0	142,748	2	7,005	4	オオクロ	7,010

注1. As=*Anopheles sinensis* シナハマダラカ, Ct=*Culex tritaeniorhynchus* コガタアカイエカ, Cp=*Culex pipiens* アカイエカを表し, その他にはカラツイエカ, オオクロヤブカ, ヒトスジシマカ, ヤマトヤブカなどが含まれる。

注2. - はトラップの故障などで調査が出来なかったことを示す。

表5. 富山県における近年の気象要因の変動(富山気象台)

比較因子	月	年 度									平年値
		1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	
平均気温 (℃)	5	16.5	15.1	15.7	17.9	16.6	16.3	17.6	18.6	17.6	16.7
	6	22.1	19.9	19.7	20.7	19.3	21.0	21.5	20.7	20.9	20.5
	7	24.8	24.6	23.2	26.9	25.0	25.1	24.8	25.2	24.9	24.6
	8	24.6	26.1	23.3	29.1	27.7	26.0	26.4	25.5	27.7	26.0
	9	22.5	21.9	20.4	23.3	21.0	21.0	21.4	23.3	24.5	21.6
日照時間 (hrs)	5	169.9	165.5	204.9	214.6	160.1	212.1	167.8	207.0	224.9	200.9
	6	132.5	169.8	100.1	154.8	105.9	117.3	162.5	86.5	137.3	152.3
	7	111.6	164.6	100.2	195.4	122.1	192.2	136.3	130.9	134.5	165.7
	8	142.7	184.3	102.0	285.9	232.4	226.4	199.8	101.6	201.8	200.4
	9	(129)	157.5	112.5	(156)	129.2	150.4	95.5	125.5	129.9	133.9
降 雨 量 (mm)	5	65.5	101.0	180.5	(55.0)	103.0	126.0	197.5	245.5	132.5	124.8
	6	328.0	185.5	179.0	50.0	116.5	305.0	143.0	135.0	247.0	196.9
	7	274.5	113.5	283.0	29.5	536.5	60.5	325.0	161.5	88.0	241.9
	8	276.5	137.0	328.0	18.0	176.0	149.0	129.5	630.5	155.0	176.6
	9	130.0	92.0	243.5	208.5	80.5	159.0	213.0	303.0	424.5	233.1

注. 1. 日本気象協会富山支部発行の「富山県気象月報」から富山気象台のデータを用いた。

2. () 内の数値は欠測があったことを示し、参考に伏木気象台のデータを用いた。

3. 網掛け数字は前年および平年値と著しく異なることを示す。

表6. 1999年豚血清における日本脳炎ウイルスのHI抗体保有状況(平成11年度)

検 体 採取日	抗 体 価								2-ME 感受性 陽性数
	<10	×10	×20	×40	×80	×160	×320	≥640	
7月13日	20 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0
27日	20 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0
8月3日	20 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0
10日	20 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0
17日	19 (95.0)	0	1 (5.0)	0	0	0	0	0	0
24日	20 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0
31日	20 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0
9月7日	20 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0
14日	20 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0
21日	18 (90.0)	0	0	0	0	0	0	2 (10.0)	2 (100)
28日	19 (95.0)	0	0	0	1 (5.0)	0	0	0	0 (0.0)
10月5日	12 (60.0)	0	0	0	2 (10.0)	3 (15.0)	3 (15.0)	0	2 (25.0)
12日	11 (55.0)	0	0	1 (5.0)	2 (10.0)	4 (20.0)	2 (10.0)	0	0 (0.0)
計	239 (91.9%)	0 (0.0)	1 (0.4)	1 (0.4)	5 (1.9)	7 (2.7)	5 (1.9)	2 (0.8)	4 (20.0)

注. 1. 抗体価10倍以上を陽性とみなし、さらに40倍以上を示した血清について2-メルカプトエタノール(2-ME)処理を行ない、ウイルスの新鮮感染を検討した。

2. 表中の数字は観察実数を表し、括弧内の数字はパーセントを示す。

定される。すなわち、6月に雨が多く、7月に少なく、さらに9月に多くなる推移を示したことは(表5)、7～8月のコガタアカイエカを例年に比べ少なくさせた原因と思われ、相対的に9月の捕獲数が目立ったためと思われる。県東部と西部とでの捕獲数の減少程度の相違についても、気象状況が微妙に異なっていることが考えられる。

II. 豚血清の日本脳炎HI抗体保有調査

1. 調査対象と検査方法

7月13日から10月12日まで、毎週火曜日に富山食肉総合センターに搬入される生後6か月の県内産(主として小矢部市と氷見市)の豚を対象として毎回20頭から血液を採取して、日本脳炎の抗体保有状況を調査した。抗体価の測定は、例年のごとく伝染病流行予測検査術式[2]に従った。被検血清は2回アセトン処理を行い、非特異的な凝集抑制物質(インヒビター)を除去し、市販の日本脳炎ウイルスJaGAr 01株(デンカ生研)を抗原として、赤血球凝集抑制反応(HI)で抗体価を測定した。血球はガチョウの赤血球を用い、反応はマイクロタイター法で行った。

2. 調査結果および考察

採血日とHI抗体価の測定結果を表6に示した。豚の採血は毎週20頭としていたが、9月16日と9月29日はそれぞれ10頭のみであった。

最初の採血日の7月7日から4回目の7月28日まで、抗体を保有している豚は認められなかった。5回目の8月4日に初めて抗体保有豚が出現したが、保有率は15%(3/20)で、抗体価も10倍と低い値であった。8月18日には3頭の陽性豚が出現し、その内の2例は160倍、320倍と高い抗体を保有していた。さらに、160倍の豚は2-ME感受性が擬陽性であったが、320倍の豚は2-ME感受性が陽性であり、新鮮感染であることが確認された。その後、8月25日にも抗体保有豚が認められたが、10～20倍という低い抗体価であった。9月1日には抗体保有率が0%になったが、翌週から調査終了の9月29日まで保有例が出現した。9月8

日は抗体保有率が30%(6/20)で、抗体価40倍以上の4例の内、3例が2-ME感受性であった。一方、9月16日の抗体保有率は100%で、しかも全例が80倍以上の抗体価であったが、2-ME感受性例は認められなかった。9月22日は抗体保有率60%で、12例の内3例が2-ME感受性であった。最終採血日の9月29日は採血された豚は10頭であったが、全ての豚が40倍以上の抗体を保有しており、320倍の抗体を保有していた1頭が2-ME感受性であった。

前年の場合は、9月上旬に高い抗体価の豚が出現し、それ以降2-ME感受性である日本脳炎新鮮感染の豚が最終採血日まで出現した。今年は2週間早い8月18日に抗体価の高い豚が出現し、それ以降2-ME感受性である新鮮感染の豚が、最終採血日まで断続的に認められた。このことから今年は前年に比べ、2週間も早く日本脳炎ウイルスが富山県内に侵入し、少なくとも9月下旬まで豚の間に拡大していったと推定され、前年(前述のごとく9月14日に氷見市で患者1名発生)よりも日本脳炎患者が発生しやすい危険な状況と思われたが、患者発生は無かった。この原因については、現段階では明瞭な答えを導き出せず、今後の課題として残っている。

ま と め

今年度の蚊の発生状況、豚のHI抗体保有推移は日本脳炎患者が発生した1997年、および1998年の状況と大きく異なった。それが大きな原因で、日本脳炎に罹患する人達が無かったと推定される。すなわち、蚊の発生量が1997、98年に比べ、顕著に少なく、しかも発生のピークが9月にずれ込んだこと、さらに、豚における日脳ウイルスの増幅拡大が遅れ、ウイルスを保有した蚊に刺される事態が、7～8月の盛夏には起こらなかったことが考えられる。この事は逆に、コガタアカイエカの発生量が、とくに7～8月に多く、しかも日本脳炎ウイルスが豚の間で7月に感染、その後急速に増幅拡大する状況にな

れば、日本脳炎患者が発生することを示唆するものと考えられる。

謝辞：本調査の実施にあたり、ご協力を頂いている各定点畜舎、関係保健所・支所および食肉総合センター・検査所の各位に深謝いたします。

文 献

1. 渡辺 護, 長谷川 澄代, 林 ちはる(1999), 富山衛研年報, 22, 80-90.
2. 厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室(1986), 伝染病流行予測検査術式, 57-80, 東京.

ポリオ流行予測調査

中山 喬 安藤 秀二 松浦久美子
北村 敬 高島アリ子¹ 田中桂子²
荻浦泰也³ 松田和久⁴ 沼田直子⁵

Epidemiological Surveillance of Poliovirus in Toyama Prefecture

Takashi NAKAYAMA, Shuji ANDO,
Kumiko MATSUURA, Takashi KITAMURA,
Ariko TAKASHIMA¹, Keiko TANAKA²,
Yasunari OGIURA³, Kazuhisa MATSUDA⁴
and Naoko NUMATA⁵

要 旨 平成11年度は、厚生省委託事業としては感染源調査のみをおこない、感受性調査は県単独事業として実施した。感染源調査は、ポリオワクチン接種後2カ月以上経過した時点で、1歳から6歳までの乳幼児から糞便を採取し、ウイルス分離検査を実施した。その結果、ポリオウイルス2型1株、エコーウイルス22型1株および型別同定不能のウイルス1株が分離された。

感受性調査は、全年齢層を対象として採血し、127名(0歳～49歳)の血清についてポリオウイルスに対する中和抗体価を測定した。ポリオウイルス各型に対する抗体価4倍以上の抗体保有率は、1型が90.6%、2型が96.1%、3型が80.3%であった。また、抗体保有者の平均抗体価は、1型では229.7倍、2型では163.4倍、3型では26.8倍であった。

厚生省伝染病流行予測事業で、国内のポリオウイルスの動向を監視するために、国からの依頼を受け毎年実施している調査である。本年度も昨年同様感染源調査のみの委託であった。

過去の流行予測調査の結果では、ポリオウイルスの野生株は分離されておらず、また、富山県住民のポリオウイルスに対する抗体保有率は、1型、2型、3型とも、ポリオの流行を阻止するのに十分な免疫状態であった。しかし、3種類のポリオウイルス全てに対する抗体を保有している人は県民の約4分の3であり、約4人に1人は1種類ま

たはそれ以上の抗体を保有していないという結果が示されている。WHOによるポリオ撲滅作戦により、世界のほとんどの地域でポリオウイルスが駆逐されているが、今なお東南アジアやアフリカなどの一部には依然として野生型ポリオの存在が知られている。個人レベルでの感染防御は完璧とはいえない状況の中で、商用や観光で海外に渡航する機会が多くなっている今日、海外からのポリオウイルス侵入に対する監視体制を中止することはできない。

ポリオウイルスに対する抗体の保有状況を把握

するための感受性調査は、本年度も富山県単独事業で実施したので、両調査結果を合わせて報告する。

I 感染源調査 調査および検査方法

新川保健所管内の健康な乳幼児を対象に、同地区の秋期ポリオワクチン投与実施後、2ヵ月以上経過した平成11年12月に調査を実施した。検体採取計画は、検査対象年齢区分は0～1歳、2～3歳、4～6歳で、男女を問わず各区分20例、計60例を予定した。ウイルスの検索は伝染病流行予測調査検査術式（一部改定）[1]に準じて行った。採取した糞便をEagle-MEM培養液（日水製薬K.K.）で約10%乳剤を作製し、10,000回転30分の高速遠心を行った上清に、抗生物質を加えたものをウイルス分離材料とした。使用細胞はVero細胞およびMA-104細胞を用い、細胞変性効果(CPE)を指標としてウイルス分離検査を実施した。分離したウイルスは、エンテロプール抗血清および型特異抗血清（ともにデンカ生研K.K.）を用いた中和反応を行い、ウイルスの型を同定した。

結果および考察

男児39名、女児33名の乳幼児合計72名についてポリオワクチン接種歴などを調査し、糞便を採取してウイルス分離検査を行った。その結果、ポリオウイルス2型(Polio 2)が1株、エコーウイルス22型(Echo 22)が1株、型別同定不能のウイルスが1株の、合計3株のウイルスが分離され、分離率は4.2%であった(Table 1)。

Polio 2は7ヵ月の女児から分離された。この女児は、平成11年9月13日にポリオ生ワクチンの接種を受けているが、検体採取日は同年12月17日でありワクチン接種後3ヵ月を経過していた。健康状態の調査はしていないが、現在のところ特に健康異常の報告はない。Polio 2の抗原性状については、国立感染症研究所(感染研)に分析を依頼中である。

Echo 22は1歳10ヵ月の女児から分離された。このウイルスは、全国的にも分離の報告は少ないが、過去の本調査において時々分離されており、特に重要な疾患との関与は少ないウイルスであると思われる。

型別同定が不能であったウイルスは、1歳8ヵ月の女児から分離された。MA-104細胞で分離

Table 1. Virus Isolation from Feces of Children

Sex	Age (year)	No. of feces	Virus isolation positive		Identification of isolates *		
			No.	(%)	P-2	E-22	unidentified
Male	0	6	0	0.0			
	1	3	0	0.0			
	2	4	0	0.0			
	3	11	0	0.0			
	4	0					
	5	1	0	0.0			
	6	14	0	0.0			
	Subtotal	39	0	0.0	0	0	0
Female	0	15	1	6.7	1		
	1	3	2	66.7		1	1
	2	0					
	3	8	0	0.0			
	4	0					
	5	1	0	0.0			
	6	6	0	0.0			
	Subtotal	33	3	9.1	1	1	1
Total		72	3	4.2	1	1	1

Date of survey : Dec. 13 ~ 17, 1999.

*P - 2 : Poliovirus type 2 ,

E - 22 : Echovirus type 22

されたが、ウイルス増殖力が弱く、上述の同定用抗血清のほか、シュミットプール血清（感染研分与）および手持ちの抗血清を用いた中和反応では、明らかなウイルス同定はできなかった。

本年度の調査において、Polio 2 の1株を含む合計3株のウイルスが分離された。Polio 2 の抗原分析は感染研に依頼中であり、本ウイルスの由来は不明であるが、後述の感受性調査成績からみても、県内でポリオウイルスがさらに流行することはないものと推測できる。

II 感受性調査 調査および検査方法

高岡、新川、中部、砺波の各保健所および富山市保健所管内で、平成11年8月から12月まで、乳児から成人までの全年齢層を対象に、採血と予防接種歴の調査が行われた。

中和抗体価の測定は、伝染病流行予測調査検査術式（一部改定）[1]に準じて行った。被験血清を維持培養液で4倍希釈し、56℃30分間非働化した後、その50 μ lを96穴マイクロプレート上で滅菌チップを用いて2倍階段希釈した。希釈血清それぞれに、100TCID₅₀/50 μ lとなるように調製した弱毒セービンウイルス50 μ lを加えてよく混和し、37℃、3時間および4℃一晩の中和反応を行った。中和後、Vero細胞浮遊液（1～2 $\times 10^5$ 細胞/ml）を100 μ lずつ加え、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。ウイルスによるCPEを1週間観察し、接種ウイルスを50%以上中和した血清の最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。抗原として使用した弱毒セービンウイルスは、1型、2型、3型とも、昭和59年度に感染研から分与され、当研究所でVero細胞に7代継代したウイルスを使用した。

結果および考察

本年度の感受性調査は、昨年度同様、県単独事業として実施した。検査した血清は、ポリオ流行予測調査として採血された血清の他に、ポリオ以外の流行予測調査のために採血された血清の内、ポリオの抗体測定の詳細を得た血清をも含む、0歳から49歳までの血清127件について、ポリオウイルスに対する中和抗体価を測定した。その結果を、ウイルス型別、年齢区分別にまとめてTable 2に示した。抗体価4倍以上を陽性とした抗体保有率は、1型は90.6%（115/127）、2型が96.1%（122/127）、3型は80.3%（102/127）であり、いずれの型に対しても集団免疫としては十分な抗体保有状況であった。ウイルス型別に各年齢区分の抗体保有率をみると、1型では、0～1歳が66.7%、20～24歳が76.9%であるが、その他の各年齢区分とも80%以上の高率を示した。2型では0～1歳が75.0%を示した以外は、各年齢区分とも90%以上の保有率であった。また、3型は0～1歳が33.3%、10～14歳が64.3%、15～19歳が71.4%で、その他の年齢区分においては80%以上であった。抗体保有者全体の平均抗体価は、1型が229.7倍、2型は163.4倍であったが、3型では26.8倍と低かった。

Table 3はワクチン接種歴別の抗体保有状況を示した。1型と2型のワクチン接種者全体の各抗体保有率は、各々95.8%（91/95）、100.0%（95/95）であり、また、1回のみのワクチン接種でも十分な抗体獲得率を示している（1型85.7%、2型100.0%）。しかし、3型の場合、ワクチン接種者全体の陽性率は82.1%（78/95）で、1型、2型と比べてやや低く、とくに1回接種者が28.6%（2/7）であることから、3型ワクチンでは2回接種は不可欠であると考えられた。

Table 4に各個人レベルの型別抗体保有状況を示した。1型、2型、3型すべての型に対する抗体を保有している人は、全体では74.8%（95/127）であったが、0～1歳は33.3%、10～14歳および15～19歳ではともに64.3%であり、その他の年齢区分では70.0%以上であった。一方、全型抗体陰

Table 2. Distribution of Neutralizing Antibodies against Poliovirus by Age groups

Type 1													
Age group (years)	No. of serum with neutralizing antibody titer										Total	Positive rate	Geometric mean titer*
	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024			
0~1	4	0	0	1	1	0	0	0	1	5	12	66.7%	362.0
2~3	1	0	0	0	0	0	0	1	3	15	20	95.0%	853.3
4~6	0	0	0	0	0	1	1	2	5	13	22	100.0%	618.5
7~9	0	0	0	0	0	1	2	2	2	3	10	100.0%	337.8
10~14	0	0	0	0	3	3	5	1	2	0	14	100.0%	105.0
15~19	2	0	0	3	0	1	4	4	0	0	14	85.7%	90.5
20~24	3	0	0	1	1	4	2	0	1	1	13	76.9%	97.0
25~29	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	100.0%	90.5
30~39	2	0	1	1	2	1	0	1	1	1	10	80.0%	76.1
40~	0	0	1	2	2	1	1	2	0	1	10	100.0%	64.0
Total	12	0	2	8	10	12	15	14	15	39	127	90.6%	229.7
	9.4%	0.0%	1.6%	6.3%	7.9%	9.4%	11.8%	11.0%	11.8%	30.7%	100.0%		

Type 2													
Age group (years)	No. of serum with neutralizing antibody titer										Total	Positive rate	Geometric mean titer*
	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024			
0~1	3	0	0	2	0	0	1	0	2	4	12	75.0%	276.5
2~3	1	0	0	0	0	0	3	1	7	8	20	95.0%	531.0
4~6	0	0	0	0	1	3	4	8	4	2	22	100.0%	218.7
7~9	0	0	0	0	1	4	3	1	1	0	10	100.0%	104.0
10~14	0	0	0	2	1	4	3	3	1	0	14	100.0%	90.5
15~19	0	0	0	0	1	4	7	2	0	0	14	100.0%	105.0
20~24	0	0	1	0	2	2	4	0	3	1	13	100.0%	121.4
25~29	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	100.0%	90.5
30~39	0	0	0	0	2	2	2	3	1	0	10	100.0%	119.4
40~	1	0	1	2	1	0	1	2	2	0	10	90.0%	80.6
Total	5	0	2	6	9	20	29	20	21	15	127	96.1%	163.4
	3.9%	0.0%	1.6%	4.7%	7.1%	15.7%	22.8%	15.7%	16.5%	11.8%	100.0%		

Type 3													
Age group (years)	No. of serum with neutralizing antibody titer										Total	Positive rate	Geometric mean titer*
	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024			
0~1	8	0	1	0	0	0	0	2	1	0	12	33.3%	128.0
2~3	2	1	1	4	5	4	2	0	0	1	20	90.0%	37.3
4~6	2	3	3	6	2	3	2	1	0	0	22	90.9%	21.9
7~9	2	0	0	3	1	3	1	0	0	0	10	80.0%	38.1
10~14	5	0	3	2	1	0	3	0	0	0	14	64.3%	27.4
15~19	4	3	2	3	2	0	0	0	0	0	14	71.4%	10.6
20~24	1	2	3	3	0	2	2	0	0	0	13	92.3%	19.0
25~29	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	100.0%	8.0
30~39	1	0	3	3	2	1	0	0	0	0	10	90.0%	17.3
40~	0	0	1	1	1	3	2	2	0	0	10	100.0%	64.0
Total	25	10	17	26	14	16	12	5	1	1	127	80.3%	26.8
	19.7%	7.9%	13.4%	20.5%	11.0%	12.6%	9.4%	3.9%	0.8%	0.8%	100.0%		

* Titer of ≥1024 was calculated as 1024

性は3名(2.4%)で、3名とも0~1歳であり、ワクチン接種歴はなかった。その他の29名(22.8%)は3種のウイルスのうち1種または2種のウイルスに対する抗体を持っていなかった。

本調査の結果、約4人の内1人が、1型、2型、

3型のうちいずれかの型に対する抗体を保有していないことが明らかになった。東南アジアやアフリカなどの一部には依然として野生型ポリオの感染が発生しており、ポリオ常在国からの野生株ポリオウイルスの侵入の可能性を否定できず、ポリ

Table 3. Positive Rate of Neutralizing Antibodies by History of Vaccination

Type 1 Age group (years)	Times of vaccination						No vaccination		Unknown	
	Twice		Once		Unknown		No.*	(%)	No.*	(%)
0~1	4/4	100.0	3/4	75.0			1/4	25.0		
2~3	17/17	100.0	2/2	100.0			0/1	0.0		
4~6	20/20	100.0							2/2	100.0
7~9	10/10	100.0								
10~14	7/7	100.0			7/7	100.0				
15~19			1/1	100.0	3/3	100.0			8/10	80.0
20~24	7/10	70.0			3/3	100.0				
25~29	2/2	100.0								
30~39	2/2	100.0							6/8	75.0
40~					3/3	100.0		0.0	7/7	100.0
Total	69/72	95.8	6/7	85.7	16/16	100.0	1/5	20.0	23/27	85.2
91 / 95 , 95.8 %										
Type 2 Age group (years)	Times of vaccination						No vaccination		Unknown	
	Twice		Once		Unknown		No.*	(%)	No.*	(%)
0~1	4/4	100.0	4/4	100.0			1/4	25.0		
2~3	17/17	100.0	2/2	100.0			0/1	0.0		
4~6	20/20	100.0							2/2	100.0
7~9	10/10	100.0								
10~14	7/7	100.0			7/7	100.0				
15~19			1/1	100.0	3/3	100.0			10/10	100.0
20~24	10/10	100.0			3/3	100.0				
25~29	2/2	100.0								
30~39	2/2	100.0							8/8	100.0
40~					3/3	100.0			6/7	85.7
Total	72/72	100.0	7/7	100.0	16/16	100.0	1/5	20.0	26/27	96.3
95 / 95 , 100.0 %										
Type 3 Age group (years)	Times of vaccination						No vaccination		Unknown	
	Twice		Once		Unknown		No.*	(%)	No.*	(%)
0~1	4/4	100.0	0/4	0.0			0/4	0.0		
2~3	15/17	88.2	2/2	100.0			1/1	100.0		
4~6	18/20	90.0							2/2	100.0
7~9	8/10	80.0								
10~14	6/7	85.7			3/7	42.9				
15~19			0/1	0.0	3/3	100.0			7/10	70.0
20~24	9/10	90.0			3/3	100.0				
25~29	2/2	100.0								
30~39	2/2	100.0							7/8	87.5
40~					3/3	100			7/7	100.0
Total	64/72	88.9	2/7	28.6	12/16	75.0	1/5	20.0	23/27	85.2
78 / 95 , 82.1 %										

* Number of positive sera(≥4) / Number of tested sera

オウウイルスに対する監視は続けなければならない。
また、ワクチン未接種の成人男性のポリオ疑似症例の報告[2]に見られるように、ポリオワクチン接種を受けた小児から排泄される、毒性復帰株に感染する可能性は考慮しておかなければならない。
現在のわが国では、ポリオウイルスの自然感染が

ないために、ワクチンでしか抗体を獲得する機会がない。したがって、ワクチン接種年齢を過ぎても抗体を獲得できなかった人は、特に、海外渡航時や育児に携わる期間には注意が必要であると思われる。

Table 4. Distribution of Neutralizing Antibodies against Each Type of Poliovirus

Age group (years)	No. of sera	Negative against all types	Positive against						
			Type1	Type2	Type3	Type1&2	Type2&3	Type1&3	Type1,2&3
0~1	12	3		1		4			4 (33.3%)
2~3	20				1	2			17 (85.0%)
4~6	22					2			20 (90.9%)
7~9	10					2			8 (80.0%)
10~14	14					5			9 (64.3%)
15~19	14			1		3	1		9 (64.3%)
20~24	13			1			2		10 (76.9%)
25~29	2								2 (100.0%)
30~39	10					1	2		7 (70.0%)
40~	10							1	9 (90.0%)
Total	127	3	0	3	1	19	5	1	95 (74.8%)
(%)	(100.0)	(2.4)	(0.0)	(2.4)	(0.8)	(15.0)	(3.9)	(0.8)	

ま と め

感染源調査の結果、Polio 2が1株、Echo 22が1株、型別同定不能ウイルスが1株分離された。Polio 2の抗原性状およびウイルスの由来については、現在感染研に分析を依頼中である。

感受性調査の結果、弱毒セービンウイルスに対する抗体保有率は1型90.6%、2型96.1%、3型80.3%であり、集団免疫としては充分高く、国内においてはポリオ流行の可能性は少ないと考えられた。

謝辞：本調査を実施するに当たり、検体採取にご協力いただいた保育所、学校、病院、その他関係各位に感謝いたします。

文 献

1. 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課、国立予防衛生研究所流行予測事業委員会編(1996). 伝染病流行予測調査検査術式(一部改定), 2-8.
2. 国立予防衛生研究所、厚生省保健医療局エイズ結核感染症課編(1996). 病原微生物検出情報月報, 17:219-220.

インフルエンザ流行予測調査

松浦久美子	長谷川澄代	中山 喬	石倉 康宏
安藤 秀二	北村 敬	田中桂子 ¹	荻浦泰也 ²
高島阿里子 ³	浅野真由美 ³	松田和久 ⁴	沼田直子 ⁵

Epidemiological Surveillance of Influenza Virus Infection in Toyama Prefecture

Kumiko MATSUURA, Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA,
Mitsuhiro ISHIKURA, Shuji ANDO, Takashi KITAMURA,
Keiko TANAKA¹, Yasunari OGIURA², Ariko TAKASHIMA³,
Mayumi ASANO³, Kazuhisa MATSUDA⁴, Naoko NUMATA⁵

要 旨 インフルエンザの流行前の時期（1999年7～10月）における富山県住民の抗体保有状況と豚（1999年7～10月）の抗体保有状況の調査、および1999年12月から2000年3月までの間のインフルエンザ様患者等127名について、ウイルスの検出を試みた結果、以下のような成績を得た。

1. 富山県住民248名のインフルエンザ流行前におけるA/Beijing/262/95(H1N1)株, A/Sydney/5/97(H3N2)株, B/Yamanashi/166/98株およびB/Shangdong/7/97株に対する10倍以上の抗体保有率は各々24.2%, 66.1%, 29.8%, 20.2%であった。これより, A(H3N2)型に対する抗体保有状況は高かったが, A(H1N1)型とB型に対しては低かった。豚80頭におけるA(H5N3)型, A(H1N1)型およびA(H9N2)型ウイルスに対する10倍以上の抗体保有率は0%であった。

2. 今冬は12月からかぜ様患者が発生し始め, 12月中旬より患者が多くなり, 3月中旬まで患者の発生は続いた。その間に「集団かぜ」が1月14日にU中学校で発生し, 3月中旬まで県内の各地で発生した。休校, 学年または学級閉鎖の措置が延べ127施設でとられ, 累積患者数は4,680人であった。

3. インフルエンザ様患者からA(H1)型とA(H3)型が分離され, 今シーズンは2種類の型による混合流行であった。ウイルスの検出状況や集団発生事例の調査結果から, A(H3)型よりA(H1)型によるインフルエンザ患者が多かったと推察される。分離されたA(H1)型36株に対する抗A/Beijing/262/95血清のHI価は20～80倍(ホモ:640), A(H3)型12株に対する抗A/Sydney/5/97血清のHI価は320～640倍(ホモ:1280)であった。

4. 2歳の脳炎患者の咽頭ぬぐい液からA(H3)型, 12歳の脳炎患者の髄液からA(H1)型遺伝子がRT-PCR法によって検出され, インフルエンザ関連の脳炎と判断された。

本調査は、インフルエンザウイルスに対する集団免疫の現況把握（感受性調査）及びウイルスの検索（感染源調査）等を行い、インフルエンザ流行の予測ならびに予防に資することを目的とする。厚生省保健医療局結核感染症課が主体となって、全国の地方衛生研究所等が協力して実施している。感受性調査は、インフルエンザ流行前の時期における人のインフルエンザウイルス抗体保有状況と、新型インフルエンザを想定して豚におけるインフルエンザウイルス抗体保有状況を調べた。感染源調査は、インフルエンザ様患者についてウイルスの検出と血清抗体を、またインフルエンザの関連が疑われた脳炎・脳症患者についても調べた。これらの結果について報告する。

I 感受性調査 調査および検査方法

1. 調査期間

人の感受性調査：1999年7月～10月

豚の感受性調査：1999年7月～10月

2. 調査対象

人血清は県内住民の248名（0～69歳）から採取し、豚血清は富山食肉総合センターに搬入された県内産豚（生後6ヶ月）から80検体を採取した。

3. 検査方法

「伝染病流行予測調査検査術式」（昭和61年発行）に従いインフルエンザウイルス HI 抗体価を測定した。ただし、抗体価は血清希釈1：10より測定し、血清希釈倍数のみで表示した（WHO法）。抗原は人では A/Beijing/262/95（H1N1）株、A/Sydney/5/97（H3N2）株、B/Shangdong/7/97株および B/Yamanashi/166/98株を用い、豚では A/duck/Singapore/3/97（H5N3）株、A/NewJersey/1/76株および A/turkey/Wisconsin/66（H9N2）株を用いた。A/Beijing/262/95株と A/Sydney/5/97株および B/Shangdong/7/97株は今年度のワクチン株である。これらの抗原は国立感染症研究所より分与された。

結果及び考察

1. 人のインフルエンザ感受性調査

年齢群別検体数は0～4歳：53例、5～9歳：31例、10～14歳：19例、15～19歳：18例、20～29歳：25例、30～39歳：29例、40～49歳：24例、50～59歳：25例、60歳以上：24例で、合計248検体である。これらの検体について、A（H1N1）、A（H3N2）、B型ウイルスに対する HI 抗体を調べ、HI 価10倍以上と40倍以上の抗体保有率を年齢群別に示すと Fig. 1 のようであった。40倍以上の抗体は感染防御能があると考えられている。

A/Beijing/262/95（H1N1）株に対する抗体保有率：HI 価10倍以上の抗体保有率は24.2%（60/248）、40倍以上は5.2%（13/248）であり、抗体保有者は少なかった。年齢群別にみると、10倍以上の抗体保有率は学童年齢では他の年齢群に比し抗体保有率は高くなっているが、40倍以上は全年齢群で低い。富山県内では A（H1N1）型は1995年12月から96年3月に流行した後、発生していないために、抗体保有者が年々低下した。

A/Sydney/5/97（H3N2）株に対する抗体保有率：HI 価10倍以上の抗体保有率は66.1%（164/248）、40倍以上は46.4%（115/248）で、高い保有率であった。年齢群別にみると、10倍以上の抗体保有率は全年齢群で50%以上であり、40倍以上は5～19歳の年齢群で高い保有率（55.6～83.9%）が認められた。これは過去2シーズンにわたり流行の主体であったことから高い保有状況となった。

B/Yamanashi/166/98株に対する抗体保有率：HI 価10倍以上の抗体保有率は29.8%（74/248）、40倍以上は10.9%（27/248）で、全体の保有率は低かった。しかし、年齢群別にみると、10倍以上の抗体保有率は5～29歳群で高く（41.9～73.7%）、4歳以下および30歳以上では低い。40倍以上の保有率は10歳代でやや高い傾向が認められた。これは前シーズン（1999年1～3月）の流行を反映していると推察される。

B/Shangdong/7/97株に対する抗体保有率：HI 価10倍以上の抗体保有率は20.2%（50/248）、40倍以上は4.4%（11/248）であった。年

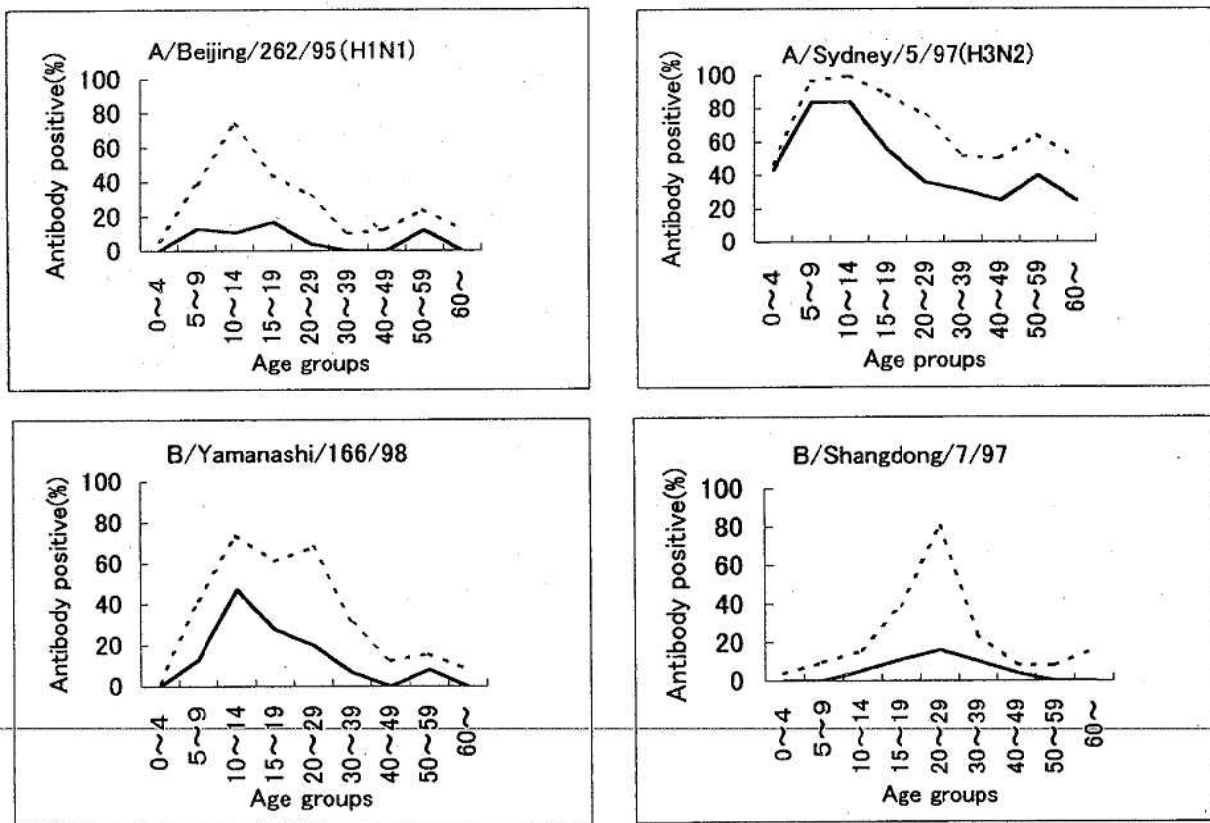


Fig 1. Prevalence of Influenza Virus Strains in Age Groups(1999.7~10).

----- : Antibody positive rate of ≥ 10 , — : Antibody positive rate of ≥ 40

年齢別にみると、10倍以上の抗体保有率は20~29歳の年齢群では高いが、その他の年齢群では低い。40倍以上は全年齢で低く、高いHI抗体価の保有者も少なかった。本株は前シーズンより散発的に分離されている変異株である。この株に対する抗体保有状況とYamanashi株に対する抗体保有状況とを比較すると、Sangdong株とYamanashi株とは抗原性がかなり異なっていることが判明した。

富山県住民におけるインフルエンザ流行前の時期の抗体保有状況を調べた結果、A/ソ連型(H1N1)は、これまで3年間流行がなかったこと、各年齢群における抗体保有率がかなり低いことから、流行する可能性が示唆された。A/香港型(H3N2)では、抗体保有率が高い状況であることから判断すると、ワクチン類似株によるインフルエンザの流行は大きくならないだろうと推測される。しかし、変異株の流行が発生した場合、感染が広がると考えられる。B型では前シーズンの

流行株に対しては10歳代の抗体保有率が高い状態であったが、他の年齢群は低い。そして今シーズンのワクチン株に対してはさらに低い状況であったことから、警戒が必要と推察された。感染症情報センターで集計された全国の抗体保有状況も同様の傾向がみられた。

2. 豚のインフルエンザ感受性調査

豚血清80検体について、A(H5N3)、A(H1N1)およびA(H9N2)型ウイルスに対するHI抗体を調べた結果、抗体価は全て10倍未満であり、抗体保有の豚は認められなかった。豚の月齢は6ヶ月と若い豚が対象であった為、抗体保有率0%になった可能性もあるが、豚の間ではこれらのウイルス株による流行はなかったと推測される。

Ⅱ 感染源調査 調査および検査方法

1. 調査期間

1999年12月～2000年3月

2. 調査対象

定点観測では、正木医院（福光町）、舘小児科医院（高岡市）、二本垣医院（黒部市）、石黒小児科医院（富山市）および富山市民病院（富山市）の協力により、インフルエンザ様疾患の患者を対象として調査した。「集団かぜ」の発生に際しては、1集団あたり5名の患者を対象として、4施設について調べた。また、インフルエンザの関連が疑われた脳炎・脳症患者や2医療機関の依頼検体についても調べた。

3. 検査方法

1) インフルエンザウイルスの検出

ウイルス分離は咽頭ぬぐい液をMDCK細胞に接種して行い、分離されたウイルスの同定は、国立感染症研究所から分与された抗A/Beijing/262/95(H1N1)血清、抗A/Sydney/5/97(H3N2)血清、抗B/Yamanashi/166/98血清および抗B/Shangdong/7/97血清を用いて行った。インフルエンザウイルスの遺伝子検出は永田ら〔1〕が設定したプライマーを用い、RT-PCR法で行った。

2) インフルエンザウイルスHI抗体

患者の急性期血清と回復期血清について、インフルエンザHI抗体価を感受性調査と同様の方法で測定した。抗原は感受性調査に用いた抗原とA/Fukushima/99/98(H3N2)株を使用した。このFukushima株は、Sydney株とは抗原性が異なる株である。

Table 1. Virological Examination of Patients with Influenza-like Disease

Sampling station	No. of patients	Virus detection			
		Throat swab		No. of isolates	Type
		Date of sampling	No. of samples		
Masaki internal clinic(Fukumitsu)	35	Dec.6,1999～	35	17	A(H1)
		Mar.11,2000		4	A(H3)
Tachi pediatric clinic(Takaoka)	19	Dec.15,1999～	19	4	A(H1)
		Mar.15,2000		1	A(H3)
Nihongaki clinic (Kurobe)	18	Dec.15,1999～	18	4	A(H1)
		Mar.2,2000		4	A(H3)
Ikeda internal clinic(Kamiichi)	11	Dec.19,1999～	11	3	A(H1)
		Feb.26,2000		2	A(H3)
Ishiguro pediatric clinic(Toyama)	3	Jan.2,2000～ Mar.7,2000	3	1	A(H1)
Toyama Municipal hospital(Toyama)	11	Dec.20,1999～ Jan.23,2000	11	1	A(H3)
Total	97		97	29	A(H1)
				12	A(H3)

Table 2. Virological and Serological Examinations of Patients with Influenza-like Disease or Encephalitis · Encephalopathy

Sampling station	No. of patients	Virus detection		No. of isolates	Type	HI antibody examination ¹⁾			No. of influenza patients	
		Throat swab(T)/CSF	No. of samples			No. of sera	No. of significant increase			
		Date of sampling				Acute	Conva-lescent	A(H1N1)		A(H3N2) ₁
Shinryo junior high school(Toyama, Epidemic case)	5	Jan.14,2000	5(T)	0		5	0	5	5	A(H3)
Higashikazumi primary school(Namerikawa, Epidemic case)	5	Jan.17,2000	5(T)	4	A(H1)	5	4	0	1	4 A(H1) 1 A(H3)
Nomura primary school(Takaoka, Epidemic case)	5	Jan.19,2000	5(T)	2	A(H1)	3	2	1	1	3 A(H1) 1 A(H3)
Nyuzen junior high school(Nyuzen, Epidemic case)	5	Feb.3,2000	5(T)	1	A(H1)	5	4	0	0	4 A(H1)
Toyama Med.Pharm.Univ Hospital et al. (Sporadic cases)	10 ²⁾	Dec.7.1999~ Mar.9,2000	9(T) 3(CSF)	1 ³⁾ 1 ³⁾	A(H3) A(H1)	6	0	1	1	1 A(H3) 1 A(H1)
Total	30		32	8 1	A(H1) A(H3)	24	10	7	8	12 A(H1) 8 A(H3)

1) Antigen, A(H1): A/Beijing/262/95, A(H3)₁: A/Sydney/5/97, A(H3)₂: A/Fukushima/99/98

2) Three patients : Encephalitis ; 1 patient : Encephalopathy

3) Gene of influenza virus was detected by RT-PCR method.

結果および考察

1. インフルエンザ様疾患の発生状況

1999年12月よりかぜ様患者が発生し始め、中旬頃から散発の患者が多くなった。1月14日には今冬初めての「集団かぜ」がS中学校で発生、2月上旬まで県内の各地で相次ぎ発生した。その後少数の施設で、集団かぜが3月中旬まで発生した。「集団かぜ」による休校、学年または学級閉鎖などの措置が延べ127施設でとられ、累積患者数は4,680人であった。

2. インフルエンザウイルスの検出状況と血清HI抗体

1999年12月から2000年3月までに採取した定点観測97検体、集団かぜ（4集団）20検体、脳炎・脳症患者4名からの6検体および検査依頼6検体

（合計129検体）について、インフルエンザウイルスの検出および患者の急性期と回復期血清抗体の成績をTable 1, 2に示す。

定点観測では、今冬の最初のインフルエンザウイルスはA(H3)型が12月15日、A(H1)型が12月17日に発病した患者から分離された。その後、A(H1)型、A(H3)型ウイルスとも3月中旬までの患者より分離され、2種類の型による混合流行となった(Table 1)。被検者97名中 A(H1)型患者が29名、A(H3)型患者が12名確認された。

「集団かぜ」では4施設の患者について調べた結果、3施設の患者からA(H1)型が分離され、急性期から回復期にかけてA(H1)型に対するHI抗体価の有意上昇（4倍以上の上昇）も認められた。一方、1施設の患者からはウイルスは検出されなかったが、急性期から回復期にかけてA(H3)

Table 3. HI Titers of Reference Antiserum against Isolated Influenza Virus Strains

Antigen	HI titer of ¹⁾		Antigen	HI titer of	
	Anti-A/Beijing/ 262/95(H1N1)	Anti-A/Sydney/ 5/97(H3N2)		Anti-A/Beijing/ 262/95(H1N1)	Anti-A/Sydney/ 5/97(H3N2)
A/Beijing/262/95 ¹⁾	640	— ²⁾	A/Toyama/15/2000	40	—
A/Sydney/5/97 ¹⁾	—	1280	A/Toyama/16/2000	80	—
A/Toyama/23/99	—	320	A/Toyama/17/2000	80	—
A/Toyama/24/99	80	—	A/Toyama/18/2000	—	320
A/Toyama/25/99	—	640	A/Toyama/19/2000	40	—
A/Toyama/26/99	80	—	A/Toyama/20/2000	80	—
A/Toyama/27/99	80	—	A/Toyama/21/2000	80	—
A/Toyama/28/99	40	—	A/Toyama/22/2000	—	640
A/Toyama/29/99	40	—	A/Toyama/23/2000	40	—
A/Toyama/30/99	40	—	A/Toyama/24/2000	—	320
A/Toyama/31/99	80	—	A/Toyama/25/2000	40	—
A/Toyama/1/2000	—	320	A/Toyama/26/2000	40	—
A/Toyama/2/2000	80	—	A/Toyama/27/2000	20	—
A/Toyama/3/2000	—	320	A/Toyama/28/2000	40	—
A/Toyama/4/2000	—	320	A/Toyama/29/2000	40	—
A/Toyama/5/2000	—	320	A/Toyama/30/2000	40	—
A/Toyama/6/2000	—	320	A/Toyama/31/2000	40	—
A/Toyama/7/2000	80	—	A/Toyama/32/2000	40	—
A/Toyama/8/2000	80	—	A/Toyama/33/2000	40	—
A/Toyama/9/2000	80	—	A/Toyama/34/2000	40	—
A/Toyama/10/2000	—	320	A/Toyama/35/2000	40	—
A/Toyama/11/2000	80	—	A/Toyama/36/2000	40	—
A/Toyama/12/2000	80	—	A/Toyama/37/2000	40	—
A/Toyama/13/2000	80	—	A/Toyama/38/2000	40	—
A/Toyama/14/2000	80	—	A/Toyama/39/2000	—	320

1) Reference antigens and antiserum were supplied from Japan Influenza Center. A/Toyama/23/99 ~ A/Toyama/39/2000 antigens were isolated from throat swabs of patients with influenza-like disease in Toyama Prefecture from Dec. 1999 to Mar. 2000.

2) — : HI titer <10

型に対するHI抗体価の有意上昇が確認され、A(H3)型の感染によるインフルエンザであった。「集団かぜ」の患者のなかには、A(H1)型、A(H3)型の両方に対する抗体価の有意上昇したのが2名いた。これらの患者は短期間に2回インフルエンザ感染したと判断された(Table 2)。

脳炎患者3名と脳症患者1名では、ウイルスは分離されなかったが、RT-PCR法によって患者N.K.(脳炎、2歳)の咽頭ぬぐい液からA(H3)型、患者K.A.(脳炎、12歳)の髄液からA(H1)型ウイルスの遺伝子が検出された(Table 2)。N.K.では急性期から回復期にかけA(H3)型に対するHI抗体の有意上昇が認められ、臨床症状は発熱40.5℃、気管支炎、意識障害、痙攣などであった。K.A.の臨床症状は発熱42.0℃、関節痛、意識障害、小脳症状、脳幹障害などであった。

合計129検体中36検体よりA(H1)型、12検体よりA(H3)型ウイルスが分離された。分離株に対するインフルエンザ抗血清のHI価はTable 3に示すようであった。A(H1)型の分離株(36株)に対する抗A/Beijing/262/95(H1N1)血清のHI価は20~80倍(ホモ:640倍)で、Beijing株より1/8~1/32倍低いHI価を示した。A(H3)型の分離株(12株)に対する抗A/Sydney/5/97(H3N2)血清のHI価は320~640倍(ホモ:1280倍)で、分離株にはSydney株より低いHI価の株が10株含まれていた。B型の抗血清は、分離株に対して10倍未満のHI価を示した。

以上の検査結果より、被験者127名中A(H1)型

感染者が41名、A(H3)型感染者が20名確認され、富山県ではA(H1)型とA(H3)型インフルエンザが12月から3月まで混合流行したことが明らかとなった。ウイルス検出状況や4集団の発生事例の調査結果より、A(H3)型よりA(H1)型ウイルスによる流行が大きかったと判断され、流行前の住民抗体保有状況からのA(H1)型の流行予測と一致した。分離されたウイルス株について抗血清のHI価により検討すると、A(H1)型株はワクチンのA/Beijing/262/95株とは抗原性が変異した株、A(H3)株型はワクチンのA/Sydney/5/97株に類似した株と変異した株が混在していたことが示唆された。近年、高齢者のインフルエンザ重症例、脳炎や脳症患者の発生等からワクチンの効果が見直され、住民はワクチン接種に関心を持ってきた。しかし、今シーズンの流行株とワクチン株とでは抗原性に変異が認められた。このことは、流行株予測の難しさを示すが、ワクチン株の選定方法やより効果のあるワクチン作製など、さらに検討が望まれる。

謝辞：検査材料の採取と臨床症状の調査にご協力頂いた正木医院、館小児科医院、二本垣医院、池田内科医院、石黒小児科医院および富山市民病院の関係各位に深謝致します。

文 献

1. 永田紀子, 根本治育, 原 孝, 増子京子, 藤咲登 (1998). 茨城県衛研年報, 第36号, 34-37.

ポリオウイルスワクチン株および強毒株に対する 中和抗体保有状況

中山 喬 松浦久美子 安藤 秀二
長谷川澄代 石倉 康宏 北村 敬

Neutralizing Antibodies against Vaccine
Strains or Virulent Strains of Poliovirus

Takashi NAKAYAMA, Kumiko MATSUURA,
Shuji ANDO, Sumiyo HASEGAWA,
Mitsuhiro ISHIKURA and Takashi KITAMURA

要 旨 現在わが国では、ポリオウイルスに対する抗体保有率は高く、ポリオ野生株ウイルスによるポリオ発症の危険性はない。しかし、ごく稀にワクチン由来変異ウイルスの二次感染による麻痺症状の発症事例が報告されている。国内ではワクチン接種以外にはポリオウイルスに対する抗体を獲得することができない。そこで、変異ウイルスや現在も世界のごく一部の地域に常在する野生株ウイルスに対する抗体保有状況を把握するため、強毒株に対する抗体保有状況を調査した。

ポリオ強毒株である1型Mahoney株、2型Lansing株、3型Saukett株と、ワクチン株のSabin 1型株、Sabin 2型株、Sabin 3型株とに対する中和抗体を測定した。その結果、各株に対する抗体価4倍以上の抗体保有率は、1型はMahoney株92.3%、Sabin 1型株94.9%、2型はLansing株98.0%、Sabin 2型株98.0%、3型はSaukett株76.0%、Sabin 3型株79.6%であり、各型の強毒株とワクチン株との間に有意差は認められなかった。

平均抗体価は、1型はMahoney株74.0倍、Sabin 1型株179.7倍、2型はLansing株117.4倍、Sabin 2型株177.8倍、3型はSaukett株34.8倍、Sabin 3型株37.1倍であった。1型のワクチン株の平均抗体価は強毒株より約2.4倍高く、2型でもワクチン株が約1.5倍高かった。3型では両株とも同様の平均抗体価であった。

本調査に使用した強毒株に対する感染予防は、集団免疫としては現行のワクチン接種対策で充分であると思われた。しかし、ワクチン由来変異ウイルスや、変異の著しい野生株に対する免疫状態については、さらに検討を要すると思われた。

一般住民のポリオ流行予測感受性調査の結果、年齢によっては1型および3型で抗体保有率の低い年齢層が認められているが、全体として、流行を阻止しうるに十分な抗体保有率を示している。また、現在日本国内ではポリオウイルス野生株に

よるポリオ患者の発生はなく、野生株ウイルスも分離されていない。

一方、東南アジアや、インド、アフリカなどの一部の地域では、現在もポリオ野生株が常在しており、分離されたウイルスの中には、遺伝的にか

なり変異したウイルスが見つかった[1]。さらに、河川水や下水中から塩基配列に変異を示したワクチン由来ポリオウイルスが分離されている[2]。また、抗体陰性者が病原性を回復したワクチン由来株の感染によって麻痺症状を起こした例も認められている[3]。これらの変異株に対する抗体レベルがどの程度のものか知っておく必要がある。そこで、第1段階として、ポリオ強毒株に対する抗体保有状況を調査した。

材料および方法

抗体測定は、平成10年度流行予測調査に使用した血清196件（0歳～76歳）について行った。検査方法は伝染病流行予測調査検査術式（一部改訂）[4]に準じて行った。その概要は、被験血清を維持培養液で4倍希釈し、56℃、30分間非動化した後、その50 μ lを96穴マイクロプレート上で2倍階段希釈した。希釈血清各々に、100TCID₅₀/50 μ lとなるように調製した抗原ウイルス50 μ lを加えてよく混和し、37℃、3時間および4℃一晩の中和反応を行った。中和後Vero細胞浮遊液（1～2 $\times 10^5$ 細胞/ml）を100 μ lずつ加え、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。ウイルスによるCPEを1週間観察し、接種ウイルスを50%以上中和した血清の最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。抗原として使用したウイルスは、ワクチン株は流

行予測調査で使用しているSabin 1型株、Sabin 2型株、Sabin 3型株（感染研分与、当研究所にてVero細胞にて継代）を用いた。強毒株は1型がMahoney株、2型はLansing株、3型はSaukett株（ともに感染研分与）を使用した。

結 果

ワクチン株および強毒株に対する中和抗体の抗体価4倍以上の抗体保有率を表1に示した。検査した血清全体の抗体保有率は、1型ではSabin 1株は94.9%、Mahoney株は92.3%、2型ではSabin 2株およびLansing株とも98.0%、3型ではSabin 3株が79.6%、Saukett株が76.0%であり、各型ともワクチン株と強毒株との間に有意差は認められなかった。また年齢区分別の抗体保有率を見ても、ワクチン株と強毒株との間に有意差は認められなかった。

ワクチンを接種した年代と、接種していない年代を比較するために、年齢区分別に抗体価別スクリーニングをおこなった（表2、表3）。1型と2型では、高い抗体価を基準に陽性率を比較した場合、ワクチン株と強毒株との間に有意差が認められる年齢区分が存在した。まず1型では、2～3歳と4～6歳では256倍以上の陽性率（ $p<0.01$ ）、7～9歳と10～14歳では128倍以上の陽性率（ $p<0.05$ ）において、Mahoney株よりSabin 1株

表1 中和抗体保有率（抗体価4倍以上）

年齢区分 (歳)	検査件数 (人)	1 型		2 型		3 型	
		Sabin 1		Sabin 2		Sabin 3	
		陽性者	陽性率(%)	陽性者	陽性率(%)	陽性者	陽性率(%)
0～1	8	7	87.5	7	87.5	3	37.5
2～3	20	19	95.0	19	95.0	16	80.0
4～6	23	23	100.0	23	100.0	21	91.3
7～9	18	18	100.0	18	100.0	17	94.4
10～14	20	19	95.0	20	100.0	11	55.0
15～19	5	4	80.0	4	80.0	2	40.0
20～24	15	13	86.7	15	100.0	11	73.3
25～29	11	9	81.8	11	100.0	7	63.6
30～39	16	15	93.8	16	100.0	13	81.3
40～49	25	25	100.0	25	100.0	25	100.0
50～59	19	18	94.7	19	100.0	15	78.9
60～	16	16	100.0	15	93.8	15	93.8
合計	196	186	94.9	192	98.0	156	79.6

表2 Sabin株 抗体価別スクリーニング

1型 Sabin 1		抗体価別陽性率(%)								
年齢区分 (歳)	検査件数 (人)	4倍以上	8倍以上	16倍以上	32倍以上	64倍以上	128倍以上	256倍以上	512倍以上	1024倍以上
0~1	8	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5
2~3	20	95.0	95.0	95.0	95.0	95.0	95.0	95.0	80.0	70.0
4~6	23	100.0	100.0	100.0	95.7	91.3	91.3	91.3	82.6	52.2
7~9	18	100.0	100.0	100.0	100.0	94.4	94.4	83.3	66.7	44.4
10~14	20	95.0	95.0	95.0	90.0	75.0	70.0	60.0	35.0	5.0
15~19	5	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	60.0	40.0	20.0	20.0
20~24	15	86.7	80.0	73.3	73.3	60.0	40.0	26.7	6.7	0
25~29	11	81.8	81.8	81.8	81.8	45.5	36.4	9.1	9.1	9.1
30~39	16	93.8	81.3	75.0	62.5	56.3	43.8	25.0	18.8	6.3
40~49	25	100.0	96.0	92.0	88.0	68.0	44.0	28.0	20.0	12.0
50~59	19	94.7	94.7	89.5	78.9	68.4	31.6	10.5	0	0
60~	16	100.0	100.0	93.8	93.8	81.3	37.5	25.0	18.8	6.3
合計	196	94.9	92.9	90.3	86.7	76.0	61.7	50.0	38.3	25.0

*: p<0.05

**: p<0.01

2型 Sabin 2		抗体価別陽性率(%)								
年齢区分 (歳)	検査件数 (人)	4倍以上	8倍以上	16倍以上	32倍以上	64倍以上	128倍以上	256倍以上	512倍以上	1024倍以上
0~1	8	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	75.0	50.0
2~3	20	95.0	95.0	95.0	95.0	95.0	90.0	90.0	75.0	50.0
4~6	23	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.7	91.3	69.6	30.4
7~9	18	100.0	100.0	94.4	94.4	88.9	83.3	44.4	16.7	5.6
10~14	20	100.0	100.0	100.0	95.0	85.0	70.0	40.0	25.0	10.0
15~19	5	80.0	80.0	80.0	80.0	60.0	40.0	40.0	40.0	0
20~24	15	100.0	100.0	100.0	93.3	80.0	40.0	26.7	13.3	6.7
25~29	11	100.0	100.0	100.0	100.0	90.9	81.8	63.6	18.2	9.1
30~39	16	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	68.8	43.8	31.3	18.8
40~49	25	100.0	100.0	100.0	92.0	76.0	64.0	28.0	16.0	8.0
50~59	19	100.0	89.5	89.5	84.2	73.7	47.4	26.3	26.3	10.5
60~	16	93.8	87.5	81.3	68.8	50.0	25.0	18.8	12.5	6.3
合計	196	98.0	96.4	95.4	91.8	83.7	67.9	49.5	34.2	17.3

*: p<0.05

**: p<0.01

3型 Sabin 3		抗体価別陽性率(%)								
年齢区分 (歳)	検査件数 (人)	4倍以上	8倍以上	16倍以上	32倍以上	64倍以上	128倍以上	256倍以上	512倍以上	1024倍以上
0~1	8	37.5	37.5	37.5	37.5	25.0	25.0	25.0	12.5	0
2~3	20	80.0	65.0	65.0	65.0	60.0	45.0	20.0	10.0	5.0
4~6	23	91.3	78.3	78.3	65.2	43.5	26.1	8.7	8.7	4.3
7~9	18	94.4	83.3	66.7	44.4	33.3	5.6	0	0	0
10~14	20	55.0	35.0	20.0	15.0	5.0	5.0	0	0	0
15~19	5	40.0	40.0	40.0	20.0	0	0	0	0	0
20~24	15	73.3	66.7	40.0	20.0	13.3	0	0	0	0
25~29	11	63.6	54.5	54.5	36.4	27.3	0	0	0	0
30~39	16	81.3	68.8	56.3	31.3	25.0	18.8	12.5	6.3	0
40~49	25	100.0	100.0	100.0	92.0	64.0	48.0	16.0	8.0	0
50~59	19	78.9	73.7	73.7	31.6	21.1	10.5	10.5	0	0
60~	16	93.8	93.8	87.5	75.0	62.5	31.3	12.5	6.3	0
合計	196	79.6	70.9	64.3	49.0	35.7	20.9	9.2	4.6	1.0

*: p<0.05

**: p<0.01

表3 強毒株 抗体価別スクリーニング

1型 Mahoney		抗体価別陽性率(%)								
年齢区分 (歳)	検査件数 (人)	4倍以上	8倍以上	16倍以上	32倍以上	64倍以上	128倍以上	256倍以上	512倍以上	1024倍以上
0~1	8	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	75.0	62.5	50.0
2~3	20	95.0	95.0	95.0	90.0	90.0	80.0	50.0**	30.0**	10.0**
4~6	23	100.0	91.3	91.3	91.3	82.6	65.2	47.8**	17.4**	4.3**
7~9	18	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3	55.6*	16.7**	0	0
10~14	20	95.0	90.0	80.0	75.0	45.0	25.0*	15.0**	5.0	5.0
15~19	5	80.0	80.0	60.0	60.0	40.0	40.0	20.0	20.0	0.0
20~24	15	80.0	60.0	53.3	33.3	20.0	6.7	0	0	0
25~29	11	81.8	63.6	45.5	27.3*	18.2	0	0	0	0
30~39	16	81.3	75.0	62.5	50.0	18.8	6.3*	6.3	0	0
40~49	25	92.0	88.0	84.0	68.0	40.0	24.0	20.0	16.0	8.0
50~59	19	94.7	94.7	84.2	78.9	68.4	47.4	26.3	5.3	0
60~	16	100.0	100.0	100.0	93.8	93.8	68.8	37.5	18.8	6.3
合計	196	92.3	87.2	81.6*	74.0**	59.2**	42.3**	26.0**	12.8**	5.6**

*: p<0.05

**: p<0.01

2型 Lansing		抗体価別陽性率(%)								
年齢区分 (歳)	検査件数 (人)	4倍以上	8倍以上	16倍以上	32倍以上	64倍以上	128倍以上	256倍以上	512倍以上	1024倍以上
0~1	8	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	87.5	75.0	50.0	37.5
2~3	20	95.0	95.0	95.0	95.0	95.0	85.0	75.0**	50.0	35.0
4~6	23	100.0	100.0	100.0	100.0	95.7	87.0	60.9	13.0**	4.3
7~9	18	100.0	94.4	94.4	94.4	77.8	33.3**	11.1	11.1	11.1
10~14	20	100.0	100.0	95.0	85.0	70.0	50.0	20.0	5.0	0
15~19	5	80.0	80.0	80.0	80.0	40.0	40.0	40.0	0	0
20~24	15	100.0	100.0	86.7	86.7	46.7	26.7	13.3	6.7	0
25~29	11	100.0	100.0	90.9	90.9	81.8	72.7	27.3	9.1	0
30~39	16	100.0	100.0	100.0	100.0	81.3	50.0	37.5	18.8	12.5
40~49	25	100.0	96.0	96.0	88.0	64.0	52.0	24.0	16.0	8.0
50~59	19	100.0	94.7	89.5	89.5	78.9	52.6	36.8	26.3	5.3
60~	16	93.8	87.5	87.5	75.0	56.3	50.0	25.0	18.8	12.5
合計	196	98.0	95.9	93.4	90.3	75.0*	57.7*	36.2**	18.9**	10.2

*: p<0.05

**: p<0.01

3型 Saukett		抗体価別陽性率(%)								
年齢区分 (歳)	検査件数 (人)	4倍以上	8倍以上	16倍以上	32倍以上	64倍以上	128倍以上	256倍以上	512倍以上	1024倍以上
0~1	8	37.5	37.5	37.5	25.0	25.0	25.0	12.5	0	0
2~3	20	70.0	65.0	65.0	65.0	45.0	25.0	10.0	10.0	5.0
4~6	23	82.6	78.3	69.6	47.8	30.4	13.0	8.7	4.3	4.3
7~9	18	88.9	77.8	55.6	38.9	16.7	5.6	0	0	0
10~14	20	45.0	20.0	15.0	10.0	5.0	0	0	0	0
15~19	5	40.0	40.0	40.0	20.0	0	0	0	0	0
20~24	15	66.7	53.3	33.3	26.7	20.0	0	0	0	0
25~29	11	63.6	54.5	45.5	45.5	18.2	9.1	0	0	0
30~39	16	75.0	62.5	50.0	31.3	25.0	18.8	6.3	6.3	0
40~49	25	100.0	100.0	100.0	76.0	64.0	44.0	12.0	4.0	0
50~59	19	89.5	78.9	68.4	47.4	31.6	10.5	10.5	10.5	0
60~	16	93.8	93.8	87.5	87.5	62.5	37.5	18.8	12.5	6.3
合計	196	76.0	67.9	59.7	46.9	32.1	17.3	7.1	4.6	1.5

*: p<0.05

**: p<0.01

の陽性率が高かった。また、25～29歳では32倍以上 ($p<0.05$)、30～39歳では128倍以上 ($p<0.05$) で有意差が認められたが、その他の年齢区分では、陽性率に有意差は認められなかった。2型では、2～3歳の256倍以上 ($p<0.01$)、4～6歳の512倍以上 ($p<0.01$)、7～9歳の128倍以上 ($p<0.01$) において、Lansing株よりSabin 2株の陽性率が高かったが、その他の年齢区分では有意差は認められなかった。一方、3型では、各年齢区分ともSabin 3株とSaukett株との間に有意差は認められなかった。

ワクチン株と強毒株に対して、抗体価4倍以上の抗体保有者の平均抗体価を表4および図に示した。1型では、Sabin 1株は179.7倍、Mahoney株は74.0倍で、ワクチン株が強毒株より約2.4倍高い値を示した。ワクチン接種世代の30歳代より低年齢の年齢区分ではSabin 1株の平均抗体価はMahoney株より2倍～4倍高い傾向を示した。2型の平均抗体価では、Sabin 2株は177.8倍、Lansing株は117.4倍であった。年齢区分別では、4～6歳から20歳代の区分で、Sabin 2株がLansing株より約2倍高い傾向が見られた。3型の平均抗体価では、Sabin 3株が37.1倍、Saukett株が34.8倍であり、各年齢区分とも両ウイルスに対して同様の抗体価を示した。一方、ワクチンを接種していない50歳代以上の年齢区分では、各型とも強毒株の平均抗体価が、ワクチン株の平均抗体価より高い

傾向が認められた。

検体別の各型に対する抗体保有状況を表5に示した。ワクチン株の1型、2型、3型全てに対する抗体保有者は151件77.0%であった。同じく強毒株に対しては141件71.9%であり、ワクチン株と強毒株との間に有意差は認められなかった。

考 察

一般住民のポリオ流行予測感受性調査の結果は、わが国ではポリオの流行を阻止しうるに十分な抗体保有率を示している。一方、東南アジアや、インド、アフリカなどの一部の地域では、現在もポリオ野生株が常在しており、分離されたウイルスの中には、遺伝的にかなり変異したウイルスが見つっている。さらに、河川水や下水中からワクチン由来のポリオウイルス変異株が分離されている。また、抗体陰性者がワクチン由来株の二次感染によって麻痺症状を起こした例も認められている。これらの変異株に対する抗体レベルがどの程度のものか知っておく必要がある。そこで、まず、ポリオ強毒株に対する抗体保有状況を調査した。

抗体価4倍以上の抗体保有率は、各型とも強毒株がワクチン株よりやや低い傾向を示したが、両者の間に有意差は認められなかった。ワクチン接種世代の平均抗体価は、1型と2型ではワクチン

表4 平均中和抗体価 (抗体価4倍以上)

年齢区分 (歳)	検査件数 (人)	1 型				2 型				3 型			
		Sabin 1		Mahoney		Sabin 2		Lansing		Sabin 3		Saukett	
		陽性者	平均抗体価	陽性者	平均抗体価	陽性者	平均抗体価	陽性者	平均抗体価	陽性者	平均抗体価	陽性者	平均抗体価
0～1	8	7	1024.0	7	565.3	7	689.1	7	463.7	3	161.3	3	80.6
2～3	20	19	764.8	19	205.7	19	592.4	19	382.4	16	72.9	14	70.7
4～6	23	23	527.7	23	120.5	23	467.7	23	195.2	21	43.1	19	34.4
7～9	18	18	456.1	18	94.1	18	155.2	18	77.6	17	22.2	16	18.2
10～14	20	19	184.4	19	47.8	20	152.2	20	76.1	11	11.0	9	8.6
15～19	5	4	215.3	4	64.0	4	152.2	4	90.5	2	22.6	2	22.6
20～24	15	13	71.2	12	18.0	15	97.0	15	50.8	11	15.0	10	16.0
25～29	11	9	80.6	9	14.8	11	199.0	11	106.0	7	26.3	7	26.3
30～39	16	15	61.1	13	25.9	16	197.4	16	128.0	13	25.9	12	25.4
40～49	25	25	89.3	23	55.0	25	114.6	25	86.8	25	77.7	25	64.0
50～59	19	18	61.6	18	77.6	19	88.9	19	106.7	15	27.9	17	29.5
60～	16	16	94.5	16	145.8	15	53.2	15	84.4	15	61.1	15	80.6
合計	196	186	179.7	181	74.0	192	177.8	192	117.4	156	37.1	149	34.8

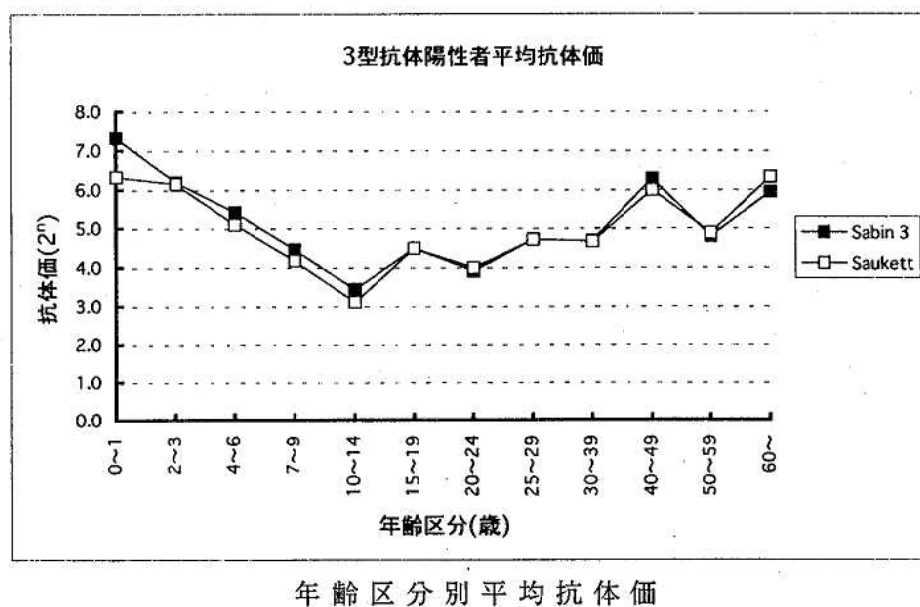
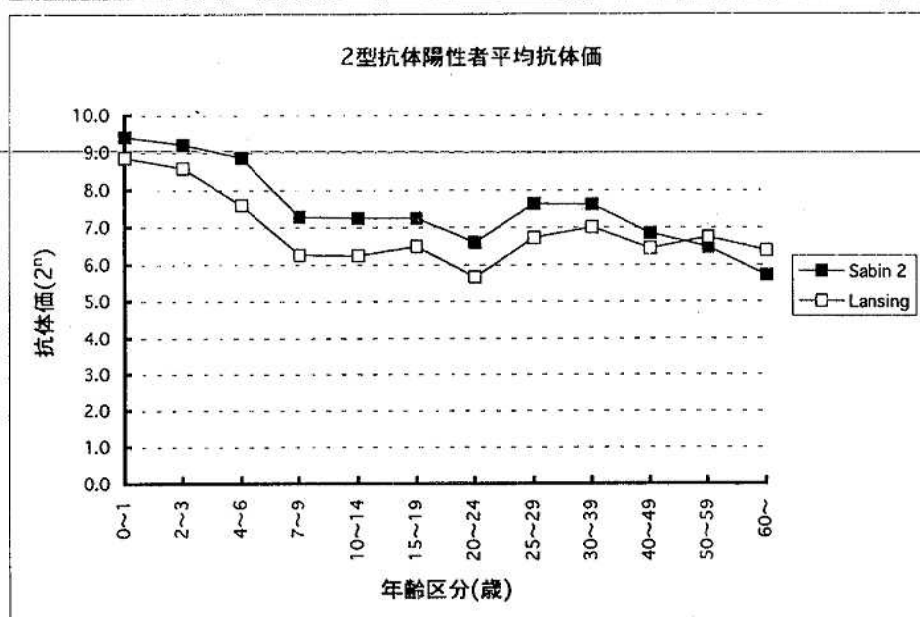
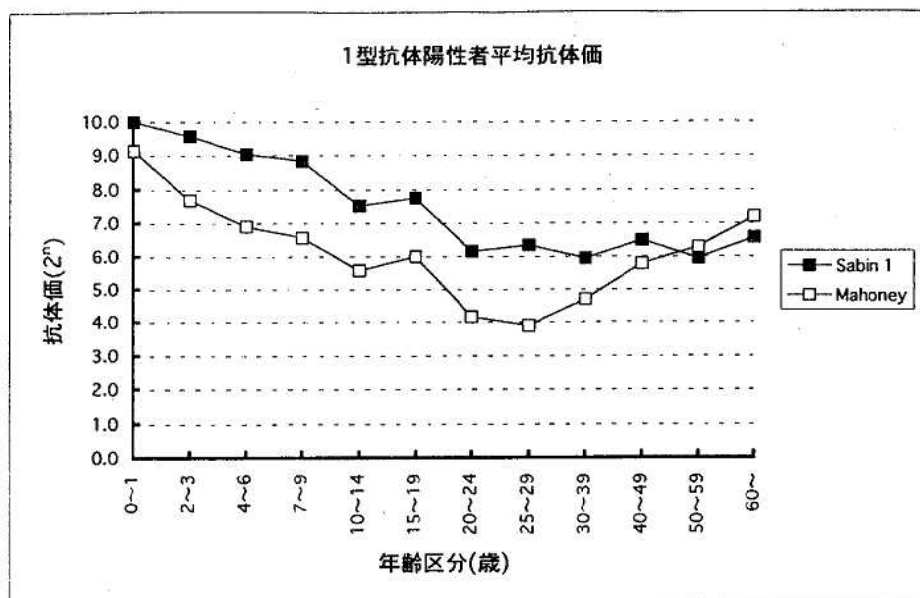


表5 個人別抗体保有状況（抗体価4倍以上）

Sabin株									
年齢区分	検体数	1,2,3型	型 別 保 有 状 況						
(歳)	(人)	全て陰性	1型	2型	3型	1,2型	2,3型	1,3型	1,2,3型(%)
0~1	8	1				4			3 (37.5)
2~3	20	1				3			16 (80.0)
4~6	23					2			21 (91.3)
7~9	18					1			17 (94.4)
10~14	20			1		8			11 (55.0)
15~19	5	1				2			2 (40.0)
20~24	15			1		3	1		10 (66.7)
25~29	11			1		3	1		6 (54.5)
30~39	16					3	1		12 (75.0)
40~49	25								25 (100.0)
50~59	19					4	1		14 (73.7)
60~	16					1		1	14 (87.5)
総合計	196	3	0	3	0	34	4	1	151
		1.5%	0.0%	1.5%	0.0%	17.3%	2.0%	0.5%	77.0%

強毒株									
年齢区分	検体数	1,2,3型	型 別 保 有 状 況						
(歳)	(人)	全て陰性	1型	2型	3型	1,2型	2,3型	1,3型	1,2,3型(%)
0~1	8	1				4			3 (37.5)
2~3	20	1				5			14 (70.0)
4~6	23					4			19 (82.6)
7~9	18					2			16 (88.9)
10~14	20			1		10			9 (45.0)
15~19	5	1				2			2 (40.0)
20~24	15			2		3	1		9 (60.0)
25~29	11			1		3	1		6 (54.5)
30~39	16			1		3	2		10 (62.5)
40~49	25						2		23 (92.0)
50~59	19					2	1		16 (84.2)
60~	16					1		1	14 (87.5)
総合計	196	3	0	5	0	39	7	1	141
		1.5%	0.0%	2.6%	0.0%	19.9%	3.6%	0.5%	71.9%

株に対する抗体価よりも強毒株に対する抗体価が低い傾向を示したが、3型では両株とも同様であった。一方50歳代以上では各型とも強毒株に対する抗体価がワクチン株より高い傾向が見られた。抗体価4倍以上を陽性とした抗体保有率がワクチン株より低い理由は、ワクチン株に対する抗体価の低い検体（4～8倍）の一部が強毒株に対して陰

性化したものであった。これは、強毒株に対する抗体価がワクチン株に対する抗体価より低い傾向を示したことを反映したものか、単なる抗体測定誤差によるものかについては、さらに検討を要すると思われた。

以上の結果、ワクチン接種後間もない年代では、高抗体価の保有率はワクチン株と強毒株との間に

有意差が認められたが、抗体価4倍以上の保有率では、各型ともワクチン株と強毒株との間に有意差は認められず、現在のワクチン接種体制で充分強毒株の流行を阻止しうると思われた。ただし、ここで使用した強毒株は、1950～1960年代に分離された強毒ウイルスの代表株である。現在も世界の一部の地域に生存している野生株の中には抗原性にかなりの変異を示す株も認められている[1]。個人的な抗体保有状態によっては、これらの遺伝的に変異した野生株や毒力を回復したワクチン由来変異株による、感染、発症の危険性は避けられない。これからは、子供や大人に関係なく、個人レベルの感染予防対策を考える必要があると思われた。

ま と め

0歳から76歳までの血清196件について、ポリオウイルスワクチン株と強毒株に対する中和抗体価を測定した。その結果、抗体価4倍以上の抗体保

有率は、1型、2型、3型ともワクチン株と強毒株との間に有意差は認められなかった。

平均抗体価は、1型および2型で強毒株がワクチン株よりやや低い傾向を示したが、3型では両株とも同様の値であった。

以上の結果から、ワクチン接種により、従来型の強毒株に対しては感染を予防しうると思われた。

文 献

1. 橋戸円, 米山徹夫, 萩原昭雄 (1998). 日本ウイルス学会第46回学術集会・総会抄録集 p160
2. 松浦久美子, 石倉康宏, 中山喬, 長谷川澄代, 安藤秀二, 北村敬 (1998). 富山衛研年報, 21, 117-120
3. 国立感染症研究所, 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課編 (1996). 病原微生物検出情報月報, 17, 219-220
4. 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課, 国立予防衛生研究所流行予測事業委員会編 (1996) 伝染病流行予測調査検査術式 (一部改訂), 2-8

富山県における河川水や下水から分離したポリオウイルスのVP1領域遺伝子の解析 (3)

松浦久美子 石倉 康宏 中山 喬
長谷川澄代 安藤 秀二 北村 敬

VP1 Gene Analysis of Poliovirus Isolates from River Water
and Sewage in Toyama Prefecture (3)

Kumiko MATSUURA, Mitsuhiro ISHIKURA,
Takashi NAKAYAMA, Sumiyo HASEGAWA,
Shuji ANDO and Takashi KITAMURA

要 旨 1993年から1995年の間に、富山県内の河川水と下水から分離されたポリオウイルス2型の31株と3型の31株について、VP1領域遺伝子の塩基配列を決定し、Sabin株との比較を試みた。その結果、2型14株、3型16株にはSabin株とは異なる塩基配列が認められた。これらの株とSabin株との塩基の差異は、2型0.7%以内、3型0.9%以内であり、これらの株はSabin変異株と考えられた。塩基配列よりアミノ酸配列に変換すると同義置換も多かったが、アミノ酸置換も起きていた。3型の3株では中和抗原決定部位N-Ag1の近隣にアミノ酸置換が存在していた。

1988年、WHO総会はポリオを全世界で根絶することを決議し、この目標に向けてポリオ撲滅事業が地球全地域で進行中である。その努力は成果をあげ、ポリオ患者は激減した[1,2]。東南アジアやアフリカなどの一部には依然としてポリオ患者が発生している。日本では1960～61年にポリオが大流行したが、61年にはポリオ生ワクチンが導入されて流行はおさまった。その後、1963年からはポリオ生ワクチン定期投与が開始され、ポリオ患者は激減した。1980年の1型ポリオを最後に、野生型ポリオウイルスによるポリオ麻痺症例は報告されていないが、1984年、1993年には麻痺症例以外から野生型が分離された。その後は検出されず、国内には野生株は常在しないと考えられている[3]。一方、ポリオ生ワクチンに関連した麻痺症例が、稀ではあるが発生して問題となっている。

我々は河川水や下水から分離されたポリオウイルス株について、VP1領域の遺伝子解析を試みた。第1報ではPCR-RFLP法での解析[4]、第2報ではポリオウイルス1型分離株の塩基配列を調べて、分離株がワクチン株か野生株かを検討した結果、1型分離株はSabinワクチン株由来であることを明らかにした[5]。今回はポリオウイルス2型、3型分離株について調べた結果を報告する。

材料と方法

1. ポリオウイルス

ウイルスの分離方法は前年報[6]の記載どおりである。

2. 塩基配列の解析

ポリオウイルス株をRNAzol B (コスモ・バイオ) で処理してウイルスRNAを抽出し、次にプライマー UC1とUG1を用いてVP1領域の遺伝子断片 (474~480bp) を増幅した。プライマーおよびRT-PCR法はBalanantら [7] の方法に準じた。その増幅したPCR産物をSeaKem GTG agarose (TakaRa) ゲルで電気泳動し、エチジウムプロミッドで染色後、UVイルミネーター下でDNA bandを切り出した。このDNAをSUPREC-01 (TaKaRa) の使用とアルコール沈殿により精製した。次に、精製DNAを鋳型としてBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてシーケンス反応を行い、Centri-Sep spin column で精製、Genetic Analyzer (ABI PRISM 310) にて塩基配列を決定した。さらに、この塩基配列よりアミノ酸配列に変換した。

結果と考察

1. ポリオウイルス 2 型分離株

31分離株についてVP1領域遺伝子の塩基配列 (position 2424-2862, 439 base) を決定した。これらの塩基配列とSabin 2 型株の塩基配列とを比較すると、17株はSabin株と同じであったが、14株にはSabin株とは異なる塩基の部位が認められた。これらの14株についてTable 1にSabin株と異なった塩基の部位、Fig. 1に塩基配列より変換したアミノ酸配列を示す。14株はSabin株とは1~3塩基異なり、0.7% (3/439) 以内の差異であった。その異なる塩基は、2株 (G25-6, G25-7) を除いた12分離株ではそれぞれ違った部位に見られた。次に、アミノ酸配列に変換すると、9株にアミノ酸置換が起きていた。これらのアミノ酸置換部位は、中和抗原決定部位N-Ag1の近隣には見られなかった。

2. ポリオウイルス 3 型分離株

31分離株についてVP1領域遺伝子の塩基配列 (position 2419-2851, 433 base) を決定した。これらの塩基配列とSabin 3 型株の塩基配列とを比較すると、15株はSabin株と同じであったが、

16株にはSabin株とは異なる塩基の部位が認められた。これらの16株についてTable 2にSabin株とは異なった塩基の部位、Fig. 2. にアミノ酸配列を示す。これらの16株はSabin株とは1~4塩基が異なり、0.9% (4/433) 以内の差異であった。その異なる塩基の部位は、分離株によって違う場合も多いが、変異しやすい部位 (position 2535: 3株, 2636: 3株, 2637: 6株, 2790: 3株) が認められた。アミノ酸配列に変換すると、13株にアミノ酸置換が起きていた。3株 (G4-18, G5-1, G27-3) におけるPosition 2790の塩基変異 (Sabin:T→分離株:C) は、VP1領域のアミノ酸position 105でアミノ酸置換 (Sabin:M→分離株:T) をもたらした。そこは中和抗原決定部位N-Ag1の近隣であった。N-Ag1の近隣部位での置換は抗原性の変化をもたらし、中和に影響する可能性ある。そこで、このことについて、Sabin型特異ポリクローナル抗血清 (ウサギ) の中和能で調べたところ、これら3株はSabin株と同じ抗体価で中和された。従って、ポリクローナル抗体ではN-Ag1近隣部位のアミノ酸置換の影響は見られなかった。現在、モノクローナル抗体で検討している。また、変異株に対する人血清の抗体調査も実施中である。

前年報[5]で報告した1型分離株(16株)についてのVP1領域の塩基配列を決定した結果では、12分離株にSabin株とは異なる塩基配列があり、その塩基の差異は1.4%以下であった。今回調べた2型31株、3型31株中にも、Sabin株とは異なる塩基配列の株(2型14株、3型16株)が存在し、その塩基の差異は各々0.7%以内、0.9%以内であった。米山ら [8] によると、ワクチン由来株において塩基配列の差異がVP1領域では0~2%認められると述べている。従って、河川水や下水から分離された78株(1型16株、2型31株、3型31株)はすべてSabin株由来と考えられる。Sabinワクチン株は、人の腸管での増殖やin vitroでの細胞継代により塩基変異が起きることは多く報告されているが、78株中42株(53.8%)が、Sabin株とは異なる塩基を持つ変異株であることは注目される。Sabin変異株が麻痺患者発生に関与する可能

Table 1. Nucleotide Differences between Type 2 Isolates and Sabin Strain

Strain/ isolate	Position of Nucleotides differed from type 2 Sabin strain																	No. of mutations
	2468	2520	2537	2546	2547	2548	2550	2566	2568	2576	2597	2626	2634	2687	2790	2796	2820	
Sabin 2	A	T	T	C	T	T	C	G	C	C	A	A	T	G	A	T	A	
018-1				T														1
041-1										T								1
G2-13																C		1
G4-9																		1
G15-8		C									G							1
G18-2			C					A	T									3
G18-10															G			1
G25-6, G25-7														A				1
G27-14					C								C					2
G39-8							T											1
G40-4																G		2
G41-2						C												1
G42-21	T											G						1

Sabin 2	FSVLLRDIT	HISQAMPQG	IGDMIEGAVE	GITNALVPP	TSNSLPDTK	PSGPANSKEI	PALTAVETGA	INPLVPSDTV	QTRVIOVRT	RSESTVESFF	ARGACVALLIE	VNDAPTKRA	SRLFSVWKIT	YKDTVQLRRK	LEFTTY
018-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
041-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G4-9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G18-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G25-6, G25-7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G40-4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G41-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G42-21	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Fig.1.Deduced Amino Acid Sequences of VP1 Region in Type 2 Isolates and Sabin Strain.

Dots represent amino acids which are identical to Sabin strain.

Table 2. Nucleotide Differences between Type 3 Isolates and Sabin Strain

Strain/ isolate	Position of Nucleotides differed from type 3 Sabin strain														No. of mutations
	2479	2535	2560	2592	2636	2637	2674	2707	2713	2776	2785	2790	2815		
Sabin 3	T	A	T	T	G	C	A	A	C	G	T	T	A		2
S9-2						T				A					1
S25-1				C											1
G2-19, G2-24, G27-9		G									C				1
G3-8, G3-16															2
G3-12						T		G							1
G3-14						T									3
G4-18						T	G					C			2
G4-19						T									4
G5-1	C								T			C	G		1
G17-6, G19-14					A										1
G19-4			C		A										1
G27-3						T						C			2

Sabin 3	FSVRLRDIT	HISQALPQG	IEDLISEVAQ	GALTSLPKQ	QDSLPPTKAS	GPASKEVPA	LTAVETGATN	PLAPSDTQV	RHVQRSSRS	ESTIESPFAR	GACVAILI	VD	NEOPTTRAQK	LFANWRITYK	DTVQLRRKLE	FFTY
S9-2, G3-12, G3-14, G4-19								V								
S25-1							A									
G2-19, G2-24, G27-9				R				V								
G4-18, G27-3								T								
G5-1																
G17-6, G19-14																

Fig.2. Deduced Amino Acid Sequenes of VP1 Region in Type 3 Isolates and Sabin Strain.

Dots represent amino acids which are identical to Sabin strain.

性がある。アメリカでは、2000年1月より子供達には不活化ワクチンが実施されるようになった[9]。ポリオ根絶の最終段階として、日本でも不活化ワクチンに切り替えることが必要と思われる。

文 献

1. Centers for Disease Control and Prevention (1997). MMWR, 46, 579-584
2. Centers for Disease Control and Prevention (1998). MMWR, 47, 414-419
3. Infectious Agents Surveillance Center (1997). Infectious Agents Surveillance report, 18, 1-2
4. 松浦久美子, 石倉康宏, 長谷川澄代, 中山 喬, 安藤秀二, 北村 敬(1998). 富山衛研年報, 21, 117-119
5. 松浦久美子, 石倉康宏, 中山 喬, 長谷川澄代, 安藤秀二, 北村 敬(1999). 富山衛研年報, 22, 91-96
6. 松浦久美子, 石倉康宏, 長谷川澄代, 中山 喬, 森田修行, 北村 敬(1997). 富山衛研年報, 20, 114-119
7. Balanant, J., Guillot, S., Candrea, A., Delpeyroux, F. and Crainic, R. (1991). Virology, 184, 645-654.
8. 米山徹夫, 吉田 弘, 清水博之, 吉井久美子, 萩原昭夫, 宮村達男(1997). 国立予防衛生研究所年報, 平成8年度, 65.
9. Centers for Disease Control and Prevention (1999). MMWR, 48, 590.

富山県でみられたノーウォーク様ウイルス (NLV) による急性胃腸炎の集団発生について (1999年度)

長谷川澄代 松浦久美子 中山 喬
安藤 秀二 石倉 康宏

Outbreaks of Gastroenteritis Caused by
Norwalk-like Virus(NLV) in Toyama
Prefecture in Fiscal 1999

Sumiyo HASEGAWA, Kumiko MATSUURA, Takashi NAKAYAMA,
Shuji ANDO and Mitsuhiro ISHIKURA

要 旨 1999年4月から2000年3月までの間に発生したウイルス性の食中毒事件について調査した。

1. 1999年度には7例の事件があり、これら全てがNLV感染によるものであり、7例中6例が感染源・感染経路として牡蠣が関与していた。
2. 糞便検体からのNLVの検出はEM法では31件 (31/34.91%)、ELISA法では13件 (13/34.38%) でEM法の方が検出率が高かった。
3. ELISA法で陽性となったNLVのGenogroupはG Iが11件、G IIが2件であった。
4. 生牡蠣を食してNLV 感染しても無症状でウイルスを糞便中に排出している感染者がいることが判明した。

近年、非細菌性食中毒の主な原因物質としてノーウォーク様ウイルス (Norwalk-like Virus:NLV) が注目されるようになった。NLV の感染経路としてはウイルスに汚染された牡蠣 (養殖中に、中腸腺にウイルスを蓄積) の生食によるものが多い。

しかし、牡蠣が関与しない食中毒事例も数多く報告されている。このような感染例は生牡蠣を原因とする事例に比べて発生数は少ないが、事件の規模 (一事例あたりの感染者数) は大きい。これは、NLV に不顕性感染している調理人の手指を介するなど、何らかの経路で食品がウイルス汚染され、それが感染源となったものと考えられる。

NLV は、「食中毒」を起こすウイルスとして知られている一方で、「感染症」ウイルスとしての性質もあり、乳幼児の急性胃腸炎はNLV によるものが多く、年間を通してNLV の感染が見られる [1]。また介護福祉施設などで、NLV 感染者の吐物や便に汚染された手指などを介してヒトからヒトへ直接伝播したと考えられる事例がいくつか報告されている [2, 3]。

今回、1999年度に富山県で起こったNLV 感染による胃腸炎の集団発生事例について報告する。

材料と方法

(1) 対象事例

1999年4月～2000年3月までの間に発生した食中毒事例7件を検査対象とした。

(2) 検査材料

1999年度にみられたNLVの集団感染事例は表1に示したとおり7例である。検査材料は7事例から糞便が採取された。食中毒症状のあった患者29人の糞便、調理従事者5人の糞便、推定原因食として牡蠣3件を検査材料とした。

(3) ウイルスの検出方法

ウイルス検索は電子顕微鏡観察（EM法）と「ウイルス下痢症研究会」で開発したノーウォークウイルス検出ELISAキットを用いて行った。食品（牡蠣の中腸腺）からのNLVの検出はRT-PCR法で行った。

結果および考察

1999年度にみられたNLVの集団発生事例は、表1に示した7例である。検査を行った7例のうち6例が、発症者に共通するNLV感染源・経路

表1. 富山県においてNLVが検出された食中毒事例

No.	発生時期	発生地区・状況 人数 / 検査数	検体	NLV検出数	電顕法	ELISA法
1	99.7.1~ 7.3	富市 会社 食堂 成人 101/290	糞便（患者） （調理者）	3/4 1/2	3/4 1/2	1/4 0/2
2	99.10.31~ 11.3	富市 飲食店 成人 20/27 牡蠣	糞便（患者）	3/4 1/1	3/4	0/4
3	99.12.26~ 12.27	石川 旅館 高校生・教師 ハンズ 59/102 牡蠣	糞便（患者）	5/5 1/1*	5/5 1/1	0/5
4	2000.2.20~ 2.21	富市 レストラン 高校生（テニスクラブ） 16/25 牡蠣	糞便（患者） （調理者）	6/6 3/3	6/6 3/3	3/6 1/3
5	2000.2.27~	富市 寿司屋 成人 5/6 牡蠣	糞便（患者）	5/5 0/1	5/5	3/5
6	2000.3.6~ 3.9	富市 家族 成人 4/4 牡蠣	糞便（患者）	3/3	3/3	3/3
7	2000.3.27~ 3.29	石川 温泉 成人 6/6 牡蠣	糞便（患者）	2/2	2/2	2/2

※ EM法とRT-PCR法で陽性

として、ウイルスに汚染された生牡蠣が関連していた。

事例No.1は、1999年7月、富山市内のA会社食堂で、290名が喫食し、7月1日～2日にかけて101名が「下痢」「嘔吐」「腹痛」の食中毒症状を呈した。医療機関を受診したものが31名で、そのうち3名が入院した。患者4名（入院患者2名を含む）と調理人2名から糞便を採取し、ウイルス検出を試みたところEM法で患者4名中3名から、調理人2名のうち1名からNLVを検出した。一方、ELISA法では、患者4名のうち1名が陽性であった。この事例では牡蠣の喫食は見られず、調理前もしくは調理中に何らかの経路でウイルスに汚染された食品が原因となったと考えられた。実際、EM法でNLV陽性の調理人はこの事件が発生する1か月前より下痢症状が続いていたとのことであった。松岡ら〔4〕は3才の子供がNLVに感染後、3週間にわたりNLV粒子を糞便中に排泄していた事例を報告している。このことよりこの事例はNLV感染者である調理人の排泄物が、何らかの経路で食品を2次汚染させそれが感染源になったと考えられた。

事例No.2は、1999年10月30日の夕方、富山市内の飲食店で会食した27名のうち20名が、10月31日午後9時頃から「嘔吐」「発熱」「下痢」の症状を呈した。この事件の場合、牡蠣を食していない人も発症していた。患者4名から糞便が採取された。4名のうち3名からEM法でNLVが検出されたがELISA法では4名全員が陰性であった。牡蠣の中腸腺からRT-PCR法でNLVの遺伝子を検出した。この事例は、NLVで汚染された牡蠣を調理する際に調理器具や調理人の手指がNLVで汚染されて、他の食品が二次汚染されることにより、それを食べたヒトがNLV感染したものと考えられる。

事例No.3は、1999年12月26日午後11時30分～27日午前7時30分にかけて、氷見市で全国ハンドボール大会に参加していた102名（高校生徒91名、先生11名）のうち生徒59名が、「下痢」「嘔吐」の症状を呈し、31名が入院する大事件であった。原因食は12月25日の夕食に宿泊先の旅館で出され

た生牡蠣であった。喫食してから発症までの平均潜伏時間は37時間25分であった。患者糞便5件よりEM法により、全てにNLV粒子を確認したが、ELISA法では5件すべてが陰性であった。生牡蠣の中腸腺を精製濃縮し、EM法でのNLV粒子の検出とRT-PCR法でNLV遺伝子の検出を試みたところEM法でウイルス粒子を、RT-PCR法でNLVの遺伝子を確認した。

事例No.4は2000年2月19日お昼、富山市内のレストランで高校生のテーブルマナー教室が開かれた。25名（生徒24名、先生1名）が喫食して、2月19日夜から生徒16名が「下痢」「腹痛」の症状を呈し、そのうち3名が医療機関を受診した。原因食は生牡蠣であった。EM法で患者6名の糞便中にNLV粒子を確認した。ELISA法では6名のうち3名が陽性であった。調理人3名からも患者と同時期に糞便が採取された。調理人3名のうち1名の便の性状は下痢便であったが、他の2名は無症状で便の性状は普通便に近い状態であった。調理人3名の糞便中にEM法でNLVの粒子を確認した。ELISA法では3名のうち普通便の1名だけが陽性であった。EM法とELISA法の両方がNLV陽性の調理人は患者らと同じロットの生牡蠣をテーブルマナー教室以前に食していたが、まったく胃腸炎症状は呈していなかった。原因食品は、潜伏時間からNLVに汚染された牡蠣であると判断された。この事例より、たとえ生牡蠣を食べて、NLVに感染しても、全く無症状で糞便中にかなり量のNLV粒子を排泄している不顕性感染者の存在が判明した。この事実より不顕性感染者が糞便中にどれくらいの期間、NLV粒子を糞便中に排泄し続けるかを調査研究する必要があると考えられた。

事例No.5は2000年2月29日午後7時頃6名が砺波市内の寿司店で、会食し、生牡蠣を食した5名全てが「嘔吐」「発熱」「下痢」の症状を呈した。患者5名から糞便が採取された。5名の患者全員からEM法でNLV粒子が確認された。ELISA法では5名中3名が陽性であった。RT-PCR法で牡蠣の中腸腺からのNLV遺伝子の検出を試みたが、陰性であった。

表2. ELISAキットでNLVが検出された事例

No.	発生時期	状 況	検 体	ELISA法 陽性数/検査数	遺伝子型	
					I	II
1	1999.7	会社 食堂 成人	糞便 (患者)	1 / 4		1
4	2000.2	レストラン 高校生 (テ-フルマナ-) 牡蠣	糞便 (患者)	3 / 6	3	
			糞便 (調理者)	1 / 3	1	
5	2000.2	寿司屋 成人 牡蠣	糞便 (患者)	3 / 5	2	1
6	2000.3	家族 成人 牡蠣	糞便 (患者)	3 / 3	3	
7	2000.3	砂嚙で食した 成人 牡蠣	糞便 (患者)	2 / 2	2	

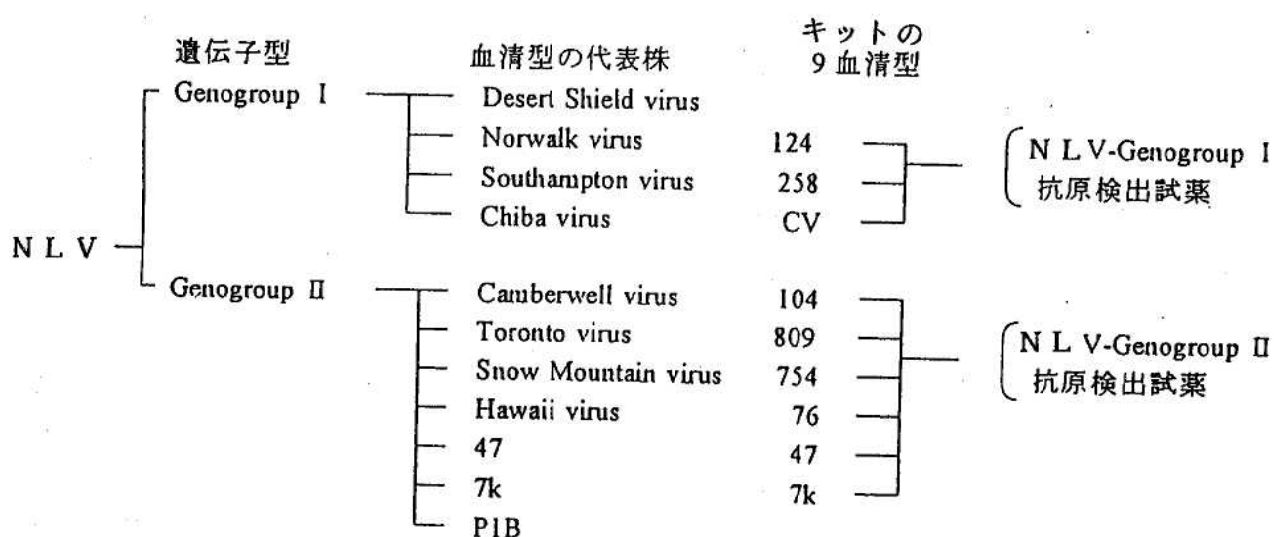


図1. NLVの血清型の代表株とELISAキットの血液型の関係

事例No.6は2000年3月4日夕方、滑川市内の家族4人が、牡蠣のしゃぶしゃぶを食して、3月6日に「下痢」「嘔吐」「頭痛」の症状を呈して、3月7日に医療機関を受診した。患者3名の糞便が採取された。EM法で3名からNLV粒子が確認された。一方、ELISA法でも3名すべてが陽性であった。

事例No.7は2000年3月26日、石川県で牡蠣料理を食して、3月27日～28日に「下痢」「嘔吐」「発熱」の症状を呈した。患者2名から糞便が採取された。患者2名の糞便中にEM法でNLV粒子が確認された。ELISA法でも2例は陽性であった。

今回、7例の事例について報告したが、NLVの検出にはEM法による検査のほうが、ELISA法よりも検出率が高かった。今回の7事例のうち5事例がELISA法で陽性となった。これら陽性のNLVのGenogroupは表2に示した。感染源が牡蠣のため血清型の異なったNLVが混在している事例No.5のようなケースも見られた。しかし、事例No.2,3は電顕法でNLVが確認されても、ELISA法で陰性であった。今回使用したELISAキットは、マイクロプレートに抗NLV抗体を固相し、捕捉されたNLVをペルオキシダーゼ標識抗NLV抗体で検出するキットなので、NLVの血清型は、図.1に示すGenogroup Iの3株(G I)とGenogroup IIの6株(G II)であるので、これら以外の血清型のNLVは検出が困難と思われる。このキットは開発中なのでさらに検出可能なNLVの血清型が加わることにより、NLVの検出に有効なキットとなると考えられる。

NLVの感染源・感染経路として、一般的に考えられることは①ヒトの糞便中のNLVが下水を経て河川、海に流れ込み、牡蠣等の2枚貝がウイ

ルスを取り込み、その貝類をヒトが生で食べることでヒトに感染するルートがある。この他に、牡蠣が直接関連しない経路として②牡蠣などの貝類が調理の過程で他の食品を二次的に汚染し、それを食べることでヒトに感染するルート、③糞便が下水を通じ飲料水に混入してヒトに感染する水系感染のルート、④糞便が食品を汚染してヒトに感染するルート、⑤糞便が介護人の手などを介してヒトからヒトへ感染するルートが推定される。このように牡蠣が直接関連しないルートは、NLVが含まれる糞便による二次汚染の影響がおおきい。食中毒の防止には牡蠣等(2枚貝)や魚介類を調理する場合は十分注意し、他の食材へのNLV汚染を阻止することが大切であると考えられる。事例No.4のように無症状のヒトの糞便中にNLVが排泄されることから、食中毒の防止には、NLV感染者の糞便については、2～3週間にわたり、特に汚物処理などには十分注意する必要があると考えられる。

謝辞：検体採取等にご協力いただきました富山市、高岡、中部、新川、砺波保健所の関係者各位に感謝します。

文 献

1. 長谷川澄代, 館 一矩, 北村 敬(1999).富山衛研年報, 178-182.
2. 斎藤博之, 八柳 潤, 佐藤広康, 宮島嘉道, 鈴木紀行, 森田盛大(1997).病原微生物検出情報, 月報, 6, 5-6.
3. 入谷展弘, 勢戸祥介, 春木孝祐, 浅香策雄(1998).病原微生物検出情報, 月報, 1, 3.
4. 松岡由美子, 阿蘇品早苗, 本田れい子, 松野重雄(1999).病原微生物検出情報, 月報, 11, 3.

日本産マダニから直接PCR法で増幅した 紅斑熱群リケッチア遺伝子の系統解析

石倉 康宏 安藤 秀二 渡辺 護
品川 保弘 藤田 博己¹ 松浦久美子
長谷川澄代 中山 喬 北村 敬

Phylogenetic Analysis of *gltA* and *rompA* Genes
of Spotted Fever Group Rickettsiae Amplified
by PCR from Ticks in Japan.

Mitsuhiro ISHIKURA, Shuji ANDO, Mamoru WATANABE,
Yasuhiro SHINAGAWA, Hiromi FUJITA¹, Kumiko MATSUURA,
Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA, Takashi KITAMURA

要 旨 日本各地で採集したマダニから直接PCR法でリケッチアのクエン酸合成酵素遺伝子 (*gltA*) と190-kDa抗原遺伝子 (*rompA*) を増幅し、増幅した遺伝子のシーケンスを行い、このシーケンスをもとに系統解析を行った。

日本産マダニのリケッチア (*gltA*) 保有率は10~94%とマダニの種類により異なり、平均すると28% (165/587) であった。増幅した*gltA*遺伝子断片で系統樹をつくると、大きくIAとIBに分枝し、更に、IBはIB-1とIB-2に分枝した。IAに分枝した*gltA*遺伝子断片は*Rickettsia helvetica*のそれと同一であり、ヤマトマダニ13, シュルツエマダニ3, キチマダニ5, ヤマトチマダニ2, ヤマアラシチマダニ1個体からそれぞれ増幅された。しかしながら、これらのマダニからは*rompA*遺伝子は増幅出来なかった。IB-1に分枝した*gltA*遺伝子は*R. felis*, *R. akari*, AT-1株のそれと同じクラスターに属し、ヤマトマダニ1, タネガタマダニ1, キチマダニ3, ヒゲナガチマダニ1個体からそれぞれ増幅された。そしてこれらの6個体から*rompA*遺伝子も増幅されたが、この遺伝子は既知の紅斑熱群 (SFG) リケッチアとは大きく異なった枝に位置した。一方、IB-2に分枝した*gltA*遺伝子は*R. japonica*, *R. rickettii*, *R. conorii*のそれと同じクラスターに属し、キチマダニ12, フタトゲチマダニ13, タカサゴチマダニ13, オオトゲチマダニ8, ヤマトチマダニ4, ヤマアラシチマダニ3, ヒゲナガチマダニ1個体からそれぞれ増幅された。これらの個体から、*rompA*遺伝子は57個体から増幅された。これを系統解析すると、フトトゲチマダニやタカサゴチマダニは*R. japonica*に非常に近縁SFGリケッチアを高率に保有していることが明らかとなった。

前報では日本産マダニが保有する紅斑熱群(SFG)リケッチアの分類上の位置を明らかにするために、マダニから分離したSFGリケッチアのクエン酸合成酵素遺伝子(gltA)と190-kDa抗原遺伝子(rompA)断片の塩基配列を決定し、それをもとにして系統解析を行い、分類した。その結果、徳島県生息のタイワンカクマダニとキチマダニは日本紅斑熱の病原体である*R. japonica* (1,2,6)を保有することを、徳島県、秋田県、北海道に生息する*Ixodes*属のマダニは*R. helvetica* (1,2)を保有することを、また、徳島県生息のタカサゴキララマダニはアメリカの*Ixodes scapularis*から分離された*R. cooleyi*に近縁な新種のSFGリケッチア(AT-1株)を保有することを明らかにしてきた(1,2)。今年度は、我国に生息するマダニのリケッチア保有状況をより詳細に知るために、日本各地から採集したマダニから直接PCR法でgltAおよびrompA遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子断片はシーケンスをし、系統解析を行ったのでその結果を報告する。

材料と方法

1. マダニの採集

マダニは日本紅斑熱の患者発生地である徳島県、高知県、千葉県と、そして患者非発生の富山県と北海道でそれぞれ旗ずり法で採集した。

2. マダニからPCR法によるgltAおよびrompA遺伝子断片の増幅

a. マダニから鋳型DNAの抽出と精製

生きたマダニは0.5mlのプラスティックチューブに入れ、眼科用ピンセットでよくつぶす。200~300ulの磷酸緩衝液(pH7.2, PBS)を加え、更にピンセットでよくつぶし、ダニの足や殻をピンセットで取り除く。このマダニ乳剤は12,000rpmで20分間遠心した。遠心後、上清をすて、沈査に50ulのInstaGene Matorix (Bio-Rad)を加え、55℃で60分間保った後、強くボルテックスした。そして、チューブは100℃で8分間煮沸した。煮沸後のチューブは12,000rpmで10分間遠心し、その上清を鋳型DNA

NAとして使用した。

b. nested PCR

マダニからのgltA断片の増幅には*R. prowazekii*のgltAから構築したRpCS.780p(GACCATGAGCAGAATGCTTCT)とRpCS.1258n(ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA)のプライマーペアを用い、denaturationは95℃で30秒、annealingは44℃で30秒、extensionは65℃で2分、cycleは35回の条件でfirst PCRを行った。second PCRはRpCS.877p(GGGGGCCTGCTCACGGCGG)とRpCS.1258n(381bp)のプライマーペア(3)を用いて同じ条件で行った。一方、rompAの増幅は*R. ricketii*のrompAから構築したRr190.70p(ATGGCGAATATTTCTCCAAA)とRr190.669n(TATTATACCTCCTCCATCTAT)のプライマーペアを用い、denaturationは95℃で30秒、annealingは40℃で35秒、extensionは62℃で2分、cycleは35回の条件でfirst PCRを行った。second PCRはRr190.70pとRr190.606n(AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT)(532bp)のプライマーペア(4)を用いてfirst PCRと同じ条件で行った。PCR産物は2%アガロースゲル(和光)で電気泳動した。泳動後のゲルはethidiumbromide液で20分間染色した後、トランスイルミネーター上でDNA-bandを観察した。

3. PCR増幅遺伝子断片のシーケンス

a. PCR産物の精製

マダニからPCRで増幅した遺伝子断片は1.2% Seakem GTGアガロース(Takara)ゲルを用いて電気泳動した。泳動後のゲルはethidium bromideで染色した。染色したゲルはトランスイルミネーターにのせて目的のDNA-band確認した後、フナゲルチップ(フナコシ)で切り取った。切り取ったゲル小片はDNA回収カートリッジ(Takara)にいれ、-40℃で凍結させた。カートリッジは室温に置き、DNA-bandを含むゲル小片を融解させ、そして12,000rpmで20分間冷却遠心をし、ゲルからDNAを分離した。更に遠心後のカートリッジに200ulの蒸溜水を加え、12,000rpmで20分間遠心した。そしてカートリッジからフィルターを取り除き、フィルターを通過した液に冷アルコール

ル (2.5倍量) を加え, 15,000rpmで20分間遠心してDNAを沈殿させた。沈殿DNAは70%アルコールで洗浄した後に乾燥させ, 使用時に少量の蒸溜水に溶かした。

b. シーケンス反応

シーケンス反応はマダニからPCR法で増幅した精製DNAを鋳型とし, ABIのシーケンシングキット(BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit)を用いて行った。

c. シーケンス

シーケンス反応産物はCentriSepスピнкаラムに通して, フリーの蛍光色素を取り除いた。gltAおよびrompA断片のシーケンスは精製したシーケンス反応産物を310 Genetic Analyzer (ABI)

でカピラリー電気泳動をすることによって解読した。

4. 系統解析

マダニから増幅されたgltAおよびrompA断片の塩基配列の比較と系統解析は, 遺伝子情報処理ソフトウェアであるGene Works2.3.1ソフトウェアを用いて行った。系統樹はUnweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean(UPGMA)で作成した。我々がシーケンス出来なかったリケツチアのgltAおよびrompA情報はGene Bank Data Baseからインターネットで得た。リケツチア名, 株名, Gene Bank Accession No.は表1に示した。

表1. 実験に使用したリケツチア種と株名

No.	Species and strain	GenBanks accession no. gltA	rompA	Geographic origin	Source, vector tick
1.	<i>R. africana</i> , ESF-5	U59733	U43790	Ethiopia	<i>Amblyomma variegatum</i>
2.	<i>R. sibirica</i> , 246(K-1)	U59734	U43807	Siberia	<i>Dermacentor nutalli</i>
3.	<i>R. parkeri</i> , Maculatum 20	U59732	U43802	Mississippi	<i>A. maculatum</i>
4.	<i>R. slovaca</i> , 13-B	U59725	U43808	Slovakia	<i>D. marginalis</i>
5.	<i>R. japonica</i> , YH			Japan	Human, ?
6.	<i>R. montana</i> , ATCC VR-611	U74756	U43801	Montana	<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i>
7.	<i>R. rickettsii</i> , Sheila Smith			Montana	Human, <i>D. andersoni</i>
8.	<i>R. conorii</i> , Malish 7	U59730	U01028	Africa	?, <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
9.	<i>R. massiliae</i> , Mtu 1	U59719	U43799	France	<i>Rh. turanicus</i>
10.	<i>R. rhipicephali</i> , 3-7-f-6	U59721	U43803	Mississippi	<i>A. maculatum</i>
11.	<i>R. honei</i> , RB	AF022817		Australia	Human, ?
12.	<i>R. helvetica</i> , C9P9	U59723		Switzerland	<i>Ixodes ricinus</i>
13.	<i>R. cooley</i> , AF031536	AF031536	AF031535	Texas	<i>I. scapularis</i>
14.	<i>R. akari</i> , Kaplan	U59717		New York	Humann, <i>Alloderma</i>
15.	<i>R. australis</i> , Phillips	U33923		Australia	Human, <i>Ixodes</i> sp.?
16.	<i>R. felis</i> ,				Human, (<i>Ctenocephalides</i>)
17.	<i>R. bellii</i> , 369L42-1	U59761		Ohio	<i>D. variabilis</i>
18.	HA-91 (<i>R. mongolotimonae</i>)	U59371		Mongolia	<i>Haemaphysalis asiaticum</i>
19.	TT-118 (Thai tick typhus)	U59726		Thailand	<i>Ixodes</i> sp., <i>Rhipicephalus</i> sp.
20.	A-167 (Astrakhan fever)	U59728	U43791	Russia	<i>Rh. pumilio</i>
21.	ITTR (Israeli tick typhus)	U59727	U43797	Israel	<i>Rh. sanguineus</i>
22.	MC16	U59722	U43800	Morocco	<i>Hyalomma marginatum</i>
23.	Bar29	U59720	U43792	Spain	<i>Rhipicephalus</i> sp.
24.	Strain S	U59735		Armenia	<i>Rh. sanguineus</i>
25.	AB bacterium	U59712		England	<i>Adalia bipunctata</i>
26.	ISS (<i>I. scapularis</i> symbiont)		AB002268	Minnesota	<i>I. scapularis</i>
27.	Puerto Rico	U76908		Florida	papaya, ?
28.	<i>R. prowazekii</i> , Brein L	M17149		Poland	Human, (<i>Prdiculus</i>)
29.	<i>R. typhi</i> , Wilmington			Carolina	Human, (<i>Xenopsylla</i>)

Human disease: rickettsia; No. 1, 2, 5, 7, 8, 11, 14, 15, 16?, 18, 19, 20, 21, 28, 29.

結 果

1. マダニのリケッチア (gltA) 保有状況

リケッチア属に含まれる全てのリケッチア種の gltA が増幅出来るプライマーを用い、日本産マダニのリケッチア保有率を調べた (表2)。*Ixodes* に属するマダニのリケッチア保有率は23% (48/205) で、*Haemophysalis* に属するマダニの保有率は31% (117/382) であり、マダニ全体での保有率は28% (165/587) であった。これをマダニの種類別にみると、フタトゲチマダニとタカサゴチマダニが他の種類のマダニよりもリケッチア保有率が有意に高かった。採集地別にみるとヤマトマダニ、キチマダニの保有率に地域差はみられなかったが、フタトゲチマダニのリケッチア保有率は日本紅斑熱患者非発生地富山県よりも、患者発生地の高知県に生息する方が有意に高率であった。

2. マダニから増幅された gltA 遺伝子断片 (341bp) の系統解析

90個体のマダニから増幅した gltA 断片 (プライマーの配列を除いた341bp) の塩基配列をもとに系統解析を行った。UPGMA法で作成した系統樹は図1に示す。マダニから増幅した gltA は大きくIAとIBに分かれ、更に、IBはIB-1とIB-2に大別された。IAに分類された gltA はヤマトマダニ13個体、シュルツェマダニ3個体、キチマダニ5個体、ヤマトチマダニ2個体、ヤマアラシチマダニ1個体からそれぞれ増幅された (表2)。IAの gltA の塩基配列は *R. helvetica* のそれと同じか、1~2塩基の置換みられるだけであることから、これらのマダニは *R. helvetica* を保有していることが明らかとなった。IB-1に分類された gltA はキチマダニ3個体、ヤマトマダニ1個体、タネガタマダニ1個体、ヒゲナガチマダニ1個体からそれぞれ増幅された。この gltA は徳島県のタカサゴキラマダニから分離されたAT-1株や *R. akari*, *R. australis*, *R. felis* のそれと相同性が高く、同じクラスターを形成することが明らかとなった。IB-2に分類された gltA はキチマダニ17個体、フタトゲチマダニ13個体、タカサゴチマダニ8個体、オオトゲチマ

ダニ8個体、ヤマトチマダニ2個体、ヤマアラシチマダニ2個体、ヒゲナガチマダニ1個体からそれぞれ増幅された。このIB-2の gltA は系統樹上で a, b, c, d の4つに分類され、a, b, c は一つのクラスターを形成し、d は *R. japonica*, *R. slovaca*, *R. ricketii*, *R. conorii*, *R. amblyommii* などと同じクラスターに属した (図1)。このIB-2の gltA は *R. japonica* のそれと相同性が高いものが多く認められたが、*R. japonica* と同一の塩基配列を示したものは一例も認められなかった。1個体の *Ixodes* sp. N2 と2個体のキチマダニから増幅された gltA は、既知のリケッチアや他のマダニから増幅された gltA とかなり異なった塩基配列 (identity: 63%) を示した (系統樹上に示していない)。

3. マダニから rompA の増幅と系統解析

a. rompA の増幅

gltA が増幅された90個体のマダニのうち81個体 (塩基配列が大きく異なった3個体のダニと鋳型DNAの試料が少量しかなかった9個体のダニを除く) から rompA の増幅を試みた。IAに分類された gltA を保有する24個体のマダニからは rompA は一例も増幅されなかった。IB-1に分類された gltA を保有する6個体のマダニのうち、5個体から rompA が増幅された。一方、IB-2に分類された gltA を保有する51個体のマダニうち、31個体から rompA が増幅された。このうち、cに分類された gltA 保有マダニからは全例 rompA が増幅されたが、dに分類された gltA 保有マダニからは全例 rompA を増幅することは出来なかった。

b. 増幅 rompA の系統解析

IB-1の gltA を保有するタネガタマダニから増幅された rompA は、*R. japonica* との identity が83%で、徳島県のタカサゴキラマダニから分離されたAT-1株との identity は93%であった。従って、このタネガタマダニはAT-1株に近縁なSFGリケッチアを保有していることが明らかとなった (系統樹には示していない)。同じく、IB-1の gltA を保有していたキチマダニから増幅された rompA は、*R. japonica* との identity が63%と低く、系

表2. 日本産マダニからPCRによるgltA遺伝子の増幅

ダニの種類	ダニ採集県					計	
	富山県	高知県	徳島県	千葉県	北海道		
<i>Ixodes</i> 属							
ヤマトマダニ	30/134	7/23	0	0	6/12	43/169	25%
シュルツェマダニ	3/31	0	0	0	0	3/31	10
タネガタマダニ	1/1	0/3	0	0	0	1/4	25
<i>Ixodes</i> sp. N2	0	0	1/1	0	0	1/1	(100)
<i>Haemophysalis</i> 属							
キチマダニ	11/74	19/72	3/13	0	0	33/159	21%
フタトゲチマダニ	22/49	15/16	0	0	0	37/65	60
タカサゴチマダニ	0	16/26	0	0	0	16/26	62
オオトゲチマダニ	0	12/41	0	4/26	0	16/67	24
ヤマトチマダニ	6/16	0	0	0	0	6/16	38
ヤマアラシチマダニ	0	4/11	0	0	0	4/11	36
ヒゲナガチマダニ	0	0	0	5/38	0	5/38	13
計	73/305	73/192	4/14	9/64	6/12	165/587	28%

表3. 日本産マダニが保有する紅斑熱リケッチアのgltA遺伝子による系統分類

ダニの種類	供試数	I A (<i>R. helvetica</i>)	I B				その他	
			I B-1	I B-2				
				a	b	c		d

<i>Ixodes</i> 属							
ヤマトマダニ	20	13	1	4		1	1
シュルツェマダニ	3	3					
タネガタマダニ	1		1				
<i>Ixodes</i> sp. N2	1						1
<i>Haemophysalis</i> 属							
キチマダニ	27	5	3	8	8		1
フタトゲチマダニ	13			1		12	
タカサゴチマダニ	8					6	2
オオトゲチマダニ	8			7		1	
ヤマトチマダニ	4	2		2			
ヤマアラシチマダニ	3	1					2
ヒゲナガチマダニ	11		1		1		
計	90	24	6	22	9	20	6

57

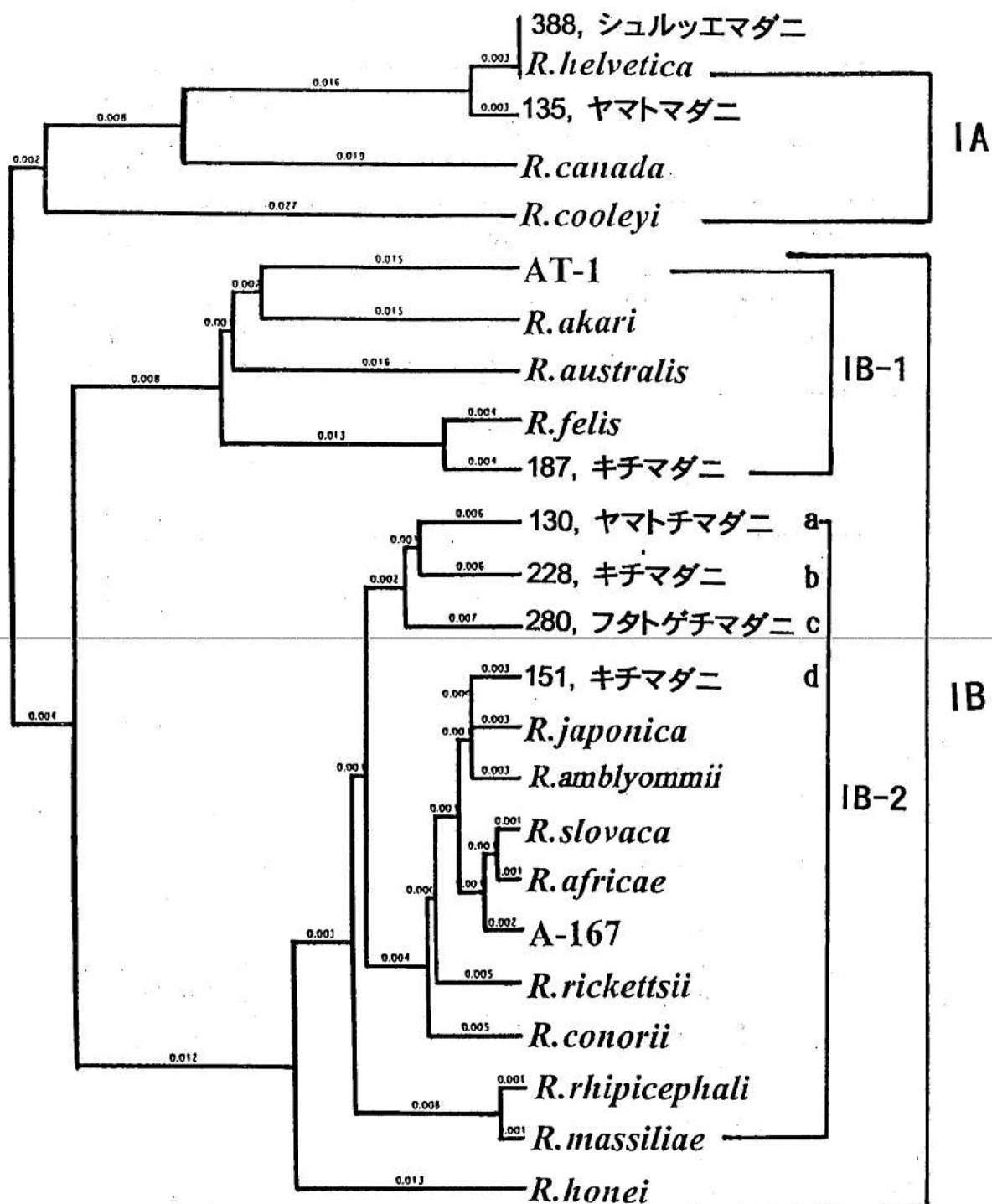


図1. マダニから増幅したgltA遺伝子の系統樹

系統樹上でも既知のSFGリケッチアの外側の枝に位置した(図2)。一方、IB-2に分類されたgltAを保有するマダニから増幅されたrompAは、マダニの種類、採集地に関係なく、ほとんど同じ塩基配列を示し、*R. japonica*と近縁(identity:94%)で、系統樹上も*R. japonica*に近い枝に位置した。しかしながら、*R. japonica*と同じ塩基配列のro-

mpAを保有するキチマダニは一例もいなかった。

考 察

前報では日本産マダニからL細胞を用いて分離したSFGリケッチアをgltAとrOmpA遺伝子を標

表4. gltA遺伝子型におけるrOmpAの増幅の有無

gltA遺伝子型	供試数	rOmpAの増幅	
		有り	無し
IA (<i>R. helvetica</i>)	24		24
IB-1	6	5	1
IB-2 a	17	8	9
b	8	3	5
c	20	20	
d	6		6
計	81	36	45

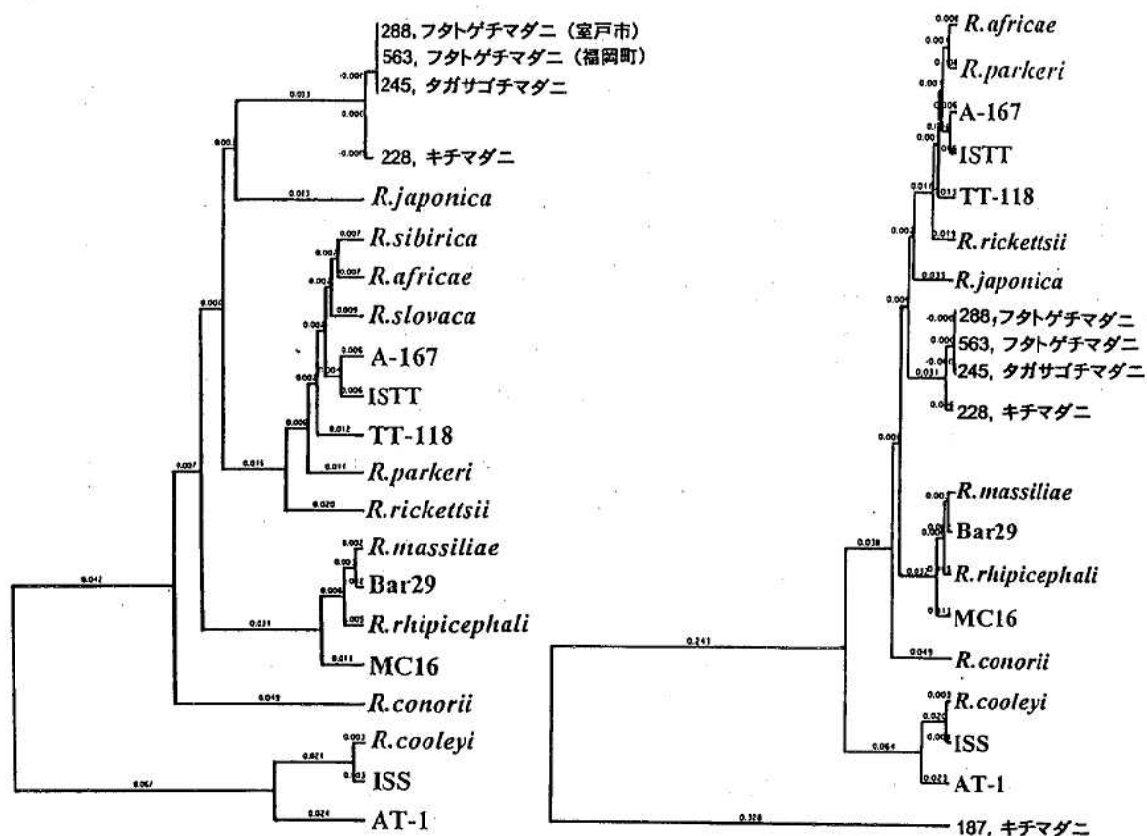


図2. マダニから増幅したrOmpA遺伝子の系統樹(1) 図3. マダニから増幅したrOmpA遺伝子の系統樹(2)

的に系統解析を行った。その結果、日本産マダニは日本紅斑熱の病原体である *R. japonica* (6) 以外に、*R. helvetica* と AT-1 株の 2 種類の SFG リケッチアを保有することを明らかにした (1, 2)。マダニは消化管に多くの微生物を保有しているため、培養細胞に雑菌が混入することが多く、ダニからのリケッチアの分離を困難にしている。また培養条件によって選択抑制がかかるために、マダニが保有するすべてのリケッチアを分離するのは不可能である。そこで、今年度は日本産マダニの SFG リケッチア保有状況をより詳細に解明する目的で、日本各地で採集してきたマダニから直接 PCR 法で *gltA* と *rompA* 遺伝子断片を増幅し、系統分類を試みた。

日本国内の山間部に広く分布しているヤマトマダニは *R. helvetica* を保有することは前報において報告した (1)。今回も、日本各地から採集されたヤマトマダニはおよそ 17% の率で *R. helvetica* を保有することを明らかにすることができた。また同じ *Ixodes* に属するシュルツェマダニにも 10% の率で *R. helvetica* を保有しており、*R. helvetica* は *Ixodes* を宿主として日本国内に広く分布していることを再確認した。一方、富山県で採集された *Ixodes* に属する 1 個体のタネガタマダニは徳島県で採集され、*Amblyomma* に属するタカサゴキラマダニから分離された AT-1 株 (2) と近縁な SFG リケッチアを保有していた。

国内に最も多く分布しているキチマダニはおよそ 21% の率でリケッチアを保有することが明らかとなった。徳島県の患者発生地で採集されたキチマダニから *R. japonica* が分離されている (2)。そこで今回、徳島県と高知県の患者発生地で 85 個体のキチマダニを採集して *R. japonica* を保有するかどうかを検討した。患者発生地のキチマダニは *R. japonica* に近縁なリケッチアを保有することは確認されたが、*R. japonica* を保有するキチマダニは認められなかった。系統分類でキチマダニが保有する SFG リケッチアをみると、キチマダニは *R. helvetica* はじめとして、数種類の SFG リケッチアを保有することが可能な宿主であることが明らかとなった。このうち、*gltA* の分類で IB-1 のリ

ケッチアを保有する 3 個体キチマダニから増幅された *rompA* は、既知の SFG リケッチアのそれと比べ大きく異なっていた。*rompA* は SFG リケッチアの表層タンパク (190-kDa 抗原) をコードしていることから、この遺伝子をもつリケッチアは他の SFG リケッチアとは抗原性も大きく異なることを示唆している。

フタトゲチマダニ、タカサゴチマダニ、オオトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニから増幅した *gltA* で系統解析すると、IB-2 のグループの a, b, c, d のいずれかに分類される SFG リケッチアを保有している。そして、これらのキチマダニから *rompA* を増幅して解析すると、*gltA* での a, b, c, d の分類に関係なく、いずれの *rompA* の塩基配列もほぼ同じであった。この結果は、*gltA* で IB-2 グループに分類された SFG リケッチアは同一の抗原性をもつことを示唆している。しかしながら、我々は今回、増幅した遺伝子をクローニングしないでダイレクトにシーケンスした。もし、マダニが 2 種類以上の SFG リケッチアを保有していた場合、*gltA* と *rompA* が別々の SFG リケッチアから増幅された可能性を否定することはできない。

内田らは PCR-RFLP 法で高知県の室戸岬に生息するフタトゲチマダニが *R. japonica* を保有することを報告している (7)。そこで我々は、室戸市椎名のミカン畑 (日本紅斑熱の患者発生地) と富山県の福岡町 (患者非発生地) でフタトゲチマダニを採集して *R. japonica* を保有しているかどうかを検討した。増幅した *gltA* と *rompA* の系統解析の結果から、室戸市と福岡町の両地区に生息するフタトゲチマダニは同一の SFG リケッチアを保有することが明らかとなった (図 4, 図 5)。この SFG リケッチアは *R. japonica* とは非常に近縁な遺伝性状を示したが、その塩基配列は完全に一致しなかった。また制限酵素の切断パターンも内田らのそれとは異なっていた。

今回の研究によって、日本に生息するマダニは *R. japonica*、*R. helvetica* や新種の AT-1 株以外に、既知の SFG リケッチアとは異なる数種の SFG リケッチアを保有していることが明らかとなった。今後はこれらの SFG リケッチアを分離してヒト

165		50
550		50
280		50
R. japonica(YH)		50
Consensus	GGCTAATGAA GCGGTAATAA ATATGCTTAA AGAAATCGGT AGTTCTGAGT	50

165	AA	100
550	CG	100
280	CG	100
R. japonica(YH)	AA	100
Consensus	ATATTCTMR ATATATAGCT AAAGCTAAGG ATAAAAATGA TCCATTTAGG	100

165		150
550		150
280		150
R. japonica(YH)		150
Consensus	TTAATGGGTT TTGGTCATCG TGTATATAAA AACTATGACC CGCGTGCCGC	150

165	G	200
550	T	200
280	T	200
R. japonica(YH)	T	200
Consensus	AGTACTTAAA GAAACGTGCA AAGAAGTATT AAAGGAACTC GGGCAGCTAG	200

165		250
550		250
280		250
R. japonica(YH)		250
Consensus	ACAACAATCC GCTCTTACAA ATAGCAATAG AACTTGAAGC TATCGCTCTT	250

165		300
550		300
280		300
R. japonica(YH)		300
Consensus	AAAGATGAAT ATTTTATTGA GAGAAAATTA TATCCAAATG TTGATTTTTA	300

165	C	341
550	C	341
280	C	341
R. japonica(YH)	C	341
Consensus	TTCGGGTATT ATCTATAAG CTATGGGTAT ACCGCGCAA A	341

図4. フタトゲチマダニから増幅したgltA遺伝子のアライメント

165 : 高知市の筆山で採集 280 : 室戸市椎名で採集 550 : 富山県福岡町で採集

平成12年10月1日

Consensus	TTATTTCAAA AAGCAATACA ACAAGGTCTT AAAGCCGCTT TATTCACCAC	50
R. japonica(YH)		50
rompA-563		50
rompA-280		50
Consensus	CTCAACCGCA GCGATAATGC TGAGTAGTAG TGGGGTACTC GGTGTTGCTG	100
R. japonica(YH)		100
rompA-563		100
rompA-280		100
Consensus	CAGGTGTTAT TGCTACTAAT CATGATGCAG CATTAGTAA TGATGCTGK	150
R. japonica(YH)		150
rompA-563		150
rompA-280		150
Consensus	GCCAATAATT GGRATGAGAT AACGGCTRHA GGGGAGCTR ATGGTATCC	200
R. japonica(YH)		200
rompA-563		200
rompA-280		200
Consensus	TGCTGGGGT CCTCAAAACA ATTGGGCATT TACTTACGT GTGATTATA	250
R. japonica(YH)		250
rompA-563		250
rompA-280		250
Consensus	CTATCACTGC AGATGTAGTC CATGTATTA TTAGGCTAT AAATGTTGCG	300
R. japonica(YH)		300
rompA-563		300
rompA-280		300
Consensus	RRTACTATTC CCGTAGGTCT AAATATTGCT CAAAATACCG TCGTTGGTTC	350
R. japonica(YH)	AA.....	350
rompA-563	GG.....	350
rompA-280	GG.....	350
Consensus	GATTATAACK RGAGGTAAC TGTGCCTGT TACTATTACT GCGGCAAAA	400
R. japonica(YH)		400
rompA-563		397
rompA-280		397
Consensus	GCTTAAC TTT AAATGGTAT AATGCTGTTG CTGCAATCA TGGTTTAT	450
R. japonica(YH)		450
rompA-563		447
rompA-280		447
Consensus	GCTCCGCGG ATAATTATAC AGGTTTAGGA AATATAACTT T	491
R. japonica(YH)		491
rompA-563		488
rompA-280		488

図5. フタトゲチマダニから増幅したrompA遺伝子のアライメント

rompA-280 : 室戸市椎名で採集

rompA-563 : 富山県福岡町で採集

や動物に対する病原性の有無を血清疫学や動物実験で解明する必要がある。

文 献

1. 石倉康宏, 藤田博巳, 渡辺 護, 品川保弘, 安藤秀二, 松浦久美子, 北村 敬(1999). 富山衛研年報, 22, 112-121.
2. Fujita, H., Watanabe, Y., Ishikura, M., and Takada(1999). Ann. Rep. Ohara General Hospital, 42, 45-50.
3. Regnery, R.L., Spruill, and Plikaytis, B.D. 1991. J. Bactriol., 173, 1576-1589.
4. Gage, K.L., Gilmore, R.D., Karstens, and Schwan. T.G. 1992. Mol. Cell. Probes, 6, 333-341.
5. Takada, N., Fujita, H., Yano, Y., Tsuboi, Y., and Mahara, F. (1994). J. Med. Entomol., 31, 183-185.
6. Uchida, T., Uchiyama, T., Kumano, K., and Walker D.H. 1992. Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 303-305.
7. Uchida, T., Yan, Y., and Kitaoka, S. (1995). J. Clin. Microbiol., 33, 824-828.

富山県における溶血レンサ球菌分離株の 菌型と薬剤感受性

田中大祐 細呂木志保 磯部順子 刑部陽宅
香取幸治¹ 赤間美徳² 遠藤美代子³

Serotype Distribution and Drug Sensitivity
among Hemolytic Streptococcus Isolates
in Toyama Prefecture

Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI,
Yotaku GYOBU, Koji KATORI¹,
Yoshinori AKAMA² and Miyoko ENDO³

要 旨 富山県で1982～1999年の間に分離された臨床材料由来溶血レンサ球菌（溶レン菌）について、分離材料、患者の平均年齢と分離株の群別分布、A、B両群の型別分布、および分離株の薬剤感受性を調べた。結果は次のようであった。

1. 分離株の群別分布では、各年次においてB群、次にA群が優勢で、両者が全体の約80%を占めた。G群は全体の10～20%であり、C群は極めて少なく約1%であった。主にA群は小児の咽頭から、B群は高齢者の喀痰や膿、分泌物などや尿から分離された。G群は高齢者の喀痰や膿、分泌物などから分離された。

2. 1982～1999年の間に分離されたA群のT型別分布の変遷を見ると、T4型とT12型が長期間高い検出率を示し、T1型の検出率も高かったがほぼ5年周期で変動した。1999年は、A群ではT12型が多く、半数近くを占め、B群ではNT-6型、JM-9型、Ib型の順に多かった。

3. 薬剤感受性に関して、1998年はA群ではTC、EM、CAM、LCMに対して一部の菌株が耐性であった。B群ではTC、LCMに対して一部の菌株が耐性であった。C群では1株がTCに対して耐性であった。βラクタム系薬剤（ABPC、CFDN、CEX、CDTR）に対しては耐性菌は認められなかった。

A群溶血レンサ球菌（溶レン菌）は、咽頭炎、扁桃炎、中耳炎、皮膚感染症、猩紅熱、リウマチ熱、腎炎、劇症型A群レンサ球菌感染症（Toxic shock-like syndrom ; TSLS）などを引き起こす。また、近年、食品を原因とした大規模なA群溶レン菌集団感染事例が発生している [1, 2, 3]。

一方、B群溶レン菌は、新生児の敗血症や髄膜炎の原因として重要であり [4]、C群及びG群溶レン菌は、ときに上気道炎などを起こす。

ここでは、このような溶レン菌の流行の実態と有効な薬剤を把握するため、富山県下で臨床材料から分離された菌株について、群別、型別、薬剤

1. 富山県立中央病院 2. 富山市民病院 3. 東京都立衛生研究所

Table 1. Relationship between Mean Age of Patient and Serogroup of Clinical Isolates of Hemolytic Streptococci

Year	Specimen	Serogroup of Streptococci				Total
		A	B	C	G	
1995	Throat swab	46*(8**)	8(43)		2(23)	56
	Sputum	4(45)	24(68)		6(71)	34
	Pus, exudate etc.	10(28)	52(52)		10(66)	81
	Urine		18(65)	1(76)	1(75)	20
	Blood, cerebrospinal fluid	1(5)	3(51)		2(64)	6
	Total	61[32.4%]	105[55.9%]	1[0.5%]	21[11.2%]	188
1996	Throat swab	58(8)	1(81)		6(28)	65
	Sputum	2(46)	26(63)		15(67)	43
	Pus, exudate etc.	18(26)	38(50)		12(63)	68
	Urine	1(5)	31(60)			32
	Blood, cerebrospinal fluid		5(51)		1(25)	6
	Total	79[36.9%]	101[47.2%]	0[0%]	34[15.9%]	214
1997	Throat swab	66(11)	7(14)	1(31)	1(32)	75
	Sputum	10(59)	29(67)	1(77)	13(61)	53
	Pus, exudate etc.	23(35)	77(49)	2(68)	13(64)	115
	Urine	1(9)	29(78)		1(74)	31
	Blood, cerebrospinal fluid	1(85)	3(58)			4
	Total	101[36.8%]	145[52.2%]	4[1.4%]	28[10.1%]	278
1998	Throat swab	67(8)	8(5)		3(21)	78
	Sputum	8(65)	46(68)		11(57)	65
	Pus, exudate etc.	20(27)	63(49)	2(65)	18(45)	103
	Urine		34(57)		2(87)	36
	Blood, cerebrospinal fluid		1(73)		1(67)	2
	Total	95[33.5%]	152[53.5%]	2[0.7%]	35[12.3%]	282
1999	Throat swab	47(6)	3(21)		6(12)	56
	Sputum	3(13)	14(71)		14(53)	31
	Pus, exudate etc.	9(34)	40(48)	3(51)	9(61)	61
	Urine		20(45)		2(89)	22
	Blood, cerebrospinal fluid				2(63)	2
	Total	59[34.3%]	77[44.8%]	3[1.7%]	33[19.2%]	172

*: No. of isolates, **: Mean age of host

感受性を調べた結果を報告する。

結果と考察

材料と方法

被検菌は病原微生物検出情報収集定点である県内12か所の公立病院の内の2病院で分離された溶レン菌を用いた。群別はストレプトLA「生研」(デンカ生研)を用いた感作ラテックス凝集反応によって実施し、A群T型別およびB群型別はそれぞれの型別用抗血清(デンカ生研)を用いて行った。薬剤感受性試験は、アンピシリン(ABPC)、セフジニル(CFDN)、セファレキシム(CEX)、セフトロネム(CDTR)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、エリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)、リンコマイシン(LCM)の9剤について行った。

1995~1999年の間に分離された溶レン菌について、分離材料、分離株の群と患者の平均年齢の関係をTable 1に示す。被検菌はB群、次にA群が多く、両者が全体の約80%を占め、G群は全体の10~20%であり、C群は極めて少なく約1%であった。咽頭から分離される溶レン菌は、A群が多く、小児の占める割合が高かった。喀痰からはB群やG群が主に分離され、患者の平均年齢は高かった。膿、分泌物などからはA、B、C、G群が分離されるが、A群は、B、C、G群に比べて患者の平均年齢が比較的lowであった。尿からの分離はほとんどがB群であり、平均年齢は高かった。血液、髄液からは分離株数は少ないがA、B、G群が分離され、患者の平均年齢は高かった。これらの関係は毎年類似していた。

1999年のA群分離株の月別のT型別分布と12病

Table 2. Monthly Distribution of T Types of Group A Streptococci in 1999

T type	No. of Isolates												Total
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
1		2	1		1	1							5
2		1	2			1							4
3													0
4		1		1				1					3
6				1		2							3
9											1		1
11										1			1
12	4	5	2	3	1	1	2	2	2	1	2	3	28
13								1			1		2
22				1									1
25	1										1	1	3
28				1	1				1			2	5
B3264		2									1		3
Untypable													0
Total	5	11	5	7	3	5	2	4	3	2	6	6	59
Reported number of strains from 12 hospitals	44	60	74	40	39	35	18	10	19	26	35	40	440

Table 3. Monthly Distribution of Types of Group B Streptococci in 1999

Type	No. of Isolates												Total
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
I a							1			2		2	5
I b	2	1	2						3	3		2	13
II													0
III										1		1	2
IV													0
V		1										1	2
NT-6	2	1	3	2		1	4	2		3	5	3	26
WHO-7271													0
JM-9			2			4	3	1	1		1	4	16
Untypable			1		1	3	3	2	1	1	1		13
Total	4	3	8	2	1	8	11	5	5	10	7	13	77

院における溶レン菌分離株数をTable 2に示す。T12型が半数を占め、年間を通じて分離された。当研究所は溶レン菌の東海北陸ブロックのレファレンス支部センターとして、県外で分離された菌株の型別も行っている。表には示さなかったが、福井県の一公立病院から送られてきた菌株を調べたところ、菌株数は多くはないが、1999年は富山県と異なりT2型が多かった。

1999年のB群の月別の型別分布をTable 3に示す。NT-6型、JM-9型、Ib型の順に多かった。

1982年～1999年の間に分離されたA群のT型別分布をTable 4に示す。18年間に型別した2303株では、多い順にT12型 572株、T4型 424株、T1型 284株、T3型 210株、T28型 165株、T6型 105株、TB3264型 82株、T2型 67株、T13型 66株、T18型 47株であった。T4型とT12型の検出率は長期間高いが、T4型の検出率は1996年以降少なかった。T1型の検出率はほぼ5年周期で変動していた。

1998年に分離したA群 28株、B群 16株、C群

Table 4. T Type Distribution of Clinical Isolates of Group A Streptococci in Toyama between 1982 and 1999

Year	T type																		B3264	imp. 19	14/49	UT***	Total
	1	2	3	4	5	6	8	9	11	12	13	18	22	25	28	3	6						
1982	20 ^{2*} (26.3**)			2						27 ¹ (35.5)	4		3		2	3	6 ² (7.9)			9	76		
1983	2			69 ¹ (42.6)						41 ² (25.3)	22 ³ (13.6)		1		11	6				10	162		
1984	6		8	30 ² (24.0)	1		1		2	42 ¹ (33.6)	9		1		10 ² (8.0)	3	1			11	125		
1985	3		55 ¹ (38.5)	26 ² (18.2)		1			3	31 ² (21.7)	8	1	1		7	2				5	143		
1986	1		64 ² (23.1)	27 ² (9.7)	1	1	6		11	125 ¹ (45.1)	8	8	1		15					9	277		
1987	29 ² (11.9)		13	44 ² (18.0)	1	17	1		5	69 ¹ (28.3)	4	22			22	2				15	244		
1988	66 ¹ (36.9)		2	43 ² (24.0)		15 ² (8.4)	1		1	14		7			6					24	179		
1989	11			46 ¹ (30.2)		29 ² (19.3)			4	8	2	2			18 ² (12.0)	8				22	150		
1990	14		1	26 ¹ (22.0)		8		1	3	22 ² (18.6)		1			16 ¹ (13.6)	3				23	118		
1991	20 ² (14.5)			20 ² (14.5)			1	3	4	51 ¹ (36.9)	1				12	15			2	9	138		
1992	21 ¹ (20.6)		14	19 ² (18.6)			1		2	6	3	4			4	15 ² (14.7)				13	102		
1993	18 ² (18.6)		21 ¹ (21.6)	18 ² (18.6)			2	1	2	14					6	6				9	97		
1994	12			17 ² (17.5)		14 ² (14.4)		1	1	34 ¹ (35.1)		2			7	3				6	97		
1995	8	1		12 ² (19.7)		19 ¹ (31.1)				9 ² (14.8)					5	3				4	61		
1996	7 ² (8.9)	31 ¹ (39.2)		2		4		1	2	11 ² (13.9)	1				5	7 ² (8.9)				8	79		
1997	32 ¹ (31.7)	18 ² (17.8)		4		9			2	15 ² (14.9)	1		1	2	9	2				6	101		
1998	9	13 ¹ (13.7)	1	10		22 ² (23.2)				25 ¹ (26.3)	1			3	5	1				5	95		
1999	5 ² (8.5)	4		3		3		1	1	28 ¹ (47.5)	2		1	3	5 ² (8.5)	3					59		
Total	284	67	210	424	3	105	14	7	43	572	66	47	9	8	165	82	7		2	188	2303		

*: Order of prevalence, **: Percentage occupied by the corresponding type, ***: Untypable

Table 5. Antibiotic Susceptibility of Hemolytic Streptococci in 1998

Serogroup	Antibiotics	MIC (μg/ml)														32	64	>64
		0.0075	0.015	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16					
A	ABPC	2 ^{**}	26															
	CFDN	26	2															
	CEX						1	27										
	CDTR	28																
	TC					6	9	4								3	5	
	CP										14	14						
	EM			3	19	2												
	CAM		2	11	11								1	1				2
	LCM			1	4	11	10				2			2 ^{**}				
																		2
B	ABPC				12	4												
	CFDN			14	2													
	CEX									9	7							
	CDTR			16														
	TC						4	6								4	2	
	CP																	
	EM				3	11				3	13							
	CAM				13	1				1	1		1					
	LCM					1	4	9										2
C	ABPC		2															
	CFDN		2															
	CEX						1	1										
	CDTR			2														
	TC																	
	CP																	1
	EM					2					2							
	CAM				2													
	LCM						2											
G	ABPC		3			1												
	CFDN		3			1 ^{***}												
	CEX							3				1						
	CDTR			3			1											
	TC							3	1									
	CP																	
	EM				1	2	1					4						
	CAM				1	3												
	LCM								2	1	1							

*: No. of isolates, **: >16 (MIC), ***: >0.06 (MIC)

2株, G群4株, 計50株の薬剤感受性試験の結果を Table 5 に示す. MIC値が $16\mu\text{g/ml}$ 以上を耐性とする, A群ではTCに対して8株(T3型2株, T4型3株, T12型1株, T13型1株, T28型1株), EMに対して2株(T12型とT28型), CAMに対して2株(T12型とT28型), LCMに対して2株(T12型1株, T28型1株)が耐性であった. B群ではTCに対して6株, LCMに対して2株が耐性であった. C群ではTCに対して1株が耐性であった. β ラクタム系薬剤(ABPC, CF DN, CEX, CDTR)に対しては, 耐性菌は認められなかった. 遠藤ら[5]は, 1967~1996年の30年間に全国で分離されたA群溶レン菌において β ラクタム系薬剤に対して耐性菌が存在しなかったことを報告している.

文 献

1. 国立感染症研究所編(1997). 病原微生物検出情報月報, 18巻11号, 264.
2. 国立予防衛生研究所編(1998). 病原微生物検出情報月報, 19巻12号, 279.
3. 国立予防衛生研究所編(1999). 病原微生物検出情報月報, 20巻5号, 115.
4. 保科清(1996). 臨床と微生物, 23巻1号, 65-67.
5. 遠藤美代子, 奥野ルミ, 柏木義勝, 榎田隆一, 五十嵐英夫(1997). レンサ球菌感染症研究会 第30回学術講演会抄録集.

Vibrio cholerae, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* Enteritidis および Enterohaemorrhagic *Escherichiae coli* O157:H7 におけるPFGEパターンの変化

刑部陽宅 平田清久¹ 細呂木志保
磯部順子 田中大祐 北村 敬

The shift of Pulsed-field-Gel-Electrophoresis pattern of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* Enteritidis and Enterohaemorrhagic *Escherichiae coli* O157:H7

Yotaku GYOBU, Kiyohisa HIRATA¹, Shiho HOSOROGI,
Junko ISOBE, Daisuke TANAKA and Takashi KITAMURA

要 旨 我が国で公衆衛生上重要な4種の腸管起病性病原菌（腸炎ビブリオ、コレラ菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌O157）について菌株を保存した時のパルスフィールドゲル電気泳動像の変異を調べた。その結果、いずれの病原菌でも保存中にPFGEパターンが親株と異なる子孫が生じた。菌種による変異率の高い低いは明確にはならなかったが、同一菌種でも菌株による変異率の差は大きかった。変異を起こした子孫と親株とのPFGE像の差はDNAバンド1～2本であった。

以上の結果はこれらの病原菌による集団発生において、2種類以上のPFGEパターンの菌が分離されても、その差がバンド1～2本であり、疫学的に感染源が1つであることが明らかであるなら、原因菌は1つのクローンに属すると判定しても良いことを示唆する。

目 的

コレラ菌、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌、サルモネラは我が国において公衆衛生上重要な下痢原因菌として位置づけられている。これらの菌による下痢症が発生したときには、患者や患者接触者あるいは食品の菌検索が行われ、さらに分離菌の性状の一致性が感染経路解明の立場から調べられてきた。調べる性状は1980年代は生化学性状と薬剤感受性が中心であったが、1990年代にはDNA技術が進歩したことから、Ribotyping, RAPD-PCR, パルスフィールドゲル電気泳動

(PFGE)等が実施されるようになった。特にPFGEは他の方法に比べて解析力に優れており、1996年には大阪府堺市を中心に発生した腸管出血性大腸菌O157の疫学解析に有効であったことから、その後全国的に採用されるようになった。

Tenoverら〔1〕はPFGEは細菌を詳細に型別できる手技と述べている。それだけに、著者らの経験によれば、本法を集団発生分離株に適用したとき、分離株はすべて同じPFGEパターンではなく、中にすこしパターンの異なる菌株を少数認められることがある。このような事例では、少数のPFGEパター

ンの菌株は他の多くの菌株の変異株であるのかどうかを判断するため、変異についての基礎データが参考になるが、あまり見あたらない。このことより本研究は国内で公衆衛生上重要ないくつかの下痢起病菌についてPFGEパターンの変異がどのような頻度で起こるかについて検討した。

材料と方法

1) 菌株

Vibrio cholerae O1 : 1991年に千葉県などで発生した“あおやぎ”が原因として疑われたコレラ事例より分離された菌24株を用いた。これらの菌株は国立感染症研究所島田俊雄博士より分与を受けた。

Salmonella Enteritidis : 1994年富山市内H中学校で発生した食中毒事例由来の菌株251-94, 同年登出者において発生した食中毒事例由来の菌株71-94を用いた。

Vibrio parahaemolyticus : 著者らが1998年9月富山県内の漁港から分離したTDH産生性の血清型O3:K6, 2株 (TVP 25-98, TVP 27-98)を用いた。

Enterohaemorrhagic *E.coli* O157 : 1997年富山県において牛との接触による小児の感染事例があった時に、牧場の牛2頭より分離した菌2株 (TEC1469, 1470) を用いた。

2) PFGE

試料の調製, DNAの染色および写真撮影は前報[2]によったが、電気泳動については次の条件によった。*Vibrio cholerae* O1 : 電圧170V, スイッチタイム3から40または60秒, 24時間, 温度14°C. *Salmonella* Enteritidis : 電圧200V, スイッチタイム20から80秒, 24時間, 温度14°C. *Vibrio parahaemolyticus* : 電圧200V, スイッチタイム4から8秒で12時間, 続いて8から50秒10時間, 温度12°C, Enterohaemorrhagic *E.coli* O157 : 電圧200V, スイッチタイム4から8秒で12時間, 続いて8から50秒で10時間, 温度12°C.

3) 菌株の保存

供試菌は始めにPFGEパターンを調べた。次に0.5%に寒天を加えたDifco社のNutrient broth (以下半流動寒天培地) またはCooked-meat培地に接種し室温保存した。

結 果

1. コレラ菌のPFGE像の変化

あらかじめPFGEパターンが同じことを確かめた24株の1集団発生事例分離菌を25カ月間半流動寒天培地に保存後、再分離し染色体DNAを制限酵素Sfi

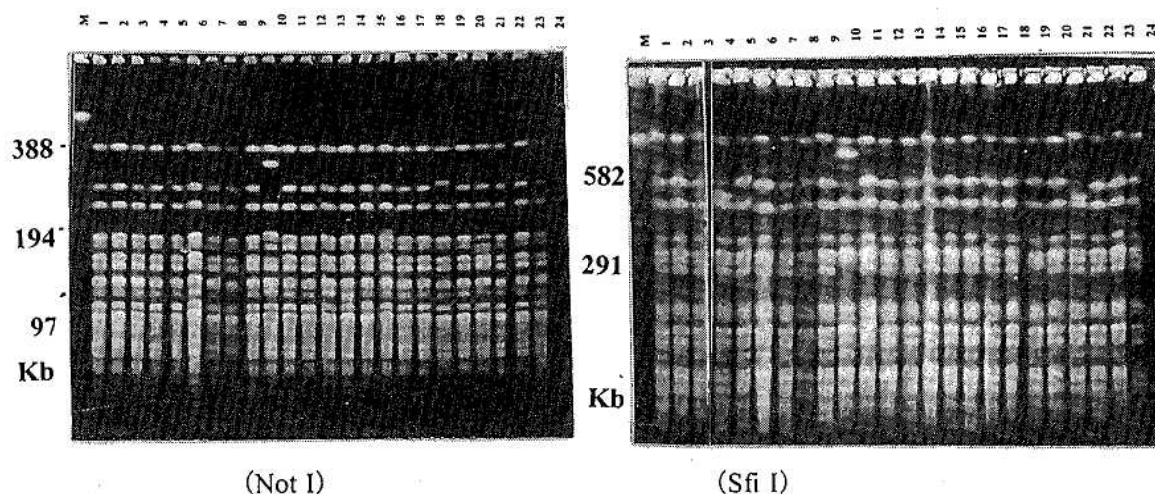


Fig. 1. Pulsed-field Gel Electrophoresis of *Vibrio cholerae* Stored for 25 Months
Lane 1 through 24 represent provisional strain number. M : Size marker (Lambda ladder)

IあるいはNot I処理しPFGEパターンを再度調べた。結果はFig 1に示した。Not I使用の場合には25株中23株のPFGE像が保存前の親株と同じで、他の2株(レーン10と19)がこれと少し異なっていた。異なるところは、レーン10の菌株では、親株に比べ370 Kb付近のバンドが消失して450 Kb付近のバンドが新たに認められ、レーン19の菌株では同じく370 Kb付近のバンドが消失して、これよりやや大きいサイズのDNAバンドが新たに認められた。一方、Sfi I処理の場合には25株中21株のPFGE像が保存前の親株と同じで、他の4株(レーン4, 10, 19, 21)が親株と少し異なっていた。異なる4株の内2株(レーン10, 19)はNot I処理の時にも変化のあった菌株であるが、この2菌株の泳動像を親株と比べると、250あるいは400Kb付近のバンドで異なっていた。また、残る2菌株(レーン4, 21)の泳動像は500-Kb付近のバンドが消失してやや小さい約400 Kbのバンドが新たに認められた。

結果の詳細は示さなかったが、コレラ毒素(CT)遺伝子をプローブとしてDNAハイブリダイゼーションを行うとCT遺伝子はFig. 1-(Sfi I)でみられる大きいサイズのDNA断片(約550 Kb)に認められた。保存中の変異はこのDNA断片で

最もよくみられた。

2. *Salmonella* EnteritidisのPFGE像の変化

S. Enteritidis 2株(71-94, 251-94)をクックドミート培地に24カ月保存後再分離しそれぞれ14個のコロニーを任意に選び、染色体DNAをBln I処理しPFGEを行った。結果は菌株が71-94ではすべてが親株と同じであった。しかし菌株が251-94では、調べた14コロニー中9コロニーの泳動像は保存前の親株と同じであったが、他の5コロニーの泳動像はこれとは少し異なっていた。これら5コロニーはいずれも親株にみられない300 Kb付近のDNAバンドが新たに認められ、400 Kb付近のDNAバンドの幅が広がる傾向であった。

3. 腸管出血性大腸菌O157:H7のPFGE像の変化

牛2頭由来の2株(TEC 1469, TEC 1470)を分離してから1カ月間、半流動培地に保存後、再分離しTEC1469については44コロニー、TEC1470については43コロニーを任意に選び、染色体DNAをXba I処理後PFGEを行った。その結果、TEC1469については44コロニー中33コロニーのパターンが保存前の親株と同じで、7コロニー(16%)のパター

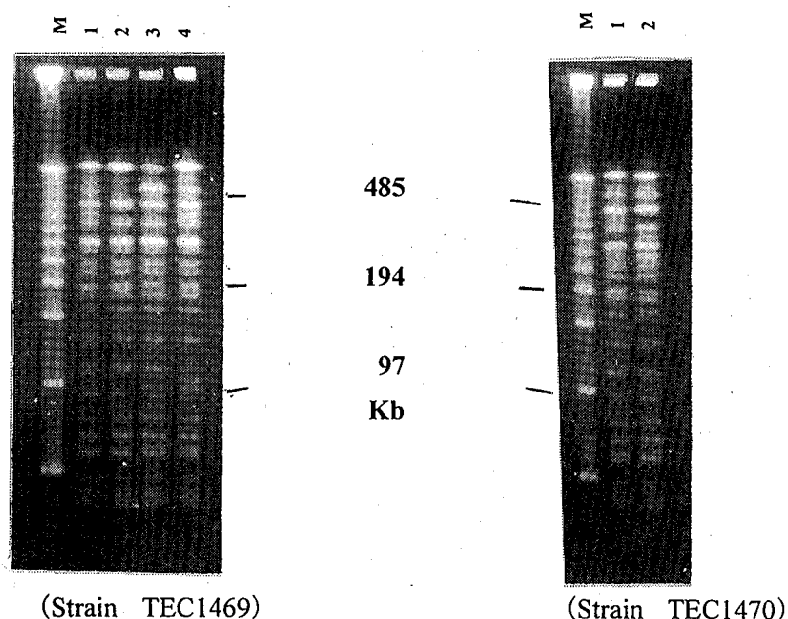


Fig. 2. Pulsed-field Gel Electrophoresis of Enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7 Stored for One Month

Lane 1 : Colony showing no variation of pattern.

Lane 2 ~ 3 : Colony showing variation of pattern. M : Size marker (Lambda Ladder)

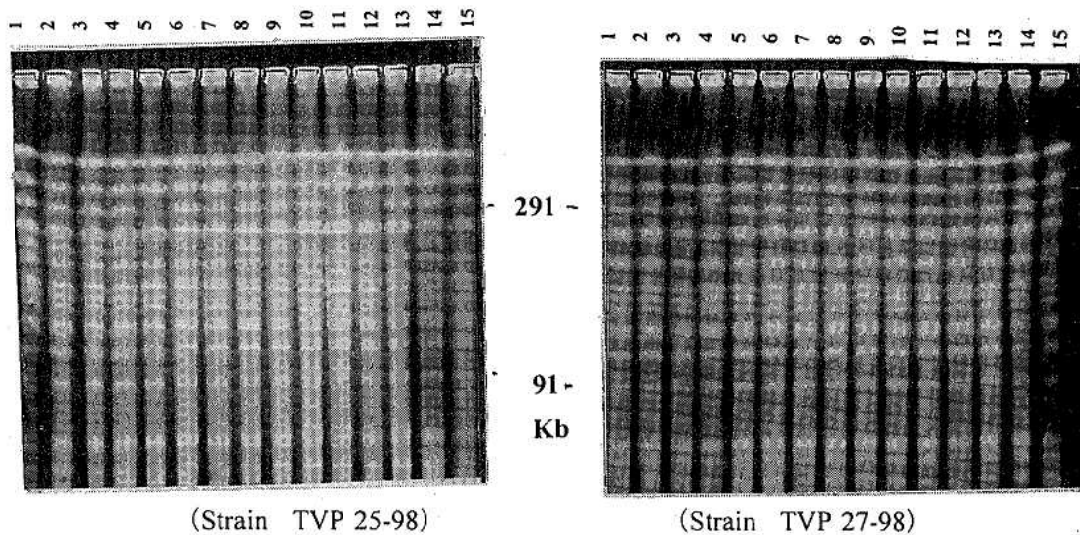


Fig. 3. Pulsed-field Gel Electrophoresis of *V. parahaemolyticus* Stored for 14 Months
Lane 1 through 15 represent colony number.

ンが親株と少し異なっていた。また、TEC1470については43コロニー中42コロニーのパターンが保存前親株と同じで、1コロニー（2%）のパターンが親株と異なっていた。変異コロニーのパターンはFig. 2に示した。親株と異なるところはTEC1469の場合には、1コロニー（レーン2）では親株に比べて550 Kb付近のDNAバンドが、3コロニー（レーン3）では、400 Kb付近のDNAバンドが認められなく、残る3コロニーでは、110 Kb付近のバンドが認められなかった。一方、菌株がTEC1470の場合には変異のあった1コロニー（レーン2）に350 Kb付近のバンドが認められなかった。

4. 腸炎ビブリオのPFGE像の変化

海水から分離した *V. parahaemolyticus* 2株 (TVP 25-98, TVP 27-98) を半流動培地に14カ月保存後再分離し、両株とも任意に15コロニーを選び、染色体DNAをNot I処理しPFGEを実施した。結果はFig 3に示した。TVP 25-98では15コロニー中9コロニーのPFGE像が親株と同じであったが、6コロニーでは親株と少し異なり、300あるいは400 Kb付近のDNAバンドが認められなかった。一方、TVP 27-98では15コロニー中14コロニーで親株と同じであったが、1コロニーが親株と少し異なり400 Kb付近のDNAバンドがなく、

それより大きいサイズのDNAバンドが新たに認められた。

考 察

細菌の染色体DNAではPoint mutation, DNAの挿入あるいはDNAの欠損が起こることが知られている。Tenoverら〔1〕はPFGEパターンにおける2～3バンドの差はDNAにこのような変化が一度起こることで説明されること、そして、このようなPFGEパターンの変化は繰り返しの継代を行った時に観察されると述べている。また、Akibaら〔3〕はこのようなことが腸管内で起こる可能性を述べている。

Tenoverら〔1〕はまた集団発生例で分離した菌の比較を10個以上のバンドがみられるPFGEパターンで行ったときの表現を1) 同一、2) Subtype, 3) 多分関係あり、4) 異なるの4種に分け、パターンが同じ時に1)、2～3のバンドが異なる時に2)、4～6のバンドが異なる時に3)、集団分離株と50%のバンドが異なる時に4)としている。また、PFGEパターンが同じなら他の方法で差を見つけることは困難で同じクローンと考えた方がよいと述べている。これに対

してBarrettら〔4〕は1本のバンドの差でもクローンは無関係としている。また, Louieら〔5〕は1～2本のバンドの差を近似 (Subtype), 3バンド以上の差がある場合に異なるとする意見を記述している。

本研究において, 腸炎ビブリオ, サルモネラ, 腸管出血性大腸菌を1～24カ月保存後再分離し, 釣菌したコロニーについてPFGEを実施すると, いずれの病原菌においても保存前 (親株) と異なるPFGEパターンのコロニーの出現を認めた。また同じPFGEパターンのコレラ菌25株を25カ月保存したところ, 2株に変化を認めた。パターンの変化は調べた4種の菌すべてでバンド1～2本の差であった。この現象は我が国において重要な4種の腸管系病原菌では保存中にpoint mutation, DNAの挿入または欠損が起こることを示している。変異率を4種の菌について比較することは使用した制限酵素, 菌の保存期間, 調べた菌株やコロニー数が異なるので一律に論ずることはできない。しかし, 同一菌種でも, 菌株により異なることは, 変異率が腸炎ビブリオでは, 7/15(47%)の菌株と1/15(7%)の菌株があること, 腸管出血性大腸菌O157では7/44(16%)の菌株と1/43(2.3%)の菌株があること, S. Enteritidisでは5/14(36%)の菌株と0/14(0%)の菌株があることより明らかである。

変異は染色体上, すべての領域において無作為に起こるのか, 或いは変異を起こし易い領域があるのかについては明らかでないが, 変異を起こし易い腸炎ビブリオや腸管出血性大腸菌O157の菌株では特定の位置のバンドが消失して新たな位置にバンドが出現する傾向にあるので, パターンの変化は後者の理由で起こることが多いのではないかと考えられる。変異を起こし易いDNA領域にはどのような特徴があるのか今後明らかにしてゆ

く必要があろう。

集団発生において分離株のPFGEパターンが全株一致したとする報告例は多い。しかし, Faithら〔6〕, Keeneら〔7〕は集団発生は単一のパターンである必要は無いとしている。変異について調べた今回の実験では4種の腸管系病原菌のいずれでもパターン変化が1～2本のバンドの単位で起こることが確認された。この結果は集団発生において, PFGEパターンが異なる2種の菌が検出されたとしても, その差がバンド1～2本であるなら同じクローンと判断しても良いことを示唆している。しかし100%確実とは言えないので, 集団発生に遭遇し行政的判断を行う場合には, 食品等から1検体あたり複数の菌株を釣菌し, 他の方法も併用して比較し, さらに疫学的事実と照合した方が良いと思われる。

文 献

- 1) Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V. et al. (1995). J. Clin. Microbiol., 33, 2233-2239.
- 2) 刑部陽宅, 細呂木志保, 島田俊雄 (1995). 感染症学雑誌, 69巻, 501～505.
- 3) Akiba, M., Sameshima, T. and Nakazawa, M. (1999). Epidemiol. Infect., 122, 343-346.
- 4) Barrett, T. J., Lior, H., Green, J. H., et al. (1994). J. Clin. Microbiol., 32, 3013-3017.
- 5) Louie, M., Read, S., Louie, L., Ziebell, K. et al. (1999). Epidemiol. Infect., 123, 17-24.
- 6) Faith, N.G., Shere, J. A., Brosch, R., et al. (1996). Appl. Environ. Microbiol., 62, 1519-1525.
- 7) Keene, W.E., Hedberg, K., Herriott, D. E., et al. (1997). J. Infect. Dis. 176, 815-818.

イオンクロマトグラフィーによる飲料水中の陰イオン、 カルシウム及びマグネシウムイオンの一斉分析

松永 明信 高柳 信孝 山本 敦 岡田 滋*

A Method for Simultaneous Determination of Anions, Calcium and Magnesium Ions in Drinking Water by Ion Chromatography

Akinobu MATSUNAGA, Nobutaka TAKAYANAGI,
Atsushi YAMAMOTO, Shigeru OKADA*

要 旨 ポータブル型イオンクロマトグラフ (IC) を使用し、陰イオン分析カラムとして TSK-GEL IC-Anion-PW_{XL} (3.0mmΦ x 150mm)[東フー]、溶出液には0.35mM EDTA・3Naを用い、流速は0.35ml/分、カラム温度は35℃に設定して、飲料水中の塩素、亜硝酸及び硝酸、硫酸の各陰イオン及びカルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)の陽イオンを一斉分析する方法を開発した。Ca及びMgイオンの値から換算したCaCO₃の合計値は、滴定による硬度の測定値と良く一致したので、ICによるCaとMgの測定値から硬度を算出することが可能であると推定された。本県の保健所では、陰イオンはICで、硬度は滴定で測定されている。本法を用いれば、硬度測定の滴定操作の必要が無くなり、検査業務の省力化に寄与するものと考えられる。

近年、イオンクロマトグラフィー (IC) が急速に普及して、広範な領域でイオン性成分の分析に利用されている。衛生化学分野では、飲料水、温泉成分、食品添加物の測定に、多成分一斉分析法として使用されている。

本県の保健所における飲料水検査では、水道法施行規則に規定されている定期検査での省略不可能な10項目に鉄、カルシウム及びマグネシウム等(硬度)を追加した12項目が測定されている。イオンクロマトグラフが平成10年7月に導入され、塩素(Cl)、亜硝酸(NO₂)及び硝酸(NO₃)の各陰イオンの測定に使用されており、硬度は滴定法で測定されている。検査業務の省力化を図るため

に、ICによるCl、NO₂及びNO₃の各イオン及びカルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)イオンを一斉分析する方法の開発を試みた。

一般的に、陰イオンと陽イオンは、それぞれ陰イオン交換カラムと陽イオン交換カラムを用いて別々に測定されている。しかしながら、同一のカラム(装置)で陰イオン及び陽イオンを一斉分析する方法も何種類か報告されている。

①陰イオン交換カラムを用い、溶出液にエチレンジアミン4酢酸(EDTA)ナトリウム塩を使用してCa、Mg等の金属イオンと陰イオン錯体を生成させ、Cl、NO₂及び硫酸(SO₄)等の陰イオンを一斉分析する方法[1]。

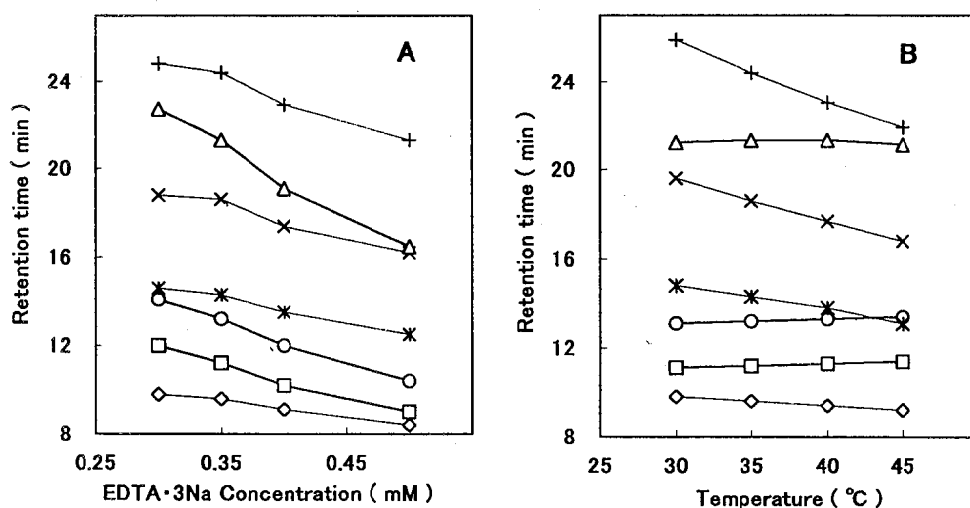


Fig 1. Effects of EDTA·3Na concentration in eluent and analytical column temperature on the retention time of 7 ions

◇ Cl □ Ca ○ Mg * NO₂ × Br △ SO₄ + NO₃

②弱酸性の水素型陽イオン交換カラムを用い、弱酸系溶出液（酒石酸）を使用し、陰イオンはその酸解離定数と価数の差に基づくイオン排除作用により、陰及び陽イオンを一斉分析する方法であり、イオン排除／陽イオン交換型ICと名付けられ[2]、雨水の分析に利用されている。

③陰及び陽イオンカラムを直列に連結して、溶出液に銅-スルホ安息香酸錯体を用い、間接吸光度検出法で陰イオン、ナトリウム、カリウム及びアンモニウムイオンを一斉分析する報告[3]等がある。

今回は、保健所に導入したIC装置を用い、①の方式による方法の検討を詳細に行い、陰イオン、Ca及びMgイオンの一斉分析が可能な条件を確立したので報告する。

実験方法

1. 試料

飲料水は高岡保健所に検査依頼された104検体を用いた。

2. 標準溶液

Cl, Ca, Mg, NO₂-N, 臭素(Br), SO₄及びNO₃-Nの濃度が、それぞれ284, 300 (CaCO₃換算), 100 (CaCO₃換算), 5, 5, 100及び20mg/Lとなるように混合標準原液を調製した。これを適宜希釈

して標準溶液とした。

3. IC装置

島津製PIA-1000を使用した。

4. IC測定条件Ⅰ

分析カラムはTSK-GEL IC-Anion-PW_{XL} (3.0 mmΦ x 150mm)[東ソー：特注]、溶出液には0.35mM EDTA·3Naを用い、流速は0.35ml/分、カラム温度は35℃、試料注入量は20μlに設定し、陰イオン及びCa, Mgイオンを測定した。

5. IC測定条件Ⅱ

分析カラムはShim-pack IC-A3(S) (2.0mmΦ x 150mm)[島津]、溶出液には8 mM p-ヒドロキシ安息香酸/3.2mM トリス- (ヒドロキシメチル) アミノメタン/7%アセトニトリルを用い、流速は0.2ml/分、カラム温度は40℃、試料注入量は20μlに設定して、陰イオンを測定した。なお、硬度は滴定法で測定した。

結果と考察

1. IC条件の検討

EDTAを溶出液に用いて陰イオン及びCa, Mgイオンを一斉分析するための方法としては、シリカ系陰イオン交換カラム[1]及び親水性ポリマー系カラム[4]を利用した分析法が既に報告されて

いる。シリカ系カラムは寿命が短いとされているので、市販されている数種類のポリマー系カラムを用いて条件の検討を行ったところ、TSK-GEL IC-Anion-PW_{xL}が適用可能な分析カラムの一つであった。以後の検討は、溶出液の使用量を少なくするために、カラムサイズ3.0mmΦ x 150mmのものを特注して用いた。Ca及びMgがEDTAと錯体を形成するためには、pHは6以上であることが必要である[1,4]。今回はEDTA・3Na(pH7)を溶出液に選択し、溶出液濃度と各イオンの溶出時間との関係を調べてFig.1-Aに示した。濃度の増加に伴って各イオンの溶出時間は小さくなり、一価イオンより二価イオンが顕著な影響を受けた。各イオンが互いに分離する濃度は0.35mMであった。また、カラム温度の検討を行ったところ、Fig.1-Bに示すように、二価イオンは影響を受けず、温度の上昇に伴って一価イオンの溶出時間は小さくなり、35℃で各イオンが良好に分離した。以上の検討の結果、実験方法4に記載のIC測定条件Iを設定した。この条件での標準溶液のクロマトグラムをFig.2-Aに示した。Ca及びMg錯体は溶出液に比べて電気伝導度が小さいので、負のピークとして出現している。

2. 検量線

各種濃度の標準溶液のクロマトグラムのピーク面積（負のピークはデータ処理機能によりピークを反転させて）から検量線を作成した。Cl, Ca(CaCO₃), Mg(CaCO₃), NO₂-N, Br, SO₄及びNO₃-Nは、それぞれ、1～60, 1～60, 1～50, 0.1～5, 0.5～5, 1～20及び0.1～4 mg/Lの範囲で原点を通る良好な直線性を示した。

3. 飲料水の分析

IC測定条件Iで飲料水104検体を分析した。代表的なクロマトグラムをFig.2-B,Cに示した。この2検体を連続して5回分析したところ、Cl, Ca, Mg, SO₄及びNO₃-Nの測定値の変動係数は、いずれも1～2%程度であった。

IC条件Iで得られた陰イオンの値、CaとMgから算出したCaCO₃の値について、IC測定条件IIで得られた陰イオンの値、滴定で測定した硬度とを比較してFig.3-A～Dに示した。3種陰イオン、

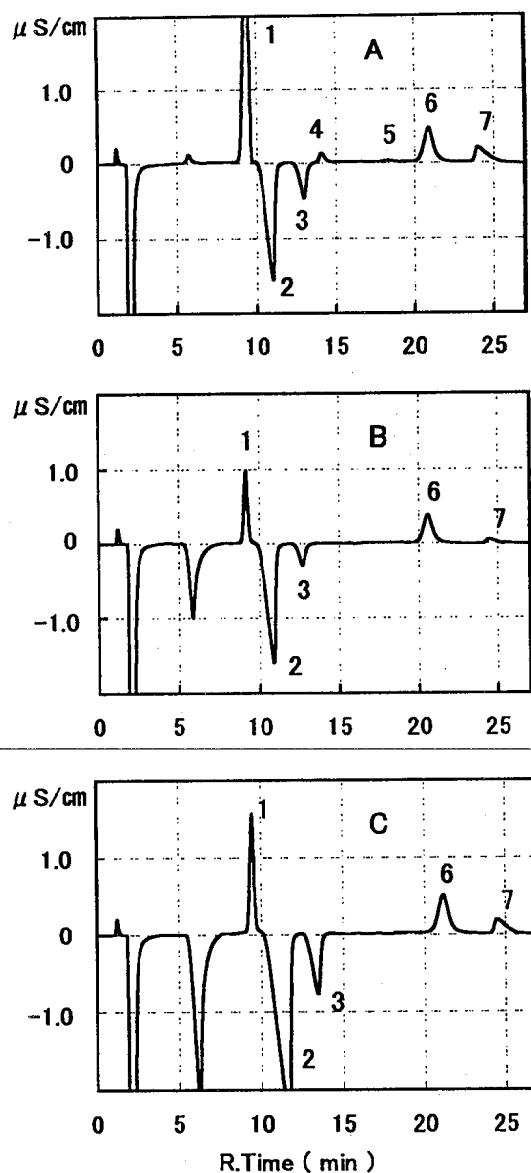


Fig 2. Chromatogram of anions, Ca and Mg ions in standard solution and drinking waters

1-7 represent Cl, Ca, Mg, NO₂, Br, SO₄ and NO₃, respectively.

A : standard solution, Contents of Cl, Ca(as CaCO₃), Mg(as CaCO₃), NO₂-N, Br, SO₄ and NO₃-N were 28.4, 30, 10, 0.5, 0.5, 10 and 4mg/L, respectively.

B, C : drinking water

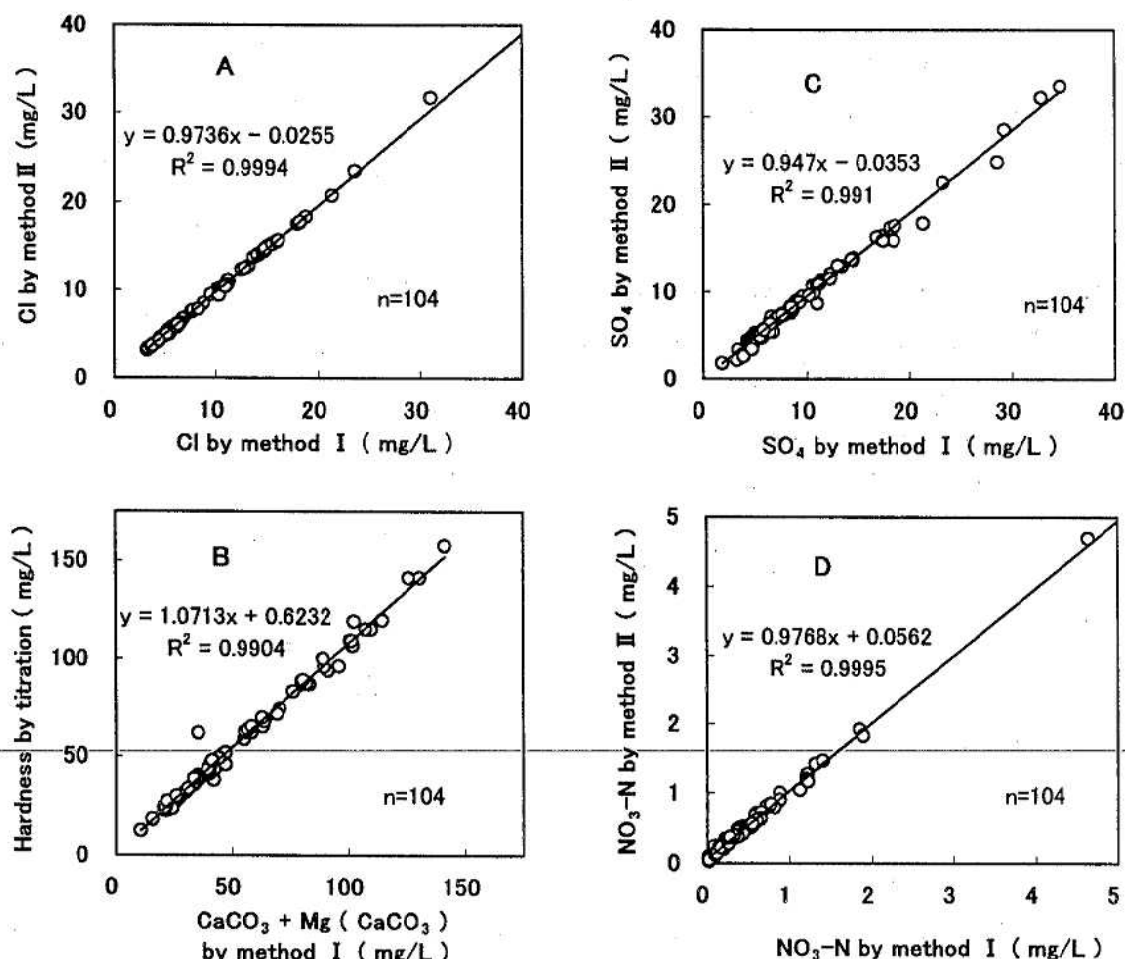


Fig 3. Correlation of analytical values determined by method I, method II and titration

Ca及びMg成分はいずれも高い相関がみられ、それぞれの値は良く一致した。IC条件Iで得られたCa及びMgの合計を硬度とみなすことが可能であれば、滴定操作の必要がなくなり、保健所における検査業務の省力化に寄与すると考えられる。

PIA-1000はポータブル型の装置であり、可搬性と操作の簡便性を重視した設計になっている。接近した正のピークと負のピークを同時に処理する機能、特にベースラインのドリフトを補正する機能がいないために、正確なデータ処理が困難な場合もみうけられた。IC条件Iでは正のピークと負のピークが出現するので、測定精度を高めるためにも、各ピークを完全に分離することが必要である。保健所の日常の検査業務に導入するためにも、精度の高い分析法の開発を目指して、分析条

件（分析カラム、溶出液の選択等）の改良と装置の機能強化を図ることが望まれるので、引き続き検討を行う予定である。

文 献

1. M.Yamamoto et al. (1984).
Anal. Chem., 56, 832-834.
2. 田中一彦(1997). 環境技術, 26, 54-60.
3. Z.Iskandarani, T.E.Jr.Miller(1985).
Anal. Chem., 57, 1591-1594.
4. テクニカルインフォメーションNo.98
(1997). 東ソー(株)

中学・高校生における踵骨超音波計測値と 関連要因について

堀井 裕子 西野 治身 山上 孝司¹
松倉 知晴² 田中 朋子 鏡森 定信³

Relationship between Ultrasound Measurements
of Bone Mass at Calcaneus and Related
Factors in Junior and Senior Highschool Students

Yuko HORII, Harumi NISHINO, Takashi YAMAGAMI¹,
Tomoharu MATSUKURA² Tomoko TANAKA,
and Sadanobu KAGAMIMORI³

要 旨 若年期の骨量に影響を与える要因を明らかにするため、中学3年生（14歳）および高校3年生（17歳）男女について超音波法で踵骨骨量を測定し、その計測値（SOS：Speed of sound, BUA：Broad-band ultrasound attenuation, Stiffness）と体格、第二性徴、牛乳摂取量、運動習慣等との関連を検討し以下の結果を得た。

1. 体格との間では、BUA, Stiffness は14歳、17歳の男女ともに体重、BMIと正の相関を示したが、SOSは14歳女子においてBMIと正、身長と負の相関がみられたのみで、その他の対象では関連は認められなかった。

2. 第二性徴との関連では、男子は陰部発毛後年数、女子では初経後年数が長いものほどBUA, Stiffnessは高い傾向を示した。しかし、SOSには関連はみられなかった。

3. 牛乳摂取量との関連では、17歳男子で摂取量が1日200mlを超えるものにおいてSOSが高い値を示した。

4. 運動習慣との関連では、運動部に所属しているものは男女ともにSOS, Stiffnessが高かったが、BUAは男子では高値を示したものの女子では差がみられず、BUAの変動は男女で異なっていた。

以上の結果から、踵骨超音波計測値と関連がみられた要因は、BUAでは体格、第二性徴、男子の運動習慣、SOSでは牛乳摂取量、運動習慣であり、それぞれの計測値で関連する要因は異なっていた。

近年骨粗鬆症の予防には若年期の最大骨量高め
る対策が重要視されており、若年者についての骨量
測定が実施されつつある。我々は若年者の最大骨量

に影響する因子を明らかにすることを目的として、
若年者の骨量を超音波骨量測定装置のAchilles
（Lunar社製、米国）で測定した。Achillesでは、

計測値として踵骨の超音波伝播速度 (SOS: Speed of sound, m/sec) と超音波減衰係数 (BUA: Broad-band ultrasound attenuation, dB/MHz) を測り, それらから Stiffness を算出している. SOS は骨密度を, BUA は海綿骨の骨梁構造を反映し骨質を表すと言われており [1], 各々の計測値が関連する要因は異なると考えられるが, 一般には Stiffness のみが骨量の指標として採用され, SOS, BUA について関連要因を検討したものは少ない. そこで今回我々は, 中学・高校生について SOS, BUA を測定し, 両計測値に影響を与える要因について検討したので報告する.

対象および方法

対象は富山県内, Y 町の 1 中学校 3 年生 (4 月 1 日現在 14 歳) 全員と O 市の 1 高校 3 年生 (4 月 1 日現在 17 歳) 全員であり, そのうち踵骨超音波計測値, 身体計測値が調査できた中学 3 年生 86 人 (男子 44 人, 女子 42 人) および高校 3 年生 181 人 (男子 73 人, 女子 108 人) を分析に供した.

調査にあたり中学生は本人および保護者から, 高校生は本人から書面により承諾を得た.

骨量の測定は Achilles を用い, 踵骨の SOS および BUA を測定後, Stiffness を算出した.

身長, 体重は各学年 4 月の値を用いた. またアンケートにより, 第二性徴発来学年, 中学 3 年生は中学時, 高校 3 年生は高校時の牛乳摂取量および運動習慣, 現在までの骨折経験, ダイエット経験を調査した. 第二性徴発来は, 男子は陰部発毛, 女子は初潮発来を指標とした. 運動習慣は学校内および学校外の運動部所属の有無を調べ, いずれかに所属していたものを “運動あり” とした.

統計処理は, 2 群間の平均値の比較に t-検定を行い, 有意水準を 5% とした. 各変数の相関の検討には Pearson の相関係数を用い, 5% 未満を有意とした. 統計処理には統計解析ソフト HALLWIN を用いた.

結 果

Table 1 に対象者の身体計測値および踵骨超音波計測値を示した. 14 歳 (中学 3 年生) と 17 歳 (高校 3 年生) を男女別に比較すると, 身体計測値は男女ともに 14 歳に比べ 17 歳が高値であったが, 男子の BMI には差がなかった. 超音波計測値では SOS, Stiffness は男女ともに 17 歳が 14 歳より有意に高かったが, BUA は男子で差がなく, 女子では逆に 17 歳が有意な低値を示した ($p < 0.01$).

超音波計測値は 14 歳と 17 歳で有意差があったので, 以下の検討では年齢別に検討した.

身体計測値と各種超音波計測値との相関係数を Table 2 に示した. 男子では BUA は 14 歳, 17 歳ともに身長, 体重, BMI の全てと有意な正の相関があり, Stiffness についても 14 歳で体重と, 17 歳で体重, BMI と正の相関があった. しかし, SOS は両年齢ともに身体計測値と関連がみられなかった. 女子では, BUA は両年齢で体重, BMI と正の有意な相関がみられ, Stiffness は 14 歳では BMI と, 17 歳では体重と正の相関があった. 一方 SOS は 17 歳では身体計測値と関連がなかったが, 14 歳において身長と負の相関, BMI と正の相関がみられた.

第二性徴と超音波計測値との関連を検討するため, 男子では陰部発毛, 女子では初経発来年齢を 0 年とし, 男女それぞれ第二性徴発来後の年数別に超音波計測値を示した (Fig. 1). 14 歳男子の中に発来前の者が 1 名おり, 対象より除いた. 男女ともに BUA, Stiffness は第二性徴発来後の年数が長いほど高値を示す傾向がみられたが, SOS には同様の傾向はみられなかった. さらに, 発来後年数と各超音波計測値との関係を検討したところ, 男子では 14 歳は BUA との間に $r = 0.333$ ($p < 0.05$) の正の相関があり, 17 歳では BUA と $r = 0.219$ ($p < 0.1$), Stiffness とは $r = 0.223$ ($p < 0.1$) と有意ではないが正の傾向がみられた. 女子については, BUA, Stiffness は 14 歳, 17 歳の両年齢で初経後年数との間に有意な正の相関があった (BUA : 14 歳 $r = 0.475$ $p < 0.01$, 17 歳 $r = 0.240$ $p < 0.05$, Stiffness : 14 歳 $r =$

Table 1. Physical Characteristics and Ultrasound Measurements of Bone Mass at the Calcaneus

			14 years old		17 years old		t-test
			Mean	S.D.	Mean	S.D.	
			(N=44)		(N=73)		
Boys	Height	(cm)	166.0 ±	7.1	170.2 ±	5.4	**
	Weight	(kg)	56.3 ±	10.4	60.8 ±	6.7	*
	BMI	(kg/cm ²)	20.4 ±	3.1	21.0 ±	2.0	
	SOS	(m/sec)	1562.3 ±	30.9	1589.5 ±	26.9	***
	BUA	(db/MHz)	118.5 ±	11.5	118.1 ±	8.6	
	Stiffness		96.3 ±	14.8	103.2 ±	10.6	**
			(N=42)		(N=108)		
Girls	Height	(cm)	157.0 ±	4.8	159.2 ±	4.9	*
	Weight	(kg)	49.1 ±	4.8	54.0 ±	6.1	***
	BMI	(kg/cm ²)	19.9 ±	1.9	21.3 ±	2.1	***
	SOS	(m/sec)	1550.5 ±	21.7	1573.4 ±	26.9	***
	BUA	(db/MHz)	115.0 ±	8.5	111.1 ±	6.8	**
	Stiffness		90.6 ±	10.2	94.3 ±	9.7	*

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

N: Number of subjects

S.D.: Standard deviation

t-test: Significantly different from 14 years old

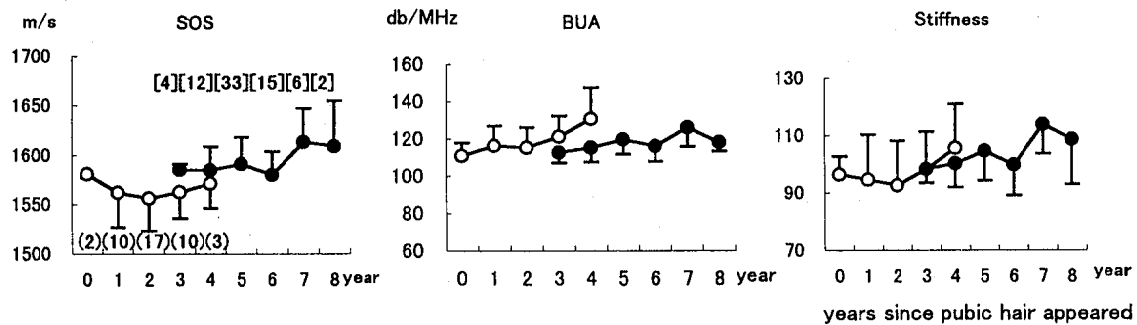
Table 2. Correlation Coefficients between Physical Characteristics and Ultrasound Measurements of Bone Mass at the Calcaneus

		14 years old			17 years old		
		SOS	BUA	Stiffness	SOS	BUA	Stiffness
		(N=44)			(N=73)		
Boys	Height	0.058	0.402 **	0.236	0.071	0.306 **	0.215
	Weight	0.133	0.485 **	0.316 *	0.193	0.524 ***	0.420 ***
	BMI	0.137	0.377 *	0.265	0.169	0.403 ***	0.339 **
		(N=42)			(N=108)		
Girls	Height	-0.340 *	-0.179	-0.305	0.125	0.186	0.177
	Weight	0.118	0.413 **	0.269	0.164	0.314 **	0.263 **
	BMI	0.344 *	0.538 ***	0.475 **	0.106	0.239 *	0.186

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

N: Number of subjects

Boys



Girls

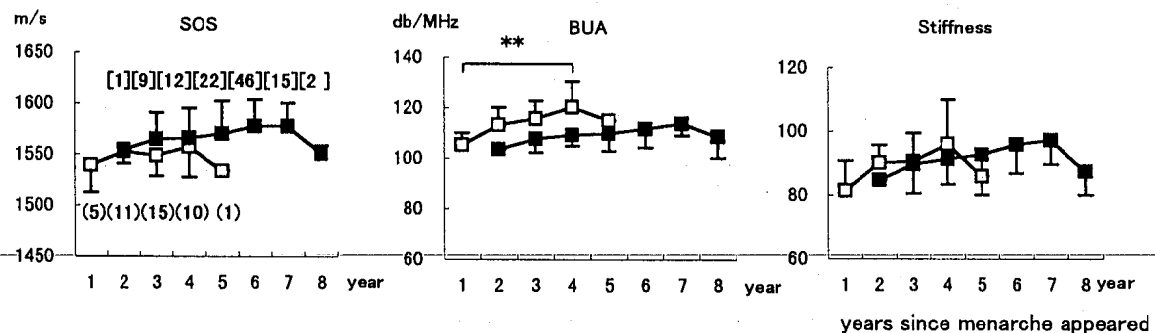


Fig. 1. Mean Ultrasound Measurements of Bone Mass at the Calcaneus by Pubertal Development

○, □: 14 years old, ●, ■: 17 years old

(): Number of 14 years old, []: Number of 17 years old

0.330, 17歳 $r=0.218$ ともに $p<0.05$). しかし SOSは男女ともに二次性徴発来後年数との相関はみられなかった。

次に生活習慣と超音波計測値との関連を検討した。

ダイエット経験、骨折経験の有無については両年齢の男女ともに超音波計測値に違いはみられなかった (Tableなし)。

牛乳摂取量について中学時および高校時での摂取量を1日200ml以下のものとそれ以上に分け超音波計測値を比較した (Table 3)。14歳では男女ともに牛乳摂取量別で有意差はみられなかった。一方、17歳では1日200mlを超えて摂取するものは、男子でSOSが有意に高かった ($p<0.05$)。

運動習慣について、14歳は中学校での運動部所属、17歳は高校での運動部所属の有無別に超音波計測値を比較した (Table 4)。その結果、14歳では男子の“運動あり”は“運動なし”に比べてSOS ($p<0.001$), BUA ($p<0.01$), Stiffness ($p<$

0.001)が有意に高く、女子では有意差はないもののSOSが高い傾向を示した。17歳でも男子の“運動あり”はSOS ($p<0.01$), BUA ($p<0.05$), Stiffness ($p<0.01$)が高く、女子ではSOS ($p<0.001$)とStiffness ($p<0.01$)が高値を示した。

考 察

本研究において14歳と17歳女子の踵骨超音波計測値を比較したところ、SOSは加齢で増加していた。片平らは、10~25歳の女子を年齢で4グループに区分し検討した結果、SOS、BUAともに加齢に伴い増加し、15~17歳で最大値になったと報告している [2]。今回のSOSの結果はこれとよく合致していた。しかしBUAは増加がみられなかったことから、SOSより先にピークを迎えている可能性が示された。

Table 3. Mean Ultrasound Measurements of Bone Mass at the Calcaneus by Habitual Milk Intake

Age	Milk intake	N	SOS(m/sec)		BUA(db/MHz)		Stiffness	
			Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
14	Boys	≤200ml/day	18	1559.6 ± 26.5	117.3 ± 11.2		94.5 ± 12.6	
		>200ml/day	26	1564.1 ± 34.0	119.4 ± 11.9		97.5 ± 16.2	
	Girls	≤200ml/day	20	1545.9 ± 22.8	113.4 ± 7.8		88.5 ± 10.4	
		>200ml/day	22	1554.7 ± 20.2	116.5 ± 9.0		92.6 ± 9.9	
17	Boys	≤200ml/day	49	1584.6 ± 25.7	118.2 ± 8.2		102.2 ± 10.0	
		>200ml/day	23	1600.5 ± 27.1	118.8 ± 8.9		106.2 ± 11.0	
	Girls	≤200ml/day	92	1573.4 ± 26.8	110.5 ± 6.8		93.9 ± 9.6	
		>200ml/day	15	1572.5 ± 29.3	114.0 ± 6.3		96.0 ± 10.4	

*: p<0.05

N: Number of subjects

S.D.: Standard deviation

Table 4. Mean Ultrasound Measurements of Bone Mass at the Calcaneus by Sports Club Activities

Age	Sport club	N	SOS(m/sec)		BUA(db/MHz)		Stiffness	
			Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
14	Boys	Yes	35	1570.5 ± 28.1	120.2 ± 12.2		99.7 ± 14.4	
		No	9	1530.1 ± 17.4	112.1 ± 4.6		82.9 ± 5.5	
	Girls	Yes	34	1553.6 ± 21.9	115.2 ± 9.3		91.6 ± 10.7	
		No	8	1537.3 ± 15.7	114.1 ± 3.6		86.4 ± 6.6	
17	Boys	Yes	55	1594.3 ± 27.1	119.3 ± 8.0		105.3 ± 10.1	
		No	18	1574.8 ± 20.5	114.3 ± 9.6		97.0 ± 9.9	
	Girls	Yes	59	1581.8 ± 24.3	111.4 ± 6.1		96.7 ± 8.3	
		No	48	1562.7 ± 26.6	110.5 ± 7.6		91.2 ± 10.5	

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

N: Number of subjects

S.D.: Standard deviation

体格と超音波計測値との関連では、BUAやStiffnessは両年齢の男女ともに身体計測値、特に体重、BMIと正の相関があったが、SOSは14歳女子でのみBMIとの間に正の相関があり、BUA、Stiffnessのような体格との強い関連はみられなかった。また、第二性徴との関係においてもBUA、Stiffnessは男女ともに発来後の年数が長いものほど高くなる傾向がみられたが、SOSでは関連がみられなかった。これらのことから、若年者において超音波計測値のBUA、Stiffnessは体格や第二性徴など成長と関連があるが、SOSはそれらの影響があらわれにくく、超音波計測値の各値と関連する要因に違いがあった。体格と超音波

計測値との関係は、中高年女性における我々の調査結果[3]でもStiffnessやBUAは身長、体重、BMIと正の相関があったがSOSでは相関がなく、年齢にかかわらず同じ傾向であった。

また、第二性徴との関係については、中川らは10～15才の女子においてStiffnessは初経発来後3年目までは有意な上昇が認められたと報告している[4]。今回の女子の結果でも、初経後年数とBUA、Stiffnessには正の相関があり、初経後にBUA、Stiffnessが上昇する傾向がみられた。

生活習慣で超音波計測値と関連がみられたのは、牛乳摂取量と運動習慣であった。前者では17歳男子の摂取量の多いものでSOSが高値を示した。後

者では、男子の“運動あり”はSOS, BUA, Stiffnessが高い傾向を示したが、女子ではSOS, Stiffness だけに変化がありBUAとの関連はみられず、性別で超音波計測値に対する影響に違いがみられた。一方、先にBUA, Stiffnessと関連があった体重, BMIについて運動の有無で比較したところ、17歳男子の“運動あり”は“運動なし”に比べて体重 ($p<0.05$), BMI ($p<0.01$) が有意に高値を示した。このことから、17歳男子“運動あり”のBUA, Stiffnessには体格が影響し、高値を示した可能性がある。

島田らは中高年女性を対象に、体格、閉経、運動、カルシウム等栄養摂取量の各要因とSOS, BUAとの関係を検討した結果、要因によって超音波計測値への影響が異なっていたことを報告しているが[5]、今回の調査から10代の若年者でも同じ結果が得られた。

現在踵骨の超音波計測値はStiffnessのみを骨量の指標として用いられることが多い。しかし、本来の測定値はSOSとBUAであり、これらの計測値が異なる要因の影響を受けることが明らかとなった。特に若年者では成人に比べ体格の変化や、第二性

徴による変化が大きいことを考えると、若年者の骨量に影響する要因を検討する際には、StiffnessだけではなくSOS, BUAそれぞれの計測値を骨量の指標として使い分けることが有用であると思われる。

文 献

1. 福永仁夫, 武田直人(1993). 医学のあゆみ, 165, 625-628.
2. 片平弦一郎, 稲垣慶正, 辻 正裕, 松井秀章, 酒井俊明 (1995). Osteoporosis Japan, 3, 259-262.
3. 西野治身, 田中朋子, 堀井裕子, 熊西忠郎, 伊木雅之, 梶田悦子, 土肥祥子, 日下幸則, 鏡森定信 (1996). 富山衛研年報, 19, 138-147.
4. 中川理映子, 福田佳世, 岡本貴世, 足達綱三郎, 有田佐智子, 藤田晴康, 田中美津子, 山西佐智美, 城川法子, 広田孝子(1996). 第2回日本骨ドック・健診研究会抄録集, 29.
5. 島田直樹, 伊藤美季, 加部 勇, 等々力達也, 高橋 謙, 近藤健文(1996). 日本衛生学雑誌, 51, 499.

小学校6年生の血清脂質と生活習慣

田中 朋子 堀井 裕子 中崎美峰子
西野 治身 山上 孝司¹ 鏡 森 定信²

Relationship between Serum Lipid and
Lifestyle in Students of the Sixth Grade

Tomoko TANAKA, Yuko HORII, Mineko NAKAZAKI,
Harumi NISHINO, Takashi YAMAGAMI and Sadanobu KAGAMIMORI

要 旨 小学校6年生の血清コレステロールを測定し、生活習慣との関連を検討した結果、以下の事が分かった。

1. 運動との関連について

男児では運動習慣を有するものはHDLコレステロールが高く、動脈硬化指数(AI)が低かった。

女児では初経発来後には運動習慣を有する者は総コレステロールが低く、AIは低値を示したが、初経発来前には運動による影響は認められなかった。

2. 牛乳摂取との関連について

男児では牛乳を1日2本以上飲む者は総コレステロール、HDLコレステロールが高かったが、運動による影響を除くとHDLコレステロールのみが高値を示した。

我々はこれまで小児期からの生活習慣病予防を目的に成長期の血清脂質の変動について調査を行ってきた[1]。その結果、コレステロールは男女とも小学校高学年から徐々に低下し、中学生で最低値を示すこと、女児では初経発来によりコレステロールが低下していることが判った。それらは急激な成長や第二性徴によると考えられた。一方、小児期は正しいライフスタイルを確立する重要な時期であり、血清脂質と生活習慣との関連を把握する事は重要である。そこで、小学6年生を対象に、肥満、運動、牛乳摂取の3項目について、コレステロールとの関連を、身体状況や初経発来の

有無を考慮して検討した。

対象および方法

富山県内のY小学校6年生で、運動、牛乳摂取についてのアンケートがそろっていた男児50名、女児37名を対象とした。身体状況は4月の測定値を用い、体格指数としてローレル指数{体重(kg)/[身長(m)]³×10}を用いた。運動習慣については学校内、学校外のいずれかのクラブに入っている者を“運動あり”とし、入っていない

者を“運動なし”とした。牛乳摂取については“1日1本以下”と“1日2本以上”に分けた。採血は7月に実施した。血清脂質として総コレステロール(T-chol), HDLコレステロール(HDL-chol)を測定し、動脈硬化指数(AI) $\{=(T\text{-chol} - \text{HDL-chol})/\text{HDL-chol}\}$ を求めた。

結 果

Table 1に全対象者の身体状況と血清脂質を示した。身体状況、血清脂質は、男女間に有意な違いは認められなかった。

日本肥満学会の判定基準[2]によりローレル指数が身長129cm以下では180以上、130~149cmでは170以上、150cm以上で160以上を肥満としたと

ころ、男児3名、女児1名が肥満と判定された。肥満の有無により脂質を比較したところ(Table 2), 男児では、肥満者はHDL-cholが低く、AIは高値であり、女児についても1名のみであったがT-chol, AIは高く、HDL-cholは低値を示した。今回の対象は肥満者は少なかったが、成人と同様、脂質代謝に異常が認められた。

そこで、以下の解析は女子1名、男子3名の肥満者を除き行った。

また、女児については先の報告[1]より、初経発来で脂質が変動すると考えられるので初経発来の有無別に比較した(Table 3)。その結果、身体状況では、初経発来群は未発来群に比し体重が高かった。脂質については、初経発来群が未発来群に比しHDL-cholは低く、AIは高値を示した。そこで、以下の解析は初経発来の有無別に行った。

Table 1. Basic Characteristics of the Subjects and Serum Lipids.

	Boys (n=50)			Girls(n=37)		
	Mean±S.D.	Max.	Min.	Mean±S.D.	Max.	Min.
Height(cm)	144.6±7.2	159.8	128	146.6±4.6	158.1	135.1
Weight(kg)	38.7±9.2	69.9	26	39.2±6.5	63	28
Rohrer index	126±19.2	187	95	124±18.0	193	97
T-chol(mg/dl)	171±26.6	236	127	179±20.6	221	134
HDL-chol(mg/dl)	59.0±16.4	129	32	56.8±11.1	78	36
AI [#]	2.05±0.77	4.42	0.83	2.26±0.76	5.12	1.31
[#] :(T-chol — HDL-chol)/HDL-chol						

Table 2. Basic Characteristics of the Subjects and Serum Lipids in Relation to Obesity.

	Boys		t-test	Girls	
	Not obese n=47	Obese [#] n=3		Not obese n=36	Obese [#] n=1
	Mean±S.D.	Mean±S.D.		Mean±S.D.	
Height(cm)	144.6±7.1	144±6.1		146.5±4.6	148.4
Weight(kg)	37.5±7.6	57.5±12.5	***	38.5±5.2	63
Rohrer index	123±15.4	172±13.6	—	122±14.0	193
T-chol(mg/dl)	170±27.3	168±13.0		178±19.6	221
HDL-chol(mg/dl)	60.1±16.1	40.4±10.3	*	57.4±10.7	36
AI	1.97±0.69	3.33±1.10	**	2.18±0.60	5.1
[#] : Height 110~129cm Rohrer Index ≥180					
130~149cm ≥170					
150cm~ ≥160					

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.00

Table 3. Basic Characteristics of the Subjects and Serum Lipids in Relation to Menstrual Status

	Before menarche(n=17)	After menarche(n=19)	t-test
	Mean±S.D.	Mean±S.D.	
Height(cm)	144.9±4.1	148.1±4.7	
Weight(kg)	36.4±5.6	40.4±3.95	*
Rohrer index	120±16.5	125±11.2	
T-chol(mg/dl)	181±23.0	175±16.1	
HDL-chol(mg/dl)	61.7±9.6	53.5±10.4	*
AI	1.96±0.39	2.38±0.69	*

*: p<0.05

Table 4. Basic Characteristics of the Subjects and Serum Lipids in Relation to Habitual Exercise

	Exercise n=34	No-Exercise n=13	t-test
	Mean±S.D.	Mean±S.D.	
Height(cm)	143±7.4	147±5.7	
Weight(kg)	37.0±7.9	38.6±7.0	
Rohrer index	124±14.5	121±17.9	
T-chol(mg/dl)	171±25.8	169±31.8	
HDL-chol(mg/dl)	63.1±16.0	52.4±13.9	*
AI	1.82±0.60	2.37±0.76	*

*:p<0.05

Table 5. Basic Characteristics of the Subjects and Serum Lipids in Relation to Habitual Exercise

	-Girls-			
	Before menarche		After menarche	
	Exercise n=9	No-Exercise n=8	Exercise n=5	No-Exercise n=14
	Mean±S.D.	Mean±S.D.	Mean±S.D.	Mean±S.D.
Height(cm)	145±3.7	144±4.6	146±6.4	149±4.0
Weight(kg)	36.6±5.6	36.1±5.9	36.6±5.5	41.0±3.3
Rohrer index	119±15.7	120±18.4	123±4.9	125±12.8
T-chol(mg/dl)	180±25.7	181±21.3	156±6.2	182±12.8
HDL-chol(mg/dl)	62.5±11.3	60.9±7.9	56.2±5.7	52.6±11.6
AI	1.92±0.37	2.01±0.44	1.81±0.33	2.58±0.67

***, *: Significant difference compared with Exercise and No-Exercise at p<0.001, p<0.05

運動習慣の有無で分け身体計測値、脂質を比較したところ (Table 4, 5), 男女とも身体計測値に違いはなかった。脂質について、男児では“運動あり”は“運動なし”に比べHDL-cholが高く、AIが低かった (各々 p<0.05)。女児では初経発来群の“運動あり”は“運動なし”に比

べT-cholが低く、AIは低値を示したが、未発来群では運動の有無による違いはなかった。

牛乳摂取量についてTable 6に男児の結果を示した。“1日1本以下”、“1日2本以上”の2群間で身体計測値に違いはなかった。脂質について、“1日2本以上”のT-chol, HDL-cholは

Table 6. Basic Characteristics of the Subjects and Serum Lipids in Relation to Habitual Milk Intake

	-Boys-		
	$\leq 200\text{ml/day}$	$\geq 400\text{ml/day}$	t-test
	n=29 Mean $\pm$ S.D.	n=18 Mean $\pm$ S.D.	
Height(cm)	145 $\pm$ 7.2	145 $\pm$ 7.3	
Weight(kg)	37.2 $\pm$ 7.3	37.9 $\pm$ 8.4	
Rohrer index	122 $\pm$ 14.6	126 $\pm$ 16.8	
T-chol(mg/dl)	164 $\pm$ 22.9	181 $\pm$ 31.2	*
HDL-chol(mg/dl)	56.4 $\pm$ 13.7	66.2 $\pm$ 18.0	*
AI	2.06 $\pm$ 0.72	1.83 $\pm$ 0.62	

*:p<0.05

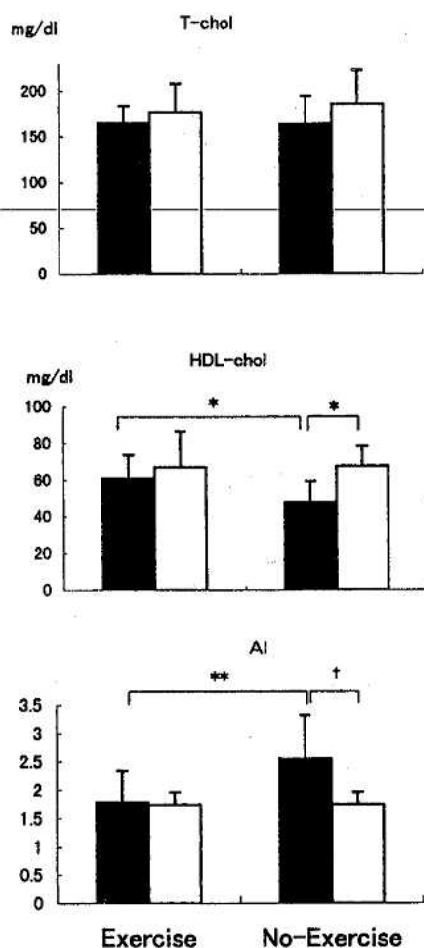


Fig 1. Serum Lipids by Habitual Exercise and Milk Intake in Boys

■ less than 1 bottle/day
 □ more than 2 bottles/day
 **p<0.01, *p<0.05, †: p<0.1

“1日1本以下”に比し有意に高かった ($p<0.05$). 一方、女児では牛乳摂取量が“1日2本以上”は全体で6名(初経発来群2名, 未発来群4名)であったが, 身体計測値, 脂質は初経発来の有無にかかわらず牛乳摂取量による違いはなかった (Tableなし).

そこで、男児について運動習慣, 牛乳摂取習慣それぞれの有無で4群に分け脂質を比較した (Fig.1). “1日1本以下”で“運動あり”と“運動なし”を比較すると, “運動あり”のHDL-cholは有意に高く, AIは低値を示した. また, “運動なし”で“1日1本以下”と“1日2本以上”を比較すると“1日2本以上”のHDL-cholは有意に高く, AIは低い傾向を示した.

考 察

運動との関連について, 従来, 成人では運動によりHDL-cholが高くなること, AIが低値を示すことはよく知られている [3,4]. しかし, 小学生についての報告は比較的少ない [5,6]. 特に, 女児について初経発来を考慮したものはほとんどみられない. 今回, 初経後で運動習慣を有する者はT-cholが低く, AIは低値を示した. 成人と異なりHDL-cholに違いはなかったが, 運動は初経後の女児においても脂質代謝を改善すると考えられた. 一方, 初経前の女児では運動との関連は認められなかった. 初経発来前はコレステロールの変動が非常に大きい時期であり, 運動の効果が

現れにくいのではないかと考えられた。

男児については、成人と同様、運動によりHDL-cholが高く、A Iは低値を示した。さらに、牛乳摂取による影響を除いても同じ結果が得られた。

一方、牛乳摂取との関連について、一般に、過剰の牛乳摂取は脂質の摂りすぎにつながることから、動脈硬化の危険因子と考えられている[7]。牛乳摂取が脂質特にHDL-cholを高くする、あるいはA Iを低下させるという報告は少ないように思われる。このことに関して岩田らは、小学校4年生、中学1年生を対象に同様の調査を実施している。中学1年生では脂質と牛乳摂取との関連は認められなかったが、小学校4年生では、牛乳摂取量が多くなるとT-cholが高いが、同時にHDL-chol、Apo A-1も高く、牛乳摂取は動脈硬化性を高めていなかったと述べている[8]。今回、小学校6年生の男児では、牛乳を1日2本以上飲むという習慣は岩田らの4年生の調査結果と同様T-chol、HDL-cholを高くしていた。さらに、運動の影響を除いたところ、HDL-cholが高いことがわかり、成長期に必須なカルシウム確保のために

重要な牛乳摂取が、脂質代謝にもプラスに働いていることがわかった。

文 献

1. 堀井裕子, 田中朋子, 西野治身, 熊西忠郎, 山上孝司, 鏡森定信 (1997). 富山衛研年報, 20, 217-220.
2. NHK世論調査部編. 現代小学生の生活と意識, (1992). 明治図書.
3. 岡村智教 (1994). 動脈硬化, 21, 585-589.
4. 内藤義彦 (1994). 日本公衛誌, 41, 706-719.
5. 洲上達夫, 唐沢賢祐 (1991). Pharma Medica. 9, 51-55.
6. 譚鳳珠, 岡本幹三, 陶山昭彦, 岡田浩文, 岸本拓治 (1998). 日本公衛誌, 45 (10), 508.
7. 本田佳子 (1999). 保健の科学, 41, 741-746.
8. 岩田富士彦, 佐藤良行, 山崎弘貴, 原 光彦, 金英哲, 岡田智雄, 原田研介, 梁 茂雄, 大国真彦 (1997). 56, 655-659.

3. 資 料

平成11年度動物由来感染症実態調査 富山県における犬猫の *Coxiella burnetii* に対する抗体保有状況

安藤 秀二 石倉 康宏 北村 敬

Serosurveillance of companion animals against *Coxiella burnetii*
in Toyama prefecture

Shuji ANDO, Mitsuhiro ISHIKURA, Takashi KITAMURA

平成11年4月より「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」が施行され、多くの動物由来感染症（人獣共通感染症）が法律によって届け出が規定された。このことに伴い、富山県では平成11年度より動物由来感染症実態調査としてQ熱の調査を開始した。Q熱はリケッチアの1種である *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) による熱性疾患で、急性感染ではインフルエンザ様症状を呈するが、一般に予後は良好である。しかしながら、感染者の5%ほどは急性期から慢性感染への移行により慢性心内膜炎や慢性肝炎を起し、最近では不定愁訴とも関係があるといわれている(1, 2, 3)。Q熱の原因である *C. burnetii* は、家畜やペットが保有するとの報告があるが、その実態は不明な点が多く残されている。

材料と方法：初年度は県内の開業獣医と動物管理センターの協力により集められた犬76頭、猫91匹、合計167件の血液についてQ熱の病原体 *C. burnetii* に対する抗体検査を行い、その抗体保有状況を検討した。その内訳は、開業獣医より犬55頭（オス33/メス22）及び猫63匹（オス30/メス32/性別不明1）、動物管理センターの引き取り動物より犬21頭（オス12/メス9）及び猫28匹（オス14/メス14）である。

間接蛍光抗体法による抗体検査は、*C. burnetii* Nine Mile株を感染させたVero細胞を抗原とし、16倍から2倍階段希釈した血清または血漿を反応させた後、犬および猫のIgGとIgMに対する抗血清を

反応させて行った。

結果と考察：血清希釈16倍以上を抗体陽性としたところ、*C. burnetii* に対するIgG抗体では、犬で10.5% (8/76)、猫で50.5% (46/91) において *Coxiella burnetii* に対する抗体が陽性となった(表)。Q熱の抗体診断に関しては、国内における統一基準が無いのが現状であり、今回我々は感染細胞を固定した抗原を用い、抗体によって *C. burnetii* の封入体が明瞭に染められる検体を陽性とした。この場合、検体希釈16倍でも明瞭に陰性と陽性が染め分けられた。抗体価でみると、陽性となったものの大部分が64倍未満の低い抗体価であったが、猫において6匹が516倍以上の抗体価を示した。

急性期を示すIgM抗体は、開業獣医からの犬猫各1検体で16倍で陽性となったが、いずれもIgG抗体についても16倍の低力価であった。また、動物管理センターの引き取り猫の中にIgM抗体16倍を示したものが3件、32倍を示したものが2件あった。これらIgM抗体陽性を示した検体から、PCRによる *C. burnetii* 特異的遺伝子は検出されなかった。

国内外の犬猫における *C. burnetii* に対する抗体調査は、犬で10~17%、猫で7~69%が陽性と、調査によって大きな幅が見らる。日本におけるQ熱株は国外の株と比べて病原性が弱く、抗体上昇も軽度である可能性も指摘されており、診断基準の確立とともに、国内のQ熱に関する疫学的特徴、

犬猫におけるC.burnetiiに対する抗体保有状況

動物種	検体由来	性別	検体数	陽性数 (≥16)	陽性率%	陽性数 (≥32)	陽性率%	陽性数 (≥64)	陽性率%
イヌ	開業獣医	オス	33	7	21.2	4	12.1	2	6.1
		メス	22	1	4.5	0	0.0	0	0.0
		小計	55	8	14.5	4	7.3	2	3.6
	動管*	オス	12	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		メス	9	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		小計	21	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	計	76	8	10.5	4	5.3	2	2.6	
ネコ	開業獣医	オス	30	14	46.7	10	33.3	5	16.7
		メス	32	13	40.6	9	28.1	6	18.8
		不明	1	0	0.0	0	0.0	0	0.0
		小計	63	27	42.9	19	30.2	11	17.5
	動管	オス	14	11	78.6	9	64.3	6	42.9
		メス	14	8	57.1	7	50.0	5	35.7
	小計	28	19	67.9	16	57.1	11	39.3	
計	91	46	50.5	35	38.5	22	24.2		

*動管：動物管理センター

病原性の解析を進める必要がある。

文 献

謝辞：本調査事業は、厚生部薬務食品課、富山市保健所を含む県内の10の保健所本所・支所、動物管理センターの関係職員、富山県獣医師会所属開業獣医師など多数の協力により行われたものです。

1. 平井克哉, Khin Khin Htwe, 山口剛士, 福士秀人 (1992). Q熱—その疫学的考察. 獣医畜産新法, 45, 848-855.
2. Katsuya Hirai and Ho To (1998). Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. Journal of Veterinary Medical Science, 60, 781-790.
3. 長岡宏美, 杉枝正明, 秋山真人, 西尾智裕, 仁科徳啓, 中村信也 (1997). 原因不明熱患者および飼育動物血清におけるQ熱リケッチア遺伝子の証明—Q熱後倦怠症候群についての一考察. 静岡県環境衛生科学研究所報告, 39, 7-11.

富山県における平成11年度の ウイルスおよびリケッチア検査状況

安藤 秀二 中山 喬 長谷川澄代
松浦久美子 石倉 康宏 北村 敬

Virological and Rickettsiological Examinations of Infectious Diseases
in Toyama Prefecture, April 1999 to March 2000

Shuji ANDO, Takashi NAKAYAMA, Sumiyo HASEGAWA,
Kumiko MATUURA, Mitsuhiro ISHIKURA, Takashi KITAMURA

平成11年度富山県結核・感染症発生動向調査事業、感染症流行予測事業、行政依頼検査及び一般依頼検査において行った病原体の検出結果を報告する。検査の実施方法は、臨床症状に応じ常法によって行った。検査対象となった患者は296症例、検査に供した検体数は糞便164、咽頭拭液135、髄液7、尿1、血液6、食材(牡蛎)3の計316であった。検査実施296症例中143症例から143株のウイルス及びリケッチアが検出された。(表)

平成11年4月1日より「感染症の予防及び感染症の患者の治療に関する法律」の施行により、感染症発生動向調査事業が法律により規定された事業になった。このことに伴い、病原体定点病院の見直しが行われた経過措置により、無菌性髄膜炎や手足口病をはじめとする夏期に流行する小児の疾患の検査が例年に比較して少ないまたは無いことは、これまでの年度報告と比較する上で注意が必要である。また法律により、届出における疾患の名称に変更があったものを、以下の疾患の範囲で若干の解説をする。

インフルエンザ及び急性気管支炎：1999年12月から2000年3月のインフルエンザ流行期にかけて県内の定点病院および集団発生の学校から115例の検査依頼があり、12株のA(H3)型インフルエンザおよび36株のA(H1)型インフルエンザウイルスを分離同定した。今流行シーズンの特徴は、A

(H1)型インフルエンザ(ソ連型)ウイルスが1995-1996年シーズン以来4年ぶりに流行し、分離数においてもH3(香港型)を上回った。1996-1997年シーズン以来3年にわたって分離されたB型インフルエンザウイルスは分離されていない。またインフルエンザと診断された患者の咽頭拭液より3株のアデノウイルスが分離された。詳細については、本年報に掲載されているインフルエンザ流行予測調査の報告を参照されたい。

感染性胃腸炎：乳児嘔吐下痢症を含む感染性胃腸炎は年間を通じて発生した。小型球形ウイルス(SRSV)が47件中30件と6-7月と11-3月を中心に多く検出された。他に春から初夏にかけてA群及びC群ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルスが検出された。

感染性胃腸炎の定義は、新法により「細菌、ウイルス、寄生虫等を原因とする胃腸炎」とされ、感染原因微生物の範囲が広がっている。旧来、満1才以上のウイルス性胃腸炎患者を感染性胃腸炎として、細菌性胃腸炎と分けて報告していたが、現在同じ臨床診断名で届けることに注意しなければならない。

食中毒：ウイルス性食中毒の原因となったのは全て小型球形ウイルス(SRSV)であった。SRSVによる食中毒は、一般に冬期間から春先にかけてピークとなるといわれているが、7月にも集団発生した。

平成11年度疾患別、月別ウイルスおよびリケッチア検出状況

臨床診断名	検出病原体	3月*1	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
インフルエンザ及び急性気管支炎	(被検者数)									(1)	(27)	(52)	(21)	(14)	(115)
	INF. A(H1)										7	15	6	8	36
	INF. A(H3)										2	9		1	12
	7デ/2											1			1
	7デ/3										2				2
感染性	(被検者数)	(4)	(4)	(6)	(6)	(5)	(1)	(1)		(6)	(5)	(3)	(1)	(5)	(47)
胃腸炎*2	ADENO NT	1		1	2										4
	ROTA A	3	2	4											9
	ROTA C				1						1				2
	SRSV		1	1	3	4	1	1		6	4	3	1	5	30
	SRSV+ROTA Like	1													1
	ASTRO					1									1
食中毒	(被検者数)					(6)				(4)	(5)		(9)	(10)	(34)
	SRSV					4				4	5		9	10	32
脳炎・脳症	(被検者数)						(2)		(1)			(1)	(2)	(1)	(7)
	INF. A(H1)												1		1
	INF. A(H3)											1			1
	ENTERO NT					2									2
髄膜炎	(被検者数)					(1)									(1)
	MUNPS					1									1
恙虫病	(被検者数)		(1)							(5)					(6)
	<i>O.tsutsugamushi</i>									5					5
無症状	(被検者数)										(72)				(72)
	POLIO 2										1				1
	ECHO 22										1				1
	ENTERO NT										1				1
その他*3	(被検者数)		(1)		(3)	(2)					(2)	(6)			(14)
合計	(被検者数)	(4)	(6)	(6)	(9)	(14)	(3)	(1)	(1)	(16)	(111)	(62)	(33)	(30)	(296)
	検出数	4	4	6	6	10	3	1	0	15	24	29	17	24	143

*1: 検体採取3月、搬入4月。

*2: 乳児嘔吐下痢症を含む。

*3: 発疹症5、無菌性髄膜炎1、重症呼吸器疾患1および家族(感冒様)3、気管支炎・気管支喘息1、急性ウイルス性感染症1、急性咽頭喉頭炎1、無記入1

上記感染性胃腸炎の所でも示した様にSRSVによる胃腸炎患者は年間を通じても発生していることから、1年を通しての注意が必要と考えられる。SRSVによる集団のウイルス性食中毒は7件発生し、2件の原因食(牡蛎)からもSRSVが検出された。

脳炎・脳症: 昨今のインフルエンザ脳症・脳炎報告から全国的な調査が開始され、臨床現場での感心も高まっている。インフルエンザウイルスによる脳炎・脳症疑いの検査が、1-3月に4症例について依頼があった。このうち1月の患者咽頭拭い液からA(H3)型インフルエンザウイルス、2

月の患者髄液からA(H1)型インフルエンザウイルスがそれぞれ1株ずつRT-PCRにより検出された。

髄膜炎: 7月にワクチン接種後髄膜炎を発症した患者の髄液から、接種ワクチンと同じムンプスワクチン宮原株がRT-PCRとシーケンス解析により検出された。

恙虫病: 恙虫病と診断された6症例に関して恙虫病リケッチアの検出を行った。11月に発生した5症例から恙虫病リケッチア(*Orientia tsutsugamushi*)がPCRによって検出された。また4月の症例は、血清学的にKarp型の感染に

平成12年10月1日

よる恙虫病と診断された。

その他、無症状：4月から7月にかけて発疹症5例、無菌性髄膜炎1症例の検査依頼があったが、ウイルスは分離されていない。その他ウイルス分離はできなかったが、呼吸器疾患を中心に様々な臨床診断名で依頼が8件あった。

また本年度もポリオの流行予測事業により12月に1～6才の健康な乳幼児72名を対象にウイルス検索を行った。ポリオウイルス2型、エコーウイ

ルス22型、型別不能のエンテロウイルスがそれぞれ1株分離された。ポリオウイルス2型については、ワクチン株と野生株の鑑別のため、現在国立感染症研究所に解析を依頼している。詳細については、本年報に掲載されているポリオ流行予測調査の報告を参照されたい。

感染症新法施行によるご多忙のなか、ウイルスおよびリケッチアの検出にご協力いただいた医療防疫機関の関係各位に深くお礼申し上げます。

富山県におけるイカ菓子による サルモネラ食中毒について

磯部 順子 田中 大祐 細呂木志保 平本 裕子

Salmonella Food Poisoning Caused
by Cuttlefish Chips in Toyama Prefecture

Junko ISOBE, Daisuke TANAKA,
Shiho HOSOROGI and Yuko HIRAMOTO

1999年3月、イカ菓子によるサルモネラ食中毒が川崎市で発生した。その後全国各地で同食品を原因とする食中毒患者が確認され、最終的にその数が1,500人以上となった[1,2]。

富山県においても、この食中毒に関連すると思われるSalmonella Oranienburg(S.O), S.Chester(S.C)がヒトおよびイカ菓子から分離された。

富山県におけるイカ菓子サルモネラ汚染による食中毒の実態を明らかにする目的で、分離したS.O, S.C分離株について、その生化学性状、薬剤感受性試験、及びパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による遺伝子解析を行ったので、その成績を報告する。

材料と方法

1) 菌株：富山県内にある4医療機関と高岡保健所及び中部保健所八尾支所より搬入されたヒトから分離されたS.O(12株), S.C(2株)と、収去されたイカ菓子11検体から分離されたS.O(14株), S.C(10株), そして1980年, 1983年に分離されたS.O3株の合計41株を用いた。

2) 一般生菌数及びサルモネラ菌数：イカ菓子はリン酸緩衝食塩水にて10倍乳剤として検査に供した。一般生菌数は標準寒天による混釈法で、また、サルモネラ菌数はラパポート培地を用いた5

本3段階のMPN法で測定した。

2) 糖分解能試験：バージコーの培地を使用した。

3) 薬剤感受性試験：既報[3]に示すとおり、センシディスク(BBL)を用いたNCCLS法によった。

4) PFGE：TERAJIMAら[4]の方法を参考に、制限酵素Bln I(takara)でDNAを切断後、PFGEを行った。

結果および考察

富山県における1999年のヒトからのS.OおよびS.Cの分離状況を表1に示した。分離数は合計14株で、いずれも3月～5月に病院あるいは保健所で分離され、当所で同定された。患者の喫食状況を調べた結果、5人がイカ菓子を食べていたが、他の患者の感染源は明らかでなかった。患者の年齢は、10歳以下が7人、11～16歳が4人、40～51歳が3人と子供に多かった。菌の分離材料はNo.2は静脈血、No.12は尿であったが、その他はいずれも便であった。

表2に富山県で収去されたイカ菓子の検査結果を示した。11検体のうちS.O, S.Cともに分離されたのは6検体、S.Oのみ分離されたのは4検体で、サルモネラが分離されなかったのは1検体であっ

表1. 菌株分離とその患者情報

菌株 No.	搬入月日	分離施設	分離月日	年齢	性別	血清型	分離材料
1	3/30	N病院		10	女	Oranienburg	便
②	4/ 6	K病院		16	男	Oranienburg	静脈血
3	4/ 8	T病院		51	女	Chester	便
4	4/ 9	Y保健所		11	男	Oranienburg	便
⑤	4/ 9	TA病院	4/7	13	男	Chester	便
⑥	4/14	TA病院	4/12	8	女	Oranienburg	便
7	4/15	I病院	3/29	8	男	Oranienburg	便
⑧	4/16	C保健所		12	男	Oranienburg	便
⑨	4/22	TA病院	4/19	7	男	Oranienburg	便
10	4/23	T病院	4/7	7	女	Oranienburg	便
11	4/27	N病院		8	男	Oranienburg	便
12	5/ 6	N病院		5	女	Oranienburg	尿
13	5/14	TA保健所	4/20	41	女	Oranienburg	便
14	5/14	TA保健所	5/11	41	女	Oranienburg	便

○はイカ菓子を食べた患者からの分離。

No.13,14 は同一患者からの分離。

表2. イカ菓子検査結果

No.	イカ菓子名 (消費期限)	サルモネラ検出 (血清型)	一般生菌数 (個/g当たり)	サルモネラ菌数 (100g中)
1	元祖おやつ珍味 (1999. 9. 29)	+(S. Oranienburg, S. Chester)	NT*	NT
2	元祖東京おやつ珍味 (1999. 5. 19)	+(S. Oranienburg)	5.4×10^7	2,300
3	するめジャーキー (1999. 5)	+(S. Oranienburg, S. Chester)	9.1×10^7	< 20
4	おやつ珍味 (1999. 8. 22)	+(S. Oranienburg, S. Chester)	NT	NT
5	おやつ珍味 (1999. 7. 17)	+(S. Oranienburg, S. Chester)	7.6×10^7	> 16,000
6	するめそーめん (1999. 6. 2)	検出せず	1.0×10^8	NT
7	するめそーめん (1999. 6. 26)	+(S. Oranienburg)	5.0×10^8	NT
8	するめそーめん (1999. 8. 1)	+(S. Oranienburg)	4.6×10^8	NT
9	するめそーめん (1999. 8. 7)	+(S. Oranienburg)	2.9×10^8	NT
10	味彩紀行 (1999. 9. 16)	+(S. Oranienburg, S. Chester)	3.1×10^7	2,400
11	味彩紀行 (1999. 9. 8)	+(S. Oranienburg, S. Chester)	1.7×10^6	90

* NT:未検査

た。これらのうち9検体について一般生菌数を測定したところ、 $1.7 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^8 / g$ であった。市販されたイカ菓子は、サルモネラが分離されなかった製品も細菌学的にかなり汚染されていた。また、サルモネラ菌数については5検体について検査したが、少ないものは $< 20 / 100g$ 、多いものは $> 16,000 / 100g$ と製品によるばらつきが認められた。分離菌について、14種類の糖分解能を調べた結果を表3に示した。S.Oではイノシット分解株が少なかった(3/29)のに対し、S.C.では1

株を除いて、すべて分解株であった。アドニット、ソルビット、アラビノースについても同様の結果であった。S.Oの場合、特にヒトから分離された菌に分解株が少なく、通常のサルモネラの糖分解性と異なっていた。

表4にこれら分離株の薬剤感受性を示す。供試したS.O、S.Cはすべて感受性であった。しかし、詳細をみるとS.O(ストレプトマイシン)、S.C(クロラムフェニコール)それぞれ1株に、菌発育阻止ゾーンに耐性を獲得したコロニーの出現が

表3. 分離サルモネラの糖分解能

サルモネラ	供試 菌株数	糖													
		ラクトース	サッカロース	マンニト	スルシット	サリシン	アドニット	イパシット	ソルビット	アラビノース	ラフィノース	ラムノース	キシロース	トレハロース	セロビオース
S.O(ヒト)	15	0*	0	15	15	2	2	1	2	2	0	15	15	15	15
S.O(イカ)	14	0	0	14	14	5	5	2	7	5	0	14	14	14	14
S.C(ヒト)	2	0	0	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2
S.C(イカ)	10	0	0	10	10	8	10	9	10	10	0	10	10	10	10

S.O: S.Oranienburg * : 糖分解性株数を示す

S.C: S.Chester

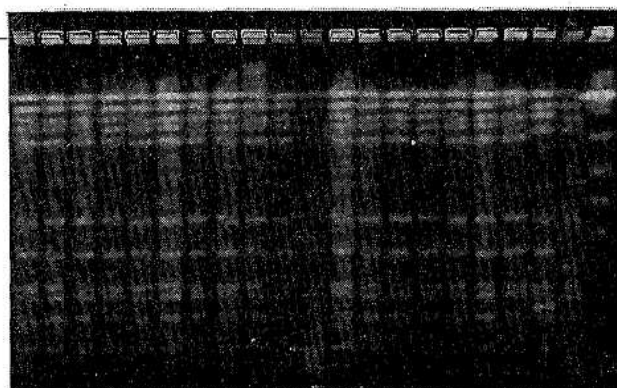
表4. 分離サルモネラの薬剤感受性

サルモネラ	供試菌株数	薬 剤										
		ABPC	CET	CEZ	CL	OP	GM	KM	MINO	NA	SM	TC
S.O	28	28*	28	28	28	28	28	28	28	28	28(1)	28
S.C	12	12	12	12	12	12(1)**	12	12	12	12	12	12

S.O: S.Oranienburg * : 感受性を示した菌株数

S.C: S.Chester () : 耐性コロニー出現を認めた菌株数

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M



Kb

1 ~ 11 患者分離株

8 川崎市患者分離株

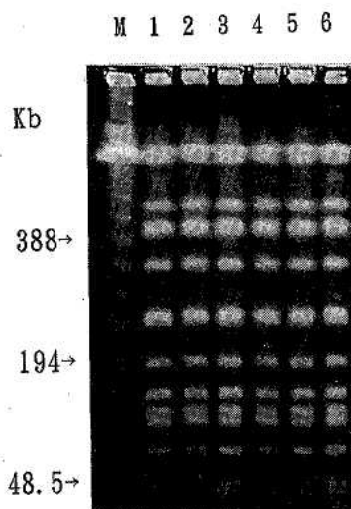
12 ~ 17 イカ製品分離株

←450 18 1980年ヒト分離株

19, 20 1983年ヒト分離株

←225 M マーカー

図1. S. OのPFGEパターン(BInI)



M マーカー

1, 2 患者分離株

3 ~ 6 イカ製品分離株

図2. S. CのPFGEパターン(BInI)

みられた。

分離株についてDNAをBln Iで切断し、PFGEを行い、その泳動パターンを比較した(図1.2)。S.Oについては、1999年患者分離11株(内1株は川崎市患者分離)、1980年ヒト分離1株、1983年ヒト分離2株の計14株について比較を行った。DNA切断パターンは1983年2株を除くすべての株で同じであった。ここには示さなかったが、他の制限酵素で処理後のPFGEパターンもすべて一致していた。1983年に分離された2株については、450 Kbと100Kb付近で1999年分離株との間に相違が見られたが、内1株(レーン20)のパターンは今回の食中毒分離株に似ていた。S.Cについてもヒトおよびイカから分離されたすべての株が同じパターンを示した。

これらの結果から、1999年3月～5月に分離されたS.OおよびS.Cを原因とする下痢症は、そのほとんどがイカ菓子を原因としたdiffuse outbreakであったと考えられた。われわれは県内におけるヒトから分離されたサルモネラを収集し、血清型等について調査し、その動向を監視している[3]。今回のdiffuse outbreakについて、川崎市での事件の情報が通知される前に、富山県におけるS.Oの分離数の増加に注目し、何らかの

汚染食品の存在を疑っていた。このような散发下痢症の患者に対する喫食調査等から、原因食品を究明するのは容易ではない。しかし、食品等が広く流通する現在、今回の事件をはじめ、1998年におきたイクラによるO157事件[5]のような、広域的なdiffuse outbreakが今後増加すると思われる。diffuse outbreakの発生を防ぐためには、散发型食中毒の動向を監視することが重要である。

文 献

1. 厚生省保健医療局食品課, 食品衛生研究(2000). 50, 7-15.
2. 国立感染症研究所編, 病原微生物検出情報(1999). 20, 6-8.
3. 磯部順子, 田中大祐, 細呂木志保, 井山洋子(1996). 富山県衛生研究所年報, 19, 111-116.
4. J. TERAJIMA, A. NAKAMURA, AND H. WATANABE (1998). Epidemiol.Infect, 120, 223-229.
5. 国立感染症研究所編, 病原微生物検出情報(1998). 19, 176.

漁港の腸炎ビブリオ実態調査について (平成11年度)

細呂木志保 平本裕子 田中大祐
磯部順子 山川清孝 刑部陽宅
北村 敬 山下志をり¹ 富田良一¹

Vibrio parahaemolyticus Surveillance at
Fishing Ports in Toyama Prefecture

Shiho HOSOROGI, Yuko HIRAMOTO, Daisuke TANAKA,
Junko ISOBE, Kiyotaka YAMAKAWA, Yotaku GYOBU,
Takashi KITAMURA, Shiworu YAMASHITA¹ and Ryouichi TOMITA¹

平成3年以降、減少傾向にあった腸炎ビブリオ食中毒が、近年再び増加している。平成11年7、8月には、全国的に大規模な食中毒事例が相次ぎ、魚介類による腸炎ビブリオ食中毒発生防止の徹底が厚生省より通知された。

県厚生部では、腸炎ビブリオの生態やその汚染実態を知り、食中毒防止に役立てるため、昭和54年より市販魚介類の調査を実施してきた。さらに、平成8年度からは「VP（腸炎ビブリオ）マリン実態調査」として県内4カ所の漁港の海水、海泥中の腸炎ビブリオの定量調査を行っている。ここでは平成11年の調査結果を報告する。

材料および方法 調査地点：県内の生地、魚津、新湊、氷見漁港を定点とした。調査期間：平成11年6月28日から10月4日までの間、隔週ごとに調査を実施した。新湊漁港においては、さらに平成11年11月から平成12年3月まで月1回ずつ調査を継続した。検体の採取：前報[1]に従った。腸炎ビブリオ数および*Vibrio alginolyticus*数の測定：前報[1]に従った。耐熱性溶血毒(TDH)産生性腸炎ビブリオO3:K6の分離：前報[2]に従っ

た。パルスフィールドゲル電気泳動：前報[3]に従った。制限酵素処理には、Not Iをプラグあたり10単位で使用した。電気泳動は、電圧200V、12℃、スイッチングタイム4から8秒で9時間、8から50秒で13時間で行った。

結果および考察 平成11年6月後半から10月前半の間、定点漁港内の腸炎ビブリオ数は海水100mlあたり3未満から 6.4×10^2 、海泥100gあたり30未満から 3.8×10^3 の間を変動した(表1)。平成8～10年には、菌数が最も多くなる8月から9月に、海水では 10^1 台、海泥では 10^2 台が多い傾向であったが、平成11年はどの漁港でも腸炎ビブリオの菌数が少ない傾向であった。また、前報[4]では、平成8年から10年までの調査より、その年の6、7月の漁港海水中的菌数と、県内の腸炎ビブリオ食中毒発生件数には関連性があると示唆したが、平成11年の結果はこれを支持し、6月から10月の期間を通して菌数が少なく、食中毒発生件数も2件(8、9月に各1件)と少なかった。

腸炎ビブリオを定量する際に、TCBS寒天培地上で観察される黄色のコロニーを*Vibrio alginolyticus*疑いとして菌数を算出している。

表1. 漁港における腸炎ビブリオ調査結果

漁港	6月28日	7月12日	7月26日	8月 9日	8月23日	9月 6日	9月20日	10月 4日	
生地	海水	3*	<3	4.3×10	2.9×10	4.3×10	6.4×10 ²	2.3×10	4.3×10
	O3:K6**	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陰性
	海泥	4.0×10	<30	7.0×10	1.5×10 ²	1.1×10 ²	3.6×10 ²	2.4×10 ³	3.8×10 ³
	気温(℃)	22	21	33	38	33	24	27	22
	水温(℃)	18	18	22	24	22	25	21	18
魚津	海水	7	2.3×10	9.3×10	9.3×10	2.9×10	9.3×10	4	4.3×10
	O3:K6	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	海泥	4.3×10	1.5×10 ²	2.9×10 ²	2.9×10 ²	1.4×10 ²	9.3×10 ²	3.8×10 ²	4.3×10 ²
	気温(℃)	26	26	36	36	33	25	26	22
	水温(℃)	21	22	26	28	29	25	24	23
新湊	海水	4	4.6×10 ²	7	9.3×10	2.9×10	2.4×10	4.6×10 ²	4.6×10 ²
	O3:K6	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	海泥	3.8×10 ²	<30	9.3×10 ²	2.3×10 ²	<30	2.3×10 ²	4.3×10 ²	1.2×10 ³
	気温(℃)	20	25	31.2	34	28.5	26	26	19.5
	水温(℃)	21.5	23.5	28.5	32	28.8	25	25	24
氷見	海水	2.8×10	<3	2.1×10	3	1.1×10	9	9.3×10	4.6×10 ²
	O3:K6	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性
	海泥	4.3×10 ²	1.5×10 ²	7×10	4.3×10 ²	9×10	<30	1.5×10 ²	7.5×10 ²
	気温(℃)	24	26	31.2	35	28.4	23	28	19
	水温(℃)	20	24.5	28.0	32.5	29.8	22	25	22.5

* : 菌数はMPN(100 mlまたは、100 g中の最確数)により測定した。

** : 海水 1 ℓについてビーズ法による定性検査を実施した。

表2. 漁港における腸炎ビブリオ調査結果

漁港	11月 2日	12月 1日	1月11日	2月 7日	3月 7日
新湊	海水	9.2	9.3×10	<3	<3
	O3:K6	陰性	陰性	陰性	陰性
	海泥	3.8×10^2	1.6×10^2	7.0×10	2.3×10^2
	気温(°C)	17.8	14.0	7.0	5.5
	水温(°C)	18.5	17.5	10.5	9.5

* : 菌数はMPN(100 mlまたは、100 g中の最確数)により測定した。

** : 海水 1 ℓについてビーズ法による定性検査を実施した。

*Vibrio alginolyticus*の菌数は平成8～10年と比べ、大きな変化はみられなかった。

冬季の腸炎ビブリオの動態を確認するため、新湊漁港において平成11年11月から平成12年3月の間、同様の調査を継続した(表2)。海水からは12月上旬まで腸炎ビブリオが検出され、海泥からは11月から3月まで毎回検出可能であった(菌数は $7.2 \times 10 \sim 3.8 \times 10^3$ /100 ml)。腸炎ビブリオは、水温15℃以下では増殖しないため[5]、1月以降は海水から分離されなかったが、港内の海泥中には存在していることが確認された。

近年、腸炎ビブリオ食中毒が、再び増加している原因の一つは、血清型O3:K6による食中毒事例の増加であると考えられている[6]。この血清型は富山県内において、平成9年より食中毒事例に

みとめられ、以後、腸炎ビブリオ食中毒の半数以上を占めている。耐熱性溶血毒を産生する腸炎ビブリオを海水等の環境中から分離するのは従来、困難とされてきたが、腸管出血性大腸菌O157等の分離に利用されている免疫磁気ビーズ法を血清型K6に応用し、海水等からの分離を試みた。TDH産生性O3:K6株は、7月前半から10月前半までの期間内に、すべての定点において分離が可能であった(表1)。しかし、11月以降調べた新湊漁港においては、検出されなかった(表2)。O3:K6株が分離された時の腸炎ビブリオ総数は、1,000 mlあたり30未満から 6.4×10^3 の範囲であった。腸炎ビブリオの総数が増加する時、TDH産生性の腸炎ビブリオも増加すると思われる。腸炎ビブリオ数が1,000 mlあたり30未満でもTDH産生性のO3:K6が分離される例があったが、その理由についてはさらに検討する必要がある。

平成11年に海水から分離された腸炎ビブリオO3:K6と食中毒患者から分離されたO3:K6の染色体DNAをパルスフィールドゲル電気泳動により比較した(図1)。海水分離株はいずれも現れるバンドの差が1～2本以内の非常によく似たパター

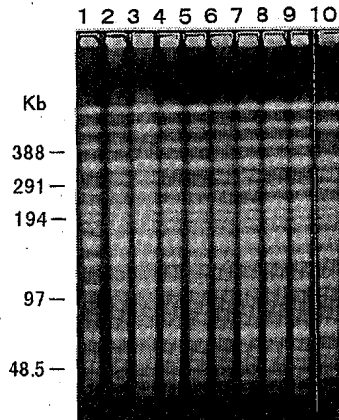


図1. 漁港海水および食中毒患者から分離された腸炎ビブリオO3:K6のNot I 切断PFGEパターン

レーン1～9：漁港海水由来株

レーン10：食中毒患者由来株

ンを示した。患者由来株は、そのうちのひとつと同一であった。しかし、この両者の関連については不明である。国内と東南アジアで分離されるO3:K6株は同一のクローンであることが示唆されており[6,7] 県内においても、同様の菌が広く環境や魚介類に分布していたと考えられる。

今後、漁港の海水中における腸炎ビブリオの動態と食中毒発生との関連をさらに明らかにするため、調査を継続するとともに、食中毒からの分離が増加している血清型O3:K6, O4:K68等の環境

中における生態を調査することが必要と思われる。

謝辞：本調査にご協力いただいた富山県薬務食品課および各保健所の関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 細呂木志保, 田中大祐, 平田清久, 磯部順子, 刑部陽宅, 城石将幸, 長沢憲嗣(1997). 富山衛研年報, 20, 184-186.
2. 刑部陽宅, 細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 北村敬 (2000). 日食微誌, 17, 5-10
3. 刑部陽宅, 細呂木志保, 島田俊雄 (1998). 感染症学雑誌, 72, 575-584.
4. 細呂木志保, 田中大祐, 平田清久, 磯部順子, 刑部陽宅, 道谷真由美, 富田良一 (1999). 富山衛研年報, 22, 186-189.
5. 赤羽荘資 (1990). 腸炎ビブリオ第Ⅲ集 (三輪谷俊夫, 大橋誠監修), 56-69.
6. 国立感染症研究所編 (1999). 病原微生物検出情報, 20, 9-10.
7. Prasanta K.B., Suvobroto N., Rupak K.B., T. Ramamurthy, S.K.Bhattacharya, M.Nishibuchi, T.Hamabata, S.Yamasaki, Y.Takeda, and G.B. Nair (1999). J.Clin.Microbiol, 37, 2354-2357.

富山県における1999年の病原微生物検出情報

田中大祐 平本裕子 細呂木志保 磯部順子
山川清孝 刑部陽宅 北村 敬

Isolation of Pathogenic Bacteria in Toyama Prefecture in 1999

Daisuke TANAKA, Yuko HIRAMOTO, Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE,
Kiyotaka YAMAKAWA, Yotaku GYOBU, Takashi KITAMURA

富山県では12カ所の公立病院検査室、5カ所の保健所、および衛生研究所から毎月病原微生物検出情報を収集し、その集計を国立感染症研究所に報告している。

表1. 1) - 8) に1999年1月から12月までの県内の病原微生物検出情報の集計を分離材料別・菌種別に示す。保健所・衛生研究所からの情報はほとんどが糞便からの分離例であったが、それらを医療機関からの情報に含めて集計した。また、医療機関から分離された黄色ブドウ球菌について、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）の割合も示した。表中の○で囲んだ数字は、食中毒など同一フォーカスからの分離株が含まれていることを示し、() 内の数字は、海外旅行者分の再掲を示している。

糞便：分離株総数1,525株、前年比82%。最も多かったのは大腸菌の583株で、前年比84%であった。腸管出血性大腸菌は38株で、内訳は血清型O157が20株、O26が18株であった。次に多いのは黄色ブドウ球菌で前年と同じ545株（そのうちMRSAは55%）であった。サルモネラは141株で前年比120%と増加しており、特にO9（*S. Enteritidis*など）が全体の44%と高率であった。カンピロバクターは134株で前年並であった。腸炎ビブリオは94株で前年比31%と減少し、本菌による食中毒も昨年の11件に比べ今年はわずか2件であった。

2類感染症では、赤痢菌が3株分離され、すべて*S. sonnei*であった。2株は海外渡航歴のない患者、1株はインド旅行歴のある患者から分離された。

穿刺液：分離株総数270株、前年比101%。黄色ブドウ球菌（MRSAが60%）、大腸菌、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌などが多く分離された。

髄液：分離株総数13株、前年比108%。肺炎球菌、黄色ブドウ球菌（MRSAは60%）などが分離された。

血液：分離株総数525株、前年比111%。コアグラーゼ陰性ブドウ球菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌（MRSAは56%）が多く分離された。

咽頭および鼻咽喉：分離株総数1,203株、前年比95%。インフルエンザ菌、A群溶レン菌、肺炎球菌が分離された。

喀痰、気管吸引液および下気道：分離株総数6,626株、前年比120%。黄色ブドウ球菌（MRSAは67%）、緑膿菌、肺炎桿菌が特に多く、次にインフルエンザ菌、肺炎球菌、B群溶レン菌などが多く分離された。

尿：分離株総数7,605株、前年比122%。尿は最も分離株数が多い分離材料であった。大腸菌、腸球菌、緑膿菌、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌などが特に多かったが、黄色ブドウ球菌（MRSAは68%）、肺炎桿菌、*Candida albicans*なども多かった。

陰部尿道頸管擦過（分泌）物：分離株総数2,312

表1. 月別・菌種別の病原微生物検出状況(1999年)

1) 分離材料: 糞便

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Salmonella Typhi													
Salmonella Paratyphi A													
Salmonella O4	1	1	2	6	3	1	2	11	5	3		1	36
Salmonella O7			3	10	3	3		6	1	1	1		28
Salmonella O8					1			2					3
Salmonella O9	6	1	1	1	1	1	2	10	(20)	11	7	1	62
Salmonella その他						1		2	3	1	3		10
Salmonella 群不明	1		1										2
Yersinia enterocolitica	1		1					2					4
Y. pseudotuberculosis													
Vibrio cholerae O1													
Vibrio cholerae O139													
V. cholerae O1、O139以外													
Vibrio parahaemolyticus							3	(55)	(31)	5			94
Vibrio fluvialis							1		1				2
Vibrio mimicus													
Aeromonas	1				2	1	4	3	5	1		2	19
Plesiomonas shigelloides													
Campylobacter	2	7	5	10	13	18	26	13	7	15	12	6	134
Staphylococcus aureus	40	33	45	43	50	48	41	50	43	30	62	60	545
Clostridium perfringens													
Clostridium botulinum													
Bacillus cereus													
Entamoeba histolytica													
Escherichia coli 腸感染性													
" 腸炎菌	4	2	1	2	1	2	2	2		1	2	1	20
" 病原大腸菌血清型	24	26	30	24	40	(50)	37	57	30	(20)	(37)	31	406
" EHEC/VTEC				1	1	8	1	4		13	10		38
" その他・不明	8	8	5	5	5	6	8	12	9	14	23	16	119
Shigella					1	1				1(1)			3(1)
合 計	88	78	94	102	121	140	127	229	155	116(1)	157	118	1525(1)

注: ()内は海外旅行者分再掲。○で囲んだ数字は同一フォーカスからの分離株を含む。

2) 分離材料: 穿刺液(胸水、腹水、関節液など)

Escherichia coli	2	4	4	7	2	9	5	2	4	9	3	6	57
Klebsiella pneumoniae	1	5	3	1	3	4	5	9		3	4	3	41
Haemophilus influenzae													
Neisseria meningitidis													
Pseudomonas aeruginosa	4					4	3	6	4	2	3	6	32
Mycobacterium spp.													
Staphylococcus aureus	6	5	5	4	7	7	14	5	7	8	3	4	75
Staphylococcus, コリネバクテリウム	3	2	8	4	3	3	5	6		3	5	9	51
Streptococcus pneumoniae													
Anaerobes	2			1		6	2			1	2		14
Mycoplasma pneumoniae													
合 計	18	16	20	17	15	33	34	28	15	26	20	28	270

平成12年10月1日

3) 分離材料：髄液

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Escherichia coli													
Haemophilus influenzae			1										1
Neisseria meningitidis													
Listeria monocytogenes													
Staphylococcus aureus				1	2	2							5
Streptococcus, B			1										1
Streptococcus pneumoniae	1	2		1	1			1					6
合 計	1	1	2	2	3	2	0	1	0	0	0	0	13

4) 分離材料：血液

Escherichia coli	9	6	11	23	14	9	9	14	7	9	10	11	132
Salmonella Typhi													
Salmonella Paratyphi A													
Salmonella spp.				1				1			3		5
Haemophilus influenzae								1					1
Neisseria meningitidis													
Pseudomonas aeruginosa	3	4	4	3	1	4	4	1	5	7	7	9	52
Staphylococcus aureus	7	9	7	9	8	8	7	14	14	15	11	12	121
Staphylococcus, コアラーゼ陰性	13	22	5	10	6	9	19	27	28	21	9	17	186
Streptococcus, B			3					1		1		1	6
Streptococcus pneumoniae	1	3		2	5		1				2		14
Anaerobes	2			1		2			1		2		8
合 計	35	44	30	49	34	32	40	59	55	53	44	50	525

5) 分離材料：咽頭および鼻咽喉からの材料

Bordetella pertussis													
Haemophilus influenzae	42	41	68	46	48	43	42	37	18	24	40	40	489
Neisseria meningitidis													
Streptococcus, A	39	58	68	39	32	34	15	10	18	24	34	34	405
Streptococcus pneumoniae	18	19	16	18	37	28	24	18	18	29	42	42	309
C. diphtheriae													
合 計	99	118	152	103	117	105	81	65	54	77	116	116	1203

6) 分離材料：喀痰、気管吸引液および下気道からの材料

M. tuberculosis	4	5	6	8	1	4	6	6	4	7	2		53
Klebsiella pneumoniae	93	60	69	70	71	85	85	107	114	109	84	69	1016
Haemophilus influenzae	74	45	60	58	63	59	72	37	29	25	32	31	585
Legionella pneumophila													
Pseudomonas aeruginosa	126	115	149	132	110	117	144	133	126	141	140	125	1558
Staphylococcus aureus	222	253	285	257	197	199	205	202	214	201	247	222	2704
Streptococcus, A	5	2	6	1	7	1	3		1	2	1	3	32
Streptococcus, B	10	7	22	16	19	23	15	16	17	23	21	18	207
Streptococcus pneumoniae	60	51	47	37	38	38	43	27	29	39	30	31	470
Anaerobes			1										1
Mycoplasma pneumoniae													
合 計	594	538	645	579	506	526	573	528	534	547	557	499	6626

7) 分離材料: 尿

菌 種 ・ 群 ・ 型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
<i>Escherichia coli</i>	149	118	156	174	163	183	197	225	190	151	154	139	1999
<i>Enterobacter</i> spp.	19	19	21	18	20	28	19	31	32	21	27	19	274
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	22	45	47	31	31	42	61	64	43	58	45	529
<i>Acinetobacter</i> spp.	9	8	3	6	6	6	11	13	12	12	6	8	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97	78	84	78	68	87	102	124	110	107	92	76	1103
<i>Staphylococcus aureus</i>	48	42	57	61	56	57	50	56	55	48	62	55	647
<i>Staphylococcus</i> , コアグラーゼ陰性	49	82	97	70	86	85	101	136	109	93	102	83	1093
<i>Enterococcus</i> spp.	106	88	127	105	116	108	131	127	160	109	91	90	1358
<i>Candida albicans</i>	30	32	57	48	42	39	57	47	42	46	38	24	502
合 計	547	489	647	607	588	624	710	820	774	630	630	539	7605

8) 分離材料: 陰部尿道頸管擦過(分泌)物

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		1	1	2	2	4	2	6	5	4		3	30
<i>Streptococcus</i> , B	28	40	51	33	37	45	55	51	64	43	61	58	566
<i>Chlamydia trachomatis</i>	10	10	5	12	6	9	10	13	10	9	7	6	107
<i>Ureaplasma</i>					8								8
<i>Candida albicans</i>	94	92	134	120	125	133	142	164	154	127	156	108	1549
<i>Trichomonas vaginalis</i>	3	3	1	2	1	5	3	3	5	1	4	22	52
合 計	135	146	192	169	179	196	212	237	238	183	228	197	2312

株, 前年比127%. 特に*Candida albicans*が多く,
 その他にB群溶連菌などが分離された. なお,
Chlamydia trachomatis, *Trichomonas vaginalis*

は抗原検出による.

謝辞: 調査に協力していただいた公立病院と保健
 所の検査担当各位に感謝致します.

ワイン中残留農薬のGC/MSによる確認

齊藤 行雄 山本 敦 小玉 修嗣 松永 明信

Confirmation of Pesticide Residues in Wines by GC/MS

Yukio SAITO, Atsushi YAMAMOTO,
Shuji KODAMA and Akinobu MATSUNAGA

最近のワインブームにより外国産ワインなどが大量に消費されている。ワインからは抗アンドロゲン作用のあるビンクロゾリン[1]や、同じジカルボキシイミド系殺菌剤のプロシミドン、イプロジオンなど[2-4]の検出例もあり、アルコール飲料中の農薬残留実態の把握は重要である。

著者らは、前報[5]で上記の農薬などについて、昇温プログラム気化 (PTV) 大量注入法を用いたGC-ECDにより、アルコール飲料中の農薬迅速分析法を報告した。今回は、前報[5]でワインから検出されたジカルボキシイミド系殺菌剤についてGC/MSによる確認を行った。

材料と方法： 試料は、前報[5]で農薬が高濃度で検出された赤ワインNo.1, No. 2 及び白ワインNo. 9, No.10を用いた。

試薬、器具及び試験溶液の調製などは、前報[5]に従った。

GC/MS測定条件は、GC/MS QP-5000 (島津製作所製) にワークステーションCLASS-5000 (Ver.2) 及びオートサンプラーAOC-20i/AOC-20s (各島津製作所製) を装備した機器を用いた。

注入口温度：80℃ (0.1min) →100℃/min→230℃ (28.4 min)

カラム：HP-5MS (Hewlett Packard社製, 0.25mm i.d.×10m, 膜厚0.25μm)

オープン温度：50℃ (2.0min) →8℃/min→240℃ (4.25min)

カラム流量：He, 2.2mL/min, 全流量；20mL/min

インターフェース温度：250℃

イオン源：EI, イオン化電圧：70eV

検出器電圧：1.5kV

試料注入量：スプリットレス, 選択イオンモニタリング (SIM) モード1μL, スキャンモード2μL

結果及び考察：GC-ECDでビンクロゾリン, プロシミドン及びイプロジオンが検出された試験溶液[5]を0.1mL (150倍) に濃縮し, GC/MSのスクリーンモードによる農薬の確認試験を実施した。マススペクトルによる確認ができた農薬は, 赤ワインNo. 1 及びNo. 2 のプロシミドン, 白ワインNo. 9 及びNo.10のイプロジオン, 白ワインNo. 10のプロシミドンであった。白ワインNo.10の確認データ例をFig. 1 に示した。しかし, 濃縮液中の農薬濃度が低濃度 (後述のSIM測定から1 ppm以下のもの) の試験溶液では, マススペクトル及びマスクロマトグラムが得られなかった。

そこで, SIMモードを用いて農薬の確認と定量を行った。実施例として, 赤ワインNo. 2 のGC/MSによるSIMクロマトグラムをFig. 2 に示した。試験溶液についても上記3農薬の標準物質と同じ保持時間帯にピークが出現した。これらのピークについては, 各農薬に特有の選択イオンによるピークの検出及びイオン強度比の一致がみられたことから, それぞれGC-ECDにおける検出農薬

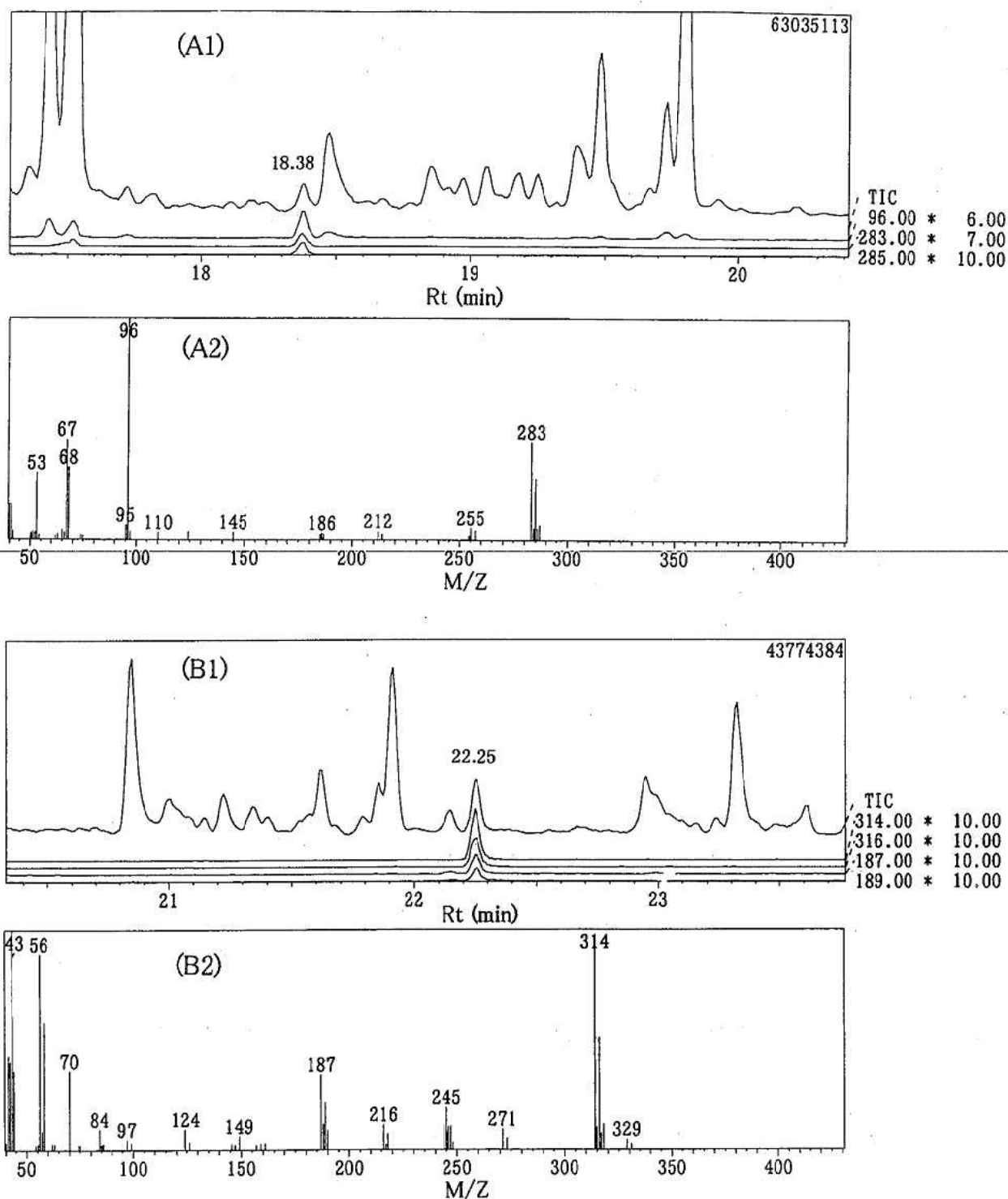


Fig. 1. Mass chromatograms of procymidone at 18.38min and iprodione at 22.25min, and mass spectra of those pesticides in white wine extract(No.10)by GC/MS

(A1),(A2);Procymidone, (B1),(B2);Iprodione

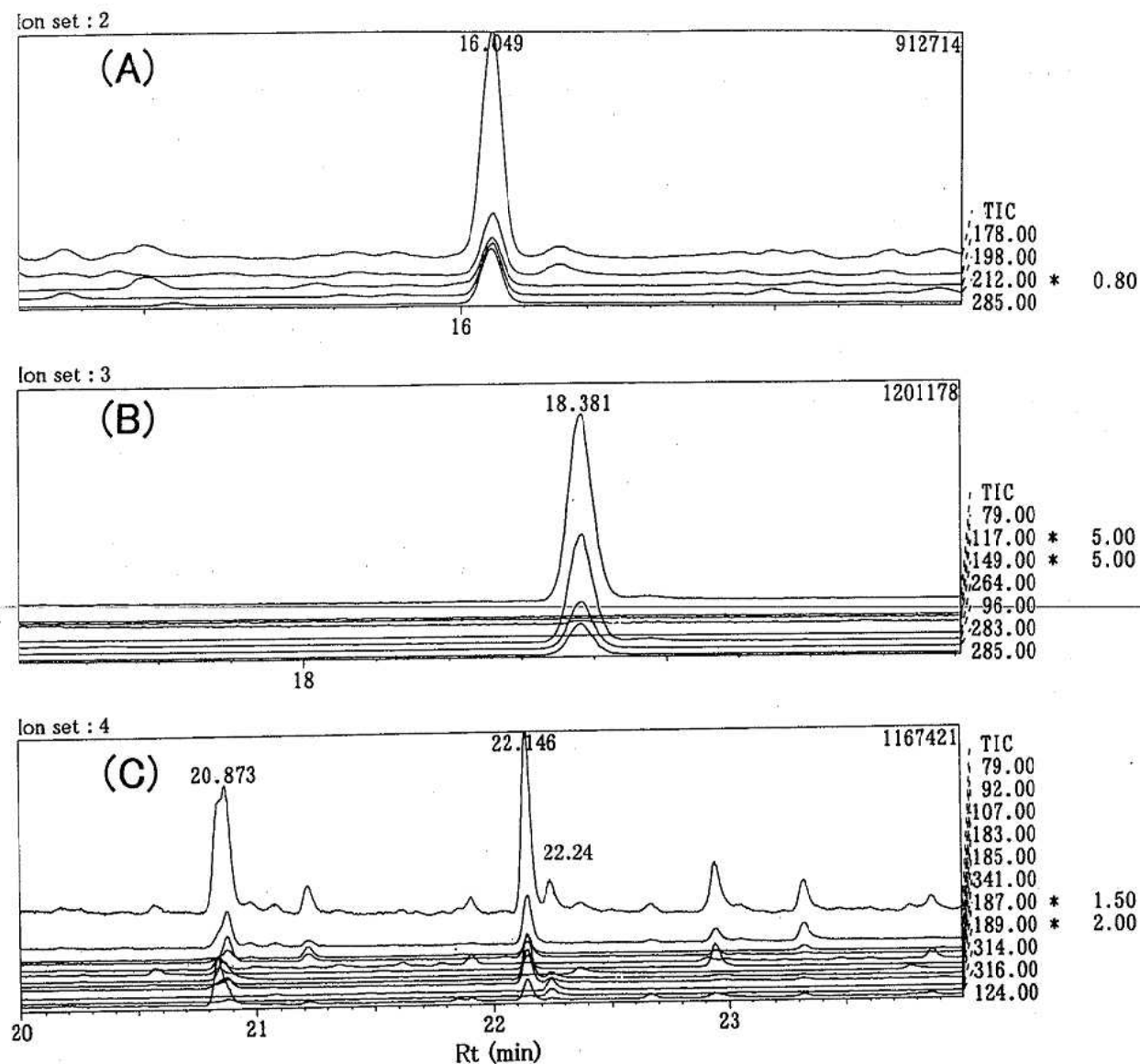


Fig. 2. SIM chromatograms of dicarboxyimide fungicides in red wine extract(No.2)by GC/MS

(A);Vinclozolin, Rt=16.05min, monitor ion M/Z=178, 198, 212, 285

(B);Procymidone, Rt=18.38min, monitor ion M/Z=96,283,285

(C);Iprodione, Rt=22.24min, monitor ion M/Z=187,189,314,316

Three peaks at 16.05min, 18.38min and 22.24min were obtained the same as monitor ion peaks in the standard solution containing vinclozolin, procymidone and iprodione

Table 1. Analytical Result of Pesticide Residues in Wines by GC or GC/MS(SIM)

Pesticide	(ng/g)							
	Red wine				White wine			
	No.1		No.2		No.9		No.10	
	GC	GC/MS	GC	GC/MS	GC	GC/MS	GC	GC/MS
Vinclozolin	0.5	0.8	2.2	2.6	—	—	—	—
Procymidone	51.1	55.0	55.5	39.0	—	—	6.7	8.3
Iprodione	—	—	14.7	9.8	126	80.0	32.5	32.4
Iprodione Met.	—	—	—	—	10.6	6.5	—	—

— ; not detected

[5]の確認ができた。Table 1にGC-ECD及びGC/MSによる定量結果を示した。GC/MSによる定量は少量溶媒（アセトン0.1mL）での農薬溶解のため、正確性に欠けるが、ビンクロゾリン及びプロシミドンではGC-ECDによる測定数値[5]にほぼ一致した数値が得られた。赤ワインNo. 2と白ワインNo. 9におけるイプロジオン数値では、GC/MS測定値が低い数値を示した。

文 献

1. Gray, L.E. Jr., Ostby, J.S., Kelce, W.R. (1994). Toxicol. Appl. Pharmacol., 129, 46-52.
2. Dejonckheere, W., Steurbaut, W., Drieghe, S., Verstraeten, R., Braeckman, H. (1996). J. AOAC Int., 79, 97-110.
3. Hyötyläinen, T., Jauho, K., Riekkola, M.-L. (1998). J. Chromatogr. A, 813, 113-119.
4. Ceschi, M., De Rossa, M., Jäggi, M. (1994). Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 85, 579-593.
5. 齊藤行雄, 山本 敦, 小玉修嗣, 大戸幹也, 大浦 敏, 松永明信(2000). 食衛誌投稿中.

平成11年度食品衛生検査（理化学検査区分）の 精度管理調査について

大戸 幹也 松永 明信 尾崎 一郎

Precision Control of Benzoic Acid, Sorbic
Acid, p-Hydroxybenzoic Acid and Sodium
Saccharin in Food

Mikiya OHTO, Akinobu MATSUNAGA
and Ichiro OZAKI

平成7年の食品衛生法の一部改正により、食品衛生検査施設には検査業務管理基準（GLP）が適用された。これにより、保健所、食肉検査所及び衛生研究所においても、GLP基準を満たすために精度管理を行うことになった[1]。精度管理は、外部精度管理と内部精度管理に分けられ、食品衛生検査施設ではこれらを両方行うことになっている。外部精度管理については厚生省が認めた機関を利用して実施しているが、内部精度管理（以下精度管理）については、検査員の人数、検査方法に関する情報及び解析件数等の不足から各検査施設単独では対応できないことも想定される。そこでこれらの検査機関に対して技術研修業務を行っている当所が中心になり、各検査機関自らが日常の精度管理とは別に、検査方法等を統一して精度管理調査を行うことになった。当所は、試料や検査方法の選定、各機関報告書の解析、評価等を行ったので、その概要を報告する。

調査方法：

- (1) 実施期間：平成11年11月30日～12月17日
- (2) 対象：県内で食品理化学検査を行う保健所、食肉検査所及び衛生研究所。
- (3) 試料：こしあん（平成11年11月30日配布）
- (4) 検査項目：安息香酸（BA）、ソルビン酸（SOA）、パラオキシ安息香酸（PHBA）及びサッカリ

ンナトリウム（SA）の4成分

(5) 検査方法：BA；0.2g/kg、SOA；0.5g/kg、PHBA；パラオキシ安息香酸として0.1g/kg（パラオキシ安息香酸イソプロピル使用）及びSA；0.15g/kgの濃度になるように、測定機関が配布試料に添加し、溶媒抽出－高速液体クロマトグラフ法によって5回の併行測定を実施し、回収率を求める方法で行った。

(6) 測定値等：各検査項目について、測定値、回収率、検量線及びチャート等データ類を含む検査実施の記録等を平成11年12月27日までに当所に送付することとした。

結 果：

(1) BA：各機関からの報告を集計し、まとめてTable 1に示した。測定機関数は5で、測定機関の平均回収率の最大値は107.30%、最小値は93.50%であった。全機関の回収率平均値±標準偏差（SD）は、98.94±5.45%、変動係数（CV）は、5.51%であった。また機関内変動係数は0.4～4.4%の範囲にあった。検査実施標準作業書（検査SOP）では、回収率の承認要件として回収率範囲を80～110%に設定している。A機関の回収率は、SOP上再測定が必要となる110%を超える結果は無かったが5回全てが105%を超えていた。E機関の変動係数は若干高い傾向であった。

Table 1. Analytical Results of Benzoic Acid (BA)

Laboratory	Recovery (%) average (n = 5)	C.V.(%)	Range (%)
A	107.30	1.4	4.0
B	100.60	1.1	2.5
C	94.90	1.1	2.6
D	98.40	0.4	1.0
E	93.50	4.4	9.5
Average	98.94	1.69	3.92
SD	5.45	—	—
CV%	5.51	—	—

Table 2. Analytical Results of Benzoic Acid (SOA)

Laboratory	Recovery (%) average (n = 5)	C.V.(%)	Range (%)
A	105.82	1.3	3.6
B	97.92	0.7	1.8
C	95.26	1.1	2.6
D	98.72	0.6	1.6
E	92.72	3.6	7.4
F	98.64	0.2	0.4
Average	98.18	1.26	2.90
SD	4.41	—	—
CV%	4.49	—	—

Table 3. Analytical Results of p-HydroxyBenzoic Acid (PHBA)

Laboratory	Recovery (%) average (n = 5)	C.V.(%)	Range (%)
A	100.56	1.2	3.4
B	93.34	1.7	4.0
C	95.12	0.8	1.8
D	98.52	1.2	2.9
E	93.60	3.4	6.7
Average	96.23	1.65	3.76
SD	3.18	—	—
CV%	3.31	—	—

Table 4. Analytical Results of Sodium Saccharin (SA)

Laboratory	Recovery (%) average (n = 5)	C.V.(%)	Range (%)
A	80.34	0.6	1.2
B	90.52	1.0	2.0
C	90.02	2.1	4.7
D	92.74	1.5	3.5
E	88.80	3.9	7.3
Average	88.48	1.82	3.74
SD	4.77	—	—
CV%	5.39	—	—

(2) SOA : 測定機関数は6で、測定機関の回収率平均値の最大値は105.82%、最小値は92.72%であった (Table 2)。全機関の平均値±標準偏差は、98.18±4.41%、変動係数は、4.49%であった。また機関内変動係数は、0.2~3.6%の範囲にあり、BAの結果と同様、E機関の変動係数が若干高い傾向であった。BAの結果と同様、A機関の回収率は他の5機関の回収率と比較すると若干高い傾向がみられた。

(3) PHBA : 測定機関数は5で、測定機関の回収率平均値の最大値は100.56%、最小値は93.34%であった (Table 3)。全機関の回収率の平均値±標準偏差は、96.23±3.18%、変動係数は、3.31%であった。機関内変動係数は、0.8~3.4%の範囲にあった。E機関の変動係数が若干高い傾向であった。

(4) SA : 測定機関数は5で、測定機関の回収率平均値の最大値は92.74%、最小値は80.34%であった (Table 4)。全機関の回収率の平均値±標準偏差は、88.48±4.77%、変動係数は、5.39%であった。機関内変動係数は、0.6~3.9%の範囲にあった。A機関の回収率は低かった。E機関の変動係数が若干高い傾向であった。

考 察 :

(1) 回収率 : 検査項目別、機関別回収率をまとめてFig. 1に示した。全機関の検査項目全ての回収率は80~110%の範囲にあり、検査SOPが求めている結果承認要件を満たし、ほぼ良好な結果が得られた。

SAは他の成分に比べて水溶性が高いため、Fig. 1に見られるように、溶媒抽出法では他の成分と比べてやや回収率が低い傾向がみられた。

A機関の回収率は全項目で全機関平均値から最も外れており、BA、SOA、PHBAで高く、SAで低かった。この点については、関係記録から分析装置の測定条件設定には問題はなかった。今後は、①標準溶液の管理・使用方法、②定容操作の再確認、③過去の検査データ（ピーク応答値）との比較や④各4成分ピークの相対比較などを行って再検討する必要があると考えられた。

(2) 装置等測定条件及び前処理操作 : F機関のクロマトグラムのピークはブロードであった。ピーク理論段を計算すると700段 (F機関以外では5,000段程度) と小さかった。日常の検査では精度を向上させるために常にカラム交換等を含めた装置の点検が重要と考えられた。

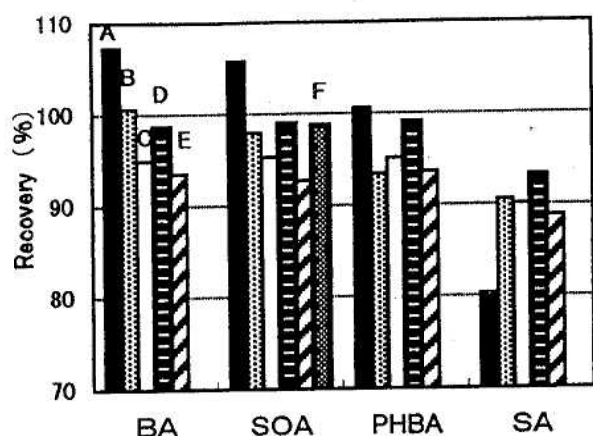


Fig. 1. Recoveries of BA, SOA, PHBA and SA

Laboratories(A~F) were the same as described in Table 1 ~ 4.

各機関の検量線溶液の直線性は、その相関係数がA機関のSAの0.995以外は全ての項目で0.999以上の原点を通る良好な直線性が得られた。また、検量線溶液の繰返し測定精度もほぼCV 1 %以内であり、装置の測定精度は高く良好であった。

次にこれと検体測定値の変動と比較すると、CVで1 ~ 2 %程度の差しか見られず、全ての機関で前処理が良好に行われたものと判断できた。

(3) 検査SOPの回収率による再検査基準の検討：
検査SOPでは、検査結果を承認する回収率範囲は80~110%としている。当所での本試験法による過去5年間の回収率（添加レベル；0.1~0.5g/kg，検査者；経験年数10年以上の二名，n=20）は、4成分が92.3~101.0%の範囲であった。一方、今回の調査では80.34~107.30%の範囲であり、範囲幅の差は8 %程度であった。検査者の習熟度、人数、検査環境、使用機械の性能等の因子を勘案しても、検査結果を承認する回収率範囲幅はもう少し狭く設定しても支障はないと考えられる。検査件数を増やし詳細な検討は必要であるが、今回の検査SOPにおける結果承認回収率はBA, SOA及びPHBAでは、90~110%，SAでは80~100%が妥当であると考えられた。

今後、本調査で得たデータは蓄積し、各種SOPの作成・変更に活用し、検査水準の向上に役立てたい。

文 献

1. 富山県厚生部長通知，薬食第1,229号，平成10年12月16日

平成11年度水道水質検査の精度管理事業について

健 名 智 子 高 柳 信 孝 松 永 明 信

The Results of External Quality Control of Potassium Permanganate Consumed and Nitrate-nitrogen in Water

Tomoko KEMMEI, Nobutaka TAKAYANAGI and
Akinobu MATSUNAGA

富山県水道水質検査精度管理実施要領に基づく精度管理が、平成11年度は過マンガン酸カリウム消費量、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の2項目について実施された。当所は配布試料の調製、参加機関の報告値の集計および解析を担当した。今回、その結果をまとめたので報告する。

調査方法

- (1) 実施時期：平成12年1月11日～1月21日
- (2) 参加機関：水道事業体2機関、水道用水供給事業体2機関、水道法第20条に規定する指定検査機関1機関、5保健所及び当所の計11機関で、県内の水道水質検査を実施する全機関が参加した。
- (3) 検査項目：過マンガン酸カリウム消費量、
硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素
- (4) 配布試料：過マンガン酸カリウム消費量測定用試料として、マンニトール5mg/L溶液を15L調製し、これを1Lポリ瓶に小分けして配布した。また、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素測定用試料として市販の2Lペットボトル入ミネラルウォーターを1本配布した。これら試料における過マンガン酸カリウム消費量の濃度範囲は1.0～10.0mg/L、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の濃度範囲は0.1～5.0mg/Lと明示した。また今回は標準原液等を配布せず、各機関が管理しているものを用いることとした。
- (5) 検査方法及び検査結果：検査は日常の検査業務と同じ方法を用い、5回の併行測定を行うこととした。検査結果は、過マンガン酸カリウム消費

量については小数点以下1桁で、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素については小数点以下2桁で記載することとした。なお、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の測定において、イオンクロマトグラフ法を用いる機関は硝酸性窒素、亜硝酸性窒素各々の、吸光光度法を用いる機関は硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素総量を報告することとした。

結 果

(1) 過マンガン酸カリウム消費量

各機関から小数点以下1桁で報告された5回の併行測定値より、平均値を小数点以下2桁まで求め、各機関の測定値とし、小さい方から順に並べTable1に示した。なお過マンガン酸カリウム消費量における検査機関番号は、過マンガン酸カリウム消費量に関する図表において統一した。11検査機関はすべて滴定法を用いており、測定値の平均値±標準偏差は 3.43 ± 0.692 mg/Lであった。この値からGrubbsの異常値検定(危険率5%)を行ったところ、棄却される機関はなかった。各機関内での併行測定における室内変動係数は1.5～4.9%であり、すべて判断基準である10%未満であった。全機関の測定値の変動係数(室間変動係数)は20.2%と10%を大きく上回っており、機関間のばらつきが大きかった。

過マンガン酸カリウム消費量の $\bar{x}$ -R管理図をFig.1に示した。すべての機関の測定値は平均値±2標準偏差の範囲内に収まっていた。R管理図においてUCL(上方管理限界)を超える機関は

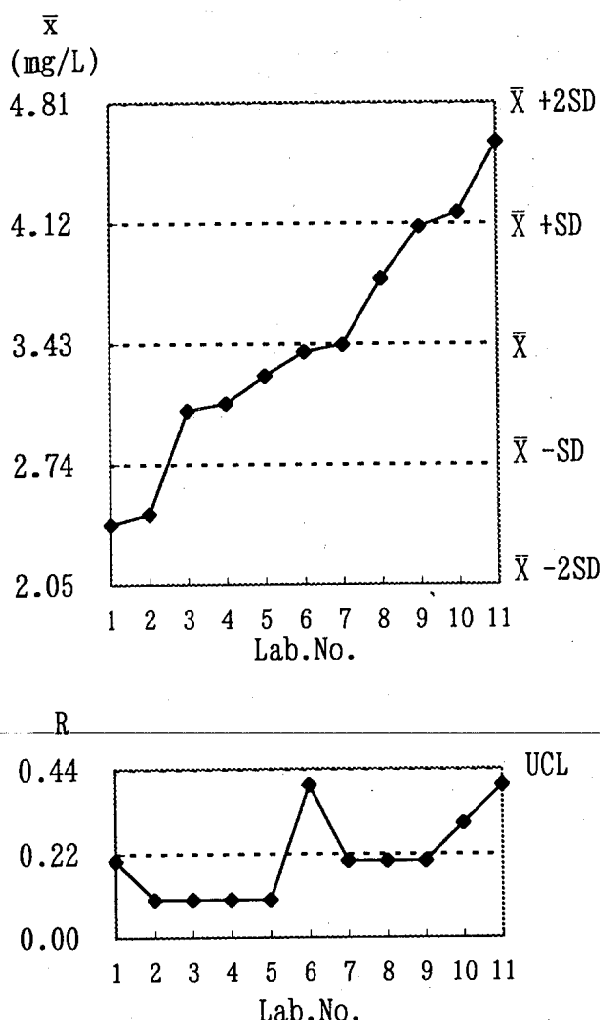


Fig.1. $\bar{x}$ -R Chart of Potassium Permanganate Consumed

$\bar{x}$: Average
SD : Standard Deviation
UCL : Upper Control Limit

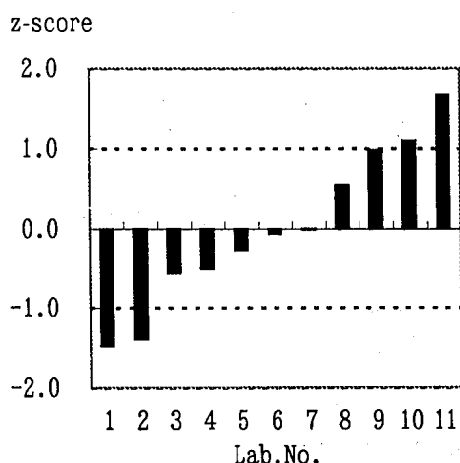


Fig.2. Z-Score Order of Potassium Permanganate Consumed

なかった。

過マンガン酸カリウム消費量における z スコアの順位を Fig. 2 に示す。すべての機関において、 $|z\text{-スコア}|$ はすべて 2 未満で、「満足」と評価された。

11 機関の平均値 3.43 mg/L を真の値と仮定し、回収率 (= 測定値 / 真の値) を求めると、Table 1 に示すとおり、良好と判断される 0.9~1.1 の範囲内に含まれた機関は 4 機関のみであった。

過マンガン酸カリウム消費量測定用検体はマンニトール 5 mg/L 溶液である。あらかじめマンニトールの 1 g/L 溶液を調製し、これを検体配布の 1 時間前に精製水で希釈した。この溶液の過マンガン酸カリウム消費量の値は、冷蔵庫保存で少なくとも 2 週間、変化がないことを当所の測定で確認している。

今回の過マンガン酸カリウム消費量の精度管理においては機関間のばらつきが大きかった。他県においても過マンガン酸カリウム消費量を水質検査精度管理の対象項目としており、報告された室間変動係数は 20.4% (愛知県 / 26 機関参加 / 水道水 / 平均値 1.36 mg/L) [1], 19.5% (山梨県 / 12 機関参加 / 水道水 / 平均値 1.09 mg/L) [2] 及び 28.0% (岡山県 / 11 機関参加 / グルコース水溶液 / 平均値 6.48 mg/L) [3] と大きい値を示していた。

過マンガン酸カリウムによる酸化反応は試験操作、特に加熱条件の影響を大きく受けると考えられる。そこで加熱条件として、5 回の併行測定における煮沸までの時間、煮沸用具及び煮沸用容器のサイズについて、各機関ごとに Table 2 に示す。煮沸までの時間は、各機関内での時間のばらつきが非常に小さかったにも関わらず、機関間では最短で 1 分 41 秒、最長で 6 分 59 秒とかなり異なることがわかった。加熱から煮沸までの時間と過マンガン酸カリウム消費量の関係について Fig. 3 に示す。煮沸までの時間が 3~4 分の機関が多かったがそれらの間でも過マンガン酸カリウム消費量の値はばらついており、煮沸までの時間と過マンガン酸カリウム消費量の間に関連関係は見られなかった。煮沸用具のなかでは、電熱器を使用している機関は煮沸までの時間が短く過マンガン酸カリウ

Table 1. Summary of Analytical results of Potassium Permanganate Consumed

Laboratory No.	Concentration (mg/L) Mean value of 5runs	CV(%)	Recovery (= Concentration/Average)
1	2.40	2.9	0.70
2	2.46	2.2	0.72
3	3.04	1.8	0.89
4	3.08	1.5	0.90
5	3.24	1.7	0.95
6	3.38	4.9	0.99
7	3.42	2.4	1.00
8	3.80	1.9	1.11
9	4.10	1.7	1.20
10	4.18	2.6	1.22
11	4.58	3.6	1.34
Number of lab.	11	11	11
Max(mg/L)	4.58	4.9	1.34
Min(mg/L)	2.40	1.5	0.70
Average(mg/L)	3.43	2.5	1.00
SD(mg/L)	0.692	1.01	0.202
CV(%)	20.2		20.2

Table 2. Analytical Conditions of Potassium Permanganate Consumed

Laboratory No.	Time for coming to boil (mm:ss)	Heater	Size of a Flask(ml)
	Mean value of 5runs	Range	
1	3:30	0:31	electric heater 1500W 200
2	3:03	0:10	gas burner 300
3	3:54	0:50	gas hot plate 200
4	2:16	0:15	electric heater 300
5	3:45	0:53	electric hot plate 300
6	6:59	0:50	electric hot plate 200
7	4:55	0:20	electric hot plate 200
8	5:54	0:30	electric hot plate 200
9	2:17	0:03	electric heater 1200W 300
10	1:41	0:15	electric heater 600W 500
11	3:16	0:28	electric heater 1200W 300

Potassium Permanganate Consumed (mg/L)

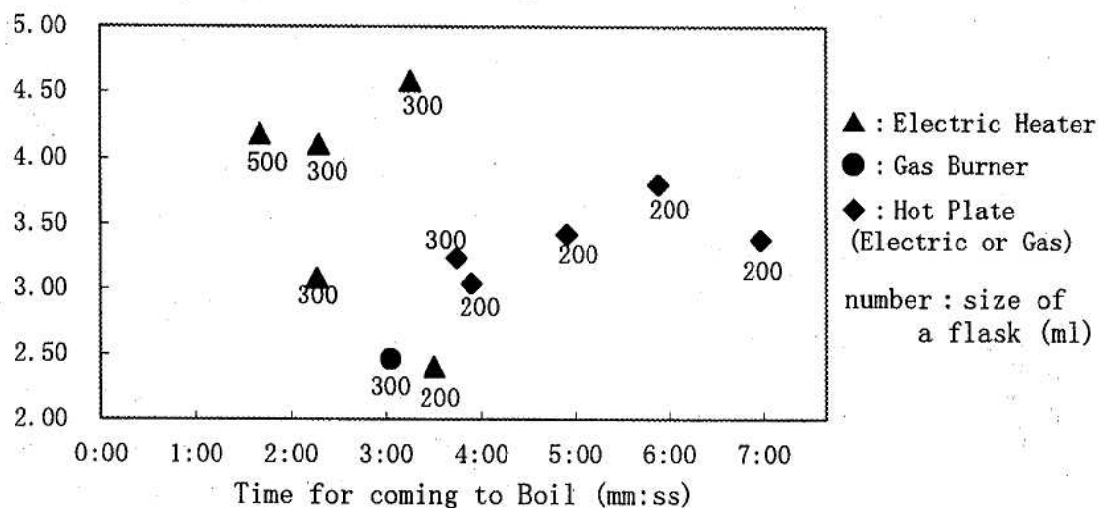


Fig. 3. Relation between Time for Coming to Boil and Potassium Permanganate Consumed

ム消費量の値の機関差が大きく、プレート板を使用している機関は煮沸までの時間が長く過マンガン酸カリウム消費量の値の機関差が小さかった。また、煮沸用容器のサイズが大きい方が煮沸までの時間が短かった。容器底の直径は、500mlサイズで約10.5cm、300mlサイズで約8.5cm、200mlサイズで約7.0cmであり、この容器の底面積の違いにより加熱効率が異なるためと考えられた。上水試験法(1993版)[4]には加熱条件として「5分間煮沸」しか記載されていないが、測定機関ごとの加熱条件の違いが過マンガン酸カリウム消費量の機関間のばらつきの大きな要因と考えられる。加熱条件として、この他に、「5分間煮沸」の程度や煮沸後シュウ酸ナトリウム溶液を加えた後過マンガン酸カリウム溶液で滴定する際の温度などもばらつきの要因と考えられる。

(2) 硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素

硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素については、11検査機関のうち1機関が2通りの方法を使用し報告したことから、12検査機関として統計処理を行った。このうち検査方法としてイオンクロマトグラフ法を用いた機関は9機関、吸光光度法を用いた機関

は3機関であった。なお亜硝酸性窒素の値は、イオンクロマトグラフ法を用いたすべての機関で検出限界以下と報告されたことから、以下、硝酸性窒素の値についての考察を行った。

各機関から小数点以下2桁で報告された5回の併行測定値より、平均値を小数点以下2桁まで求め、各機関の測定値とし、小さい方から順に並べTable 3に示した。なお硝酸性窒素における検査機関番号は、硝酸性窒素に関する図表において統一した。この硝酸性窒素における検査機関番号は、Table 1の過マンガン酸カリウム消費量のそれとは一致しない。

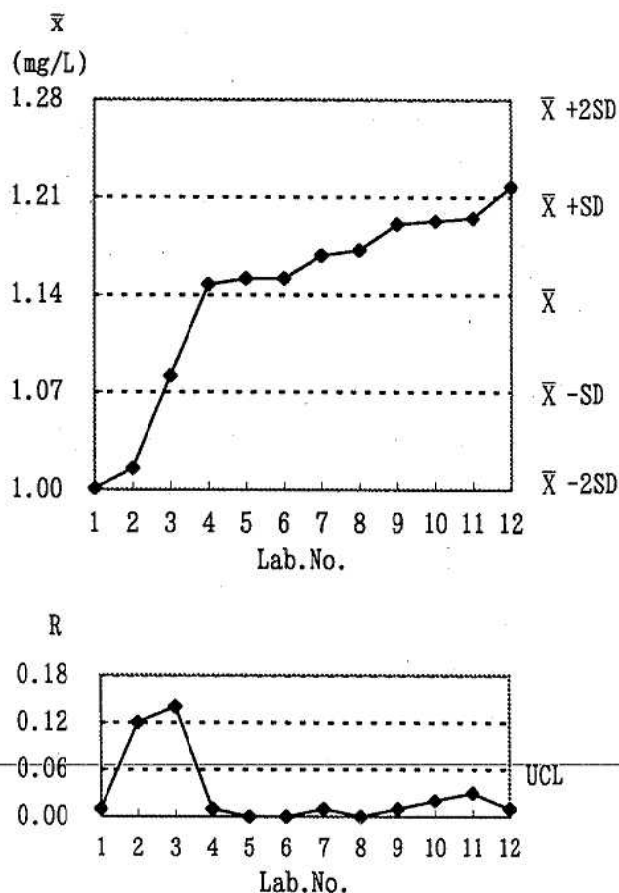
全機関の測定値の平均値±標準偏差は1.14±0.068mg/Lであり、この値からGrubbsの異常値検定(危険率5%)を行ったところ、棄却される機関はなかった。各機関内での併行測定における室内変動係数は、0.0~4.8%であり、すべて判断基準である10%未満であった。特にIC法を用いた機関では室内変動係数はすべて1.0%未満であった。全機関の測定値の変動係数(室間変動係数)は6.0%であって10%を下回っていた。

硝酸性窒素の $\bar{x}$ -R管理図をFig. 4に示した。すべての機関について、測定値は平均値±2標準

Table 3. Summary of Analytical Results of Nitrate-nitrogen

Laboratory No.	Method	Concentration (mg/L) Mean value of 5runs	CV(%)	Recovery (= Concentration/Average)
1	*	1.00	0.5	0.88
2		1.02	4.3	0.89
3		1.08	4.8	0.95
4	*	1.15	0.5	1.01
5	*	1.15	0.0	1.01
6	*	1.15	0.0	1.01
7	*	1.17	0.5	1.02
8	*	1.17	0.0	1.03
9	*	1.19	0.4	1.04
10	*	1.19	0.6	1.04
11		1.19	0.9	1.05
12	*	1.21	0.5	1.07
Number of lab.		12	12	12
Max(mg/L)		1.21	4.8	1.07
Min(mg/L)		1.00	0.0	0.88
Average(mg/L)		1.14	1.08	1.00
SD(mg/L)		0.068	1.65	0.060
CV(%)		6.0	—	6.0

* : Ion chromatography
no mark : Absorptiometry

Fig. 4. $\bar{x}$ -R Chart of Nitrate-nitrogen

$\bar{x}$: Average
SD : Standard Deviation
UCL : Upper Control Limit

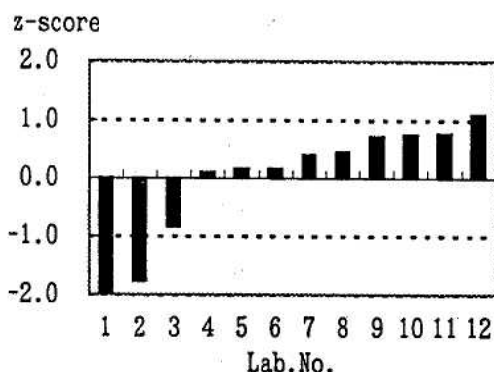


Fig. 5. Z-Score Order of Nitrate-nitrogen

偏差の範囲内に収まっていた。R管理図において、吸光光度法を用いたNo. 2 及びNo. 3 機関がUCL (上方管理限界) を超えていた。

硝酸性窒素におけるzスコアの順位をFig. 5 に示す。すべての機関において、| z-スコア | はすべて2未満で、「満足」と評価された。

測定値の平均値1.14mg/Lを真の値と仮定し、回収率を求めると、Table 3 に示すとおり、検査機関No. 1, 2 を除く10機関の測定値が良好と判断される0.9~1.1の範囲内に含まれた。

回収率が0.9~1.1の範囲をはずれた検査機関No. 1はイオンクロマトグラフ法を用いて測定を行っている。イオンクロマトグラフ法を用いた9機関の平均値±標準偏差は1.15±0.060mg/Lであり、この値よりGrubbsの異常値検定 (危険率5%) を行ったところ、検査機関No. 1の測定値は棄却された。検査機関No. 1はサプレッサ型イオンクロマトグラフを用い、ピーク面積より5点の直線検量線 ($r=0.996$) を作成して定量を行い、1.00 mg/Lという測定値を得ていたが、その送付データをもとに、5点の二次式検量線 ($r=1.000$) を作成して定量を行ったところ、1.15mg/Lという値を得た。イオンクロマトグラフ法においてピーク面積より検量線を作成する場合、直線、二次式のいずれを用いればより適合するかを、使用する装置の方式 (サプレッサ型あるいはノンサプレッサ型) の特性も考慮に入れて判断する必要がある。

吸光光度法を用いた検査機関No. 2, 及びNo. 3 はR管理図においてUCL (上方管理限界) を超えており、また検査機関No. 2は回収率が良好と判断される0.9~1.1の範囲をはずれていた。検査機関No. 2においては検量線の外挿による定量、また、検査機関No. 3においては検体の50ml比色管を用いての25倍希釈等、誤差を生む要因が指摘された。

考 察

今年度の精度管理結果として、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素については、ほとんどの機関で精度

平成12年10月1日

良い検査が行われており、2, 3の機関については、データ処理や実験操作上の問題点が指摘された。過マンガン酸カリウム消費量については、機関内でのばらつきは小さかったものの、機関間のばらつきが大きく、測定機関ごとの加熱条件の違いがその大きな要因と考えられた。

文 献

1. 平成5年度愛知衛研年報(1994),22,86.
2. 鷹野茂夫, 小林浩, 堀内雅人, 笹本順, 時田寛幸, 深澤喜延(1997). 山梨衛公研年報,41,1-7.
3. 山本弘捷(1999). 岡山県環境保健センター年報,23, 28-29.
4. 日本水道協会 (1993). 上水試験法,p107-108.

中国・内モンゴル自治区における フッ素暴露調査

新村哲夫 西野治身 田中朋子 中崎美峰子
伊木雅之¹ 梶田悦子² 劉 仲玉³
張 森 鏡森定信³ 毕 力夫⁴

Studies on Fluoride Exposure in Inhabitants of
Inner Mongolia, China

Tetsuo SHIMMURA, Harumi NISHINO, Tomoko TANAKA, Mineko NAKAZAKI,
Masayuki IKI, Etsuko KAJITA, Zhongyu LIU,
Miao Zhang, Sadanobu KAGAMIMORI and Lief BI

さきに西野らは、骨粗鬆症の予防因子を明らかにするため、ライフスタイルの異なる中国・内モンゴル自治区の閉経前の女性を対象に、各種骨代謝マーカーについて調査を行い、草原地区女性の骨代謝が亢進していることを報告した[1]。その原因を明らかにするため、中国・内モンゴル自治区住民を取り巻く環境要因を探る必要があると考え、セレンやその他の必須金属について調査を行ったが、草原地区に特有なことはみられなかった[2, 3]。今回は、中国において汚染の事例が数多く報告され[4, 5]、骨代謝に影響を与えることが報告されているフッ素(F)[6, 7]について、飲料水および早朝尿中の濃度調査を行い、F暴露の有無について検討を行ったので報告する。

対象と方法：さきに調査を行った対象者(年齢35から45歳の女性)について[1]、1年後の1997年8月に早朝尿中のF濃度と再度骨代謝マーカーの調査を行い、さらに1年後の1998年8月に飲料水と早朝尿中F濃度の調査を行った。調査地区は、中国・内モンゴル自治区の主都である呼和浩特(都市地区、35名)、呼和浩特近郊にある農村地帯

(農村地区、41名)および草原地帯(草原地区、37名)の3地区である。

測定項目と方法は以下のとおりである。飲料水および早朝尿中のF濃度は、イオン電極法で測定した[8, 9]。骨代謝マーカーは、血清骨型アルカリフォスファターゼ(B-ALP)は窪田の方法、尿中CrossLaps(CL)濃度はEIA法、尿中ハイドロキシプロリン(Hyp)濃度は池田らの方法で測定し、尿中濃度はクレアチニン(Cr)補正を行った。

結果および考察：飲料水および早朝尿中F濃度の測定結果をTable 1に示した。1998年に調査を行った飲料水中F濃度の結果をみると、中国・内モンゴルの草原地区の幾何平均値は3.1mg/l(最小値0.8~最大値7.1mg/l)であった。都市地区の0.40mg/l(調査の結果、同一水源と考えられた)、農村地区の0.33mg/l(1つの水源からの採水が確認された)に比べて、草原地区の飲料水中Fは高濃度を示した。草原地区の対象者全員が、日本の水質基準(0.8 mg/l)を越える高F水を飲用していることが明らかとなった。

1. 近畿大・医・公衆衛生学 2. 富山医薬大・医・地域看護学
3. 富山医薬大・医・保健医学 4. 中国内蒙古医学院

Table 1. Fluoride Concentrations in Urine and Drinking Water

		Inner Mongolian		
		Urban (n=35)	Rural (n=41)	Grassland (n=37)
'98 Drinking Water Fluoride (mg/l)	G.M.(G.S.D)	0.40(1.01)	0.33a	3.05(1.84)***
	Range	0.40-0.41		0.81-7.09
'97 Urinary Fluoride (mg/gCr)	G.M.(G.S.D)	1.22(1.87)	1.37(1.54)	7.57(1.52)***
	Range	0.46-3.55	0.66-3.54	3.06-24.7
'98 Urinary Fluoride (mg/gCr)	G.M.(G.S.D)	1.26(1.67)	1.21(1.57)	7.58(1.53)***
	Range	0.51-5.10	0.40-3.54	2.80-22.1

G.M.(G.S.D.), Geometric mean (Geometric standard deviation) ; Range, Minimum-Maximum; a, n=1.

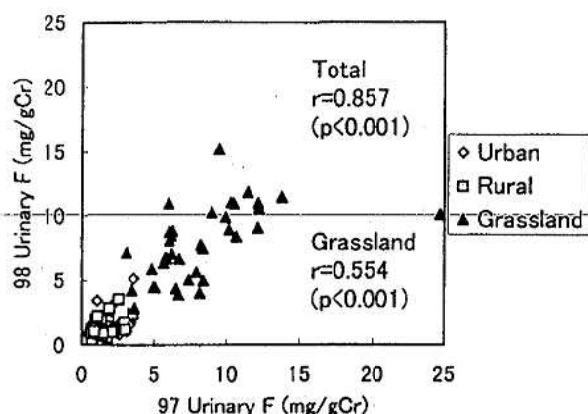
***, significant difference ($p<0.001$) compared with different district.

Fig. 1 Relationship between Fluoride Concentrations in Urine of '97 and '98.

次に、早朝尿中F濃度についてみると (Table 1), 1997年の調査では、都市地区、農村地区、草原地区の順に、幾何平均値 (最小値~最大値) は、1.2 (0.5~3.6) mg/gCr, 1.4 (0.7~3.5) mg/gCr, 7.6 (3.1~24.7) mg/gCrであった。飲料水濃度と同様に、草原地区が他の地区に比べて有意に高値を示した ($p<0.001$)。草原地区の住民は遊牧を生業としており移動する可能性があることから、1998年には飲料水とあわせて早朝尿の調査を行った。その結果、1998年も97年と同様な成績が得られた (Table 1)。2カ年の調査結果の間には良好な正の相関がみられ (Fig. 1), 1例を除いて、97年に高値を示した人は98年も高かった。

草原地区において飲料水と早朝尿中のF濃度がいずれも高値を示したことから、両者の関係につ

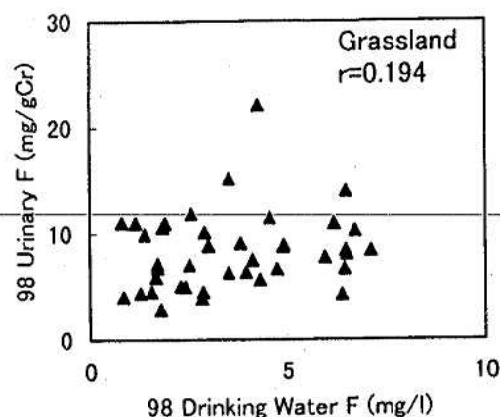


Fig. 2 Relationship between Fluoride Concentrations in Drinking Water and in Urine.

いて調べた (Fig. 2)。その結果、予想に反して、飲料水濃度と2カ年の早朝尿濃度との間に有意な相関は認められなかった (97年 $r=-0.004$, 98年 $r=0.194$)。

骨代謝の亢進がみられた草原地区にF暴露が明らかになったことから、F暴露の指標である飲料水中F濃度と骨代謝マーカーとの関係について検討した。草原地区女性について、骨吸収マーカーである早朝尿中CL/Crと飲料水中F濃度の関係をみたが、両者の間に有意な相関は認められなかった ($r=0.096$)。別の骨吸収マーカーである早朝尿中Hyp/Crや、骨形成のマーカーである血清B-ALPとの間にも有意な相関はみられなかった。

一方、早朝尿中のF濃度とCL/Crの関係をみると、両者の間には良好な正の相関が認められた (Fig. 3)。早朝尿中のHyp/Crとの間にも正の相

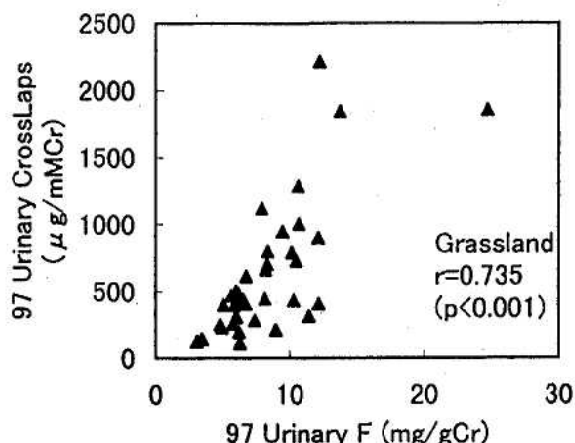


Fig. 3 Relationship between Fluoride Concentrations and CrossLaps Concentration in Urine.

関がみられ ($r=0.355$), また血清B-ALPとの間にも正の相関がみられた ($r=0.317$).

角田らによれば, 飲食によって摂取され体内に吸収されたFの約60%は速やかに尿中に排泄されることが報告されている [6]. しかし, 今回調査を行った内モンゴル草原地区女性では, 飲料水と早朝尿中のF濃度の間に相関はみられなかった. 体内に吸収されたFの約40%は血液を介して骨組織に選択的に沈着するとされており [6], 高F濃度の飲料水を摂取している草原地区住民には, 骨組織へのFの高蓄積が推察される. 今回, 草原地区の閉経前女性の早朝尿中F濃度が骨代謝マーカと相関する結果が得られた. 草原地区女性には骨代謝の亢進がみられており, F暴露によって骨組織に蓄積されたFが, 骨吸収の亢進に伴って尿中に排泄された可能性も示唆された.

これまで高濃度のF暴露によって骨硬化症や骨形成の亢進は多く報告されているが [6, 7], 骨吸収との関連をみた報告は少ない. Sowersらは飲料水のF濃度が内モンゴル草原地区と同様の地区で, 閉経および閉経前女性で骨量の減少や骨折の増加がみられることを報告し, F暴露と骨吸収の亢進との関連を示唆している [10]. F暴露と骨代謝亢進の関係を明らかにするには, F暴露の詳

細な調査や早朝尿中F濃度の意義など検討する課題は多く, さらなる調査研究が必要と考えられた.

謝辞: 本研究は, 富山医科薬科大学と中国内蒙古医学院との国際共同研究である. 内蒙古医学院の秦林金助教授をはじめ中国側の研究者ならびに関係各位に深謝いたします. 尿中F濃度測定でご指導いただいた岩手医科大学医学部衛生公衆衛生学教室板井一好講師, 角田文男教授に感謝いたします.

文 献

1. 西野治身, 梶田悦子, 伊木雅之, 毕 力夫, 劉仲玉, 鏡森定信 (1999). 富山衛研年報, 22, 152-157.
2. 新村哲夫, 田中朋子, 西野治身, 桑守豊美, 劉仲玉, 鏡森定信, 毕 力夫 (1999). 富山衛研年報, 22, 158-162.
3. 新村哲夫, 西野治身, 劉仲玉, 鏡森定信, 毕 力夫 (1999). 富山衛研年報, 22, 226-227.
4. 安藤 満, 平野靖史郎, 山元昭二, 田村憲治, 櫻井四郎 (1997). 日衛誌, 52, 379.
5. 野原 勝, 板井一好, 立身政信, 中屋重直, 小野田敏行, 小栗重統, 角田文男, 山田雅男 (1998). 日衛誌, 53, 542-544.
6. 角田文男 (1987). 新小児医学大系第25巻小児中毒学, p.255-264, 中山書店.
7. Cashman K. and Flynn A. (1998). Bibl. Nutr. Dieta, 54, 150-164.
8. 角田文男 (1978). 生化学実験法 (三浦義彰編), p.337-340, 文光堂.
9. 上水試験方法 (1993). 厚生省生活衛生局水道環境部監修, p.167-173, 日本水道協会.
10. Sowers M. F. R., Clark M., Jannausch M. and Wallance R. B. (1991). Am. J. Epidemiol., 133, 649-660.

4. 業

績

4. 業 績

(1) 受賞, 学位授与, 資格取得など

1) 受 賞

西野治身

地方衛生研究所設立50周年記念 厚生大臣表彰

受賞日 平成11年6月11日

刑部陽宅

地方衛生研究所全国協議会学術貢献賞

受賞日 平成11年6月11日

石倉康宏

地方衛生研究所全国協議会会長表彰

受賞日 平成11年6月11日

中山 喬

地方衛生研究所全国協議会会長感謝状

受賞日 平成11年6月11日

渡辺 護

地方衛生研究所全国協議会会長感謝状

受賞日 平成11年6月11日

細呂木志保

平成11年度全国食品衛生監視員研修会 厚生省生活衛生局長表彰

受賞日 平成11年11月12日

(2) 誌 上 発 表

[原 著]

1) ウイルスと培養細胞の相互作用から見た石綿の発癌性に関する実験的研究

中山喬, 山上孝司*, 鏡森定信*

産業衛生学雑誌, 40: 195-203, 1998.

ウイルスの感染性核酸の培養細胞へのトランスフェクションに対する石綿曝露の影響を検討し、石綿が外来性発癌因子の細胞内取り込みを促進することによって発癌過程に関与する可能性を考察した。クロシドライト、アモサイト、アンソフィライト、クリソタイルなどの石綿をポリオウイルスRNAとともにVero-E6細胞へ添加したところ、石綿がウイルスRNAのトランスフェクション効率を促進した。また、石綿とカオリンとの混合液で処理したところ、石綿によるウイルスRNAのトランスフェクション効率の促進がさらに増強された。これらの結果から、石綿曝露によって発癌物質など外来性因子の細胞への取り込みが促進されることが示唆された。

2) カラムスイッチングHPLCによる乾燥ろ紙血液中アミノ酸分析法の基礎検討と応用

米田 豊, 九曜雅子

日本マス・スクリーニング学会誌 9(3)43-55(1999).

新生児のアミノ酸代謝異常症マススクリーニングの一次検査に適応可能なHPLC分析法の開発を目的に、ポストカラム誘導体化法の基礎条件の検討をODSカラムを用いて行った。その結果、ステッグラジェントとカラムスイッチングを組合せることにより、良好な分離パターンを有する迅速分析法を確立できた。本法を新生児濾紙血液に適用したところ、Met, Leu 及び Phe のカットオフ濃度近辺における回収率はそれぞれ81.6, 103.8及び101.8%であり、再現性は相対標準偏差で1.7から4.2%の値が得られた。また、マイクロプレート酵素法との相関も良好であった。現在、本法を日常検査に導入している。

3) Multi-beam circular dichroism detector for HPLC

Atsushi Yamamoto, Shuji Komada, Akinobu Matsunaga, Kazuichi Hayakawa*
and Mitsuo Kitaoka*

Analyst, 124, 483-485, 1999.

A novel multi-beam circular dichroism (CD) detector for HPLC is described. A unique feature of this detector is the use of a retardation plate to give many quarter-waves in the wavelength region of interest. When a polarizing prism and thin quartz plate as the retarder are placed in a conventional photodiode array (PDA) detector, the kinetic spectra of an optically active analyte recorded by the instrument contain sinusoidal CD waves in the wavelength axial direction. Extraction of these CD waves superimposed on the absorption spectra was performed with MS Excel. Both the instrumental conditions for the PDA data acquisition and the polynomial data processing were optimized by monitoring the chromatographic elution of camphor. The limit of detection for ajimaline, a chiral alkaloid, was 26 ng injected amount.

4) イヨシロオビアブの吸血被害阻止対策の一事例

渡辺 護, 斎藤嘉広*

日本ベストロジー学会誌, 14巻, 1号, 39-43, 1999年5月

人を激しく襲うことで知られているイヨシロオビアブの発生地で、多発期の1998年夏に全国自然公園大会が開催された。その際にイヨシロオビアブの吸血被害阻止対策を行う機会があった。方法として二酸化炭素誘引トラップ16台による誘殺と、殺虫剤展着ネット（網目5mm, 高さ4m, 設置距離50m）による飛来遮断を行った。その結果、大会直後の会場におけるイヨシロオビアブの減少率93.3%と、下流5kmの対照地点での減少率54.3%の差などから、阻止効果があったと考えられた。

5) A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus with genetic changes in cynomolgus monkey

Katuaki Shinohara*, Koji Sakai*, Shuji Ando, Yasushi Ami*, Naoto Yoshino*, Eiji Takahashi*, Kenji Someya*, Yuriko Suzaki*, Tadashi Nakasone*, Yuko Sasaki*, Masahiko Kaizu*, Yichen Lu* and Mitsuo Honda*

Journal of General Virology, 80:1231-1240, 1999.

A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus (SHIV), designated C2/1, was obtained by serum passages in cynomolgus monkeys of p-SHIV, an SHIV strain that contains the env gene of pathogenic human immunodeficiency virus type 1 89.6. CD4⁺ lymphocyte depletion was induced within 1 week of the SHIV-C2/1 infection in peripheral blood as well as in various lymphoid organs in all the animals tested, with symptoms of diarrhoea and no increase in body weight, followed by intense viraemia. Serum antibody against Env protein was

detected from 4 weeks after the virus infection, while the anti-Gag antibody response was absent in the SHIV-C2/1-infected animals. In contrast, both anti-Gag and anti-Env antibody responses were present in animals infected with p-SHIV or the non-pathogenic SHIV-MN. Sequencing of the env gene of isolates of SHIV-C strains showed conserved amino acid changes in the Env C2 and V3 regions that included changes to negatively charged amino acids, in the cytoplasmic region of gp41 that included a 42 amino acid deletion, and in the Nef protein. The pathogenic SHIV-C2/1-monkey model suggests that virus-specific pathogenicity in SHIV infection may be associated with the absence of anti-Gag antibody responses in animals and may be caused by genetic changes during serum passage in vivo.

6) Precision of Quantitative Ultrasound Measurement of the Heel Bone and Effects of Ambient Temperature on the Parameters

M. Iki*, E. Kajita*, S. Mitamura*, H. Nishino, T. Yamagami* and N. Nagahama*

Osteoporosis International, 10, 462-467, 1999.

The goal of this study was to determine the magnitude of measurement error of a quantitative ultrasound (QUS) measurement system of the heel bone in a practical setting and to examine the effects of ambient temperature in the test room on QUS parameters. We assessed the intratest, intertest and interdevice coefficients of variation (CVs) for speed of sound (SOS), broadband ultrasound attenuation (BUA) and stiffness in vitro using phantoms and in vivo using volunteers. The intratest CV was the smallest and the interdevice CV was the greatest for every QUS parameter. The intertest CVs in vivo were 0.50% for SOS, 2.53% for BUA and 4.38% for stiffness. The standardized precision error (sPE) of stiffness, however, was smaller than those of the other two parameters. The intertest sPEs in vivo of the QUS parameters were 2-3 times greater than that of the spine bone mineral density (BMD) as measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Using an average of duplicate measurements for the representative value of a subject could improve sPE of the QUS parameters to around 2 times greater than that of spine BMD. We examined five phantoms each with the QUS system under the ambient temperature conditions of 10, 20 and 30°C. The lower the room temperature, the greater the values of all the QUS parameters obtained. We then assessed the effect of the season on the QUS parameters in healthy five women. SOS and stiffness were significantly greater in February (room temperature, 12.6°C) than in June (22.4°C) by 0.74% and 3.2% of overall means, respectively, by 10.1% and 4.3% as a standardized difference, or by 0.422 and 0.214 in Z-scores. This difference was likely to be caused by the difference in heel temperature between the seasons. The precision of the QUS system was inferior to that of conventional DXA densitometry. We recommend that institutions using several QUS system devices throughout the year at various locations monitor the precision of each device,

make duplicate measurements for a single subject, use the same device for each patient being followed, and control the heel temperature of subjects by keeping the test room temperature constant throughout the year.

7) 日本と中国・内モンゴル自治区の有経女性における骨代謝マーカー

西野治身, 梶田悦子*, 毕 力夫*, 劉 仲玉*, 王 福彦*, 秦 林金*, 趙 毅*, 郝 富*, 王 延彬*, 伊木雅之*, 鏡森定信*

Osteoporosis Japan, 7, 168-173, 1999.

生活習慣や地域環境の異なる中国・内モンゴル自治区3地域のモンゴル女性と、日本の福井市在住の女性を対象に、骨代謝マーカーを4地域間で比較した。その結果、内モンゴルの草原住民では、有経であるにもかかわらず明らかな骨代謝の亢進が認められ、活性型VDの上昇がこれに重要な役割を果たしていると考えられた。

8) 北村 敬：天然痘ウイルスと安全保障

朝日新聞, 1999年7月19日, 「論壇」

(要旨) 1980年の全世界痘瘡(天然痘)根絶宣言に続き、全世界で小児の定期接種が停止され、20年近く経過した現在、全世界的に若い人は痘瘡ウイルスに対する免疫のない状態になっている。これを好機として、痘瘡ウイルスを生物兵器として利用しようとする研究を行っている国があるとの情報に基づき、痘瘡ウイルスを用いた戦争とテロリズムに対して、国の安全保障問題として対処するよう提案した。

9) Major Degradation Pathway of Thiuram in Tap Water Processed by Oxidation with Sodium Hypochlorite

Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Mikiya Ohto and Akinobu Matsunaga

J. Agric. Food Chem., 47, 2914-2919, 1999.

Thiuram ($3\mu\text{M}$), a fungicide, was incubated in deionized water by adding 0-100mg/L free chlorine at 30°C for 30 min, and the solution was analyzed by HPLC and IC. The byproducts were identified by LC/MS, EI-MS, infrared, and ^{13}C NMR spectra and a reduction technique using 2-mercaptoethanol. On the basis of these results, it was found that the oxidation of thiuram with sodium hypochlorite initially produced an intermediate dimethylthiocarbamoyl

dimethylcarbamoyl disulfide, which was finally degraded to bis(dimethylcarbamoyl)disulfide, its trisulfide, and dimethylamine. Subsequently, it was suggested that monitoring of bis(dimethylcarbamoyl)disulfide, its trisulfide, and dimethylamine should be included for the management and control of thiuram in tap water processed by oxidation with sodium hypochlorite.

10) List of all isolates of spotted fever group rickettsiae from ticks in Japan 1993-1998

Hirofumi Fujita*, Yuriko Watanabe*, Mitsuhiro Ishikura, Nobuhiro Takada*

Annual Report of OHHARA general hospital, 42:45~50, 1999.

We listed all of 63 isolates of spotted fever group rickettsiae obtained from ticks collected at various localities in Japan during the years 1993 to 1998; 25 from *Amblyomma testudinarium*, one from *Dermacentor taiwanensis*, one from *Haemaphysalis flava*, one from *Ixodes monospinosus*, 33 from *Ixodes ovatus*, and two from *Ixodes persulcatus*. As examined by serologic immunoperoxidase test and/or PCR analysis, the isolates comprised three distinct species: Japanese spotted fever agent, *Rickettsia japonica*, each one from *D. taiwanensis* and *H. flava*; the *A. testudinarium* isolates, a tentatively named AT-1 serotype, seemed to be a new species; and the *Ixodes* isolates, were another members of serotype named IO-1, classified as *Rickettsia helvetica* according to PCR analysis.

11) Capacity gradient anion chromatography with a borate complex as eluent

Atsushi Yamamoto, Yoshinori Inoue*, Shuji Kodama, Akinobu Matsunaga

J. Chromatogr. A., 850, 73-77, 1999.

Complex formation between borate compounds and vicinal diols is well recognized. Generally, in a chemically bonded anion-exchange resin, many hydroxyl groups are introduced on the surface of the resin in order to make the resin hydrophilic. The borate as an eluting reagent also reacts to these hydroxyl groups, and this complex formation decreases the apparent ion-exchange capacity of the column by being dissociated to the anion depending on the eluent pH. In the present work a method is described for the simultaneous determination of anions based on the capacity gradient for suppressed ion chromatography. A Tosho IC-Anion-PW column and dihydroxyphenylborane-mannitol eluent system were used. To maintain baseline stability, it was helpful to keep the borate concentration constant during a gradient of 16 to 0mM mannitol as a modifier to prevent the complex formation with the

hydroxyl on the resin. The chemical composition of the eluents and gradient profiles are discussed and the application to the analysis of the condensed phosphates with widely varying retention times as food additives in a cheese sample is presented.

12) Phylogenetic analysis of Echovirus type 30 isolated from a large epidemic of aseptic meningitis in Japan during 1997-1998

Hiromu Yoshida*, Zheng Hong*, Tetsuo Yoneyama*, Kumiko Yoshii*, Hiroyuki Shimizu*, Kozo Ota*, Tsukasa Murakami*, Nobuhiro Irotani*, Misako Tsuchiya*, Shinichi Takao*, Kazue Uchida*, Shigeki Yamanishi*, Mitsuhiro Hamazaki*, Shuji Yoshino*, Mitsuaki Oseto*, Katsuhiko Abe*, Masako Hamano*, Kengi Sakae*, Hideaki Tsuzuki*, Seizo Chiya*, Hajime Onishi*, Tsuguto Fujimoto*, Tetsuya Munemura*, Ayumi Kawamoto*, Yuko Yokota*, Shuji Ando, Hiromasa Sekine*, Masayuki Akami*, Setsuko Iizuka*, Akio Hagiwara* and Tatsuo Miyamura*

Japanese Journal of Infectious Diseases, 52 : 160-163, 1999.

During 1997 to 1998, a nationwide epidemic of aseptic meningitis occurred in Japan. More than 4,500 isolates from patients with aseptic meningitis were identified as echovirus type 30. To investigate the character of these isolates, we examined the nucleotide sequences of thirty-seven geographical representatives and compared them with 50 strains isolated during the past 20 years. The phylogenetic analysis used partial sequences from either the VP1 or VP4-VP2 region of the viral capsid. This analysis revealed that the isolates were divided into six genomic groups. All isolates identified during 1997-1998 belonged to only two genomic groups; these two groups are thought to be the causative viral agents involved in the recent epidemic.

13) Measurement of enantiomeric purity by ratio chromatograms with a photometric detector using quartz plates as a multiple retarder

Hiroyuki Nakazawa*, Tomoko Yamada*, Takaho Watanabe*, Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Masayuki Nishimura*

Anal. Chim. Acta, 396, 125-130, 1999.

The measurement of enantiomeric purity is presented using the dual-wavelength detection function of a spectrophotometric detector. Between enantiomers, this method measures the difference in the absorbance ratio at adjacent 1/4 wavelengths that are produced by a thin quartz plate placed on a flow-cell. The use of a split-type flow-cell achieved high sensitivity.

Moreover, the determination of absolute quantities of the analyte was successful from the peak shape by adjusting the ratio of effluent velocity between the reference and sample cells to 1/3. This method was applied to the determination of camphor in pharmaceutical preparations.

14) N-Methyl-L-Serine Stimulates Hyaluronan Production in Human Skin Fibroblasts

Shingo Sakai*, Tetsuya Sayo*, Shuji Kodama, Shintaro Inoue*

Skin Pharmacol. Appl. Physiol., 12, 276-283, 1999.

We examined the effects of *N*-methyl-L-serine (NMS), an amino acid derivative, on hyaluronan (HA) synthesis in human skin fibroblasts. NMS (1-10 mM), but not L-serine, stimulated the incorporation of [^3H] glucosamine into HA dose-dependently, with a maximum stimulation of 1.5-fold compared to the control. The effect of NMS was specific for HA production, because there was no change in sulfated glycosaminoglycan formation. Neither the *N*-methyl derivatives of L-glycine or L-alanine, nor *N*-methyl-D-serine, could stimulate HA synthesis, indicating that the β -hydroxyl group and the L-configuration were essential for the activity. Gel filtration of the products showed that NMS stimulated the production of high-molecular-mass HA ($>10^6\text{D}$) without affecting the production of low-molecular-mass HA. NMS required 24 h to stimulate HA production, and when fibroblasts were pretreated for 10-24 h with NMS (1-10 mM), membrane-associated HA synthase activity was increased dose-dependently. Thus, a second messenger is likely to be involved in the stimulation of HA production by NMS.

15) 北村 敬：痘瘡根絶と痘瘡ワクチンの今後

臨床とウイルス, 第27巻, 第5号, 1999年12月, p.378-384

(要旨) 1980年に、完成した全世界痘瘡根絶計画の理論的基礎、根絶の検証、種痘（痘瘡ワクチンの接種）の改善と遺伝子発現ベクターへの応用を解説した後、痘瘡ウイルスの国際管理の失敗から、痘瘡ウイルスを用いた生物兵器による戦争とテロリズムの可能性が生じている現状を解析し、安全保障のための痘瘡ワクチン備蓄の切り札として、わが国の研究者が開発した Lc16m8 ワクチンが世界中かが注目されている現状を紹介した。

16) 北村 敬：第5回汎太平洋新興感染症国際会議

AIDE Update Japan, Vol.1, No. 3, 2000年1月 p. 21-22.

(要旨) 日米医学協力計画 (CMSP) の一部として, 2000年1月7-9日, インドのチェンナイ (旧マドラス) で, 日米印3国の協同で開かれた第5回会議はHIV感染と結核・癩の重複を主題に行われた. 日本側CMSPエイズ部会長として, 同会議の企画, 発表内容, 共同報告書の内容等を厚生省の「エイズ治療のためのブロック拠点病院と拠点病院の連携に関する研究班」の機関誌上で解説した.

17) 中国内モンゴールの都市部, 農村部および草原部における閉経前女性の骨粗鬆症関連要因の比較研究

—生活習慣, 第2中手骨骨量および骨代謝マーカーの関連を中心に—

劉 仲玉*, 毕 力夫*, 梶田悦子*, 西野治身, 伊木雅之*, 新村哲夫, 関根道和*, 笹島 茂*, 張 淼, 桑守豊美*, 原田澄子*, 鏡森定信*

民族衛生, 66(1), 14-27, 2000.

生活習慣が異なる内モンゴールの3地域の閉経前女性における骨量, 骨代謝マーカーおよびその関連要因を検討したところ, 以下の成績を得た.

1) 非利き手の骨量GSminが内モンゴール農村部で最高値を示し, 他の地域に比較して統計的に有意であった. 利き手の骨量も農村部が他の2地域に比し高値を示したが, 統計的な有意差はみられなかった.

2) 多変量解析において非利き手の骨量GSmin(高値)への種々の要因の寄与では, 重中度労働および握力要因が統計的に有意であることが示された.

3) 内モンゴール草原部では, 骨代謝マーカーは閉経女性の特徴を示しており, これは都市部や農村部ではみられないフッ素の過剰摂取という特異な環境状況と関連していることが示唆された.

18) Determination of saccharides in sake by high-performance liquid chromatography with polarized photometric detection

Kazuichi Hayakawa*, Kyoko Ando*, Natsue Yoshida*, Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Masayuki Nishimura*, Mitsuo Kitaoka* and Keizo Matsui*

Biomed. Chromatogr., 14, 72-76, 2000.

A high-performance liquid chromatographic method has been developed for the determination of saccharides in sake, an alcoholic beverage brewed from rice. Saccharides in sake were

separated on a normal phase (carbamoyl bonded silica) column using a linear gradient elution of water in acetonitrile. Seven saccharides, glucose, maltose, isomaltose, maltotriose, panose, isomaltotriose and ethyl α -D-glucoside, were determined by a polarized photometric detector. Unidentified peaks suggesting saccharides with polymerization degrees over 4 were also observed. The proposed method did not require any sample clean-up treatment. As an application, saccharide compositions in various kinds of sake were compared.

19) 利尻島のアブ

渡辺 護, 佐藤雅彦*

利尻研究, 19号, 57~59, 2000年3月

利尻から新たに分布が確認されたヤマトアブと新種と考えられるゴマフアブを含む5種のアブについて解説した。

20) An Alternative Method for CD Measurement by a Conventional Spectrophotometer

Tomoko Yamada*, Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Takaho Watanabe*, Hiroyuki Nakazawa*

Anal. Sci., 16, 325-327, 2000.

Holzwarthの原理を改良し, 分光光度計によるCDスペクトル作成法を確立した。既存の分光光度計内のセル入射光側に偏光プリズムとmultiple-order位相差板を配置してスペクトルを作成する。次に位相差板の光軸を逆にし, もう一度スペクトルを測定する。これらスペクトルの差を求めると, 位相差板の1/4波長を極値とするCD波が得られる。このCD波を基にしたCDスペクトルの作成は, 全てMS Excel上で行なった。本法は, 化合物の ϵ と $\Delta\epsilon$ の比で表されるAnisotropy factorが $1/2000$ と小さなCDスペクトルも測定可能であり, 従来の変調型CD分散計に劣らぬ性能を示した。

[著書・総説・解説]

1) 堀 浩二*編

畜産害虫QアンドA, 中央畜産会ホームページ, 1999年

分担執筆 渡辺 護

アブの種類, 生態と駆除

家畜に飛来する主なアブを列挙し, その分類, 生態および駆除について解説した.

2) 緒方一喜*, 栗原 毅*, 篠永 哲*, 新庄五朗*, 田中生男*編

住環境の害虫獣対策, pp. 402. (財)日本環境衛生センター刊行, 2000年1月

分担執筆 渡辺 護

第10節 自然界の害虫獣p.200~217.

カメムシ類, プユ類, アブ類について主要種の形態, 生態を解説し, それぞれの駆除について経験に基づいた実際的方法を記述した.

3) 渡辺 護, 品川保弘, 安藤秀二, 北村 敬

オロロ (イヨシロオビアブ) の駆除に関する調査報告書, 富山県におけるイヨシロオビアブの吸血被害阻止に関する実践的研究, pp. 105, 富山県厚生部薬務食品課, 2000年3月.

5年にわたる調査結果をまとめ, イヨシロオビアブの吸血被害の阻止法を解説した.

4) 千葉県の保護上重要な野生生物, 一千葉県レッドデータブックー動物編

千葉県, 438pp. 2000年3月

分担執筆 渡辺 護

昆虫類双翅目アブ科

千葉県における最重要保護生物としてイシハラアブを挙げ、重要保護生物として房総半島清澄山周辺にのみ生息するキンイロアブを挙げた。

5) キャピラリー電気泳動を用いた食品成分・残留農薬のキラル分析

小玉修嗣, 早川和一*

ぶんせき 3月号, 167-168, 2000 3月

食品成分や農薬の中には多くのキラル化合物がある。しかし、キャピラリー電気泳動を実際の食品中のキラル分析に適用した報告は極めて少なく、これらの先駆的研究を紹介した。

6) フタル酸エステル類のHPLC測定とその尿中代謝物測定の試み

小玉修嗣, 新村哲夫

北陸と公衆衛生 46, 7-9, 2000 3月

水道水や食品中のフタル酸エステル類の測定に適用できる全自動HPLC分析システムを確立した。さらに、フタル酸ジエステルの生体内代謝物の一つであるフタル酸モノエステルの分析法も併せて紹介した。

(3) 特別講演等

1) 富山県のリケッチア症

石倉康宏

第17回北陸病害動物研究会

平成11年6月26日（富山県小杉町，富山県衛生研究所）

2) ボツリヌス菌の生態から見た細菌の病原性

山川清孝

第52回日本細菌学会九州支部総会，第36回ウィルス学会九州支部総会

シンポジウム「微生物の生態を透して病原性を視る」

1999年9月3日～4日（福岡市，九州大学同窓会館）

3) 富山県における腸炎ビブリオ食中毒発生予測についての取組み

刑部陽宅

第33回腸炎ビブリオシンポジウム

シンポジウム「これからの腸炎ビブリオ食中毒対策」

1999年11月25日～26日（沖縄県，日航那覇グランドキャッスル）

(4) 学会発表等

1) イヨシロオビアブ誘殺トラップの配置戦略に関する検討

渡辺 護

第51回日本衛生動物学会, 平11. 4. 8~10, 調布市

2) チュウバイサシガメとオオサシガメの産卵生態に関する実験的検討

渡辺 護

第51回日本衛生動物学会, 平11. 4. 8~10, 調布市

3) エコーウイルス30型の分子疫学

吉田 弘*, 米山徹夫*, 吉井久美子*, 清水博之*, 宮村達男*, 萩原昭夫*, 大田耿三*, 村上司*, 入江展弘*, 土井ミサ子*, 高尾信一*, 内田和江*, 山西重機*, 濱崎光宏*, 吉野修司*一, 大瀬戸光明*, 阿部勝彦*, 濱野雅子*, 栄賢二*, 都築秀明*, 千屋誠造*, 尾西一*, 藤本嗣人*, 守村徹也*, 川本歩*, 横田陽子*, 安藤秀二, 関根大正*

第40回日本臨床ウイルス学会, 平11. 5. 13~14, 大阪市

4) キャバシティグラジェント法による陰イオンクロマトグラフィー

山本 敦, 小玉修嗣, 松永明信, 井上嘉則*, 青山哲也*, 熊谷雄五*

第6回クロマトグラフィーシンポジウム 平11. 6. 25~26, 金沢市

5) キャピラリー電気泳動による食品中の乳酸の光学分割

小玉修嗣, 山本 敦, 松永明信, 曾我朋義*, 箕浦加穂*, 松井圭三*, 中込和哉*, 谷村穂徳*, 早川和一*

第6回クロマトグラフィーシンポジウム 平11. 6. 25~26, 金沢市

6) e mm遺伝子塩基配列によるA型溶連菌の型別

田中大祐, 刑部陽宅, 北村 敬

第32回レンサ球菌感染症研究会, 平11. 6. 26, 金沢市

7) 小学校で発生したC群ロタウイルスによる急性胃腸炎の集団発生について

長谷川澄代, 松浦久美子, 中山喬, 石倉康宏, 北村敬,

平成11年度北陸腸内細菌研究会, 平11. 7. 10, 富山市

8) 中国・内モンゴル自治区におけるフッ素暴露と骨代謝への影響

新村哲夫, 西野治身, 田中朋子, 中崎美峰子, 伊木雅之*, 梶田悦子*, 劉 仲玉*, 鏡森定信*, 毕力夫*

第10回日本微量元素学会, 平11. 7. 14~15, 東京都

9) 漁港の海水・海泥における腸炎ビブリオ実態調査(富山県厚生部V p マリン実態調査事業)について

細呂木志保, 田中大祐, 磯部順子, 刑部陽宅, 北村 敬, 薬務食品課*, 新川保健所*,

平成12年10月1日

新川保健所魚津支所*, 中部保健所*, 高岡保健所*, 高岡保健所小杉支所*, 高岡保健所氷見支所*
第31回東海北陸ブロック食品衛生監視員研修会, 平11. 8. 27, 名古屋市

10) マルチビーム方式の偏光吸光度検出法

山本 敦, 小玉修嗣, 松永明信, 早川和一*, 安居嘉秀*, 北岡光夫*
日本分析化学会 平11. 9. 8~10, 神戸市

11) 配位子交換キャピラリー電気泳動によるリンゴ酸の光学分割

小玉修嗣, 山本 敦, 松永明信, 曾我朋義*, 箕浦加穂*
日本分析化学会 平11. 9. 8~10, 神戸市

12) 自然界におけるCoxiella burnetii の浸淫状況.

安藤秀二, 石倉康宏
中部獣医師会連合大会日本獣医公衆衛生学会, 平11. 9. 18~19, 富山市

13) 富山市及び周辺地域における外猫のQ熱病原体Coxiella burnetii の感染状況について

小杉和伸*, 竹山秋見*, 坪島貞夫*, 石倉康宏, 安藤秀二 他11名.
中部獣医師会連合大会日本小動物獣医学会, 平11. 9. 18~19, 富山市

14) 中国・内モンゴールの閉経前女性における指骨密度に関する追跡調査

劉 仲玉*, 鏡森定信*, 西野治身, 笠島 茂*, 新村哲夫
第64回日本民族衛生学会, 平11. 9. 25~26, 弘前市

15) 栄養素摂取量調査(秤量法, 陰膳法)と骨代謝指標測定値

田中朋子
平成11年度地研東海北陸支部環境保健部会, 平11. 9. 29~30, 名古屋市

16) カラムスイッチングHPLCによる乾燥ろ紙血液中アミノ酸の迅速分析法

米田 豊, 九曜雅子
第27回日本マス・スクリーニング学会 平11. 10. 8~9, 名古屋市

17) 家屋に侵入越冬するカメムシの富山県における近年の飛来発生状況

渡辺 護
第54回日本衛生動物学会西日本支部大会, 平11. 10. 16~17, 津市

18) 富山県における環境中の腸炎ビブリオの動態と食中毒の発生

細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 平本裕子, 山川清孝, 刑部陽宅, 北村 敬
第36回日本細菌学会中部支部総会, 平11. 10. 16~17, 金沢市

19) 「富山県衛生研究所における染色体分析の現状と最近の問題, 1. 血液・骨髓液」

林 美貴子, 本田幸子, 大江 浩, 北村 敬, 鏡森定信*

第58回日本公衆衛生学会, 平11. 10. 20~22, 別府市

20) 「富山県衛生研究所における染色体分析の現状と最近の問題, 2. 羊水・流産胎児」

本田幸子, 林 美貴子, 大江 浩, 北村 敬, 鏡森定信*

第58回日本公衆衛生学会, 平11. 10. 20~22, 別府市

21) 思春期児童の骨密度と運動関連指標

山上孝司*, 西野治身, 田中朋子, 堀井裕子, 松倉知晴*, 鏡森定信*

第58回日本公衆衛生学会総会, 平11. 10. 21~22, 別府市

22) 前腕骨における末梢骨用QCTによる骨密度とDXAによる骨密度との関連について—JPOS study group—

松倉知晴*, 西野治身, 山上孝司*, 伊木雅之*, 香川芳子*, 松崎俊久*, 米島秀夫*, 丸茂文昭*, 鏡森定信*

第58回日本公衆衛生学会総会, 平11. 10. 21~22, 別府市

23) 異なる測定法の精度の比較 —DXAとQUSによる骨量測定値を例に

伊木雅之*, 梶田悦子*, 西野治身, 三田村純枝*

第58回日本公衆衛生学会総会, 平11. 10. 21~22, 別府市

24) 栄養摂取状況と血液中および尿中の生化学的測定値との関連性について

宮川茂樹*, 田嶋隆俊*, 庄田丈夫*, 西野治身, 田中朋子

第58回日本公衆衛生学会総会, 平11. 10. 21~22, 別府市

25) 中国・内モンゴル自治区の有経女性における骨代謝 第2報 フッ素暴露との関係

西野治身, 新村哲夫, 毕 力夫*, 劉 仲玉*, 張 淼*, 秦 林金*, 郝 富*, 伊木雅之*, 梶田悦子*, 鏡森定信*

第1回日本骨粗鬆学会, 平11. 10. 27~30, 倉敷市

26) 定量的超音波法 (QUS) の精度と測定値に対する環境温の影響

伊木雅之*, 梶田悦子*, 西野治身, 三田村純枝*, 森田明美*, 池田行宏*

第1回日本骨粗鬆症学会, 平11. 10. 27~30, 倉敷市

27) 非散布作業における有機リン系農薬の尿中代謝物追跡調査

中崎美峰子, 西野治身, 大浦栄次*

第48回日本農村医学会学術総会, 平11. 10. 28~29, 松江市

28) フタトゲチマダニが保有する紅斑熱群リケッチアについて

石倉康宏, 安藤秀二, 渡辺護, 品川保弘, 藤田博己*

第6回リケッチア研究会, 平11. 11. 6, 東京都

平成12年10月1日

- 29) 日本産マダニから増幅した紅斑熱群リケッチア遺伝子の系統解析
石倉康宏, 安藤秀二, 松浦久美子, 長谷川澄代, 北村 敬
日本ウイルス学会第47回学術集会・総会, 平11. 11. 7～9, 横浜市
- 30) Chiral Resolution of Undervatized Aliphatic α -Hydroxy Acids and Amino Acids Using Cyclodextrin in Capillary Electrophoresis
Shuji Kodama, Atsuhiko Yamamoto, Akinobu Matsnaga, Tomoyoshi Soga*, Kaho Minoura*
キャピラリークロマトグラフィー国際シンポジウム 平11. 11. 8～12, 岐阜市
- 31) 漁港の海水・海泥における腸炎ビブリオ実態調査(富山県厚生部V pマリン実態調査事業)について
細呂木志保, 田中大祐, 磯部順子, 刑部陽宅, 北村 敬, 薬務食品課*, 新川保健所*,
新川保健所魚津支所*, 中部保健所*, 高岡保健所*, 高岡保健所小杉支所*, 高岡保健所氷見支所*
平成11年度全国食品衛生監視員研修会, 平11. 11. 11～12, 東京都
- 32) HPLCによる先天性アミノ酸代謝異常症マススクリーニング検査法3方式の比較
米田 豊, 九曜雅子
北陸先天異常研究会第20回学術集会—平11. 11. 27, 金沢市—
- 33) 「富山県衛生研究所における染色体分析(血液・骨髄液)の現状」
林 美貴子, 本田幸子, 大江 浩, 北村 敬
第20回北陸先天異常研究会, 平11. 11. 27, 金沢市
- 34) 「富山県衛生研究所における染色体分析(羊水・流産胎児)の現状」
本田幸子, 林 美貴子, 大江 浩, 北村 敬
第20回北陸先天異常研究会, 平11. 11. 27, 金沢市
- 35) 「当所における染色体分析の状況」
本田幸子
平成11年度富山県先天異常研究会, 平11. 11. 30, 富山市
- 36) 誘引トラップによるイヨシロオビアブの吸血被害阻止対策事例
渡辺 護
第14回日本ペストロロジー学会, 平11. 12. 1～2, 名古屋市
- 37) HIV-189.6由来Env等シーケンスを挿入したSIV/HIVキメラウイルスの株間による変化—感染サルにおけるCD4陽性細胞減少とCD4陽性細胞におけるCD発現の解析.
佐々木裕子*, 網 康至*, 阪井弘治*, 篠原克明*, 高橋栄治*, 安藤秀二, 染谷健二*, 須崎百合子*,
海津雅彦*, 仲宗根正*, 本多三男*
第13回日本エイズ学会, 東京都, 平11. 12. 2～4, 東京都

- 38) Povidone iodine as topical microbicide for HIV prevention.
T. Kitamura
5th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. January
8,2000,Chennai.
- 39) イオンクロマトグラフィーによる飲料水中の陰イオン及び陽イオンの同時分析
高柳信孝
平成11年度地研東海北陸支部衛生化学部会 平12. 1. 20~21, 岐阜市
- 40) PTV濃縮法を用いたアルコール飲料中の農薬迅速分析
齊藤行雄
平成11年度地研東海北陸支部衛生化学部会 平12. 1. 20~21, 岐阜市
- 41) 富山県内に分布するツツガムシ病リケッチアの型別成績
安藤秀二, 石倉康宏, 渡辺護, 田中桂子*, 金子望博*
富山県公衆衛生学会, 平12. 2. 17, 富山市
-
- 42) 富山県における平成11年の腸管系病原細菌検出情報と食中毒発生状況
田中大祐, 平本裕子, 北村 敬
平成11年度地研東海北陸支部細菌部会, 平12. 2. 24~25, 福井県
- 43) 富山県におけるサルモネラの日常的検索状況と乾燥イカ菓子による食中毒
磯部順子, 山川清孝, 刑部陽宅, 北村 敬
平成11年度地研東海北陸支部細菌部会, 平12. 2. 24~25, 福井県
- 44) 溶血レンサ球菌レファレンス事業報告
田中大祐, 山川清孝, 北村 敬
平成11年度地研東海北陸支部細菌部会, 平12. 2. 24~25, 福井県
- 45) 漁港海水・海泥における腸炎ビブリオの変動と食中毒の発生について
細呂木志保, 山川清孝, 刑部陽宅, 北村 敬
平成11年度地研東海北陸支部細菌部会, 平12. 2. 24~25, 福井県
- 46) 「アミノ酸分析へのHPLC導入にあたっての問題点」に対する整理
米田 豊
日本マス・スクリーニング学会 技術部会第19回研修会 平12. 3. 3~4, 山口市
- 47) 富山県におけるインフルエンザ流行状況
中山喬, 松浦久美子
平成11年度地研東海北陸支部ウイルス部会, 平12. 3. 9~10, 名古屋市

平成12年10月1日

48) ポリオ中和抗体のワクチン株と強毒株の比較

中山喬

平成11年度地研東海北陸支部ウイルス部会, 平12. 3. 9~10, 名古屋市

49) 小型球形ウイルスによる集団食中毒について

長谷川澄代

平成11年度地研東海北陸支部ウイルス部会, 平12. 3. 9~10, 名古屋市

50) Phenotypic changes in lymphoid cells during acute

Shuji Ando, Naoto Yoshino*, Yasushi Ami*, Katsuaki Shinohara*, Kenji Someya*, Takashi Kitamura*, Tadashi Nakasone*, Mitsuo Honda*,

12th US-Japan Joint Meeting of AIDS, Santa Fe, NM, U.S.A., March 22~24, 2000.

51) Status and trends of HIV epidemics : Japan, U. S., and globally.

Mitsuhiro Kamakura*, Kenji Soda*, Shuji Ando, Takashi Kitamura.

12th US-Japan Joint Meeting of AIDS, Santa Fe, NM, U.S.A., March 22~24, 2000.

52) Epidemiological analysis of the trends of HIV/AIDS in Japan and the United States.

M. Kamakura, K. Soda, S. Ando, & T. Kitamura

12th Joint Meeting of AIDS Panels, US-Japan Cooperative Medical Science Program (CMSP), March 22, 2000, Santa Fe.

53) The current status and trends of the HIV epidemics in the World.

M. Kamakura, K. Soda, S. Ando, & T. Kitamura

12th Joint Meeting of AIDS Panels, CMSP, March 22, 2000, Santa Fe.

54) Phenotypic changes in lymphoid cells during acute infection with highly pathogenic Simian/Human Immunodeficiency virus.

S. Ando, N. Yoshino, Y. Ami, K. Shinohara, K. Someya., T. Kitamura, T. Nakasone, & M. Honda

12th Joint Meeting of AIDS Panels, CMSP, March 24, 2000, Santa Fe.

55) 偏光子回転方式による変調型偏光吸光度検出法

山本 敦, 小玉修嗣, 松永明信, 早川和一*, 中澤裕之*, 安居嘉秀*, 北岡光夫*

日本薬学会第120年会 平12. 3. 29~31, 岐阜市

56) キャピラリー電気泳動によるモノヒドロキシベンゾ[*a*]ピレンの異性体12種類の分離

小玉修嗣, 山本 敦, 松永明信, 鳥羽 陽*, 早川和一*

日本薬学会第120年会 平12. 3. 29~31, 岐阜市

57) フタル酸ジエステルの尿中代謝産物・モノエステルのHPLC測定

新村哲夫, 堀井裕子, 西野治身, 篠田晶子*, 鈴木廣志*

日本薬学会第120年会, 平12. 3. 29~31, 岐阜市

編 集 委 員

委 員 長 尾 崎 一 郎
委 員 加 納 晴 美
渡 辺 護
石 倉 康 宏
磯 部 順 子
高 柳 信 孝
堀 井 裕 子

富 山 県 衛 生 研 究 所 年 報

平成11年度 (1999)

2000年10月1日 発行

発 行 富 山 県 衛 生 研 究 所
〒939-0363

富山県射水郡小杉町中太閤山17-1

電 話 (0766) 56-5506

F A X (0766) 56-7326

印 刷 あ け ぼ の 企 画 (株)

富山市住吉町1丁目5-18

電 話 (076) 424-1755(代)