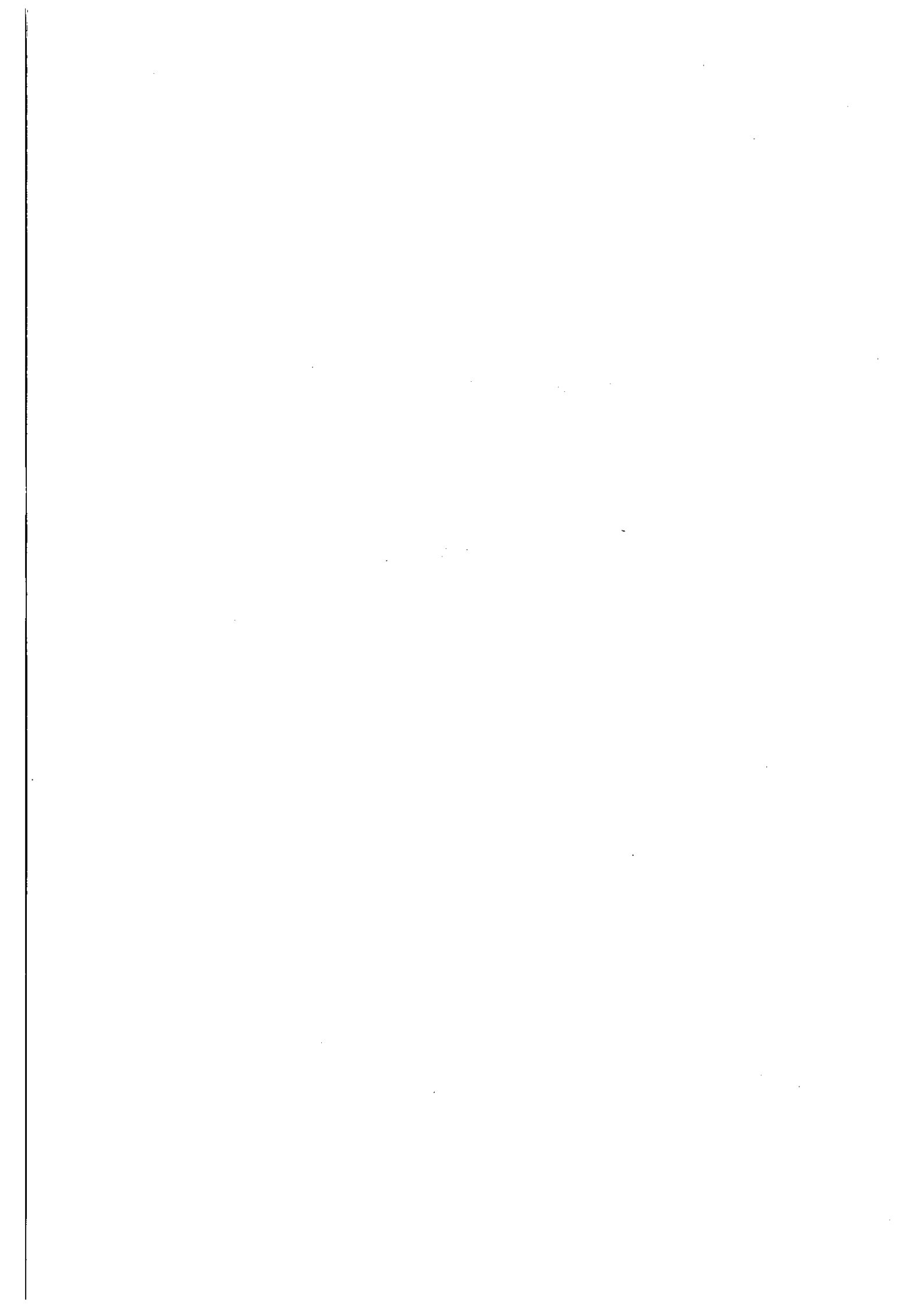


富山県衛生研究所年報

(平成13年度)

第25号

富山県衛生研究所



は じ め に

衛星放送の画面に突如とびこんできた「01/09/11」の大惨事。これは「映画ではなく事実なのだ」と何度か反すう。そして直ちに訪れた底知れない恐怖感。ほどなく炭疽菌によるバイオテロ。県内の関係諸機関と緊急かつ綿密な協議。近年わが国では全く発生を見ていない炭疽だけに、恐怖感のみが先走りがち。少しでも不審な郵便物ならすべて当所に搬入され、ウイルス部のレベル3の物理的封じ込み（P3）施設が“郵便局化”してしまうのもいかなものかなどと話し合いつつ、情報収集につとめる。国立感染研や米国CDCのホームページ、所内外の専門家の見解が大いに役立ち、適切な対処の基本方針も固まる。そして、細菌部、ウイルス部を中心に、実際の不審郵便物の検査に入る。両部の献身的な取り組みと共に事務方の迅速かつ適切な対応も有難かった。検査結果はむろんすべて陰性だった。ところで、私自身、細菌部にもどうしてもP3が必要であろうとかねがね思ってきたところですが、これを機に新設されることになり、ほどなく完成予定です。また、菌やウイルスの保管に一層の注意を払うと共に、物理的にもセキュリティを高める手立てがとられました。これらについての県の御理解と御支援に深く感謝しております。全国的には、菌やウイルスの検出感度、検出精度を高めるために定量的PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）装置の普及などがはかられているようです。ひきつづき御支援をお願いする次第であります。

これまでのところ業務上は当所の直接の関与はありませんが、わが国での牛海綿状脳症（BSE）、いわゆる狂牛病の発生も衝撃的でした。しかし、報道された一連の経過を冷静に見つめれば、これは起こるべくして起こったと言えましょう。グローバルな物流、人的往来の今日、わが国だけは例外といえるようなことはまずありえない、あるいは良き例外たらしめるためには格段の努力と慎重さが求められると言えましょう。

ともかくも、「健康危機管理」という観点からは、まことに重い一年でありました。筆者自身も迅速な情報収集、適切な対処の重要性を痛感するとともに、例えば、炭疽菌を扱うことのできる人材、バイオセーフティーに関する識見を有する人材を所内に有することの意義は極めて大きいと感じました。人的資源は一朝一夕には得られません。技術は先輩から後輩へ引き継がれながら改良されていきます。設備装置などハード面の充実と共に人材の育成と確保の重要性を、あらためて指摘しておきたいと思えます。本来なら、各研究部の主要実績を列挙すべきですが、上記の特別な事情により割愛せざるを得ません。それぞれの研究報告を御覧いただければ幸いです。一言だけ加えるとすれば「健康とくらしの安全を科学する」当地方衛生研究所には極めて新鮮かつ貴重な検体がたえず集積されます。大学とは比べものになりません。この素材をもっと有効に利用し、もっともっと「科学する」べく最善の努力をしてまいりたいと存じます。御鞭撻のほどよろしくお願い致します。

平成14年7月

富山県衛生研究所長

永 井 美 之

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	27
(8) 講 師 派 遣	31
(9) 研 修 指 導	33
(10) 研 修 受 講	33
(11) 客員研究員等招へい	34
(12) セミナーの開催	34

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13年度の検査成績）	35
米田 豊, 九曜雅子, 前田多美子, 加藤丈士, 永井美之, 竹 邦子	
乾燥ろ紙血液中ガラクトースのカラムスイッチングHPLC定量法	47
米田 豊, 九曜雅子	
乾燥ろ紙血液中ガラクトースのHPLC定量法（第2報）	55
米田 豊, 九曜雅子	
ヒト染色体に関する調査研究—血液・骨髄液—平成13年度	62
林 美貴子, 本田幸子, 加藤丈士	
ヒト染色体に関する調査研究—羊水・流産胎児—平成13年度	68
本田幸子, 林 美貴子, 加藤丈士	
日本脳炎流行予測調査	74
渡辺 護, 長谷川澄代, 高田ちはる	
ポリオ流行予測調査	84
中山 喬, 岩井雅恵, 安藤秀二, 長谷川澄代, 松浦久美子, 永井美之, 遠藤京子, 田中桂子, 金木 潤, 田中有易知, 中村由起子	

インフルエンザ流行予測調査	91
松浦久美子, 岩井雅恵, 長谷川澄代, 中山 喬, 安藤秀二, 永井美之, 田中桂子, 金木 潤, 遠藤京子, 田中有易知, 中村由起子, 宮田英喜	
ノーワーク様ウイルス (NLV) による急性胃腸炎の集団発生について (2001年度)	99
長谷川澄代, 松浦久美子, 中山 喬, 安藤秀二, 永井美之	
富山市都市河川水のサルモネラ定点観測	103
磯部順子, 田中大祐, 細呂木志保, 清水美和子, 香取幸治	
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	111
田中大祐, 清水美和子, 細呂木志保, 磯部順子, 刑部陽宅, 香取幸治, 林喜代志 中村政雄, 遠藤美代子	
健康児の咽頭溶血レンサ球菌保菌状況	115
田中大祐, 磯部順子, 細呂木志保, 清水美和子, 永井美之, 田中桂子, 田中有易知	
河川水, 土およびヒト糞便からの低温性大腸菌群の分離と分析	118
刑部陽宅, 清水美和子, 田中大祐, 細呂木志保, 磯部順子, 香取幸治, 永井美之	
富山県で分離された腸管出血性大腸菌の志賀毒素と志賀様毒素産生	124
刑部陽宅, 清水美和子, 細呂木志保, 田中大祐, 磯部順子, 永井美之	
下痢症患者由来の主要病原因子陰性大腸菌の病原性	129
刑部陽宅, 平田清久, 清水美和子, 田中大祐, 細呂木志保, 磯部順子, 永井美之	
イヌワシ未孵化卵中の残留ポリ塩化ビフェニル及び有機塩素系農薬	135
齊藤行雄, 松永明信, 間宮寿頼, 湯浅純孝, 村上孝一	
鉛給水管を使用している水道水の鉛濃度調査	140
高柳信孝, 健名智子, 松永明信, 植野 一, 金谷昭男	
富山湾における多環芳香族炭化水素の深度別濃度分布	145
大浦 徹, 大戸幹也, 松永明信	
カルシウム食品摂取が女子大生の骨代謝に与える効果	149
田中朋子, 堀井裕子, 中崎美峰子, 西野治身, 桑守豊美, 石塚盈代, 大浦栄次	
骨量獲得期における女子学生の骨密度・骨代謝指標と初潮・生活習慣との関連	155
堀井裕子, 中崎美峰子, 田中朋子, 西野治身, 山上孝司	

3. 資 料

マウス末梢血におけるコメヌカ油抽出物の小核誘発試験	163
本田幸子, 林 美貴子	
動物由来感染症実態調査 (第2) 富山県のイヌ・ネコおよびその飼育者における <i>Coxiella burnetii</i> の浸淫状況	167

安藤秀二, 石倉康宏, 永井美之	
富山県における平成13年度のウイルスおよびリケッチア検出状況	170
岩井雅恵, 中山 喬, 安藤秀二, 長谷川澄代, 松浦久美子, 永井美之	
A(H3)型とB型インフルエンザウイルスによる混合感染の1例について	172
松浦久美子, 香取幸治, 永井美之, 正木明夫, 田中有易知	
加熱処理におけるビーフ角切りステーキ中の腸管出血性大腸菌 O157:H7 の挙動	176
磯部順子, 細呂木志保, 田中大祐, 清水美和子, 香取幸治, 永井美之	
漁港における腸炎ビブリオ調査 (平成13年)	179
細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 清水美和子, 香取幸治, 刑部陽宅, 永井美之, 竹内 崇	
富山県における2001年の病原微生物検出情報	183
清水美和子, 細呂木志保, 田中大祐, 磯部順子, 永井美之	
液体クロマトグラフ/質量分析計を用いた富山県内水道水中のハロ酢酸の分析	186
大戸幹也, 山本 敦, 松永明信	
平成13年度食品衛生 (理化学) 検査の精度管理調査について	189
齊藤行雄, 大戸幹也, 松永明信, 尾崎一郎	
平成13年度水道水質検査の精度管理事業について	194
健名智子, 高柳信孝, 松永明信	

4. 業 績

(1) 誌上発表	201
(2) 特別講演等	211
(3) 学会発表等	212
(4) 受賞, 学位授与, 資格取得など	218

Reports

A Survey Report on Neonatal Mass Screening for Inborn Errors of Metabolism, Congenital Hypothyroidism and Congenital Adrenal Hyperplasia in Toyama Prefecture (April 2001~March 2002)	35
Yutaka YONEDA, Masako KUYO, Tamiko MAEDA, Takeshi KATO, Yoshiyuki NAGAI and Kuniko TAKE	
Quantification of Galactose in Dried Blood Specimens by Column Switching HPLC	47
Yutaka YONEDA, Masako KUYO	
Modified Method for Quantification of Galactose in Dried Blood Specimens by Column Switching HPLC	55
Yutaka YONEDA, Masako KUYO	
Chromosome Analysis of Human Blood and Bone Marrow Cells	62
Mikiko HAYASHI, Sachiko HONDA and Takeshi KATO	
Chromosome Analyses of Amniotic Fluid Cells and Fetal cells	68
Sachiko HONDA, Mikiko HAYASHI and Takeshi KATO	
Epidemiological Surveillance of Japanese Encephalitis in Toyama Prefecture in 2001.....	74
Mamoru WATANABE, Sumiyo HASEGAWA and Chiharu TAKADA	
Epidemiological Surveillance of Poliovirus in Toyama Prefecture	84
Takashi NAKAYAMA, Masae IWAI, Shuji ANDO, Sumiyo HASEGAWA, Kumiko MATSUURA, Yoshiyuki NAGAI, Kyoko ENDO, Keiko TANAKA, Jun KANAKI, Yuichi TANAKA and Yukiko NAKAMURA	
Epidemiological Surveillance of Influenza Virus Infection in Toyama Prefecture.....	91
Kumiko MATSUURA, Masae IWAI, Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA, Shuji ANDO, Yoshiyuki NAGAI, Keiko TANAKA, Jun KANAKI, Kyoko ENDO, Yuichi TANAKA, Yukiko NAKAMURA and Hideki MIYATA	
Outbreaks of Gastroenteritis Caused by Norwalk-like Virus (NLV) in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2001	99
Sumiyo HASEGAWA, Kumiko MATSUURA, Takashi NAKAYAMA, Shuji ANDO and Yoshiyuki NAGAI	
Salmonella Surveillance in River Water in an Urban Area of Toyama City.....	103
Junko ISOBE, Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI, Miwako SHIMIZU and Koji KATORI	
Serotypes and Drug Susceptibilities of the Hemolytic Streptococci in Toyama Prefecture	111
Daisuke TANAKA, Miwako SHIMIZU, Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE,	

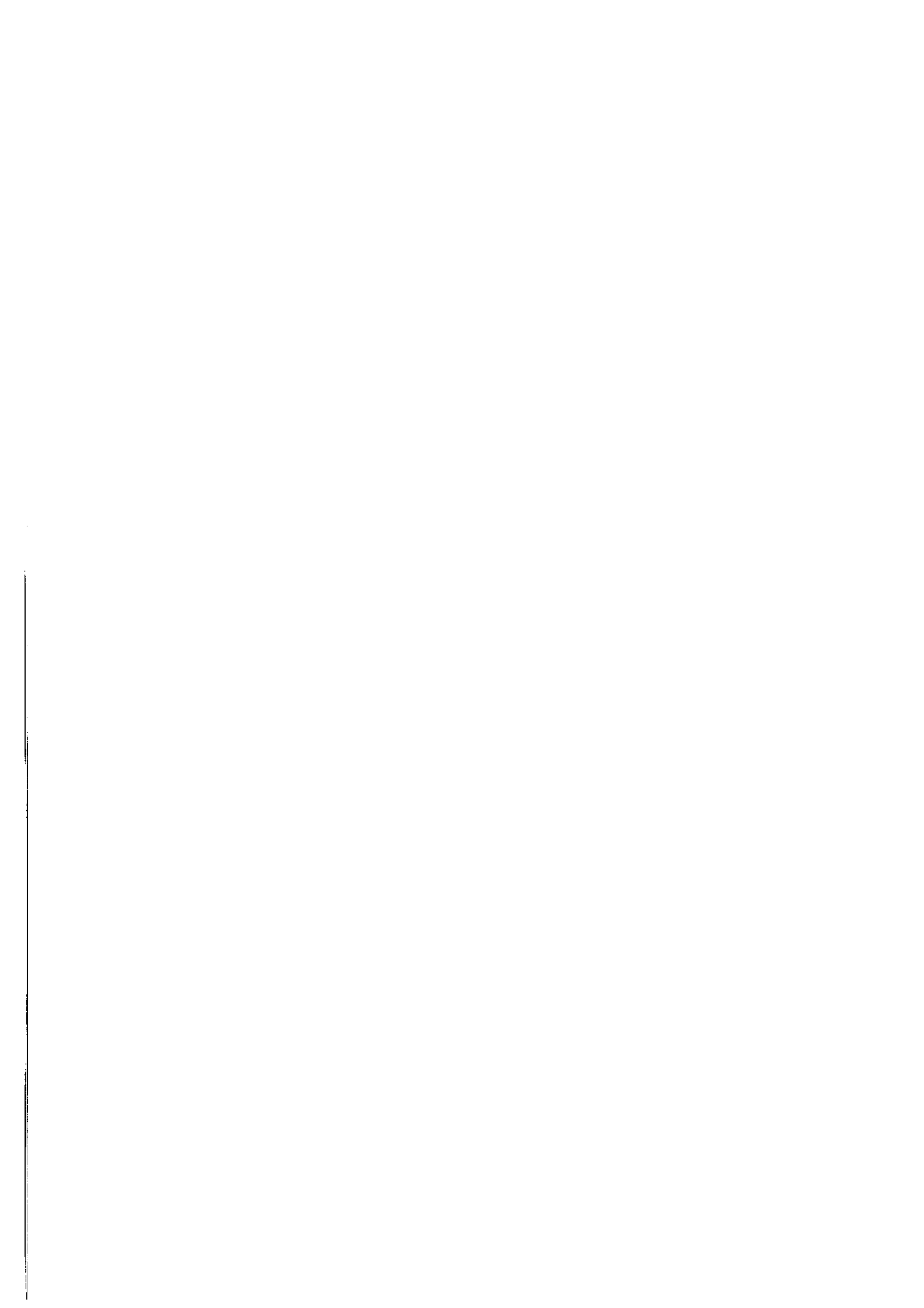
Yotaku GYOBU, Koji KATORI, Kiyoshi HAYASHI, Masao NAKAMURA, Miyoko ENDO	
Distribution of Pharyngeal Hemolytic Streptococci among Healthy Children	115
Daisuke TANAKA, Junko ISOBE, Shiho HOSOROGI, Miwako SHIMIZU, Nagai Yoshiyuki, Keiko TANAKA, Yuichi Tanaka	
Isolation and Analysis of Psychrophilic Coliforms from River Water, Soil and Human Feces	118
Yotaku GYOBU, Miwako SHIMIZU, Daisuke TANAKA , Shiho HOSOROGI , Junko ISOBE , Koji KATORI and Yoshiyuki NAGAI	
Production of Shiga and Shiga-like Toxins by Enterohaemorrhagic Escherichia coli Isolated in Toyama Prefecture	124
Yotaku GYOBU, Miwako SHIMIZU, Shiho HOSOROGI, Daisuke TANAKA, Junko ISOBE and Yoshiyuki NAGAI	
Enteropathogenicity of Principal Virulence-factor-negative Escherichiae coli from Diarrheal Patients	129
Yotaku GYOBU, Kiyohisa HIRATA, Miwako SHIMIZU, Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE and Yoshiyuki NAGAI	
Polychlorinated Biphenyl and Organochlorin Pesticide Residues in Unhatched Eggs of Golden Eagles	135
Yukio SAITO, Akinobu MATSUNAGA, Kazuyori MAMIYA, Sumitaka YUASA and Kohichi MURAKAMI	
Investigation of Lead Concentration in the Tap Water Provided through the Lead Pipe	140
Nobutaka TAKAYANAGI, Tomoko KEMMEI, Akinobu MATSUNAGA, Hajime UENO and Akio KANAYA	
Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAH) by Sea Depth in Toyama Bay	145
Takashi OHURA, Mikiya OHTO, Akinobu MATSUNAGA	
Effect of Calcium Supplementation on Bone Metabolism in Students of Women's College	149
Tomoko TANAKA, Yuko HORII, Mineko NAKAZAKI, Harumi NISHINO, Toyomi KUWAMORI, Michiyo ISHIZUKA and Eiji OOURA	
Relationship of Bone Mineral Density and Bone Metabolic Markers to Post Menarche Period and Lifestyle-related Factors during Bone Mass Acquisition in Girl Students	155
Yuko HORII, Mineko NAKAZAKI, Tomoko TANAKA, Harumi NISHINO and Takashi YAMAGAMI	

Notes

- Studies on the Micronucleus Induction in Mouse Peripheral Blood Erythrocytes
by Rice Bran Oil Extract163
Sachiko HONDA and Mikiko HAYASHI
- Prevalence of *Coxiella burnetii* among Companion Animals and Its Owners
in Toyama Prefecture167
Shuji ANDO, Mitsuhiro ISHIKURA and Yoshiyuki NAGAI
- Detection of Viruses and Rickettsiae from Infectious Diseases in Toyama Prefecture,
April 2001 to March 2002170
Masae IWAI, Takashi NAKAYAMA, Shuji ANDO, Sumiyo HASEGAWA,
Kumiko MATSUURA and Yoshiyuki NAGAI,
- A case of Mixed Infection due to Influenza Virus Type A(H3) and Type B172
Kumiko MATSUURA, Koji KATORI, Yoshiyuki NAGAI, Akio MASAKI
and Yuichi TANAKA
- Behavior of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in Tenderized Cubic Beef
under Heat Treatment176
Junko ISOBE, Shiho HOSOROGI, Daisuke TANAKA, Miwako SHIMIZU,
Koji KATORI and Yoshiyuki NAGAI
- Vibrio parahaemolyticus* Surveillance at Fishing Ports in Toyama Prefecture179
Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE, Daisuke TANAKA, Miwako SHIMIZU,
Koji KATORI, Yotaku GYOBU, Yoshiyuki NAGAI, Takashi TAKEUCHI
- Isolation of Pathogenic Bacteria in Toyama Prefecture in 2001183
Miwako SHIMIZU, Shiho HOSOROGI, Daisuke TANAKA, Junko ISOBE,
Yoshiyuki NAGAI
- Haloacetic Acids Determination in Tap Water in Toyama Prefecture by Using Liquid
Chromatography/Mass Spectrometry186
Mikiya OHTO, Atushi YAMAMOTO and Akinobu MATSUNAGA
- Quality Control of the Physicochemical Testing of Food189
Yukio SAITO, Mikiya OHTO, Akinobu MATSUNAGA and Ichiro OZAKI
- On the External Quality Control of the Quantification of Lead and Iron in Water194
Tomoko KEMMEI, Nobutaka TAKAYANAGI and Akinobu MATSUNAGA

1. 運

營



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公布され、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。
平成12年7月1日	衛生研究所内に富山県感染症情報センターを設置。

(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	3,044.59㎡
" (動物飼育)	" 平屋建	241.76
車 庫	鉄骨造平屋建	34.56
薬 品 庫	コンクリートブロック造平屋建	20.60
ボ ン ベ 庫	"	17.54
R I 排 水 庫	"	26.65
廃 水 処 理 庫	"	13.57
渡 り 廊 下	鉄 骨 造	40.50
機 械 室	鉄骨造平屋建	39.24
合 計		3,479.01

(3) 職 員 数

(平成14年5月1日現在)

区 分	所・次長 部・課長	主 幹	主 幹 研究員	副主幹	副主幹 研究員	主 任 研究員	主 事	研究員	主 任 業務技師	嘱 託	計
所 長	1										1
次 長	1										1
総 務 課	1			1			1		2		5
がん研究部	1				5	1					7
ウイルス部	所 長 事務取扱				4	1		1			6
細菌部	所 長 事務取扱					2		3		1	6
化 学 部	1		3		1	3					8
環境保健部	1	1			2	2		1			7
合 計	6	1	3	1	12	9	1	5	2	1	41

(4) 職 員 一 覧

(平成14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	永 井 美 之	1.2	所内事務総括
次 長	坂 森 寛 治	0.2	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	3.2	人事, 予算, 出納員業務及び課内事務総括
副 主 幹 (会計員)	加 納 晴 美	3.2	予算経理, 決算, 物品購入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	4.2	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	9.2	実験動物の飼育管理, 滅菌洗浄室の管理
“	高 田 宏	1.2	公用車の操車, 整備保全業務
がん研究部長	加 藤 丈 士	1.2	部内事務総括及びがんの疫学研究
副主幹研究員	渡 辺 護	33.4	衛生・不快害虫の検査研究及び防除対策に関する調査研究
“	本 田 幸 子	31.8	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	31.7	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	8.2	先天性代謝異常マスキングの検査及び調査研究
“	品 川 保 弘	12.1	がん発生要因の実験的調査研究
主任研究員	九 曜 雅 子	18.11	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	中 山 喬	32.2	ポリオ流行予測調査, 感染症発生動向調査病原体検査研究
“	松 浦 久美子	37.2	インフルエンザ流行予測調査, 感染症発生動向調査病原体検査研究, 河川水のウイルス調査研究
“	長谷川 澄 代	30.6	日本脳炎流行予測調査, 感染性胃腸炎・ウイルス性食中毒検査研究
“	庄 司 俊 雄	24.1	感染症情報センターの運営, 患者発生情報解析
主任研究員	安 藤 秀 二	5.2	H I V検査, 動物由来感染症調査研究, リケッチア感染症調査研究
研 究 員	岩 井 雅 恵	1.2	ポリオ流行予測調査, 感染症発生動向調査病原体検査研究, 河川水のウイルス調査研究

職名	氏名	当所 勤続年数	主な担当事務
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	12.2	細菌性感染症の検査研究, 細菌性食中毒の原因究明及び食品の細菌学的検査研究
〃	田中 大祐	10.2	呼吸器系病原細菌の調査研究, 原虫の検査, 感染症情報センターの運営
研究員	細呂木 志保	11.1	水, 医薬品及び環境細菌の検査研究, 細菌のDNAの研究
〃	清水 美和子	2.2	病原体検出情報の収集, 還元, 深層水に関する調査研究
〃	木全 恵子	0.2	細菌の検査法と病原性の研究
嘱託	刑部 陽宅	3.2	真菌の試験, 検査
化学部長	松永 明信	28.1	部内事務総括及び富山湾深層水の特性解明
主幹研究員	大浦 徹	7.2	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	20.2	温泉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	24.2	食品中の添加物及び残留農薬等の調査研究
副主幹研究員	山本 敦	23.2	食品中の成分及び器具・容器・包装等の調査研究
主任研究員	小玉 修嗣	8.4	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	18.2	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	16.8	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	荒谷 哲雄	0.2	部内事務総括, 農薬等生体中有害物質の調査研究
主幹	長瀬 博文	0.2	カドミウム等環境化学物質の健康影響, 生活習慣病の疫学的調査研究, 深層水の海洋療法の調査研究
副主幹研究員	新村 哲夫	30.1	環境ホルモン等の生体中微量有害物質の調査研究, 深層水分析・海洋療法の調査研究
〃	田中 朋子	24.5	肥満体質遺伝子等生活習慣病の診断・予防の生化学的調査研究
主任研究員	中崎 美峰子	17.1	農薬等環境変化に基づく生活習慣病発症要因の生化学的調査研究
〃	堀井 裕子	15.1	骨粗しょう症等生活習慣病予防の生化学的調査研究, 神通川流域住民健康調査
研究員	中山 恵理子	3.2	環境保健にかかわる検査

(5) 予 算 概 要

平成 13 年 度
予 算 概 要 (当初)

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 88,411	千円 3,895	千円 84,516	衛生研究所の運営, 維持管理, 試験検査等
試験研究費	13,129		13,129	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	7,540		7,540	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	2,182		2,182	
がん等特別研究費	11,783		11,783	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	123,045	3,895	119,150	

平成13年度 歳入決算

款 項 目 節	決 算 額	備 考
	円	
使用料及び手数料	7,563,238	
手 数 料	7,563,238	
衛生手数料	7,563,238	
衛生研究所	2,634,608	〔収入証紙 1,110,256 納入通知 1,524,352
環境衛生検査	4,928,630	
諸 収 入	152,730	〔収入証紙 835,520 納入通知 4,093,110
雑 収 入	152,730	
雑 収 入	152,730	
納 付 金	26,730	
雑 収 入	126,000	
合 計	7,715,968	

平成13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				
				4,261,052				
				448,852				
				448,852				
			賃金	24,240				
			旅費	374,612				
			負担金補助及び交付金	50,000				
			企画費	3,812,200				
			計画調査費	3,812,200				
			賃金	455,160				
			報償費	120,000				
			旅費	921,389				
			需用費	1,689,651				
			役務費	75,000				
			備品購入費	441,000				
負担金補助及び交付金	110,000							
民生費	児童福祉費	児童福祉対策費		15,315,890				
				15,315,890				
				15,315,890				
			賃金	1,614,560				
			旅費	110,330				
			需用費	13,502,000				
			役務費	89,000				
			衛生費	公衆衛生費	公衆衛生総務費		162,328,409	
							140,873,026	
							347,441	
共済費	347,441							
予防費	13,696,740							
賃金	1,302,300							
報償費	24,000							
旅費	355,740							
需用費	9,716,000							
役務費	561,000							
使用量及び賃借料	652,000							
備品購入費	1,085,700							

款	項	目	節	決 算 額	摘 要
				円	
		環境保健対策費		14,498,860	
			賃 金	892,160	
			旅 費	146,000	
			需用費	3,823,000	
			諸 費	13,000	
			役 務 費	55,000	
			使用料及び賃借料	9,569,700	
		衛生研究所費		112,329,985	
			報 酬	3,600,000	
			共 済 費	770,852	
			賃 金	10,038,145	
			報 償 費	90,000	
			旅 費	2,852,110	
			需用費	63,507,000	
			諸 費	213,480	
			役 務 費	3,009,000	
			委 託 料	17,132,391	
			使用料及び賃借料	223,997	
			備品購入費	10,474,810	
			負担金補助及び交付金	405,000	
			公 課 費	13,200	
	環 境 衛 生 費			21,030,272	
		環境衛生総務費		12,257,099	
			賃 金	581,990	
			旅 費	278,135	
			需用費	9,256,624	
			役 務 費	19,000	
			委 託 料	1,260,000	
			備品購入費	847,350	
			負担金補助及び交付金	14,000	
		食品衛生指導費		8,644,513	
			賃 金	112,000	
			旅 費	484,313	
			需用費	7,963,000	
			役 務 費	10,000	
			使用料及び賃借料	75,200	

款	項	目	節	決算額	摘要
				円	
		環境衛生指導費		100,000	
			需用費	100,000	
		水道指導費		28,660	
			旅費	28,660	
	保健所費			106,106	
		保健所費		106,106	
			需用費	106,106	
	医務費			27,005	
		医務総務費		27,005	
			旅費	27,005	
	公害防止費			292,000	
		公害防止対策費		292,000	
			需用費	292,000	
商工費				107,000	
	工鉦業費			107,000	
		工鉦業総務費		107,000	
			役務費	107,000	
教育費				150,000	
	大学費			150,000	
		教育研究費		150,000	
			旅費	150,000	
	合	計		182,162,351	

重要備品一覽

(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
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
炭酸ガス培養装置	57. 9. 30	1	“ 3158型
“	57. 9. 30	1	ナプコ 5200型
赤外線放射温度計	57. 10. 20	1	三栄測器 6T53
ガスクロマトグラフ	57. 10. 12	1	島津 GC-7APrFFT型
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
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
超低温槽	58. 3. 24	1	フォーマ 8138型
炭酸ガス培養装置	58. 3. 31	1	フォーマ 3158型
酸素免疫システム	58. 3. 31	1	三光純薬 MR580ミニオウオッシャー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
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 VIIA
分光光度計	62. 9. 10	1	日立 U-2000

品名	購入年月日	数量	型式
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-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. 30	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
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 ジーンアッセンプラースペシャル
マイクロプレートウォッシャー	5. 3. 10	1	米国ダイナテック ウルトラウォッシャー 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
バージ&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

品名	購入年月日	数量	型式
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	フォーマー 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
超低温槽	8. 10. 9	1	レブコ製 ULT-1786
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
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

品名	購入年月日	数量	型式
高速液体クロマトグラフ用オートインジェクター	10. 7. 10	1	島津製作所 SIL-10ADVP
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	レプコ 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	レプコ 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
高速液体クロマトグラフ装置	12. 6. 30	1	横河アナリティカルシステムズ社製 HP1100
マイクロプレートリーダー	12. 9. 13	1	日本バイオラッド
分離用超遠心機	12. 11. 30	1	日立CP100MX
パルスフィールド電気泳動装置	12. 12. 15	1	日本バイオラッドCHEF-DRⅢチラーシステム
透過型電子顕微鏡	13. 3. 5	1	日製産業(株) 日立H-7600形
落射型蛍光顕微鏡	13. 3. 15	1	オリンパスBX51-34-FL-2
高速液体クロマトグラフ装置のダイオードアレイ検出器	13. 9. 28	1	横河アナリティカルシステムズ社製
染色体分析制御装置	13. 11. 30	1	カールツァイス社製(イカロス)
染色体核型分析用画像処理システム	13. 11. 30	1	カールツァイス社製(イカロス)
大型フリーザー	14. 2. 15	1	SANYO MDF-U50V

(平成14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13年度の検体総数は11,574件で、県内57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95.4%（里帰り分娩を含めると109.1%）であり、前年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および先天性副腎過形成症の6疾患である。検査の結果、要精密検査として55人（フェニルケトン尿症疑い3人、ホモシスチン尿症疑い3人、メイプルシロップ尿症疑い1人、先天性甲状腺機能低下症疑い36人、先天性副腎過形成症疑い12人）がスクリーニングされ、クレチン症6人および良性高フェニルアラニン血症1人の患者が発見された。

染色体検査

平成13年度の検査受付件数は、血液78件、羊水83件、自然流産胎児22件の計183件で、うち、染色体異常を示したものは、血液7件（クラインフェルター症候群1件、ターナー症候群1件、均衡転座保因者5件）、羊水5件（21トリソミー型ダウン症候群2件、18トリソミー症候群1件、均衡転座保因者1件、9pトリソミー症候群1件）、流産胎児13件（ターナー症候群4件、21トリソミー型ダウン症候群2件、?4トリソミー1件、14トリソミー1件、22トリソミー1件、22トリソミーモザイク1件、三倍体1件、47,XXY,der(1)t(1;7)1件、47,XY,t(8;15),+15 1件）の計25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、羊水では高齢妊娠、流産胎児では流産を繰り返すが最も多かった。

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5カ所の畜舎で昨年に引き続き行った。13年度のコガタアカイエカの発生状況は西部では減少したが、東部では前年度よりも増加した。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7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16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1,714件の依頼を行った。

〔調査研究〕

がん発生要因に関する研究

胃癌発生背景要因の疫学的研究の結果に基づき、上水道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要因をさぐるための症例対照研究を継続している。平成13年度は症例として男性24名（平均年齢66.3歳）、女性18名（平均年齢67.6歳）について、対照として男性24名（平均年齢65.8歳）、女性30名（平均年齢66.3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

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるガラクトース血症マススクリーニング検査法の開発を行った。検査指標となるガラクトースを還元アミノ化法により蛍光標識を行ない、カラムスイッチング

により過剰のラベル化剤を除去してHPLCを行う方法を検討した。ラベル化剤には2-アミノ安息香酸を、還元剤としてシアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いて乾燥ろ紙血液中のガラクトースを高感度に検出できた。また、この方法を、より短時間に分析可能で、操作性の良い方法に改良した。改良内容は蛍光ラベル化時に用いる還元剤をボランジメチルアミン錯体に変更し、また、移動相中のカウンターイオンを1-ブチルアミンからテトラ-n-ブチルアンモニウムスルフェートに変更した点などである。

遺伝子易損傷性に関する研究

DNAへの損傷を簡便に検出することのできるアルカリシングルゲル電気泳動法およびアルカリシングルゲル電気泳動法を用いたDNAクロスリンク物質の検出法の確立を行った。アルカリシングルゲル電気泳動法を用いた方法では、DNAクロスリンク物質は一見DNA損傷抑制物質として検出される可能性があり、そのため、経胎盤性発ガン物質のジエチルスチルベステロールと炭酸リチウムおよび培養酸濃度の相乗効果について、DNAクロスリンク物質の検出法を用い検討した結果を検討中である。

姉妹染色分体交換法に関する研究

染色体異常等の先天異常発生要因追求の一環として、DNA損傷の指標となる姉妹染色分体交換法とアルカリゲル電気泳動法の比較を行った結果、姉妹染色分体交換法の方がより感度の高い結果が得られた。しかし、姉妹染色分体交換法は細胞分裂を行うことのできた特定の細胞のDNA修復の結果を観察するのに対し、アルカリゲル電気泳動法は修復前のDNA損傷を検出することと、全ての細胞を対象としていることから、さらに詳細に検討中である。

環境汚染物質等の突然変異原性に関する研究

既存天然添加物・コメヌカ油の安全性を調査するため、マウス末梢血を用いた小核試験法により、その変異原性を検討した。その結果、有意な小核誘発頻度の上昇は認められなかった。

衛生動物に関する研究

イヨシロオビアブ（オロロ）の効果的な吸血被害阻止法として、トラップによる誘殺を利賀村、福光町および新潟県青海町で実践的検討を行ったところ良好な成績が得られた。また、家屋侵入性カメムシ（ヘクサンボ）に対して天然テルペン製剤の忌避・殺虫活性を実地試験で評価したところ、殺虫活性は従来のピレスロイド系殺虫剤に比べ低いが、実用が可能であることが示唆される成績が得られた。

ウ イ ル ス 部

〔行政検査および依頼検査〕

感染症発生動向調査病原体検査および保健所等から依頼のあった検体についてウイルス分離検査を実施した。インフルエンザおよび呼吸器系疾患88例の検体からは、インフルエンザ以外のウイルスは分離されなかった。これらの検体の多くはインフルエンザ流行予測調査を兼ねており、インフルエンザウイルスの分離状況については、本年報に掲載されている流行予測調査の報告を参考にされたい。インフルエンザ脳症を疑った4例からインフルエンザウイルスA（H1）型およびB型がそれぞれ1株分離された。食中毒3事例中2事例においてノーウォーク様ウイルス（NLV）が検出された。感染性胃腸炎・下痢症55例ではA群ロタウイルス、ノーウォーク様ウイルス、アデノウイルスが検出された。手足口病においてはコクサッキーウイルスA16型が分離された。リケッチア関係では、ツツガムシ病が疑われた2件のうち1件からツツガムシ病リケッチア遺伝子が検出された。本年度は、インフルエンザおよび感染性胃腸炎を除いて、富山県内ではウイルス性疾患の流行は少なかった。

[動物由来感染症実態調査]

平成12年度までに、感染源としての愛玩動物の犬猫と一部産業動物について、Q熱をモデルに調査検査体制の構築を行ってきた。平成13年度からは、野生動物が関連する動物由来感染症の発生監視体制の確立を目的に、「①富山県は、環日本海諸国との経済交流の玄関として、腎症候性出血熱 HFRS の常在発生地である韓国、中国ならびにロシアからの輸入物資とともに同疾患が侵入する可能性があること。②過去に同疾患に対する抗体陽性の野鼠が本県でも確認されたこと。③ライム病の患者発生が確認されていること。」より、アカネズミ102匹、ヒメネズミ6匹、ハタネズミ24匹、ドブネズミ7匹、スミスネズミ6匹、その他2匹の計147匹を対象として野生げっ歯類における動物由来感染症の浸淫調査を行った。対象疾患として腎症候性出血熱、ライム病、さらにQ熱、つつが虫病について検討した。

抗体検出を行った腎症候性出血熱ならびにQ熱に関しては全て陰性であった。つつが虫病に対する抗体は流行地で捕獲された野鼠は抗体陰性であり、同地域の自然環境でのつつが虫病リケッチアの浸淫状況が薄まっている可能性を示唆した。ライム病に関しては病原体の分離を試み、供試した85検体のうち3件から *Borrelia* 属がPCRにより検出された。国内でヒトにライム病を起こすことが確認されているものは *B. afzelii*, *B. garinii* の2種であるが、今回検出したものは種の同定までには至っていない。

[HIV抗体検査]

平成13年4月から平成14年3月までの1年間に130件の検体について抗体スクリーニングを行い、内4件について確認検査ならびにフォローアップを行ったが全て陰性であった。本年度は血液製剤によるHCVの同時感染が問題となり、6月から10月に併せてHCVスクリーニング検査を行った。期間中12件について実施し、全て陰性であった。

[流行予測]

日本脳炎：県内5ヶ所の定点におけるコガタアカイエカの発生調査（6月～9月）と、県内産ブタにおける日本脳炎ウイルスHI抗体保有状況調査（7月上旬～10月上旬）を実施した。抗体保有調査においては、日本脳炎ウイルス新鮮感染の指標である2-ME感受性抗体が、9月上旬から調査終了の10月上旬まで確認され、9月中旬には本県も日本脳炎推定汚染地域に指定された。しかし、コガタアカイエカの発生調査の結果では、例年蚊の発生数がピークとなる7～8月の盛夏における蚊の発生が少なく、発生のピークが9月中旬にずれこんだ。そのため、日本脳炎ウイルスを保有したコガタアカイエカに人が刺される機会が少なく、日本脳炎患者の発生がなかったと推測された。

ポリオ：厚生労働省委託事業の感染源調査と県単独事業の感受性調査を実施した。感染源調査では、平成13年秋季ポリオワクチン投与終了後、2ヶ月以上経過した平成14年1月から2月にかけて、0歳から6歳までの乳幼児58名から糞便を採取し、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型が2株、コクサッキーウイルスA9型が1株、エコーウイルス22型が1株分離された。ポリオウイルス2型2株について国立感染症研究所に抗原分析を依頼した結果、2株ともワクチン由来ポリオウイルスであった。感受性調査（平成13年7～9月）は226名（0歳～69歳）の血清についてポリオウイルスに対する中和抗体を測定した。抗体価4倍以上の抗体保有率は、1型に対して93.4%、2型では98.2%、3型に対しては78.8%であり、ポリオ流行を十分阻止しうる抗体保有状況であった。これらの結果から、本県においては野生型ポリオウイルスの流行はないものと推測された。

インフルエンザ：インフルエンザの予防と蔓延の防止のために、感受性調査（平成13年7～9月）および感染源調査（平成14年1～4月）を実施した。感受性調査は、富山県民226名（0～68歳）を対象として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HI抗体価40倍以上の保有率は低く（0～28%）、今シーズンも流行する可能性が示唆された。特にB型のB/Akita/27/2001株に対する抗体保有者は非常に少ないので、この株による流行が始まると蔓延が懸念された。感染源調査では、インフルエンザ患者は1月から4月までの長期間にわたりA（H1）型、A（H3）型およびB型ウイルスによって発生した。これらの患者のなかには、A（H3）型とB型の混合感染が1名認められた。ウイルス型別、月別に検出状況をみると、A（H1）型感染者は1月から3月上旬、A（H3）型感染者は2月から4月、B型感染者は1月から4月上旬まで発生していた。B型感染者が長期間発生したのは、流行株がワクチン株と異なるB/Akita/27/2001株に類似した株で、流行前の県民における抗体保有率が非常に低い状況であったことによると推測された。これらのインフルエンザ流行状況やウイルス検出状況についての「インフルエンザ情報」を、富山県感染症情報センターのホームページに毎週掲載して県民に提供した。

[調査研究]

河川水、下水から分離されたウイルスの分子生物学的解析：1979以来、河川水や下水についてウイルス学的調査研究を実施している。また、1997からはこれらの調査で分離されたポリオウイルスについて遺伝子解析を行い、分離株全てがワクチン由来株であることや、遺伝子の塩基配列に変異を起こした株が存在すること等、その成果を専門誌あるいは学会等で発表してきた。本年度も引き続き分子生物学的解析を行うとともに、平成14年度から第4次河川水のウイルス学的調査を実施する予定で準備を進めた。

紅斑熱群リケッチアの分布調査：動物由来感染症実態調査により捕獲された野鼠141匹を対象に紅斑熱群リケッチアの感染状況をスクリーニングしたところ、アカネズミ96匹中64匹（66.7%）、ドブネズミ7匹全て（100%）が抗体を保有していた。ハタネズミ、ヒメネズミ等の他の野鼠は抗体を保有していなかった。紅斑熱群リケッチアは免疫学的に交叉反応性が高いため、またこれまでヒトの疾患である日本紅斑熱の患者の報告が県内では無いため、野鼠に感染している紅斑熱群リケッチアがどのようなグループに属するものか分子生物学的に解析していく予定である。

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事例について：2001年4月から2002年3月までの1年間に発生した、ウイルス性の感染性胃腸炎の集団発生事例についてまとめた。2001年度中に調査したウイルス性急性胃腸炎の集団発生は5事例であった。その結果、5事例全てにおいてノーウォーク様ウイルス（NLV）が検出された。集団事例の患者発生前後において無症状であったが、関連調査として採取した検体からもNLVが検出された。検出されたNLVの遺伝子型（酵素抗体法による）はすべてGⅡであった。各事例間の関連性はなく、また、各事例における感染経路等について解明は出来なかった。しかし、発症者ばかりでなく、無症状のヒトからもウイルスが検出されたことは、集団発生における規模拡大の要因のひとつであると考えられた。

[ウイルス性感染症検査マニュアルの作成]

感染症マニュアル作成委員会検査関係部会において、作成した内容の加筆・修正を行うと共に、他の部会との調整を行った。

[富山県感染症情報センター]

県内の感染症発生動向調査指定届け出機関67定点から、各所轄保健所へ毎週報告される患者発生数に基づいて全県の集計を行い、結果を国立感染症情報センターへ送信するとともに全国の集計結果を受け取り、県内関係医療機関に情報を還元した。平成13年1月から12月まで富山県平均定点あたり各週発生率第1位を占めた主な疾病は、1～2月、5～6月および11～12月は感染性胃腸炎、3～4月はインフ

ルエンザ、7～8月はヘルパンギーナ、9～10月は流行性耳下腺炎であった。富山県感染症情報センターでは、県内および全国の感染症発生動向の情報を速報あるいは週報の印刷物として関係医療機関へ毎週送付するとともに、インターネット上に開設した富山県感染症情報センターホームページで一般公開している。

細菌部

〔感染症、食中毒に関わる行政検査〕

2類感染症：腸管感染症では、赤痢3件、パラチフス1件の発生があり、保健所から搬入された菌株について血清型及び薬剤感受性を検査した。赤痢菌の菌種は2株がB群（フレキシネリ3aおよび不明）、1株がD群（ソンネI相）であった。フレキシネリはいずれも海外渡航歴無しの国内感染で、型不明の1株は、近年、東京都等で報告されている新しい型 *Shigella flexneri* 89-141である可能性が高かった。ソンネは中国旅行者からの分離であった。パラチフスAは、1995年以後の分離で、ファージ型は1であった。

3類（腸管出血性大腸菌）感染症：平成13年度の感染事例は48件、88名で、原因菌の血清型はO157：H7（41件、74名）、O26：H11（7件、14名）であった。分離された菌株について感染経路を解明するため、関連性が疑われた株を中心に、染色体DNAの制限酵素切断パターンによる遺伝子解析をおこなった。本年は、感染者が1名の散発事例がO157：H7 25件、O26：H11 4件（計29件）と全体のおよそ50%を占めたが、これらのうち7月～8月に分離されたO157 7事例の分離株のDNAパターンは同一であった。同じ時期に発生した感染者2人以上の集団発生例分離株もこれら散発事例分離株と同じDNAパターンを示した。DNAパターンは、富山県だけでなく、一部の地域を除く全国各地で分離されたO157とも一致していた。感染源として広く流通した食品が疑われたが、富山県のいずれの事例においても感染源は明らかにならなかった。

細菌性食中毒：細菌性食中毒は患者数2名以上の事例が7件発生し、患者便からの原因菌分離と分離菌の血清学的、生化学的検査をおこなった。サルモネラ食中毒（3件）については、分離菌のパルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子解析もおこなった。このうち1件は、原因菌の血清型が *S. Tennessee* で、分離株の染色体DNA切断パターンはすべて同一であった。また、ウェルシュ菌食中毒（1件）については、当所と保健所で患者から分離されたウェルシュ菌についてその毒素産生性等を調べた結果、調理従事者からの1株を除き、すべてエンテロトキシンを産生した。

〔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53件の成分規格試験をおこなった。すべての検体で大腸菌群が陰性であった。また、食品の夏期一斉取締りの一環として、生食用鮮魚介類（刺身等）37検体について腸炎ビブリオの定性、定量をおこなった。その結果、すべての検体が成分規格基準に合致していた。その他、苦情食品7検体について、異物、カビ等の検査をおこなった。（2）水質関係：生活環境部および富山市の依頼で海水浴場水（8定点、のべ148検体）の糞便性大腸菌群数測定をおこなった。いずれも水質が良好な「AA」または「A」ランクで「適」であった。このうち30検体について腸管出血性大腸菌O157検索をおこなったがすべて陰性であった。（3）水道水源水のクリプトスポリジウム検査：富山県内で水道水源として利用される河川水60検体について汚染の指標とされる糞便性大腸菌群と嫌気性芽胞菌を検査した。これらのうち、本年を含む過去4年間のいずれかで指標菌陽性であった河川水についてクリプトスポリジウムの検査をおこなった。本年度は19検体について検査をおこなったが、結果はす

べて陰性であった。(4)腸炎ビブリオ検査：通称「VPマリン」事業として、6月から11月にかけて県内5漁港の海水、海泥の腸炎ビブリオを定期的に調べた。その結果、腸炎ビブリオ数は、海水100mlあたり $<3\sim 2.4\times 10^2$ 、海泥100gあたり $<30\sim 7.5\times 10^4$ の範囲であった。

炭疽菌検査：平成13年9月、米国において「同時多発テロ」が発生し、同時に炭疽菌に汚染された郵便物によって炭疽症の患者が発生した。わが国においても同様の事件発生が危惧されることから、その対応について、厚生労働省より通知（平成13年10月4日付）がだされたのをはじめ、「病原微生物等の管理の強化について」、「炭疽菌等の汚染のおそれのある郵便物等の取り扱いについて」の通知が出された。これらの通知を受けて、当所においても、厚生部医務課及び富山県警察本部を中心とした関係機関と協議を重ね、連絡網、検査体制等の対応について検討した。平成13年10月25日から11月5日の間に富山県内で発見された郵便不審物3検体について炭疽菌の検査を実施した。その結果、いずれの検体からも炭疽菌は検出されなかった。また、今後の対応として、菌株の管理を強化、徹底し、レベル3の病原細菌に対応できるよう、細菌部内にP3対応の実験室を整備することとなった。

依頼検査：民間企業より依頼されて検査した検体は医薬部外品6件で、そのすべてが抗菌試験であった。

【流行予測事業、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：県単独流行予測事業として溶連菌の保菌状況を、東西2ヵ所の保育園児対象に調べた。保菌者は県東部の保育園で48名中3名（A群T3型：1株、A群T4型：1株、A群T28型：1株）で、県西部の保育園40名中10名（A群T12型：10株）であった。また、病院で分離された溶連菌を型別すると、検出率の高い型は、A群では順に、T1型、T12型、T25、TB3264型であり、B群では順に、NT6型、JM9型、Ib型、V型であった。

病原細菌検出情報：県内10か所の病院と保健所における糞便からの病原菌の検出数は、1,754株、前年比111%で、最も多かったのは大腸菌の692株、以下黄色ブドウ球菌590株、カンピロバクター143株、サルモネラ118株、ウェルシュ菌91株、腸炎ビブリオ63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おこなった。富山市内河川水では、分離率20/48（41.6%）で、分離菌にはS. Thiphimuriumと血清型不明の(4:i:-)が多かったが、高岡市内河川水では、分離率10/30（33.3%）で、血清型S. Nagoyaが多かった。一方、県内の病院、保健所で分離された菌では、血清型S. Enteritidis, S. Tennessee, S. Typhimuriumが多かった。

大腸菌：(1)平成12年度に発生したファミリーレストランチェーン店でのビーフ角切りステーキを原因とするO157:H7食中毒について、その背景・原因を追求するため、解凍直後のステーキ肉中のO157が加熱によって死滅するかどうか、調理の再現実験を行った。その結果、O157が生き残ることが示された。(2)河川水、畑土およびヒト糞便からの低温性大腸菌群の分離と分析を行った。その結果、低温性大腸菌群は河川水と畑土から73~88%、ヒト糞便から58%の率で検出された。分離菌の多くは7℃で発育するが、44.5℃で発育しないβ-glucuronidase非産生の*K. oxytoca*、*K. pneumoniae*または*C. freundii*と同定された。(3)下痢患者から分離された市販病原性大腸菌血清で凝集する主要な病原因子の遺伝子(*st*, *elt*, *inuE*, *bfpA*, *eaeA*, *aggR*, *astA*)を保有しない大腸菌43株の下痢起病能を乳呑みマウス胃内に生菌を投与する方法で調べた。その結果、5株に病原性が認められたが、その菌体抽出液と培養ろ液に下痢活性は認められなかった。(4)富山県で分離された腸管出血性大腸菌の志賀毒素産生レ

ベルを調べたところ、Stx1産生量は血清型や菌株によりあまり異ならなかったが、Stx2産生量は菌株により、培養条件により大きく異なった。

溶連菌：A群レンサ球菌についてT型別を行うとしばしば型別不能の菌株が存在する。これまでの研究では、患者由来T型別不能株に*emm58*型が多いという成績が得られている。そこで、皮膚感染症患者由来*emm58*型菌を免疫株としてT型別用血清の作製を試みた。作製した血清を用いて、富山県内の病院で分離されたT型別不能株/*emm58*型9株についてT凝集反応を行ったところ凝集が認められた。しかし、T型別用血清としての特異性は充分ではなかったため、さらに、特異性の高いT型別用血清が得られるよう検討している。

腸炎ビブリオ：平成13年6月から11月の期間、県内の5漁港の海水についてPCR法と免疫磁気ビーズ法によりTDH産生性腸炎ビブリオの分布を調べた。海水、海泥100検体のうち、29件からTDH遺伝子が検出された。さらに、TDH産生性のO3:K6を7株分離した。TDH遺伝子、TDH産生菌の検出率には、平成11年以降減少傾向がみられた。

[精度管理]：(1)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、富山市保健所および衛生研究所の7機関を対象に、内部精度管理をおこなった。調査項目は、牛乳の一般生菌数測定とコンビーフの成分規格とした。コンビーフは食肉製品と仮定し、ウェルシュ菌を接種し、配布した。回答結果は、一般生菌数測定およびウェルシュ菌検出のいずれの検査についても、すべての機関で良好であった。(2)外部精度管理：前述の精度管理規定に基づき、外部精度管理調査に参加した。3回、7検体のいずれの検査結果も、結果はおおむね良好であった。

[研 修]

富山医科薬科大学附属病院の検査担当者1名にパルスフィールドゲル電気泳動法について実技研修を行った。また、民間企業の検査担当者2名にレジオネラの検査法について実技研修を行った。

[夏休み子供科学研究室]

「身のまわりの細菌について調べてみよう」というテーマで県内の中学生を対象に実施した。手指に付着した細菌を培養し、顕微鏡観察を行った。その結果、手指に付着していた形態や色の異なる様々な細菌が観察できた。また、手洗いは手指に付着した細菌を洗い流す効果のあることを確認した。

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等

県内で生産されたミネラルウォーターについて、延べ54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、海洋深層水を使用した製品については、揮発性有機化合物等をも調べたが、いずれの有害成分等も検出されなかった。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）等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。

(2) 残留農薬

県内産主要農産物の玄米、トマト等の6種17検体について、厚生省通知の残留農薬迅速分析法で有機リン系（フェニトロチオン等）、含窒素系（フルトラニル等）、N-メチルカーバメート系（フェノブカルブ等）、ピレスロイド系（ペルメトリン等）、有機塩素系（フサライド）の71農薬（77成分）を調査した。玄米1検体からフェニトロチオンが0.02ppm（残留基準値0.2ppm）、フェノブカルブが0.11ppm（1.0ppm）検出された。ぶどう2検体からはペルメトリンが0.05、0.14ppm（5.0ppm）、ほうれんそう1検体からはピレスロイド系のシベルメトリンが0.72ppm（2.0ppm）、トマト1検体からはピレスロイド系のシフルトリンが0.06ppm（2.0ppm）検出された。その他の検体は全て不検出であった。

(3) 重金属等

富山湾産魚介類について、16魚種20検体（かつお、かれい等）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0.01～0.21ppm（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、いずれも不検出（0.02ppm未満）であった。

(4) 食品容器

ポリカーボネート製容器4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9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検体についてディ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

WHOは飲料水の水質ガイドライン（1993）で鉛の基準値0.01mg/Lを勧告している。我国では平成15年度から、基準値が0.05mg/Lから0.01mg/Lに強化される。水道本管から家庭へ導水する給水管に旧来は鉛管が利用されてきた。現在でも鉛給水管を使用している場合には、鉛が停滞水へ溶出して水質基準を超えることが懸念されている。富山県内の鉛給水管を使用している水道水の鉛濃度実態調査を行った。停滞水では新基準値の0.01mg/Lを超えるものがあったが、停滞水を排出した後の流水では新基準値を超えるものはなかった。鉄、亜鉛、銅、マンガンの溶出状況は、停滞時間の長い水でマンガンが基準を超えるものが一例あったが、その他はすべて基準を超えるものはなかった。また、金属濃度やpH、残留塩素及び滞留時間等との相関関係を調べたところ、停滞水における停滞時間と鉛及び亜鉛の間に高い正の相関係数がみられた。一方、流水では金属濃度がランゲリア指数に依存することが示唆され、すでに鉛低減化対策として行われているpH調整、腐食防止剤の使用等の対策の有効性を支持するものと考えられる。

水道水の全項目試験（理化学44項目）13検体及び井戸水等（23検体）の検査を行ったが、すべてが基準に適合した。

(2) 監視項目

水道原水23検体及び浄水16検体について、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32項目の検査を行った。消毒副生成物のトリクロロ酢酸が3検体から指針値の1/100程度検出され、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13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45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28件(再分析14件、浴槽水14件)及び小分析1件(新規分析)を行ったところ、温泉法第2条に適合するものは15件(浴槽水を除く)であり、そのうち14件は療養泉であった。泉質は、ナトリウム塩化物泉、ナトリウム・カルシウム塩化物泉、単純硫黄泉等であった。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、7ヵ年で顕著な変化はなく、各成分濃度は安定していた。

[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

キャピラリー電気泳動法を利用して確立した乳酸の光学分割法を使用して、市販の日本酒(速醸もと)の含有量を調査した。D-乳酸濃度は狭い範囲に収まっていたのに対し、L-乳酸濃度はメーカーにより大きく異なっていることを明らかにした。その原因を解明するために、日本酒醸造工程中(速醸もと)の各試料、麴米、酵母培養液及び原酒等の分析を行った。その結果、日本酒のL-乳酸濃度は醸造工程とともに減少したのに対し、D-乳酸濃度は徐々に増加した。麴米の乳酸量は微量であったが、酵母はD-乳酸だけを生成した。以上のことから、L-乳酸は速醸もとを造るために加えられた乳酸量を、D-乳酸は酵母が生合成した乳酸量を反映するものと推定した。

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

野生鳥類のイヌワシは国内希少野生動物種に指定されている。本県でも保護対策の一環として、営巣地に監視カメラを設置して繁殖状況を遠隔モニタリングしている。平成13年3月に親鳥が抱卵を放棄した。その原因調査のために、未孵化卵について環境汚染指標であるPCB及び塩素系農薬の残留量調査を行った。PCB、DDT、ヘキサクロシクロヘキサン及びディルドリンが検出され、残留量は他県等の同様な調査結果と比較して同レベルであった。環境汚染物質の生体内残留量と繁殖障害等との関係を解析するためには広範囲な領域の調査研究が必要である。今回の調査がその一助となるものと期待する。

3. 飲料水および温泉に関する調査研究

エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)は金属封鎖剤として洗浄剤等に配合されている。EU等ではEDTAの水域への残留が懸念され、モニタリング調査も行われている。そこで、水試料中の超微量なEDTAを簡便・迅速に分析する方法の開発を試み、金属(鉄)錯体を形成させてHPLC法で微量分析する方法を確立した。この方法を用いて県内の水道原水30検体(表流水3、地下水17、伏流水4、湧水6)を分析したところ、すべて不検出であった。また、県内で製造されたミネラルウォーター9検体を分析したところ、スチール缶入り1製品からはEDTAが3 μ g/L検出された。その他のペットボトル入り8製品からは検出されなかった。

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による光学異性体の分析

ピンクロゾリンは殺菌剤であると同時に、代表的な抗アンドロゲンでもある。ピンクロゾリンは光学活性を有し、(+)-体と(-)-体の等量混合物(ラセミ体)が農産物の栽培に使用されている。キャピラリー電気泳動法によるピンクロゾリンの光学分割法を開発してワインに適用した。その結果、ワインに残留するピンクロゾリンでは(+)-体と(-)-体の比が2:3であることから、(+)-体の方が分解されやすいことを明らかにした。また、ジヒドロテストステロン応答ルシフェラーゼ

レポータージーンアッセイ法を使用して、(-)-ピンクロゾリンに比べて(+)-ピンクロゾリンの抗アンドロゲン活性の方が強い傾向を示すことも明らかにした。

(2) 偏光吸光度検出法 (PPD) を利用した光学異性体の分析

微量試料を使って光学的に不斉情報を得る方法として蛍光検出円二色性 (FDCD) が知られている。これは、発蛍光性の光学活性物質を円偏光で励起した場合、偏光の回転方向によって蛍光強度が異なる現象である。FDCDの専用測定装置は開発されておらず、その測定は円二色性 (CD) 分光計内に蛍光測定用セルホルダと、この位置より光軸に対して90° 方向に新たな光電子倍增管を装着して行なわれてきた。CD分光計は広く普及した装置ではなく、またFDCD測定用付属品も特殊で高価なため、FDCDは誰もが容易に測定できるものではない。そこで普及型の蛍光分光光度計を利用し、その光学系に安価なプリズムと位相差板を組み込むだけでFDCDが測定可能な方法を確認した。この方法を、茶中のカテキン光学純度測定に適用した。

5. 富山湾の海洋科学基礎研究

(1) 微量有機成分について

いわゆる環境ホルモンは極微量濃度で生理活性 (内分泌かく乱作用) を発現することから社会的関心が高まっている。前年度は海洋深層水の清浄性の把握のために、環境汚染指標である多環芳香族炭化水素類 (PAHs : ピレン, ベンツ(a)ピレン等) の超微量分析法の検討を行った。本年度は、季節毎に、PAHsの濃度調査を深度別に実施した。深度が増すに伴ってピレン及びベンツ(a)ピレン濃度は減少しており、表層水に比べて深層水は清浄であることが明らかになった。PAHsの濃度レベルが著しく低いために、明瞭な季節的な濃度変化は見出せなかった。

(2) 栄養塩の連続自動分析について

深層水中の硝酸塩の連続自動分析装置を前年度に独自に開発した。この独自装置を用いて、水産試験場に揚水されている深層水の硝酸塩濃度を継続的に調査を続行したところ、海水中の微生物や粒子状物質が増加すると、装置を構成する試料の導入配管内部を汚染して測定値に誤差を引き起こすこと、分析カラムの寿命が著しく短くなることが判明した。そこで、ろ過装置を設置して海水を連続的にろ過した後、独自分析装置に導入したところ、長期間に渡って測定誤差の生じない値が連続して得られることが明らかになった。深層水中の硝酸塩濃度は、10月~12月には変化が少なく、ほぼ一定 ($\text{NO}_3\text{-N}=0.33\text{mg/L}$) していた。しかしながら、1月~3月には2~3日の短期的な変動 (濃度の2割程度の減少) がしばしば観察された。また、この濃度の減少と深層水の水温上昇とが見事に相関していることを世界に先駆けて実証した。冬季には深層水取水口付近で性状の異なる水塊が移動することが示唆された。なぜ水塊が移動するかは今後の検討課題である。

[理化学検査の技術研修及び精度管理調査等]

1. 食品検査の精度管理

「富山県食品衛生検査業務管理要綱」の制定 (平成10年12月) 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水準の維持、向上を目的として検査業務管理基準が適用され、平成11年度から各検査機関合同で精度管理調査を実施している。本年度は、同一ロットの市販牛乳を6機関に配布し、牛乳中の成分規格試験 (酸度及び乳脂肪分) による調査を実施した。その結果、酸度及び乳脂肪分の測定値の機関内変動係数 (CV) はそれぞれ4.8%以下及び2.2%以下、機関間CVは6.1%及び2.4%であり、機関内、機関間のばらつきはいずれも小さい数値であった。R管理図では、酸度で2機関の測定値が、乳脂肪分で1機関の測定値がそれぞれ上方管理限界 (UCL) を僅かに超えることになり、若干測定値のばらつきがみられた。これは他機関の繰返し測定値の範囲が極めて狭いことから派生したものであり、滴

定時の終点決定や乳脂計目盛の読取り方法などを厳格に順守することにより改善されるものと考えられる。食品衛生検査データの信頼性確保の向上に資するために、検査実態を把握して問題点を改善することは必要であり、今後も継続的に調査を実施することが重要である。

2. 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10機関の参加により、平成13年度は鉛および鉄の2項目について実施され、当所は配布試料の調製・配布、報告値の集計・解析を行った。鉛の精度管理は昨年度に引き続いての実施で、昨年度同様、市販ミネラル水に鉛標準液及び超高純度硝酸を添加して試料を調製した。検査機関によっては、昨年度の精度管理の結果より操作内容の変更や分析機器の調整を行ったことより、回収率（各機関の測定値の平均値/添加濃度）が昨年度の79.6%から103%、室間変動係数が昨年度の26.8%から15.3%と共に改善され、分析精度は向上した。鉄については3回目の実施で、今回は基準値を超える濃度の試料を調製した。結果は、すべての機関の測定値が平均値±2標準偏差の範囲内に収まり、機関内・機関間のばらつきも小さく良好であった。

環 境 保 健 部

[行政検査]

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

昭和54年度から実施してきた前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。平成13年度は新方式に基づく調査を実施し、対象者2,843名中1,017名が1次検診を受診した。

(2) 精密検診

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200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157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5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. 骨代謝指標による効果的な骨粗鬆症の予防法の確立に関する研究

(1) 小児期から実行可能な骨粗鬆症予防法の確立に関する研究

骨粗鬆症の予防には、骨量が急激に増加する成長期に最大骨量を高めることが効率的であり、かつ重要である。そこで、平成13年度から、成長期の骨量増加が著しい中学2年生女子を高校まで追跡し、骨密度と骨代謝指標の変化の実情、およびこれらに対する体格、第二性徴、生活習慣の影響の程度を検討する調査を開始した。

対象者の橈骨骨密度は成人女性より低く、骨代謝指標は成人女性より高かった。体格と骨密度の関係は、体重が多いものほど骨密度が高値を示した。第二性徴の影響を検討するため、初潮との

関連をみたところ、骨密度は初潮発来前の群に比べて初潮後の群は高く、初潮後の月数が長くなるほど骨密度は高値を示した。骨代謝指標では全ての指標において初潮発来後月数が長いほど低値となった。骨密度と骨代謝指標の間には負の相関がみられ、初潮前や初潮発来直後の骨密度が低い群で骨代謝は亢進状態にあり、今後、骨密度が増加するものと推測された。骨密度と生活習慣の関連について検討したところ、骨密度は、小学校時代に週3回以上運動している群、現在牛乳を1日600ml以上摂取している群で高値であった。

(2) カルシウム食品摂取が女子大生の骨代謝に与える効果

骨形成の最終段階と考えられる18歳の女子大生47名を、ゼリー群22名と対象群25名に分け、ゼリー群は発酵乳酸Ca150mgを含むゼリーを就寝前に1包2ヶ月間服用した。2ヵ月後の体重、BMI、stiffness値は2群間で違いは認められなかった。ゼリー群の調査終了時のピリジノリン、デオキシピリジノリンは対象群に比べ低い傾向であった。ゼリー摂取総数が多い者ほど尿中のピリジノリン、デオキシピリジノリンが低下し、骨吸収を抑制させる可能性が示された。さらに、ゼリー群の中でも“毎日牛乳を飲まない”、“緑黄色野菜好きでない”、“日頃から体を動かさない”といったライフスタイルが不良な者で骨吸収を抑制する傾向が認められた。

2. イタイイタイ病に関する研究

重金属の生体影響に関する調査研究の一環として、神通川流域住民の尿中カドミウム濃度の推移を検討した。平成9年度から神通川流域住民に新方式の健康調査が行われており、その平成9年度の50歳以上の検診受診者全員について、早朝尿中のカドミウムを測定した。これを20年前の昭和51～53年度に同様に行った検診受診者の測定結果と比較した。測定対象者全員の尿中カドミウム濃度は、20年前は算術平均値10.9 $\mu\text{g/l}$ （幾何平均値8.3 $\mu\text{g/l}$ 、943名）、今回は算術平均値3.9 $\mu\text{g/l}$ （幾何平均値3.0 $\mu\text{g/l}$ 、925名）であり、以前に比べてカドミウム暴露量は低下していると考えられた。

3. 環境汚染物質の生体影響に関する研究

(1) 有機リン系農薬の生体暴露に関する研究

これまで残留性がないとされてきた有機リン系農薬の尿中代謝物が、農業従事者だけでなく非農業従事者においても検出されたことから、有機リン系農薬による暴露実態を把握するため、非農業従事者や都市部住民における尿中代謝物の調査を開始した。農薬散布の影響を受けないと考えられる冬季の尿サンプルを収集し、現在測定中である。今後、農薬散布の影響を受ける可能性のある夏季のサンプルを収集し、比較検討を行う予定である。また、有機リン系農薬の体内における残留の有無を明らかにするため、ヒト脂肪組織のサンプル収集を始めた。これまでに得られた8検体について分析を行ったところ、有機リン系農薬が同定されたものはなかった。

(2) 内分泌攪乱化学物質に関する研究

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」）であるフタル酸ジエステル類の体内暴露指標を定めるため、ジェチルヘキシル体の尿中代謝物であるモノエステル体の測定法を検討した。現在、健常者の尿中レベル把握のため調査を実施中である。

4. 肥満遺伝子と生活習慣病予防に関する疫学的研究

肥満は生活習慣病の危険因子であるが、その成因の1つに遺伝子異常が想定されている。最近、肥満の遺伝子候補として、 β_3 -アドレナリンレセプター遺伝子の異常が報告され、太りやすい体質があることが明らかになった。病気にかかりやすい体質を遺伝子診断で知っておくことは、予防検診の指導においても有効であると考えられる。そこで、 β_3 -アドレナリン受容体遺伝子の変異の有無を、微量の血液を用いて検出する方法の実用化を検討し、健常者4人について調べたところ、変異は認められなかった。

5. 非水産分野における海洋深層水の利用に関する研究

(1) 海洋深層水温浴のリラックス作用及び睡眠への影響に関する研究

深夜勤務に従事する交代勤務者を対象に、深層水温浴の夜勤明け睡眠への影響を、主観的・客観的指標について、表層水、真水の温浴および空浴と比較検討した（富山医科薬科大学との共同研究）。

睡眠に関する指標は、脳波・呼吸運動、睡眠調査、自律神経系に関する指標として、心拍スペクトル解析、尿中のホルモン、唾液中のミネラルおよびアミラーゼ濃度、中枢神経系に関する指標として、視覚誘発電位（VEP）、皮膚温、鼓膜温、気分・感情調査としてPOMS調査を行った。入浴前後と睡眠後の検査結果から、深層水の温浴により、主観的指標では、「寝つき」の改善や「活気」の上昇がみられた。客観的指標では、深層水の温浴が他の温浴より睡眠効率が高い傾向を示した。また心拍変動からみた自律神経系における交感神経活動の相対的抑制と副交感神経活動の相対的亢進、覚醒後の視覚誘発電位潜時の延長などおおむね睡眠の質の向上につながる所見がみられた。

(2) 濃縮海洋深層水浮遊浴の効果に関する心理・生理学的指標からの調査研究

県水産試験場において、平成13年度から開始された富山湾の濃縮海洋深層水製造研究から生じた濃縮水の付加価値を一層高めるため、健康づくりの分野で活用する方法や医学的效果について研究を開始した。今回は、将来に全身浮遊浴として利用するための予備調査として、現時点で利用可能な塩分濃度約10%濃縮水と3%非濃縮水（通常の海洋深層水）の心理・生理的指標を比較検討した。濃縮水の浸漬では、非濃縮水と比較して、接触皮膚部の一過性・相対的脱水の生起や浸漬部位の発汗促進などの刺激作用を呈することが明らかとなった。

本研究は財団法人富山県新世紀産業機構の新産業創出公募事業として実施した。今後、富山医科薬科大学と滑川市との共同で3年間継続する予定である。

(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	11,574 (69,444)	
	染色体検査	64 (64)	119 (119)
	衛生動物検査	1,576 (1,576)	139 (175)
	小 計	13,214 (71,084)	258 (294)
ウ イ ル ス 部	感染源検査	459 (459)	
	血清学的検査	1421 (3606)	
	小 計	1880 (4065)	
細 菌 部	感染症にかかわる検査	622 (647)	
	食中毒にかかわる検査	143 (266)	
	食品検査	128 (142)	
	水質検査	371 (761)	8 (8)
	医薬品検査		6 (6)
	小 計	1,264 (1,816)	14 (14)
化 学 部	食品にかかわる検査	221 (2,845)	2 (2)
	家庭用品検査	14 (18)	
	水質検査	4,788 (16,112)	47 (454)
	温泉分析	27 (550)	15 (437)
	小 計	5,050 (19,525)	64 (893)
環 境 保 健 部	カドミウム環境汚染に 関わる地域住民健康調査	1,182 (4,520)	
	小 計	1,182 (4,520)	

検査内容

() 内項目数

がん研究部

[行政検査]		[一般依頼検査]	
1. 先天性代謝異常検査	11,574 (69,444)	1. 染色体検査	
2. 染色体検査		(1) 血液	40 (40)
(1) 血液	38 (38)	(2) 羊水	63 (63)
(2) 羊水	20 (20)	(3) 胎児	16 (16)
(3) 胎児	6 (6)	2. 衛生動物等検査	
3. 衛生動物等検査		(1) 衛生・不快動物	77 (100)
(1) 衛生・不快動物	1,608 (1,612)	(2) 食品混入異物	14 (21)
(2) 食品混入異物	16 (18)		

ウイルス部

[行政検査]		[一般依頼検査]	
1. 感染源検査			
(1) インフルエンザ	93 (93)		
(2) ポリオ	58 (58)		
(3) その他ウイルス	67 (67)		
(4) リケッチア, その他	233 (233)		
(5) 食中毒	8 (8)		
2. 血清学的検査			
(1) インフルエンザ	ヒト 251 (979)		
	ブタ 80 (240)		
(2) ポリオ	226 (678)		
(3) 日本脳炎	ブタ 255 (255)		
(4) エイズ	133 (266)		
(5) その他のウイルス	201 (341)		
(6) リケッチア, その他	271 (843)		
(7) 食中毒	4 (4)		

細菌部

[行政検査]		[一般依頼検査]	
1. 感染症にかかわる検査		1. 水質検査	
(1) 溶連菌	504 (504)	(1) 風呂水	8 (8)
(2) 結核菌	18 (28)		

(3) 出血性大腸菌	90 (90)	2. 医薬品検査	6 (6)
(4) 赤痢菌	4 (8)		
(5) パラチフスA菌	1 (2)		
(6) MRSA	5 (15)		
2. 食中毒にかかわる検査			
(1) サルモネラ	93 (198)		
(2) 病原大腸菌	26 (44)		
(3) ウェルシュ菌	24 (24)		
3. 食品検査			
(1) 収去検査	90 (90)		
(2) 集団発生原因食調査	35 (43)		
(3) 苦情食品	3 (9)		
4. 水質検査			
(1) 海水	233 (393)		
(2) 河川水	78 (169)		
(3) 水道水水源水	60 (199)		

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	96 (1,008)
(2) 残留農薬	38 (1,356)
(3) 重金属類	83 (473)
(4) 容器包装	4 (8)
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	4 (8)
(3) デイルドリン	5 (5)
3. 水質検査	
(1) 水質基準項目	116 (1,190)
(2) 監視項目	39 (522)
(3) ゴルフ場使用農薬	22 (368)
(4) その他	4,611 (14,032)
4. 温泉分析	27 (550)

[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	2 (2)
2. 水質検査	
(1) ゴルフ場使用農薬	24 (420)
(2) その他	23 (34)
3. 温泉分析	
(1) 中分析	14 (420)
(2) 小分析	1 (17)

環 境 保 健 部

[行政検査]

[一般依頼検査]

1. カドミウム環境汚染に関わる地域住民健康調査

(1) 神通川流域住民健康調査

1次検診 尿検査 1,017 (2,034)

精密検診 尿, 血液検査 157 (2,355)

(2) イタイイタイ病要観察者の管理検診

尿, 血液検査 5 (80)

(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)

(8) 講 師 派 遣

主 題	講 師	会 合 名	年 月 日	場 所
ブユの多発原因調査	渡 辺 護	現地調査・指導	平13. 4. 20 ～4. 26	鹿 児 島 県 十島村中之島
ウルリとヘクサンボの駆除	渡 辺 護	現地指導	平13. 7～10	新潟県青海町
室内のダニとその駆除	渡 辺 護	アトピー教室	平13. 7. 11	中部保健所 八尾支所
オロロとヘクサンボ	渡 辺 護	酪農学園大学大学院	平13. 7. 26	酪農学園大学 (北海道)
昆虫のからだとへんたい	渡 辺 護	きらめきエンジニア	平13. 9. 21	下 村 立 下村小学校
ヘクサンボの駆除	渡 辺 護	青海町自治会ヘクサンボ 対策	平13. 9. 28	新潟県青海町 上路公民館
オロロについて	渡 辺 護	富山湾に学ぶ	平13. 10. 20	富 山 市 市民学習室
昆虫とは	渡 辺 護	きらめきエンジニア	平13. 10. 24	新 湊 市 立 片口小学校
トコジラミの駆除	渡 辺 護	現地指導	平13. 11. 2 ～12	宇 奈 月 町 O ホ テ ル
昆虫とは	渡 辺 護	きらめきエンジニア	平13. 11. 21	富 山 市 立 柳町小学校
衛生昆虫学	渡 辺 護	富山医科薬科大学医学部	平13. 12. 7	富山医科薬科大学
吸血昆虫, その生理と生態	渡 辺 護	きらめきエンジニア	平13. 12. 12	富 山 県 立 入 善 高 校

主 題	講 師	会 合 名	年 月 日	場 所
臨床遺伝学	本 田 幸 子	富山医科薬科大学医学部	平13. 4. 19	富山医科薬科大学
生化学	品 川 保 弘	厚生連高岡看護専門学校	平13. 4～9 週1回	厚生連高岡 看護専門学校
生化学	品 川 保 弘	高岡市立看護専門学校	平13. 10～ 平14. 3 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13. 4～9 週1回	厚生連高岡 看護専門学校
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13. 7～9 週1回	富山市医師会 看護専門学校
ウイルス学から見た健康 危機管理	安 藤 秀 二	富山県保健所医師の会	平13. 7. 3	富山県民会館
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13. 12. 5	富 山 県 消 防 学 校
衛生試験法中の食品成分 試験法の解説	山 本 敦	金沢大学 薬学部 衛生 薬学Ⅲ	平13. 10. 30	金 沢 大 学 薬 学 部
環境保健医学	西 野 治 身	富山医科薬科大学医学部 保健医学講義	平13. 7. 5	富山医科薬科大学
成長期における骨粗鬆症 予防調査1年目の調査結 果について	西 野 治 身	骨粗鬆症予防調査結果報 告会	平14. 3. 12	氷見市立北部 中 学 校
成長期における骨粗鬆症 予防調査1年目の調査結 果について	西 野 治 身	骨粗鬆症予防調査結果報 告会	平14. 3. 15	氷見市立西條 中 学 校
わたしのウイルス研究	永 井 美 之	富山医科薬科大学医学部 ウイルス学講義	平14. 1. 30	富山医科薬科大学

(9) 研 修 指 導

対象者および所属	研 修 期 間	研 修 内 容	担 当
富山医科薬科大学附属 病院検査部 野手 良剛	平13. 4. 9～13	パルスフィールドゲル電気泳動法に基づく遺伝子型の解析	細菌部
星薬科大学 院生 伊藤 里恵	平13. 4. 16～20	蛍光検出円二色性法による光学異性体の分析	化学部
日環計量管理株式会社 柴崎 奈美 古村 昭夫	平13. 9. 3, 9. 10	レジオネラの検査法	細菌部
富山市保健所 森岡 誠二	平14. 1. 23～25	魚介類中の有機スズ化合物の分析	化学部

(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
健 名 智 子 大 戸 幹 也	平13. 7. 5 ～7. 6	LC/MS の基礎と実技 講習	富山県衛生研究所 (富山県)	横河アナリテイカルシ ステムズ(株) 滝埜 昌彦
安 藤 秀 二子 磯 部 順 子 細呂木 志 保	平13. 7. 12 ～7. 13	衛生微生物技術協議会 第22回研究会	微生物技術協議会 (徳島県)	国立感染症研究所長 吉倉 廣 他
田 中 大 祐	平13. 7. 16 ～7. 20	第31回嫌気性菌検査技 術セミナー	岐阜大学 (岐阜県)	医学部附属嫌気性菌実 験施設 渡辺 邦友 他
本 田 幸 子 林 美 貴 子	平13. 9. 1 ～9. 2	臨床細胞遺伝学セミナー	日本人類遺伝学会 (神奈川県)	兵庫医科大学 古山 順一 他
磯 部 順 子	平13. 10. 25	厚生省炭疽菌の検査法 に関する講習会	国立感染症研究所 (東京都)	国立感染症研究所長 吉倉 廣 他
細呂木 志 保	平13. 12. 3 ～12. 14	平成13年度水道クリプ トスポリジウム試験法 実習	国立公衆衛生院 (東京都)	国立公衆衛生院 水道工学部 国包 章一 他
岩 井 雅 恵 田 中 大 祐	平14. 1. 30 ～1. 31	DDBJing (日本DNA データバンク) 講習 会	国立遺伝学研究所 (静岡県)	国立遺伝学研究所教授 館野義男 他
松 浦 久美子 長谷川 澄 代子 磯 部 順 子	平14. 2. 12 ～2. 13	厚生省希少感染症診断 技術研修会	国立感染症研究所 (東京都)	国立感染症研究所 副所長 倉田 毅 細菌部 渡辺 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
倉橋 弘	国立感染症研究所 昆虫医科学部媒介生態室 長	平13. 8. 8 ～8. 11	オロロの効果的な駆除法について
有川 二郎	北海道大学教授 (医学部附属 動物実験 施設長)	平13. 8. 22 ～8. 25	動物由来感染症に関する野生鼠族の 調査捕獲, 保存材料の解析について
遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部原生動物室長	平13. 8. 30 ～9. 1	クリプトスポリジウムの生態と検査 法について
熊谷 浩樹	横河アナリテイカルシス テムズ(株) LPAグループリーダー	平13. 10. 17	金属の分離分析への選択的イオン交 換体の応用
井上 紳太郎	カネボウ(株) 基礎科学研究所 副所長	平13. 12. 5 ～12. 7	食品・医薬品及び化粧品開発に伴う 分析法の現状

(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
クリプトスポリジウムの生態と検査法について	遠藤 卓郎	国立感染症研究所寄生動物部原生動物室長	平13. 8. 30
金属の分離分析への選択的イオン交換体の応用	熊谷 浩樹	横河アナリテイカルシテムズ(株) PHSサポート課長	平13. 10. 17
新しい作用メカニズムに基づいた機能性化粧品素材の開発	井上 紳太郎	カネボウ(株) 基礎科学研究所 副所長	平13. 12. 6

衛生研究所主催セミナー

演 題	講師氏名	所属職名	年 月 日
紫綬褒章受章記念講演会「私のウイルス研究」	永井 美之	富山県衛生研究所 所長	平13. 12. 17
「DNAチップ技術」に関する懇話会	石井 暁 荒川 久雄 草川 貴史	バイオメディカルサイエンス(株)営業部 北斗産業(株)技術開発室 北斗産業(株)技術開発室	平14. 2. 26

2. 調查研究報告



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13年度の検査成績)

米田 豊 九曜 雅子 前田多美子
加藤 丈士 永井 美之 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 2001~March 2002)

Yutaka YONEDA, Masako KUYO, Tamiko MAEDA,
Takeshi KATO, Yoshiyuki NAGAI and Kuniko TAKE¹

要 旨 平成13年度の検体総数は11,574件で、スクリーニングの結果、クレチン症6人および良性高フェニルアラニン血症1人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25年間で38人（フェニルケトン尿症4人、メイプルシロップ尿症1人、ヒスチジン血症33人）、先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）が22年間で83人、先天性副腎過形成症が13年間で12人となった。その他の疾病については、現在までに、良性高フェニルアラニン血症8人、チロジン血症2人、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD）異常症1人が発見されている。

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きた。今年度（平成13年度）から、先天性代謝異常検査費が一般財源化され、所要の財源は地方交付税措置されることになった [1]。

富山県では、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、先天性代謝異常マススクリーニングを実施しており、引き続き、検査料公費負担で、フェニルケトン尿症等6疾病を対象に検査を行った。

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、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13年4月より、平成14年3月までの検査実施状況をまとめた。

1 富山県厚生部健康課

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

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、濾紙血中のフェニルアラニン、ロイシンおよびメチオニンを測定した。なお、HPLCはカラムスイッチングー逆相イオンペアード法 [2] で行った。

②ガラクトース血症

Microplate・酵素法 (バイエルメディカル社製キット「GAL-R」使用) により、濾紙血中のガラクトースを測定した。ガラクトースの抽出には、トランスファープレートを使用する改良法 [3] を用いた。また、全検体についてBeutler法 (ロシュ・ダイアグノスティックス社製キット「ガラクトセミア・テスト」) によりGalactose-1-phosphate uridyl transferaseの有無を検査した。なお、Beutler法の判定用濾紙はWatman DE81 [4] を使用

した。

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) を用いTSH (Thyroid stimulating hormone) 値の測定を行った。

④先天性副腎過形成症

ELISA (平成13年11月までは栄研化学社製キット「17-OHP D-ELISA II」, 12月からはバイエルメディカル社製キット「エンザプレートNeo-17 α -OHP」-いずれも7位抗体使用-) を用い17- α -OHP (17- α -hydroxy progesterone) 値の測定を行った。

(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Microplate法に応用 [5] し、検体をサンプリングした。

(4) 判定基準

表1に示した。

なお、先天性副腎過形成症の抽出法での判定基準値を、使用キットの変更に伴い平成14年2月から3.5ng/mlとした。

この判定基準に従い、疑陽性と判定した検体は

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	HPLC	Phenylalanine	≥ 2.0 mg/dl	
ホモシスチン尿症	HPLC	Methionine	≥ 1.0 mg/dl	
メイプルシロップ尿症	HPLC	Leucine	≥ 3.0 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で蛍光のない場合
	ポイトラー法	Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase	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 抽出法 ≥ 3 ng/ml (H14年1月まで) ≥ 3.5 ng/ml (H14年2月から)	直接法 10 ng/ml 以上で何らかの症状がある場合 抽出法 ≥ 10 ng/ml

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、月報集計などのデータ管理は、当所で開発した動的データ管理システム [6] 用いた。また、新たに、本報に記載の年度集計データも自動集計できるよう機能強化を図った。

結 果

1. 検査実施状況

(1) 検査件数と検査結果の概要

今年度の受付総数は、11,574件で、県内60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。

図1に検査の流れと検査件数の概要を示した。

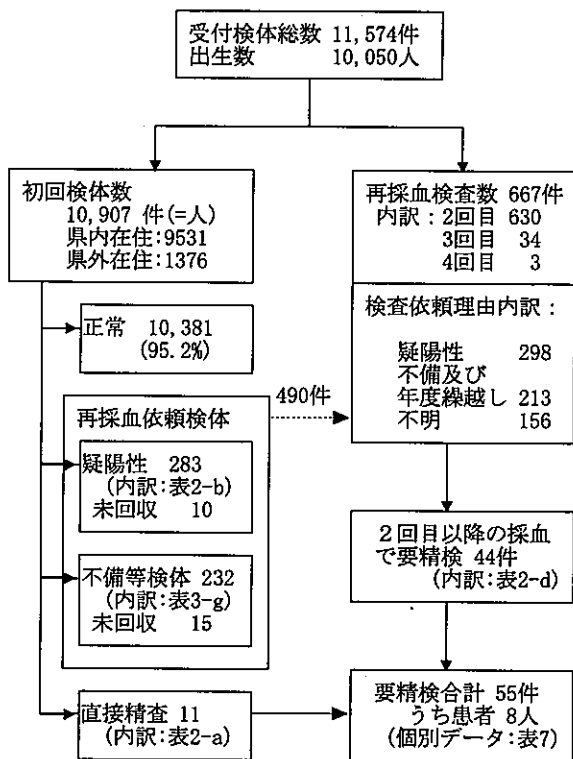


図 1. 検査の流れ及び検査件数の概要

今年度の出生数は10,050人であり、初回検体数10,907件から計算すると受検率は108.5%となるが、初回検体のうち県内在住者は9,531名、県外在住者は1,376名であることから、いわゆる「里帰り分娩」を含めない受検率は94.8%であった。また、県内在住者が他県で受検するケースも考えられるため、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。

初回検体のうち10,381件(95.2%)は正常と判定されたが、283件(2.6%)は疑陽性のため、232件(2.1%)は不備検体等疑陽性以外の理由で再採血を依頼した。また、11件(0.1%)は初回検査で直ちに精密検査が必要（直接精査）と判定された。再採血検体として受付けた667件(5.8%)のうち、44件(6.6%)は要精査と判定され、直接精査分と合わせ、計55件が要精査と判定された。

(2) 疑陽性による再採血

表2に疾患別の疑陽性による再採血依頼数を示した。再採血率は代謝異常症4疾患で0.43%、クレチン症は1.21%および副腎過形成症は0.99%となり、合計2.63%であった。なお、現在再採血の目安は代謝異常症4疾患で0.5%程度、クレチン症は0.5~1.0%、副腎過形成症は0.3~0.5%で6項目合わせて2%程度が適当とされている [7]、また、1検体で2疾患が同時に疑陽性となった検体が3件あり、それらはクレチン症と副腎過形成症、ガラクトース血症とクレチン症、並びにガラクトース血症とメイプルシロップ尿症との同時疑陽性であった。また、初回検体で副腎過形成症の疑いにより疑陽性となった108件のうち39件(36.1%)は低出生体重児(2,000g以下)であった。

(3) 疑陽性以外の理由による再採血

表3に疑陽性以外の理由による再採血依頼数を示した。初回検体で、3日以内に採血された検体が4件、血液が不足している検体が9件、採血後日数が経過している検体が27件あった。また、低出生体重児のため、体重が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た検体（低体重検体）が137件、哺乳不良検体が44件、低体重で且つ哺乳不良の検体が11検体あった。

表 2. 疑陽性による再採血依頼数および要精検検体数の内訳

採血回数	初回			2回目以降	総受付検体	
	直接精査 (a)	疑陽性による 再採血依頼数 (b)	再採血率 (%) (c)	要精検数 (d)	疑陽性 項目数 (e)	要精検合計 (患者数) (f)=(a)+(d)
フェニルケトン尿症	0	5	0.05	3	6	3
ホモシスチン尿症	0	2	0.02	3	3	3
メイプルシロップ尿症	0	17	0.16	1	21	1
ガラクトース血症	0	22	0.20	0	23	0
クレチン症	9	132	1.21	27	139	36(8)
副腎過形成症 (うち低体重)	2	108(39)	0.99	10	135	12
合計 [うち2疾患重複数]	11	286 [3]	2.63	44	327 (月別:表4)	55(8)

表 3. 疑陽性以外の理由による再採血依頼数

理由	初回検体 (g)	総受付検体 (h)
3日以内に採血	4	4
血液不足	9	9
古い	27	27
低体重	137	177
低体重、哺乳不良	11	14
哺乳不良	44	48
合計	232	279

初回検査時に再採血を依頼したの515件のうち490件が再採血され、その回収率は95.1%であった。再採血を依頼しても1か月以上検体を送られてこない場合は再依頼しているが、疑陽性で再採血依頼し、回収できなかった症例のうち死亡例1件、他県への転出例が1件あり、その他の県内在住者の未回収検体はすべてNICUや小児科からの検体であり、医療機関で追跡されていると思われる。

採血は、日齢4～6(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6件あり、内訳は日齢2日採血が2件、3日採血が4件あった。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、20件が8日以上(最長16日)かかっていた。これらのほとんどは、1月受付分で、年末年始の休み期間の影響と考えられた。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。しかし、なかには冷蔵庫の中で保管されたまま送付し忘れたものもあり、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。

(4) 月および年度別推移並びに全国結果との比較
検査実施状況の月別比較、年度推移並びに全国集計との比較をそれぞれ表4、表5および表6に示した。

富山県における現在までの患者発見率は、検査対象の代謝異常症が1/7,500、クレチン症が1/3,000、副腎過形成症が1/11,700である。全国の患者発見率と比較すると、クレチン症の発生頻度が有意に高いといえる($P<0.05$)。

2. 要精密検査者の検査結果

今年度の疑陽性人数は、代謝異常症が46人、クレチン症が132人、先天性副腎過形成症が108人であり、そのうち、それぞれ7人、27人、10人に精密検査の必要が認められた。なお、初回検査で精密検査が必要と認められた11人のうち9人はクレチン症、他の2人は先天性副腎過形成症の疑いで直接精査と判定された。

表7に要精密検査者の検査状況と結果をまとめた。患者と診断されたのは、クレチン症の症例2, 6, 7, 10, 12, 16, 24および31の8人であった。その他の疾病として、良性高フェニルアラニン血症1人が発見された。

表 4. 月別検査実施状況

年月	平成13年										平成14年			計	
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3			
受付検体総数(件)	890	1,034	909	984	1,045	890	1,092	963	847	1,093	866	961	11,574		
内訳	初回検査数(件)	834	979	858	931	1,001	842	1,042	903	789	1,010	821	897	10,907	
	再採血総数(件)	56	55	51	53	44	48	50	60	58	83	45	64	667	
	再採血内訳	2回目	52	54	47	46	42	48	50	55	55	77	42	62	630
		3回目	3	1	4	6	2	0	0	5	3	5	3	2	34
		4回以上	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	3
疑陽性件数(要精検)	フェニルケトン尿症	1	0(1)	0	0	0	1	3	0(1)	1(1)	0	0	0	6(3)	
	ホモシスチン尿症	0(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3(2)	3(3)	
	メイプルシロップ尿症	3	2	0	3(1)	0	2	0	1	1	0	2	7	21(1)	
	ガラクトース血症	4	0	1	0	1	2	2	0	7	4	2	0	23(0)	
	クレチン症	14(2)	11(2)	6	10(2)	9(2)	15(4)	12(6)	16(1)	11	16(7)	9(5)	10(5)	139(36)	
	副腎過形成症	9	8(1)	15	4	10	7	9	14(1)	13(3)	20(6)	11	15(1)	135(12)	
計	31(3)	21(4)	22	17(3)	20(2)	27(4)	26(6)	31(3)	33(4)	40(13)	24(5)	35(8)	327(55)		

表 5. 年度別検査実施状況

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(27)	130(25)	—
平成元年度 ～6年度	68,956	64,398	61,473	104.7	1,130	958	440	53(7)	174(24)	107(7)
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(0)	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)
平成12年度	11,531	10,930	9,983	109.5	35	107	117	7(0)	18(6)	13(1)
平成13年度	11,574	10,907	10,050	108.5	53	139	135	7(0)	36(8)	12(0)
計	302,467	284,675	288,899	—	4,221*	2,778	1,182	211*(38**)	484(85)	207(12)

()は 対象疾病患者数
 *, ** : 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
 **: この他に対象疾病以外の患者11人あり(良性高フェニルアラニン血症8人, チロジン血症2人, G6PD異常症1人)

表 6. 全国および富山県の患者発見状況

区分 期間	富山県		全国	
	平成13年度	昭和52年度～平成13年度	昭和52年度～平成12年度	
受検者数	10,907人	284,675人	30,894,254人	
患者数, 発見率	患者 (人)	発見率	患者 (人)	発見率
フェニルケトン尿症	0	4 / 71,200	394	1 / 78,400
ホモシスチン尿症	0	0	168	1 / 183,900
ヒスチジン血症	—	33 / 6,000 ¹⁾	2,200	1 / 9,600 ²⁾
メイプルシロップ尿症	0	1 / 284,700	60	1 / 514,900
ガラクトース血症	0	0	873	1 / 35,400
クレチン症	8 / 1,400	85 / 3,000 ³⁾	6,722	1 / 4,100 ⁴⁾
先天性副腎過形成症	0	12 / 11,700 ⁵⁾	979	1 / 16,400 ⁶⁾

1) 昭和52年度～平成5年度 受検者数 197,180人
 2) 昭和55年度～平成13年度 受検者数 256,225人
 3) 平成元年度～平成13年度 受検者数 140,790人
 4) 昭和52年度～平成4年度 受検者数21,119,892人
 5) 昭和54年度～平成12年度 受検者数27,657,577人
 6) 昭和63年度～平成12年度 受検者数16,013,492人

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果 (1)

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	
フェニルアラニン尿症	1	*	女	H13.4.18	4.23	5	Phe 2.34 mg/dl 2.275	良性高フェニルアラニン血症	
					4.30	12	Phe 2.34 mg/dl 2.40 2.275		
	2		男	H13.10.15	10.20	5	Phe 1.81 mg/dl 2.035	経過観察中	
					10.25	10	Phe 1.98 mg/dl 2.09 1.77		
					10.31	16	Phe 2.08 mg/dl 2.20 2.19		
	3		女	H13.12.1	12.6	5	Phe 2.425 mg/dl 2.65 1.79	経過観察中	
					12.13	12	Phe 2.45 mg/dl 2.79 2.805		
	メチオニン尿症	1		男	H13.3.13	3.19	6	Met 1.14 mg/dl 1.06	異常なし
						3.24	11	Met 1.01 mg/dl 0.98 0.79	
4.14						32	Met 1.10 mg/dl 1.065 1.035		
2			女	H14.2.25	3.2	5	Met 0.87 mg/dl 1.015	高メチオニン血症 (経過観察中)	
					3.7	10	Met 0.86 mg/dl 1.035 1.04		
3			女	H14.3.3	3.8	5	Met 1.01 mg/dl 1.15	経過観察中	
					3.15	12	Met 0.90 mg/dl 1.025 1.0		
メチルコップ尿症		1		女	H13.6.27	7.2	5	Leu 3.13 mg/dl 3.26	異常なし
						7.9	12	Leu 3.34 mg/dl 3.06 3.20	
クレチン症	1		男	H13.3.24	3.29	5	TSH 37.60 μ U/ml 32.55	一過性高TSH血症	
					4.3	30	TSH 55.35 μ U/ml 60.10		
	3		男	H13.4.19	4.24	5	TSH 10.7 μ U/ml 11.3	一過性高TSH血症	
					4.27	8	TSH 11.1 μ U/ml 11.40		

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果 (2)

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	4	女	H13.4.26	5.1	5	12.40	クレチン症の疑い
						TSH 11.7 μ U/ml 11.20	
	5	女	H13.7.8	7.12	4	TSH 16.8 μ U/ml 16.65	一過性高TSH血症、又はクレチン症の疑い
						7.19 11 TSH 12.7 μ U/ml 12.70 12.15	
	6*	女	H13.7.17	7.22	5	TSH 18.0 μ U/ml 22.9	クレチン症
						7.29 12 TSH 27.7 μ U/ml 23.2 22.7	
	7*	男	H13.8.8	8.13	5	TSH 29.0 μ U/ml 31.3	クレチン症
	8	女	H13.8.8	8.12	4	TSH 10.6 μ U/ml 12.5	高TSH血症の疑い
						8.20 12 TSH 13.3 μ U/ml 14.1 13.95	
	9	女	H13.8.28	9.2	5	TSH 72 μ U/ml以上 72 μ U/ml以上	一過性甲状腺機能低下症
	10*	女	H13.9.6	9.11	5	TSH 70.6 μ U/ml 68.3	甲状腺機能低下症
	11	男	H13.9.4	9.9	5	TSH 9.4 μ U/ml 9.15	高TSH血症(経過観察中)
						9.17 13 TSH 10.0 μ U/ml 10.6 9.35	
	12*	男	H13.9.19	9.25	6	TSH 38.5 μ U/ml 40.8	クレチン症、ダウン症
	13	男	H13.9.28	10.4	6	TSH 14.4 μ U/ml 14.0	一過性高TSH血症の疑い
						10.12 14 TSH 24.3 μ U/ml 21.6 21.45	
	14	男	H13.9.26	10.2	6	TSH 8.1 μ U/ml 8.25	一過性高TSH血症
						10.11 15 TSH 9.3 μ U/ml 8.15	
15	男	H13.10.10	10.15	5	TSH 72 μ U/ml以上 72 μ U/ml以上	移行抗体による甲状腺機能低下症	
16*	女	H13.9.29	10.4	5	TSH 9.8 μ U/ml 11.25	甲状腺機能低下症	
					10.15 16 TSH 19.1 μ U/ml 20.5		
17	男	H13.10.8	10.13	5	TSH 9.1 μ U/ml 8.55	一過性高TSH血症、又はクレチン症の疑い(ダウン症)	
					10.24 16 TSH 10.6 μ U/ml 9.1		
18	男	H13.10.6	10.11	5	TSH 9.4 μ U/ml 9.05	一過性高TSH血症、又はクレチン症の疑い	

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果 (3)

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	18		男	H13.10.6	10.25	19	TSH 22.70 μ U/ml 19.55 20.90	一過性高TSH血症、又はクレチン症の疑い
	19		女	H13.11.8	11.13	5	TSH 10.9 μ U/ml 13.45	一過性高TSH血症の疑い
					11.21	13	TSH 26.5 μ U/ml 26.40 24.70	
	20		女	H13.12.15	12.20	5	TSH 12.4 μ U/ml 13.0	一過性高TSH血症
					1.7	23	TSH 9.1 μ U/ml 9.15 8.65	
	21		男	H13.11.22	12.25	33	TSH 20.7 μ U/ml 22.85	高TSH血症
					1.4	43	TSH 13.2 μ U/ml 15.65 12.45	
	22		男	H13.12.19	12.24	5	TSH 8.6 μ U/ml 8.25	一過性高TSH血症
					1.5	17	TSH 8.6 μ U/ml 8.8 8.15	
	23		男	H13.12.28	1.5	8	TSH 14.9 μ U/ml 11.5 11.1	乳児一過性高TSH血症
					1.15	18	TSH 18.5 μ U/ml 17.45 14.60	
	24*		男	H13.12.31	1.5	5	TSH 17.6 μ U/ml 16.95	クレチン症
					1.15	15	TSH 40.5 μ U/ml 43.90	
	25		男	H14.1.10	1.15	5	TSH 17.1 μ U/ml 19.7	一過性高TSH血症、又は軽度クレチン症の疑い
					1.23	13	TSH 21.8 μ U/ml 25.6 24.25	
	26		男	H14.1.17	1.22	5	TSH 15.3 μ U/ml 14.7	一過性高TSH血症、又は軽度クレチン症
1.28					11	TSH 16.3 μ U/ml 17.2 15.7		
27		女	H14.1.18	1.23	5	TSH 21.2 μ U/ml 18.3	一過性高TSH血症 (甲状腺は正常)	
				1.30	12	TSH 35.2 μ U/ml 32.25 32.5		
28		男	H14.1.26	2.5	10	TSH 31.3 μ U/ml 35.3	一過性高TSH血症の疑い	
29		男	H14.1.29	2.3	5	TSH 8.8 μ U/ml 9.95	一過性高TSH血症の疑い	
				2.11	13	TSH 11.7 μ U/ml		

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果 (4)

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
						12.5 10.5	
クレチン症	30	男	H14.1.28	2.4	7	TSH 12.4 μ U/ml 13.3	一過性甲状腺機能低下症 (ダウン症、動脈管開存、心室中隔欠損併発)
				2.13	16	TSH 10.5 μ U/ml 9.7 10.85	
	31*	女	H14.2.19	2.25	6	TSH 32.1 μ U/ml 33.85	クレチン症
	32	男	H14.2.20	2.25	5	TSH 8.2 μ U/ml 8.8	一過性高TSH血症
				3.2	10	TSH 9.4 μ U/ml 11.0 9.45	
	33	女	H14.3.6	3.11	5	TSH 17.5 μ U/ml 18.55	経過観察中
				3.15	9	TSH 23.9 μ U/ml 20.7	
	34	男	H14.3.2	3.7	5	TSH 7.95 μ U/ml 9.6	一過性高TSH血症
				3.17	15	TSH 9.4 μ U/ml 10.25 9.9	
	35	女	H14.3.9	3.14	5	TSH 7.4 μ U/ml 8.5	異常なし
				3.24	15	TSH 8.3 μ U/ml 9.3 9.3	
	36	男	H14.3.16	3.21	5	TSH 12.0 μ U/ml 9.5 9.05	一過性高TSH血症の疑い
				3.28	12	TSH 13.0 μ U/ml 11.65 12.05	
先天性副腎過形成症	1	女	H13.4.20	5.15	25	17-OHP120ng/ml以上17-OHP24.5ng/ml 直接法 抽出法	異常なし 在胎週数 27.4 週 生下時体重 1175 g
	2	女	H13.11.7	11.12	5	17-OHP 15.7 ng/ml 17-OHP 5.10ng/ml 直接法 14.75 抽出法	異常なし 在胎週数 36.5 週 生下時体重 2232 g
				11.15	8	17-OHP 8.5 ng/ml 17-OHP 3.55ng/ml 直接法 9.9 抽出法 12.25	
3	男	H13.11.12	11.20	8	17-OHP 8.1 ng/ml 17-OHP 3.5ng/ml 直接法 9.95 抽出法 12.45	異常なし 在胎週数 27.1 週 生下時体重 940 g	
			12.10	28	17-OHP 16.2 ng/ml 17-OHP12.25ng/ml 直接法 16.35 抽出法 18.0		

表 7. 要精密検査者の検査状況と結果 (5)

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	4		男	H13.11.24	11.28	4	17-OHP 13.2 ng/ml 直接法 11.65 9.5	17-OHP 7.4 ng/ml 抽出法	異常なし 在胎週数 30 週 生下時体重 1490 g
					12.6	12	17-OHP 6.6 ng/ml 直接法 6.5 6.1	17-OHP 3.5 ng/ml 抽出法	
					12.25	31	17-OHP 5.1 ng/ml 直接法 5.15 5.7	17-OHP 3.8 ng/ml 抽出法	
5	女	H13.12.13		12.17	4	17-OHP 5.1 ng/ml 直接法 5.55	17-OHP 4.2 ng/ml 抽出法	異常なし 在胎週数 35 週 生下時体重 2478 g	
				12.25	12	17-OHP 7.6 ng/ml 直接法 8.15 7.10	17-OHP 4.8 ng/ml 抽出法		
6	男	H13.12.20		12.25	5	17-OHP 12.25ng/ml 直接法 14.7	17-OHP 3.85ng/ml 抽出法	異常なし 在胎週数 36 週 生下時体重 2416 g	
				1.2	13	17-OHP 6.2 ng/ml 直接法 6.15	17-OHP 3.0 ng/ml 抽出法		
7	男	H13.12.20		12.25	5	17-OHP 11.9 ng/ml 直接法 13.2	17-OHP 3.65ng/ml 抽出法	異常なし 在胎週数 36 週 生下時体重 2266 g	
				1.3	14	17-OHP 8.5 ng/ml 直接法 8.0 7.65	17-OHP 3.2 ng/ml 抽出法		
8	女	H13.12.25		1.3	9	17-OHP 11.75ng/ml 直接法 12.9	17-OHP 8.8 ng/ml 抽出法	未熟児に伴う一過性17-OHP高値 在胎週数 35 週 生下時体重 2010 g	
				1.7	13	17-OHP 10.6 ng/ml 直接法 12.85 13.0	17-OHP 7.45ng/ml 抽出法		
9	女	H13.12.25		1.3	9	17-OHP 9.6 ng/ml 直接法 8.55	17-OHP 5.1 ng/ml 抽出法	未熟児に伴う一過性17-OHP高値 在胎週数 35 週 生下時体重 2005 g	
				1.15	21	17-OHP 6.1 ng/ml 直接法 5.3 5.85	17-OHP 4.1 ng/ml 抽出法		
10	男	H14.1.3		1.9	6	17-OHP 16.9 ng/ml 直接法 10.1 15.1	17-OHP 11.80ng/ml 抽出法	経過観察中 在胎週数 35.4 週 生下時体重 2525 g	
				1.12	9	17-OHP 8.60ng/ml 直接法 8.05	17-OHP 5.80ng/ml 抽出法		
				1.18	15	17-OHP 11.3 ng/ml 直接法 12.5 13.05	17-OHP 8.1 ng/ml 抽出法		
11	男	H13.12.26		1.3	8	17-OHP 7.5 ng/ml 直接法 9.1	17-OHP 4.3 ng/ml 抽出法	異常なし (超低出生体重児) 在胎週数 30 週 生下時体重 994 g	
				1.28	33	17-OHP 5.2 ng/ml 直接法 5.1 4.65	17-OHP 4.55ng/ml 抽出法		
12	男	H14.3.11		3.25	14	17-OHP 93.5 ng/ml 直接法 113.0	17-OHP 93.5 ng/ml 抽出法	未熟児に伴う一過性17-OHP高値 在胎週数 26 週 生下時体重 434 g	

(1) 代謝異常症

フェニルケトン尿症の疑いで3人、ホモシスチン尿症の疑いで3人、ガラクトース血症の疑いで1人が要精密検査となった。フェニルケトン尿症の症例1は鑑別診断の結果、良性高フェニルアラニン血症と診断された。なお症例1の前子（男H10.7.8生）もマスキングの結果要精密検査となっており、同疾患と診断されている。

(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2>日齢30の初回検査で、TSH値が $30\mu\text{U/ml}$ 以上で直接精査となった。小児科での検査の結果、日齢33でTSH $115\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 0.4ng/dl 、FT₃ 1.5pg/ml で、患者と診断され、治療が開始された。

<症例6>日齢12の再検査で、TSH値が27.7、23.2、 $22.7\mu\text{U/ml}$ と高く、要精密検査となった。日齢30の検体が当所に送付されてきたため検査を行ったところTSH値は $140.8\mu\text{U/ml}$ と上昇しており、その後の小児科での精密検査の結果は、TSH $240\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 0.6ng/dl で患者と診断され、治療が開始された。

<症例7>日齢5の初回検査でTSH値が $30\mu\text{U/ml}$ 以上で直接精査となった。小児科での検査の結果TSH $102.7\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 0.42ng/dl 、FT₃ 2.90pg/ml で、甲状腺は正常位置に確認されたが、大腿骨遠位端骨核が未出現で、クレチン症と診断された。

<症例10>日齢5の初回検査で、TSH値が $70\mu\text{U/ml}$ と異常高値のため、直接精査となった。小児科での検査の結果、日齢14でTSH $45.14\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 1.06ng/dl 、FT₃ 2.80pg/ml で甲状腺機能低下症と診断された。

<症例12>日齢6の初回検査でTSH値が $30\mu\text{U/ml}$ 以上のため直接精査となった。ダウン症の児で、病院での検査の結果、日齢9でTSH $84.3\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 0.8ng/dl 、FT₃ 1.41pg/ml で患者と診断され、治療が開始された。

<症例15>日齢5の検査の結果、TSH $72\mu\text{U/ml}$ 以上で直接精査となった。母親が慢性甲状腺炎で

甲状腺ホルモン剤を内服中であったことから、生後すぐに病院で検査されており、TSH $455.7\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 0.4ng/dl 、FT₃ 0.9pg/ml で、母体からの移行抗体による甲状腺機能低下症と診断され、すでに治療が開始されていた。

<症例16>日齢16の再検査でTSH値が上昇していたため要精密検査となった。日齢25の小児科での検査の結果TSH $66.9\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 0.64ng/dl 、FT₃ 3.39pg/ml で、甲状腺機能低下症と診断された。

<症例24>日齢15の再検査で、TSH値が43.9、40.52、 $44.2\mu\text{U/ml}$ と高く、要精密検査となった。日齢30の小児科での検査の結果TSH $64.5\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 0.6ng/dl 、FT₃ 3.4pg/ml で、甲状腺機能低下症と診断された。

<症例31>日齢6の初回検査でTSH値が $30\mu\text{U/ml}$ 以上のため直接精査となった。小児科での検査の結果、日齢9でTSH $47.6\mu\text{U/ml}$ 、FT₄ 1.4ng/dl 、FT₃ 3.9pg/ml 、大腿骨遠位端骨核の出現が認められたが、患者と診断され、治療が開始された。

(3) 副腎過形成症

要精検となった12人のうち2,000g以下の低出生体重児は6人であった。さらにそのうち1,000g以下の極小未熟児は4人であった。

3. 精度管理

精度管理センターから毎月10件ずつ送付されてくる精度管理検体については、アミノ酸、ガラクトース、TSH、17-OHPの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

OHP及びTSHのELISA法による測定キットとして、近年、試薬調製を必要としない液状化試薬が開発され市販されている。当所では、これまで試薬の液状化操作が必要なキットを用いてきたが、OHP測定キットの一部に、プレートの発色

ムラを認めた。そこで、平成13年12月から、OHPについては液状化キットである「エンザプレート Neo-17 α -OHP (バイエルメディカル社製)」への変更を行った。このことにより、操作性が良好になり、安定したデータが得られるようになった。しかし、OHPの抽出法では液状化キットを用いた場合、従来法より、測定値がやや高値になる傾向があるため、再採血率が高くなった。そこで、OHP抽出法の判定基準値の見直しを行ない、抽出法の基準値を3.5ng/mlに変更することにした。なお、従来キットを用いた場合の発色ムラの原因については、試薬メーカーと共に検討を行ったが、今のところ明確な原因は判明していない。

一方、代謝異常症スクリーニングのアミノ酸およびガラクトース検査においては、2次検査法の開発が求められている。特にSLC25A13異常症(成人発症II型シトルリン血症)は、シトルリンをはじめとする多種のアミノ酸の増加とガラクトースの増加が同時に観察される場合が多い疾患であり、平成12年度には本県でも患者が発見されている。当該患児は当所のスクリーニング検査では、初回採血(日令6)でガラクトースが陽性基準値を超え、2回目の採血(日令23)でメチオニンとガラクトースの異常が検出されている。このような事例の場合、簡易に多種のアミノ酸を同時分析できる2次検査システムの整備が有用と考えられ、現

在、ガラクトースのHPLC [8,9] をベースにした、多種アミノ酸の2次検査システムを開発中である。

文 献

1. 厚生労働省雇用均等・児童家庭局長(2001). 雇発第170号.
2. 米田 豊, 九曜雅子(2001). 富山衛研年報, 平成12年度, 48-53.
3. 藤本昭栄, 大浦敏明, 長谷 豊(1991). 日本マス・スクリーニング学会誌, 1(1), 211-212.
4. 美澄博雄, 高坂睦年, 和田 洋, 川上幹子, 二宮福子, 末石照香, 市場洋三(1980). 代謝異常スクリーニング研究会会報, 5, 46-47.
5. 米田 豊(1998). インターネットURL, <http://homepagel.nifty.com/screening/punch.htm>
6. 米田 豊(1999). 富山衛研年報, 平成10年度, 54-57.
7. 市原 侃, 鈴木 健, 青木菊麿(1998). 日本マス・スクリーニング学会誌, 8 Supplement 2, 73-81.
8. 米田 豊, 九曜雅子(2001). 日本マス・スクリーニング学会誌, 11(3), 53-60.
9. 米田 豊, 九曜雅子(2001). 日本マス・スクリーニング学会誌, 11(3), 61-68.

乾燥ろ紙血液中ガラクトースのカラム スイッチングHPLC定量法

米田 豊 九曜 雅子

Quantification of Galactose in Dried Blood Specimens
by Column Switching HPLC

Yutaka YONEDA, Masako KUYO

要 旨 新生児のガラクトース血症マススクリーニングのための、高感度で迅速なガラクトース(Gal)およびガラクトース-1-リン酸(Gal-1-P)の高速液体クロマトグラフ分析法(HPLC)の開発を行った。ガラクトースは2-アミノ安息香酸(ABA)を用いる還元アミノ化法により蛍光標識し、カラムスイッチングHPLCを用いて定量を行った。本法を新生児ろ紙血液に適用したところ、20分サイクルでガラクトースの定量が可能であり、定量限界は血中濃度で0.1 mg/dlであった。また、酵素法との良好な相関が認められた。なお、Galの他、Gal-1-P、グルコース(Glc)、ラクトース(Lac)、グルコサミン(GlcN)及びガラクトサミン(GalN)の定量も可能であった。

ガラクトース血症のマススクリーニングでは、血中のガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼの有無を直接検査するポイトラー法等とともに、ガラクトース(Gal)およびガラクトース-1-リン酸(Gal-1-P)を指標として酵素活性の異常を検査するスクリーニングが行われている。Galの検査法は、大腸菌を用いるペイゲン法 [1] が広く用いられているが、近年、ガラクトース脱水素酵素を用いる酵素法を導入する施設も増加している。酵素法ではマイクロプレート対応の蛍光検出器を用いる方法(MFL)の他、高速液体クロマトグラフ分析(HPLC)用の蛍光検出器を用いる方法 [2] や固定化酵素を用いるフローインジェクション法 [3] なども検討されている。一方、2次あるいは確認検査法としては薄層クロマトグラフィ (TLC) [4] が用いられる他、HPLCを用いた報告 [5] もある。しかし、TLCは定量

性に欠け、また既報のHPLCはアミノカラムを用いる順相HPLCのためカラム寿命等に問題がある。近年、Anumula [6] は2-アミノ安息香酸(ABA)を用いるプレカラム誘導体化HPLC (Fig. 1) により、糖蛋白質中の単糖類の定量を行っている。この方法は逆相カラムを用いて単糖類を分離する方法であり、検出感度も優れている。そこで、この方法をガラクトース血症の新生児マススクリーニングに応用することを試みた。ABAを用いる方法は、その後、ゼラチン中の還元糖の測定にも応用 [7] されているが、1回の分析所要時間はカラム洗浄時間を含め約90分間と長時間を要するという欠点があり、効率的分析が要求されるマススクリーニング検査に用いるには分析時間の短縮化が必要である。そこで、HPLC方式にカラムスイッチング法を導入したところ、高感度で迅速なGal及びGal-1-Pの定量法を確立するこ

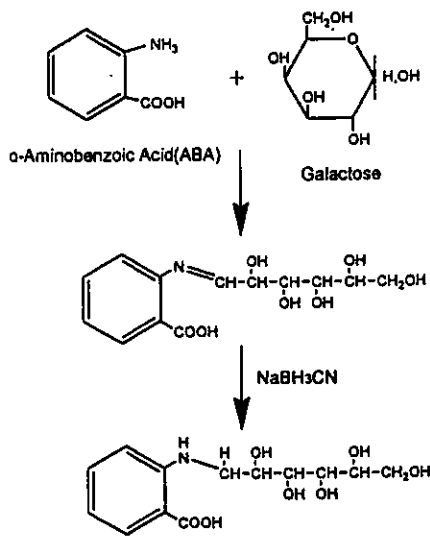


Fig. 1 Derivatization of galactose by reductive amination

とができた。

実 験

1 装 置

プレカラム誘導体化反応用の恒温槽はヤマト製 DRYING-ORVEN model DX-38を用いた。この恒温槽内部にガラスビーズ(直径0.71-0.99mm)を高さ約2cmに敷き詰めたアルミ容器を入れ、ガラスビーズ加熱浴として用いた。

HPLCは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 3台

デガッサー：DG-980-50

オートインジェクター：AS-950-10

カラム恒温槽：CO-1560

蛍光検出器：FP-1520S

カラム切替ユニット(6方バルブ)：HV-992-01

装置制御ソフトウェア：HSS1500 Ver3.3.10

波形処理ソフトウェア：Borwin Ver1.50 Build 12

2 試 薬

2-アミノ安息香酸(ABA：別名アントラニル酸)及び1-ブチルアミンは和光純薬製、シアノ水素化

ホウ素ナトリウムはアルドリッチ製、アセトニトリルは和光純薬製高速液体クロマトグラフィー用を用いた。また、標準品としてGalは和光純薬製D-ガラクトース、Gal-1-Pはシグマ社製D-ガラクトース1リン酸2カリウム塩、グルコース(Glc)は和光純薬製D-グルコース、ラクトース(Lac)は和光純薬製ラクトース一水和物、グルコサミン(GlcN)は和光純薬製D-グルコサミン塩酸塩及びガラクトサミン(GalN)は和光純薬製D-ガラクトサミン塩酸塩を用いた。

また、次の方法により混合標準液、抽出用溶液及びプレラベル誘導体化用のABA溶液を調製した。

混合標準液：Gal, Glc, Lac, GlcN及びGalNをそれぞれ1%酢酸ナトリウム溶液に溶解し、各々100mg/dl溶液を調製し、更にこれらを1%酢酸ナトリウム溶液で希釈し、1mg/dl Gal標準原液、10mg/dl Glc標準原液、0.5mg/dl Lac標準原液、0.2mg/dl GlcN標準原液及び0.2mg/dl GalN標準原液を調製した。次にGal, Lac, GlcN及びGalNの標準原液を各1ml、更にGlc標準原液5mlを合わせ、1%酢酸ナトリウム溶液で全量を10mlとした溶液を混合標準液とした。

抽出用溶液：Galの定量には0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH9.0)を用い、GalとGal-1-Pとの総量を定量する場合は、このトリス緩衝液9.9mlに後述の酵素法キットに添付のAlp溶液(330unit/ml)100 μ lを添加した溶液を用いた。

ABA溶液：ABAを5mlバイアル瓶に30mg秤取りし、これを4%酢酸ナトリウム及び2%ホウ酸含有メタノール1mlに溶解した。この溶液を用い、別の5mlバイアル瓶に秤取しておいたシアノ水素化ホウ素ナトリウム20mgを溶解しABA溶液を調製した。

なお、マイクロプレート酵素法のガラクトース測定キットはバイエルメディカル社製エンザプレート GAL-Rを用いた。

3 実験方法

3. 1 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インチの血液ろ紙1枚に各々エタノール-アセトン-水(7:7:2)を10 μ lずつ滴下後、30分間、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽に入れ溶媒を揮散させた。これに抽出用溶液100 μ lを加え、10分間超音波抽出を行った。各セルの抽出液50 μ lをそれぞれ0.6mlスクリーキャップ付バイアル瓶に分取し、これにABA溶液を50 μ l加え、直ちにVOLTEX型ミキサーで混和した後、80 $^{\circ}$ Cのガラスビーズ加熱浴に入れ、45分間、蛍光ラベル化反応を行った。加熱後、バイアル瓶を水冷し、全量を別に用意した96穴U底マイクロプレートの各セルに移し、オートインジェクターにセットした。また、GalにGal-1-Pも含めた定量を行う場合はAlp含有抽出液100 μ lを用いて、同様に超音波抽出を行い、抽出後、室温に30分間静置して脱リン酸反応を完結させ、以後の操作はGalの定量と同様に行った。なお、定量計算は1/8インチ径の血液ろ紙に含まれる血液量を3 μ l [8]として計算した。Gal-1-Pの定量値は総Gal濃度からAlp溶液を添加せずに測定したGal濃度を差引き、分子量補正係数1.44を乗じて算出した。

3. 2 HPLC条件

カラムスイッチング流路はFig. 2に示すように

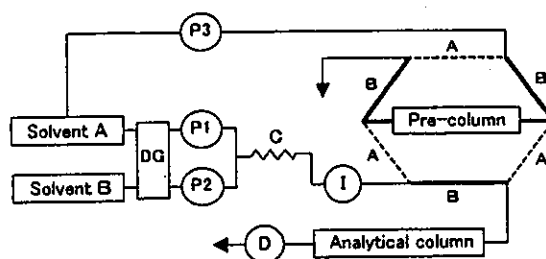


Fig. 2 Flow diagram of column-switching system
DG;Degasser, P1,P2,P3;Pump,
C;Mixing coil, I;Auto injector,
D;Fluorescence detector

配管し、次のHPLC条件で測定した。

分析用カラム：Develosil ODS-UG-5 4.6mm i.d. \times 100mm

前処理カラム：分析用カラムと同種、同サイズのものを用了。

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A液;アセトニトリル-B液(1:1), B液; 0.3%ブチルアミン及び1%テトラヒドロフラン含有0.5%リン酸溶液

送液及びカラム切替パターン：Table 2に示した。

Table 1 Time programs for pump and column selection unit

Pump 3	Time (min)	0.0~	4.0~	12.0~	20.0
	Mobile phase (solution A%)	100	100	100	
	Flow speed (ml/min)	0.2	1.0	0.2	
	Mode	Washing			
Pump 1,2	Time (min)	0.0~	5.3~	11.5~	14.0~ 20.0
	Mobile phase (solution A%)	20	4	100	20
	Flow speed (ml/min)	1.0	1.8	1.0	1.0
	Mode	Head cutting	Separation	Washing	Conditioning
Column Selection Unit	Time (min)	0.0~	5.3~	11.5~	20.0
	Valve position	A position	B position	A position	
	Mode	Analytical column was joined to pre-column	Analytical column was separated from pre-column	Analytical column was joined to pre-column	

蛍光検出波長：Ex 360nm, Em 425nm
 蛍光検出器感度：GAIN 10
 注入量：10 μ l

結 果

1 HPLC条件の検討

Anumula [6] の方法では過剰のABAがクロマトグラム上に出現し、Gal及びGlcはABAの溶出後、ABAのテーリング上に溶出されている。短時間分析の検討を行うため、まず移動相に移動相B液-アセトニトリル混液を用いてアイソクラティック溶出を試み、アセトニトリルの組成を増加させて、ABA、Gal及びGlcの溶出パターンを観察した。その結果、アセトニトリルの組成を10%以上にするとGal及びGlcはABAより早い位置に溶出し、ABAのテーリングはみられるものの、リーディングは認められないことから、GalとABAの完全分離が達成できた。ただ、この条件ではGalとGlcの溶出位置は同一であるため、カラムスイッチングによるヘッドカットでGalとGlcを含む分画のみを分析カラムへ送り、GalとGlcの分離を行う方式によりHPLCを行うことでガラクトース分析が可能と考えられた。送液方法並びにカラム切替バルブの切替タイミングについ

て、種々の検討を行い、どのタイミングにおいてもカラム圧が100Kg/cm²を超えず、且つ、より迅速な分離が可能なTable 1に示す分析条件を採用することとした。

2 ABAによる蛍光標識の反応時間の検討

Gal, Glc, Lacの濃度が1 mg/dlの1%酢酸ナトリウム溶液を各々1 ml, GlcN及びGalNの1 mg/dl溶液を各々0.5mlずつ合わせて混合溶液を調製し、この混合溶液を用いて、蛍光標識に必要な反応時間の検討を行った。前記混合液100 μ lにABA溶液100 μ lを加え、ガラスビーズ加熱浴中で加熱する試験を、加熱時間1, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120及び150分間について行った。その結果はFig. 3に示すようにGal, Glc及びLacは概ね30分で反応が終了し、GlcN及びGalNは150分経過しても、なお反応が進行している様子が観察された。従って、Galの分析では加熱時間を45分間に設定した。

3 蛍光標識物質の安定性

前項の試験結果に基づき、ABA溶液との加熱時間を45分間とした場合、反応液を冷却し、HPLC装置にセットした後もGlcN及びGalNとABAの反応が進行したり、また、逆にGal, Glc及びLacとABAとの反応生成物が分解する

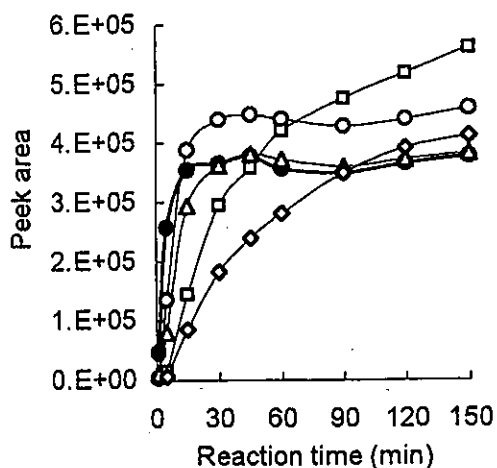


Fig. 3 Effect of reaction time with ABA on peak area

○—Glc ●—Gal ▲—Lac
 □—GalN ◇—GlcN

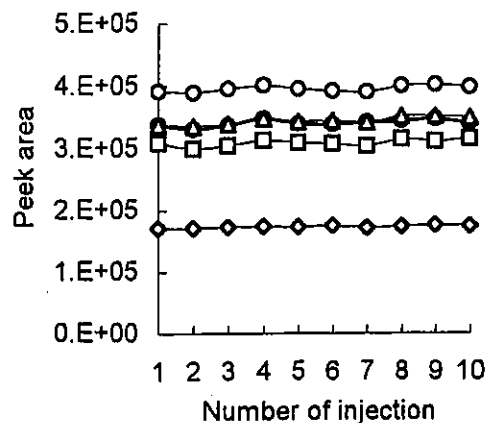


Fig. 4 Stability of derivatized carbohydrates

○—Glc ●—Gal ▲—Lac
 □—GalN ◇—GlcN

恐れがあるため、これらを確認する必要がある。そこで、45分間反応後の反応液を繰返しHPLCに注入し、蛍光標識物質の安定性を調べた。その結果をFig. 4に示した。Fig. 4では10回注入まで、すなわち反応後200分までの安定性を示したが、GlcN及びGalNを含めHPLC装置にセット後は、いずれの糖も安定であることが認められた。なお、この実験で得られたGalの繰返し注入のピーク面積は 340158 ± 5180 (平均値±標準偏差)であり、再現性は変動係数1.5%であった。

4 検量線及び定量限界

混合標準液を用い、Gal濃度が0.10, 0.08, 0.06, 0.04及び0.02mg/dlになるよう1%酢酸ナトリウム溶液で希釈し検量線を作成した。HPLCの注入量が10 μ lであることから、Galの絶対注入量はそれぞれ10, 8, 6, 4及び2 ngとなる。また、血液中濃度0.1mg/dlに相当するHPLC用試験溶液中濃度である0.003mg/dl (絶対注入量0.3ng=約1.7pmol)の検出も可能であったことから、血液中濃度で0.1mg/dlを定量限界とした。また、Fig. 5に示すように、Glc, Lac, GlcN及びGalNの検量線もほぼ原点を通る良好な直線が得られた。なお、混合標準液中のGal濃度は、検体のGalピーク面積が、混合標準液のGalピーク面積と同等の場合、検体中のGal濃度が陽性基準値近辺の3.3

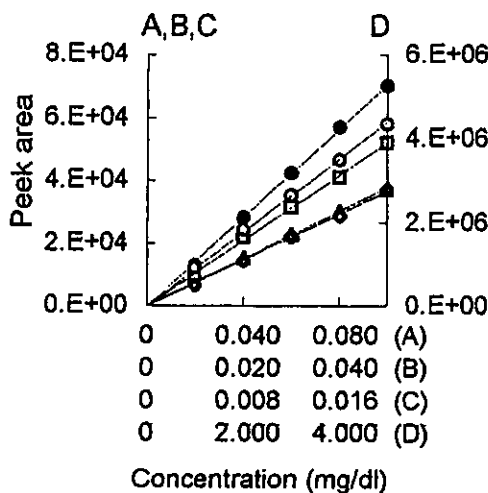


Fig. 5 Calibration curves (A:Gal, B:Lac, C:GalN and GlcN, D:Glc)
●Gal ▲Lac □GalN ◆GlcN ○Glc

mg/dlに相当するよう配慮し設定した。また、Glcの混合標準液の濃度は、新生児血液中のGlc濃度は数十mg/dl以上のオーダーで含有することから、正常新生児のろ紙血液30検体から調製した試験溶液をプールし、そのプール溶液に本法を適用して得られたクロマトグラムを参考に、ろ紙血液中のGlcの定量に適した濃度として5 mg/dlに設定した。

5 酵素法用標準血液ろ紙中Galの定量

酵素法のGal測定キットに添付されている標準血液ろ紙のうち異なる濃度の4種のろ紙から3スポットずつを切出し、本法を適用した。その結果はFig. 6に示すようにMFL用標準血液ろ紙の表示Gal濃度とHPLC定量値間に高度の相関が認められたが、本法の定量値(Y)はGal標準血液ろ紙の表示濃度(X)に対し $0.8556X - 0.2751$ となり、やや低値を示した。

6 脱リン酸反応時間の検討

Anumula [6]は試験溶液の溶媒に1%酢酸ナトリウム溶液(pH7.7)を用いている。しかし、Gal-1-Pの測定ではAlp溶液による脱リン酸の必要があり、Alpの至適pHが9.0であることから0.1 Mトリス塩酸緩衝液(pH9.0)を調製し、抽出及び脱リン酸に用いる溶媒としてどちらが優れている

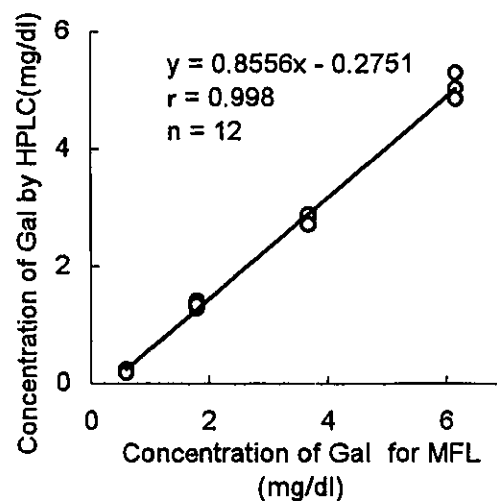


Fig. 6 Correlation of concentration of Gal in standard discs for galactosemia

かを検討した。検討には酵素法により Gal が 0.23 mg/dl, Gal-1-P が 3.10mg/dl 検出されたる紙血液 (S6206) を用い, Alp 溶液との反応時間 (超音波抽出後の室温での静置時間) を 0, 15, 30, 45, 60, 90 及び 120 分とした場合の測定値を調べた。その結果は Fig. 7 に示すように, 1% 酢酸ナトリウム溶液では 30 分の静置が必要であったのに対し, 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH9.0) では, 超音波抽出直後にほぼ脱リン酸反応は完結していた。本法では静置時間を 30 分とした。なお, 検討に用いたろ紙血液 (S6206) 中の Gal 及び Gal-1-P の HPLC 定量値はそれぞれ 0.13 及び 3.00mg/dl であり, 酵素法の Gal-1-P 濃度と良く一致した。

7 新生児検体への応用

7. 1 MFL と HPLC との相関

MFL により Gal が一次検査の陽性基準値である 5 パーセントタイルを超えた新生児のろ紙血液 40 検体を含む一般新生児検体合計 80 検体を本法でも定量し, MFL と HPLC から得られた定量値の相関を調べた。その結果は Fig. 8 に示すように, 相関係数 0.987 と良好な相関が認められた。なお, HPLC 定量値 (Y) は MFL 定量値 (X) に対し $0.8376 X - 0.3561$ となり, MFL 用の標準ろ紙を用いて行った実験 (Fig. 6) と同様, MFL より低値が得られた。また, 混合標準液, ブランク及び Gal が

1.40mg/dl 検出された新生児ろ紙血液のクロマトグラムを Fig. 9 に示した。

なお, 今回使用した新生児ろ紙血液 80 検体から Lac は 0.1-1.3mg/dl 検出され, GalN 及び GalI は殆ど検出されなかった。

7. 2 ガラクトース負荷試験検体の測定

Fig.10 にガラクトース負荷試験時に採血されたるろ紙血液の分析例 2 例を示した。No1 および No2 の検体共, 門脈-体循環系シャントと診断された児のろ紙血液検体で, No1 は月齢 1 ヶ月, No2 は 1 才 5 ヶ月の児に対し, 無糖乳期間を設けず, 各々 Gal を体重あたり 1.75g/Kg を投与している。これらの例では, Gal は 60 分後, Gal-1-P は 120 分後に極大濃度となることが観察された。

考 察

還元糖の HPLC 分析については種々の検討 [9] がなされているが, 新生児マススクリーニングに適用可能な方法は, これまで殆ど開発されていない。その理由のひとつとしてガラクトース血症のマススクリーニングでは試料に直径 1/8 インチの血液ろ紙を用いることから, 試料量が少なく高感度の分析が要求されることが挙げられる。例えば血液ろ紙 1 枚から Gal を 100 µl の抽出溶媒で抽出

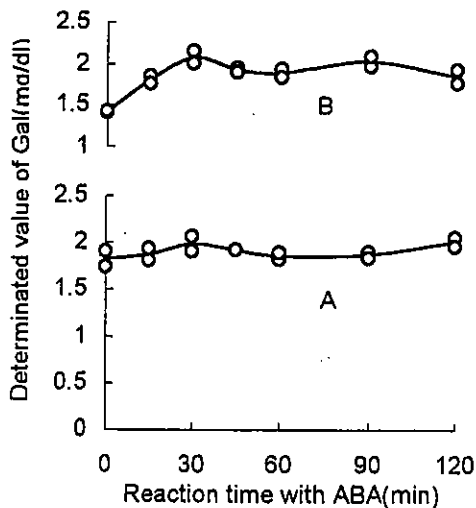


Fig. 7 Time course of phosphohydrolysis of Gal-1-P (A:0.1M Tris buffer, B:1% sodium acetate solution)

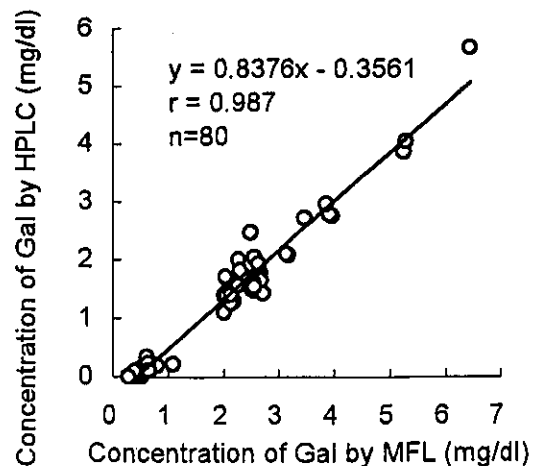


Fig. 8 Correlation of determined concentration of Gal in blood of newborn by HPLC and MFL

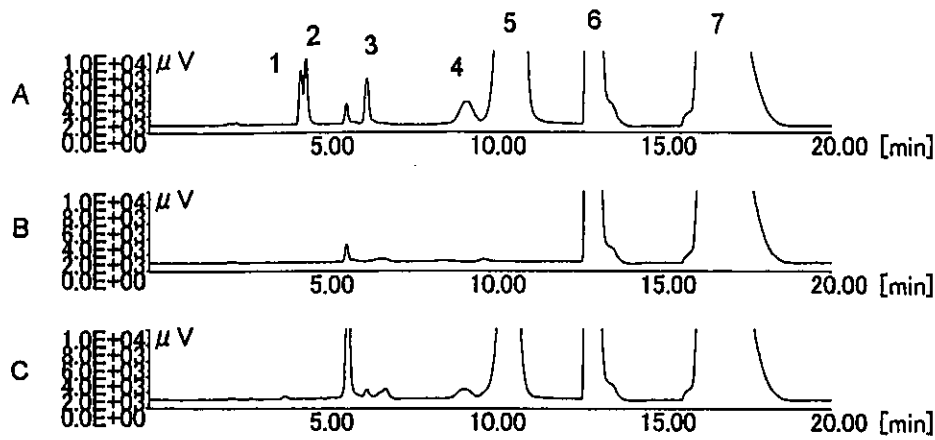


Fig. 9 Chromatograms of standard solution(A), blank solution(B) and normal blood(C)
1;GlcN, 2;GalN, 3;Lac, 4;Gal, 5;Glc, 6 and 7;Peak by wash

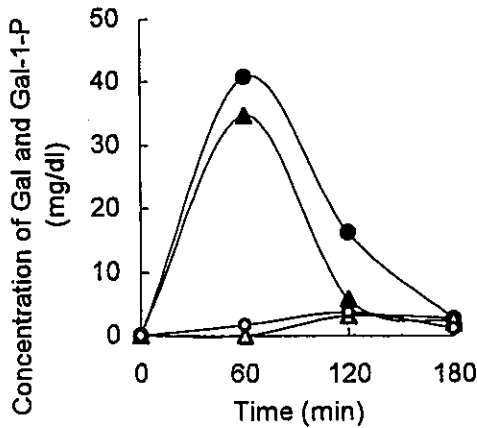


Fig.10 Result of galactose challenge test

—▲— No1 Gal —●— No2 Gal
—△— No1 Gal-1-P —○— No2 Gal-1-P

し、その1/10量をHPLCに注入すると仮定すると、Galの血中濃度が0.1mg/dlである紙血液中のGalを定量するためには、約1.7pmol以下を検出できる感度が必要となる。更に、迅速な分析も求められる。近年、糖を還元アミノ化法により蛍光あるいはUV標識し、HPLCを行う高感度のプレカラムHPLCが多数報告 [10] されている。還元アミノ化剤としては2-アミノピリジン、4-アミノベンゾニトリルやABAなどが用いられている。特に、ABAを用いて生成される蛍光物質は分子内にカルボン酸基を有するため、炭水化

物の分離に有利とされている [6]。このことは、GalとGlcの分離にも有利と思われ、血中に多量に含まれるGlcによる定量妨害を防ぐ上で、ABAは優れたラベル化剤と考えられる。本法ではカラムスイッチング法の採用により、HPLCに要する分析時間を従来法の90分間から20分間へと大幅に短縮できた。カラムスイッチングに用いた流路は、先に著者らが報告したアミノ酸分析用の流路 [11] とほぼ共通であるため、装置を共用できるメリットもある。また、酵素法より広範な定量範囲を有することから、負荷試験など、予想される定量値に幅がある場合でも、柔軟に対応できる特徴がある。今回は特に内部標準法は用いず、ピーク面積による絶対検量線法により定量を行ったが、一般新生児検体ではGlcN及びGalNの溶出位置にピークが認められないため、これらの物質を内部標準物質として利用することも可能と思われる。しかし、代謝異常を示す検体で、これらのピークが検出される可能性も否定できないため、内部標準物質の選定は、今後慎重に行うべきであると考えている。

文 献

1. 吉田篤子(1989). 新生児マススクリーニングハンド

- ブック(成瀬 浩, 松田一郎編), p233-239, 南江堂.
2. 服部絹代, 高野弘紀, 柴田 實(1999). 日本マス・スクリーニング学会誌, 9(2), 66.
 3. 伊藤克敏, 三留真珠美, 荒川秀俊, 前田昌子(2000). 分析化学, 49, 953-959.
 4. 藤本昭栄(1989). 新生児マススクリーニングハンドブック(成瀬浩, 松田一郎編), 南江堂, p254-259.
 5. Mizoguchi, N. Eguchi T., Sakura N., Ueda K. (1993). Clinica Chimica Acta., 216, 145-151.
 6. Anumula K.R.(1994). Anal Biochem, 220, 275-283.
 7. 谷 貞子, 谷 威廣(1998). 日本写真学会誌, 61, 83-87.
 8. Hannon WH, Aziz KJ, Collier FC, Fisher DA (1992). Blood collection on filter paper for neonatal screening programs, (2nd ed.Villanova, PA), National Committee for Clinical Laboratory Standards, 12, p1-23.
 9. 福井作蔵(1990). 生物化学実験法 1 還元糖の定量法第2版, p177-194, 学会出版センター.
 10. Hase S.(1996). J.Chromatogr. A 720, 173-182.
 11. 米田 豊, 九曜雅子(1999). 日本マス・スクリーニング学会誌, 9(3), 43-55.

乾燥ろ紙血液中ガラクトースのHPLC定量法 (第2報)

米田 豊 九曜雅子

Modified Method for Quantification of Galactose in Dried
Blood Specimens by Column Switching HPLC

Yutaka YONEDA, Masako KUYO

要 旨 前報 [1] で提案した新生児のガラクトース血症マススクリーニングのためのカラムスイッチング高速液体クロマトグラフ分析法 (HPLC) を一次検査に対応可能な方法に改良した。改良内容は 1) HPLCの1分析所要時間を20分間から10分間に短縮, 2) 定量方法を絶対検量線法から内部標準法に変更し, 定量精度を向上, 3) 蛍光ラベル化に用いる還元剤を毒性が高く, また潮解性を有するシアノ水素化ホウ素ナトリウムから, より低毒性のボランジメチルアミン錯体 (BDMA) に変更し, 環境汚染および分析の操作性に配慮, 4) 蛍光ラベル化時の加温方法として80°Cの方法の他, マイクロプレート内で行える緩和な加温条件を設定し, 多検体処理に対応, 5) ガラクトース分析に用いたHPLC装置をアミノ酸分析に用いた場合, ゴーストピークが出現し, 装置の洗浄を要したことから, 移動相中のカウンターイオンを1-ブチルアミンからテトラ-n-ブチルアンモニウムヒドロゲンサルフェート (TBA) に変更し, ゴーストピークの出現を抑制, の5点である。以上により, ガラクトース血症のHPLCによる一次スクリーニング検査が可能となった。

前報 [1] で, マススクリーニング血液ろ紙中のガラクトース (Gal) の高速液体クロマトグラフ定量法 (HPLC) を報告した。この方法は2次検査に用いるには十分な感度, 迅速性および操作性を有していたが, 1次検査法として全検体検査に用いるには課題もあった。そのひとつは, HPLC分析の更なる迅速化と内部標準法の採用である。また, 蛍光ラベル化に用いる還元剤は毒性が高いため, より低毒性の還元剤に変更すること, 同時に, 多検体処理に適した蛍光ラベル化方法に改善する必要がある。更に, ガラクトース分析に用いたHPLC装置をアミノ酸分析用に切替えて使用する場合, 1-ブチルアミンあるいはそ

の不純物によると考えられるゴーストピークの出現が認められたため, 装置の汚染を生じない移動相を採用する必要もあった。そこで, これらの問題点の改善を試み, ガラクトース血症の1次検査にも対応可能な検査法への改良を図った。

実 験

1 装 置

前報 [1] の装置を用いた。

2 試 薬

ボランジメチルアミン錯体 (BDMA) はアル

ドリッチ製を用い、テトラ-*n*-ブチルアンモニウム
 ハイドロゲンスルフェート (TBA) は東京化
 成製を用いた。セロビオース (Cel) は和光純薬
 製D-セロビオースを用い、その他の試薬は前報
 [1] に準じた。

ABA溶液：BDMAを5 mlバイアル瓶に20mg秤
 取し、これを4%酢酸ナトリウム、2%ホウ酸含
 有メタノール1 mlに溶解した。この溶液を用い、
 別の5 mlバイアル瓶に秤取しておいたABA 30
 mgを溶解しABA溶液とした。

0.5mg/dl Cel-ABA溶液：100mg/dl Cel含有1
 %酢酸ナトリウム溶液200 μ lを0.5mlバイアル瓶
 にとり、これに等量のABA溶液を加え、80°Cで
 30分間蛍光ラベル化反応を行った。反応液を冷却
 した溶液をCel-ABA原液とした。Cel-ABA原液
 を1%酢酸ナトリウム溶液で100倍に希釈し、0.5
 mg/dl Cel-ABA溶液を調製した。

内部標準含有混合標準液 (IS含有標準液)：Gal,
 グルコース (Glc), ラクトース (Lac), グルコ
 サミン (GlcN) およびガラクトサミン (GalN)
 をそれぞれ1%酢酸ナトリウム溶液に溶解し、各々
 100mg/dlの溶液を調製し、更にこれらを1%酢
 酸ナトリウム溶液で希釈を行い、Gal, Lac, GlcN
 およびGalNは各々1 mg/dl, Glcは10mg/dlの
 標準原液を調製した。次にGal, Lac, GlcNおよ
 びGalNの標準原液および0.5mg/dl Cel-ABA溶
 液を各々1 ml, 更にGlcの標準原液5 mlを加え
 た溶液をIS含有標準液とした。

IS含有抽出用溶液：Cel-ABA原液を1%酢酸ナ
 トリウム溶液で1000倍に希釈し用いた。

移動相B液：5 mM TBA含有100mMリン酸二水
 素カリウム溶液にリン酸を加えてpHを2.0に調整
 した。

3 実験方法

3.1 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インチの血液ろ紙1枚にエタノール-アセト
 ン-水(7:7:2)を10 μ lずつ滴下後、30分間、37°Cの
 恒温槽に入れ溶媒を揮散させた。これにIS含有
 抽出用溶液100 μ lを加え、10分間超音波抽出を行っ

た。次に、各セルの抽出液およびIS含有標準液
 50 μ lずつを別のマイクロプレートに分取し、こ
 れにABA溶液を50 μ l加えて振とう後、37°Cの
 恒温槽内で90分間加熱した。なお、少数検体を迅
 速に処理する場合は、スクリュウキャップ付0.6
 mlバイアル内で、80°Cのガラスビーズ加熱浴を
 用い30分間反応を行った。蛍光ラベル化反応をマ
 イクロプレート内で行った場合は、マイクロプレ
 ートをそのままHPLCにセットし、バイアル瓶を
 用いて行った場合は、反応液を冷却後、マイクロ
 プレートに移しHPLCに供した。

3.2 HPLC条件

カラムスイッチング流路、前処理および分析カ
 ラム、カラム温度、蛍光検出条件および注入量は
 前報 [1] と同様の条件を用いた。移動相A液に
 はアセトニトリル-移動相B液(1:1)を、移動相液
 B液には5mM TBA含有100mMリン酸緩衝液
 (pH2.0)を用いた。

送液およびカラム切替えパターンはTable 1の
 条件で行った。なお、蛍光検出器のオートゼロ機
 能によるベースラインの再設定は、HPLC試験
 溶液の注入直後には行わず、注入1分後の時点で
 を行った。

結 果

1 HPLC条件の検討

1.1 分析時間の短縮化

HPLC分析の所要時間の短縮を図るため、カ
 ラムの洗浄方法の改良を行った。前報 [1] では、
 分析カラムでの分離終了後、前処理カラムと分析
 カラムを直列に連結した状態で、洗浄液を送液し
 ていたが、この方法では、前処理カラムに存在し
 ているカラム汚染物質が分析カラムを通過するた
 め、分析カラムを汚染させる恐れがあった。また、
 Glc溶出後、洗浄由来の2つの大きなピークの溶
 出が終わるために約8分間を要していた。そこで、
 今回は、前処理カラムは1分析毎に洗浄を行い、
 分析カラムの洗浄は毎回行わず、複数回の分析
 終了後、1日に1回程度の定期的な洗浄を行う方

Table 1 Time programs for pump and column selection unit

Pump 3	Time (min)	0.0~	5.0~	9.0~	10.0
	Mobile phase (solution A%)	100	100	100	
	Flow speed (ml/min)	0.2	1.5	0.2	
	Mode		Washing		
Pump 1,2	Time (min)	0.0~	5.8~	8.5~	10.0
	Mobile phase (solution A%)	20	14	20	
	Flow speed (ml/min)	1.0	2.0	1.0	
	Mode	Head cutting	Separation	Conditioning	
Column Selection Unit	Time (min)	0.0~	5.8~	8.5~	10.0
	Valve position	A position	B position	A position	
	Mode	Analytical column was joined to pre-column	Analytical column was separated from pre-column	Analytical column was joined to pre-column	

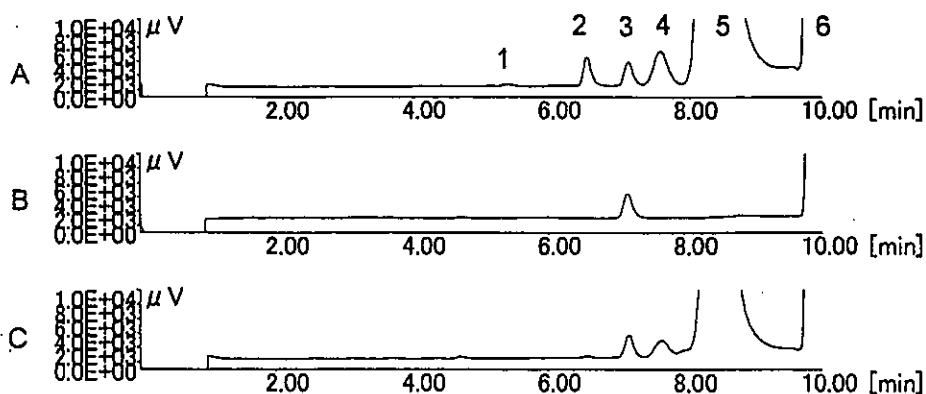


Fig. 1 Chromatograms of standard solution(A),blank solution(B) and normal blood No155(C)
1;GalN, 2;Lac, 3;Cel, 4;Gal, 5;Glc, 6;Peak by wash

法を採用することで、分析時間の短縮化を図った。但し、分析時間の短縮に伴い、分析カラムによる分離と同時に前処理カラムの洗浄時間も短縮されるため、前処理カラムの洗浄液送量を1.0 ml/minから1.5ml/minに増加した。その結果、12分サイクルでの連続分析が可能になった。しかし、この方法ではGalピークの直前に小さなシステムピークが出現した。そこで、このシステムピークが現れないクロマトグラムを得る方法を検討した。その結果、Fig. 1に示すようにカラム洗浄に伴うピーク（ピークNo6）の溶出が終わる前に次の試験溶液を注入するオーバーラップ注入法を行うことにより、前記のシステムピークは出現なくなり、同時にHPLCの1分析所要時間を12分

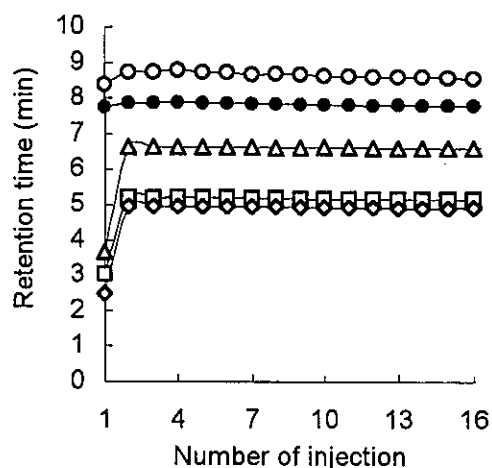


Fig. 2 Stability of retention time
—○— Glc —●— Gal —△— Lac
—□— GalN —◇— GlcN

間から10分間に短縮できた。なお、Glcの位置に僅かなベースラインの上昇が認められたが、検体でのGlcのピーク面積は非常に大きいため無視し得る程度であった。Fig. 1にはIS含有標準液およびブランク溶液（IS含有抽出用溶液）のクロマトグラムと共に新生児ろ紙血液例（No155）のクロマトグラムを示した。なお、検体No155の本法によるGal定量値は1.3mg/dlであった。

1. 2 繰返しHPLC分析間隔

混合標準液を用いて、12分サイクルでHPLCの連続分析を行ったところ、Fig. 2に示すようにGlcNおよびGalNの保持時間は1回目より2回目以降の分析での保持時間が著しく長くなる現象が観察された。しかし、Galについては、この保持時間の変動は認められなかった。1回目と2回目以降との保持時間の変動原因として、短時間の繰返し分析では分析開始時に移動相が初期状態に戻りきっていないまま、次の分析が行われるためと考えられた。そこで、分析間隔を変化させて、保持時間の変化を観察した。Fig. 3に分析間隔と2回目の各物質の保持時間との関係を示した。Fig. 3の結果からHPLCを注入の初期状態に戻すには少なくとも30分間を要し、30分間以上の間隔でHPLCを行う必要があるとみなされた。しかし、30分間隔では逆に分析時間が延びてしまうことになる。そこで、敢えて、10分サイクルでの分析を行い、第1回目の分析はダミー分析とする

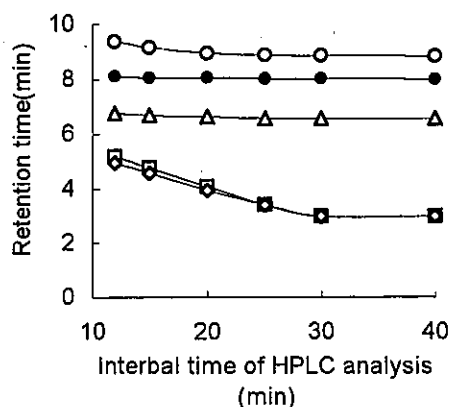


Fig. 3 Effect of interval time of injection on retention time

—○— Glc —●— Gal —△— Lac
—□— GalN —◇— GlcN

こととした。

1. 3 カウンターイオンの検討

新生児マススクリーニングではガラクトース分析と同時にアミノ酸分析も必要とされる。前報 [1] ではGal分析に1-ブチルアミンを含む移動相を用いていたため、Gal分析後、同一の装置でo-フタルアルデヒドを用いるポストカラム法によるアミノ酸分析 [2] を行った場合、1-ブチルアミンあるいはその不純物によると思われるゴーストピークがTyrとIleのピーク間に出現した。また、この汚染ピークは容易には除去できなかった。そこで、今回は1-ブチルアミンに替えてTBA [3] をカウンターイオンとして用いたことでゴーストピークは消失し、アミノ酸分析への切替えが容易になった。

1. 4 移動相中のTBAおよびリン酸緩衝液濃度

移動相B液中のTBA濃度は5および10mMについて検討を行った。その結果、10mMより5mMの方がGalとGlcの分離が良好であった。また、リン酸緩衝液(pH2.0)の濃度は50および100mMについて検討を行ったところ、50mMよりも100mMの方がGalとGlcの分離が良好であったことから、移動相B液は5mM TBA含有100mMリン酸緩衝液(pH2.0)を採用することとした。

1. 5 内部標準物質候補の選択

内部標準物質としては生体内に殆ど存在しない糖で、Gal近辺の保持時間を有する物質が適している。そこで内部標準物質として、植物に存在する糖を探索した。ブドウおよびリンゴの果実をすり潰し、得られた果汁を水で希釈した溶液を、ABA溶液を用いて蛍光ラベル化反応を行いHPLCに供したところ、ブドウおよびリンゴ共、その果汁中に、Galの直前に溶出する物質が存在することが分かった。そこで、この物質の同定を行ったところ、Celの保持時間と一致したことから、Celを内部標準物質候補とした。

2. 蛍光ラベル化条件の検討

2. 1 還元剤の選択および必要濃度

前報 [1] で用いた還元剤のシアノ水素化ホウ

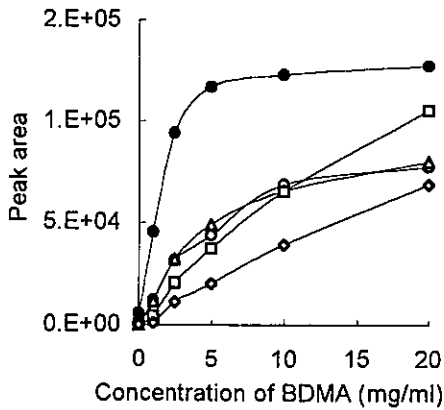


Fig. 4 Effect of concentration of BDMA on peak area

—○— Glc —●— Gal —△— Lac
—□— GalN —◇— GlcN

素ナトリウムは毒性が高いうえ、潮解性が高く秤量し難い面があった。そこで、他の還元剤の利用を試みた。亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、ヒドロサルファイト、アスコルビン酸、テトラヒドロホウ素ナトリウムおよびBDMAについて検討を行ったところ、BDMAがシアノ水素化ホウ素ナトリウムの代用になり得ることが分った。次に、Gal, Glc, Lac, GlcNおよびGalNを各々0.2mg/dlを含む溶液を用いてBDMAの必要量の検討を行った。ABAを30mg/ml含む4%酢酸ナトリウム、2%ホウ酸含有メタノール溶液を調製し、この溶液を用い、

BDMA濃度が0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0および20.0 mg/dlとなるようBDMA溶液を各々調製した。これらの溶液を用い、糖を含む溶液とを等量混和し、80°C、30分間の反応を行い、BDMA必要量を調べた。その結果はFig. 4に示すように、Galでは5 mg/dl以上の濃度ではピーク面積の増大は僅かであった。GlcおよびLacの反応も考慮し、BDMA濃度は20mg/dlとした。

2. 2 反応温度および反応時間の検討

還元剤をBDMAに替えたことから、蛍光ラベル化に必要な反応温度および時間の再検討を行った。まず、IS含有標準液を用い、反応温度80°Cにおける経時変化を観察した。その結果はFig. 5に示すように、Galは15分、LacおよびCelは45分で概ね反応が完結し、GlcNおよびGalNは60分後の時点でも反応は進行を続ける様子が認められた。この結果から、反応時間は30分間を採用することとした。また、Fig. 5の結果からGalは他の糖よりも迅速に反応することが認められた。このことは、80°Cより低温でも反応が進行する可能性を示唆している。そこで、37°Cでの反応の様子を調べた。その結果、Fig. 6に示すようにGalのピーク面積はほぼ75分後にプラトーに達した。この結果から、37°Cの反応では90分を反応時間とした。

2. 3 内部標準物質の使用

Fig. 5およびFig. 6に示すように、80°Cおよび

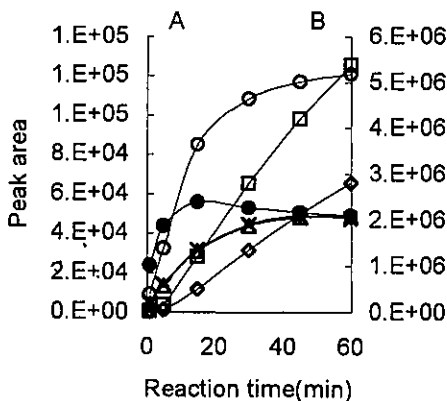


Fig. 5 Effect of reaction time on peak area at 80°C

(A:except for Glc, B:Glc)

—●— Gal —×— Cel —△— Lac
—□— GalN —◇— GlcN —○— Glc

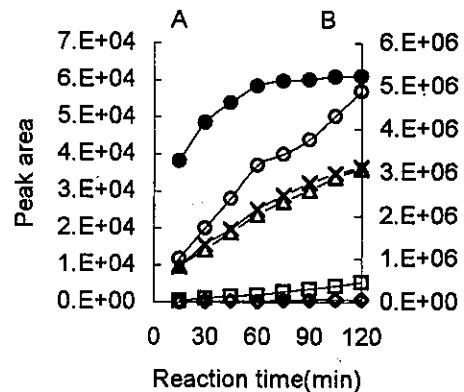


Fig. 6 Effect of reaction time on peak area at 37°C

(A:except for Glc, B:Glc)

—●— Gal —×— Cel —△— Lac
—□— GalN —◇— GlcN —○— Glc

び37°Cのいずれの反応条件においても、LacとCelはABAとの反応のタイムコースは良く一致していた。従って、Lacの定量用の内部標準物質としてはCelが適していた。しかし、ABAとCelとの反応はGalとの反応より遅いため、Celをそのまま、Gal定量用の内部標準物質に用いることは困難であった。そこで、CelをあらかじめABAと反応させて得られたCelのABA標識物を内部標準物質として用いた。なお、IS含有標準液を用い37°Cで90分間蛍光ラベル化反応を行った溶液を連続60回(計10時間)の分析を行い、GalのCelに対するピーク面積比の変動を調べた結果、変動係数は0.98%であり、一度に多検体の処理を行った場合の分析順序に基づく定量値の変動は殆どないことが確認された。

2. 4 抽出用溶媒

血液ろ紙からの抽出溶媒として、前報 [1] では0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH9.0)を用いたが、トリス塩酸緩衝液を用いた場合10分サイクルでのHPLCでLacのピークの後に、小さなピークが出現し、抽出溶媒に1%酢酸ナトリウム溶液を用いた場合、当該ピークは出現しなかった。

ガラクトース-1-リン酸(Gal-1-P)の定量の際の、Gal-1-Pとアルカリフォスファターゼの反応は1%酢酸ナトリウム溶液を抽出溶媒として用いても支障がないことから、今回は内部標準物質を含有する1%酢酸ナトリウム溶液を抽出溶媒に用いた。

3 検量線

検量線用標準原液を1%酢酸ナトリウムで希釈しGal, Lac, GalNおよびGlcNはそれぞれ0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08および0.10mg/dl, Glcは1.0, 2.0, 3.0, 4.0および5.0 mg/dlの濃度で内部標準法により検量線を作成した。80°C30分間および37°C90分間の反応で得られた検量線をそれぞれFig. 7およびFig. 8に示した。

4 酵素法用標準ろ紙血液および新生児ろ紙血液への応用

酵素法のGal測定キットに添付されている標準ろ紙血液(バイエル・メディカル社製)および正常新生児ろ紙血液に37°C90分間の反応による本法を適用し、Galの定量を行った。Fig. 9には標準ろ紙血液によるMFLとHPLC間のGal定量値の相関を、Fig. 10には新生児検体のヒストグラムを示した。標準ろ紙血液および新生児検体共、GalのMFLとHPLC間の定量値には高度の相関が認められ、相関係数はそれぞれ0.9992および0.9268であった。また、標準ろ紙血液と新生児検体共、MFLではHPLCより高い定量値が得られ、新生児検体ではHPLCによる定量値の平均0.05mg/dlに対しMFLでは0.51mg/dlと0.46mg/dl高い定量値が得られた。

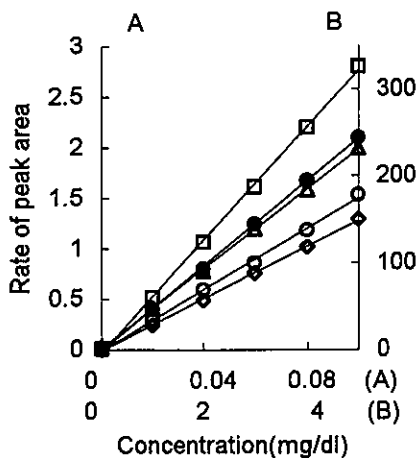


Fig. 7 Calibration curves at 80°C,30min (A:except for Glc, B:Glc) ● Gal ▲ Lac □ GalN ◆ GlcN ○ Glc

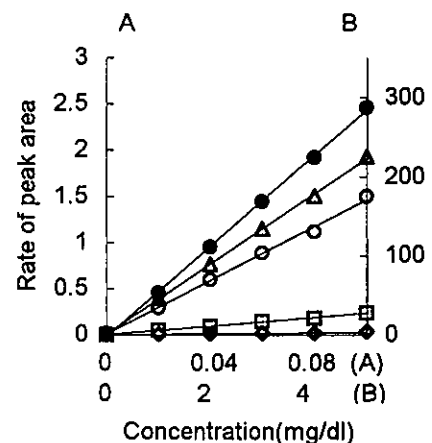


Fig. 8 Calibration curves at 37°C,90min (A:except for Glc, B:Glc) ● Gal ▲ Lac □ GalN ◆ GlcN ○ Glc

考 察

当所のような月間の受付検体数が1000検体程度の中規模の検査施設では、再検検体等を含めると1日に60検体以上の処理能力が必要である。一方、これまでのようにHPLC 1分析の所要時間が20分間では夜間分析を行っても50検体程度しか分析できないため、更に分析時間を短縮する必要があった。今回の改良によって、HPLC 1分析の所要時間は10分間と従来の1/2に短縮できた。これにより、夜間分析で96穴マイクロプレート1枚分の処理が可能になった。糖の還元アミノ化法による分析では、多くの報告で、還元剤として毒性の高いシアノ水素化ホウ素ナトリウムが用いられている。BDMAはHase [4] が糖鎖分析に用いており、また、ボラン錯化合物として、BDMAの他、ブチルアミン錯体、トリエチル錯体など数種が市販されており、これらの還元剤も利用できる可能性があると考えられる。今回用いたBDMAはシアノ水素化ホウ素ナトリウム使用時に認められた時間経過に伴うABA溶液の変色は起こり難く、また、ABA溶液は4℃の冷蔵保管で少なくとも2か月間は使用可能であった。

Meyerら [3] は4-アミノ安息香酸(4-ABA)を用いて糖の分析を行っている。しかし、4-ABA

では調製した4-ABAは放置により、沈殿物が生じたが、我々の2位の置換体ではこのような現象がみられないことから、日常検査に用いる場合、有利と考えられた。また、従来用いられている糖の蛍光ラベル化反応の多くは100℃以上の高温での加熱を必要としているが、ABAとBDMAによる蛍光ラベル化では、37℃でも反応が進行するため、マイクロプレート内でのラベル化が可能であり、多検体処理に適していた。また、Cel-ABAを内部標準物質として用いることができ、本法はガラクトース血症マススクリーニングの2次検査のみならず1次検査法にも対応可能と考えられる。

文 献

1. 米田 豊, 九曜雅子(2002). 日本マス・スクリーニング学会誌, 11(3), 53-60.
2. 米田 豊, 九曜雅子(1999). 日本マス・スクリーニング学会誌, 9(3), 43-55.
3. Meyer A., Raba C., Fischer K. (2001). Anal. Chem., 73, 2377-2382.
4. Hase S. (1993). Methods in Molecular Biology 14 (Hounsell, E.F., Ed.), p69-80, Humana Press, Totowa, NJ.

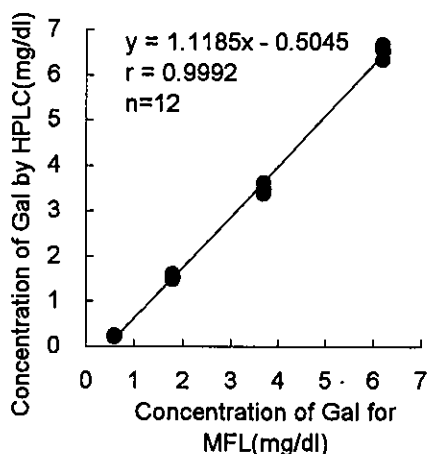


Fig. 9 Correlation of concentration of Gal in standard discs for galactosemia

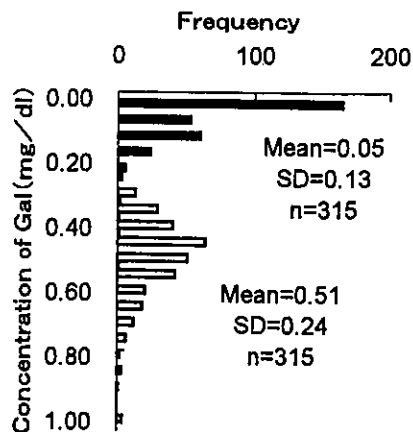


Fig.10 Distribution of concentration of Gal determined by MFL and HPLC

□ MFL ■ HPLC

ヒト染色体に関する調査研究—血液・骨髄液— 平成13年度

林 美貴子 本田 幸子 加藤 丈士

Chromosome Analysis of Human Blood and Bone Marrow Cells

Mikiko HAYASHI, Sachiko HONDA and Takeshi KATO

要旨 平成13年度の受付数は血液78人であり、うち7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ターナー症候群1人、クラインフェルター症候群1人と均衡転座保因者5人であった。均衡転座保因者はいずれも羊水検査で異常が認められたため、急きょ、核型の確認のためなどの目的で検査を行った。依頼理由としては流産を繰り返す等の不育症の夫婦、次いで、羊水検査の確認のためが多かった。また、昭和48年(1973)度から、平成13年(2001)度までに、1,782件(実人数1,756人)の検査を行った。うち、1,742件(同1,729人)が検査可能で、240人に染色体異常が発見され、異常率は13.9%になった。

一般に、染色体検査は先天異常児や発達遅滞児の確定診断、習慣流産など不育症の夫婦の原因検索、出生前診断、流産胎児、白血病の診断や上記理由の家族等がその対象となっている。

当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、昭和48年(1973)度より染色体検査を行ってきた。ここに平成13(2001)年度の結果とともに過去29年間の検査内容、依頼理由の変化等について報告する。

実施方法

各医療施設から送られてきた末梢血液(ヘパリン採血)から、通常の方法により、染色体標本作製した。その概要は前報[1]のとおりであった。一部の検体ではメソトレキセート(MTX)による細胞培養同調法を併用し、高精度分染法を行った。染色はおもにGバンド法によった。分析

は主に写真判定で行い、核型分析による判定数を5枚以上とし、さらに、数のみの計数細胞は20個以上とした。しかし、性染色体異常であるターナー症候群、クラインフェルター症候群のように、モザイク性が高い場合は100個以上の細胞を観察した。

精液細胞は前川らの方法[2]に従い、前処理を行い、標本作製した後、Fluorescent in situ hybridization(以下、FISH)法を行った。

クロモゾームペインティング法とFISH法はVYSIS製プローブを用い、前川らの方法[3]に従った。

平成13年度の検査依頼数は78件(人)で、全て県内の病医院からの依頼であり、医療施設別の依頼数内訳を表1に示した。

結果および考察

1. 平成13年度

依頼数は血液78人であった。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、依頼理由の72%は不育症(反復流産・不育症)であった。発見された染色体異常は表3に示した7人であり、13年度の異常率は9.0%であった。

モザイク型のクラインフェルター症候群が疑われた1例は47,XXYの細胞が111個に対し、46,XYの細胞が3個観察された。モザイクは通常3%

表1. 医療施設別依頼数内訳(昭和48~平成13年度)

病院名	年 度	
	H13	S48~H13
県立中央病院	42	986(5)
富山赤十字病院	12	306(50)
富山医科薬科大学	6	104(4)
高志学園	0	92
富山市民病院	3	82
氷見市民病院	8	32
厚生連高岡病院	4	24
富山保健所	0	17
砺波総合病院	0	15
富山遷信病院	0	9
国立富山病院	1	8
済生会富山病院	0	6
済生会高岡病院	2	6
黒部市民病院	0	4
社会保険高岡病院	0	2
富山労災病院	0	2
厚生連滑川病院	0	2
小杉保健所	0	1
他(県外分含)	0	86
計	78	1,784(59)

の同じ核型の細胞が存在するとモザイクとされるが、この場合は境界域であった。また、染色体標本上の休止核のFISH法では、観察細胞1,000個中、X2個Y1個の細胞が96%あったのに対し、X1個Y1個の細胞が4%あったことから、モザイク型のクラインフェルター症候群ではないかと思われた。また、精液細胞のFISH法も行ったが、ほとんどの細胞がX染色体またはY染色体1本を有していた。そのX:Yの割合は95:105であった(表3・症例No.1)。

ファンコニー症候群の疑い2件のうち、1件が45,X/46,XX(6:4)のモザイク型ターナー症候群であった。血小板減少、成長障害、発達遅滞等の症状を示していた(表3・症例No.2)。

表2. 依頼理由別依頼数内訳(平成13年度)

依頼理由	検査数	判定数	異常数
流産を繰り返す	52	52	0
不育症	4	4	0
ターナー症候群の疑い	2	2	0
ファンコニー症候群の疑い	2	2	1
クラインフェルター症候群の疑い	1	1	1
ロスメントトムソン症候群の疑い	1	1	0
脳ヘルニア	1	1	0
無脳症	1	1	0
精神運動発達遅滞	1	1	0
精神発達遅滞・筋緊張低下	1	1	0
家族(発端者に染色体異常あり)			
羊水検査の確認のため	10	10	5
家族(発端者に染色体異常なし)			
ターナー症候群の疑いの母	1	1	0
精神運動発達遅滞児の母	1	1	0
計(人)	78	78	7

表3. 染色体異常の内訳(平成13年度)

症例No.	主訴・主要症状	核 型	診 断 名
1	クラインフェルター症候群	47,XXY	クラインフェルター症候群
2	ファンコニー症候群の疑い	45,X/46,XX(6/4)	モザイク型ターナー症候群
3	羊水検査(45,XX,der(13;14))の確認	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	均衡転座保因者(母)
4	遺伝相談(同上 第1子)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	均衡転座保因者(姉)
5	遺伝相談(No.3の兄)	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	均衡転座保因者(家族)
6	羊水検査の確認(第1子46,XX,der(18))	46,XY,t(1;18)(q42;q23)	均衡転座保因者(父)
7	羊水検査(46,XY,add(20q))の確認	46,XX,t(9;20)(p13;q13.3)	均衡転座保因者(母)

羊水検査でD/D転座が疑われた症例の両親の染色体検査を行ったところ、母が45,XX,der(13;14)であったため、羊水は45,XY,t(13;14)の母と同じ均衡転座保因者と判定した [4]。第1子生産後、1回の死産、3回の自然流産を繰り返していた。第1子と母の兄の染色体検査を行ったところ、ともに均衡転座保因者であった (表3・症例No. 3~5)。この兄夫婦の妊娠歴については調査できなかった。

羊水検査を行うにあたって、第1子が染色体異常であることから、父親が均衡転座保因者であることが判明していたが、その異常の型がわからないことから、検査を行ったところ、46,XY,t(1;18)(q42;q23)の核型であった (図1)。しかし、羊水検査の結果は正常であった (表3・症例6)。

羊水検査の結果、46,XY,add(20)(q?)であったため、両親の染色体検査を行った結果、母が46,XX,t(9;20)(p13;q13.3)の均衡転座保因者であっ

た (表3・症例7) [4]。

表2に示したとおり、その他の疑いでは染色体異常は発見されなかった。

最も多い依頼理由であった流産を繰り返した (1~4回) 夫婦52人 (26組夫婦) には、染色体異常は発見されなかった。

以上より、羊水検査で羊水に転座型染色体の存在を疑われた3組の夫婦では、夫婦のいずれかが均衡転座保因者であった。

2. 昭和48年度~平成13年度

検査開始当初からの累積受付件数は血液1,723件と骨髄液59件の計1,782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1,702人と骨髄液54人の計1,756人であった。そのうち、検査可能であった1,729人中240人に染色体異常が発見されたため、染色体異常率は13.9%になった

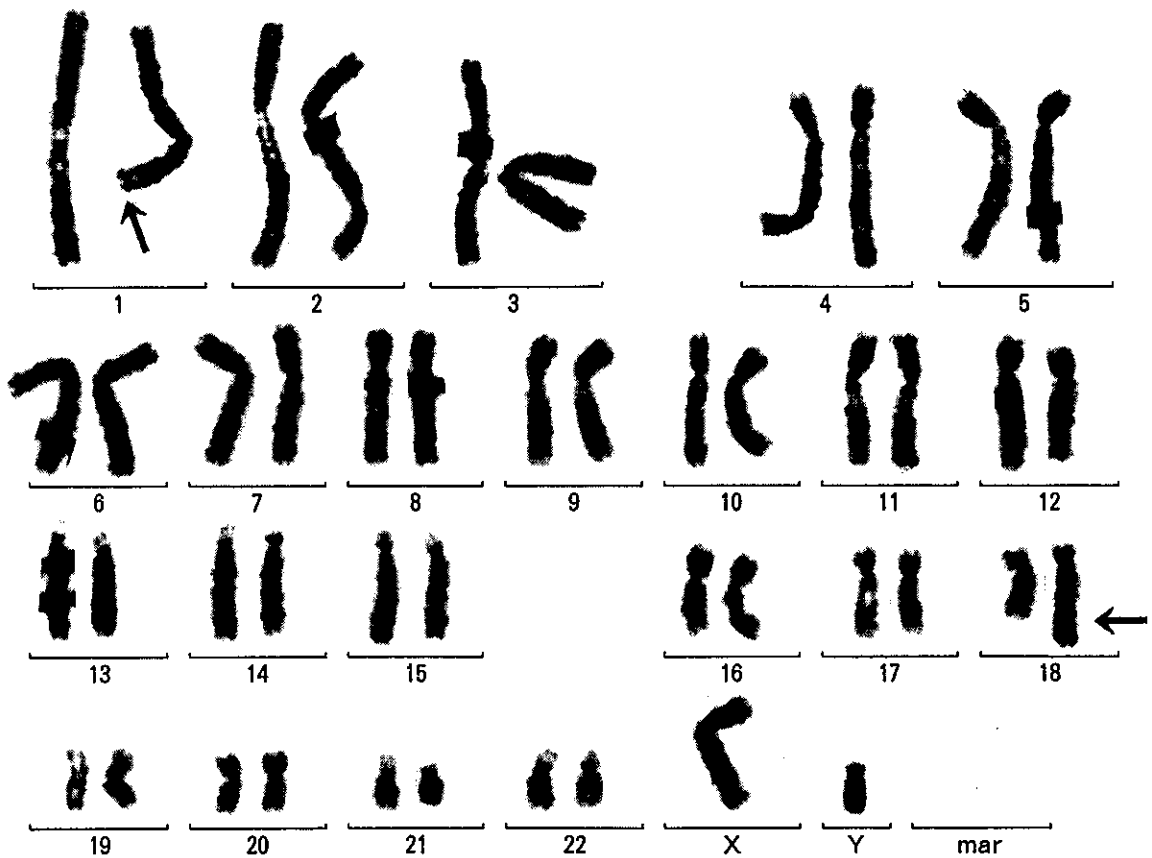


図1. 症例6の核型 46,XY,t(1;18)(q42;q23)

平成14年10月1日

(表4). 当所での依頼理由のうち、最も多いものは流産を繰り返す夫婦であった。そのうち、判定可能であった678人中28人に染色体異常が発見され、その異常率は4.1%、夫婦単位にすると335組

表4. 染色体検査結果一覧(実人数) 昭和48~平成13年度

依頼理由	依頼検査数	検査判定数	染色体異常数	その他*	染色体異常の主な核型等
血液の依頼理由内訳					
①不妊症(計)	767	766	28	14	
流産を繰り返す	679	678	28	13	均衡転座保因者,ターナー症候群等
不妊症	88	88	0	1	
②児の異常(計)	318	311	138	2	
ダウン症候群の疑い	130	128	103		21トリソミー
先天奇形	104	99	11		r(D),2pトリソミー,inv(7)由来7pトリソミー等
発育不良・発育遅延	50	50	2	2	9pトリソミー
18トリソミー症候群の疑い	16	16	15		18トリソミー
猫なき症候群の疑い	6	6	1		5p部分モノソミー
13トリソミー症候群の疑い	4	4	4		13トリソミー
副腎性器症候群の疑い	4	4	1		9pトリソミー
フラガー・ウイリー症候群の疑い	4	4	1		46,XX,del(15)(q11.2q12)
③白血病等(計)	45	40	9	0	
白血病	40	35	6		Ph染色体等
ファンコニー貧血	4	4	2		切断,キヤップ等, 45,X/46,XX
色素性乾皮症	1	1	1		モザイク型クラインフェルター症候群
④性染色体異常の疑い(計)	134	132	29	5	
無月経	36	36	3		45,X/46,XX等
ターナー症候群の疑い	32	32	16	5	45,X/46,X,r(X), 45,X/46,X,i(Xp)等
低身長	30	30	0		
半陰陽	13	11	3		45,X/46,XY, 46,XY/46,XX 等
臍欠損・鎖臍	7	7	0		
生理不順	3	3	1		45,X/46,XX
クラインフェルター症候群の疑い	7	7	6		47,XXY
他の性染色体異常の疑い	6	6	0		
⑤家族(計)	273		14	1	
染色体異常有り	158	158	14		均衡転座保因者等
染色体異常無し	115	115	0	1	
⑥出生前診断(計)	12		1		
胎児異常(胎児血液)	12	12	1		18トリソミー
⑦その他(計)	153		6	1	
心臓病	10	10	1		45,X/46,XX
脆弱X症候群の疑い	4	4	0		
その他	139	135	5	1	均衡転座保因者等
血液の小計	1,702	1,683	225	23	
骨髄液の依頼理由内訳					
①白血病等	54	46	15	0	Ph染色体等
骨髄液の小計	54	46	15	0	
合計(人)	1,756	1,683	240	23	

*:9番逆位染色体(正常変異)および睾丸女性化症候群

中27組で約8.1%，つまり，約12組に1組の割合で染色体異常が発見された。

また，検査受付時の流産歴を調査したところ，2～3回が最も多く，流産回数毎の異常率は2回・3.1%，3回・6.6%，4回・9.4%であった。均衡転座保因者21人，ロバートソン転座5人，逆位保因者1人，トリプルX 1人とマーカー染色体保有者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，他の理由による原因の場合よりも挙児の可能性が高いといわれているが，当所の検査後の調査でも，その後，妊娠成立し，羊水検査をうける場合もあった。

また，最近の補助生殖技術の発展はめざましいが，まだ，完全ではなく，実際には体外受精や顕微授精後の着床不成功等による反復流産を理由とする夫婦の染色体検査の依頼もあった。しかし，上記の依頼理由では染色体異常は発見されなかった。

発見された染色体異常の主な核型と人数を表5に示したが，ダウン症候群が最も多く，103人(103/233 44.2%)であった。常染色体異常206人のうち，先天異常児が137人(137/206 66.5%)，均衡転座等保因者40人(40/206 19.4%)，白血病等24人(24/206 11.7%)であった。性染色体異常34人のうち，ターナー症候群22人(22/34 64.7%)，クラインフェルター症候群7人(7/34 20.6%)，他5人(5/34 14.7%)であった。

当所における依頼理由は流産を繰り返す夫婦等不育症の理由によるものの割合が増加しており，それに伴って，全体の依頼数の増加にもかかわらず，年毎の異常率は減少傾向にあった。それは民間検査機関の増加による先天異常児の確定診断の減少と，女性の晩婚化による高齢出産および補助生殖技術の発展による不育症の原因検索の増加など，依頼理由の変化による影響と考えられた。

染色体異常の確定診断は染色体検査に基づいて行われるものであり，重要な臨床検査として位置づけられている。そのため，日本人類遺伝学会では平成6年度より，臨床細胞遺伝学認定士制度を設け，人材育成に積極的に携わっている。

表5. 染色体異常の内訳

染色体異常	人数
1. 常染色体異常	
①ダウン症候群	103
(トリソミー型)	97
(モザイク型)	3
(転座型)	3
②18トリソミー症候群	15
(トリソミー型)	12
(モザイク型)	2
(転座型)	1
③13トリソミー症候群	6
(トリソミー型)	2
(モザイク型)	1
(転座型)	2
(部分トリソミー)	1
④13リング症候群	2
⑤9pトリソミー症候群	2
⑥2p部分トリソミー	2
⑦猫なき(5pモノソミー)症候群	1
⑧7p部分トリソミー-7q部分モノソミー	1
⑨11p部分トリソミー	1
⑩プラター-ウイリー症候群	1
⑪由来不明部分過剰	6
⑫均衡転座保因者	40
⑬逆位保因者	3
⑭ファンコニー貧血	1
⑮白血病	21
⑯悪性腫瘍がある	1
小計(人)	206*
2. 性染色体異常	
①ターナー症候群	22
(モノソミー型)	5
(モザイク型)	17
②クラインフェルター症候群	7
(トリソミー型)	6
(モザイク型)	1
③トリプルX	2
④半陰陽	3
小計(人)	34**
合計(人)	240

*:全体に占める異常率 11.9%(206/1,729)

**：全体に占める異常率 2.0%(34/1,729)

平成14年10月1日

謝 辞

各症例の臨床像のご提供や採血にご協力いただきました関係者に深謝いたします。

文 献

1. 林美貴子, 本田幸子, 大江浩, 北村敬(2001). 富

山衛研年報, 24, 54-60.

2. フジサワ医療関連事業部技術センター(2000). フジサワFISH実技講習会操作マニュアル, 86-87.

3. 前川雅彦, 新宅香織, 山下達夫(1997). 臨床FISHプロトコール, 79-84.

4. 本田幸子, 林美貴子, 大江浩, 北村敬(2001). 富山衛研年報, 25, 68-73.

ヒト染色体に関する調査研究—羊水・流産胎児— 平成13年度

本田 幸子 林 美貴子 加藤 丈士

Chromosome Analyses of Amniotic Fluid Cells and Fetal cells

Sachiko HONDA, Mikiko HAYASHI and Takeshi KATO

要 旨 平成13年度の羊水および流産胎児の染色体の検査は、受付件数が羊水83件、流産胎児22件で、昭和49年度からの累計件数は、羊水1,179件、流産胎児204件となった。検査の結果、今年度は染色体異常が、羊수에 5件 (47,XX,+21 47,XY,+21 47,XX,+18 45,XY,t(13;14)mat 46,XY,der(20)t(9;20)mat), 流産胎児に13件 (47,XX,+?4 47,XX,+14 47,XX,+21 47,XY,+21 47,XX,+22 47,XX,+22/46XX 45,X(4件) 69,XXY 47,XXY, der(1)t(1;7)pat 47,XY,t(8;15)mat)みられた。今年度までの累計件数では羊水で53件、流産胎児で79件の異常がみられている。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が、流産胎児では流早産既往等が多かった。

当所において染色体検査は、昭和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、絨毛等が加わり、検査が行われてきた。ここに平成13年度の羊水、流産胎児の検査結果とともに今年度までの累計結果もあわせて報告する。

実 施 方 法

1. 羊 水

染色体標本作成は、羊水15ml以上を静置後、沈殿した細胞に培養液を加え、再浮遊し、1検体につきシャーレ2枚以上になるようにし、炭酸ガス培養を行った。

培養方法、染色体標本作成方法等の詳細は表1および既年報 [1] に従った。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等のFISH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、流産胎児の皮膚組織、および流産胎児の付属物である絨毛組織等であった。方法等は既年報 [1] にしたがった。

これらの組織をハサミで細切し、シャーレの上に並べ、培養液を添加し、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。培養液の組成や染色体標本作製等は羊水細胞と同様の方法(表1)で行い、色体分析を行った。

表1. 染色体標本作成法 (羊水)

羊水	羊水 10ml 以上を無菌試験管に入れ 3 時間～1 晩静置し、羊水細胞を収集
培養液	AmnioMAX™ (GibcoBRL)
培養	シャーレ (Falcon Tissue Culture Dish 35×10mm) で、37℃ 5% CO ₂ 培養
細胞遊離	0.025% トリプシン・EDTA 37℃ 5 分
遠心	1,000rpm 5 分
低張処理	0.075 塩化カリウム 3 : 0.9% クエン酸ナトリウム 1
コルセミド処理	最終濃度 0.1 μ /ml 37℃ 2-4 時間
固定	カルノア液 (メタノール 3: 酢酸 1)
蒸気乾燥	細胞浮遊液をパスツールピペットでスライドグラス上に落とし、 恒温水槽 (60℃) の蒸気上で乾燥し、その後自然乾燥

結果および考察

1. 羊 水

今年度の染色体検査受付総数は83件で、すべて富山県内の医療施設からの依頼であった (表 2)。染色体分析はすべて可能であった。検査開始時から平成13年度までの検査受付総数1,179件のうち分析可能数は1,133件で、その分析率は96.1%になった。今年度および検査開始の昭和49年度から今年度までの累積検査数、結果等はそれぞれ表 3、表 4 に示した。

今年度染色体分析の結果、下記の染色体異常 5 件 (症例 1～5) がみられた。今年度までの異常累計数は53件であり、その異常率は4.7%となった。

表 2. 染色体検査依頼病院 (羊水・流産胎児)
(平成13年度)

病 院	羊水	流産胎児	計
富山県立中央病院	20	6	26
済生会高岡病院	15		15
富山医科薬科大学	13	1	14
富山赤十字病院	5	9	14
黒部市民病院	6	2	8
厚生連高岡病院	6	1	7
砺波総合病院	3		3
高岡市民病院	1	1	2
氷見市民病院	1		1
北陸中央病院	1		1
菅田産婦人科医院	1		1
計	83	22	105

〈症例 1〉

年齢・妊婦：41歳

夫：35歳

羊水採取時の妊娠週数：15週

主訴・依頼理由：高齢妊娠

既往歴・他：生産児 1 人、自然流産 1 回

分析結果：47,XX,+21 (ダウン症候群)

経過・予後等：不明

〈症例 2〉

年齢・妊婦：43歳

夫：47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：生産児 1 人、自然流産 3 回、

早産 (7 ヶ月) 死亡

分析結果：45,XY,t(13;14)mat

経過・予後等：不明

〈症例 3〉

年齢・妊婦：36歳

夫：27歳

羊水採取時の妊娠週数：17週

主訴・依頼理由：胎児後頸部に浮腫

Nuchal Translucency

既往歴・他：初妊娠

分析結果：47,XX,+21 (ダウン症候群)

経過・予後等：流産

表3. 羊水の染色体検査依頼理由と結果 (平成13年度)

依頼理由 (主訴)	受付・分析数	異常数	染色体異常の核型
高齢妊娠	50	2	
35歳未満	2	0	
35-39歳	33	1	47, XX, +21 (症例 1)
40歳以上	15	1	45, XY, t(13:14)mat (症例 2)
胎児異常の疑い	11	3	
Nuchal translucency	7	2	47, XX, +21 (症例 3) 46, XY, der(20)t(9:20)mat (症例 4)
多発奇形	2	1	47, XX, +18 (症例 5)
胎児胸水	1	0	
発育遅延	1	0	
染色体異常児出産既往	6	0	
前子ダウン症候群	5	0	
前子プラダーウィリー症候群	1	0	
体外受精・顕微授精	4	0	
転座型染色体保因者	3	0	
相互転座	2	0	
逆位	1	0	
本人の強い希望	3	0	
妊娠初期に薬剤・CT等を受けた	2	0	
前子・前胎児が異常 (奇形)	2	0	
親類にダウン症や障害児等がいる	1	0	
トリプルマーカー高値の精査	1	0	
計	83	5	

表4. 羊水の染色体検査依頼理由と結果 (昭和49年~平成14年3月)

依頼理由 (主訴)	受付数	分析数	異常数	染色体異常の核型
高齢妊娠	652	637	13	47, (+18):2件 47, XX, +13/46, XX 47, (+21):5件 47, XY, +21/48, XY 46, XX, -18p 47, XXY 47, XXX 45, XY, t(13:14)mat
染色体異常児出産既往	175	170	3	47, XX, +G:2件 47, XY, +E
胎児異常の疑い	103	97	15	45, X:2件 47, (+18):5件 47, XX, +21:3件 47, XX, +M 69, XXY 46, XY, del(4) 47, XXY 46, XY, der(20)t(9:20)mat
前子が異常 (染色体異常を除く)	51	46	1	47, XX, +21
親類にダウン症や障害児等がいる	47	46	0	
羊水過多・羊水過少	39	36	7	47, XY, +E 47, XX, +D 46, XX, iso psu dic(18) 47, XY, +21:2件 47, XY, +13 47, XX, +18
転座型染色体保因者	27	26	11	45, XY, t(14:21) 46, XY, t(D:G) 46, XX, t(1:12) 46, XX, t(7:11) 46, XX, inv(3) 46, XX, t(2:17) 45, XX, t(13:15):2件 46, XY, inv(7) 45, XY, t(13:14) 46, XY, t(14:21)
流産・死産既往	19	17	2	69, XXX 46, XX, t(5:6)
本人の強い希望	13	13	1	46, XY/45, X
体外受精・顕微授精	9	9	0	
血中アルファプロテイン等の異常	5	5	0	
近親婚	4	3	0	
風疹に感染	4	4	0	
トキソプラズマ症の疑い	2	2	0	
その他	16	13	0	
不明	13	9	0	
計	1179	1133	53	

〈症例4〉

年齢・妊婦：28歳

夫：29歳

羊水採取時の妊娠週数：16週

主訴・依頼理由：胎児後頸部に浮腫

Nuchal Translucency

既往歴・他：人工受精

分析結果：46,XY,der(20)t(9;20)mat

経過・予後等：流産

〈症例5〉

年齢・妊婦：28歳

夫：33歳

羊水採取時の妊娠週数：33週

主訴・依頼理由：胎児に多発奇形

既往歴・他：2回目の妊娠

分析結果：47,XX,+18

経過・予後等：早産後死亡

そのほか、異常とは判定しなかったが、培養中の細胞分裂異常によるモザイクと考えられる症例が2件あり、その核型は47,XY,+2/46,XYと46,XY,add(1)(?p),-12,-15,-15,+3M/46,XYであった。但し、通常は1検体につき2枚のシャーレを用い培養、分析を行っているが、この2件はいずれも培養シャーレ2枚中の1枚のみに見られたモザイク核型であり、他の1枚は正常であった。従って、医師による児の超音波等の詳しい検査や部分的なモザイクであること、+2のモザイクが希に見られるという文献[2]等から判断して、これらのモザイクは胎児の染色体を反映したものではないと推測された。

検査依頼の理由として一番多いのは高齢妊娠の50件で、受付総数の60.2%にあたる。その年齢は31歳から43歳で、このうち2件に染色体異常がみられた(症例1、症例2)。症例1のように、母親の加齢とともに、ダウン症等の染色体異常の発生率が高くなることはよく知られている。しかし症例2は高齢とは関係なく、今回の羊水の結果から初めて転座型染色体保因者と判明したもので、過去の流産歴もこれが原因と考えられる。なお生産

女児1人の検査の結果、母親と同じ転座型染色体の核型が得られた[3]。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53件のうち、高齢妊娠を主訴としているのは13件で23.6%となる。

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11件の依頼があり、そのなかの3件に異常がみられた。その内訳は、7件が胎児にNuchal translucency (NT)の肥厚がみられたという理由であり、そのうち2件に異常がみられた(症例3、症例4)。その異常はダウン症候群と母親相互転座由来の9短腕トリソミー症候群であった。また胎児多発奇形が疑われた1件にも異常がみられた(症例5)。最近の超音波診断の進歩により、胎児の状況がよく診られるようになった。特に、妊娠10~14週胎児のNTの肥厚が異常の判断の指標として採用され、トリプルマーカー検査より正確ともいわれるようになっている[4]。当所においても近年この依頼が増加している。そのほか、胎児胸水、発育遅延がそれぞれ1件であった。

次は、以前に染色体異常児(両親由来ではない染色体異常)を出産した経験者からの6件の依頼であった。前児の異常の内訳は、ダウン症候群5件、プラダウィリー症候群1件で、今回これらに異常は見られなかった。

続いて体外受精、顕微授精等の不妊治療のためが4件で、異常はみられなかったが、不妊治療と異常発生との関係についてはまだ明らかではない。

転座型染色体保因者という理由で3件依頼があったが、いずれも正常核型であった。

そのほかの依頼として、「妊娠初期にアルコールを飲み薬剤投与を受けた、骨シンチを受けた」、「前子、前胎児に奇形等の異常があった」という理由が各2件、「親類に障害児等がいる」、「トリプルマーカー高値のため」が各1件であった。

最近の遺伝子診断技術の急激な進歩に伴い、当所の染色体検査においても高度な分析を要求されることが多くなっている。そのため高精度分染法やクロモゾームペインティング法、FISH法等の技術を導入して対応している。しかし、分析機器の更新の必要性や試薬の高価格等に早急には対応

できないこと、さらに出生前診断としての羊水等の染色体検査には、母親細胞混入の危険性があること、前述のように培養細胞を分析していること、微細な染色体異常やモザイク症がすべて把握されるわけではないこと、染色体異常が発見されてもほとんどが治療困難であること等多数の問題がある。その上、倫理的、社会的な問題も残されている。今後の少子化、高齢妊娠増加等による羊水染色体検査の需要の増大に対応するためには、医師による遺伝相談と適切な指導を伴った総合的な検査体制の整備が必要と考えられる。

2. 自然流産胎児

今年度、受付総数は22件で、すべて分析可能であった。平成13年度および検査開始時から平成13年度までの検査依頼病院、理由、結果等を表2、表5、表6に示した。今年度は22件中13件(59.1

%)に染色体異常がみられた。全年度では46.7%となった。

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9件で、そのうち7件に異常があり、すべて、ダウン症候群、ターナー症候群等の数的異常であった。過去の流産胎児の染色体異常の有無については未調査のため、再発かどうかは不明である。また今回の流産時点の年齢は24歳~38歳(平均29.9歳)で、年齢との関係についても明らかではない。

次に多いのは、流産した胎児に奇形等が見られたための理由で5件依頼があり、1件にターナー症候群の異常がみられた。

子宮内胎児死亡の3件では、1件にダウン症候群の染色体異常がみられた。

cystic hygromaがみられた胎児2件はいずれもターナー症候群であった。

表5. 流産胎児水の染色体検査依頼理由と結果(平成13年度)

依頼理由(主訴)	受付・分析数	異常数	染色体異常の核型
過去にも流早産をした	9	7	47, XX, +24 47, XX, +14 47, XY, +21 47, XX, +22 47, XX+22/46, XX 69, XXY 45, X
流産胎児に奇形等がある	5	1	45, X
子宮内胎児死亡	3	1	47, XX, +21
胎児に cystic hygroma	2	2	45, X(2件)
親が転座染色体保因者	2	2	47, XXY, der(1)t(1:7)pat 47, XY, t(8, 15)mat, +15
体外受精・顕微授精	1	0	
計	22	13	

表6. 流産胎児水の染色体検査依頼理由と結果(昭和50年~平成14年3月)

依頼理由(主訴)	受付数	分析数	異常数	染色体異常の核型等
過去にも流早産をした	83	69	40	45, X:4件 47, (+3):2件 47, (+16):6件
流産胎児に奇形等があった	33	30	10	69, XXY 47, (+18):2件 45, X:3件
子宮内胎児死亡	29	25	8	45, X:2件 47, (+16):2件
初めての流早産(原因不明)	22	15	8	69, XXX:3件 47, XY, +18
体外受精・顕微授精	14	13	6	47, XX, +13 47, XY, +20
親が染色体異常	7	5	3	46, XY, der(4)t(4:15)
胞状奇胎	6	6	0	
羊水検査で染色体異常があった	3	2	2	47, XX, +13/46, XX 47XY, +21/46, XY
前子が染色体異常	2	2	2	48, XX, +15, +16
前子が多発奇形	1	1	0	
羊水過少	1	1	0	
妊娠中に風疹に罹った	1	0		
理由不明	2	0		
計	204	169	79	

平成14年10月1日

親が染色体異常保因者であるための依頼2件は、いずれも親の転座型染色体に由来する異常であり、うち1件はクラインフェルター症候群を伴っていた。

そのほか、体外受精、親が転座染色体保因者、という理由で1件あったが、異常はみられなかった。

依頼された流産胎児の週数は6週から20週にわたっていた。

自然流産胎児において報告されている染色体異常の発生頻度は、研究材料、収集方法、研究方法による違いで開きはあるものの、妊娠初期に起こった流産胎児の染色体異常の頻度が高いことは一般に認められている。池内 [5] は46.1%と報告しており、当所の結果も全年度で46.7%とほぼ一致している。

当所における分析数がまだ少ないため、確たる結論には至っていないが、この検査を続けていくことにより、今後の妊娠指導、治療方針の決定や、遺伝相談の資料として母子医療に役立つものと考えている。

謝 辞

ここに発表しました症例の検体採取や調査にご協力をいただきました、各医療施設の関係者の方々に深謝いたします。

文 献

1. 本田幸子, 林美貴子, 大江浩, 北村敬 (2001). 富山衛研年報, 24, 54-60.
2. 福嶋義光, 涌井敬子 (1996). 臨床染色体診断法 (古庄敏行編), 207-231 金原出版.
3. 林美貴子, 本田幸子, 加藤丈士, 永井美之 (2002). 富山衛研年報, 25, 62-67.
4. 佐藤孝道 (2001). 臨床検査, 45(2), 161-166, 医学書院.
5. 池内達郎 (1999). 遺伝子・染色体検査学 (奈良信雄編), p131-135 医歯薬出版.

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 2001

Mamoru WATANABE, Sumiyu HASEGAWA and Chiharu TAKADA¹

要 旨 2001年度の豚における日本脳炎HI抗体保有推移は、2000年同様、日本脳炎患者が発生した1997年（平成9年）の状況と似ていた。しかし、ウイルスを媒介する蚊の発生量と発生消長は1997年と異なり、それが大きな要因になって、日本脳炎に罹患する県民がいなかったと推定された。すなわち、コガタアカイエカの発生量が1997年に比べ明らかに少なく、しかも発生のピークが盛夏期ではなく9月中旬にずれ込んだことで、日本脳炎ウイルスを保有したコガタアカイエカに刺される機会が、極めて少なかったことが示唆された。

富山県では1997年（平成9年）9月に、15年ぶりに日本脳炎患者が氷見市で確認され、その背景にコガタアカイエカの多発生傾向とウイルスの侵入・拡大があったことが指摘された [1]。このように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係する事態になれば、患者発生は今後も起こりうる懸念される。そこで、患者の発生を未然に防ぐことを目的に、2000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2001年6月から9月にかけて監視した。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、「上市湯上野」は1994年に変更移動した定点である。「富山大井」は1989年から、「小矢部金屋本江」は1981年から同一の牛舎である。調査期間、調査方法は2000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30日まで、ライト・トラップ（東京エース製）による連日捕集を、他の3定点は6月中旬から9月末まで、基本的に毎週水曜日にトラップを一晩点灯することで行った。なお、前2定点では畜舎管理者が、毎朝トラップの捕集ケージをクロロホルムで麻酔した後、捕集物を70%エタノールの入ったポリ瓶に移した。それを20日毎に回収して捕集された蚊類を選び出し分類した。後3定点は毎週木曜日に捕集ケージを交換・回収して、検査室に持ち帰り蚊類を選別して計数した。

1 富山県健康課

表1. 日本脳炎媒介 コガタアカイエカ捕集定点の概要 (平成13年度, 2001年)

番号	定点名	類別	定点の概要
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	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2頭、和牛4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。

2. 調査結果および考察

表2に、2001年の各調査定点における毎週水曜日の蚊全体の捕集成績を、表3に最近10年間のコガタアカイエカの定点別捕集総数を示した。2001年は全定点において8月第4週からコガタアカイエカが多くなる消長を示し、結局、5定点の内「小矢部金屋本江」を除いた4定点で2000年よりも捕集数が増加した。とくに、県東部の「上市湯上野」では2000年の2倍を超え顕著であった(表2)。

2000年に最もコガタアカイエカ捕集数が多かった「富山大井」は、2001年にも最も多く捕集され、6～9月間毎週水曜日集計(合計16回調査)で78,846個体であった。次いで多く捕獲された定点は「小矢部金屋本江」で、12,877個体であった。一方、最も少なかった定点は、「黒部荻生」で1,443個体、「富山大井」の約1/55であった。2001年も県東部に比べ県中央部と西部に蚊の発生が多い傾向が前年同様にみられた。なお、黒部の定点は県内の他定点に比べ、ここ30年ほど蚊数が明らかに少ないが、その原因については解析ができていない。今後の課題のひとつである。

県全体の発生推移状況は、調査開始の6月中旬から8月第2週まで、捕集数の増加速度は2000年よりも遅かった。しかし、8月第4週からは全定点で、捕集数が増加を示し、9月第3週までその

傾向が続き、その間に日当たり捕集数が最大になった。9月第4週には全定点で捕集数は減少し、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2000年よりも捕集数が少なく [2]、それは8月中旬まで続いた。しかし、中旬以降は2000年よりも多い場合が9月末まで続いた。日最大捕集数は8月30日の25,170個体であり、2000年の9月8日、39,541個体よりも約1週間早いピークの形成であった [2]。2001年は8月下旬から9月中旬まで長い多発生の期間が形成され、それが2000年よりも年間の捕集数が増加した原因と思われる。

[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5か所の中では捕集数が少ない原因と思われる。表4に連日捕集成績を示した。日最大捕

表2-1. 5 定点（畜舎）における蚊雌成虫の捕集数（平成13年，2001年）

調査日	1. 黒部萩生					2. 上市湯上野				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
6.13	0	5	2	0	7	2	5	0	0	7
20	0	10	29	0	39	0	5	1	1	7
27	6	4	0	0	10	0	6	1	0	14
7. 4	0	7	2	0	9	2	7	0	1	10
11	0	8	1	0	9	2	8	1	0	11
18	0	10	1	0	11	0	34	2	0	21
25	0	35	3	0	38	1	78	3	0	82
8. 1	0	18	0	0	18	0	46	2	0	48
8	0	6	0	0	6	0	163	0	0	130
15	0	72	0	0	72	0	99	0	0	99
22	0	104	0	0	104	2	307	0	0	309
29	0	99	2	0	101	0	336	0	0	408
9. 5	0	229	2	0	231	0	765	0	0	765
12	0	215	3	0	218	3	1,528	0	1	1,532
19	0	417	4	0	421	25	2,784	0	0	2,297
26	0	204	0	0	204	3	403	0	1	407
	6	1,443	49	0	1,498	40	6,574	10	4	6,628

調査日	3. 小矢部金屋本江					4. 大山東黒牧				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
6.13	0	23	5	0	28	0	4	0	1	5
20	0	33	2	0	35	0	19	2	2	23
27	0	15	2	0	17	0	16	2	4	28
7. 4	0	29	2	0	31	0	4	0	0	4
11	0	32	3	0	35	0	16	0	1	17
18	0	46	2	0	48	0	4	1	0	21
25	0	115	3	0	118	0	17	0	0	17
8. 1	0	39	0	0	39	0	22	1	1	24
8	0	203	0	0	203	0	84	0	0	41
15	3	385	6	0	394	0	20	0	0	20
22	12	603	2	0	617	0	267	0	1	268
29	9	667	2	0	678	1	55	0	7	288
9. 5	2	545	2	0	549	0	256	0	1	257
12	18	3,751	2	0	3,771	2	449	0	2	453
19	16	5,256	15	0	5,287	4	565	1	1	710
26	3	1,135	2	0	1,140	0	21	0	5	26
	63	12,877	50	0	12,990	7	1,819	7	26	1,859

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。

平成14年10月1日

集は9月15日の691個体であった。2000年の日最大捕集は8月27日の671個体であり〔2〕、ピークは2001年の方が約3週間遅かった。年間捕集数は前年の114%、10,433個体と増加したが、その原因

は9月の捕集数が増加した事に起因すると考えられる。「富山大井」とは連日捕集数で1/50（表3）、日最大捕集数で1/36（表4）の捕集差がみられ、牛舎周辺にコガタアカイエカの発生源になる水田が無いことが示唆される（表1）。しかし、蚊の種類は6種類認められ、5定点の内では環境の多様性に富むことが考えられる。

表2-2. 5定点（畜舎）における蚊雌成虫の捕集数（平成13年，2001年）

調査日	5.富山大井				
	As	Ct	Cp	その他	計
6.13	0	775	0	0	775
20	0	798	0	0	798
27	0	864	3	0	867
7.4	0	1,194	21	0	1,215
11	0	561	35	0	596
18	0	1,215	27	0	1,242
25	0	1,794	24	0	1,818
8.1	0	447	5	0	452
8	0	1,980	51	0	2,031
15	0	3,155	40	0	3,195
22	0	10,600	25	0	10,625
29	0	8,620	40	0	8,660
9.5	0	10,365	15	0	10,380
12	0	12,670	0	0	12,670
19	0	22,230	25	0	22,255
26	0	1,578	2	0	1,580
計	0	78,846	313	0	79,159

種名などは表2-1の脚注を参照。

〔3. 黒部荻生〕「黒部植木」から移動して4年目になる。捕集数は2000年よりも増加した（表3）。また、日最高捕集数も、2000年の9月8日の257個体に対し、2001年は9月19日の417個体と増加した。発消長曲線は9月19日に山を形成する年1峰型であり、2000年の2峰型と異なった。

〔4. 上市湯上野〕年間捕集数（表3）は前年の221.7%、6,574個体と顕著に増加した。しかも、日最高捕集数も2000年の9月6日、602個体に対し、9月19日の2,784個体と4.6倍に増加した。発消長曲線は8月第4週から増加を始め、9月第3週に最高に達する年1峰型を示した（表2）。

〔5. 小矢部金屋本江〕年間捕集数は2000年の66.1%、12,877個体に減少し、1998年から毎年減少を続けている（表3）。なお、日最高捕集数（9月

表3. 5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
2000	67,757	495,004	965	9,147	1,181	2,965	-	19,477
2001	78,846	504,862	1,819	10,433	1,443	6,574	-	12,877

注. a. 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。
 b. 富山大井、大山東黒牧の右側の数値は、6月1日から9月30日までの連日捕集による成績。
 c. 2. 大山東黒牧は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。5. 福野は2000年から調査を中止した。

表4-1. 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 (平成13年, 2001年)

調査日	1. 富山大井牛舎					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	318	0	0	318	3	13	0	0	16
2	0	120	0	0	120	-	-	-	-	-
3	0	233	0	0	233	0	26	0	1	27
4	0	392	0	0	392	0	14	0	1	15
5	0	493	0	0	493	0	14	0	1	15
6	0	754	0	0	754	1	11	0	2	14
7	0	345	0	0	345	0	5	0	4	9
8	0	412	0	0	412	1	3	1	3	8
9	0	414	0	0	414	0	5	0	4	9
10	0	724	1	0	725	0	1	0	1	2
11	0	418	1	0	419	0	0	0	1	1
12	0	447	0	0	447	0	1	0	1	2
13	0	775	0	0	775	0	4	0	1	5
14	0	639	0	0	639	1	21	0	1	23
15	0	248	0	0	248	-	-	-	-	-
16	0	441	0	0	441	0	21	0	5	26
17	0	467	0	0	467	2	4	0	1	7
18	0	223	0	0	223	0	17	0	4	21
19	0	1,509	0	1	1,510	0	-	-	-	-
20	0	798	0	0	798	0	19	2	2	23
21	0	634	0	0	634	0	26	0	1	27
22	0	340	0	1	341	0	10	3	2	15
23	0	2	0	0	2	1	20	4	1	26
24	0	1,355	0	1	1,356	0	15	0	3	18
25	0	1,524	9	0	1,533	0	4	0	2	6
26	0	945	6	0	951	0	4	1	0	5
27	0	864	3	0	867	0	16	2	4	22
28	1	942	19	0	962	1	22	0	1	24
29	0	1,032	25	0	1,057	0	4	0	0	4
30	0	1,281	15	0	1,296	1	7	0	1	9
計	1	19,089	79	3	19,172	11	307	13	48	379

注. 種名などは表2-1の脚注を参照.

19日; 5,256個体) は2000年(9月6日; 5,184個体) に比べわずかに増加した。発生消長曲線は8月第3週から9月第3週まで増え続ける年1峰型を示した。

1990年代後半のコガタアカイエカの発生消長は、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が、今年度の発生型は8月中下旬から9月中下旬にかけて増加を続ける、これまでにみられない消長曲線を示した。この原因については、現時点では明確にできないが、1つには今年度の降雨状況が影響している事が推定される。すなわち、7~8月に雨が多くの

9月にやや少なかったことが(表5)、8月中旬からのコガタアカイエカを増加させた原因と思われる、それが9月中旬まで続いたためと思われる。他に、水田環境が水張り休耕田=「調整水田」などに变化したことや、殺虫剤の変更などが複合的に関係していることが推定される。

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

2001年7月10日から10月2日までの3か月間、

表4-2. 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（平成13年，2001年）

調査日	1. 富山大井牛舎					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	557	36	0	593	0	5	0	0	5
2	0	1,860	24	0	1,884	0	5	0	0	5
3	0	1,686	63	0	1,749	0	3	0	1	4
4	0	1,194	21	0	1,215	0	4	0	0	4
5	0	2,739	75	0	2,814	0	9	0	0	9
6	0	1,288	105	0	1,393	0	1	0	0	1
7	0	635	120	0	755	-	-	-	-	-
8	0	900	51	0	951	0	5	0	2	7
9	0	2,121	108	0	2,229	0	9	0	0	9
10	0	1,551	75	0	1,626	0	12	0	0	12
11	0	561	35	0	596	0	16	0	1	17
12	0	3,885	69	0	3,954	0	7	0	1	8
13	0	3,420	90	0	3,510	0	0	0	0	0
14	0	1,839	126	0	1,965	0	7	0	0	7
15	0	2,271	78	0	2,349	0	1	0	1	2
16	0	2,391	20	0	2,411	0	3	0	0	3
17	0	2,985	63	0	3,048	0	9	0	0	9
18	0	1,215	27	0	1,242	0	4	1	0	5
19	0	1,059	33	0	1,092	0	1	0	1	2
20	0	1,392	45	0	1,437	0	2	0	0	2
21	0	2,607	36	0	2,643	0	7	0	0	7
22	0	5,385	57	0	5,442	0	0	0	0	0
23	0	5,027	46	0	5,073	0	16	0	0	16
24	0	4,416	27	0	4,443	0	14	1	0	15
25	0	1,794	24	0	1,818	0	17	0	0	17
26	0	2,415	21	0	2,436	0	21	1	0	22
27	0	2,271	18	0	2,289	0	7	0	1	8
28	0	2,904	24	0	2,928	0	15	0	1	16
29	0	3,126	27	0	3,153	0	16	0	0	16
30	0	1,575	51	0	1,626	0	33	0	3	36
31	0	1,095	30	2	1,127	0	26	0	0	26
計	0	68,164	1,625	2	69,791	0	275	3	12	290

注. 種名などは表2-1の脚注を参照.

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（7月31日のみ15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。抗体価の測定は今まで通り伝染病流行予測検査術式 [3] に従った。被検血清はアセトン処理を2回行い、非特異的赤血球凝集（HA）抑制物質を除去し、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。最初の採血日の7月10日は抗体を保有している豚は認められなかったが、2回目の7月17日には抗体保有豚が出現した。しかし、保有率は15% (3/20) で抗体価も10倍が1例、20倍が2例であった。その後、7月31日に陽性豚が3頭出現したが、この時も、抗体価10倍が2例、20倍が1例と低い価であった。8月に入って、21日に陽性豚が1例、28日に陽性豚2例が認められたが、これらも抗体価は10倍～20倍と低い価であった。しかし、9月11日になって抗体保有率が30%になり、陽性豚6

表4-3. 2地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(平成13年, 2001年)

調査日	1. 富山大井牛舎					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	447	5	0	452	0	22	1	1	24
2	0	463	1	0	464	-	-	-	-	-
3	0	223	0	0	223	0	25	0	1	26
4	0	688	32	0	720	0	32	1	2	35
5	0	136	6	0	142	0	4	0	1	5
6	0	777	30	0	807	0	11	0	0	11
7	0	3,429	75	0	3,504	0	86	0	0	86
8	0	1,980	51	0	2,031	0	84	0	0	84
9	0	3,774	82	0	3,856	0	51	1	1	53
10	0	3,849	114	0	3,963	0	189	0	6	195
11	0	2,424	66	0	2,490	1	132	0	0	133
12	0	3,528	159	0	3,687	-	-	-	-	-
13	0	2,445	45	0	2,490	0	177	0	0	177
14	0	3,850	125	0	3,975	0	60	1	0	61
15	0	3,155	40	0	3,195	0	20	0	0	20
16	0	11,670	165	0	11,835	0	57	1	0	58
17	0	6,716	130	0	6,846	0	53	0	0	53
18	0	2,035	60	0	2,095	0	59	0	1	60
19	0	2,655	65	0	2,720	0	139	1	0	140
20	0	3,500	32	0	3,532	0	73	1	1	75
21	0	6,345	20	0	6,365	2	225	0	1	228
22	0	10,600	25	0	10,625	-	-	-	-	-
23	0	6,480	15	0	6,495	0	267	0	1	268
24	1	8,110	10	0	8,121	1	133	0	1	135
25	0	4,780	20	0	4,800	0	109	0	3	112
26	0	12,000	15	0	12,015	1	151	0	6	158
27	0	7,910	20	0	7,930	0	65	0	7	72
28	0	12,495	25	0	12,520	1	85	2	12	100
29	0	8,620	40	0	8,660	1	55	0	7	63
30	0	25,170	15	0	25,185	0	336	0	14	350
31	0	7,570	10	0	7,580	0	216	0	6	222
計	1	167,824	1,498	0	169,323	7	2,916	9	72	3,004

注. 種名などは表2-1の脚注を参照.

例全ての抗体価が160倍以上で、しかも、その内5例が2-ME感受性が陽性で、新鮮感染であることが確認された。その後、9月18日には抗体保有率が50%になり、抗体陽性10例が全て抗体価40倍以上で、この内6例が2-ME感受性であった。これを受けて富山県は日本脳炎推定汚染地域となった。9月25日には抗体保有率は20%に下降したが、抗体陽性の4例は全て抗体価が160倍以上であり、その内3例が2-ME感受性であった。最終回の10月2日には抗体保有率は60%に再上昇し、陽性例12例の抗体価も高く、その内6例が2-ME感受性であった。

以上の成績を2000年と比較すると、2000年は9月5日に高い抗体価の豚が出現し、2-ME感受性である新鮮感染が認められたのに対し、2001年は9月11日になって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出現した。このことから2001年は2000年に比べると、1週間遅く日本脳炎ウイルスが富山県内で確認され、少なくとも10月上旬まで豚の間に感染が拡大していったと推定される。これらの状況は、日本脳炎患者が発生した1997年と近似しており、日本脳炎患者が発生しやすい危険な状況と思われた。しかし、幸いにも患者の発生はなかった。

表4-4. 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(平成13年, 2001年)

調査日	1. 富山大井牛舎					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	1	11,260	35	0	11,296	0	102	0	5	107
2	0	9,330	10	0	9,340	1	86	0	1	88
3	0	12,600	0	0	12,600	1	87	0	2	90
4	0	10,917	10	0	10,927	0	297	0	1	298
5	0	10,365	15	0	10,380	0	256	0	1	257
6	0	11,200	25	0	11,225	0	222	0	3	225
7	0	7,380	15	0	7,395	1	179	0	5	185
8	0	8,755	10	0	8,765	0	133	0	2	135
9	1	6,470	0	0	6,471	1	217	0	2	220
10	0	17,025	15	0	17,040	-	-	-	-	-
11	1	6,625	0	0	6,626	1	226	0	1	228
12	0	12,670	0	0	12,670	2	449	0	2	453
13	0	12,725	30	0	12,755	0	327	0	0	327
14	0	13,625	0	0	13,625	2	682	0	0	684
15	0	6,500	0	0	6,500	1	691	0	2	694
16	0	8,655	0	0	8,655	0	382	0	1	383
17	0	6,225	0	0	6,225	0	585	0	1	586
18	0	13,705	20	0	13,725	0	568	3	2	573
19	0	22,230	25	0	22,255	4	565	1	1	571
20	0	14,345	30	0	14,375	1	475	2	5	483
21	0	6,970	0	0	6,970	1	190	0	1	192
22	1	1,048	0	0	1,049	-	-	-	-	-
23	1	1,797	6	0	1,804	2	63	0	7	72
24	0	2,775	0	0	2,775	2	32	1	7	42
25	0	3,980	5	0	3,985	0	35	0	6	41
26	0	1,578	2	0	1,580	0	21	0	5	26
27	0	4,267	0	0	4,267	0	29	0	3	32
28	0	747	1	0	748	0	5	0	1	6
29	0	846	0	0	846	0	10	0	2	12
30	0	3,170	0	0	3,170	0	21	0	2	23
計	5	249,785	254	0	250,044	20	6,935	7	71	7,033

注. 種名などは表2-1の脚注を参照.

た. これはコガタアカイエカの発生が, 盛夏期に少なく9月に多くなったため, ウイルスが豚とコガタアカイエカの間で拡大する機会が減少したことによると考えられる. コガタアカイエカの多発生が早くから起こり, ウイルスの拡大分散が早まれば, 患者発生の可能性が高くなることが懸念される.

日本脳炎患者が発生した1997年(平成9年)の状況と似ていた. しかし, ウイルス媒介蚊の発生量と発生消長は1997年と異なり, それが大きな要因で日本脳炎に罹患する県民がいなかったと考えられた. すなわち, コガタアカイエカの発生量が1997年に比べ明らかに少なく, しかも発生のピークが9月中旬にずれ込んだことで, 日本脳炎ウイルスを保有したコガタアカイエカに刺される機会が, 極めて小さかったことが示唆された.

ま と め

2001年の豚のHI抗体保有推移は, 2000年同様

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	2000		2001
平均気温 (°C)	5	16.5	15.1	15.7	17.9	16.6	16.3	17.6	18.6	17.6	17.6	18.9	16.7
	6	22.1	19.9	19.7	20.7	19.3	21.0	21.5	20.7	20.9	21.4	21.1	20.5
	7	24.8	24.6	23.2	26.9	25.0	25.1	24.8	25.2	24.9	27.0	27.0	24.6
	8	24.6	26.1	23.3	29.1	27.7	26.0	26.4	25.5	27.7	28.1	26.4	26.0
	9	22.5	21.9	20.4	23.3	21.0	21.0	21.4	23.3	24.5	23.5	21.6	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	184.8	201.4	200.9
	6	132.5	169.8	100.1	154.8	105.9	117.3	162.5	86.5	137.3	148.4	111.6	152.3
	7	111.6	164.6	100.2	195.4	122.1	192.2	136.3	130.9	134.5	232.7	234.7	165.7
	8	142.7	184.3	102.0	285.9	232.4	226.4	199.8	101.6	201.8	271.8	203.7	200.4
	9	(129)	157.5	112.5	(156)	129.2	150.4	95.5	125.5	129.9	151.0	134.0	133.9
降雨量 (mm)	5	65.5	101.0	180.5	(55)	103.0	126.0	197.5	245.5	132.5	48.5	105.0	124.8
	6	328.0	185.5	179.0	50.0	116.5	305.0	143.0	135.0	247.0	197.0	281.5	196.9
	7	274.5	113.5	283.0	29.5	536.5	60.5	325.0	161.5	88.0	65.0	108.0	241.9
	8	276.5	137.0	328.0	18.0	176.0	149.0	129.5	630.5	155.0	39.5	230.5	176.6
	9	130.0	92.0	243.5	208.5	80.5	159.0	213.0	303.0	424.5	287.0	206.5	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引用した。

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引用した。

表6. 平成13年度豚血清における日本脳炎ウイルスのH I抗体保有状況 (2001年)

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10日	20 (100)								
17	17 (85)	1 (5)	2 (10)						
24	20 (100)								
31	12 (80)	2 (13.3)	1 (6.7)						
8月7日	20 (100)								
13	20 (100)								
21	19 (95)	1 (5)							
28	17 (85)	2 (10)	1 (5)						
9月4日	20 (100)								
11	14 (70)					1 (5)		5 (25)	5 (83.3)
18	10 (50)			1 (5)			1 (5)	8 (40)	6 (60.0)
25	16 (80)					2 (10)		2 (10)	3 (75.0)
10月2日	8 (40)						2 (10)	10 (50)	6 (50.0)
計	213 (83.5)	6 (2.4)	4 (1.6)	1 (0.4)		3 (1.2)	3 (1.2)	25 (9.8)	20 (62.5)

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付いて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わし、括弧内の数字はパーセントを示す。

平成14年10月1日

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、食肉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, 品川保弘, 上村 清, 田
中桂子, 浦田祐子, 川越久美子, 藤崎啓子, 広明
秀一(1998). 富山衛研年報, 21, 90 -
103.
2. 渡辺 護, 長谷川 澄代, 高田 ちはる(2000). 富
山衛研年報, 23, 79-86.
3. 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 岩井雅恵 安藤秀二 長谷川澄代
 松浦久美子 永井美之 遠藤京子¹ 田中桂子²
 金木 潤³ 田中有易知⁴ 中村由起子⁵

Epidemiological Surveillance of Poliovirus in Toyama Prefecture

Takashi NAKAYAMA, Masae IWAI, Shuji ANDO, Sumiyo HASEGAWA,
 Kumiko MATSUURA, Yoshiyuki NAGAI, Kyoko ENDO¹, Keiko TANAKA²,
 Jun KANAOKI³, Yuichi TANAKA⁴ and Yukiko NAKAMURA⁵

要 旨 平成13年度ポリオ流行予測は、厚生労働省委託事業の感染源調査と、県単独事業の感受性調査を実施した。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、0歳から6歳までの乳幼児58名から糞便を採取し、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型が2株、コクサッキーウイルスA9型が1株、エコーウイルス22型が1株分離された。ポリオウイルス2型について国立感染症研究所に抗原分析を依頼した結果、2株ともセービンウイルス2型ワクチン由来株であった。

感受性調査は、全年齢層を対象として採血し、226名(0歳~69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93.4%、2型が98.2%、3型が78.8%であった。年齢区分別では、1型および2型は各年齢区分とも70%以上を示したが、3型は0~1歳の57.1%から40~49歳の100%まで、年齢区分でばらつきが見られた。また、抗体保有者の平均抗体価は、1型は133.1倍、2型が137.1倍、3型では26.8倍であった。

ポリオ流行予測調査は、国内のポリオウイルスの動向を監視するために、厚生労働省感染症流行予測事業のひとつとして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。

富山県で実施した過去20年間の感染源調査において分離されたポリオウイルスは、1983年度にポリオウイルス1型が1株、1992年度に同3型が1株、1999年度に同2型が1株分離されている。し

かしこれら3株ともワクチン由来のウイルスであり、野生型ポリオウイルスは分離されなかった。一方、富山県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十分に阻止しうる免疫保有状況であった。しかし、3種類のポリオウイルスすべ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人は少なくとも1種類またはそれ以上の抗体を保有していないという状況も変わっていない。

1 高岡保健所 2 新川保健所 3 中部保健所 4 砺波保健所 5 富山市保健所

世界保健機構（WHO）によるポリオ根絶作戦により、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、インドやアフリカなどの一部には依然として野生型ポリオが存在する。海外からのポリオウイルス侵入に対する監視体制に加えて、集団免疫による感染防御のみならず、個人レベルでの感染防御も視野に入れて、県民の抗体保有状況を把握することは重要である。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、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

新川保健所管内および砺波保健所管内の健康な乳幼児を対象に、当該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14年1～2月に調査を実施した。検体採取計画は、検査対象年齢区分0～1歳、2～3歳、4～6歳で、男女を問わず各区分20名、合計60名を予定したが、採取された検体は0～6歳合計で58名であった。また、各保健所において検査対象者のポリオワクチン接種歴などを調査した。

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。採取した糞便からEagle-MEM培養液（日水製薬KK）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、ウイルス分離材料とした。分離用細胞としてはVero細胞およびMA-104細胞を使用し、細胞変性効果を指標としてウイルス分離検査を実施した。分離したウイルスについては、ポリオウイルスプール抗血清（デンカ生研KK）、エンテロウイルスプール抗血清（デンカ生研KK）、エコーウイルスプール抗血清（EP95；エンテロウイルスレファレンスセンター）および型特異抗血清（国立感染症研究所、デンカ生研KK）を用いた中和反応を行い、ウイルスの種と型を同定した。

結果および考察

本年度は、砺波保健所管内の小矢部市で0歳児8名、新川保健所管内の黒部市で1歳～6歳児50名の合計58名から採取された糞便についてウイルス分離検査を行なった。その結果、0歳女児からポリオウイルス2型が2株、0歳男児からエコーウイルス22型が1株、3歳女児からコクサッキーウイルスA9型が1株、合計4株のウイルスが分離され、分離率は6.9%であった（Table 1）。

ポリオウイルスが分離された0歳児2名は、ともに秋期ワクチンを平成13年10月29日に投与され、検体は2ヵ月経過後の平成14年1月9日に採取されたものであった。分離されたポリオウイルスについて国立感染症研究所にウイルスの抗原分析を依頼した結果、2株ともセービンウイルス2型ワクチン由来株であった。

全国的にみると、コクサッキーウイルスA9型は例年夏季から秋季にかけて、主に無菌性髄膜炎、ヘルパンギーナ、その他の疾患から分離されている。また、エコーウイルス22型の分離報告は少なく、感染しても軽症あるいは不顕性感染で終わるものと考えられる。腸管系ウイルスは夏季を中心に分離報告が多いが、本調査の検体採取が1～2月であることから、冬季においても乳幼児の間にこれらのウイルスの侵淫が示唆された。

本年度の調査において分離されたポリオウイルスは2株ともワクチン由来株であり、ポリオワクチン接種後2ヵ月経過時点でも排泄されていたと考えられる。県内では、後述の感受性調査成績からみても、野生型ポリオウイルスの侵淫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

平成13年8月から9月にかけて、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、乳児から成人まで合計226名（0～69歳）について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 Eagle-MEM 培養液で 4 倍希釈し、56°C30 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 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°C、3 時間および 4°C 一晚の中和反応を行った。中和後、Vero 細胞浮遊液（1 ~ 2 \times 10⁵ 細胞/ml）を 100 μ l ずつ加え、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。ウイルスによる細胞変性効果を 1 週間観察し、中和抗体価を測定した。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 年度に国立感染症研究所から分与され、当研究所において Vero 細胞で 7 代継代したものである。

結果および考察

ポリオウイルス各型に対する中和抗体価の保有状況をウイルス型別、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、2 型が 98.2%(222/226) で最も高く、次いで 1 型が 93.4%(211/226) を示し、3 型は最も低く

78.8%(178/226) であった。これらの結果は昨年度の調査結果とほとんど同様であり、いずれの型に対しても集団免疫として十分な抗体保有状況であった。各年齢区分の抗体保有率をみると、1 型では、25~29 歳群が 72.7% で最も低く、次いで 30~39 歳群が 80.0%、その他の年齢群は全て 85% 以上であった。2 型では 0~1 歳が 85.7% 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。一方、3 型は 0~1 歳が 57.1%、10~14 歳では 61.1%、25~29 歳は 63.6%、であり、その他の年齢区分では 70% 以上を示した。しかし、100% を示した年齢群は 40~49 歳のみで、年齢区分によって抗体保有率にばらつきが認められた。

抗体保有者の平均抗体価（幾何平均）は、1 型では 24~29 歳の 32.0 倍から 2~3 歳の 760.8 倍までを示し全年齢平均は 133.1 倍であった。2 型は 10~14 歳の 79.1 倍から 0~1 歳の 574.7 倍までを示し平均抗体価は 137.1 倍であった。一方、3 型では 30~39 歳の 13.0 倍から 40~49 歳の 48.2 倍までを示し、全年齢の平均抗体価も 26.8 倍であり、1 型、2 型と比べて低かった。

Table 3 に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 98.2%(112/114)、100.0%(114/

Table 1. Virus isolation from feces of children

Area	Age (Year)	No. of feces	Virus isolation positive		Identification of isolates *		
			No.	(%)	P 2	CA 9	E 22
Kurobe	0	0	-	-			
	1	6	0	0.0			
	2	5	0	0.0			
	3	12	1	8.3		1	
	4	0	-	-			
	5	3	0	0.0			
	6	24	0	0.0			
	Subtotal	50	1	2.0		1	
Oyabe	0	8	3	37.5	2		1
	1	0	-	-			
	2	0	-	-			
	3	0	-	-			
	4	0	-	-			
	5	0	-	-			
	6	0	-	-			
	Subtotal	8	3	37.5	2		1
Total		58	4	6.9	2	1	1

Date of survey : Kurobe ; Feb. 4~6, 2002. Oyabe ; Jan. 9~10, 2002.

* P 2 : Poliovirus type 2. CA 9 : Coxsackievirus A type 9. E 22 : Echovirus type 22

Table 2. Distribution of neutralizing antibodies against poliovirus by age groups

Type 1														
Age group (years)	No. of sera	No. of sera with neutralizing antibody titer										No. of positive sera	Positive rate(%)	Geometric mean titer
		<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024			
0~1	7	1	0	0	0	0	0	1	1	0	4	6	85.7	574.7
2~3	16	2	0	0	0	0	0	0	1	4	9	14	87.5	760.8
4~6	12	0	0	0	0	0	0	2	0	6	4	12	100.0	512.0
7~9	16	0	0	0	1	1	2	3	2	4	3	16	100.0	215.3
10~14	36	0	0	1	1	5	6	4	11	1	7	36	100.0	158.2
15~19	16	0	0	0	2	4	1	4	2	2	1	16	100.0	98.7
20~24	15	1	1	1	1	1	4	1	2	3	0	14	93.3	78.0
25~29	11	3	1	1	0	2	3	1	0	0	0	8	72.7	32.0
30~39	25	5	1	1	4	3	4	2	3	0	2	20	80.0	59.7
40~49	22	1	0	1	1	1	7	3	3	4	1	21	95.5	119.8
50~59	25	1	1	0	1	3	6	6	1	5	1	24	96.0	107.6
60~	25	1	1	1	4	4	2	6	4	1	1	24	96.0	67.8
Total	226	15	5	6	15	24	35	33	30	30	33	211	93.4	133.1
(%)	100.0	6.6	2.2	2.7	6.6	10.6	15.5	14.6	13.3	13.3	14.6	93.4		

Type 2														
Age group (years)	No. of sera	No. of sera with neutralizing antibody titer										No. of positive sera	Positive rate(%)	Geometric mean titer
		<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024			
0~1	7	1	0	0	0	0	0	1	0	2	3	6	85.7	574.7
2~3	16	1	0	0	0	0	0	2	6	3	4	15	93.8	388.0
4~6	12	1	0	0	0	0	5	0	0	3	3	11	91.7	240.4
7~9	16	0	0	0	0	3	4	4	1	3	1	16	100.0	128.0
10~14	36	0	0	2	2	7	9	7	7	1	1	36	100.0	79.1
15~19	16	0	0	0	0	3	4	2	5	2	0	16	100.0	122.6
20~24	15	0	0	0	0	0	2	7	3	2	1	15	100.0	185.3
25~29	11	0	0	0	1	3	2	2	2	1	0	11	100.0	82.3
30~39	25	0	0	1	2	1	4	7	8	1	1	25	100.0	117.8
40~49	22	0	0	1	2	2	2	6	5	3	1	22	100.0	120.2
50~59	25	1	0	0	3	4	2	5	4	3	3	24	96.0	128.0
60~	25	0	1	0	0	0	7	8	4	2	3	25	100.0	147.0
Total	226	4	1	4	10	23	41	51	45	26	21	222	98.2	137.1
(%)	100.0	1.8	0.4	1.8	4.4	10.2	18.1	22.6	19.9	11.5	9.3	98.2		

Type 3														
Age group (years)	No. of sera	No. of sera with neutralizing antibody titer										No. of positive sera	Positive rate(%)	Geometric mean titer
		<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024			
0~1	7	3	0	0	1	2	1	0	0	0	0	4	57.1	32.0
2~3	16	4	0	1	1	5	3	1	1	0	0	12	75.0	42.7
4~6	12	3	2	0	3	0	2	2	0	0	0	9	75.0	25.4
7~9	16	1	1	2	3	4	2	1	1	1	0	15	93.8	33.5
10~14	36	14	5	4	5	4	1	2	0	0	1	22	61.1	18.1
15~19	16	5	1	1	4	4	0	0	1	0	0	11	68.8	21.9
20~24	15	4	1	1	3	5	1	0	0	0	0	11	73.3	20.6
25~29	11	4	0	2	1	1	2	0	0	0	1	7	63.6	39.0
30~39	25	5	7	4	3	3	1	1	1	0	0	20	80.0	13.0
40~49	22	0	1	3	1	7	4	3	1	0	2	22	100.0	48.2
50~59	25	4	1	1	5	5	3	5	0	1	0	21	84.0	40.3
60~	25	1	1	6	6	4	7	0	0	0	0	24	96.0	21.4
Total	226	48	20	25	36	44	27	15	5	2	4	178	78.8	26.8
(%)	100.0	21.2	8.8	11.1	15.9	19.5	11.9	6.6	2.2	0.9	1.8	78.8		

Table 3. Positive rate of neutralizing antibodies by history of vaccination

Type 1 Age group (years)	No. of sera	Times of vaccination						No vaccination		Unknown	
		Twice		Once		Unknown		No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)
		No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)				
0~1	7	3/3	100.0	2/2	100.0			1/1	100.0	0/1	0
2~3	16	14/15	93.3							0/1	0
4~6	12	8/8	100.0	2/2	100.0					2/2	100.0
7~9	16	16/16	100.0								
10~14	36	30/30	100.0	3/3	100.0					3/3	100.0
15~19	16	10/10	100.0			4/4	100.0	1/1	100.0	1/1	100.0
20~24	15	4/4	100.0	3/3	100.0	1/1	100.0			6/7	85.7
25~29	11	1/1	100.0							7/10	70.0
30~39	25					3/4	75.0			17/21	81.0
40~49	22	1/1	100.0	1/1	100.0	5/5	100.0	2/2	100.0	12/13	92.3
50~59	25					1/1	100.0	3/3	100.0	20/21	95.2
60~	25							5/6	83.3	19/19	100.0
Total	226	87/88	98.9	11/11	100.0	14/15	93.3	12/13	92.3	87/99	87.9
				112/114	98.2						

Type 2 Age group (years)	No. of sera	Times of vaccination						No vaccination		Unknown	
		Twice		Once		Unknown		No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)
		No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)				
0~1	7	3/3	100.0	2/2	100.0			1/1	100.0	0/1	0
2~3	16	15/15	100.0							0/1	0
4~6	12	8/8	100.0	2/2	100.0					1/2	50.0
7~9	16	16/16	100.0								
10~14	36	30/30	100.0	3/3	100.0					3/3	100.0
15~19	16	10/10	100.0			4/4	100.0	1/1	100.0	1/1	100.0
20~24	15	4/4	100.0	3/3	100.0	1/1	100.0			7/7	100.0
25~29	11	1/1	100.0							10/10	100.0
30~39	25					4/4	100.0			21/21	100.0
40~49	22	1/1	100.0	1/1	100.0	5/5	100.0	2/2	100.0	13/13	100.0
50~59	25					1/1	100.0	3/3	100.0	20/21	95.2
60~	25							6/6	100.0	19/19	100.0
Total	226	88/88	100.0	11/11	100.0	15/15	100	13/13	100.0	95/99	96.0
				114/114	100.0						

Type 3 Age group (years)	No. of sera	Times of vaccination						No vaccination		Unknown	
		Twice		Once		Unknown		No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)
		No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)	No.*	Rate(%)				
0~1	7	3/3	100.0	0/2	0			1/1	100.0	0/1	0
2~3	16	12/15	80.0							0/1	0
4~6	12	7/8	87.5	1/2	50.0					1/2	50.0
7~9	16	15/16	93.8								
10~14	36	19/30	63.3	1/3	33.3					2/3	66.7
15~19	16	6/10	60.0			3/4	75.0	1/1	100.0	1/1	100.0
20~24	15	3/4	75.0	3/3	100.0	0/1	0			5/7	71.4
25~29	11	1/1	100.0							6/10	60.0
30~39	25					3/4	75.0			17/21	81.0
40~49	22	1/1	100.0	1/1	100.0	5/5	100.0	2/2	100.0	13/13	100.0
50~59	25					1/1	100.0	2/3	66.7	18/21	85.7
60~	25							6/6	100.0	18/19	94.7
Total	226	67/88	76.1	6/11	54.5	12/15	80.0	12/13	92.3	81/99	81.8
				85/114	74.6						

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

114) であり、また、1回のみワクチン接種でも十分な抗体獲得率を示している(1型、2型ともに100.0%, 11/11)。しかし、3型の場合ワクチン接種者全体の陽性率は74.6%(85/114)、1回接種者では54.5%(6/11)に止まり、1型、2型と比べて低かった。これらの結果も過去の調査結果と同様であり、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。

各個人レベルの型別抗体保有状況を年齢区分別に検討した (Table 4)。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、被験者全体では74.3%(168/226)であったが、24~29歳群は45.5%(5/11)、0~1歳は57.1%(4/7)であった。0~1歳群7名のうちワクチン2回接種者は3名であり、今後ワクチンの追加接種を受ける機会があるが、24~29歳群ではワクチン接種による抗体獲得の機会はない。その他の年齢区分では、3種類の型全てに対する抗体保有者は60%以上であった。一方、全型抗体陰性者は0歳児と2歳児の2名(0.9%)で、ワクチン接種歴は2名とも不明であった。上記以外の56名(24.8%)は3種類のウイルスのうち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、検査した血清の25.7%が3種類

の型のうち、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。インド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いる。これらポリオ常在国から野生株ポリオウイルスの侵入の可能性を否定できず、ポリオウイルスに対する監視は続けなければならない。また、父親がポリオワクチン接種児からの二次感染によりポリオ麻痺を発症した事例 [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た。

ま と め

感染源調査：平成14年1~2月に新川保健所管内および砺波保健所管内の健康な乳幼児58名を対象に調査し、ポリオウイルス2型が2株、エコーウイルス22型が1株、コクサッキーウイルスA9

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	7	1	0	0	0	2	0	0	4 (57.1)
2~3	16	1	0	0	0	3	1	0	11 (68.8)
4~6	12	0	1	0	0	2	0	0	9 (75.0)
7~9	16	0	0	0	0	1	0	0	15 (93.8)
10~14	36	0	0	0	0	14	0	0	22 (61.1)
15~19	16	0	0	0	0	5	0	0	11 (68.8)
20~24	15	0	0	0	0	4	1	0	10 (66.7)
25~29	11	0	0	1	0	3	2	0	5 (45.5)
30~39	25	0	0	2	0	3	3	0	17 (68.0)
40~49	22	0	0	0	0	0	1	0	21 (95.5)
50~59	25	0	0	1	0	3	0	1	20 (80.0)
60~	25	0	0	0	0	1	1	0	23 (92.0)
Total	226	2	1	4	0	41	9	1	168
(%)	(100.0)	(0.9)	(0.4)	(1.8)	(0)	(18.1)	(4)	(0.4)	(74.3)

型が1株分離された。ポリオウイルス2型について国立感染症研究所に抗原分析を依頼した結果、2株ともセービンウイルス2型ワクチン由来株であった。

感受性調査：0歳から69歳までの226名の血清について、ポリオウイルス（弱毒セービンウイルス）に対する中和抗体価を測定した。抗体価4倍以上の抗体保有率は1型93.4%、2型98.2%、3型78.8%であった。また、平均抗体価（幾何平均）は1型133.1倍、2型137.1倍、3型26.8倍を示し、集団免疫としては良好な抗体保有状況であった。これらの結果から、本県においては、野生型ポリオウイルスの侵淫や、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. 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課編(2001)．病原微生物検出情報月報，22，63.

インフルエンザ流行予測調査

松浦久美子	岩井雅恵	長谷川澄代	中山 香
安藤秀二	永井美之	田中桂子 ¹	金木 潤 ²
遠藤京子 ³	田中有易知 ⁴	中村由起子 ⁵	宮田英喜 ⁵

Epidemiological Surveillance of Influenza Virus Infection in Toyama Prefecture

Kumiko MATSUURA, Masae IWAI, Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA,
Shuji ANDO, Yoshiyuki NAGAI, Keiko TANAKA¹, Jun KANAKI², Kyoko ENDO³,
Yuichi TANAKA⁴, Yukiko NAKAMURA⁵ and Hideki MIYATA⁵

要 旨 インフルエンザ流行前の時期における富山県住民の抗体保有状況（2001年8～9月）と豚の抗体保有状況（2001年7～9月）の調査、およびインフルエンザ様患者からのウイルス検出を試みた。その結果、以下の成績を得た。

1. インフルエンザ流行前における富山県住民226名のA/New Caledonia/20/99(H1N1)株、A/Panama/2007/99(H3N2)株、B/Johannesburg/5/99株およびB/Akita/27/2001株に対するHI価10倍以上の抗体保有率は、各々33.2%、68.6%、54.4%、10.2%であった。感染防御能があると考えられているHI価40倍以上の抗体保有率は、各々13.3%、28.3%、21.7%、0.0%と低く、今シーズンも流行の可能性が示唆された。豚におけるA/HK/9-1-1 (H5N1)株、A/HK/1073/99(H9N2)株およびA/turkey/Wisconsin/66(H9N2)株に対する10倍以上の抗体保有率は0%であった。
2. 1月から4月までの長期間にわたりA(H1)型、A(H3)型およびB型ウイルスによるインフルエンザ患者が発生した。この間に調査した患者のなかには、A(H3)型とB型ウイルスの混合感染者が1名確認された。A(H1)型とA(H3)型の分離株はワクチン株と類似していたが、B型のほとんどの分離株はワクチン株とは抗原性が異なり、流行前の住民におけるHI価10倍以上の抗体保有率は非常に低い状況であったB/Akita/27/2001株に類似した株であった。「集団かぜ」は2月上中旬から4月中旬まで合計28施設で発生し、患者数は1,261人であった。脳症患者5名のうち3名はインフルエンザ関連の脳症であることが示唆された。

1 新川保健所 2 中部保健所 3 高岡保健所 4 砺波保健所 5 富山市保健所

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した。厚生労働省健康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た。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の出現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調べた。同様の調査をインフルエンザの関連が疑われた脳症患者についても行った。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：2001年8月～9月

豚の感受性調査：2001年7月～9月

2. 調査対象

人血清は県内住民の226名（0～68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。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/New Caledonia/20/99(H1N1)株、A/Panama/2007/99(H3N2)株、B/Johannesburg/5/99株およびB/Akita/27/2001株を用い、豚ではA/HK/9-1-1(H5N1)株、A/HK/1073/99(H9N2)株およびA/turkey/Wisconsin/66(H9N2)株を用いた。A/New Caledonia/20/99株、A/Panama/2007/99株およびB/Johannesburg/5/99株は今年度のワクチン株である。これらの抗原のうちNew Caledonia株、Panama株、Johannesburg

株はデンカ生研製、その他は国立感染症研究所より分与された。

結果および考察

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：28例、5～9歳：23例、10～14歳：36例、15～19歳：16例、20～29歳：26例、30～39歳：25例、40～49歳：22例、50～59歳：25例、60歳以上：25例で、合計226検体である。これらの検体について、Aソ連型(H1N1)、A香港型(H3N2)、B型ウイルスに対するHI抗体を調べ、HI価が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/New Caledonia/20/99(H1N1)株に対する抗体保有率：本株は前シーズン(2001.1～2001.4)の流行株であり、今シーズンのワクチン株として用いられた。この株に対するHI価10倍以上の抗体保有率は33.2%(75/226)、40倍以上は13.3%(30/226)であった。年齢群別にみると、10倍以上の抗体保有率は5～19歳群では50.0～69.6%と高かったが、他の年齢群では低かった(14.3～32.0%)。40倍以上の保有率は、5～19歳群(22.2～56.53%)以外の年齢層では非常に低い(0.0～8.0%)。

A/Panama/2007/99(H3N2)株に対する抗体保有率：本株は前シーズンの流行株であり、今シーズンのワクチン株として用いられた。この株に対するHI価10倍以上の抗体保有率は68.6%(155/226)、40倍以上は28.3%(64/226)であった。年齢群別にみると、10倍以上の保有率は全年齢群で高かった(45.5～95.7%)。40倍以上の保有率は、5～19歳群では比較的高い(36.1～60.9%)が、4歳以下と成人層は低い保有率(11.5～28.0%)を示した。

B/Johannesburg/5/99株に対する抗体保有率：前シーズンの流行株の多くは、ワクチンに用いられていたB/Yamanashi/166/98株とは抗原性が異なるB/Johannesburg/5/99株に近い株であったため、Johannesburg株が今シーズンの流行予

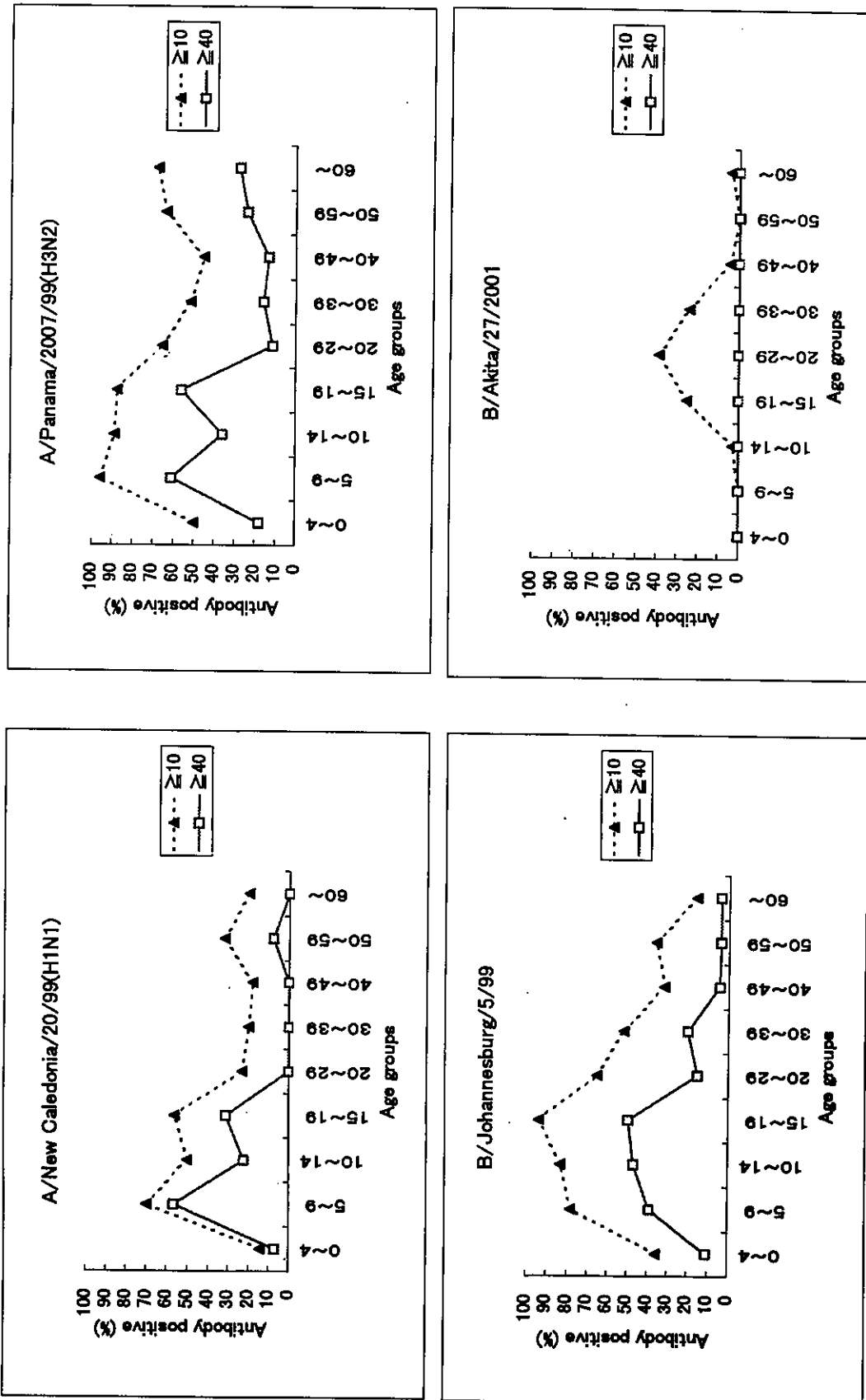


Fig. 1. Prevalence of influenza virus antibodies in age groups (2001.8~9)

想株と選定され、ワクチンとして用いられた。この株に対するHI価10倍以上の抗体保有率は54.4% (123/226)、40倍以上は21.7%(49/226)であった。年齢群別にみると、10倍以上の保有率は、5～39歳群では高い(52.0～93.8%)が、他の年齢群では低かった(16.0～36.0%)。40倍以上は5～19歳群では比較的高い(39.1～50.0%)が、4歳以下と成人層は低い保有率(4.0～20.0%)を示した。

B/Akita/27/2001株に対する抗体保有率：本株の類似株が、前シーズン(2001年)の2月頃より少数ではあるが日本各地で分離され、8月までの時点ではB型分離株の約8%を占めていた。この株に対するHI価10倍以上の抗体保有率は10.2% (23/226)と低く、40倍以上の保有率は0.0%(0/226)で、感染防御能があると考えられている抗体の保有者は認められなかった。年齢群別にみると、10倍以上の抗体保有率は15～39歳群では24.0～38.5%を示したが、他の年齢群では0.0～4.5%と低い。この抗体保有状況より、前シーズン、富山県内ではこの株による感染者はほとんど発生していなかったと推測される。

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、HI価10倍以上の保有率はA/Panama/2007/99(H3N2)株(ワクチン株)やB/Johannesburg/5/99株(ワクチン株)に対して比較的高いが、A/New Caledonia/20/99(H1N1)株(ワクチン株)では5～19歳群以外は低い。また、感染防御能があるとされる抗体価が40倍以上の保有率では、3株とも5～19歳の年齢層だけが31.3～60.9%の保有率を示し、他の年齢層は低い状況であることが明らかになった。低い抗体価の保有者が多いが、高い抗体価(40倍以上)の保有者が少ないのは、前シーズンの3種類のウイルス(Aソ連型、A香港型、B型)による流行が小規模であったことを反映したものと考えられる。これらの住民抗体保有状況から今シーズンも流行の可能性が推測された。また、ワクチンに含まれていないB/Akita/27/2001株に対する抗体保有者は非常に少なく、この株による流行が始まると蔓延が懸念された。

2. 豚のインフルエンザ感受性調査

新型インフルエンザウイルスの出現を想定して、豚における抗体保有状況を調べた。豚血清80検体についてA/HK/9-1-1(H5N1)株、A/HK/1073/99(H9N2)株およびA/turkey/Wisconsin/66(H9N2)株に対するHI抗体を調べた結果、抗体価は全て10倍未満であり、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。豚の月齢は6ヶ月と若い豚が対象であったために、抗体保有率が0%になった可能性もある。

II 感染源調査

調査および検査方法

1. 調査期間

2002年1月～2002年4月

2. 調査対象

定点観測として、正木医院(福光町)、宗玄医院(高岡市)、二本垣医院(黒部市)、坂本小児科医院(富山市)および池田内科医院(上市町)の協力により、インフルエンザ様疾患の患者を調査した。「集団かぜ」の患者およびインフルエンザの関連が疑われた脳症患者についても調べた。

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/New Caledonia/20/99(H1N1)株血清、抗A/Moscow/13/98(H1N1)株血清、抗A/Panama/2007/99(H3N2)株血清、抗B/Johannesburg/5/99株血清および抗B/Akita/27/2001株血清を用いて行った。脳症患者の検体についてはインフルエンザウイルスの遺伝子検出を森下ら[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。

結果および考察

1. インフルエンザ様疾患の発生状況

インフルエンザ様患者の発生は、1月上旬より散発的にみられたが、2月18日に今シーズン初めての「集団かぜ」がY小学校で発生し、その後「集団かぜ」が県内の各地で4月16日まで発生した。休校、学年または学級閉鎖などの措置が合計28施設でとられた。市町村別の措置状況は富山市17、細入村1、立山町3、八尾町2、入善町3、滑川市1、宇奈月町1施設であり、県の東部に「集団かぜ」が多く認められた。これらの施設での累積患者数は1,261人で、昨シーズン(214人)の約6倍の患者数であった。

2. インフルエンザウイルスの検出状況と血清HI抗体

2002年1月から4月までに採取した定点観測84検体、集団かぜ(1集団)5検体および脳症患者5名からの7検体で、合計96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を調べた成績をTable 1に示す。

定点観測において、今冬初のインフルエンザウイルスA(H1)型が2001年1月11日に発病した患者検体から分離された。その後、B型が1月28日、A(H3)型が2月20日に発病した患者検体から分離され、4月上旬までの検体よりA(H1)型が11株、A(H3)型が16株、B型が9株分離された。これらの検体うちの1検体からはA(H3)型とB型とが同時に分離され、混合感染によるものであった。

「集団かぜ」では、1施設(Y小学校)の患者5名について調べた結果、1名の患者からB型が分離され、血清HI抗体検査においては、5名全員が急性期から回復期にかけてB型に対するHI抗体価が有意に上昇(4倍以上の上昇)していた。これよりY小学校の「集団かぜ」はB型ウイルス感染によると判断された。

脳症患者5名のうち3名(A, B, C)の患者では、インフルエンザウイルスの感染が確認された。患者A(6才, 3月7日発病)からはA(H1)型、患者B(3才, 3月7日発病)からはB型が分離された。患者C(3才, 4月9日発病)からは

ウイルスは検出されなかったが、臨床現場でインフルエンザ迅速診断キットによってA型陽性の反応を示し、急性期から回復期にかけてA(H3)型に対するHI抗体価の有意上昇が認められた。これら3名の臨床症状は発熱(39.0~40.5℃)、上気道炎、気管支炎、意識障害、痙攣などであった。他の2患者からは、ウイルスは検出されなかった。

合計96検体中12検体よりA(H1)型、16検体よりA(H3)型、11検体よりB型株が分離された。これらの分離株に対するインフルエンザ標準抗血清のHI価はTable 2-1, 2-2に示すようであった。A(H1)型の分離株(12株)に対する抗A/New Caledonia /20/99 (H1N1)株血清、抗A/Moscow /13/98株(H1N1)血清のHI価は、それぞれ80~160倍(ホモ:320倍)、10~40倍(ホモ:1280倍)であり、分離株はNew Caledonia株(ワクチン株)に類似した株と考えられる。A(H3)型の分離株(16株)に対する抗A/Panama/2007/99(H3N2)血清のHI価は640~1280倍(ホモ:1280倍)であり、Panama株(ワクチン株)とは抗原性に差は認められなかった。B型の分離株(11株)では、1株を除いた10株に対する抗B/Johannesburg/5/99株血清と抗B/Akita/27/2001株血清のHI価は、それぞれ<10倍(ホモ:320倍)、20~40倍(ホモ:160倍)であり、これら10株はJohannesburg株のHI価よりAkita株に近いHI価を示した。残りの1株はB/Johannesburg/5/99株に近いHI価を示した。従って、分離株の大半はJohannesburg株(ワクチン株)より前シーズンに日本各地で少数ながら検出されていたAkita株に類似した株と考えられる。

以上の検査結果より、被検者94名中A(H1)型感染者が12名、A(H3)型感染者が16名、B型感染者が14名、A(H3)型とB型との混合感染者が1名確認された。富山県でのインフルエンザの流行は昨シーズンと同様に立ち上がりが遅かったが、1月から4月まで長期間にわたり3種類のウイルスによるインフルエンザが発生していた。ウイルス型別、月別に検出状況を見ると、A(H1)型感染者は1月から3月上旬、A(H3)型感染者は2月

Table 1. Virological and serological examination of patients with influenza-like diseases or encephalopathy

Health Center	Sampling station	No. of patients	Virus detection			HI antibody examination			Influenza Type	No. of patients			
			Date of sampling	No. of sample	Throat swab isolates	Type	Acute	No. of sera Convalescent			No. of significant increase		
								A(H1) ¹⁾	A(H3)	B			
Tonami	Masaki internal clinic	29	H14.1.21 ~4.9	29	2	A(H1) ¹⁾				2	A(H1)		
					14	A(H3)				14	A(H3)		
					4	B				4	B		
Takaoka	Shougen clinic	10	H14.1.19 ~4.3	10	2	A(H1)				2	A(H1)		
					1	A(H3)				1	A(H3)		
					1	B				1	B		
Nikawa	Nihongaki clinic	15	H14.1.9 ~4.6	15	3	A(H1)				3	A(H1)		
					1	B				1	B		
Tyubu	Ikeda internal clinic	6	H14.1.8 ~3.12	6	2	A(H1)				2	A(H1)		
					1	A(H3)				1	A(H3)		
Toyama	Sakamoto pediatric clinic	24	H14.1.8 ~3.12	24	2	A(H1)				2	A(H1)		
					3	B				3	B		
Toyama	Y high school	5	H14.2.18	5	1	B				1	B		
Toyama	Toyama Municipal hospital et al Nikawa	5 ²⁾	H14.2.18 ~4.10	7 ³⁾	1	A(H1)				1	A(H1)		
					1	B				1	A(H3)		
Total		94		96	12	A(H1)	6	6	0	1	5	12	A(H1)
					16	A(H3)						17	A(H3)
					11	B						15	B

1) A(H1): A/New Caledonia/20/99; A(H3): A/Panama/2007/99; B: B/Johannesburg/5/99

2) Five patients had clinical symptoms with encephalopathy

3) Two samples are cerebrospinal fluid

Table 2-1. HI titers of reference antisera against influenza A isolates and reference strains

strain/isolate	HI titer of ¹⁾		
	Anti-A/New Caledonia /20/99(H1N1)	Anti-A/Moscow /13/98(H1N1)	Anti-A/Panama/ 2007/99(H3N2)
A/New Caledonia/20/99 ¹⁾	320	— ²⁾	—
A/Moscow/13/98	—	1280	—
A/Panama/2007/99	—	—	1280
A/Toyama/1/2002	160	20	—
A/Toyama/2/2002	160	40	—
A/Toyama/3/2002	160	40	—
A/Toyama/4/2002	160	40	—
A/Toyama/5/2002	160	40	—
A/Toyama/6/2002	80	20	—
A/Toyama/7/2002	80	10	—
A/Toyama/8/2002	160	20	—
A/Toyama/9/2002	80	10	—
A/Toyama/10/2002	160	20	—
A/Toyama/11/2002	—	—	640
A/Toyama/12/2002	—	—	640
A/Toyama/13/2002	—	—	640
A/Toyama/14/2002	—	—	640
A/Toyama/15/2002	160	40	—
A/Toyama/16/2002	80	10	—
A/Toyama/17/2002	—	—	640
A/Toyama/18/2002	—	—	1280
A/Toyama/19/2002	—	—	1280
A/Toyama/20/2002	—	—	1280
A/Toyama/21/2002	—	—	640
A/Toyama/22/2002	—	—	640
A/Toyama/23/2002	—	—	1280
A/Toyama/24/2002	—	—	640
A/Toyama/25/2002	—	—	1280
A/Toyama/26/2002	—	—	1280
A/Toyama/27/2002	—	—	1280
A/Toyama/28/2002	—	—	640

Table 2-2. HI titers of reference antisera against influenza B isolates and reference strains

Antigen	HI titer of ¹⁾	
	Anti-B/Johannesburg /5/99	Anti-B/Akita /27/2001
B/Johannesburg/5/99 ¹⁾	320	—
B/Akita/27/2001	— ²⁾	160
B/Toyama/1/2002	—	40
B/Toyama/2/2002	—	20
B/Toyama/3/2002	—	20
B/Toyama/4/2002	—	20
B/Toyama/5/2002	—	40
B/Toyama/6/2002	—	40
B/Toyama/7/2002	—	20
B/Toyama/8/2002	—	20
B/Toyama/9/2002	—	20
B/Toyama/10/2002	80	—
B/Toyama/11/2002	—	40

1) Reference antigens and antisera were supplied from National Institute of Infectious Diseases

2) — : HI titer < 10

から4月、B型感染者は1月から4月上旬まで発生していた。B型感染者が長期間発生したのは、流行株がワクチン株とは抗原性の異なったB/Akita/27/2001株に類似した株で、流行前の住民におけるHI価10倍以上の抗体保有率は非常に低い状況であったことによると推測される。

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、宗玄医院、二本垣医院、池田内科医院、および坂本小児科医院の関係各位に深謝致します。

文 献

1. 森下高行, 小林慎一, 三宅恭司, 石原佑式, 磯村思无, 中島節子, 中島捷久 (1992). 感染症学雑誌, 66, 944-949

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 (2001年度)

長谷川澄代 松浦久美子 中山 喬
安藤秀二 永井美之

Outbreaks of Gastroenteritis Caused by Norwalk-like Virus(NLV)
in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2001

Sumiyo HASEGAWA, Kumiko MATSUURA, Takashi NAKAYAMA,
Shuji ANDO and Yoshiyuki NAGAI

要 旨 2001年4月から2002年3月までの1年間に検査したウイルス性の感染性胃腸炎の集団発生事例についてまとめた。

1. ウイルス性の急性胃腸炎の集団発生が5件あった。これらは全てがノーウォーク様ウイルス (Norwalk-like Virus : NLV) 感染によるものであった。
2. 糞便検体からのNLVの検出は電子顕微鏡 (EM) では29件, 酵素抗体固相法 (ELISA) では20件であった。
3. ELISA法で陽性となった糞便検体のNLVの遺伝子型はすべてG IIであった。
4. 無症状でウイルスを糞便中に排泄している感染者を認めた。

近年, 非細菌性の食中毒の主な病原因子としてNLVが注目されている。NLVの感染はウイルスに汚染された2枚貝 (特に牡蠣等) を生で食べることによるものが多い。しかし, 牡蠣等が関与しない場合も少なくない。このような感染例は牡蠣を原因とする事例に比べ発生数は少ないが, 一事例の感染者数は多くその規模が大きい。これは, NLVに感染している見かけ上健康な不顕性感染者あるいは軽い症状を呈している患者の手指を介するなどの経路で, 食品がウイルス汚染され, 感染源となったものと考えられる。

NLVは、『食中毒』の原因ウイルスのひとつ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る。乳幼児の急性胃腸炎はNLVによるものが多く, ほぼ年間を通してNLVの感

染が認められる [1]。また介護施設などで, NLV感染者の吐物や糞便で汚染され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の報告がいくつかある [2, 3]。

材 料 と 方 法

(1) 対象事例および検査材料

2001年4月~2002年3月までの間に発生した感染性胃腸炎の集団発生は表1に示した5事例であった。検体の採取と疫学的調査は各事例の管轄保健所で実施した (表1)。

(2) ウイルスの検出方法

糞便からのウイルスの検索は電子顕微鏡観察

表1 富山県においてNLVが検出された集団感染性胃腸炎事例

No.	発生時期	発生地区・状況 施設 / 人数	検体	NLV 陽性例	電顕法	ELISA 法		
						(I)	(II)	(I+II)
1	01.10.22~ 10.24	富山 保育所 園児 37/161 職員 (欠勤/在勤)	糞便 : 3	3	3	2 (2)
2	01.11.27 11.28	富山 保育所 園児 24/66 (有職/在職)	糞便 : 2	2	2	2 (2)
3	01.11.30~ 12.3	富山 転居施設 入所者 19/52 (有職/入所)	糞便 : 4	4	4	3 (3)
4	02.1.21~ 1.22	富山 小学生 小学生 93/433 (有職/大会参加)	糞便 : 16	16	16	10 (10)
			Z 糞便 : 5	2	2	2 (2)
			H 糞便 : 4	0	0	0		
5	02.3.4~ 3.5	富山 家族内 5人 牡蠣	糞便 : 3	2	2	1 (1)
			カキ (5個) : 6	0 ^P	0	0		

P:RT-PCR法で検査を行った

(EM法)と昨年と同じく[4]「ウイルス下痢症研究会」で開発したノーワークウイルス検出ELISAキットを用いて行った。牡蠣からのNLVの検出は「ウイルス下痢症診断マニュアル」に準じたRT-PCR法で行った。

結果および考察

表1に示した2001年度のNLVの集団感染事例5事例のうち4例が感染源・感染経路を特定することができなかった。1事例だけ牡蠣関連の感染であると考えられた。以下、事例ごとに概要を述べる。

事例No.1:2001年10月24日、富山市保健所に

富山市内のN保育所で、多数の園児が「下痢」「嘔吐」で休んでいるとの報告があった。24日に患児7~8人がS小児科を受診し、ウイルス性胃腸炎の疑いと診断された。10月26日に3名の患者から糞便が採取され、3名ともNLVが検出された。疫学調査の結果、10月22日に1名の患者(午後3時~5時にかけて下痢)が発生し、その翌日から患者(職員を含む)が増加していることがわかった。感染原因となった食物等は特定できず、NLV感染者の糞便や吐物で汚染された手指を介して直接ヒトからヒトへ感染が拡大した事例であると考えられた。

この事例と同時期に同市内の近隣の2か所の保育所でも同様の患者が多数発生している事が分かった。地域的流行が考えられたが、検体採取は前出の保育所のみであり、その後の調査は出来なかつ

た。

事例No. 2: 2001年11月28日に砺波保健所小矢部支所管内で、S保育所の園児56名中20名(36%)の欠席者が出たとの報告があり、調査の結果、職員(保育士)1名を含む計24名が「嘔吐」「下痢」「発熱」の症状を呈していることがわかった。患者2名(職員1名、園児1名)から糞便2件が採取され、表には示さなかったがそのうち1名(職員)からは急性期と回復期の対血清も採取した。

2名の患者糞便からNLVが検出された。患者の急性期と回復期の血清について、患者(園児)糞便を粗精製してNLV抗原として免疫電子顕微鏡法(IEM法:Kapikianら[5]が行ったウイルス粒子と患者血清を用いたIEMで得られた凝集像の評価、すなわちウイルス抗原への抗体付着量を0~+4の五段階評価を行いペア血清で一段階以上の差異が認められた場合、有意な抗体上昇と認める)で、患者のNLVに対する抗体を測定した。その結果、急性期と回復期で有意な抗体の上昇が認められ、NLVの感染が血清学的にも裏付けられた。担当保健所の聞き取り調査で、25日に前出の職員と別の職員1名が発症していたことがわかった。このことから本事例はこの職員が発端と考えられたが、この職員に関しては調査が出来ず、感染源・感染経路を特定することは出来なかった。

事例No. 3: 2001年12月3日に中部保健所八尾支所管内のA施設で「嘔吐」「下痢」を主症状とする患者が発生した。調査の結果、11月30日午後6時から深夜にかけて患者が発生し、12月3日までに入所者52名中19名が発症していることがわかった。患者4名から糞便と、表には示していないが急性期と回復期の対血清を採取した。4名すべての患者糞便からNLVが検出された。本事例の患者1名の糞便を粗精製し、NLV抗原とした。IEM法で患者4名の抗体を測定したところ、急性期と回復期で有意な抗体の上昇がみられNLV感染が確認された。

本事例は当初食中毒が疑われて喫食調査が行われた。しかし、患者は入所者に限られており、同じ食事を摂った職員から発症者が認められなかつ

たので、食事による感染とは特定出来なかった。入所者の居室14室のうち9室で患者が発生しており、その位置関係は廊下をはさんで隣合わせ、あるいは隣接していた。これらのことから本事例は単一暴露型の感染であると考えられ、感染者の排泄物で汚染された手指などを介してNLVがヒトからヒトへ直接伝播したと考えられた。しかし、詳細な感染源・感染経路は特定出来なかった。

事例No. 4: 2002年1月20日に黒部市で開催された小学生のドッジボール大会参加者433名中93名が「嘔吐」「下痢」「腹痛」等の胃腸炎症状を呈した事例である。患者発生の最初の報告は1月21日で砺波保健所管内のFチームの児童であった。当初Fチームが20日の夕食を摂ったZ飲食店が感染源と考えられ、患児7名と同店従業員5名から糞便が採取された。ELISA法で患児4名と従業員2名(無症状)からNLVが検出された。しかし、砺波保健所の疫学調査の結果、同店で夕食後1時間頃から発症した患者が認められ、潜伏時間が短か過ぎること等から、同店を感染源と認めるまでには至らなかった。

一方、この大会へは県内各地区から参加しており、各保健所の調査の結果、患者は全県的に散在していることが判明した。そのため、大会当日の昼食弁当による感染を疑い、上記とは別の患児9名と、Fチームが食べた弁当を作ったH業者の従業員4名から糞便を採取し、NLVの検出検査を実施した。その結果、患児からNLVが検出されたが、弁当業者従業員からNLVは検出されなかった。また、この弁当に関する疫学調査の結果、発病者の多発したSチームでは、業者の弁当を食べた児童と食べなかった児童が混在しており、患児の半数以上はこの弁当を食べていなかったことが判明した。食材からのNLV検出は非常に困難であり、糞便検査からは本事例の感染源・感染経路を特定するには至らなかった。感染発生動向調査によれば、本事例の発生時期には富山県全域にNLVによる感染性胃腸炎が流行しており、大会日以前にすでにNLVに感染している患者が無症状かあるいは軽い症状で、大会に参加し、密室状態に近い環境でヒトからヒトへ感染を拡大した

と考えられた。

事例No.5:2002年3月6日,高岡保健所管内において家族内で生食用の牡蠣を3月3日夕食に食べ,3月4日~6日に牡蠣を食べた5人全員が「腹痛」「下痢」の症状を呈した事例である。患者3名の糞便と患者らが食べた牡蠣と同一ロットの牡蠣が検体として搬入された。検査の結果,患者2名の糞便からNLVが検出された。しかし,牡蠣中腸腺からRT-PCR法でNLV遺伝子の検出を試みたが遺伝子を検出することは出来なかった。保健所の調査によると,この家族は問題の牡蠣を食べた前日にも寿司屋で牡蠣を食べたとのことであったが,寿司屋の牡蠣に関する検査は出来なかった。本事例はNLVに汚染された牡蠣を食すことによりNLVに感染したと考えられたが,感染源は特定出来なかった。

NLV感染による感染性胃腸炎は毎年冬期を中心に発生をしている。富山県感染症発生動向調査によれば,本年度も感染性胃腸炎の患者の報告数は多く2001年11月から2002年2月までは,感染症の患者報告数の第一位を占めていた。今回報告した5事例中4事例は10月から1月にかけて発生しており,県内に感染性胃腸炎が多発していた時期と一致していた。NLVの感染力は強く,保育所や介護施設(事例1,2,3)のような集団生活を行う施設や,半ば密室状態の環境におけるスポーツ大会(事例4)など,多人数が集まる集団の中へNLVが持ち込まれた場合,大きな集団発生を引き起こす可能性のあることが示唆された。

NLVの感染経路はNLVに汚染された2枚貝の喫食による場合の他,患者の汚物を介した接触感染等が考えられている。No.4の事例で感染源とはされなかったが,無症状の飲食店従業員の糞便中からNLVを検出した。我々はすでに,無症状の調理人の糞便中にNLV粒子を確認しており[4]さらにそれが1が月以上にわたり糞便中に排

泄されていることを報告した[6]。これらのことから,NLVに感染後,無症状のヒトや,発症後回復したヒトが,長期にわたりNLVを糞便中に排泄し続け,感染源となりうる可能性が十分に示唆された。

これからのNLV対策には,食中毒に対する注意とともに,感染症発生動向調査情報による感染性胃腸炎の患者発生状況を見極め,食中毒と感染症の両面で進めていく必要があると考えられた。

謝 辞

検体採取等にご協力いただきました富山市,砺波保健所小矢部支所,中部保健所八尾支所高岡保健所小杉支所,中部,新川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. 斉藤博之, 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. 長谷川澄代, 松浦久美子, 中山 喬, 安藤秀二, 石倉康宏(2000). 富山衛研年報, 23, 113-117.
5. Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock R.M.(1972). J.Virol., 10, 1075-1081.
6. 長谷川澄代, 松浦久美子, 中山 喬, 安藤秀二, 石倉康宏(2001). 富山衛研年報, 24, 110-115.

富山市都市河川水のサルモネラ定点観測

磯部 順子 田中大祐 細呂木志保
清水美和子 香取幸治

Salmonella Surveillance in River Water in an Urban Area of Toyama City

Junko ISOBE, Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI,
Miwako SHIMIZU and Kouji KATORI

要 旨 1979年から2001年までの23年間、富山市内の4河川に8～11定点を設け、定期的に採水をおこない、サルモネラの分布状況を調べた。あわせてヒトから分離されたサルモネラとの比較をおこなった。得られた結果は次のとおりであった。

1. 2001年に富山市内の河川水から分離されたサルモネラは10血清型、24株であった。分離されたサルモネラは、血清型 *Salmonella* Typhimurium と血清型不明の抗原構造 4:i:- (以下 4:i:-) がともに5株と最も多く、次いで *S. Infantis*, *S. Thompson* がそれぞれ3株、その他の6血清型が各1～2株、計24株であった。
2. サルモネラ 4:i:- は1995年と、1998年を除く1997～2001年の4年間に河川水から計12株が分離された。これらの染色体DNAの制限酵素切断パターンは、分離された定点に関係なく、分離年ごとに同一であった。また、これら12株のうち10株が *fliB* 遺伝子を保有していた。この結果からサルモネラ 4:i:- は *S. Typhimurium* の単相のバリエーションである可能性が高いことが示唆された。
3. 23年間の調査において、各定点におけるサルモネラの陽性率は、前半の12年間(1979～1990年)は33.3～81.5(平均56.0)%と高かったが、後半の11年間(1991～2001年)は9.4～58.3(平均30.4)%と低かった。陽性率が低下した主な原因として、上流部において他の河川から取水し、より清浄な水の流量が増加したこと、また、富山市周辺部で下水道が普及したことによる河川浄化が考えられた。
4. 2001年にヒトから分離されたサルモネラは12血清型67株で、その血清型別の分離数は、*S. Enteritidis* が26株(48.2%)、*S. Tennessee* が14株(22.2%)、*S. Typhimurium* が5株(9.3%)、その他の血清型がそれぞれ1～2株であった。*S. Tennessee* 14株のうち12株は一集団事例からの分離であった。
5. 23年間に分離されたサルモネラの主な血清型の薬剤耐性を調べると、耐性株の頻度は *S. Enteritidis* で306/618株(49.5%)と最も高かった。また、耐性株の頻度は1990年代より1980年代で高く、中でも *S. Enteritidis* における1990年代の耐性株の頻度は1980年代のおよそ4倍高かった。また、5血清型(*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Litchfield*, *S. Paratyphi B*, *S. Typhimurium*) においては、河川由来よりヒト由来株で耐性株の頻度が高かった。

サルモネラは主に動物に広く分布する細菌性食中毒の原因菌である。わが国においてサルモネラ食中毒は、発生件数、患者数ともに常に細菌性食中毒の原因物質の上位を占めている [1]。2000年の統計においても、患者数2人以上の事例では病因物質ごとの事件数でサルモネラが第1位 (24.4%)と最も多く、患者数1人の事例でも件数はカンピロバクターに次いで多かったことが示されている [2]。さらにサルモネラ食中毒による死者は1995～2000年の6年間に毎年1～3人報告されるなど、数だけでなく症状の重篤さにおいても重要視されている [2, 3]。このようなサルモネラによる環境汚染の実態を知る目的で、都市河川水による環境汚染の実態を知る目的で、都市河川水の定点観測を1979年より実施してきた。本報告では、河川水およびヒトからのサルモネラの分離状況と分離株の血清型、薬剤耐性について述べる。

た11か所とした (図1)。1996年からは、これらの定点の中で比較的近い距離にある3か所を省いて8定点とした。採水は1979年6月～1981年5月は毎月1回、1981年6月～1986年12月は隔月、また、1997年は毎月1回、1998年5月～2001年10月は夏期に3～6回おこなった。

サルモネラの分離は既報 [4, 5] に従い実施した。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子解析の方法は寺嶋らの方法 [6] のとおりである。PCR法はAuroraらの報告 [7] にもとづき作製したプライマー-FFLIB (5'-CTGGCGACGATCTGTTCGATG-3'), RFLIA (5'-GCGGTATACAGTGAATTAC-3')を用い、Ready-to-Go System (Amersham Pharmacia Ink.) により、95℃ 1分、58℃ 1分、72℃ 2分、30サイクルの条件で実施した。薬剤耐性試験法は既報 [4] のとおりである。

ヒト由来のサルモネラは、県内の医療機関および保健所より、同定のために当研究所へ送付された患者および保菌者からの分離菌1781株について調査した。

調査定点および方法

調査定点は、富山市内を流れるいたち川(I)、松川(M)、赤江川(A)、土川(D)の4河川に設け

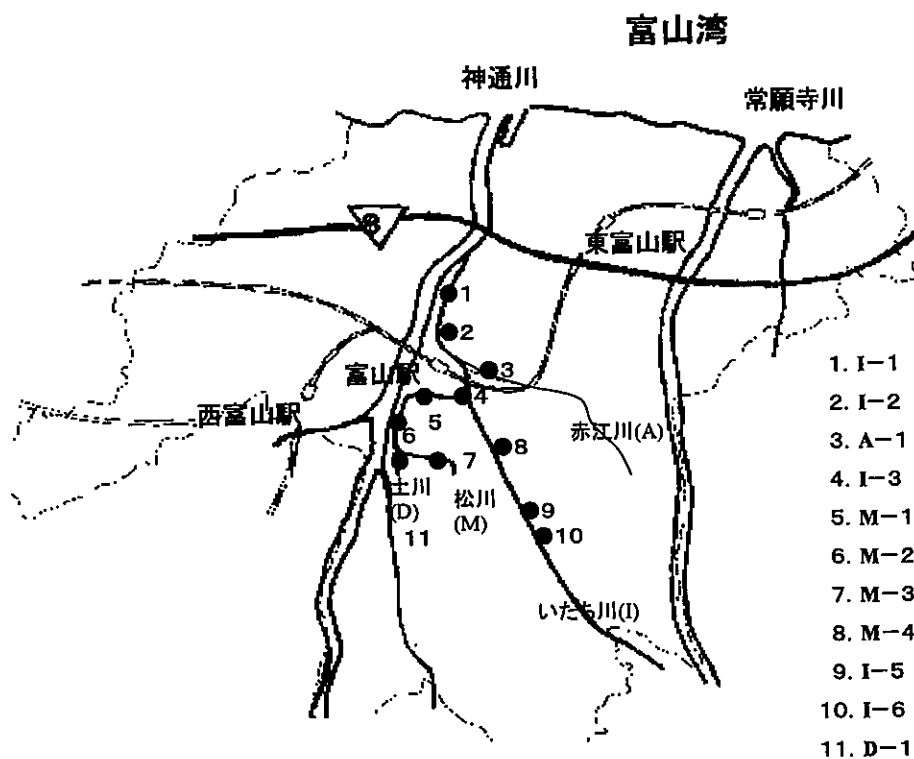


図1 富山市内河川採水定点

結果と考察

2001年5～10月に実施した河川調査におけるサルモネラの分離成績を表1に示した。定点別にみると、サルモネラはいずれの定点からも分離され、その分離率は全体で20/48(41.7%)であった。定点A-1とM-1での分離率はそれぞれ5/6(83.3%)、4/6(66.7%)と高かったが、その他の定点での分離率はいずれも1/6～2/6であった。月別ではサルモネラは毎月いずれかの定点で分離され、その分離率は1/8(12.5%)～5/8(62.5%)で、6、7月がもっとも高かった。血清型別にみると、分離株数はS.Typhimuriumと抗原構造4:i:- (以下4:i:-) がそれぞれ5株、S.Infantis、S.Thompsonがそれぞれ3株で、他の6血清型は1～2株であった。分離数の多かった血清型のうち、S.Typhimuriumは河川Dを除くすべての水系で、また、4:i:-はすべての水系で分離された。この4:i:-は1995年に初めて河川から分離され、その後1998年を除く1997～2001年の4年間、毎年河川から分離されている。この4:i:-の動向については、前述のAuroraら[7, 8]がスペインでの分離状況を調べ、1997年に出現し、その後分離数が増加していると報告している。そして、彼らはこの4:i:-の菌がS.Typhimuriumに特異的であるとされる*fliB*遺伝子を保有することを証明し、これらがS.

Typhimuriumの単相のバリエーションであると述べている[8, 9]。そこでわれわれは分離されたサルモネラ4:i:- 12株とS.Typhimurium 13株、その他の血清型14株について同様のPCR法で*fliB*遺伝子を調べた。その結果、図2に示すごとく、4:i:- 10株とS.Typhimurium 11株が*fliB*遺伝子を保有していた。これに対し、その他の血清型は1株もこの遺伝子を保有していなかった。これらの結果から、サルモネラ4:i:-はS.Typhimuriumのバリエーションである可能性が高いと考えられた。4:i:-とS.Typhimuriumのそれぞれ少数(各2株)にこの*fliB*遺伝子を認めなかったが、これら4株がなぜ*fliB*遺伝子を保有しないのか、理由は明らかでない。これら4:i:- 12株の染色体DNAの制限酵素切断パターンを図3に示した。パターンは、2001年の6、7月に分離された3株(レーン1～3)と2000年9月および1997年の6、7月に分離された9株(レーン4～12)の2つに大きく分けられた。したがって、同じ年次に分離された株は、同一クローンの菌であったと考えられた。レーン11の菌株のパターンはレーン4～9のそれよりバンドが2本多いが、これは少数回の変異によるもので、基本的にレーン4～9と同じであると考えられる。今後、河川からだけでなく、ヒトからの分離状況などの動向にも注意し、河川に分布する4:i:-の菌の汚染源についても検討した

表1. 定点別月別サルモネラ分離状況(2001年)

定点	5月	6月	7月	8月	9月	10月	陽性頻度
I-1			4:i:1,2(Typhimurium) 4:i:-		6,8:eh:1.2 (Newport)		2/6 ¹⁾
I-3			7:k:1.5 (Thompson)	7:r:1.5 (Infantis)			2/6
I-4		4:gfs:- (Agona)	6,8:k:1,5(Blockley) 4:gfs:- (Agona)				2/6
I-6					6,8:eh:1.2 (Newport) 7:k:1.5 (Thompson)		1/6
A-1	6,8:b:1.5 (Nagoya)	4:i:1,2 (Typhimurium)	7:k:1.5 (Thompson)	4:i:-	7:b:enx (Lockleaze)		5/6
M-1		7:r:1.5 (Infntis) 4:eh:1,2 (Saintpaul)	4:i:1,2 (Typhimurium)	4:gf:- (Derby)		4:i:1,2 (Typhimurium)	4/6
M-3		4:i:-			7:r:1.5 (Infntis) 4:i:1,2 (Typhimurium)		2/6
D		4:i:-		4:i:-			2/6
陽性頻度	1/8 ¹⁾	5/8	5/8	4/8	3/8	2/8	20/48

1)陽性数/検査数

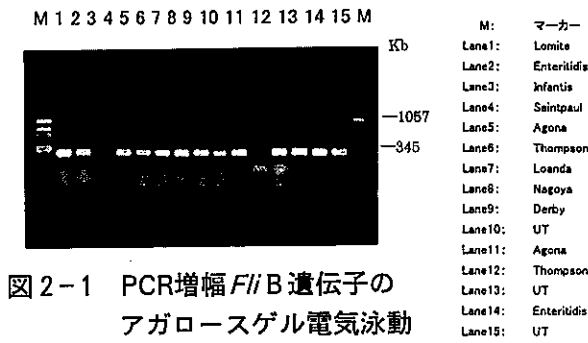


図2-1 PCR増幅FliB遺伝子のアガロースゲル電気泳動

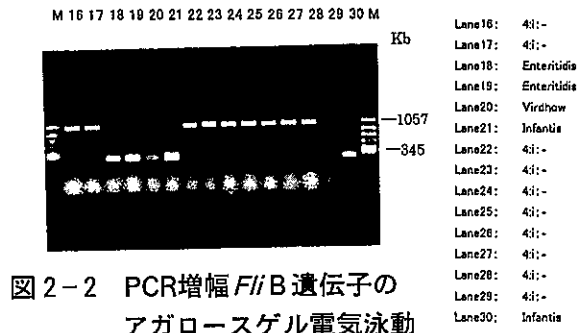


図2-2 PCR増幅FliB遺伝子のアガロースゲル電気泳動

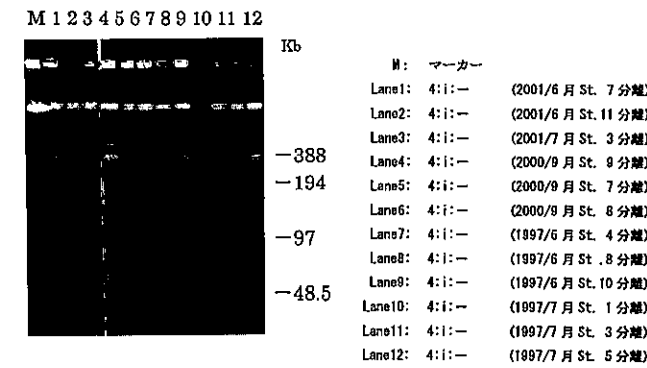


図3 サルモネラ(4:i:-)のBln I処理DNAのPFGEパターン

い。表2に定点別の年次ごとのサルモネラ分離状況を示した。いずれの定点においても陽性率は1990年までの前半12年間で高く(平均56.0%)、後半11年間では陽性率の最も高かった1998年(58.3%)を除き、その平均は30.1%と低かった。

表3、4に過去23年間に分離されたサルモネラの主な血清型の年次分布を示す。河川からのサルモネラの分離株総数は23年間で993株であった。しかし、その多く(793株, 80.0%)は1990年以前の12年間に分離され、1991年以後の11年間の分離数は200株と1990年以前の分離数のおよそ25%であった。この分離数は採水の定点数、回数およ

表2. 定点別・年次別サルモネラ分離状況

定点	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	小計 ³⁾	(%)
I-1	7/7 ¹⁾	10/12	8/8	5/6	6/6	6/6	5/6	2/6	1/6	0/6	4/6	1/6	55/81 (67.9)	2/6	1/6	0/6	4/7	3/6	1/4	4/12	2/3	0/4	2/6	2/6	21/66 (31.8)
I-2	7/7	10/12	8/8	6/6	6/6	4/6	6/6	3/6	4/6	2/6	4/6	3/6	63/81 (77.8)	1/6	1/6	1/6	4/7	3/6	0/1	3/12	2/3	0/4	2/6	2/6	10/32 (31.2)
I-3	7/7	11/12	7/8	4/6	5/6	3/6	5/6	3/6	0/6	3/6	3/6	4/6	61/81 (75.3)	0/6	2/6	0/6	4/7	4/6	3/12	2/3	0/4	2/6	2/6	19/62 (30.6)	
I-4	6/7	7/12	4/8	4/6	3/6	3/6	5/6	2/6	3/6	2/6	3/6	4/6	46/81 (56.8)	2/6	0/6	1/6	2/7	2/6	1/5	4/12	1/3	1/4	3/6	2/6	19/67 (28.4)
I-5	4/7	6/12	2/8	4/6	4/6	3/6	5/6	4/6	2/6	0/6	3/6	3/6	40/81 (49.4)	3/6	2/6	3/6	2/7	3/6	1/5	4/12	1/3	1/4	2/6	1/6	18/48 (37.5)
I-6	5/7	10/12	7/8	3/6	4/6	3/6	5/6	2/6	0/6	2/6	2/6	1/6	44/81 (54.3)	0/6	1/6	1/6	3/7	3/6	2/12	1/3	1/4	2/6	1/6	1/6	15/54 (27.8)
M-1	5/7	11/12	6/8	2/6	4/6	4/6	3/6	3/6	4/6	3/6	3/6	3/6	59/81 (72.8)	1/6	2/6	1/6	4/7	2/6	0/5	4/12	2/3	0/4	2/6	5/6	23/67 (34.3)
M-2	3/7	8/12	6/8	4/6	4/6	3/6	5/6	2/6	2/6	4/6	1/6	2/6	47/81 (58.1)	2/6	0/6	1/6	2/7	2/6	0/5	4/12	1/3	1/4	3/6	4/6	23/67 (34.3)
M-3	6/7	9/12	8/8	4/6	4/6	2/6	3/6	4/6	2/6	2/6	2/6	1/6	44/81 (54.3)	3/6	2/6	1/6	2/7	2/6	1/5	4/12	3/3	0/4	2/6	2/6	19/67 (28.4)
A-1	7/7	9/12	5/8	5/6	2/6	3/6	5/6	4/6	2/6	4/6	6/6	3/6	55/81 (67.9)	2/6	0/6	1/6	2/7	2/6	0/5	3/12	2/3	0/4	2/6	2/6	16/67 (23.9)
D-1													19/53 (35.4)	1/6	1/6	2/6	1/7	2/6	0/5	3/12	2/3	0/4	2/6	2/6	16/67 (23.9)
合計	57/70	91/120	67/80	41/60	43/63	42/66	53/66	30/65	22/66	24/66	32/66	28/66	527/863 (61.1)	17/66	12/66	12/66	30/77	28/66	5/40	32/108	14/24	3/32	18/48	20/48	90/598 (31.8)
陽性率(%)	81.4	75.8	76.3	68.3	68.3	63.6	80.3	46.2	33.3	36.4	48.5	42.4	25.8	18.2	18.2	39.6	42.4	10.0	29.6	58.3	9.4	37.5	41.7	31.8	

1)サルモネラ陽性検体数/採水(検査)回数
2)1979~1990年の合計
3)1991年~2001年の合計

表3. 富山市内河川からのサルモネラ検出状況

血清型	1979	1980	小計 ²⁾	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	小計	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	小計	2001	小計	合計
S.Paratyphi B	5	1	20	25	8	15	20	17	19	3	1	3	86	3	1	4	1	1	1	1	4	1	10	10	10	10	121	
S.Typhimurium	13	11	24	9	1	4	8	2	6	2	2	2	2	34	2	3	1	4	1	4	1	5	2	1	19	5	5	82
S.Infantis	4	20	24	14	1	1	6	3	2	1	2	1	2	31	1										3	5	3	63
S.Agona	1	2	3	1	8	2	4	5	5	5	2	27	2	27	2	1	1	1	1	4	1	4	8	17	2	2	49	
S.Enteritidis	2	3	5	9	6	3	2	2	4	5	4	3	27	33	3	1	4	4	4	3	1	1	1	12	12	12	44	
S.Typhi	1	1	12	5	1	1	2	4	2	2	1	3	21	21	1	2	4	9	2	1	1	1	0	0	0	0	34	
38z10z53	12	12	4	5	2	4	2	1	1	1	1	3	5	11	2	4	3	9	2	1	1	18	18	18	18	18	32	
S.Tennessee	3	1	4	7	2	1	2	2	1	1	1	2	16	16	3	3	5	5	5	4	4	12	3	3	3	3	35	
S.Thompson	3	1	4	7	2	1	2	2	1	1	1	2	14	14	1	1	1	5	5	11	11	18	18	18	18	32		
UT	0	0	2	0	2	5	2	2	2	2	2	2	14	14	1	1	1	5	5	11	11	18	18	18	18	32		
others	78	64	142	38	20	36	38	31	25	5	20	25	12	250	14	10	4	6	1	1	13	10	0	6	65	11	11	468
合計	118	125	243	99	63	73	73	77	39	20	30	45	31	550	19	20	13	28	12	6	36	21	2	19	176	24	24	993

1):サルモネラ分離菌株数
2):年代ごとの分離菌株数合計

表4. ヒトからのサルモネラ検出状況

血清型	1979	1980	小計 ²⁾	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	小計	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	小計	2001	小計	合計
S.Enteritidis	1	4	5	46	1	4	1	1	3	1	7	26	4	94	16	20	41	150	18	54	40	44	39	37	459	26	26	594
S.Typhimurium	1	21	22	12	4	6	8	12	6	9	5	10	7	79	2	12	7	18	8	4	4	10	8	4	77	5	5	183
S.ParatyphiB	11	21	32	7	11	16	11	13	5	5	22	6	2	98	5	12	1	2	2	1	1	5	1	5	29	29	159	
S.Infantis	3	11	14	3	1	1	7	7	2	3	2	3	7	31	2	2	1	3	4	19	1	7	2	41	2	2	88	
S.Typhi	12	7	19	15	9	5	9	2	3	4	1	3	5	56	5	3	1	3	1	2	2	1	1	11	11	86		
S.Litchfield	1	8	9	5	3	4	9	13	6	5	6	2	3	56	2	2	4	3	1	1	1	1	1	16	16	81		
S.Monteideo	0	0	30	18	3	3	1	1	1	1	1	2	2	57	2	1	3	5	2	2	2	2	18	1	1	76		
S.Braenderup	3	3	3	1	4	1	5	3	3	3	3	17	3	11	3	4	1	4	1	2	1	1	25	25	45			
S.Havana	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	38	
S.Tennessee	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	5	5	3	3	3	11	14	14	14	28		
others	0	12	12	12	15	14	12	18	16	14	18	25	28	172	14	11	13	39	25	30	16	23	31	8	210	19	19	413
合計	29	89	118	101	44	85	76	74	44	80	61	74	58	697	54	72	76	230	61	119	62	81	93	51	899	67	67	1781

1):サルモネラ分離菌株数
2):年代ごとの分離菌株数合計

び期間が異なるので単純に比較できないが、定点数および年間採水回数が同じである1981～1985年の5年間で1991～1995年の5年間で比較すると、分離数はそれぞれ385株、92株と、後方で明らかに減少している。しかし、詳細にみると1981年～1990年においても1986年からその分離数は著しく減少している。この原因は既報 [7] にもあり、他の河川から取水し、その流量を増加させたことで河川が浄化されたことによると思われる。また、富山市周辺部における下水道の普及も影響したものと思われる。

血清型をみると全期間を通じて分離数は *S. Paratyphi B* (121株, 12.0%), *S. Typhimurium* (82株, 8.0%), *S. Infantis* (63株, 6.0%) の順に多かった。しかし、1991年から2001年まで、最近の11年間に限定すると、分離数は *S. Typhimurium* が19株と最も多く、次いで *S. Tennessee* (18株), *S. Agona* (17株) の順に多かった。この *S. Tennessee*, *S. Agona* の2血清型はいずれもヒトから多く分離される血清型として認めることはできなかった。

ヒトから分離されたサルモネラについてみると、2001年にヒトから分離され、当所へ送付されたサルモネラは12血清型67株で、その血清型別の分離数は、*S. Enteritidis* が26株、*S. Tennessee* が14株、*S. Typhimurium* が5株、その他の血清型がそれぞれ1～2株であった。*S. Tennessee* 12株はすべて一集団事例からの分離であった。23年間の分離総数は1,781株で、分離数は1994年(230株)、1996年(119株)、1981年(101株)の順に多かった。いずれの年次も *S. Enteritidis* の分離数が多いが、1994年の分離数には *S. Enteritidis* による大規模な食中毒が反映されている。23年間の血清型別の分離数では *S. Enteritidis* (558株, 32.8%) が最も多く、次いで *S. Typhimurium* (178株, 10.5%), *S. Paratyphi B* (159株, 9.4%) の順であった。*S. Enteritidis* については、1989年から増加し、全国統計と同様の傾向を認めた [1]。 *S. Typhi* については、1980年代の分離数は22株であったが、1990年以降の10年間は1株も分離されなかった。河川からの *S. Typhi* 分離についてもこれと同様

の傾向がみられた。このことから、河川から分離されたサルモネラはヒトのサルモネラ感染症に密接に関連していると思われる。しかし、*S. Tennessee*, *S. Agona* の2血清型をはじめとするいくつかの血清型のサルモネラでは、近年、河川からの分離頻度とヒトからの分離頻度があまり一致しなかった。

1980～2001年に分離された主な血清型のサルモネラの薬剤耐性を表5に示した。2001年の耐性菌の頻度は、*S. Typhimurium* が10/10株(100%)と高く、次いで *S. Enteritidis* が20/27株(74.0%)と高かった。23年間全体でみても、耐性株の頻度は *S. Enteritidis* において306/618株(49.5%)と最も高く、ついで *S. Typhimurium* が112/270株(41.5%)と高かった。年代別にみると、1980年代が130/620株(21.0%)であったのに対し、1990年代は343/888株(38.6%)とその値は1980年代より1990年代でおよそ2倍と高かった。また、全期間を通じて、河川由来よりヒト由来において耐性株の頻度が高かった。この傾向は耐性株の頻度の最も高い *S. Enteritidis* において特に強く、耐性菌の頻度は1980年代で11.5%であったのに対し、1990年代ではおよそ4倍の54.1%と後方で高く、また、ヒト由来株において耐性株の頻度が高かった。これらの事実をあわせると近年ヒトから分離されるサルモネラは、抗生剤処理をより多く受けていると思われる。例外的に、*S. Typhimurium* における耐性菌の頻度は年代・由来に関係無く、40～50%と高いが、その理由は明確ではない。

薬剤耐性パターンについてみると、*S. Typhimurium* において30パターンと最も多く、単独薬剤耐性株の頻度が他の血清型に比べて低かった(12.5%)。一方、*S. Enteritidis* では、11の薬剤耐性パターンが認められ、その中でS(ストレプトマイシン)単独耐性が最も多く、ついでS・Te(テトラサイクリン)2剤耐性が多かった。*S. Enteritidis* の耐性株の9割以上がこの2パターンのどちらかであった。

近年、富山市内の河川のサルモネラによる汚染は非常に低下している。また、河川から分離されるサルモネラの血清型はヒトから分離される血清

表5. 主な血清型のサルモネラの薬剤耐性パターン

血清型	耐性薬剤名	1980年代		1990年代		2001年		合計	
		ヒト	河川	ヒト	河川	ヒト	河川	ヒト	河川
S.Enteritidis (618) ¹⁾	ABPC			1				1	
	ABPC,CP,NA,TC			2				2	
	ABPC,KM,SM,TC			1				1	
	ABPC,SM			1				1	
	ABPC,SM,TC			1	1			1	1
	ABPC,CP,TC			1				1	
	CP,GM					1		1	
	NA					7	1	7	1
	SM	12	2	217	2	4		233	4
	SM,TC			41	4	7		48	4
	TC	1		1				2	
合計	13	2	268	7	19	1	298	10	
S.Infantis (150)	ABPC,CP,KM,SM,TC		1					1	1
	ABPC,CP,KM,TC	1						1	
	ABPC,CF		1					1	
	ABPC,SM,TC	1						1	
	CP,CF,KM,SM,TC		1					1	
	CP,GM					1		1	
	KM,SM,TC			2	1			2	1
	SM	1			1			1	1
	SM,TC			2		1	2	3	2
	TC		1				1	1	2
合計	3	4	4	2	2	3	9	9	
S.Litchfield (112)	ABPC	1						1	
	ABPC,KM,SM,TC	1						1	
	ABPC,SM	1						1	
	ABPC,SM,TC	1						1	
	ABPC,TC	1	2					1	2
	CP,SM,TC	1	2	1				2	2
	CP,TC	6	4					8	4
	CPABPC,SM,TC,			1				1	
	SM			1				1	
	SM,TC	1						1	
	TC	6	1	1				9	1
合計	23	9	4				27	9	
S.Paratyphi B (280)	ABPC			1				1	
	ABPC,CP,KM,SM,TC	1						1	
	ABPC,CP,KM,TC	1						1	
	ABPC,CP,SM,TC	2		1				3	
	ABPC,CET,NA			1				1	
	ABPC,NA,SM			1				1	
	CP,SM,TC	2						2	
	CP,TC	4						4	
	CF,NA,SM			1				1	
	KM		1						1
	NA	1		1				2	
	NA,SM,TC	1						1	
	SM		1						1
	SM,TC	2		1				3	
TC	6	2	1				10	2	
合計	23	4	8				31	4	
S.Typhimurium (270)	ABPC	1		1				2	
	ABPC,CP,CL,KM,SM,TC	1						1	
	ABPC,CP,KM,SM,TC	13	3	7	1			20	4
	ABPC,CP,KM,TC	1		2				3	
	ABPC,CP,NA,SM,TC			3				3	
	ABPC,CP,SM			1				1	
	ABPC,CP,SM,TC	2	1	6	6			8	7
	ABPC,CP,TC			2				2	
	ABPC,GM,KM,SM,TC			5				5	
	ABPC,KM,NA,SM,TC			1				1	
	ABPC,KM,SM			1				1	
	ABPC,KM,SM,TC	2						2	
	ABPC,SM,TC	2	2					2	2
	CP,CL,KM,SM,TC		4					4	4
	CP,KM,SM,TC		2	1				1	2
	CP,KM,TC			2	1			2	1
	CP,NA,TC			1				1	
	CP,SM,TC					3		3	
	CP,TC	3						3	
	CF,KM,SM			1				1	
	CL,TC				1				1
	CP,CF,S,Te						1		1
	CP,SM,TC			2			1	2	1
	KM			2				2	
	KM,SM,TC	2						2	
	KM,TC	1			2			1	2
	NA,SM,TC					1			1
SM	1						1		
SM,TC	4		2		1		7	1	
TC	2	3	2		1	2	5	4	
合計	35	15	42	11	6	4	62	30	

()¹⁾: 調べた株数

型をあまり反映しなくなっている。これらのことは、下水道の普及等環境整備によるところが大きいと考えられる。しかし、依然として河川のサルモネラ汚染が認められ、欧米からきたと思われる4:i:-が分離されている。河川水におけるサルモネラを調べることによって、動物あるいはヒトのサルモネラ感染症流行の実態が明らかになるのではないかと思われる。これからも環境水中のサルモネラ調査を続けたい。

文 献

1. 国立感染症研究所編, 病原微生物検出情報(2000) 8, 1-3.
2. 厚生省生活衛生局食品保健課, 食品衛生研究(2001). 50, 117-195.
3. 金子通治, 高橋照美, 野田裕之, 浅川洋美, 高橋 要, 菊島慶彦, 大橋 衛, 山口幸久, 寺嶋 淳, 泉谷秀昌. (1999), 日本食品微生物学会雑誌, 1, 51-56.
4. 磯部順子, 田中大祐, 細呂木志保, 井山洋子(1996), 富山衛研年報, 19, 111-116.
5. 磯部順子, 田中大祐, 細呂木志保子(1998), 富山衛研年報, 21, 133-140.
6. J.Terajima, A.Nakamura and H.Watanabe(1998). *Epidemiol.Infect*, 120, 223-229.
7. M.Aurora.Echeite, Silvia.Herrera AND Miguela. Usera.(2001). *J.Clinical Micro-biology*, 39, 2981-2983.
8. M.Aurora.Echeita, Ana.Aladuenaa, Susana. Cruchaga, and Miguela.Usera.(1999). *J.Clinical Microbiology*, 37, 3425.
9. Loli C.Pritchett, Michael E.Konkel, John M.Gay and Thomas E.Besser. (2000). *J.Clinical Microbiology*, 38, 3484-3488.

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 清水美和子 細呂木志保
磯部順子 刑部陽宅 香取幸治
林喜代志¹ 中村政雄² 遠藤美代子³

Serotypes and Drug Susceptibilities of the Hemolytic Streptococci
in Toyama Prefecture

Daisuke TANAKA, Miwako SHIMIZU, Shiho HOSOROGI,
Junko ISOBE, Yotaku GYOBU, Koji KATORI, Kiyoshi HAYASHI¹,
Masao NAKAMURA² and Miyoko ENDO³

要旨 富山県内で分離された臨床材料由来溶血レンサ球菌について、A群及びB群の菌株の血清型、薬剤感受性を調べ、以下の結果を得た。

1. 2001年に分離されたA群139株をT型別すると、多い順にT4型35株(25.2%)、T1型32株(23.0%)、T12型12株(8.6%)、T25型11株(7.9%)、TB3264型11株(7.9%)であった。1980～2001年の間に分離されたA群のT型別分布の変遷を見ると、T12型、T4型、T1型の検出率が長期間高かった。
2. 2001年に分離されたB群177株を型別すると、多い順にNT6型60株(33.9%)、JM-9型33株(18.6%)、Ib型27株(15.3%)、V型16株(9.0%)であった。
3. 2000年に分離されたA群27株、B群16株、C群3株、G群4株、合計50株について薬剤感受性を調べたところ、A群ではテトラサイクリン、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、リンコマイシンに対して一部の菌株が耐性であった。B群ではテトラサイクリンとリンコマイシンに対して一部の菌株が耐性であった。被検菌株数は少ないが、C群では耐性菌が認められず、G群では1株がテトラサイクリンに耐性であった。

溶血レンサ球菌(溶連菌)は、扁桃炎、中耳炎、皮膚感染症、猩紅熱、リウマチ熱、腎炎など様々な疾患の原因となることが知られている。

ここでは、このような溶連菌の流行の実態と治療に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血清型、薬剤感受性を調べた。

材料と方法

被検菌は県内2か所の公立病院で分離された溶連菌を用いた。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)、セファレキシン(CEX)、

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

セフジトレン (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剤について微量液体希釈法で行った。

結果と考察

2001年に分離されたA群139株のT型別結果をTable 1に示す。多い順にT4型35株 (25.2%), T1型32株 (23.0%), T12型12株 (8.6%), T25型11株 (7.9%), TB3264型11株 (7.9%)であった。分離菌株数は1~3月と5~6月に多かった。

1980~2001年の22年間に分離されたA群のT型別分布をTable 2に示す。22年間に型別した2779株についてみると、多い順に、T12型727株 (26.2%), T4型478株 (17.2%), T1型372株 (13.4%), T3型218株 (7.8%), T28型184株 (6.6%), T6型139株 (5.0%), TB3264型112株 (4.0%), T2型70株 (2.5%), T13型70株 (2.5%), T18型48株 (1.7%)であった。T12型, T4型, T1型, T28型,

TB3264型は長期間連続して検出されていた。一方, T3型, T6型, T2型, T13型, T18型は検出が長期間持続せず, 流行の波が見られた。T型の年次分布の傾向について, 同様な結果が全国集計でも報告されている [1]。近年は, T1型, T4型, T25型, TB3264型が増加傾向, T2型とT6型が減少傾向となっている。

2001年に分離されたB群177株の型別結果をTable 3に示す。多い順にNT6型60株 (33.9%), JM9型33株 (18.6%), Ib型27株 (15.3%), V型16株 (9.0%)であった。

2000年に分離された溶連菌50株について実施した薬剤感受性試験の結果をTable 4に示す。MIC値が16 μ g/ml以上を耐性とする, A群27株の場合, TCに対し18.5% (T4型3株, T13型2株, 合計5株), EMに対し3.7% (T12型1株), CAMに対し3.7% (T12型1株), LCMに対し3.7% (T12型1株)が耐性であった。B群16株の場合には, TCに対し25.0% (II型1株, III型2株, V型1株, 合計4株), LCMに対し12.5% (Ib型1株, II型1株, 合計2株)が耐性であった。菌株数は少ないが, C群3株では耐性菌は認められず, G

Table 1. Monthly Distribution of T Types of Clinical Group A Streptococci in 2001

T type	No. of Isolates												Total
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
T-1	1	2	12	2	3	4	1	2		3	1	1	32 (23.0%)
T-2	1				1								2 (1.4%)
T-3								2		3	1	1	7 (5.0%)
T-4	2	5	4	1	5	4		1	1	1	3	8	35 (25.2%)
T-6						1							1 (0.7%)
T-8									1				1 (0.7%)
T-9	1					1					1		3 (2.2%)
T-11		1					1						2 (1.4%)
T-12	1	1	3		1			2		4			12 (8.6%)
T-13													0 (0.0%)
T-18							1						1 (0.7%)
T-22			1										1 (0.7%)
T-23													0 (0.0%)
T-25	1	1	2	1		1		1	2	1		1	11 (7.9%)
T-28	5	1		1			1		1				9 (6.5%)
T-B3264	1	2	3		2	2	1						11 (7.9%)
T-Imp. 19													0 (0.0%)
T-5/27/44		1		1	1								3 (2.2%)
T-14/49													0 (0.0%)
Untypeable	1		2			2		2				1	8 (5.8%)
Total	14	14	27	6	13	15	5	10	5	12	6	12	139 (100%)

Table 2. T Type Distribution of Clinical Group A Streptococci in Toyama between 1980 and 2001

Year	T type																B3264 Imp.	19	5/27/44	14/49	UT**	Total			
	1	2	3	4	6	8	9	11	12	13	18	22	23	25	28										
1980	9*		1	6	33				97						1	4								14	165
1981	29			4					29						2									27	97
1982	20			2					27	4					3									9	76
1983	2			69					41	22					1									10	162
1984	6		8	30					42	9					11	6								11	125
1985	3		55	26	1				3	31	8	1	1		10	3	1	1						5	143
1986	1		64	27	1	6			11	125	8	8	1		15									9	277
1987	29		13	44	17	1			5	69	4	22			22	2							1	15	244
1988	66		2	43	15	1			1	14		7			6									24	179
1989	11			46	29				4	8	2	2			18	8								22	150
1990	14		1	26	8			1	3	22		1			16	3								23	118
1991	20			20			1	3	4	51	1				12	15							2	9	138
1992	21		14	19			1		2	6	3	4			4	15								13	102
1993	18			21	18		2	1	2	14					6	6								9	97
1994	12		17	14			1		1	34		2			7	3								6	97
1995	8		1	12	19					9					5	3								4	61
1996	7	31	2	4			1	2	11	1					5	7								8	79
1997	32	18		4	9			2	15	1					9	2								6	100
1998	9	13	1	10	22				25	1				2	3	5	1							5	95
1999	5	4		3	3			1	1	28	2				3	5	3								58
2000	18	1		9					17	4					7	8	10							3	77
2001	32	2	7	35	1	1	3	2	12			1	1		11	9	11						3	8	139
Total	372	70	218	478	139	15	10	45	727	70	48	10	0	26	184	112	7	6	2	240	2779				
	13.4%	2.5%	7.8%	17.2%	5.0%	0.5%	0.4%	1.6%	26.2%	2.5%	1.7%	0.4%	0.0%	0.9%	6.6%	4.0%	0.3%	0.2%	0.1%	8.6%	100.0%				

*; No. of Isolates, **: Untypeable

Table 3. Monthly Distribution of Types of Group B Streptococci in 2001

Type	No. of Isolates												Total	
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec		
I a		2		2	1	1	2	2			1	1	12	(6.8%)
I b	3	3	2	3	2		2	2	2	2	4	2	27	(15.3%)
II					1			2			1	1	5	(2.8%)
III			2	1					1	1		1	6	(3.4%)
IV								1					1	(0.6%)
V	3	3	1			2	1	2	1		1	2	16	(9.0%)
NT6	3	4	8	8	4	4	4	4	10	7		4	60	(33.9%)
JM9	3	3	8	3			2	1	1	5	1	6	33	(18.6%)
7271				1				1					2	(1.1%)
Untypeable			3	1	2	3	2		1	1	1	1	15	(8.5%)
Total	12	15	24	19	10	10	13	15	16	16	9	18	177	(100%)

群では 4 株の内 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, CD
TR) に対しては、耐性菌は認められなかった。

文 献

1. 国立感染症研究所編 (2000). 病原微生物検出情報
月報, 21巻11号, 240-241.

Table 4. Antibiotic Susceptibilities of Hemolytic Streptococci in 2000

Group	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)														
		0.0075	0.015	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	64>
A	ABPC	3*	24													
	CFDN	26	1													
	CEX						3	24								
	CDTR	27														
	TC					4	15	2				1		3	2	
	CP										13	14				
	EM				21	3				2						1
	CAM			9	15	1	9	16		2			1**			
	LCM				1	14	1									1
B	ABPC			1	14	1										
	CFDN		1	15												
	CEX								1	13	2					
	CDTR		5	11										1	3	
	TC						5	7								
	CP									7	7	2				
	EM				5	9						2				
	CAM			1	9	4				1	1					
	LCM						5	9								2
C	ABPC		2		1											
	CFDN		2	1												
	CEX							2		1						
	CDTR		2	1												
	TC						1	1	1							
	CP									1	2					
	EM				1	2										
	CAM				3											
	LCM						2	1								
G	ABPC		4													
	CFDN		4													
	CEX						1	3								
	CDTR	2	2													
	TC						1	1			1	1			1	
	CP										1	3				
	EM				2	2										
	CAM			1	3											
	LCM						4									

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

健康児童の咽頭溶血レンサ球菌保菌状況

田中大祐 磯部順子 細呂木志保 清水美和子
永井美之 田中桂子¹ 田中有易知²

Distribution of Pharyngeal Hemolytic Streptococci among Healthy Children

Daisuke TANAKA, Junko ISOBE, Shiho HOSOROGI, Miwako SHIMIZU
Yoshiyuki NAGAI, Keiko TANAKA¹ and Yuichi TANAKA²

要旨 平成14年1月から2月の間に富山県内の東西2ヶ所（黒部市，小矢部市）の保育園で，2～6才の児童88名を対象に，咽頭の溶血レンサ球菌保菌状況を調べた。その結果，県東部にある黒部市内の保育園の児童48名中3名（6.3%）が菌陽性で，検出菌はA群T3型1株，A群T4型1株，A群T28型1株であった。また，県西部にある小矢部市内の保育園の児童40名中10名（25.0%）が菌陽性で，検出菌10株はすべてA群T12型であった。

溶血レンサ球菌（溶連菌）による感染症の流行の把握及び予防を目的として，富山県では健康者と患者について本菌の分布を調べてきている。昭和56年頃には溶連菌による感染症の集団発生施設の継続調査，平成2年から6年までは，小児，老人の腸管中の保菌調査，平成7年以降は小児の咽頭溶連菌保菌状況調査を行ってきている。ここでは，平成13年度の調査結果を報告する。

調査対象および検査方法

調査は県内の東西2ヶ所の保育園で行った。県東部の黒部市M保育所では，平成14年2月6日に，2～6才児の48名を，県西部の小矢部市T保育所では，平成14年1月17日に，2～5才児の40名を対象として調べた。児童の咽頭両側をぬぐった綿棒は血液寒天平板へ直接塗抹した後，SEB培地

に投入した。直接塗抹した血液寒天平板は37℃で一夜培養した後，溶血コロニーを釣菌し，常法[1]に従い溶連菌の検査を行った。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て行い，A群のT型別及びB群の型別はそれぞれの型別用抗血清（デンカ生研）を用いてスライド凝集反応にて行った。SEB培地は37℃で一夜増菌培養後，その培養液を血液寒天平板に塗抹し，その後は直接塗抹した場合と同様に検査を行った。

結果および考察

平成13年度の調査における児童の溶連菌保菌状況を表1に示す。M保育所の園児では48名中3名（6.3%）が菌陽性であった。検出菌はA群T3型1株，A群T4型1株，A群T28型1株であり，そ

1 新川保健所 2 砺波保健所

の菌型は様々であった。著者らは富山県内において患者から分離された菌株の調査を行っている。これまでの成績を見ると、A群T3型菌は、平成9年～平成12年はわずか1株しか検出されていなかったが、平成13年（2001年）に入って7株検出された。今回のM保育所の調査では、A群T3型菌を保菌している健康児童がいることが確認された。

T保育所の児童では40名中10名（25.0%）が菌陽性であった。4才児、5才児の菌陽性率は高く、それぞれ30%、60%であった。検出菌10株はすべてA群T12型であった。平成13年の富山県の患者分離菌株に占めるT12型の割合も8.6%と比較的多かった。

今年度を含め過去7年間の調査では、保育園児の溶連菌保菌率は2～36%であった（表2）。今

年（平成13年）度のT保育所の保菌率25.0%はこれまでの調査の中で比較的高かった。平成13年の感染症サーベイランスのデータによれば、県下定点から報告された溶連菌感染症患者発生数は2,769名で、前年比41.7%増となっている。全国的にも、近年報告数が増加傾向にあるが、これは検査キットの普及などで診断方法が容易になったことによるのではないかという考えも示されている。従って、現段階では、小矢部市において保菌率が高かった結果を直接、富山県における感染者数増加と関連付けることはできない。

溶連菌感染症患者の背後に多くの保菌者がいると通常いわれており、今後も児童の溶連菌保菌率の増減及び検出菌の菌型を明らかにし、患者発生防止に役立てる必要がある。

表1. 児童の咽頭溶連菌保菌状況（平成13年度）

施設名	年齢	検体(児童)数	菌陽性者数	菌陽性率(%)	検出菌の血清型(菌株数)
M保育所 (黒部市)	2	4	0	0.0	
	3	16	1	6.3	A群T28型(1)
	5	3	0	0.0	
	6	25	2	8.0	A群T3型(1)、A群T4型(1)
	合計	48	3	6.3	A群T3型(1)、A群T4型(1)、A群T28型(1)
T保育所 (小矢部市)	2	5	0	0.0	
	3	15	1	6.7	A群T12型(1)
	4	10	3	30.0	A群T12型(3)
	5	10	6	60.0	A群T12型(6)
	合計	40	10	25.0	A群T12型(10)

表2. 平成7年度～13年度の調査における児童の溶連菌保菌状況

年度	施設	検体(児童)数	菌陽性者数	菌陽性率(%)	検出菌の血清型(菌株数)
平7	魚津市M保育園	46	1	2.2	B群NT6型(1)
	小矢部市T保育所	43	1	2.3	C群(1)
平8	魚津市A保育園	52	3	5.8	A群T1型(1)、B群I b型(1)、B群NT6型(1)
	小矢部市T保育所	35	1	2.9	C群(1)
平9	魚津市A保育園	53	7	13.2	A群T1型(2)、G群(5)
	小矢部市T保育所	34	3	8.8	A群T28型(3)
平10	魚津市H保育園	35	2	5.7	A群T6型(1)、G群(1)
	小矢部市T保育所	29	6	20.7	A群T4型(4)、A群T22型(2)
平11	魚津市H保育園	50	2	4.0	B群NT6型(2)
	小矢部市T保育所	38	4	10.5	A群T4型(2)、G群(2)
平12	黒部市O保育園	58	5	8.6	A群T1型(2)、B群I a型(1)、B群I b型(1)、G群(2)
	小矢部市T保育所	25	9	36.0	A群T2型(8)、B群NT6型(1)
平13	黒部市M保育園	48	3	6.3	A群T3型(1)、A群T4型(1)、A群T28型(1)
	小矢部市T保育所	40	10	25.0	A群T12型(10)
合計		586	57	9.7	A群(38) [T1型(5)、T2型(8)、T3型(1)、T4型(7)、T6型(1)、T12型(10)、T22型(2)、T28型(4)] B群(8) [I a型(1)、I b型(2)、NT6型(5)] C群(2) G群(10)

* ; 混合保菌者の菌株を含む

平成14年10月1日

謝 辞

本調査を実施するにあたり、検体採取にご協力を頂いた保育園の関係各位に感謝いたします。

文 献

1. 日本公衆衛生協会編（1987）微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版 F2～F30

河川水，土およびヒト糞便からの低温性大腸菌群の 分離と分析

刑部陽宅 清水美和子 田中大祐 細呂木志保
磯部順子 香取幸治 永井美之

Isolation and Analysis of Psychrophilic Coliforms
from River Water, Soil and Human Feces

Yotaku GYOBU, Miwako SHIMIZU, Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI,
Junko ISOBE, Koji KATORI and Yoshiyuki NAGAI

要旨 湧き水，井戸水並びに食品に分布する低温性大腸菌群の由来に関する知見を得るため，河川水，畑の土及びヒト糞便における低温性大腸菌群の分布をBGLB培地を用いて調べた。その結果，河川水，土，ヒト糞便からの低温性大腸菌群の分離率は順に，22/25(88%)，16/22(73%)，69/120(58%)であった。分離菌137株は7属12菌種以上に分けられ，全体の78%を*K.oxytoca*，*K.pneumoniae*，*C.freundii*が占めた。河川水から*K.oxytoca*と*K.pneumoniae*，土から*K.oxytoca*と*C.freundii*，ヒト糞便から*K.oxytoca*が多く分離された。*Enterobacter*属はヒトから分離され河川水と土からは分離されなかった。*K.oxytoca*，*K.pneumoniae*，*C.freundii*合計109株について*lacZ*遺伝子保有， β -glucuronidase産生，44.5℃発育，5℃発育を調べると，陽性率は順に，47%，0.9%，8.2%，100%であった。

以上の結果は湧き水，井戸水，食品から良く分離される低温性大腸菌群の*K.pneumoniae*，*K.oxytoca*，*C.freundii*は河川水や畑の土に常在していること，湧き水の衛生確保のための大腸菌群検査では，特異酵素基質法を採用した方が良いことを示している。

高畑ら [1] は東京都内の自家用井戸水から分離された大腸菌群を分析したところ，*K.pneumoniae*，*K.oxytoca*の割合が高かったと報告している。著者らは野菜，食肉の大腸菌群を調べたところ，分離菌は17菌種以上に分類されるが，高畑ら [1]と同様，*K.pneumoniae*，*K.oxytoca*あるいは*C.freundii*が多く，更に分離大腸菌群の多くは44.5℃で発育しないで，7℃で発育することを認めた(未発表)。*K.pneumoniae*，*K.oxytoca*，*C.freundii*をはじめとする大腸菌以外の大腸菌群が検出され，行政的に飲用不適と判定される井戸水は多い。し

かし，このような大腸菌群は自然界にも分布するので，井戸水や食品からのこのような菌を検出した時，糞便汚染を意味するものと判断してよいかどうか問題を残している。特に，近年のように環境が整備され，湧き水等おいしい水が求められる科学技術の発達した時代背景では，ヒト糞便に由来しない非病原性の大腸菌群は水の規格基準から除外することについての検討があってもよいのではないかと考えられる。しかし，そのために必要なデータの蓄積は充分でない。このことから，本研究では，*K.pneumoniae*，*K.oxytoca*，*C.freundii*

等を含む低温発育性大腸菌群の河川水、土およびヒト糞便における分布調査を行った。

検査材料と方法

1) 材料：土は富山市と小杉町地内の野菜生産団地或いは自家菜園、計22個所で、河川水は射水郡、富山市、滑川市、中新川郡、負婦郡を流れる計25の中小河川で採取した。一方、ヒト糞便は赤痢菌、腸管出血性大腸菌を目的として保健所へ提出された給食従事者の便を目的菌検査終了後用いた。

2) 低温発育性大腸菌群の分離：河川水は50mlを3倍濃度のBGLB培地25mlへ、土は約1.5gを10mlのBGLB培地へ接種した。その後、37°C18時間培養し、ガス産生が認められた検体について、その0.2mlを新しいBGLB培地へ接種、7°C7日培養する操作を2回繰り返した。一方、ヒト糞便は約1gを10mlのBGLB培地へ接種し、先ず7°C、10日培養した、その後0.2mlを10mlのBGLB培地へ移植し7°C、10日培養する操作を2回繰り返した。菌分離はいずれの場合にも、分離培地としてEMB培地を用いて行った。1検体あたり形態の異なるコロニーを1～3個鈎菌し、上水試験方法[2]に従いグラム染色、乳糖分解性等を調べ分離菌が大腸菌群であることを確認した。

3) 分離菌の同定：API 20E (Bio-meriu社)によった。

4) 44.5°Cにおける発育

Trypticase Soy Broth (BBL) に菌を接種し、44.5°Cの恒温水槽に48時間おき、発育を判定した。

5) Lac 遺伝子の検出：PCR法で実施した。プライマーはBejら[3]のZR2025,とZL1675を使用し、増幅の条件は95°C1分、1サイクル後、熱変性：94°C1分、アニーリングと伸長：59°C、1.5分、サイクル数：24回とした。また、電気泳動は2%アガロースを使用し、常法により実施した。

6) β-glucuronidase産生

X-GAL培地(日水製薬)に菌を接種し、37°C24時間培養後、紫外線を照射し判定した。

結 果

1. 河川水、土およびヒト糞便からの低温性大腸菌群の分離

Table 1に示すごとく、低温性大腸菌群は河川水から22/25(88%)、土から16/22(73%)、ヒト糞便から69/120(58%)の頻度で分離された。分離率はヒト糞便より河川水の方が高かった。

Table 1. Isolation of Psychrophilic Coliforms from Soil, River Water and Human Feces

Specimens	Isolation of psychrophilic coliform
Soil	16 / 22* (73%)
River water	22 / 25 (88%)
Human feces	69 / 120 (58%)

*No. of positive / No. of sample examined

2. 分離低温性大腸菌群の同定

河川由来34株、土由来21株、ヒト糞便由来82株、合計137株の分離大腸菌群の同定を行った。Table 2に示すごとく、128株は6属11菌種以上に分類され、残る9株(6.5%)は同定出来なかった。河川水由来菌の場合には、*K. oxytoca*が最も多く全体の50%を占め、以下*K. pneumoniae*(21%)、*C. freundii*(9%)の順に多かった。また、土由来菌の場合には、*C. freundii*が48%、*K. oxytoca*が33%と、両菌種で全体の81%を占め、その他の菌は20%以下と少なかった。これに対して、ヒト糞便の場合には、*K. oxytoca*と*C. freundii*がそれぞれ32と30%を占め、次に*K. pneumoniae*が15%と多く、更に、河川水および土由来菌に殆どみられないEnterobacter属の菌が15%の割合で認められた。同定不能の菌の割合は河川水由来で3/34(9%)、土由来で3/21(14%)、ヒト糞便由来で3/82(4%)であった。

Table 3はTable 2の成績に基づいて集計した河川水、土およびヒト糞便からの各菌の分離状況を示す。*K. oxytoca*はヒト糞便、河川水、土のいずれからも比較的良く分離されたが、材料別にみると、ヒト糞便あるいは土より河川水から多

Table 2. Identification of Psychrophilic Coliforms Isolated from River water, Human Feces and Soil

Identification	Source of Strains		
	River water (n=34)*	Human feces (n=82)	Soil (n=21)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	17 (50%)	26 (32%)	7 (33%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7 (21%)	12 (15%)	
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	2 (6%)	2 (6%)	
<i>Citrobacter freundii</i>	3 (9%)	25 (30%)	10 (48%)
<i>Hafnia alvei</i>	1 (3%)	2 (2%)	
<i>Enterobacter agglomerans</i>		1 (1%)	
<i>Enterobacter amnigenus</i>		4 (5%)	
<i>Enterobacter sakazaki</i>		3 (4%)	
<i>Enterobacter sp</i>		2 (2%)	
<i>Salmonella arizonae</i>		2 (2%)	
<i>Escherichia coli</i>	1 (3%)		
Unknown	3 (9%)	3 (4%)	3 (14%)

(n=): No. of isolates examined

Table 3. Isolation Frequency of Species of Psychrophilic Coliforms from River water, Human Feces and Soil

Species	Human feces	River water	Soil
<i>Klebsiella oxytoca</i>	26/120(22%)	17/25 (68%)	7/22 (32%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/120 (10%)	7/25 (28%)	
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	2/120 (2%)	2/25 (8%)	
<i>Citrobacter freundii</i>	25/120 (21%)	3/25 (12%)	10/ 22 (45%)
<i>Hafnia alvei</i>	2/ 120 (2%)	1/25 (4%)	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1/120 (1%)		
<i>Enterobacter amnigenus</i>	4/120 (3%)		
<i>Enterobacter sakazaki</i>	3/120 (3%)		
<i>Enterobacter sp</i>	2/120 (2%)		
<i>Salmonella arizonae</i>	2/ 120 (2%)		
<i>Escherichia coli</i>		1/ 25 (4%)	
Unknown	3/ 120 (3%)	3/ 25 (12%)	3/ 22 (14%)

No. of positive sample / No. of sample examined (%)

く分離された。 *K.pneumoniae* は河川水、ヒト糞便から比較的高い頻度 (10~28%) で分離されたが、土からは分離されなかった。一方、 *C. freundii* はヒト糞便から21%、河川水から12%、土から45%の頻度で分離され、分離率はヒト糞便或いは河川水より土の方が高かった。 *Enterobacter* 属の菌はヒト糞便から10%以上の頻度で分離されたが、河川水と土から分離されなかった。

3. LacZ 遺伝子保有能と β -glucuronidase 産生能
分離頻度の高い *K.oxytoca*, *K.pneumoniae*, *C. freundii* について LacZ 遺伝子保有状況と β -glucuronidase 産生能を調べた。結果は Table 4 に示した。LacZ 遺伝子は *C.freundii* の場合、39株中1株にのみ認められた。しかし、 *K.oxytoca* と *K.pneumoniae* では、河川水およびヒト糞便由来の多く (66~90%) に認められたが、 *K.oxytoca*

土由来7株のすべてに認められなかった。一方、 β -glucuronidase 産生性は調べた *K.oxytoca* 51株、 *K.pneumoniae* 19株、 *C.freundii* 39株、合計109株の内、ヒト由来の *K.pneumoniae* 1株にのみ認められた。

4. 分離 *K.oxytoca*, *K.pneumoniae* および *C. freundii* の44.5°C発育

K.oxytoca と *K.pneumoniae* については供試70株の内、ヒト糞便由来の *K.oxytoca* 1株を除く69株 (99%) が44.5°Cに発育しなかった。 *C.freundii* も、河川水及びヒト糞便由来の場合には、供試79株のすべてが44.5°Cで発育しなかった。しかし、土由来の場合には、河川水およびヒト糞便由来菌と異なり10株の内9株 (90%) が44.5°Cで発育した。なお、7°Cでは Table 5 に示す全ての株が発育した。

Table 4. Distribution of LacZ Gene and β -glucuronidase in Psychrophilic Coliforms Isolated from River Water, Soil and Human Feces

Species	Source	No. of isolates examined	lacZ gene	β -glucuronidase
<i>K.oxytoca</i>	Soil	7	0	0
	River water	17	16 (90%)	0
	Human feces	27	21 (70%)	1 (4%)
<i>K. pneumoniae</i>	River water	7	5 (70%)	0
	Human feces	12	8 (66%)	0
<i>C.freundii</i>	Soil	10	0	0
	River water	3	0	0
	Human feces	26	1 (4%)	0

Table 5. Growth of Psychrophilic Coliforms at 44.5°C

Species	Source	No. of isolates examined	Growth at 44.5 °C
<i>K.oxytoca</i>	Soil	7	0
	River water	17	0
	Human feces	27	1 (4%)
<i>K. pneumophila</i>	River water	7	0
	Human feces	12	0
<i>C. freundii</i>	Soil	10	9 (90%)
	River water	3	0
	Human feces	26	0

考 察

著者らは野菜を中心とした市販食品中の大腸菌群を調べたところ、分離大腸菌群の多くは低温発育性の *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* あるいは *C.freundii* であった (未発表)。本研究では、土、河川から分離された低温性大腸菌の80%以上が *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* あるいは *C.freundii* のいずれかであった。高畑ら [1] は東京都の井戸水から分離される大腸菌群の上位4菌種は *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *C.freundii*, *E.cloacae* で、これらは自然界由来のことが多いと述べている。温血動物の腸管に常在する大腸菌群は一般的に44.5°Cで発育し5°C以下では発育しないことが知られている。事実、Bagleyら [3] は *K.pneumoniae* が EC 培地44.5°Cで発育する頻度はヒトから分離された病原性株で49/58 (84%)、環境由来株で19/120 (16%) であったとしている。これらのことを総合すると、食品から分離される大腸菌群の多くを占める低温発育性の *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *C.freundii* は河川や土に由来するのではないかと考えられる。ヒト糞便からも低温発育性の *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *C.freundii* 等が分離されるが、その分離率は58%と常在菌である大腸菌に比べれば高くないので、野菜等の喫食に伴う単なる通過菌である可能性が考えられる。今後、遺伝子レベルでの確認が必要であろう。

河川や土から分離された低温発育性の *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *C.freundii* の多くは糞便由来であるとは思われない。

堀江ら [5] は山岳地における低温性大腸菌群の分布を調べ、ヒトの生活による汚染がないとみなされる地点から分離される大腸菌群の多くはIMViC型が--++、運動性+で、40°Cに発育しないことから、これらの菌の生息場所は川底の泥土と考察している。著者らの結果と直接比較することは出来ないが、堀江ら [5] の低温性大腸菌群と著者らが分離した低温発育性 *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *C.freundii* のIMViC試験の結果は異なっている。*K.oxytoca*, *C.freundii*に限ると、*K.oxytoca*については、河川水由来株と土由来株の

Lac 遺伝子の保有状況に大きな差があり、*C.freundii*でも、河川由来株と土由来株で44.5°C発育能が異なるので、*K.oxytoca*では土由来と河川由来で、*C.freundii*では土由来と河川由来でそのクローンが大きく異なることが推定される。

Frickeら [6] はBejiらのプライマーを用いたPCR法で大腸菌群のlacZ遺伝子を調べたところ70%が陽性であったと述べている。本研究では、調べた菌株はすべてLactose分解性であったが、lacZ遺伝子保有率は*K.pneumoniae*と*K.oxytoca*とで66~90%、*C.freundii*で2.7%であった。LacZ遺伝子保有とLactose分解性が一致しない理由は明らかでない。

近年、おいしい水が求められるようになり、国が指定した名水になっている湧き水の飲用が少なくない。このような湧き水の衛生確保のため、大腸菌群を調べることが多いが、検査法は上水試験方法 [2] で、乳糖ブイオンブリアントグリーン乳糖胆汁ブイオン培地法または特定酵素基質法が示されている。本調査で分離された*K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *C.freundii* は前者の乳糖ブイオンブリアントグリーン乳糖胆汁ブイオン培地法では、すべて大腸菌群と判定され、結果としてこれを含む検体 (湧き水等) は飲用不適とされる。これに対して、後者の方法では、多くが β -glucuronidase非産生性であるので、その殆どが大腸菌群と判定されない。先に論じたように、低温発育性の*K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *C.freundii* は自然界由来と考えられるので、湧き水等の大腸菌群検査では、 β -glucuronidaseのような特定酵素基質法を採用するのが適当と考えられる。

Bejiら [3] のlacZ遺伝子の検索は大腸菌を含む乳糖分解菌の検査時間の短縮につながるが、低温発育性の*K.pneumoniae*, *C.freundii*にしばしばlacZ遺伝子が認められるので、大腸菌群検査にこの方法を採用することは必ずしも適当ではない。

平成14年10月1日

文 献

1. 高畑 薫, 橋田修志, 藤井敏明, 秋山 陽, 寺田 厚(1995) 日食微誌, 12, 141-145.
2. 安藤正典ら(2001). 上水試験法. p 610-623, 日本水道協会.
3. Bej, A.K., McCarty, S.C. and Atlas, R.M. (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57, 2429-2432.
4. Bagley, S. T. and Seidler, R. J. (1977) Appl. Environ. Microbiol. 33, 1141-1148.
5. 堀江 進, 荒木敏明, 佐伯和昭(1972), 食衛誌, 13, 505-409
6. Fricker, E. J. and Fricker, C. R. (1994) Letters in Applied Microbiology. 19, 44-46.

富山県で分離された腸管出血性大腸菌の 志賀毒素と志賀様毒素産生

刑部陽宅 清水美和子 細呂木志保
田中大祐 磯部順子 永井美之

Shiga and Shiga-like Toxins Production of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Isolated
in Toyama Prefecture

Yotaku GYOBU, Miwako SHIMIZU, Shiho HOSOROGI,
Daisuke TANAKA, Junko ISOBE and Yosiyuki NAGAI

要旨 富山県内で分離された腸管出血性大腸菌O157, O26, O111の志賀毒素 (Stx1) と志賀様毒素 (Stx2) 産生量を調べた。結果：1) *stx1* 遺伝子を保有する菌株のCAYE培地におけるStx1産生量は血清型、菌株にあまり関係なく、多くの菌株で力価 (デンカ生研のVET-RPLAでの凝集価) 64~512倍 (約64~512ng/ml) で、菌体からも力価128~256倍のStx1が検出された。2) *stx2* 遺伝子を保有する菌株のCAYE培地におけるStx2産生量は菌株によって異なり、産生がほとんど認められない菌株から力価512の菌株までさまざまであった。また、培地によって産生量が異なり、更に菌体内からのStx2検出量は少なかった。以上の結果は腸管出血性大腸菌のStx産生量はStx1の場合には菌株による差はあまりないが、Stx2の場合には菌株による差、発育環境による差が大きいことを示している。

1996年に大阪府堺市で大規模な腸管出血性大腸菌食中毒が発生して以来、全国的に腸管出血性大腸菌感染症患者数が増加し、富山県でも1996年以来、年間20~170名の感染者が報告されている。

患者の発生においては、確定診断のため先ず分離大腸菌の志賀毒素 (以下Stx1) と志賀様毒素 (以下Stx2) 産生或いはその遺伝子が調べられ、更にその感染原追求を目的としたパルスフィールドゲル電気泳動によるDNA分析が広く行われている。また、治療に資することを目的とした薬剤感受性試験もしばしば行われている。しかしながら、腸管出血性大腸菌感染症の症状の程度は腸管内で産生されるStx産生量の影響を受けるにもかかわらず、多くの患者から分離された菌について

Stx産生量を調べた成績はあまりみあたらない。Stx産生量を把握しておくことによって、患者によって症状の程度が異なることや、菌のStx産生性を調べる時にどのような培地を使用すべきかについての理解が深まると思われる。このことから富山県で分離された腸管出血性大腸菌のStx産生量を調べた。

材料と方法

1. 菌株：富山県内で1996~2001年の間に分離された腸管出血性大腸菌、血清型O157:H7 (16株)、O26:H11 (5株)、O26:HNM (4株)、O111:

HUT (1株) およびO111:HNM (2株) を用いた。これらの菌株の分離年、血清型等はTable 1に示した。

2. Stxの産生と測定：被検菌はTrypticase Soy Broth (BBL), 37°C 6時間培養の1白金線を1.8×18cmの試験管に入った2mlの毒素産生培地に接種した。37°C18時間振とう培養後、3000rpm20分遠心分離を行い上清と沈殿に分けた。上清はそのままStx検出に供したが、沈殿は菌体内のStxを調べるため、上清を完全に除去後、2mlの硫酸ポリミキシン溶液(5000単位/ml生理食塩水)を加えて37°C, 60分処理し、更に3000rpm20分遠心分離を行い得られた上清をStx検出に供した。Stx量はVTEC-RPLA(デンカ生研)によって

調べ凝集価で示した。

結 果

1. CAYE培地における腸管出血性大腸菌のStx産生

Table 2に示すごとく、血清型O157:H7, 17株の内 *stx1* 遺伝子を保有する13株のStx1産生量は菌株によってあまり大きな差はなく、少数の菌株を除きラテックス凝集反応で凝集価64~128倍であった。しかし、*stx2* 遺伝子を保有する15株のStx2産生量は菌株によって異なり、検出レベル以下(菌株TEC1759)から凝集価256倍(菌株

Table 1. Serovar and Source of Enterohaemorrhagic *E.coli* Examined

Strain No	Serovars	Year of isolation	Location of isolation	Source
TEC1212	O157:H7	1996.6	Toyama city	Patient (sporadic case)
TEC1229	O157:H7	1996.7	Toyama city	Patient (sporadic case)
TEC1230	O157:H7	1996.7	Toyama city	Patient (sporadic case)
TEC1324	O157:H7	1996.8	Toyama city	Patient (sporadic case)
TEC1360	O157:H7	1996.9	Namerikawa city	Patient (sporadic case)
TEC1383	O157:H7	1996.10	Kamiichi town	Patient (sporadic case)
TEC1428	O157:H7	1997.4	Kurobe city	Patient (sporadic case)
TEC1461	O157:H7	1997.6	Kurobe city	Patient (sporadic case)
TEC1469	O157:H7	1996.7	Kurobe city	Calves
TEC1911	O157:H7	2001.3	Takaoka city	Patient (sporadic case)
TEC1998	O157:H7	2001.7	Toyama city	Healthy human
TEC1619	O157:H7	1998.6	Kurobe city	Patient (outbreak case)
TEC1622	O157:H7	1998.6	Kosugi town	Food (outbreak case)
TEC1759	O157:H7	1999.10	Toyama city	Patient (sporadic case)
TEC1979	O157:H7	2001.6	Tonami city	Patient (sporadic case)
TEC1961	O157:H7	2001.6	Toyama city	Patient (outbreak case)
TEC1291	O26:H11	1996.8	Takaoka city	Patient (outbreak case)
TEC1388	O26:H11	1996.10	Oyabe city	Patient (sporadic case)
TEC1546	O26:H11	1998.3	Takaoka city	Patient (outbreak case)
TEC1677	O26:H11	1998.10	Kurobe city	Patient (sporadic case)
TEC1449	O26:H?	1997.6	Uozu city	Patient (sporadic case)
TEC1219	O26:HNM	1996.6	Toyama city	Patient (sporadic case)
TEC1460	O26:HNM	1997.6	Uozu city	Patient (sporadic case)
TEC1478	O26:HNM	1997.8	Toyama city	Patient (sporadic case)
TEC1615	O26:HNM	1998.6	Takaoka city	Patient (outbreak case)
TEC1635	O111:UT	1998.7	Kurobe city	Patient (sporadic case)
TEC1853	O111:HNM	2000.6	Takaoka city	Patient (sporadic case)
TEC1881	O111:HNM	2000.10	Toyama city	Patient (sporadic case)

TEC1360) までさまざまであった。血清型がO26 : H11 (またはNM) で *stx1* 遺伝子を保有し, *stx2* 遺伝子を保有しない菌株はその由来 (集団例, 散発例) にあまり関係なく凝集価64~256倍の Stx1 を産生した。血清型O111 : HUT (またはNM) の *stx1* 遺伝子を保有し, *stx2* 遺伝子を保有しない菌3菌株の産生量も凝集価で64~256倍の範囲で, O26 : H11と似たレベルであった。

2. 菌体からの Stx 検出

結果は Table 3 に示した。(1) Stx1 : *stx1*, Stx2, 両方の遺伝子を保有する菌株 (血清型O157 : H7 ; 13株, O26 : HNM ; 1株) では, 菌株や血清型にあまり関係なく菌体内から凝集価, 256 ~512倍のレベルの Stx1 が検出された。*stx1* 遺伝子を保有し, *stx2* 遺伝子を保有しない菌株 (血清型 : O26 : H11 ; 5株, O26 : HNM ; 3株, O111 : HUTまたはNM) ; 3株) でも, 菌株による差はあまり認められず, *stx1*, *stx2* 遺伝子を

保有する菌と似たレベル (凝集価 : 128~512倍) の Stx1 が検出された。(2) Stx2 : *stx1*, *stx2*, 両方の遺伝子を保有する菌株 (血清型O157 : H7 ; 13株, O26 : HNM ; 1株) の場合, 14株中1株に認められず, 13株 (93%) に認められた。しかしその量は凝集価 2~32倍と Stx1 に比べ少なく, また菌株によりその量は異なった。一方, *stx2* 遺伝子のみを保有する菌2株 (血清型O157 : H7) では, 菌体内から Stx2を検出することは出来なかった。

3. 各種培地における毒素産生

CAYE培地における毒素産生量の多少を基準に, 各血清型の菌それぞれ1~6株を選び, 計5種の培地における Stx 産生量を調べ, 結果を Table 4 に示した。(1) Stx1 産生 : 血清型O157 : H7は BHI, BP, TSB, GAMの各培地で凝集価16~64倍の Stx1 を産生した。しかし, CAYE培地では,

Table 2. Shiga-like Toxin Production of Enterohaemorrhagic *E.coli* Isolated in Toyama Prefecture

Strain No	Serovars	Toxin gene		Toxin production	
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Stx1	Stx2
TEC1212	O157:H7	+	+	32 ⁰	64
TEC1229	O157:H7	+	+	8	16
TEC1324	O157:H7	+	+	256	128
TEC1360	O157:H7	+	+	64	256
TEC1383	O157:H7	+	+	64	256
TEC1428	O157:H7	+	+	128	32
TEC1461	O157:H7	+	+	64	64
TEC1469	O157:H7	+	+	64	128
TEC1911	O157:H7	+	+	128	32
TEC1998	O157:H7	+	+	32	64
TEC1619	O157:H7	+	+	128	32
TEC1622	O157:H7	+	+	64	64
TEC1759	O157:H7	+	+	256	-
TEC1230	O157:H7	+	-	256	-
TEC1979	O157:H7	-	+	NE	4
TEC1961	O157:H7	-	+	NE	32
TEC1291	O26:H11	+	-	256	NE ²
TEC1388	O26:H11	+	-	256	NE
TEC1546	O26:H	+	-	512	NE
TEC1677	O26:H11	+	-	128	NE
TEC1449	O26:H?	+	-	128	NE
TEC1219	O26:HNM	+	-	64	NE
TEC1460	O26:HNM	+	-	512	NE
TEC1478	O26:HNM	+	-	128	NE
TEC1615	O26:HNM	+	+	512	512
TEC1635	O111:UT	+	-	128	NE
TEC1853	O111:HNM	+	-	64	NE
TEC1881	O111:HNM	+	-	64	NE

⁰: Maximum dilution of culture supernatant where Latex agglutination was observed.

²: Not examined.

Table 3. Detection of Shiga-like Toxin from Cell Extract of Enterohaemorrhagic *E.coli* Isolated in Toyama Prefecture

Strain No	Serovars	Toxin gene		Toxin in cell extract	
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Stx1	Stx2
TEC1212	O157:H7	+	+	256 ⁰	4
TEC1229	O157:H7	+	+	256	32
TEC1324	O157:H7	+	+	256	32
TEC1360	O157:H7	+	+	128	-
TEC1383	O157:H7	+	+	256	16
TEC1428	O157:H7	+	+	256	8
TEC1461	O157:H7	+	+	256	16
TEC1469	O157:H7	+	+	128	4
TEC1911	O157:H7	+	+	256	8
TEC1998	O157:H7	+	+	128	16
TEC1619	O157:H7	+	+	256	32
TEC1622	O157:H7	+	+	512	16
TEC1759	O157:H7	+	+	512	2
TEC1230	O157:H7	+	-	256	-
TEC1979	O157:H7	-	+	NE	-
TEC1961	O157:H7	-	+	NE	-
TEC1291	O26:H11	+	-	512	NE ²
TEC1388	O26:H11	+	-	512	NE
TEC1546	O26:H11	+	-	512	NE
TEC1677	O26:H11	+	-	256	NE
TEC1449	O26:H11	+	-	256	NE
TEC1219	O26:HNM	+	-	512	NE
TEC1460	O26:HNM	+	-	512	NE
TEC1478	O26:HNM	+	-	256	NE
TEC1615	O26:HNM	+	+	512	64
TEC1635	O111:UT	+	-	128	NE
TEC1853	O111:HNM	+	-	256	NE
TEC1881	O111:HNM	+	-	256	NE

⁰: Maximum dilution of culture supernatant where Latex agglutination was observed.

²: Not examined

Table 4. Shiga-like Toxin Production of Enterohaemorrhagic *E.coli* in Various Media

Strain No	Serovars	Toxin production in									
		BHI ¹⁾		BP ²⁾		TSB ³⁾		GAM ⁴⁾		CAYE ⁵⁾	
		Stx1	Stx2	Stx1	Stx2	Stx1	Stx2	Stx1	Stx2	Stx1	Stx2
TEC1230	O157:H7	64 ⁶⁾	NE	64	NE	32	NE	64	NE	128	NE
TEC1360	O157:H7	16	256	16	128	32	1024	32	512	64	256
TEC1759	O157:H7	32	2	32	—	32	8	32	8	128	—
TEC1911	O157:H7	16	64	16	8	16	512	16	256	128	32
TEC1979	O157:H7	NE	32	NE	16	NE	128	NE	64	NE	
TEC1291	O26:H11	64	NE	128	NE	16	NE	16	NE	64	NE
TEC1677	O26:H11	16	NE	128	NE	16	NE	16	NE	128	NE
TEC1615	O26:HNM	128	128	256	64	32	256	128	128	256	256
TEC1635	O111:UT	32	NE	64	NE	8	NE	8	NE	128	NE

1) : Brain heart infusion broth (Difco).

2) : Buffered peptone water (Difco)

3) : Trypticase soy broth (BBL)

4) : GAM broth (Nissui)

5) : CAYE medium (Denka)

6) : Maximum dilution of Culture supernatant where Latex agglutination was observed.

7) : Not examined

更に多い凝集価64~128倍のStx1を産生した。血清型O111:HUTのStx1産生も似た傾向であった。一方、血清型O26:H11はBHI, TSBおよびGAM培地で凝集価16~64倍, BPとCAYE培地で凝集価64~128倍と, CAYE培地の他, BP培地でも多くStx1を産生する傾向であった。(2) Stx2産生: *stx2* 遺伝子を保有する血清型O157:H7, 4株の産生量は菌株によって異なった。その産生量はBHI, BP, GAMおよびCAYE培地におけるよりTSBで多い傾向であった。

考 察

腸管出血性大腸菌(特にO157)感染症は一般に3~5日の潜伏期の後, 腹痛と下痢の腹部症状で始まり, 38~61%で潜血便を伴う出血性大腸炎を呈し, 下痢発症後5~9日を経過すると, 5~8%の頻度で溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症などの合併症を併発する3類感染症として知られている。病態の原因として本菌が産生する志賀毒素が重要と考えられているが, 毒素には志賀毒素(Stx1)と志賀様毒素(Stx2)の2種類あり, 蛋白質質量当りの毒性はStx1に比べ, Stx2の方が強い。いずれか又は両方を産生する大腸菌は少な

くとも100種類以上の血清型に分けられているが, 最近の資料[1]では最も多い血清型はO157:H7, 次にO26:H11で両血清型が全体の76%を占め, 更にO157:H7とO26:H11を比較すると, O157:H7では, その殆どがStx1とStx2の両方, またはStx2のみを産生し, O26:H11では, その殆どがStx1のみを産生することが示されている。一方, O157:H7感染者とO26:H11感染者の症状を比較したとき, 重篤例は前者において多い。O'Brienら[2]の指摘するように, 腸管出血性大腸菌感染症のHUSや出血では, Stx1よりStx2の方が重要視されている。富山県で分離された腸管出血性大腸菌を任意に選び, Stx産生を調べると, 少数の例外を除き, 多くの菌株は血清型に関係なくCAYE培地において凝集価32~512倍(32~512ng/ml)のStx1を産生し, 菌体内からも, 培養上清に似た凝集価128~512倍(128~512ng/ml)のレベルのStx1が検出された。これらの結果は腸管出血性大腸菌のStx1産生量は血清型や菌株にあまり関係なく, 似ていることを示唆するように思われる。多くの菌株は調べた5種類の培地の内, CAYEで最も多くのStx-1を産生したが, このことがStx1産生は高濃度の鉄によって抑制されること[3]と関係があるかどうか明らかでない。

一方、Stx2産生はO157:H7に限っても菌株による差は大きく、培地による産生量の差も大きかった。この事実は *stx2* 遺伝子の発現は菌株によって、また増殖条件によって異なることを示している。腸管出血性大腸菌感染者の症状はHUSから無症状まで幅広い、菌のStx2産生能と産生に及ぼす腸管内の環境がこのことに関係しているのではないかと思われる。Stx2産生には、温度、Mitomycin C等のファージ誘発剤、Rec A蛋白等が影響を与え、PH、酢酸塩、鉄、利用可能炭水化物等はあまり影響を与えないことが報告されている [4]。今後、Stx発現調節機構や、菌のStx2産生レベルと症状の関係を明らかにして、予防と治療に役立てる必要がある。

腸管出血性大腸菌感染症の診断のひとつとして、分離菌のStx産生性を調べる方法があり、その検査キットがメーカーから市販されている。本実験では、Stx1産生は多くの菌で安定していた。しかし、Stx2産生は培地によって菌株によって異なっていた。振とう培養より静置培養での産生量

が多いとする記述がStx検出キット（デンカ生研）の説明書にみられるが、本実験結果は、Stx2産生を調べるには培地の選択も重要でTSB培地が比較的良いことを示している。

文 献

1. 国立感染症研究所編 (2002). 病原微生物検出情報, 23, 137-138.
2. O, Brien, A.D. Tesh, V.L. Donohue-Rolfe, A. Jackson, M.P. Olsnes, S. Sandvig, K. Lindberg, A. A. and Keusch, G.T. (1992). Microbiol. Immunol., 180, 65-94.
3. Calderwood, S. B. and Mekalanos. J. J. (1987). J. Bacteriol., 169, 4759-4764.
4. Muhldorfer, I. Hacker, J. Keusch, G. T. Acheson, D.W. Tschape, H. Kana A.V. Ritter, A. Olschlager, T. and Donohue-Rolfe, A. (1996). Infec. Immun., 64, 495-502.

下痢症患者由来の主要病原因子陰性大腸菌の病原性

刑部陽宅 平田清久¹ 清水美和子 田中大祐
細呂木志保 磯部順子 永井美之

Enteropathogenicity of Principal Virulence-factor-negative *Escherichiae coli*
from Diarrheal Patients

Yotaku GYOBU, Kiyohisa HRATA¹, Miwako SHIMIZU, Daisuke TANAKA,
Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE and Yosiyuki NAGAI

要旨 主要な病原因子を保有しない市販血清に凝集する大腸菌の腸管起病性と未知病原因子を動物実験等で調べた。実験にはO1, O6, O18, O26, O111, O128等42種の血清型に属する主要な病原遺伝子 (*st*, *elt*, *stx*, *invE*, *bfpA*, *eaeA*, *aggR*, *astA*) を保有しない下痢患者から分離された43菌株を用いた。結果: 1) 調べた43株の培養上清, 菌体抽出液にVero細胞に対する毒性を認めなかった。2) 1~2日令の乳呑みマウス胃内に培養液をエバンスブルーと共に経口的に投与したとき, 43株中5株(血清型O18:H12, O18:H?, O21:H?, O28ac:H?, O128:HNM) に病原性(糞便排出)を認めたが, これらの菌株の生菌による家兎結紮腸管反応は陰性であった。3) 乳呑みマウスに病原性を示した5株のすべてに病原性への関与が疑われる定着因子遺伝子 (*cfa/I*, *cfa/II*), 細胞壊死因子遺伝子 (*cnf-I*), Type I 繊毛サブユニット遺伝子 (*fimA*), 侵入性因子遺伝子 (*ipaH*), p 繊毛遺伝子 (*papA*), s 繊毛遺伝子 (*sfaA*) および溶血毒遺伝子 (*hlyA*) を認めなかった。

以上の結果は未知の病原因子と病原メカニズムを有する病原性大腸菌があることを示唆するのではないかと思われる。

NataroとKapper [1] はヒトに下痢を起こす病原性大腸菌を毒素原性大腸菌, 腸管出血性大腸菌, 組織侵入性大腸菌, 腸管病原性大腸菌, 腸管凝集性大腸菌等に分け詳述している。著者らは1996~1998年の間に富山県内の病院で散発下痢患者から分離された市販血清に凝集する大腸菌はどのようなカテゴリーに分類されるかを明らかにするため, その血清型と各種の毒素(ST, LT, Stx1, Stx2) 産生ならびに3種の病原因子の遺伝子

(*eaeA*, *bfpA*と*aggR*) を調べてきた。その結果, 184株中71株(39%)に何らかの病原因子を認めたが, 他の61%にはいずれの病原因子も認めなかった。また, 病原因子を保有しない菌は血清型O1, O6, O18, O26, O111, O128に多く, その他の血清型に少ないことを認めた(未発表)。

下痢患者から分離される市販病原性大腸菌血清に凝集する大腸菌は病院ではO抗原と臨床症状で病原性が推測されることが多い。しかし, 正確に

1 富山県食肉検査所

はH抗原や病原因子等を調べなければ病原菌と推定或いは確定することは適当ではなく、更に、既知病原因子陰性株の中に未知の病原メカニズムを保有する病原菌がある可能性が残されている。未知の病原メカニズムを保有する大腸菌があるのではないかと考えられる。そこで、下痢患者から高頻度に分離され、かつ既知主要病原因子を保有しない市販血清に凝集する大腸菌についてその病原性を実験動物で、また、細胞毒産生性をVero細胞で調べた。

方 法

1. 菌 株

1996~1998年の間に、富山県内の公立病院において下痢患者から分離され、富山県衛生研究所へ送付された菌株の内、市販血清に凝集し且つ主要既知病原因子の遺伝子を保有しない大腸菌46株を任意に選び実験に供した。

2. PCR法による病原遺伝子の検出

毒素原性大腸菌の遺伝子 (*st*, *elt*)、腸管出血性大腸菌の遺伝子 (*stx1*, *stx2*)、腸管病原性大腸菌と関係がある遺伝子 (*eaeA*, *bfpA*)、腸管凝集性大腸菌と関係がある遺伝子 (*astA*, *aggR*)、その他病原性への関与が疑われる定着因子遺伝子 (*cfa/I*, *cfa/II*)、細胞壊死因子遺伝子 (*cnf-1*)、Type I 繊毛サブユニット遺伝子 (*fimA*)、侵入性因子遺伝子 (*ipaH*)、p 繊毛遺伝子 (*papA*)、s 繊毛遺伝子 (*sfaA*)、溶血毒遺伝子 (*hlyA*) について調べた。手技の詳細は *bfpA*, *aggR* については塚本 [2], *eaeA* については Sandhu [3], *astA* については森屋ら [4] によったが, *st*, *elt*, *invE*, *stx1* 並びに *stx2* 遺伝子については市販のキット (タカラ酒造) を用い、その説明書に従った。また, *cfa/I*, *cfa/II*, *cnf-1*, *fimA*, *ipaH*, *papA*, *sfaA*, *hlyA* は Kuhnert ら [5] によった。

3. 培養濾液と菌体抽出液の調製

菌は25mlの Trypticase soy broth (BBL) で 37°C 18時間培養した。培養後、遠心沈殿で上清と菌体に分け、上清はポアサイズ0.45 μmのメンブ

ランフィルターで濾過した。一方、菌体は0.85% NaClで3回洗浄後、超音波破砕器 (トミー, UD-201) で3分処理し、更に8000rpm30分遠心分離し、その上清をメンブフィルターで濾過した。それぞれ培養液、培養濾液、菌体抽出液とした。

4. 家兎結紮腸管反応

前報 [6] によった。

5. 乳呑みマウス反応

被検液 (培養液, 培養ろ液, 菌体抽出液), 1 mlに2% Evans blueを80 μl添加し, ポリエチレンチューブ付注射器で1~2日令, 4匹のICRマウスに1匹あたり0.1ml経口的に胃内接種した。マウスは菌接種30分後, ろ紙を敷いたシャーレに移し17~18時間後に, 生死, 下痢 (ろ紙上の青斑点数), 排便, 腸管の液貯留状況を観察した。結果は4匹中1匹でも死亡した時に致死陽性, 青斑点数3ヶ以上数えた場合または黄色の便2ヶ以上認めた場合に下痢陽性, 解剖で腸管に液貯留を対照マウス (生理食塩水投与) より明らかに多く認めた場合に腸管液貯留陽性とした。

6. 培養細胞変性作用

平底 Microplate の 1 well に細胞培養液100 μl, Vero細胞浮遊液 (20万個/ml) 50 μl, 試料25 μl を入れ, 37°Cの炭酸ガス孵卵器においた。5日培養後, 顕微鏡で細胞を観察し, 対照 (生理食塩水) に比し明らかに細胞変成がみられた場合に細胞毒陽性とした。なお, 細胞培養液には10%子牛血清加 Eagle MEM 培地を用いた。

結 果

1. 供試菌の血清型と病原遺伝子保有能

初めに, 45の血清型に属する合計46株を選び, それまでに調べられていた血清学的性状と病原因子保有能を再検査し, 更に, それまで未調査であった病原遺伝子 (*astA*) を調べた。その結果, すべての菌株が8種の病原因子の遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *st*, *elt*, *InvE*, *eaeA*, *bfpA*, *aggR*) を保有していないことを再確認したが, 追加して調べ

た腸管凝集性大腸菌のastA遺伝子は3株(O8:H4, O111:H21, O111:HNM)に認め、他の43株に認められなかった。以下、これら43株(Table 1)を実験に供した。

2. 培養濾液と菌体抽出液の細胞毒性

表に示さなかったが、供試43株すべての菌株の培養濾液にVero細胞に対する毒性を認めなかった。菌体抽出液についても、試料量25μlで、すべての菌株に毒性を認めなかった。

3. 乳呑みマウスに対する病原性

被検菌のTrypticase soy broth, 37C1夜培養液を胃内接種した時、Table 1に示すごとく、調べた43株すべてに腸管内液貯留と致死を認めなかった。しかし、5株に水様便(エバンスブルー)または固形便の排出を認めた。これら5株による水様便あるいは固形便排出の様相はFigure 1に示した。血清型はO18:H12, O18:H不明, O20:H20, O28ac:H不明, O128:HNMであった。他の38株

には、このような便排出は全く認められなかった。

4. 病原性を認めた大腸菌の生菌に対する家兎結紮腸管の反応

乳呑みマウスへの経口投与実験で下痢起病能を認めた大腸菌5株について家兎結紮腸管反応を実施した。結果はTable 2に示すごとく、いずれの菌株を接種した時にも、ループ内に液貯留を認めなかった。

5. 培養濾液と菌体抽出液に対する乳呑みマウスの反応

乳呑みマウスへの経口投与で下痢起病能を認めた大腸菌5株の培養濾液と菌体抽出液に腸管液貯留活性があるかどうかを調べた。結果は示さなかったが、いずれの菌株の培養濾液と菌体抽出液にも活性を認めなかった。

6. 病原性を認めた大腸菌からの繊毛等の遺伝子の検出

乳呑みマウスへの生菌投与で下痢起病能を認め

Table 1. Enteropathogenicity of *E.coli* in Suckling Mouse

Strain	serovars	Dea- th	Fluid accumu- lation	Diarr- hea	Strain	Dea- th	Fluid accumu- lation	Diarr- hea
TEC1506	O1:H6	0/4	-	-	TEC1317	O28ac	0/4	+
TEC1504	O1:H7	0/4	-	-	TEC1493	O44:H?	0/4	-
TEC1505	O1:H12	0/4	-	-	TEC1335	O55:H9	0/4	-
TEC1401	O1:HNM	0/4	-	-	TEC1400	O86a:H18	0/4	-
TEC1743	O1:HNM	0/4	-	-	TEC1396	O111:H?	0/4	-
TEC1322	O1:H?	0/4	-	-	TEC1634	O114:H7	0/4	-
TEC1424	O6:H12	0/4	-	-	TEC1336	O125:H19	0/4	-
TEC1518	O6:HNM	0/4	-	-	TEC1307	O126:H20	0/4	-
TEC1697	O6:H?	0/4	-	-	TEC1666	O128:H2	0/4	-
TEC1332	O8:H?	0/4	-	-	TEC1497	O128:H19	0/4	-
TEC1412	O15:H?	0/4	-	-	TEC1423	O128:HNM	0/4	+
TEC1473	O18:H5	0/4	-	-	TEC1638	O143:HNM	0/4	-
TEC1495	O18:H7	0/4	-	-	TEC1450	O151:H?	0/4	-
TEC1698	O18:H7	0/4	-	-	TEC1337	O153:H21	0/4	-
TEC1372	O18:H12	0/4	-	+	TEC1734	O153:H?	0/4	-
TEC1419	O18:HNM	0/4	-	-	TEC1734	O153:H?	0/4	-
TEC1658	O18:H?	0/4	-	+	TEC1676	O157:H21	0/4	-
TEC1421	O20:H?	0/4	-	+	TEC1487	159:H42	0/4	-
TEC1502	O25:H6	0/4	-	-	TEC1492	O159:H?	0/4	-
TEC1427	O25:HNM	0/4	-	-	TEC1386	O166:H?	0/4	-
TEC1340	O25:H?	0/4	-	-	TEC1576	O167:H2	0/4	-
TEC1580	O26:H28	0/4	-	-				
TEC1494	O26:H?	0/4	-	-				

No.of died mouse / No.of suckling mouse used



Fig. 1 Photograph of Diarrheal Feces Excreted by *E. coli*-administered Suckling Mouse

Table 2. Ligated Rabbit Ileal Loop Test of Viable Cells or Concentrated Culture Filtrates of *E. coli*

Strain	Serotype	Response of loop to injection of	
		viable cells	concentrated culture filtrate
TEC 1372	O18:H12	0/2	0/2
TEC 1658	O18:H?	0/2	0/2
TEC 1421	O21:H?	0/2	0/2
TEC 1317	O28ac:H?	0/2	0/2
TEC 1423	O128:HNM	0/2	0/2

No. of positive / No. of test.

た大腸菌5株について、定着因子遺伝子 (*cfa/I*, *cfa/II*), 細胞壊死因子遺伝子 (*cnf-1*), Type I 繊毛サブユニット遺伝子 (*fimA*), 侵入性因子遺伝子 (*ipaH*), *p* 繊毛遺伝子 (*papA*), *s* 繊毛遺伝子 (*sfaA*), 溶血毒遺伝子 (*hlyA*) を調べた。

陽性標準株はなかったので論文 [5] に忠実に従った。Table 3 に示すように、*cfa/I*, *cfa/II*, *cnf-1*, *fimA*, *ipaH*, *papA*, *sfaA*, *hlyA* の各遺伝子はいずれの菌株にも認められなかった。

考 察

Goldschmidt [7] は胃腸炎を起こした乳幼児から分離した菌を用いて免疫学的な研究を行ない、下痢患者由来菌は特定の血清型に集中すること、その血清型の菌は健康者から殆ど分離されないこと、健康な乳幼児に感染すること等の事実を発見し1993年に報告した。その後、Kauffmannらによって開発されたOおよびK抗原による大腸菌

の血清型別法の普及により、下痢患者から良く分離される菌株の血清型が明らかとなり、更に1990年代になって、ヒトに下痢を起こす大腸菌は5カテゴリーに分けられ、それぞれのカテゴリーの菌の病原因子は毒素原性大腸菌については下痢毒素(STとLT)、組織侵入性大腸菌については侵入因子(遺伝子は*inE*, *ipaH*)、腸管出血性大腸菌については細胞毒(*Stx*)であり、腸管凝集附着性大腸菌については凝集性接着線毛(AAF/I, 遺伝子は*aggR*等)と耐熱性腸管毒素(EASTI, 遺伝子は*astA*)が関係すること、また、それぞれのカテゴリーに特定の血清型の菌が集中する傾向のあることが明らかにされた。このような病原性大腸菌に関する研究の進歩があり、近年、わが国では市販病原性大腸菌血清で型別される大腸菌の各種病原遺伝子が盛に調べられるようになった。

石畝ら [8] は福井市内の医療機関で散発下痢症患者から分離された市販血清に凝集する大腸菌825株について調べ、血清型O1, O18, O6の割合が高く、これらの血清型には、重要な病原遺伝子(*st*, *elt*, *eaeA*, *invE*, *stx*, *astA*, *aggR*)を保有する菌株は少ないこと、血清型O111:H21とO126:H27に*astA*と*aggR*遺伝子保有株が多いことを示している。内山ら [9] も北海道で分離された菌株について調べ似た成績を示しているが、更に*bfpA*遺伝子保有株は調べた578株の内わずか2株であったと述べている。塚本ら [2], 森屋ら [3], 河野ら [10], 倉本ら [11], 紫竹 [12] らの報告にも同様の傾向がみられる。著者らもまた、富山県で同様の成績を得ている(未発表)が、市販血清で型別される大腸菌にあまり既知主要病原遺伝

子保有株が認められないとする報告は多い [8-12]。もとより、医療機関で分離される市販血清で型別される大腸菌のすべてが病原性を有する根拠はなく、多くの検査施設では、血清型とカテゴリーの関係が明確でない菌株は非病原株として処理することが多いと思われる。しかし、下痢患者から分離されているだけに、病原性のある菌株も含まれている可能性を否定できない。この理由から、本実験では、下痢患者から高い頻度で分離される血清型O1, O6, O18を中心に合計42種類の血清型の菌43株を主要な病原遺伝子を保有していないことを確認の上選び、そして毒素産生、乳呑みマウスに対する病原性等を調べた。細胞毒性はNataroら [1] が既知の5カテゴリー以外のメカニズムを持つ可能性のある菌として、SLTの他に細胞毒を産生する菌株がある可能性についてふれているので調べたが、すべての菌株の培養上清と菌体抽出液に細胞毒性を認めなかった。一方、乳のみマウスに対する投与実験はEPECに属する菌に対して感受性のある実験動物は殆ど知られていない状況の中で、ST,やLTの証明に使われた実験系であるので実施した。結果はTable 2に示すように、5株(血清型O18:H12, O18:H?, O20:H?, O28ac:H?, O128:HNM)に経口投与による水様便又は固形便の排出を認めた。これら5株は家兔結紮腸管反応試験が陰性で、その培養上清および菌体抽出液に液貯留活性がないので、病原性にSTやLTのような毒素の関与を証明するに到らなかった。そこで、別の病原因子として、*cfa/I*, *cfa/II*, *hlyA*, *fimA*, *papA*, *sfaA*, *cnfI*など病原性への関与が疑われる遺伝子について調べた。

Table 3. Distribution of Minor Virulent Gene in Enteropathogenic *E.coli*

Strain	Serotype	Gene							
		<i>cfa/I</i>	<i>cfa/II</i>	<i>cnf-1</i>	<i>fimA</i>	<i>ipaH</i> , <i>papA</i>	<i>sfaA</i>	<i>hlyA</i>	
TEC 1372	O18:H12	—	—	—	—	—	—	—	—
TEC 1658	O18:H?	—	—	—	—	—	—	—	—
TEC 1421	O21:H?	—	—	—	—	—	—	—	—
TEC 1317	O28ac:H?	—	—	—	—	—	—	—	—
TEC 1423	O128:HNM	—	—	—	—	—	—	—	—

しかし、すべて陰性であった。未知のメカニズムがあるのではないかと思われる。大腸菌の病原性への関与が少しでも疑われる因子の遺伝子は今回調べた遺伝子以外に *fhuA* (ferrichromeイオンのレセプター), FIC (繊毛), *iucC* (aerobactin), *neuA* (夾膜抗原), *elyA* (溶血毒), CDT (cytotoxic distending toxin), その他が知られているので、乳呑みマウスに病原性を示す菌株については、今後更に多くの検討が必要であろう。

文 献

1. Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Clin. Microbiol. Rev. Jan. 1998, 142-201.
2. 塚本定三 (1996), 感染症学雑誌 70巻, 569-572.
3. Sandhu, K.S. (1996) Epidemiol and Infect 116, 1-7.
4. 森屋一雄, 角典子, 中尾昌弘, 山崎貢, 斎藤真, 伊藤健一郎 (2000) 感染症学雑誌, 74巻, 134-142.
5. Kuhnert, P., Hacker, J., Muhlderfer, I., Burnes, A.P, Nicolet, J and Frey, J. (1997). Appl. Environ. Microbiol., 63, 703-709.
6. 刑部陽宅, 児玉博英, 佐藤茂秋 (1991). 感染症誌, 65, 531-536.
7. Goldschmidt, R. (1933). Jahrt. Kinderhelek, 139, 318 (坂崎利一 編, 食中毒より引用)
8. 石畝史, 村田健, 浅田恒夫, 杉浦政樹 (2001) 福井県衛生研究所年報, 40, 43-47.
9. 内山康裕, 森本洋, 長野秀樹, 長谷川伸作, 矢野昭起, 木村浩男 (1999). 道衛研所報, 49, 31-35.
10. 河野喜美子, 山田亨, 八木利喬, 伊藤健一郎 (1998). 感染症学雑誌, 72巻, 1275-1282.
11. 倉本早苗, 黒崎直子, 芹川俊彦 (2001) 石川保健研報, 38号, 14-18.
12. 紫竹美和子, 川瀬雅雄, 白幡祐子, 大野祥子, 不二崎順二, 寺尾道德 (2001). 新潟県保健環境科学研究所年報. 16巻. 71-75.

イヌワシ未孵化卵中の残留ポリ塩化ビフェニル 及び有機塩素系農薬

齊藤行雄 松永明信 間宮寿頼¹
湯浅純孝¹ 村上孝一²

Polychlorinated Biphenyl and Organochlorin Pesticide Residues
in Unhatched Eggs of Golden Eagles

Yukio SAITO, Akinobu MATSUNAGA, Kazuyori MAMIYA¹,
Sumitaka YUASA¹ and Kohichi MURAKAMI²

要旨 「国内希少野生動植物種」に指定されているイヌワシ未孵化卵を入手する機会を得たので同卵中のポリ塩化ビフェニル類 (PCBs) 及びジクロロジフェニルトリクロロエタン類 (DDTs), ヘキサクロロシクロヘキサン異性体類 (HCHs) 等の有機塩素系農薬を分析した。

1. 卵2試料中から, PCBsが310, 360ng/g, DDTsが85, 100ng/g, HCHsが5.0, 5.8ng/g及びディルドリンが8.5, 11ng/gの濃度(各湿重量当たり)で検出された。
2. 検出された有機塩素化合物の残留組成は, PCBsではカネクロール(KC)-600, DDTsでは代謝物のpp'-DDE, HCHsでは β -HCHであり, 使用禁止されて20-30年経過後も残留が認められ, これらの難分解性が再確認された。

イヌワシは, クマタカ, オオタカなどと共に「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律」に基づく「国内希少野生動植物種」に指定されている。また, 生息環境の影響を受け易く, 森林開発による採餌物の減少や環境汚染物質の影響などから, イヌワシ等猛禽類の絶滅の危機が懸念されており [1], その保護対策が強く望まれている。

本県では, 1998年に上平村小瀬地区のイヌワシ営巣地に監視カメラを設置し, 繁殖映像をねいの里へ転送してその状況を遠隔監視するモニタリングシステムが整備された [2]。本システムで2001

年まで毎年イヌワシによる産卵が確認されたが, 抱卵放棄などにより, 繁殖は失敗に至っている。2001年の場合も, 2月に確認されたイヌワシ卵は, 同年3月親鳥が抱卵放棄し巣に戻らなくなったため, 発育中止卵になり孵化しなかったことが観察された。このような野生生物の繁殖異常は, 化学物質による自然環境障害度を評価する上で有用な指標になりうると考えられる。

そこで, 健全性を判定するための基礎資料とするために, 同未孵化卵及び対照試料の鶏卵から, 内分泌攪乱作用の疑われているPCBsやDDTs等の有機塩素化合物を分析した結果について報告する。

試料と方法

結果と考察

1. 試料

2001年3月に小瀬地区の営巣地で未孵化となったイヌワシ卵1 (長径71.3mm, 短径55.0mm, 全重量94.0g, 内容物量64.2g) 及び同卵2 (長径74.0mm, 短径57.0mm, 全重量107.9g, 内容物量68.8g) を試料とした。対象試料として市販の鶏卵 (長径58.0mm, 短径43.0mm, 全重量59.7g, 内容物量52.6g) を使用した。

2. 分析対象物質

PCBs (KC-300, KC-400, KC-500, KC-600), DDTs (pp'-DDE, pp'-DDD, pp'-DDT, op'-DDT), HCHs (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH), アルドリン, ディルドリン, エンドリンである。

3. 分析方法

試験溶液の調製等は, 藤田ら [3] の方法を用いた。PCBsの数値化方法は, 衛生試験法・注解 [4] に従った。

分析に供したイヌワシ未孵化卵の2試料からPCBs及び有機塩素系農薬が検出された (Table 1)。検出した中では, PCBsの濃度が最も高く, 次いでDDTs, ディルドリン, HCHsの順であった。

一方, 対照としての鶏卵からは有機塩素化合物は全て不検出であった。鶏では, 飼料としてPCBsなどの有機塩素化合物が混入しないように管理された配合飼料 (原料: とうもろこし, 大豆油かす, 魚かす・魚粉など) が用いられているものと推察された。

これに対してイヌワシでは, ノウサギ, ヤマドリ, ヘビ類など野生中小動物を食性とすることから [5], 有機塩素化合物を食物連鎖によって高度に濃縮しているものと考えられる。

検出された有機塩素化合物の残留組成は, PCBsではKC-600を主体とする高塩素化合物で構成されていた (Fig. 1)。KC-300, KC-400及

Table 1. Concentration of PCBs and Organochlorine Pesticides in Unhatched Eggs of Golden Eagle and a Chicken Egg (ng/g wet weight)

Organochlorine (Fat content, %)	Unhatched egg of golden eagle		Chicken egg
	No.1 (6.4)	No.2 (5.6)	No.1 (11.0)
PCBs	360	310	<1
DDTs	100	85	<0.2
pp'-DDE	100	85	<0.2
pp'-DDD	<0.2	<0.2	<0.2
pp'-DDT	<0.2	<0.2	<0.2
op'-DDT	<0.2	<0.2	<0.2
HCHs	5.8	5.0	<0.2
α -HCH	<0.1	<0.1	<0.1
β -HCH	5.8	5.0	<0.2
γ -HCH	<0.1	<0.1	<0.1
δ -HCH	<0.1	<0.1	<0.1
Aldrin	<0.1	<0.1	<0.1
Dieldrin	11	8.5	<0.2
Endrin	<0.2	<0.2	<0.2

びKC-500は、イヌワシの薬物代謝能により代謝・排泄されたのか、或いは餌中のPCBs残留組成が既にKC-600中心になっていたのかについては、野生中小動物を分析していないので不明であった。また、DDTsでは代謝物であるpp'-DDEに変換されて残留しており、HCHsでは β -HCHが構成成分であった。しかし、国内ではPCBs, DDTs

及びHCHsが1970年代、ディルドリンが1980年代にそれぞれ生産中止や使用禁止されているが、現在も残留していることが確認された。食品のPCBs暫定的規制値の中には、卵類の200ng/g(全量中)が設定されているが、DDTs及びHCHsについては規制されていない。未孵化卵中のPCBs濃度は、食品のPCBs暫定的規制値を超過し

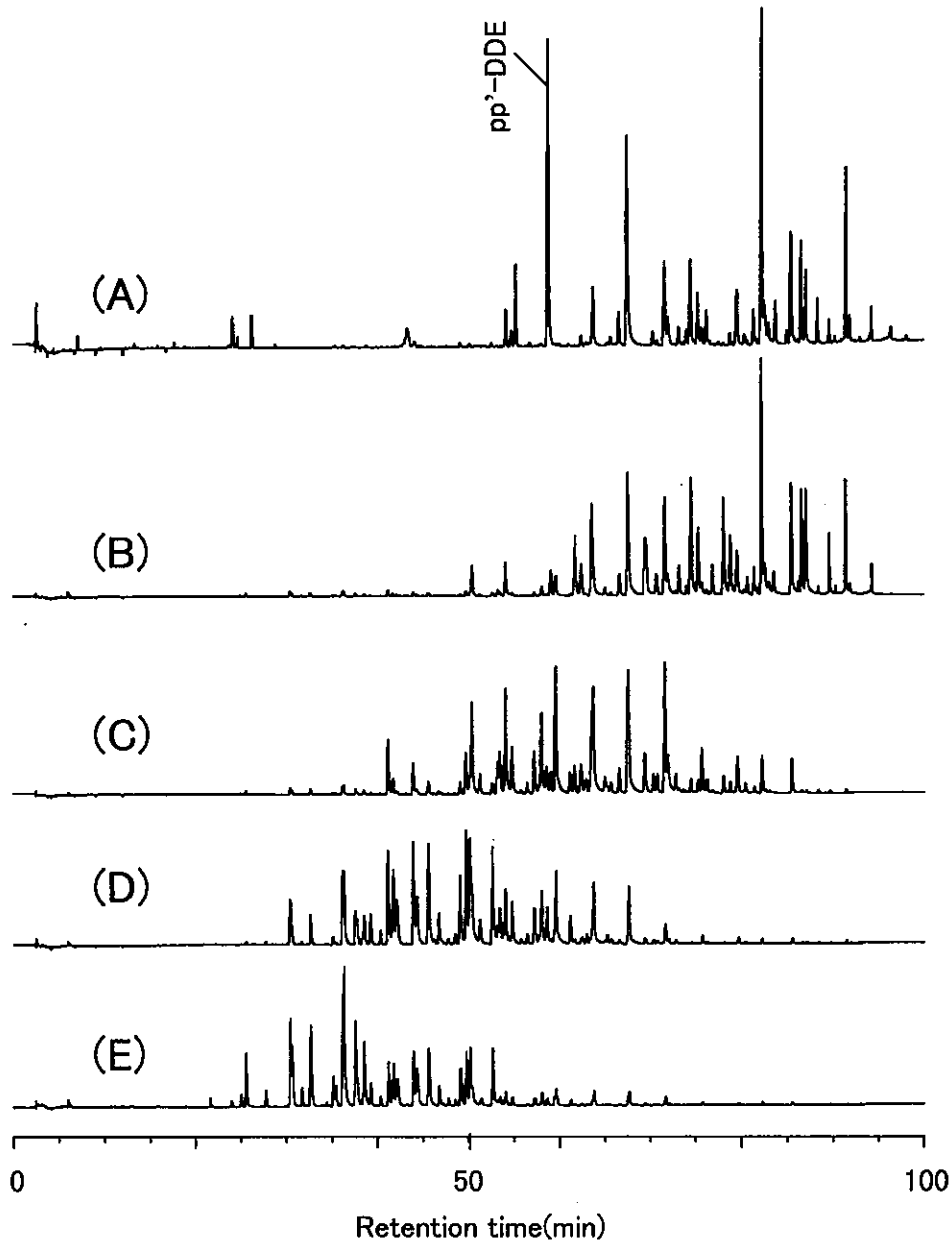


Fig. 1. Accumulation patterns of persistent PCB residues in an unhatched egg extract obtained from GC chromatograms of sample and standard solutions.

- (A) unhatched egg extract of golden eagle,
- (B) Kanechlor(KC)-600, (C) KC-500, (D) KC-400, (E) KC-300

Table 2. Comparison of Range and Mean Concentrations of Organochlorines
in Unhatched Eggs of Golden Eagles

Year	n	Sampling location								(ng/g wet weight)				
		Kamitaira of Pref. Toyama		Pref. Ooita ¹⁾		Pref. Fukui ¹⁾		Pref. Shiga ¹⁾			Scotland ²⁾			
		2001	1994	1994	1994	1994	1995	1981-1986	1981-1986		1981-1986	1981-1986		
PCBs	335 (310-360)	1,400	970	460	325 (320-330)	1,527 (1,061-2,198)	1,454 (1,232-1,718)	443 (261-753)	93 (85-100)	86	12	16	0.6	9.8 (8.5-11)
DDTs(pp'-DDE)	5.4 (5.0-5.8)	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
HCHs(β -HCH)	5.4 (5.0-5.8)	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
Dieldrin	9.8 (8.5-11)	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8

1) Data are taken from Fujita et al.[3].

2) Data are taken from Newton et al.[7].

平成14年10月1日

ていた。仮に孵化卵から雛になり、成鳥になって平均17年の生存期間 [6] 中に繁殖障害がでる可能性は、否定できないものと考えられる。

イヌワシの未孵化卵の分析データは極めて少ないが、今回の分析結果から得られた残留値を、藤田ら [3] 及びNewtonら [7] のデータと比較した (Table 2)。PCBsやHCHsでは各地の未孵化卵より低値であった。DDTsでは大分県と同レベルであり、ディルドリンはスコットランド各地より低値であった。

今回の結果から、自然環境中の有害化学物質がイヌワシの繁殖障害にどのような影響を及ぼすかについて記述することは大変困難であり、今後は、生態学的な知見と共にダイオキシン類などを含めた繁殖障害に関連する数多くの知見が必要であると考えられる。

文 献

1. 井上剛彦(1991). *Aquila chrysaetos*, 8, 1-9.
2. 富山県(2000). 富山県イヌワシ保護指針—イヌワシとの共生を目指して—, 20-21.
3. 藤田雅彦, 須藤明子, 田辺信介(1996). *Aquila chrysaetos*, 12, 1-10.
4. 日本薬学会編(2000). 衛生試験法・注解, 473-477, 金原出版.
5. 日本イヌワシ研究会(1984). *Aquila chrysaetos*, 2, 1-6.
6. 藤田雅彦(1992). *Aquila chrysaetos*, 9, 31-41.
7. Newton, I. and Galbraith, E. A. (1991). *Ibis*, 133, 115-120.

鉛給水管を使用している水道水の 鉛濃度調査

高柳 信孝 倭名 智子 松永 明信
植野 一¹ 金谷 昭男¹

Investigation of Lead Concentration in the Tap
Water Provided through the Lead Pipe

Nobutaka TAKAYANAGI, Tomoko KEMMEI, Akinobu MATSUNAGA,
Hajime UENO and Akio KANAYA

要 旨 富山県内の鉛給水管を使用している水道水の鉛濃度実態調査を行ったところ、停滞水では新基準値の0.01mg/Lを超えるものがあったが、停滞水を排出した後の流水では新基準値を超えるものはなかった。あわせて行った鉄、亜鉛、銅、マンガンの溶出状況調査では、90.5時間と停滞時間の長い停滞水で、マンガンが基準を超えるものが一例あったが、その他はすべて基準を超えるものはなかった。また、金属濃度とその他の検査項目及び調査項目との相関係数を調べたところ、停滞水における停滞時間と鉛及び亜鉛の間に高い正の相関係数がみられ、金属濃度は停滞時間に依存することが示唆された。一方、流水では、金属濃度がランゲリア指数に依存することが示唆され、すでに鉛低減化対策として行われているpH調整、腐食防止剤の使用等の腐食防止対策を支持する相関を示した。

鉛は蓄積性のある毒性物質であり、ヒトに対しては中枢及び末梢神経組織や腎臓に影響を及ぼすことから、WHOは飲料水水質ガイドライン(1993)で水質基準値0.01mg/Lを勧告している。日本でも、平成4年12月の水質基準見直しの際に、概ね10年後には0.01mg/L以下にすべきとされており、平成15年度から強化が実施される。しかし、水道に鉛給水管を使用している場合には、水道水のpH等の影響によって鉛が停滞水へ溶出し、水質基準を超えることが懸念される。鉛給水管の容易で低廉な布設替えは普及しておらず、鉛低減化対策としては、pH調整、腐食防止剤の使用、浄水

器の設置などが検討されている。これらの検討結果をまとめたものが(財)水道技術研究センター[1]により報告されており、国内では大阪市等数市での検討結果が掲載されている。また横浜市[2]や神奈川県[3]は鉛濃度実態調査を行っている。富山県でも一部鉛給水管が使用されていることから、鉛濃度低減化対策に資するため水道水の鉛濃度実態調査を行うとともに、鉛以外の金属等についても溶出状況把握のため検査を行った。

1 富山県厚生部食品生活衛生課

方 法

1. 試料水の採取

採取試料水は「検体」「追加検体」「比較検体」及び「対照浄水」の4種類とし、硝酸及び精製水で十分洗浄した容量2Lのポリエチレン容器に採取した。「検体」は、検査日の朝一番の水を2L採水した。蛇口から鉛給水管末端までの管延長が長い場合2L程度の採水では鉛給水管内の停滞水全量を採水できないと考えられる場合には、鉛管以外の配管の停滞水を流出させたのち2Lを採水し「追加検体」とした。「検体」及び「追加検体」を採水後5分間流水させ、次の2Lを採水し「比較検体」とした。また、鉛給水管を通過しない水道水（例えば浄水場の浄水等）を「対照浄水」とした。採水場所の選定及び採水は水道事業者が行い、「検体」38、「追加検体」27、「比較検体」38、「対照浄水」13を採取した。

2. 調査項目

水道事業者が、採水場所ごとに水道水停滞時間、鉛給水管布設状況（口径、管延長、布設年）、鉛給水管以降蛇口までの配管（口径、蛇口までの管延長）、浄水場から鉛給水管までの配管延長を調査した。

3. 検査項目及び検査方法

鉛はフレイムレス原子吸光光度法、鉄、亜鉛、銅及びマンガンについてはフレイム原子吸光光度法、pHはガラス電極法、残留塩素はDPD比色法で検査した。また、「対照浄水」については、水の腐食性の指標となるランゲリア指数を算出するため、蒸発残留物（溶解性物質とほぼ同等）を重量法、カルシウム硬度をイオンクロマト法、アルカリ度を滴定法で測定した。指数の計算は、上水試験方法（2001年版）の簡便計算法によった。得られた指数を、対応する「検体」、「追加検体」及び「比較検体」に当てはめた。

結果と考察

検査結果を試料水の種類ごとにヒストグラムで

まとめ図1～6に示した。なお、比較のため、データ区間及び度数のスケールは項目ごとに統一した。

①鉛

「検体」では17件が新基準値を、3件が現基準値を超え、最高は0.102mg/Lであった。「追加検体」では17件が新基準値を、3件が現基準値を超え、最高は0.199mg/Lであった。「比較検体」では新基準値を超えるものはなく、最高は0.010mg/Lであった。「対照浄水」では新基準値を超えるものはなく、最高は0.001mg/Lであった。従って、新基準を超えたものは、鉛給水管からの溶出によるものと考えられる。

②鉄

4種類の試料水はすべて基準を超えるものはなかった。「検体」では他の3種類に比べ濃度の高いものが多く、最高は0.29mg/Lであった。「追加検体」の最高は0.14mg/L、「比較検体」の最高は0.15mg/Lであった。「対照浄水」の最高は0.22mg/Lであった。

③亜鉛

4種類の試料水はすべて基準を超えるものはなかった。「検体」の最高は0.29mg/L、「追加検体」の最高は0.25mg/L、「比較検体」の最高は0.17mg/Lであった。「対照浄水」の最高は0.01mg/Lであった。

④銅

4種類の試料水はすべて基準を超えるものはなかった。「検体」の最高は0.63mg/L、「追加検体」の最高は0.23mg/L、「比較検体」の最高は0.07mg/Lであった。「対照浄水」の最高は0.01mg/Lであった。

⑤マンガン

検出されたのは「検体」で0.008mg/L、「追加検体」で0.108mg/Lの2例のみでヒストグラムは省略したが、両者は同一配管の試料水であり、「追加検体」は基準値の0.05mg/Lを超えていた。また、停滞時間は90.5時間と長かった。

⑥残留塩素

「対照浄水」以外の試料水については、試験室内で測定したものである。「比較検体」、「対照浄水」に比較して、「検体」、「追加検体」では0.1mg/L

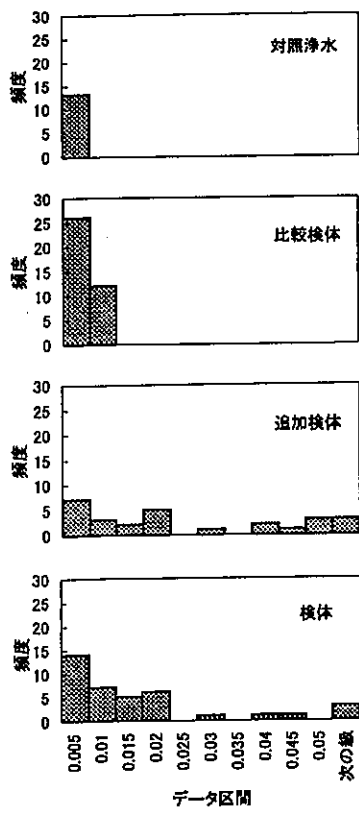


図1. 鉛濃度の度数分布

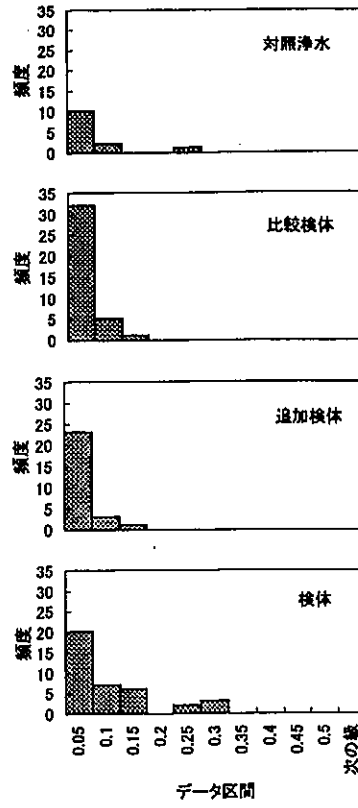


図2. 鉄濃度の度数分布

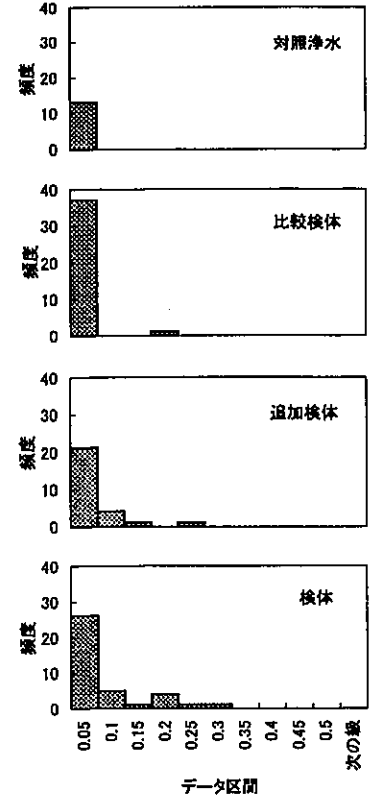


図3. 亜鉛濃度の度数分布

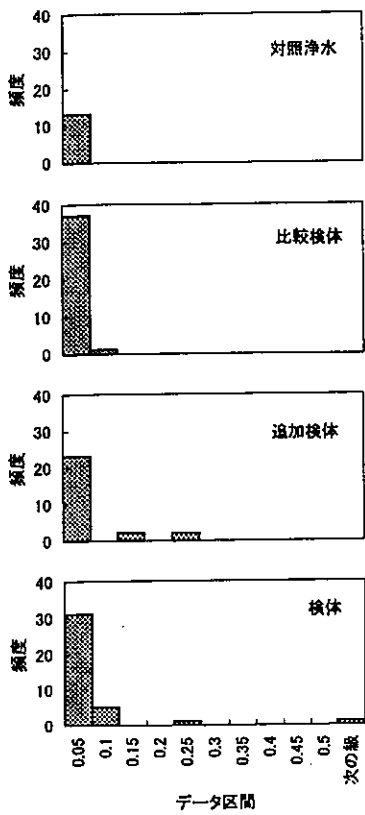


図4. 銅濃度の度数分布

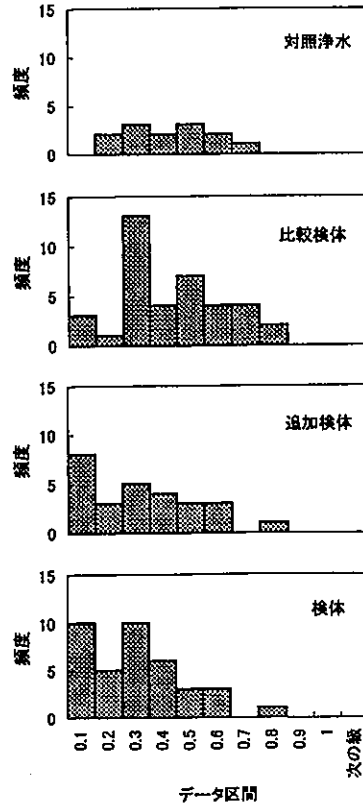


図5. 残留塩素濃度の度数分布

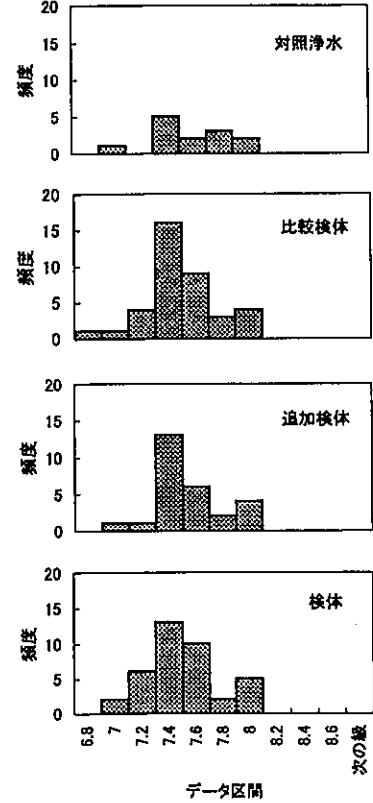


図6. pHの度数分布

未満の割合が多くなっていた。

⑦pH

4種類の試料水とも7.2~7.4が最頻値であり、分布のパターンも大きな差はなかった。

金属の溶出状況を見るため、「検体」及び「追加検体」で金属濃度の高いものについて、同一配管の「検体」「追加検体」「比較検体」から「対照浄水」までの濃度変化を調べた(図7~10)。鉛は「検体」より「追加検体」の濃度が高くなり、「比較検体」「対照浄水」へと急激に減少し、鉛管から停滞水への溶出を示唆するパターンとなった。鉄及び亜鉛は「検体」からほぼ順に減少しており、蛇口から鉛管の間での溶出を示すパターンとなった。銅は両方のパターンが混在していた。

金属溶出要因究明の一助として、金属濃度とその他の検査項目(ランゲリア指数を含む)及び調査項目との相関係数(危険率5%)を、試料水の種類(対照浄水を除く)ごとに調べた。「検体」では残留塩素-鉛(相関係数; -0.409), 残留塩素-鉄(同; -0.360), 残留塩素-亜鉛(同;

-0.428), 停滞時間-鉛(同; 0.849), 停滞時間-亜鉛(同; 0.663), ランゲリア指数-鉄(同; -0.446), pH-銅(同; 0.402)の相関が認められた。残留塩素と金属の負の相関のうち鉛の例を図11に示した。残留塩素の濃度が高いと金属濃度が低くなるのではなく、残留塩素が金属の酸化と水への溶出を促進し、自らは還元されて減少しているためと解釈される。停滞時間と金属の正の相関のうち鉛の例を図12に示した。腐食性の水との接触時間が長くなれば金属の溶出が進むためと考えられる。ランゲリア指数と鉄の負の相関(図13)については、指数値が負に傾くほど腐食性は増加するので鉄の溶出が進むためと考えられる。pH-銅の正の相関については、ボイラー水の混入等が推定される。「追加検体」では残留塩素-鉛(相関係数; -0.465), 残留塩素-亜鉛(同; -0.451), 停滞時間-鉛(同; 0.803), 停滞時間-亜鉛(同; 0.748), 鉛管延長-鉛(同; 0.468)の相関が認められた。鉛管延長と鉛の正の相関(図14)については、流速を含めた様々の条件が同一の場合、鉛

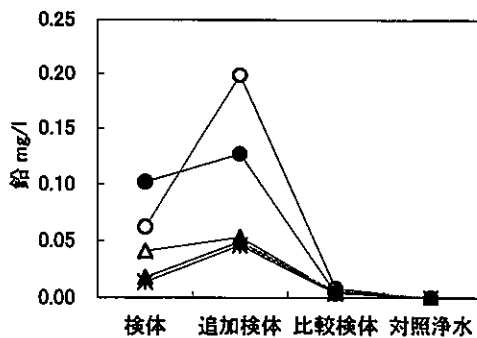


図7. 鉛の濃度分布

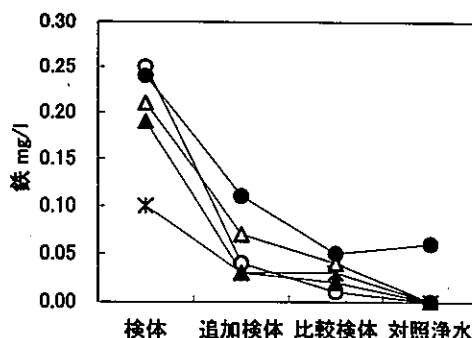


図8. 鉄の濃度分布

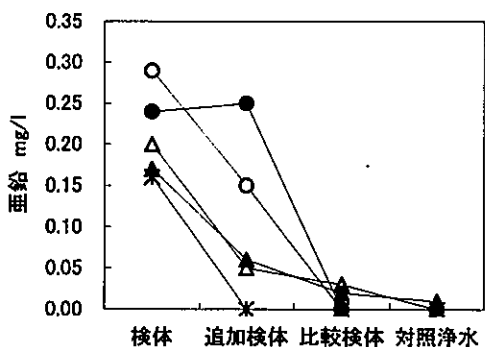


図9. 亜鉛の濃度分布

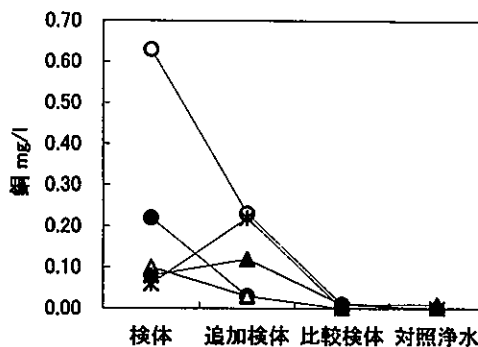


図10. 銅の濃度分布

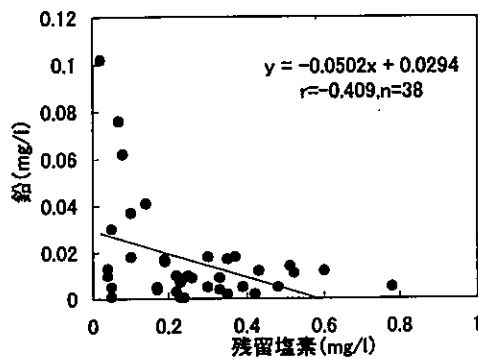


図11. 「検体」の残留塩素と鉛の関係

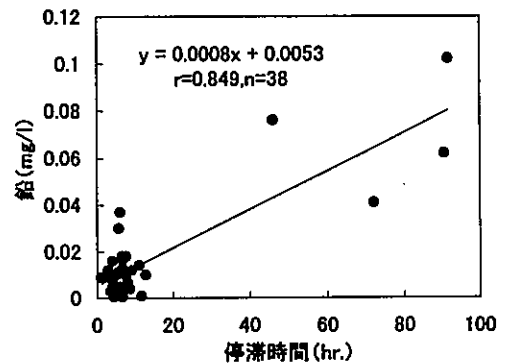


図12. 「検体」の停滞時間と鉛の関係

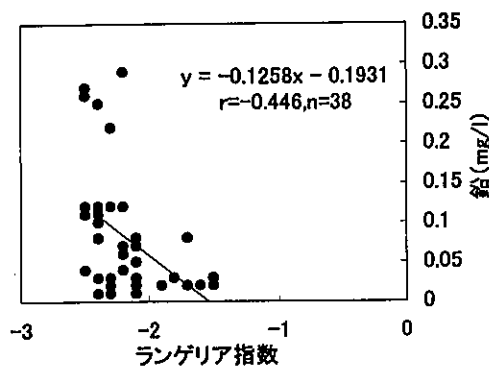


図13. 「検体」のランゲリア指数と鉛の関係

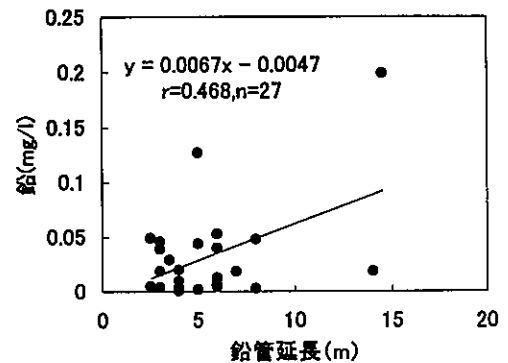


図14. 「追加検体」の鉛管延長と鉛の関係

管延長が長いほど接触時間が長くなり、鉛濃度は高くなると考えられる。「比較検体」ではランゲリア指数-鉛（相関係数；-0.363）、ランゲリア指数-鉄（同；-0.353）の相関が認められた。

「検体」と「追加検体」すなわち停滞水では、停滞時間と鉛及び亜鉛との正の相関係数が他の相関係数に比較して高く、金属溶出が停滞時間に依存することが示唆された。これは、金属濃度は流水より停滞水の方が高いという今回の調査結果、及び横浜市、神奈川県の実験結果を支持するものであった。また、「比較検体」すなわち流水では、金属濃度がランゲリア指数に依存することが示唆された。これは、すでに鉛低減化対策として行われているpH調整、腐食防止剤の使用等の腐食防止対策を支持するものであった。

謝 辞

本調査にご協力いただいた水道事業者の関係者各位に感謝いたします。

文 献

1. (財)水道技術研究センター(2001). 鉛給水管由来の鉛低減のための暫定対策検討調査報告書.
2. 嶋田俊夫, 古谷 博, 下田秀美(2001). 第52回全国水道研究発表会講演集, p560-561.
3. 小瀬恵美子, 萱沼康夫, 平岩俊也(2002). 第53回全国水道研究発表会講演集, p660-661.

富山湾における多環芳香族炭化水素の深度別濃度分布

大浦 徹 大戸 幹也 松永 明信

Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAH) by Sea Depth in Toyama Bay

Takashi OHURA, Mikiya OHTO, Akinobu MATSUNAGA

要 旨 いわゆる“深層水”として利用され始めた富山湾の海水について、その清浄性を確認するために3 m, 100m, 200m, 300mの深度における多核芳香族化合物の調査を2001年6月から2002年2月まで隔月実施した。その結果はいずれの深度、いずれの調査においてもピレン、ベンゾ(a)ピレンが検出された。深度300mにおけるその濃度は、表層水に対して約1/3から1/4であり深度依存性がみられた。また、ベンゾ(a)ピレンの濃度はピレンの約1/10であった。いずれの物質も季節による明瞭な変動はみられなかった。

近年、富山湾の深層水はその低温安定性、富栄養性、清浄性から注目され水産分野のみならず、食品、飲料水、化粧品等の幅広い分野でも利用され始めている。しかし、環境中に放出された多種多様な化学物質は最終的には海洋に流れ込むと考えられている。海水に極めて微量に含まれるそれらの有機物については、まだその実体が明らかにされていない。そこで、富山湾深層水の採取地点、滑川沖の近くに観測地点を定め、年間を通じて深度別に各種有害性有機物を測定する観測計画を策定した。今年度は、その発ガン性も指摘されている多環芳香族炭化水素を選び実施した。

材料及び実験方法

1. 材料

滑川市の県水産試験場沖でバンドン式採水器を用いて100m, 200m, 3000mの各水深から各々6 l 海水を採取した。また、比較のため表層水を3 mの深さで採水した。試料は、あらかじめアセ

トン、ヘキサソで洗浄した3 l のガラス瓶に移し、5℃の冷蔵庫で保管した。

2. 試薬

ろ紙；グラスファイバーろ紙（Whatman GF/C φ48mm 1.2μm）

ソックスレー抽出器を用い、ジクロロメタン、ベンゼンで24時間還流した後、風乾し、デシケータで保存して用いた。

ミニカラム；Waters製 OASIS HLB 6 mL
使用する直前、アセトニトリル80mLで洗浄し、メタノール、水5 mLでコンデショニングして用いた。

ベンゼン；和光純薬製、HPLC用ベンゼンを再蒸留して用いた。

アセトニトリル、メタノール、エタノール；和光純薬製 HPLC用を使用した。

蒸留水；18MΩ・cm以上の超純水を用いた。

3. 標準溶液の調製

標準液は、EPA610に準拠した、SUPELCO製

PAH MIX を適宜希釈して用いた。

4. HPLC装置及び分析条件

ポンプ；Waters 600Eの流量は1.5mL/minで下記のグラジェントを行った。

グラジェント

時間 (min)	メタノール (%)	水 (%)	パターン
0	90	10	
3	90	10	1
8	100	0	10
22	90	10	11

検出器；Shimadzu RF550A 蛍光検出器は下記の条件でプログラム運用した。

時間 (min)	Ex	Em
0.0	330nm	390nm
10.0	275nm	400nm
14.5	290nm	400nm

オートサンプラー；Waters 717Plus

カラム；野村化学製 Develosil PAHS-5
4.6mm×250mm

カラム温度 33°Cで注入量は10 μ Lであった。

5. 試験溶液の調製

海水6lをグラスファイバーろ紙でろ過した。ろ紙は水40mLで洗浄した後、デシケータで乾燥、秤量して粒子状物質の重量を求めた。さらに、ろ紙は、ベンゼン/エタノール(3:1)40mLで2度超音波抽出し、濃縮後、エタノール0.6mLで超音波溶解し、メンブレンフィルタ0.45 μ mでろ過して粒子状物質のHPLC用試験溶液とした。

一方、ろ液は、コンデショニングしたOASIS HLBに15mL/minの流速で流し吸着させ、水5mLで洗浄した後、アセトニトリル20mLで溶出しロータリ・エバポレータで濃縮乾固した。残さはエタノール0.6mLで超音波溶解し、メンブレンフィルタ0.45 μ mでろ過して溶存性物質のHPLC用試験溶液とした。

結果と考察

<粒子状物質>

各深度別の海水6Lをろ過し、デシケータで乾燥したグラスフィルタに得られた懸濁物質の量を表1に示した。

6月に採水した表層水(3m)から59mg/6Lの懸濁物質が得られた。乾燥後の色調、外観から大部分は粘土状物質と思われる。河川では豊水期にあたることから河川由来によるものと考えられる。また、8月の表層水には緑色の藻類と思われるものが多く含まれていた。6月の表層水を除き概ね含まれる粒子状物質は1~20mg/6L(0~3mg/L)であった。顕著な深度依存性はみられなかった。

表1 深度別の粒子状物質質量

採水年月	-2m	-100m	-200m	-300m	-400m
2001.6	58	7	7	20	
2001.8	12	20	8	9	
2001.10	8	3	6	5	
2001.12	9	7	9	19	
2002.2	0	2	3	4	10

単位：mg/6L

<多環芳香族>

多環芳香族化合物として、ピレン、ベンゾ(a)アントラセン、クリセン、ベンゾ(b)フェナンスレン、ベンゾ(k)フルオレン、ベンゾ(a)ピレン、ジベンゾ(a, h)アントラセン、ベンゾ(g, h, i)ペリレンの8種類について分析を行った。標準液及び2001年8月に採水した表層水及び深層水のろ紙上に捕集された粒子状物質からの抽出液のクロマトグラムはFig.1に示した。

水深3mの粒子状物質抽出液からは、5分以後に多数のピークが観測されたが、特に明瞭なピレン、ベンゾ(k)フルオレン、ベンゾ(a)ピレンのピークについて数値化した。ベンゾ(g, h, i)ペリレン近辺にもいくつかのピークがみられた。また、水深300mからのクロマトグラムにおいても、上記3物質のピークは確認できた。2001年6月から2002年2月までの5回行った調査

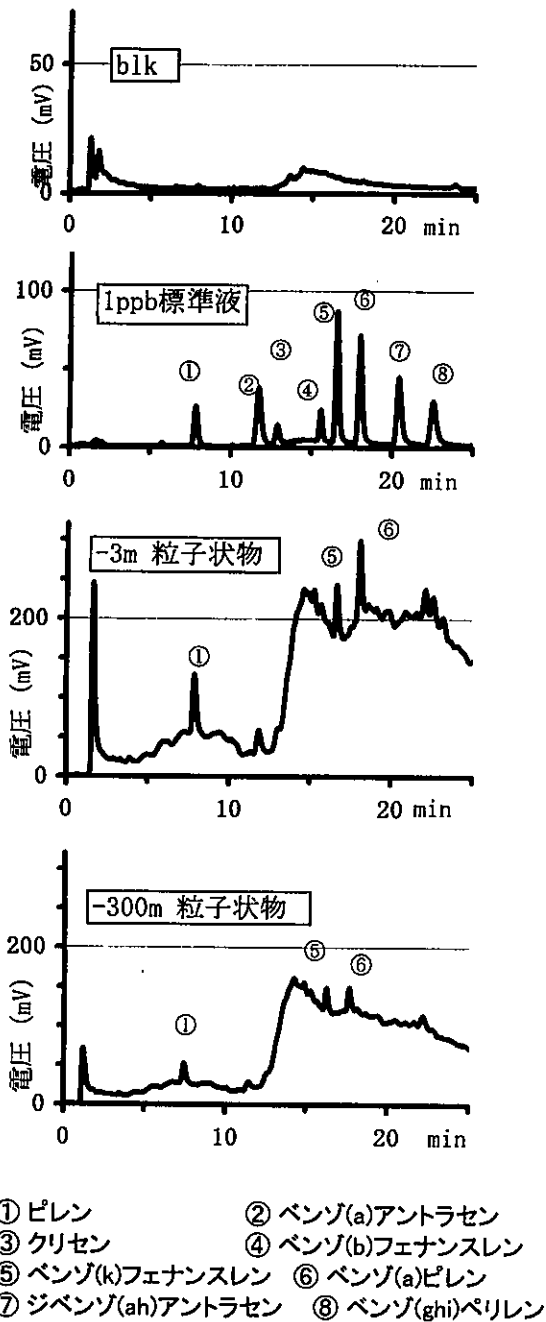


Fig. 1 標準液及び抽出物等のクロマトグラム

結果のピレンについて粒子状物質として捕集された部分と、捕集されずろ液中に含まれていた濃度を Fig. 2, 3 に示した。粒子状物質に含まれるピレンより、ろ液中に含まれるピレンに、より深度依存性がみられた。また、粒子状物質の抽出液に含まれるピレンと、ろ液中に含まれるピレンの量は概ね 1:2 であった。両者を合計した濃度についての月別、深度別濃度を Fig. 4 に示した。ベンゾ (a) ピレンはろ液中にはなく、すべて粒

子状物質としてろ紙上に捕集された。ベンゾ (a) ピレンの深度別濃度変化を Fig. 5 に示した。

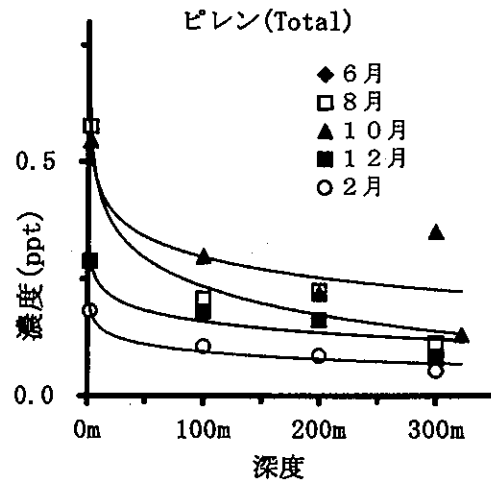


Fig. 2 粒子状物質抽出液中のピレンの月別、深度別濃度

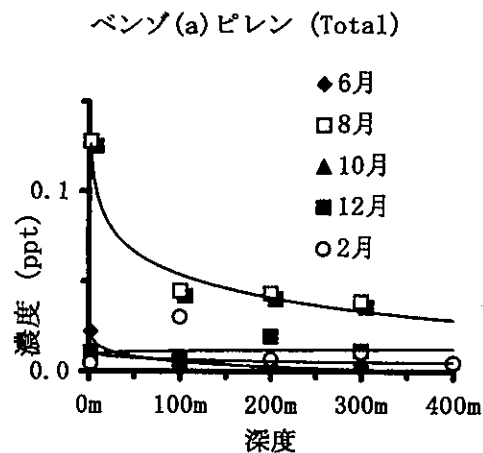


Fig. 3 ろ液中のピレンの月別、深度別濃度

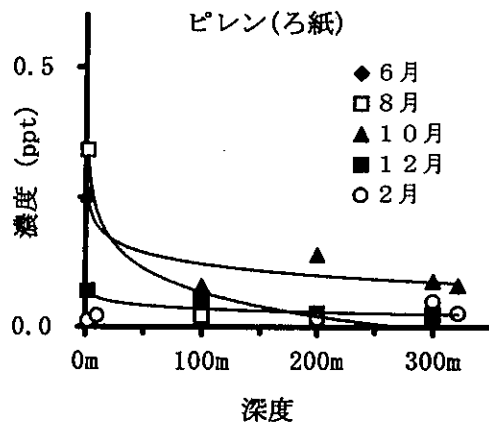


Fig. 4 ピレンの月別、深度別濃度

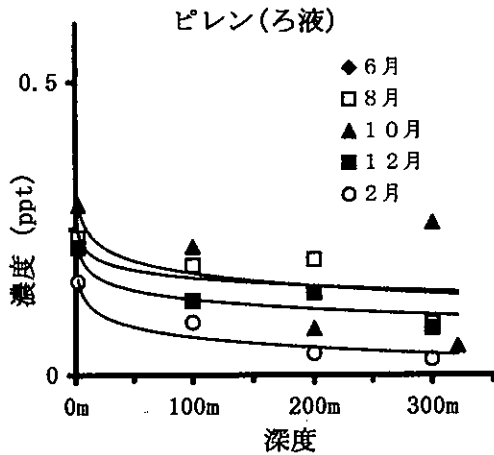


Fig. 5 ベンゾ (a) ピレンの月別、深度別濃度

両物質ともに表層水が高い値を示したが、深度依存性は明確に出来なかった。

各深度における、5回調査の平均値をプロットしたものをFig. 6に示した。

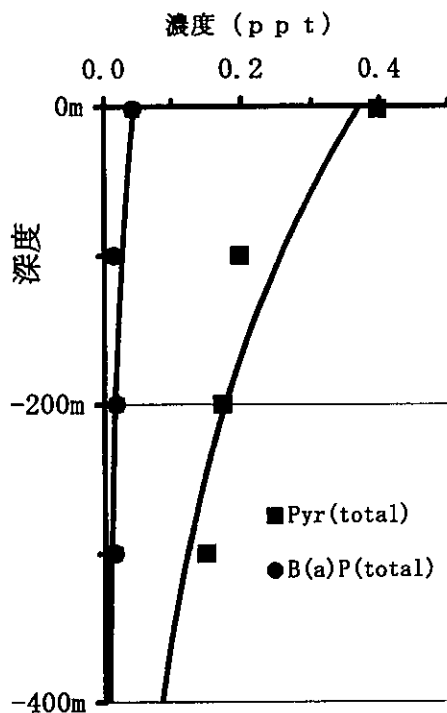


Fig. 6 ピレン、ベンゾ (a) ピレンの深度別濃度 (平均値による)

ピレンの平均値は、3mで0.34ng/L、100m、0.19ng/L、200m、0.17ng/L、300m、0.13ng/L、また、1回の測定ではあるが、400mで0.09ng/L

であった。ベンゾ (a) ピレンは各深度において0.04、0.02、0.02、0.01ng/Lと、深度を増すに従って減少する傾向が見られた。これらは、WHOの飲料水ガイドライン値700ng/Lに比べて極めて低い値であった。

8月に採水した試料のろ紙から、ベンゾ (k) フェナンスレンが表層水で0.07、100mから0.02、200mから0.03、300mから0.03ng/L検出された。その他の試料はすべて0.01ng/L以下であった。

8月採水の表層水、深層水いずれもが、ピレン、ベンゾ (a) ピレンともに他の月よりも高い値を示した。このことは、物質の垂直方向の移動が比較的短時間に行われることを示唆している。

【まとめ】

2001年6月から2002年2月まで隔月で富山湾の深度別に (3m、100m、200m、300m) PAH (ピレン、ベンゾ (a) アントラセン、クリセン、ベンゾ (b) フェナンスレン、ベンゾ (k) フルオレン、ベンゾ (a) ピレン、ジベンゾ (a, h) アントラセン、ベンゾ (g, h, i) ペリレンの8種類) について分析を行った。その結果、

- ① 粒子状物質は深度に関係なく概ね3mg/L以下であった。
- ② いずれの試料からもピレン、ベンゾ (a) ピレンが検出された。
- ③ ピレン、ベンゾ (a) ピレンは、深度とともに減少する傾向が見られた。
- ④ 深層水 (300m) のそれらは、表層水 (3m) のおよそ1/4~1/3であった。
- ⑤ ベンゾ (a) ピレンの濃度はピレンの濃度の約1/10のレベルであり、WHOの飲料水ガイドライン値700ng/Lに比べ、極めて低いレベルの値であった。
- ⑥ ピレン濃度の70%はろ液中に見いだされたが、ベンゾ (a) ピレンは100%ろ紙上にあった。
- ⑦ 季節による明瞭な変動はみられなかった。

カルシウム食品摂取が女子大生の骨代謝に与える効果

田中 朋子, 堀井 裕子, 中崎美峰子, 西野 治身
桑守 豊美¹, 石塚 盈代¹, 大浦 栄次²

Effect of Calcium Supplementation on Bone Metabolism in Students of Women's College

Tomoko TANAKA, Yuko HORII, Mineko NAKAZAKI, Harumi NISHINO
Toyomi KUWAMORI, Michiyo ISHIZUKA and Eiji OOURA

要 旨 カルシウム入りゼリーを若年女性に2ヶ月間摂取させたところ、ゼリーの摂取総数が多い者ほど尿中のピリジノリン、デオキシピリジノリンが低下し、骨吸収を抑制させる可能性が示された。さらに、“毎日牛乳を飲まない”、“日頃からだを動かさない”、“緑黄色野菜好きでない”としたライフスタイルが不良な者で骨吸収を抑制する傾向が認められた。

寝たきりの原因疾患の一つである骨粗鬆症の予防には若年期の最大骨量が高める事が重要である。しかし、10代～20代の女性はやせ願望が強く、極端なダイエット、欠食等の食生活の乱れが指摘されている [1]。特に、骨形成に不可欠なカルシウム (Ca) の充足率は平成12年度の国民栄養調査 [2] によれば15～19歳では72%とその不足が問題視されている。

そこで、骨形成の最終段階と考えられる18歳の女子大生に対し、Ca入りゼリーの経口摂取の骨代謝への影響を調べた。さらに、その影響がライフスタイルの違いで異なるかを検討した。

対象および方法

大学1年女子で本調査の主旨に同意が得られた47名を全対象者とし、被験者の意志に基づき22名をCa含有ゼリー群とし、25名を対照群とした。

調査期間は平成11年10月～12月の2ヶ月間である。

ゼリー1包中にはCa (発酵乳酸Ca) 150mg, カゼインフォスフォペプチド (CPP) 52.8mg, ビタミンD₃ 58IUを含む。これを就寝前に1包ずつ2ヶ月間摂取させた。しかし、中間時点での摂取数調査により、飲み忘れが認められたためCa付加を確実にするため、後半1ヶ月はウィークデイの日中に1包追加した (ゼリー群のゼリー摂取数は、58個～79個、平均75個、Ca11250mg相当であった)。

骨量はLunar社製Achilles (超音波法) を用い右踵骨のstiffnessとして算出した。Achillesの測定精度は、山崎ら [3] の報告によると健康者3名の10回繰り返し測定の変動係数は0.87%であり、良好と考えられた。

骨代謝指標は骨形成指標として血清中の骨型アルカリフォスファターゼ (BAP)、骨吸収指標として早朝尿中のヒドロキシプロリン (Hyp)、ピリジノリン (PYD)、デオキシピリジノリン

(DPD) を測定した。尿中成分はクレアチニン (Cr) で補正し、以下の解析には幾何平均値を用いた。測定方法はすでに報告したとおりである [4]。

身長は調査開始時のみ、体重、stiffness、骨代謝指標は開始時と終了時の2回測定した。

骨代謝に影響すると考えられるライフスタイル、初経年齢、骨折経験、ダイエット経験等について調査開始時にアンケート調査を実施した。統計処理は2群間の平均値の比較にt検定または対応のあるt検定を行い、比率の差の検定には χ^2 検定をおこなった。各変数の相関の検討にはPearsonの相関係数を用いた。また、骨代謝に影響を与える要因の寄与を検討するため変数増減法 (F-in=2, F-out=2) による重回帰分析を行った。有意水準は5%未満とした。

結 果

1. 調査開始時の身体計測値、stiffness、骨代謝指標およびライフスタイルについて

各群の調査開始時の基本特性を表1に示した。身長、体重、BMI (kg/m²) に2群間の違いは認められなかった。同様に開始時のstiffness、各骨代謝指標は2群間に違いは認められなかった (表2, 3)。

アンケート結果を図1に示した。運動習慣について、小・中学校、高校で運動をしていた者はゼ

リー群、対照群それぞれ15名68%、16名64%であった。しかし、現在運動習慣を有する者は4名18%、5名20%と少なかった。また、“日頃からだを動かすか”という設問に対してはゼリー群11名50%、対照群9名36%が“動かす”と回答した。

牛乳摂取量について、“小・中学校、高校で毎日飲んでた (1日1本以上)”と回答した者はゼリー群19名86%、対照群19名76%であった。しかし、現在毎日飲んでいる者についてみると、1本以上はそれぞれ10名45%、3名12%のみであり、毎日1/2本以上を合わせても13名59%、7名28%と少なく、特に対照群が少ない傾向にあった (p<0.1)。一方、食品群毎の好き嫌いについては2群間に差は認められなかった。

その他、骨折経験を有する者はゼリー群が2

表1. 対象者の身体計測値

		調査開始時	終了時
		平均値±S.D.	平均値±S.D.
ゼリー群 (n=22)	身長(cm)	159.8±5.0	—
	体重(kg)	53.0±5.4	53.5±4.7
	BMI	20.8±2.2	21.0±2.0
対照群 (n=25)	身長(cm)	157.9±4.6	—
	体重(kg)	53.3±8.7	53.6±9.0
	BMI	21.4±3.4	21.5±3.6

表2. 調査前後のStiffness

	調査開始時		終了時	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
ゼリー群 (n=22)	93.1**	15.8	99.3**	15.1
対照群 (n=25)	98.5*	14.4	102.6*	15.8

**p<0.01, *p<0.05 対応のあるt検定

表3. 調査前後の骨代謝指標

項目	調査開始時		終了時		
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
ゼリー群 (n=22)	BAP(B.L.U/l)	1.40	0.29	1.37	0.30
	Hyp/Cr [#] (mg/gCr)	42.0	1.38	40.7	1.36
	PYD/Cr [#] (nm/mmolCr)	26.3	1.21	25.8	1.20
	DPD/Cr [#] (nm/mmolCr)	4.8	1.31	4.5	1.28
対照群 (n=25)	BAP(B.L.U/l)	1.40	0.31	1.38	0.24
	Hyp/Cr [#] (mg/gCr)	44.4	1.42	43.6	1.38
	PYD/Cr [#] (nm/mmolCr)	27.2	1.19	28.3	1.17
	DPD/Cr [#] (nm/mmolCr)	5.1	1.26	5.3	1.27

#:幾何平均値、幾何標準偏差

+C18:p<0.1 2群間の比較

名、対照群が3名、ダイエット経験者はそれぞれ2名、5名であり2群間に違いは認められなかった。

2. 調査終了時の身体計測値, stiffness および骨代謝指標について

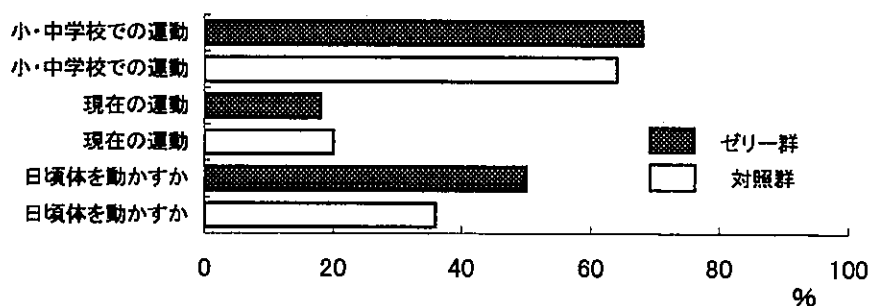
体重, BMIは2群間に違いは認められなかった。また、対応のある検定によっても変化は認められなかった。しかし、stiffnessについては2群間に違いは認められなかったものの 対応のあ

る検定では終了時には2群ともに高くなっていた(ゼリー群 $p < 0.01$, 対照群 $p < 0.05$)。

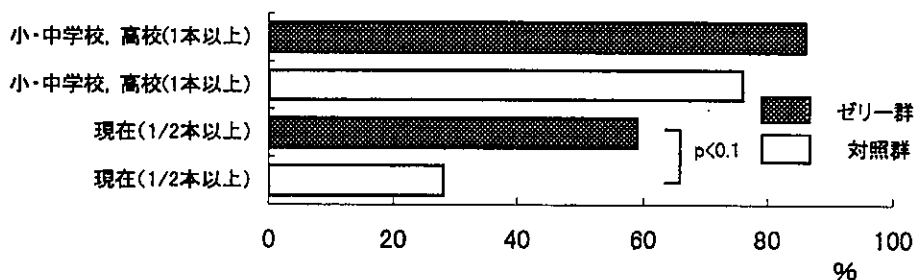
各骨代謝指標は、対応のある検定では2群とも変化は認められなかった。しかし、ゼリー群の調査終了時のPYD/Cr, DPD/Crはそれぞれ対照群に比べ低い傾向を示した(各々 $p < 0.1$, 表3)。

3. stiffness, 骨代謝指標の変化率について

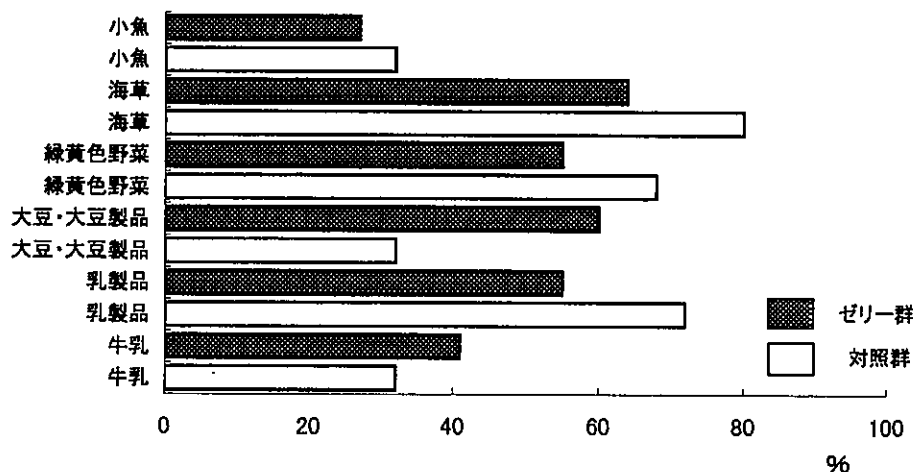
stiffness, 各骨代謝指標の変化率 ((2ヶ月後-



運動習慣に関するアンケート結果



牛乳摂取習慣に関するアンケート



食習慣に関するアンケート結果(好きと回答した割合)

図1. アンケート結果

スタート時) / スタート時 × 100} をそれぞれ % stiffness, % BAP, % Hyp/Cr, % DPD/Cr, % PYD/Cr とし 2 群間で比較したが (表 4), いずれも有意な差は認められなかった。

ゼリー群について、ゼリーの摂取総数とこれらの変化率との関連を検討したところ、%DPD/Cr と負の相関が認められた (図 2, $r = -0.467$, $p < 0.05$)。

4. ライフスタイルと骨代謝指標の変化率について

食習慣、運動習慣に関するアンケート結果毎に % stiffness, 各骨代謝指標の変化率を比較したところ、食習慣について、対照群はいずれの項目においても違いは認められなかった (図表なし)。しかし、ゼリー群では“毎日牛乳を飲まない”の % PYD/Cr, % DPD/Cr が“毎日 1/2 本以上飲む”に比べ低く ($p < 0.05$)、 “緑黄色野菜が好きでない”の % PYD/Cr が“緑黄色野菜が好き”に比べ低い傾向を示した ($p < 0.1$)。運動習慣につい

表 4. stiffness・骨代謝指標の変化率

	ゼリー群 (n=22)		対照群 (n=25)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
%Stiffness	6.4	10.2	4.4	9.6
%BAP	-1.7	12.9	-0.8	8.5
%Hyp/Cr	-2.5	18.9	3.1	31.0
%PYD/Cr	-1.3	17.3	3.8	13.9
%DPD/Cr	-5.3	22.9	3.8	19.9

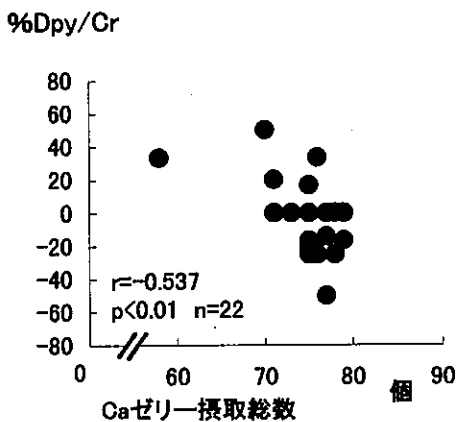


図 2. Crゼリー摂取総数と % Dpy/Cr

ても対照群に違いは認められなかったが、ゼリー群では“日頃からだを動かさない”の % DPD/Cr が“日頃からだを動かす”に比し有意に低い値であった ($p < 0.05$, 図 3)。

そこで、2 群について %PYD/Cr, %DPD/Cr を基準変数とし、体重、初経年齢、ダイエット経験、骨折経験の有無、それに“現在の牛乳摂取”、“緑黄色野菜が好きか”、“日頃からだを動かすか”を説明変数とし、ゼリー群ではさらにゼリー摂取総数を加え重回帰分析をおこなったところ、対照群には採択される変数はなかったが、ゼリー群では“緑黄色野菜が好きでない”が PYD/Cr を低下させ、“ゼリー摂取総数多い”、“日頃からだを動かさない”、“毎日牛乳を飲まない”が DPD/Cr を低下させていた (表 5)。

考 察

stiffness は 2 ヶ月後にゼリー群で約 6 %、対照群で約 4 % 増加している。しかし、我々の調査結果 [6] では 20 歳前後の女性が 1 年間に増加する stiffness が、約 1.5 % であったことから 2 ヶ月間で数 % も増加するとは考えにくい。このことについて伊木ら [5] は stiffness は測定環境の温度による影響を受け、温度が低いと高くなることを報告している。今回の調査では開始時が 10 月、終了時が 12 月であり、2 ヶ月後には気温が低かったと考えられ、それが stiffness 増加の一因となったのではないかと考えられる。

若年女性の骨量調査についての報告は多いが、その中で問題視されているのは欠食、極端なダイエット、運動不足等のライフスタイルの乱れである [1, 8]。今回の調査対象者のダイエット経験者は我々のこれまでの調査に比べ少なかった [9]。しかし、運動習慣を有する者、毎日牛乳を飲む者は 2 群とも少なく、ライフスタイルは必ずしも良好とは言えなかった。

若年女性の Ca は国民栄養調査結果で常に不足している。我々も Ca 不足についてはこれまでも報告している [6]。今回の対象者について 1

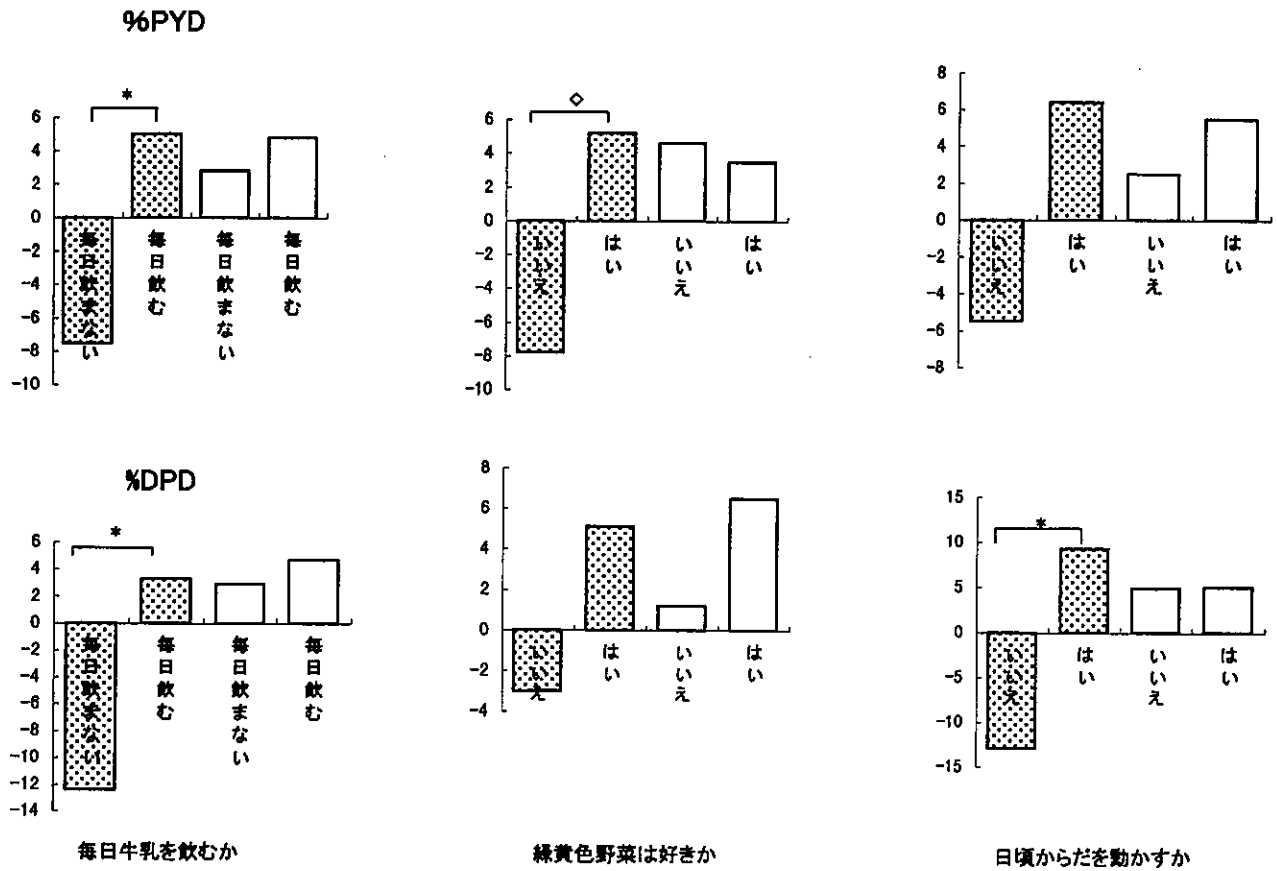


図3 ライフスタイル別骨吸収指標の変化率

*:p<0.05 ◇:p<0.1

■:ゼリー群
□:対照群

表5 骨代謝指標の変化率に対する体重、初経年齢、ライフスタイル要因の重回帰分析

基準変数	—ゼリー群—	
	%DPYR/Cr 標準偏回帰係数	%PYR/Cr
体重(kg)	—	—
初経年齢(歳)	—	—
骨折経験(あり=1, なし=0)	—	—
ダイエット歴(あり=1, なし=0)	—	—
ゼリー摂取総数	-0.386*	—
日頃からだを動かすか(はい=1, いいえ=0)	0.493*	—
現在の牛乳摂取量(毎日飲む=1, 飲まない=0)	0.402 ⁺	—
緑黄色野菜好きか(はい=1, いいえ=0)	—	0.383 ⁺
	R ² =0.51	R ² =0.15

*:p<0.05, +:p<0.1 R²:決定係数

F-in=2, F-out=2

—:採択されなかった変数

日当たりの牛乳摂取量を計算するとゼリー群で100 ml, 対照群が68mlしかなかった。このことについて、塚原らは成長期の女子について牛乳摂取状況とCa摂取量との関連を調査しており、1日200 ml牛乳を飲む者のCa摂取量は平均581mgであり1日1本では足りないと述べている [9]。今回の対象者(18歳)のCa所要量は600mgでありCaは慢性的に不足していると考えられる。そのような状況で今回のCaの補充量をみてみると、ゼリー1包中のCaは150mgであり、60日間の平均摂取総数(75個)から計算すると1日当たり約188mgになる。現状を考えると188mgのCaの補充が必ずしも充分とは思えない。しかし、ゼリー中のCaが発酵乳酸Caである事、VD₃、CPPが同時に強化されていることもあり、吸収率は高かったのではないかと推察され、ゼリー摂取の多い者ほど、Caが多く補充されたと言えるであろう。ゼリー摂取量に伴ってDPD/Crが低下していた事から、Ca補充は骨吸収を抑制していると考えられ、骨量増加に有効であると思われる。

さらに、ゼリー群の中でもCaゼリーの摂取総数とは独立して、“毎日牛乳を飲まない”“緑黄色野菜好きでない”“日頃からだを動かさない”といった生活習慣の悪い者ほど骨吸収の低下が認められ、Caゼリーによる効果が大きいのではないかと考えられた。

今後は、今回の調査結果を基にライフスタイルが不良な者に対してより長期間のCa付加をおこない、骨代謝指標の変化のみならず骨量の変化をも捉える事が重要と思われる。

謝辞：本調査を実施するにあたりサンプルを提供していただいた共栄製薬の皆様に深謝いたします。

文 献

1. 広田孝子, 広田憲二 (1992). 臨床栄養, 81, 768-774.
2. 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室栄養調査係 (2002). 厚生指針, 49, 38-47.
3. 山崎 薫, 串田一博, 大村亮宏, 佐藤倫生, 佐藤義弘, 井上哲郎 (1992). Therapeutic Research, 13, (8), 585-593.
4. 田中朋子, 西野治身, 堀井裕子, 熊西忠郎, 鏡森定信 (1996). 富山衛研年報, 19, 154-157.
5. M. Iki, E. Kajita, S. Mitamura, H. Nishino, T. Yamagami and N. Nagahara (1999). Osteoporosis International, 10, 462-467.
6. 堀井裕子, 中崎美峰子, 田中朋子, 西野治身, 萩原千佳子, 飯田恭子, 高井なおみ, 加藤一之, 守田万寿夫, 福島啓子, 木屋 昭, 松倉知晴 (2001). 富山衛研年報, 24, 147-155.
7. 田中朋子, 堀井裕子, 中崎美峰子, 西野治身, 尾崎一郎, 小島泰夫, 桑守豊美 (1998). 富山衛研年報, 21, 156-160.
8. 麻見直美, 塚原典子, 江澤邦子 (2000). Osteoporosis Japan, 8, 227-230.
9. 塚原典子, 佐藤和人, 江澤邦子 (1997). Osteoporosis Japan, 5, 97-102.

骨量獲得期における女子学生の 骨密度・骨代謝指標と初潮・生活習慣との関連

堀井裕子, 中崎美峰子, 田中朋子, 西野治身, 山上孝司¹

Relationship of Bone Mineral Density and Bone Metabolic Markers to Post Menarche Period and Lifestyle-related Factors during Bone Mass Acquisition in Girl Students

Yuko HORII, Mineko NAKAZAKI, Tomoko TANAKA,
Harumi NISHINO and Takashi YAMAGAMI¹

要旨 中学2年生女子の橈骨骨密度および骨代謝指標を測定し, 体格および第二性徴との関連を調べた。さらに, 生活習慣が骨密度に及ぼす影響を検討し, 以下の結果を得た。

1. 中学2年生女子の橈骨骨密度は成人女性に比べて低かった。骨代謝指標値は成人女性より高値であった。
2. 体格と骨密度の関連では, 体重が多いものほど骨密度が高値を示した。
3. 第二性徴の影響を検討するため初潮との関連をみたところ, 初潮発来後の月数が長いほど骨密度は高値を示した。骨代謝では全ての指標において初潮発来後月数が長いものほど低かった。
4. 骨密度と生活習慣の関連を検討したところ, 骨密度は小学時代に運動クラブを週3回以上実施していたもの, 現在牛乳を1日600ml以上摂取しているもので高値であった。

若年女性の骨密度の推移については, 初潮発来の頃に急激に骨密度が増加し, 10歳代後半に最大に達すると報告されており [1, 2], 思春期にできるだけ骨密度を高めることが将来の骨粗鬆症の予防に重要である。

女性の骨密度に影響する因子として, 体重, 運動, カルシウム摂取, ダイエットなどが報告されている [3]。我々が調査した女子短大生の生活習慣は, 運動頻度, カルシウム摂取量ともに少なく [4], その生活は骨密度増加に対し負に働く要因を持つ者が多かった。現代の若年者の生活は, 小学, 中学校までは学校給食の実施や運動クラブ

参加率が高いこと等からある程度の栄養素摂取量や運動量が確保されていると考えられる。しかし, 中学卒業後は両者ともに減少し, 生活習慣が骨密度増加に対して悪い方向へ変化すると思われる。そこで我々は, より若い時期から骨密度増加に効果的な生活習慣を身につけることが重要と考え, 県内女子中学生を対象に発育や日常生活の状況, さらに生活習慣の変化が骨密度および骨代謝に及ぼす影響についての追跡調査を開始した。今回は1年目の結果を報告する。

1. 北陸予防医学協会

対象および方法

対象者は富山県H市の3校の中学2年生女子210名である。対象者には事前に本調査についての説明を文書により行い、受診者と保護者から承諾書を得た。承諾が得られたのは153名であった。このうち、骨密度および骨代謝指標の測定、アンケート調査を実施できたのは151名であった。今回の解析には、1年以内に骨折経験があるものと骨代謝に影響を与えるような疾患のあるものを除いた141名を対象とした。

骨密度の測定はDXA法(DTX-200 OSTEOMETER社製)により非きき腕の橈骨遠位部を測定した。骨代謝指標は骨形成指標として、血清中の骨型アルカリファスファターゼ(BAP, 窪田の方法[5]), インタクトオステオカルシン(OC, ELISA法)およびγカルボキシグルタミン酸(Gla) 残基含有オステオカルシン(GlaOC, ELISA法), 骨吸収指標として早朝尿中のI型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX, ELISA法), ピリジノリン(PYD, HPLC法), デオキシピリジノリン(DPD, HPLC法)およびヒドロキシプロリン(Hyp, 池田らの方法[6])を測定した。尿中成分は濃度補正のためクレアチニン比(/Cr)として表した。解析にあたり尿中の骨代謝指標は対数正規分布を示したので対数変換した値を用いた。

身長および体重は検診当日に測定し、生活習慣については、初潮発来の有無および発来の年・月、月経の状況、小学時代および現在の運動クラブ実施状況、身体活動の状況、小学時代および現在の牛乳摂取量、カルシウムを多く含む食品の摂取頻度、食習慣等を自記式の調査票で調査した。また、運動の指標として、起床時から就寝時までの3日間の歩数を歩数計(タニタ ハローウォーク)で測定し、1日平均歩数を算出した。体力テストの結果は学校が別途実施したものをを用いた。

統計的検定は、平均値にはt検定または一元配置分散分析によって行い、多重比較はBonferroniの方法を用いた。相関の検討にはPearsonの相関係数を用いた。また、骨密度に影響を与える要因の寄与を検討するため、F値(F-in=2, F-out=2)による変数増減法を変数選択方法として重回帰分析を行った。

結 果

1. 対象者の体格、骨密度、骨代謝指標測定値について

対象者の体格は身長157.2±5.2cm, 体重49.6±7.3kgであり、身長は平成12年度学校保健会調査の全国平均値(160.2±7.6cm)よりやや低値を示し、体重は相違なかった(全国平均50.6±10.6kg)。

表1 対象者の骨密度と骨代謝指標測定値

	中学2年生女子			有経成人女性(参考値) ^A		
	人数	平均	標準偏差	平均	標準偏差	文献
骨密度 (g/cm ²)	141	0.363	±0.050	0.476	± 0.054	[7]
BAP (BLU)	141	3.2	±1.4	1.0	± 0.3	[8]
OC (ng/ml)	140	35.4	±15.7	5.6	± 2.7	[9]
GlaOC (ng/ml)	140	10.3	±4.2	3.0	± 1.9	[10]
NTX [#] (nM BCE/mMCr)	141	135.5	(1.89)	23.9	± 11.9	[9]
PYD [#] (nmol/mmolCr)	141	67.9	(1.42)	20.3	(1.35)	未発表データ
DPD [#] (nmol/mmolCr)	141	12.2	(1.53)	4.0	(1.42)	未発表データ
Hyp [#] (mg/gCr)	141	81.1	(1.49)	27.2	(1.41)	[8]

幾何平均と幾何標準偏差
A 20~50歳代の日本人有経女性

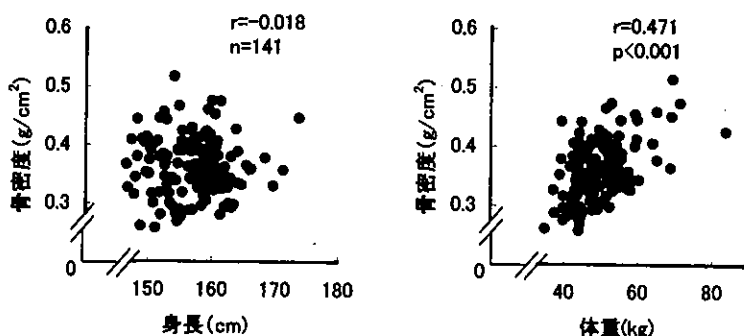


図1 骨密度と身長、体重との関係

表1に対象者の骨密度、骨代謝指標測定値を示した。また、成長期の骨代謝を評価するための参考値として、健全な有経成人女性（成人女性）の値を併記した。両者の骨密度、骨代謝指標測定値を比較すると、中学2年生女子は成人女性に比べて骨密度は低く、骨代謝指標は全ての指標で高値であった。

体格と骨密度との相関をみると（図1）、身長は $r=-0.018$ 、体重は $r=0.471$ ($n=141$ $p<0.001$)で、骨密度は身長と関連はみられなかったが体重と正の有意な相関を示した。

表2 初潮後月数別骨密度

初潮後月数	人数	骨密度(g/cm^2)	
		平均	標準偏差
初潮前	9	0.306 ± 0.032	
1-11	26	0.333 ± 0.040	
12-23	45	0.357 ± 0.038	
24-35	36	0.377 ± 0.039	
36-47	14	0.404 ± 0.043	
47ヶ月以上	4	0.446 ± 0.029	
一元配置分散分析		$p<0.001$	

表3 初潮後月数別骨代謝指標測定値

初潮後月数	人数	BAP(BLU)		OC(ng/ml)		GlaOC(ng/ml)	
		平均	標準偏差	人数	平均	標準偏差	平均
初潮前	9	5.9 ± 2.4		9	47.1 ± 14.6		14.5 ± 6.2
1-11	26	4.1 ± 1.1	**	26	50.1 ± 18.8	**	11.9 ± 4.2
12-23	45	3.5 ± 1.0		45	36.2 ± 13.3		11.0 ± 4.2
24-35	36	2.4 ± 0.6	**	36	28.4 ± 8.2		8.6 ± 2.7
36-47	14	2.0 ± 0.6		13	22.9 ± 6.0		8.2 ± 2.7
47ヶ月以上	4	1.9 ± 0.5		4	17.4 ± 4.8		6.2 ± 2.5
一元配置分散分析		$p<0.001$		$p<0.001$		$p<0.001$	

初潮後月数	人数	NTX [#] (nM BCE/ mM Cr)		PYD [#] ($nmol/mmolCr$)		DPD [#] ($nmol/mmolCr$)		Hyp [#] (mg/gCr)	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
初潮前	9	263.6 (1.65)		104.5 (1.32)		18.4 (1.47)		117.2 (1.57)	
1-11	26	232.8 (1.55)	**	94.2 (1.25)	**	18.6 (1.35)	**	113.0 (1.33)	
12-23	45	155.6 (1.51)		72.3 (1.29)		13.2 (1.36)		87.9 (1.41)	
24-35	36	93.8 (1.63)	**	54.3 (1.24)	**	9.5 (1.34)	**	65.3 (1.26)	
36-47	14	73.8 (1.71)		49.0 (1.27)		8.3 (1.28)		57.0 (1.32)	
47ヶ月以上	4	44.1 (1.72)		43.1 (1.12)		7.2 (1.26)		41.4 (1.11)	
一元配置分散分析		$p<0.001$		$p<0.001$		$p<0.001$		$p<0.001$	

** $p<0.01$ * $p<0.05$
幾何平均と幾何標準偏差

2. 第二性徴と骨密度, 骨代謝指標との関連

第二性徴と骨密度, 骨代謝指標との関連を検討するため, 初潮発来後の月数別で骨密度, 骨代謝指標測定値を比較した(表2, 3). 骨密度は初潮発来前(初潮前)の群に比べて発来後の群が高く, 発来後月数が長い群ほど高くなる傾向を示した. 骨代謝指標は骨形成, 骨吸収の全ての指標が初潮発来後に低くなる傾向を示し, 初潮発来後の月数が長い群ほど低値となった.

骨密度と骨代謝指標との関連をみると, 骨密度は全ての骨形成・骨吸収の指標との間に有意な負の相関があり(BAP $r=-0.567$, OC $r=-0.499$, GlaOC $r=-0.318$, NTX $r=-0.588$, PYD $r=-0.620$, DPD $r=-0.566$, Hyp $r=-0.549$ 全て $p<0.001$), 骨密度が低いほど骨代謝指標が高値を示した.

3. 骨密度と生活習慣との関連

各生活習慣の要因別に骨密度を比較した. 表4に月経状況, 身体活動状況別に骨密度を示した.

月経の状況, 睡眠時間, テレビ・テレビゲーム時間の別では, 骨密度に差はみられなかった. 運動との関連では, 小学時代に週3回以上運動クラブ活動をしていた群の骨密度が有意に高値を示した. 現在の運動クラブ実施回数や普段の活動性の違いでは骨密度に差はみられなかった. また, 1日歩数別でも違いはなかった.

表5に食品摂取頻度および食習慣別に骨密度を示した. 食品摂取では, 現在の牛乳摂取量が多い群で骨密度が高い傾向を示し, 1日牛乳摂取量600ml以上と未満に分けて比較すると, 600ml以上摂取群の骨密度が有意に高値を示した. 他の乳製品, 納豆, 大豆製品, 海藻, 小魚の摂取頻度と骨密度に関連はみられなかった. 食習慣の違いでは骨密度に差はなかった.

体力指標としてスポーツテストの結果を用い, 骨密度との関連を検討したところ(表6), 握力は骨密度と正の相関がみられた.

次に, 骨密度と今回関連がみられた要因と骨密

表4 月経状況および身体活動状況別骨密度

項目	カテゴリー	人数	平均	標準偏差	一元配置分散分析
生理	毎月ある	113	0.370	± 0.048	ns
	2ヶ月に1回以下	11	0.349	± 0.034	
ダイエットをしたことがあるか	ある	24	0.376	± 0.038	ns
	ない	117	0.361	± 0.051	
睡眠時間	7時間未満	22	0.373	± 0.041	ns
	7時間以上8時間未満	76	0.361	± 0.049	
	8時間以上	43	0.363	± 0.055	
テレビまたはテレビゲームの時間	2時間未満	12	0.345	± 0.055	ns
	2時間以上3時間未満	36	0.364	± 0.061	
	3時間以上4時間未満	47	0.364	± 0.041	
	4時間以上	44	0.369	± 0.047	
小学校時代運動クラブ回数	0回	49	0.353	± 0.045	** ** p<0.01
	週に3回未満	39	0.350	± 0.048	
	週に3回以上	49	0.383	± 0.051	
現在運動クラブ回数	0回	43	0.357	± 0.053	ns
	週に7回未満	34	0.362	± 0.048	
	週に7回以上	55	0.370	± 0.048	
ふだん体をよく動かすか	よく動かす	90	0.364	± 0.048	ns
	あまり動かさない	50	0.363	± 0.053	
体を動かすことが好きか	すき	120	0.362	± 0.049	ns
	きらい	21	0.371	± 0.051	
1日平均歩数	1万歩未満	14	0.362	± 0.048	ns
	1万歩以上2万歩未満	83	0.365	± 0.051	
	2万歩以上	44	0.361	± 0.048	

ns 有意差なし

** p<0.01

表5 食品摂取頻度および食習慣別骨密度

項目	カテゴリー	人数	平均	標準偏差	一元配置 分散分析
小学校時代の1日牛乳摂取量	400ml未満	79	0.361	± 0.049	p<0.1
	400ml以上600ml未満	41	0.357	± 0.044	
	600ml以上	21	0.387	± 0.059	
現在の1日牛乳摂取量	200ml未満	7	0.331	± 0.032	p<0.1
	200ml以上400ml未満	67	0.360	± 0.046	
	400ml以上600ml未満	44	0.363	± 0.050	
	600ml以上	23	0.384	± 0.059	
乳製品(牛乳をのぞく)	毎日食べる	77	0.358	± 0.047	ns
	週1回以上	59	0.369	± 0.050	
	ほとんど食べない	4	0.404	± 0.070	
納豆摂取	週に1回以上	15	0.374	± 0.069	ns
	月に1回以上	75	0.357	± 0.050	
	ほとんど食べない	50	0.371	± 0.040	
大豆製品	毎日食べる	24	0.360	± 0.058	ns
	週1回以上	95	0.363	± 0.050	
	ほとんど食べない	22	0.367	± 0.041	
海藻	毎日食べる	25	0.376	± 0.056	ns
	週1回以上	105	0.358	± 0.049	
	ほとんど食べない	11	0.383	± 0.032	
小魚	毎日食べる	4	0.388	± 0.055	ns
	週1回以上	69	0.357	± 0.054	
	ほとんど食べない	68	0.368	± 0.044	
多様な食品をとるようにしているか	はい	89	0.361	± 0.052	ns
	いいえ	50	0.368	± 0.045	ns
夕食の時間は決まっているか	はい	105	0.361	± 0.047	ns
	いいえ	35	0.371	± 0.056	ns
一人で食事をする事が多いか	はい	12	0.375	± 0.044	ns
	いいえ	128	0.363	± 0.050	ns
ファーストフード、インスタント食品を週2回以上食べるか	はい	39	0.364	± 0.047	ns
	いいえ	102	0.363	± 0.051	ns
食事の好き嫌いは多いか	はい	61	0.360	± 0.046	ns
	いいえ	79	0.366	± 0.053	ns
間食で夕食が食べられないことがあるか	はい	35	0.367	± 0.049	ns
	いいえ	105	0.362	± 0.050	ns
朝食を食べるか	毎日食べる	124	0.362	± 0.050	ns
	欠食あり ^A	17	0.376	± 0.043	ns
夜食を食べるか	毎日食べる	50	0.362	± 0.045	ns
	時々食べる	35	0.354	± 0.052	ns
	全く食べない	56	0.371	± 0.051	ns

ns 有意差なし

A 時々食べる・全く食べない

度に影響を与えるといわれている要因の、体重、初潮後月数、小学時代の運動クラブ回数（週3回未満、3回以上）、現在の運動クラブ回数（週7回未満、7回以上）、小学時代および現在の牛乳摂取量（1日3本未満、3本以上）、握力を独立変数とし、骨密度を従属変数として重回帰分析を行った（表7）。その結果、体重、初潮後月数、小学時代の運動クラブ回数、現在の牛乳摂取量が選択された。

考 察

思春期女子の骨密度には第二次性徴が影響し、橈骨骨密度は初潮の4年後まで増加したと報告されている [11]。骨密度については今回の対象者でも初潮後の期間が長い者ほど高く、初潮を迎えた者の骨密度が高いことが示された。骨代謝指標については、これまでの我々の調査でBAP、Hypは第二次性徴の影響をうけ、初潮発来の1年前か

ら低下傾向を示し、初潮の3年後まで急速に低下するという結果が得られている [8]。今回も、BAP, Hyp は同様な変化を示し、OC, GlaOC, NTX, PYD, DPD についても初潮と関連がみられた。また、今回の調査において骨密度と全ての骨代謝指標の間には負の相関がみられ、初潮前や初潮発来直後の骨密度がまだ低いもので骨代謝は亢進状態にあり、今後、骨密度が増加すると推測された。一方、成長期において骨代謝指標は身長伸びが大きいもので高いことを既に報告しており [8]、初潮近辺での骨代謝の亢進は、身長伸びと骨密度の増加の両方を反映していると思われる。さらに、初潮後4年以上経過したのもでも骨代謝指標の値は成人に比べて高く、骨密度はさらに増加する傾向にあると考えられた。

今回測定した骨代謝指標の GlaOC は、最近その測定法が開発されたものである。オステオカル

シンはアミノ酸1次配列内にグルタミン酸残基を有し、それがγ-カルボキシル化されたものが GlaOC であり、ハイドロキシアパタイトと高い親和性を持つ。一方、グルタミン酸残基がγ-カルボキシル化されていないオステオカルシンは、ハイドロキシアパタイトと親和性が低く骨に蓄積されない。したがって、オステオカルシンのうちでも GlaOC が生理活性をもち、骨代謝を反映する指標として有用性が高いと考えられ、今回測定を行った。その結果、GlaOC は他の骨代謝指標と同様に、第二次性徴や骨密度と関連がみられ、思春期の骨代謝を反映していた。今後、さらに骨密度変化との関連を調査し、骨形成指標としての有用性について検討したい。

骨密度に影響する要因について、体格との関連では、成人において体重は骨密度と正の関連があることが報告されており [12]、成長期においても体重が骨密度に影響していた。

生活習慣と骨密度との関連について検討したところ運動、牛乳摂取との関連がみられた。運動については女子大生についての調査でも過去(中学、高校時代)の運動習慣があるものは骨密度が高いことを報告した [4]。今回の対象者では小学時代に週3回以上運動しているものでは骨密度が高かったが、小学時代に運動習慣があっても1週間あたりの回数が少ないもの(週3回未満)では運

表6 体力テスト結果と骨密度との関連

	人数	相関係数	
握力	113	0.280	p<0.01
上体起こし	114	-0.019	
長座位体前屈	115	0.115	
反復横跳び	112	-0.061	
持久走	102	0.155	
50m走	113	0.179	
立ち幅跳び	113	-0.125	
ハンドボール投げ	115	0.041	

表7 骨密度を従属変数とした重回帰分析(ステップワイズ法)

説明変数	標準偏 回帰係数	F値	
初潮後月数	0.433	28.08	p<0.001
体重	0.293	12.99	p<0.001
小学校時代運動クラブ回数 (週3回未満=1、3回以上=2)	0.226	8.85	p<0.01
現在牛乳摂取量 (1日3本未満=1、3本以上=2)	0.193	6.57	p<0.05
現在運動クラブ回数 (週7回未満=1、7回以上=2)	—		
小学校時代牛乳摂取量 (1日3本未満=1、3本以上=2)	—		
握力	—		

R²=0.50

R²: 決定係数

— 採択されなかった変数 F-in=2, F-out=2

動していないものと骨密度は同じレベルで、骨密度増加のためには運動の量が重要であると思われた。現在の運動習慣や歩数など他の身体活動の指標と骨密度には関連がみられなかったが、現在の運動習慣は将来の骨密度に影響を与える可能性があり、追跡調査で更に検討したいと考えている。

牛乳摂取については、先の女子短大生の調査では牛乳を1日1本を超えて飲むものはわずか3.8%、平均カルシウム摂取量は376mgと摂取量が少なく、骨密度との関連はみられていない[4]。今回の結果では摂取量が1日600ml以上と多いもので骨密度が高かった。塚原らによると、牛乳摂取量が多いほどカルシウム摂取量は多く、1日3本以上(600ml以上)飲むものでは1日982.8mgであったと報告している[13]。これからすると、1日3本以上摂取していたものでは、カルシウムは所要量の700mgを超えて摂取していると推測され、十分なカルシウムの摂取が高い骨密度を得るのに有効であると思われた。また、小学時代の牛乳摂取量では骨密度に差はみられなかったものの、小学時代に牛乳を多く摂取していたものでは現在も牛乳を多く摂取しており、継続した牛乳摂取も骨密度を高くする要因の一つと思われた。

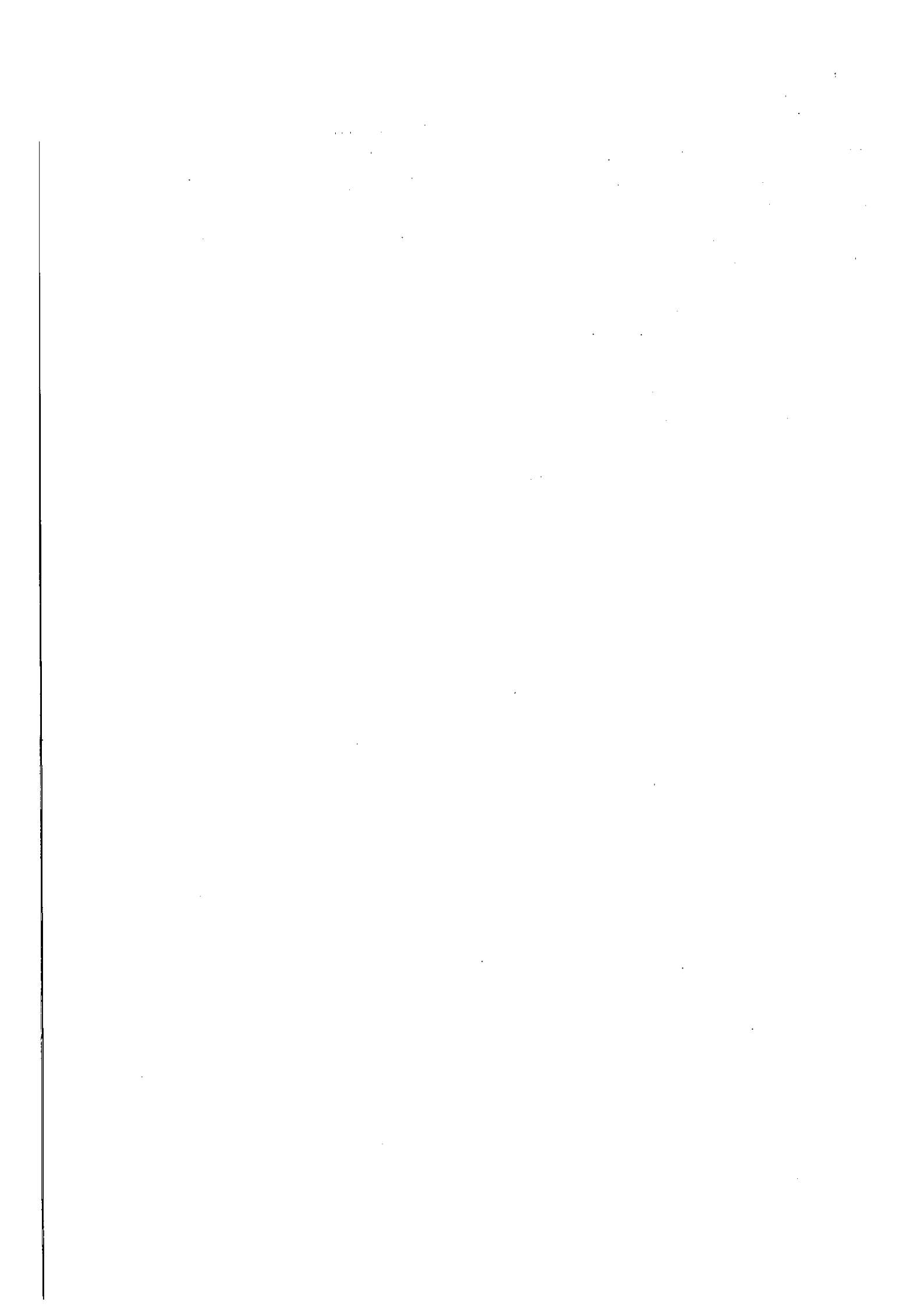
今後は、追跡調査を行い、第二次性徴や運動、牛乳摂取等の生活習慣が個人の骨密度および骨代謝指標の変化にどのように影響するか解析する予定である。

謝辞：本調査の実施にあたり、ご協力いただいた各中学校の教諭、養護教諭ならびに生徒のみなさん、教育委員会の関係各位に対し、心から感謝いたします。

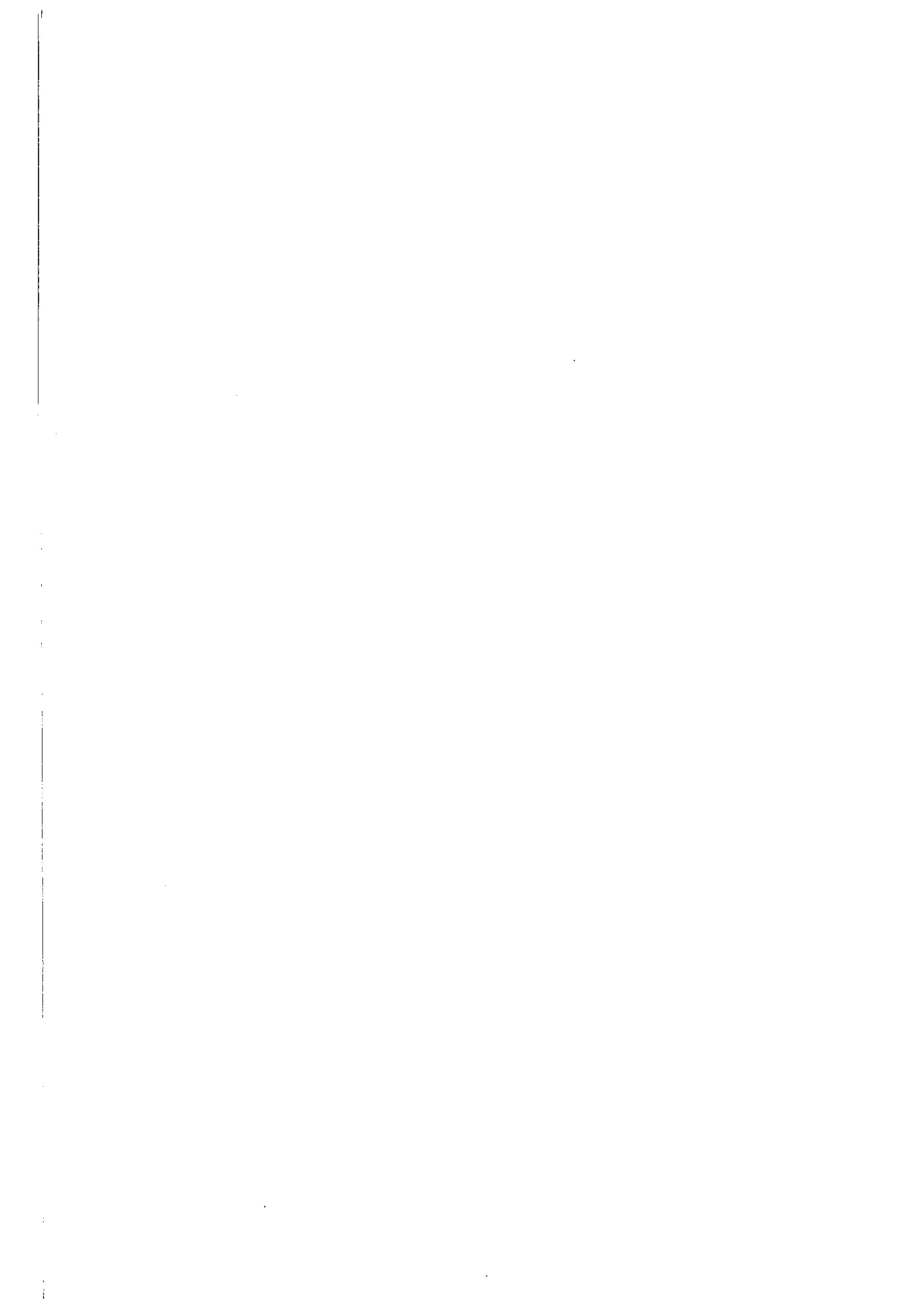
文 献

1. 福岡秀興, 笠原悦夫, 清野佳紀, 西山宗六, 広田

- 孝子(1996). 保健の科学, 38, 612-617.
2. 広田孝子, 広田憲二(2001). カルシウムと骨(西井易穂, 森井浩世, 江澤郁子, 小島 至 編), p114-118 朝倉書店
3. 広田孝子, 広田憲二(2000). Osteoporosis Japan, 8, 422-429.
4. 堀井裕子, 中崎美峰子, 田中朋子, 西野治身, 萩原千佳子, 飯田恭子, 高井なおみ, 加藤一之, 守田万寿夫, 福島啓子, 木屋 昭, 松倉知晴(2001). 富山衛研年報, 24, 147-155.
5. 窪田一男(1989). J. Nara. Med. Ass., 40, 202-217.
6. 池田信吾, 大澤誠基, 鈴木孝人, 加納堯子, 溝口 勲(1987). 東京都衛研年報, 38, 277-281.
7. 折茂 肇, 杉岡洋一, 福永仁夫, 武藤芳照, 佛淵孝夫, 五來逸雄, 中村哲郎, 串田一博, 田中弘之, 猪飼哲夫(1996). Osteoporosis Japan, 4, 643-653.
8. 西野治身, 堀井裕子, 田中朋子, 山上孝司, 松倉知晴, 鏡森定信(1999). 日本公衆衛生雑誌, 46, 47-60.
9. 五來逸雄(2002). Osteoporosis Japan, 10, 262-266.
10. 山岡完次, 大園恵一, 三浦雅一, 畠 啓視(1996). 日本骨代謝学会雑誌, 14(2), 220.
11. T. Matsukura, S. Kagamimori, T. Yamagami, H. Nisnino, M. Iki, E. Kajita, Y. Kagawa, H. Yoneshima, T. Matsuzaki, F. Marumo(2000). Osteoporosis International, 11, 858-865.
12. 梶田悦子, 伊木雅之, 飛田芳江, 三田村純枝, 日下幸則, 緒方 昭, 寺本路夫, 土田千賀, 山本和高, 石井 靖(1995). 日本衛生学雑誌, 50, 893-900.
13. 塚原典子, 佐藤和人, 江澤郁子(1997). Osteoporosis Japan, 5, 589-594.



3. 資 料



マウス末梢血におけるコメヌカ油抽出物の小核誘発試験

本田 幸子 林 美貴子

Studies on the Micronucleus Induction in Mouse Peripheral Blood Erythrocytes
by Rice Bran Oil Extract

Sachiko HONDA and Mikiko HAYASHI

既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究（厚生科学特別研究事業）の一環として、コメヌカ油抽出物の変異原性について検討した。

近年の天然物志向等により、天然添加物は広く食品に使用されるようになり、その種類や量も多くなっているが、天然物中には変異原性や発がん性を有する物質の存在も知られている。

コメヌカ油抽出物は食肉加工品、麺類等に、酸化防止剤として使用されている。今回はこの変異原性の有無を、染色体異常試験の一つであるマウス末梢血の小核試験を用いて検討した。

材料と方法

1. 検 体

コメヌカ油抽出物（藤沢薬品工業(株)より提供）イネ科イネ *Oryza Sativa* LINNE の種子から得られる米ぬか油の不けん化物から、エタノールで抽出して得られたもので、成分はフェルラ酸等であり、白色～淡黄褐色の粉末であった。

オリーブオイルに懸濁して、500, 1000, 2000 mg/kgマウスになるよう経口投与した。

2. 動 物

4週齢の ddY 系雄マウス（日本 SLC）を固形

飼料および水道水を自由摂取させ、1週間の観察期間を経た後、試験に使用した。

マウスは1群5匹とし、検体投与3群、陰性対照群および陽性対照群を設けた。試験開始直前に体重を測定し、各実験群の平均体重に偏りがないように群分けした (Table 3)。

3. 対照群

陰性対照には溶媒のオリーブオイルを経口投与した。

陽性対照には、マイトマイシンC（協和発酵工業）を生理食塩に溶解し、1mg/kgになるよう腹腔内投与した。

4. 投与および採血方法

コメヌカ油抽出物の投与は、各用量とも24時間の間隔で2回行った。採血は第1回目の投与直前を0時間として、24, 48, 72時間目に計4回の採血を行い標本を作製した。

5. 標本作製

林らにより開発されたアクリジンオレンジ超生体染色法を用いた末梢血小核試験法を用いた [1]。

マウス尾部の血管を、注射針にて突き出血させ、その5 μ lを、アクリジンオレンジ塗布スライドガラス上で超生体染色し、蛍光顕微鏡にて幼若赤血球（reticulocyte RET）中に出現する小核を有

するRETを計数した [2]。観察は二人の観察者が各1000個のRETを観察し、マウス1個体当たりRET2000個中の小核を有するRET (MNRET)の頻度を求めた。

同時に、細胞毒性の有無を検出するために、全赤血球 (正染性赤血球 normochromatic erythrocyte NCE+RET) 300-500個中に出現するRETの割合も求めた。

結果および考察

コメヌカ油投与後、小核を有するRET (MNRET)の出現頻度の割合を Table 1 に、全赤血球に対するRETの割合 (%) を Table 2 に個体別、群別および採血時間別に示した。また小核誘発は1

回目投与後48時間で検討されることが多いため、Table 3 にはコメヌカ油抽出物 2 回投与後24時間の数値のみを取り出し、示した。

投与の最高用量は、毒性徴候が認められない場合は、2000mg/kg投与が限度 [3] とされている。またコメヌカ油抽出物の毒性の検討でも毒性は認められていない [4] ので、コメヌカ油の最高投与量を2000mg/kgと定め、500, 1000, 2000mg/kgの3段階投与とした。その結果、いずれの用量でもすべて陰性対照群 (オリーブオイル) に対して有意な小核誘発頻度の上昇は認められなかった (Table 1. 3)。これに対し、陽性対照群 (マイトマイシンC) では、1 回目投与後24時間から小核の誘発がみられ、48時間目に最高となった (Table 1. 3)。RETの出現率については、実験群のいずれにも大きな変化は見られず (Table 2. 3)、細胞毒性はないと考えられた。

Table 1 Micronucleus Induction in Mouse Peripheral Blood Erythrocyte by Rice Bran Oil Extract

Dose (mg/kg)	Sampling time(h)	Number of animals	%MN RET cells based on 2000 RETs assessed per animal						
			Individual animal data					Group mean(±SD)	
500	0	5	0.15	0.3	0.15	0.3	0.1	0.20 ± 0.09	
	24	5	0.05	0.3	0.2	0.3	0.05	0.18 ± 0.13	
	48	5	0.1	0.25	0.25	0	0.1	0.14 ± 0.11	
	72	5	0.15	0.3	0.1	0.05	0.1	0.14 ± 0.10	
1000	0	5	0.05	0.15	0.2	0.2	0.2	0.16 ± 0.07	
	24	5	0.15	0.2	0.15	0.25	0.2	0.19 ± 0.04	
	48	5	0.15	0.1	0.2	0.15	0.2	0.16 ± 0.04	
	72	5	0.05	0.1	0.1	0.05	0.15	0.09 ± 0.04	
2000	0	5	0.15	0.15	0.2	0.2	0.15	0.17 ± 0.03	
	24	5	0.15	0.25	0.25	0	0.15	0.16 ± 0.10	
	48	5	0.1	0.05	0.1	0.3	0.05	0.12 ± 0.10	
	72	5	0.05	0.1	0.15	0.05	0.15	0.10 ± 0.05	
Negative control Olive oil	0	5	0.2	0.2	0.2	0.35	0.25	0.24 ± 0.07	
	24	5	0.2	0.1	0.35	0.35	0.1	0.22 ± 0.13	
	48	5	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.14 ± 0.05	
	72	5	0.2	0.2	0.05	0.1	0.2	0.15 ± 0.07	
Positive control MMC1.0	0	5	0.1	0.2	0.15	0.1	0.2	0.15 ± 0.05	
	24	5	1.6	0.85	1.0	0.45	1.2	1.02 ± 0.43 *	
	48	5	2.55	1.35	1.85	2.15	1.35	1.85 ± 0.52 *	
	72	5	0.55	0.4	0.4	0.15	0.2	0.34 ± 0.16 *	

*p<0.01

以上のことからコメヌカ油抽出物短期間投与における小核誘発の変異原性は認められなかったが、他の変異原性試験の結果も併せ総合的な検討が必要と考えられる。

この報告は既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究（厚生科学特別研究事業）の一環として行われたものである。

文 献

1. Hayashi,M., Morita,T., Kodama,Y., Sofuni,T.,

and Ishidate.M.Jr. (1990) The Micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange coated slides. Mutation Research, 245, 245-249.

2. 本田幸子, 林美貴子, 品川保弘, 佐藤茂秋 (1991). 富山衛研年報, 14, 58-61.

3. 厚生省生活衛生局科学課監修, 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針-英語版つき-3 (1996), 日本食品添加物協会.

4. 林 真 (2002). 既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究報告書

Table 2 Reticulocytes Induction in Mouse Peripheral Blood Erythrocyte by Rice Bran Oil Extract

Dose mg/kg	Sampring Time(h)	number of animals	% (RET/RET+NCE)						Group mean(±SD)
			Individual animal data						
500	0	5	8.8	11.1	8.9	10.7	9.6	9.82 ± 1.04	
	24	5	13.0	8.0	11.4	14.2	12.5	11.82 ± 2.36	
	48	5	13.4	11.0	9.9	12.3	13.8	12.08 ± 1.63	
	72	5	10.6	4.3	12.5	7.8	10.8	9.20 ± 3.22	
1000	0	5	11.9	14.5	12.6	9.2	9.6	11.56 ± 2.19	
	24	5	9.4	9.1	15.2	11.8	10.3	11.16 ± 2.49	
	48	5	5.2	7.1	16.0	12.6	12.2	10.62 ± 4.39	
	72	5	10.8	9.9	9.3	7.0	12.1	9.82 ± 1.92	
2000	0	5	13.1	9.1	11.1	10.4	12.4	11.22 ± 1.59	
	24	5	14.6	12.3	7.4	11.9	9.9	11.22 ± 2.71	
	48	5	15.3	12.4	6.7	12.2	9.5	11.22 ± 3.26	
	72	5	13.1	12.8	6.7	13.9	13.7	12.04 ± 3.02	
Negative control Olive oil	0	5	10.7	9.1	9.9	12.4	9.7	10.36 ± 1.28	
	24	5	7.7	11.1	13.5	11.5	9.8	10.72 ± 2.15	
	48	5	11.0	12.5	13.1	8.8	11.2	11.32 ± 1.66	
	72	5	9.0	7.8	10.6	8.7	10.1	9.24 ± 1.12	
Positive control MMC 1.0	0	5	14.1	12.8	10.2	10.8	11.8	11.94 ± 1.56	
	24	5	10.9	10.9	11.3	10.7	9.2	10.60 ± 0.81	
	48	5	11.6	9.9	8.5	5.6	7.5	8.62 ± 2.29	
	72	5	6.8	10.0	7.4	6.2	9.2	7.92 ± 1.62	

Table 3 コメヌカ油抽出物 2 回投与後24時間の小核出現の頻度

検体名 : コメヌカ油抽出物
 動物 : マウスddY/雄/5週齢/経口投与
 備考 : MMC腹腔内投与

mg/kg/day	SCHEDULE	MOUSE	MNRET : %	RET/(RETPCE+NCE):%	BW:g	
0 Vehicle (Olive oil)	×2, 24hr	1	0.20	11.0	29.0	
		2	0.10	12.5	27.5	
		3	0.10	13.1	29.5	
		4	0.20	8.8	27.5	
		5	0.10	11.2	27.5	
		Mean	0.14	11.3	28.2	
		Std	0.05	1.7	1.0	
		Min	0.1	8.8	27.5	
		Max	0.20	13.1	29.5	
		Total No.	14			
500	×2, 24hr	1	0.10	13.5	26.5	S ^K 判定 -
		2	0.25	11.0	27.0	
		3	0.25	9.9	27.5	
		4	0.00	12.3	28.0	
		5	0.10	13.8	27.0	
		Mean	0.14	12.1	27.2	
		Std	0.11	1.7	0.6	
		Min	0	9.9	26.5	
		Max	0.25	13.8	28.0	
		Total No.	14			
1000	×2, 24hr	1	0.15	5.2	27.0	S ^K 判定 -
		2	0.10	7.1	26.5	
		3	0.20	16.0	28.0	
		4	0.15	12.6	26.0	
		5	0.20	12.2	27.5	
		Mean	0.16	10.6	27.0	
		Std	0.04	4.4	0.8	
		Min	0.1	5.2	26	
		Max	0.20	16.0	28.0	
		Total No.	16			
2000	×2, 24hr	1	0.10	15.3	27.0	S ^K 判定 -
		2	0.05	12.4	27.5	
		3	0.10	6.7	28.5	
		4	0.30	12.2	27.0	
		5	0.05	9.5	26.5	
		Mean	0.12	11.2	27.3	
		Std	0.10	3.3	0.8	
		Min	0.05	6.7	26.5	
		Max	0.30	15.3	28.5	
		Total No.	12			
MMC 1.0	×2, 24hr	1	2.55	11.6	27.0	χ ² 判定 +
		2	1.35	9.9	28.5	
		3	1.85	8.5	29.5	
		4	2.15	5.6	27.5	
		5	1.35	7.5	28.0	
		Mean	1.85	8.6	28.1	
		Std	0.52	2.3	1.0	
		Min	1.35	5.6	27	
		Max	2.55	11.6	29.5	
		Total No.	185			

B.W. : Body weight at the 1st day of dosing.
 MNRET : Frequency of micronucleated reticulocytes.
 RET/(RET+NCE) : Ratio of reticulocytes to total erythrocytes.
 S^K : Kastenbaum-Bowmanの数表による検定
 χ² : カイ二乗検定による検定 (p<0.001)
 MMC : Mitomycin C

動物由来感染症実態調査 (第2報) 富山県のイヌ・ネコおよびその飼育者における *Coxiella burnetii* の浸淫状況

安藤 秀二 石倉 康宏 永井 美之

Prevalence of *Coxiella burnetii* among Companion Animals and Its Owners
in Toyama Prefecture

Shuji ANDO, Mitsuhiro ISHIKURA and Yoshiyuki NAGAI

平成11年4月に施行された「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」において多くの動物由来感染症（人獣共通感染症）の届け出が規定されたことに伴い、富山県では平成11年度より動物由来感染症実態調査を開始し、本邦での感染実態と病態の不明瞭なQ熱 [1, 2, 3] を対照疾患のモデルとして愛玩動物と人の検査体制を確立するとともに調査検討した。Q熱の原因である *Coxiella burnetii* (*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おり、平成11年度の調査では十分に実態解明ができなかった。平成12年度は、平成11年度の調査項目において不足または不明であった点を考慮し、引き続き県内の開業獣医師をはじめとする関係者の協力により集められたイヌ・ネコ、また犬猫の所有者およびその家族など犬猫との接触のあったヒト、さらに犬猫等の動物との接触経験のないヒトの血液を用いて調査を行った。

材料と方法

イヌ・ネコの血液：富山県内5ヶ所の開業獣医療院の協力によりイヌ59頭(オス27/メス32)、ネコ

31匹(オス18/メス13)、合計90件の血液が集められた。血液の採取方法、前処理、検査方法は前回の調査 [4, 5] に準じて行った。

ヒトの血液：犬猫の所有者及び同居者107名、犬猫との接触経験や飼育経験がない対照健康人55名から採血し、イヌ・ネコの場合と同様に検討した。犬猫の所有者及び同居者の内訳は、犬の飼育者男性26女性41、猫の飼育者男性13女性25、猫と犬両方を飼育する男女各1、全体で男性40名と女性67名であった。対照健康人は、男性22名女性33名であった。ヒトの質問事項は、年齢、性別、既往症、健康状態について行った。

以上の血液については、採血前に本事業の目的、Q熱についての説明等を行い、同意を得た上で採取したものである。

結 果

イヌ・ネコにおける *C. burnetii* に対する抗体保有状況：間接蛍光抗体法により特異蛍光を示した血清希釈16倍以上を抗体陽性としたところ、*C. burnetii* に対するIgG抗体保有率は、イヌで8.47%(5/59)、ネコで48.39%(15/31)であった(表1)。 χ^2 検定によりイヌとネコの動物種間の抗体

保有率に有意差が認められた。IgM抗体は一頭のイヌのみ低倍のものが認められた。

ヒトにおける *C. burnetii* に対する抗体保有状況：犬猫との接触のあったヒトでは、犬接触者の40.30% (27/67)、猫接触者の55.26% (21/38)が抗体陽性であった。犬猫両種を飼育していた2名は、いずれのペットも抗体陽性にもかかわらず抗体陰性であった。また犬猫等と接触のない健康人対照群は38.18% (21/55)が *C. burnetii* に対する抗体を保有していた (表2)。飼育動物種が何であるかに関わらず犬猫接触者群と健康人対照群とに有意差は認められなかった。

上記ヒト検体のうち、抗体陰性ペットの飼育者等83名 (陰性イヌ飼育者65名と陰性ネコ飼育者18名)の抗体保有率は、43.34% (36/83)であり、抗体陽性ペット関係者の抗体保有率54.55% (12/22)との間に有意差は認められなかった。

考 察

平成12年度の動物由来感染症実態調査でも、*C.*

burnetii に対するIgG抗体は、イヌで8.47% (5/59)、ネコで48.39% (15/31)が陽性であり、平成11年度と同様 (イヌ10.5%、ネコ50.5%) ネコの抗体陽性率がイヌに比較して有意に高かった (表1)。抗体価の陽性判定を32倍以上としても、イヌおよびネコの間では、5%以下の危険率で有意差が認められた。抗体価でみると、陽性血清の大部分が64倍未満の低い抗体価であり、前回のような516倍以上の抗体価を示した血清はみられなかった。国内における症例では抗体価のみによる診断の困難なケースも報告されていることから [3]、PCRを併せた経時的推移を検討し、抗体価の低い検体についてデータ蓄積し、解析することが必要である。

ヒトにおける過去のQ熱の浸淫状況調査では、呼吸器症状を呈して感染症を疑う患者集団、獣医師や食肉処理場職員など動物との接触頻度が一般住民に比べて高いと考えられるヒトの集団において抗体保有率が高いとの報告がある [1, 2]。しかし、今回の調査では犬猫接触群と非接触群 (健康人対象群) の間に有意差は認められなかった。また抗体陰性のペットを飼育しているヒトの抗体

Table 1. Seroprevalence of anti-*Coxiella burnetii* antibody in companion animals

		Sample Number	Positive	(%)
Dog	male	27	3	11.11
	female	32	2	6.25
		59	5	8.47*
Cat	male	18	9	50.00
	female	13	6	46.15
		31	15	48.39*

* p<0.01, $\chi^2=18.730375$

Table 2. Seroprevalence of *C. burnetii* infection in human

Breeding animals	Number	Positive	Negative	(%)
Dog	67	27	40	40.30
Cat	38	21	17	55.26
Dog and Cat	2	0	2	0.00
	107	48	59	44.86
None (health control)*	55	21	34	38.18

*No or low experience of contact with animals

平成14年10月1日

保有率と抗体陽性のペットを飼育しているヒトの抗体保有率とに有意差がないことから、感染経路としてイヌ・ネコのような愛玩動物からのヒトへの可能性は一般に考えられているよりも小さいことが示唆された。我が国におけるヒトQ熱は、欧米に見られるような動物を介しての急性集団発生例が見られないにもかかわらずヒトの抗体保有率が高いことから、動物からヒト以外に、ヒトからヒトへの感染経路も否定できない。今回の調査における抗体陽性者の既往歴や現在の健康状態においては、慢性Q熱を疑うような所見や傾向は認められなかったが、これら抗体陽性者をフォローすることによりQ熱の日本での特徴が明らかになるかも知れない。

文 献

1. 平井克哉, Khin Khin Htwe, 山口剛士, 福士秀人 (1992). 獣医畜産新法, 45, 848-855.
2. Katsuya Hirai and Ho To (1998). J. Vet. Med. Sci., 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). 静岡県環境衛生科学研究所報告, 39, 7-11.
4. 安藤秀二, 石倉康宏, 北村敬 (2000). 富山県衛生研究所年報. 23, 155-156.
5. 富山県厚生部 (2000). 平成11年度動物由来感染症情報分析体制整備事業結果報告書, p3-13

謝 辞

本調査事業は、富山県内の開業獣医師、保健所の公衆衛生担当者など多くの方々の協力により行われました。ここに深くお礼申し上げます。

富山県における平成13年度のウイルス およびリケッチア検出状況

岩井雅恵 中山 喬 安藤秀二
長谷川澄代 松浦久美子 永井美之

Detection of Viruses and Rickettsiae from Infectious Diseases
in Toyama Prefecture, April 2001 to March 2002

Masae IWAI, Takashi NAKAYAMA, Shuji ANDO,
Sumiyo HASEGAWA, Kumiko MATSUURA and Yoshiyuki NAGAI

平成13年度に実施した感染症発生動向調査事業、感染症流行予測調査事業、行政依頼検査、一般依頼検査および調査研究におけるウイルスおよびリケッチア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。

平成13年度に受け付けた被験者は225症例、検体別では糞便128、咽頭拭い液98、髄液2、血液7の他、食材（カキ）1の計236検体であった。このうち、被験者225症例中84例から85株のウイルスおよびリケッチアが検出された。

以上の成績を疾患別、患者別に表に示し（表1）、以下に若干の解説を加えた。

インフルエンザおよび呼吸器疾患：平成13年度、県内の定点病院および集団発生の当該保健所から88件の検査依頼があった。昨シーズン（2000/2001）終期の平成13年3月にA(H1)型インフルエンザウイルス1株、4月にB型インフルエンザウイルス1株が分離された。7月の4検体はかぜ様疾患の集団発生であるが、ウイルスは分離されなかった。今シーズン（2001/2002）のインフルエンザ流行期に入って、平成14年1月から3月の間にA(H1)型インフルエンザウイルス11株、A(H3)型インフルエンザウイルス13株、B型インフルエンザウイルス5株が分離され、さらにA(H3)型イ

ンフルエンザウイルスとB型インフルエンザウイルスの混合感染が1例あった。その後、4月に入っても患者の発生が認められた（AH3型2株、B型4株分離）。今シーズンの特徴は、3種類のウイルスによるインフルエンザが発生し、流行の規模が昨シーズンより大きかったことである。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。

脳炎、脳症：インフルエンザ脳症を疑った4例中、A(H1)型インフルエンザウイルス1株、B型インフルエンザ1株が分離された。

感染性胃腸炎：集団発生5事例を含む46例について検査し、A群ロタウイルス7株、小型球形ウイルス(SRSV)32株、アデノウイルス1株が検出された。また、集団発生5事例（すべての事例でSRSVのみを検出）のうち1事例（平成14年1月）関連で無症状の施設関係者からSRSV2株が検出された。平成14年3月の集団発生1事例の原因と考えられた食材（カキ）からはSRSVは検出されなかった。

食中毒：食中毒として扱った3事例のうち2事例からSRSVが1株ずつ検出された。

手足口病：県内の定点病院からの検査依頼3例のうち1例からコクサッキーウイルスA16型が1

平成14年10月1日

株分離された。

恙虫病：恙虫病が疑われた2例のうち1例から恙虫病リケッチア (*Orientia tsutsugamushi*) 遺伝子がPCRにより検出され、また血清学的にも感染が確認された。

無症状：ポリオ流行予測事業により、0～6歳までの健康な乳幼児58例を対象にウイルス検索を行い、ポリオウイルス2型2株、エコーウイルス22型1株、コクサッキーウイルスA9型1株を分離した。ポリオウイルス2型は2株ともワクチン接種2ヶ月経過後の健康乳幼児から分離されたもので、ウイルスの抗原性状分析を国立感染症研究所に依頼したところ、ともにワクチン由来株であった。詳細については本年報ポリオ流行予測調査の

報告を参照されたい。

その他の疾病：Q熱が疑われた5月の不明熱1例、6月の異型肺炎1例、8月と12月のQ熱疑い1例ずつからは、リケッチアは検出されなかった。8月の発疹症3例からは、ウイルスは分離されなかった。

ウイルス分離検査は結果判明までに時間がかかり、当該患者の臨床診断に間に合わない場合も多いものの、今後の感染症発生動向を知るうえで重要な資料となります。ご多忙の中でウイルスおよびリケッチア検出の意義をご理解、ご協力いただいた多くの医療機関および防疫機関の関係各位に厚くお礼申し上げます。

表1. 平成13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	H13					H14					合計		
		3月 ^{*4}	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月		1月	2月
インフルエンザ 及び呼吸器疾患	被験者数	1	[8]			[4]					30	[28]	17	88
	インフルエンザA(H1)		1								8	3		12
	インフルエンザA(H3)											4	9	13
	インフルエンザA(H3)+インフルエンザB												1	1
	インフルエンザB	1									1	[3]	1	6
脳炎	被験者数											1	3	4
	インフルエンザA(H1)												1	1
	インフルエンザB												1	1
感染性胃腸炎	被験者数		2	3	7	4	1		[3]	[2]	[4]	[25]	[4]	55
	A群ロタ		1	3	3									7
	SRSV ^{*3}				1	3			[3]	[2]	[4]	[18] ^{*3}	[3]	34
	アデノ					1								1
食中毒	被験者数		1	[5]		[2]								8
	SRSV		1			[1]								2
手足口病	被験者数						1	1			1			3
	コクサッキーA16										1			1
恙虫病	被験者数									2				2
	恙虫病リケッチア									1 ^{*5}				1
無症状 (ポリオ流行予測)	被験者数										8	50		58
	ポリオ2										2			2
	エコー22										1			1
	コクサッキーA9											1		1
その他疾病 ^{*1}	被験者数			1	1		4				1			7
症例合計	被験者数	1	11	9	8	10	6	1	3	4	6	63	79	225
	病原体検出検体数	1	3	3	4	5			3	3	5	30	11	84
食材 ^{*2}	検体数												1	1

*1: Q熱疑い3, 異型肺炎1, 発疹症3.

*2: カキ.

*3: 無症状の施設関係者を含む. SRSV: 小型球形ウイルス

*4: 検体採取3月, 搬入4月.

*5: PCRによる検出.

[]は集団発生事例を含む.

A (H3)型とB型インフルエンザウイルスによる 混合感染の1例について

松浦久美子 香取幸治 永井美之
正木明夫¹ 田中有易知²

A Case of Mixed Infection due to Influenza Virus Type A(H3) and Type B

Kumiko MATSUURA, Koji KATORI, Yoshiyuki NAGAI
Akio MASAKI¹ and Yuichi TANAKA²

2002年1月から4月までの長期間にわたり、富山県内ではA(H1)型、A(H3)型およびB型インフルエンザウイルスによるインフルエンザが流行した。流行の状況、患者からのウイルス分離状況、分離株の性状については本年報に記載されているインフルエンザ流行予測調査を参照されたいが、調査した患者のなかにはA(H3)型とB型インフルエンザウイルスの混合感染者が1名認められた。インフルエンザの混合感染事例についての報告は少ないため、この事例について報告する。

材料と方法

ウイルス検出：3月29日に発病したかぜ様疾患患者(No.182, 2歳10ヶ月)から咽頭ぬぐい液を採取し、MDCK細胞に接種してウイルス分離を行った。分離株はRT-PCR法によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出[1]とインフルエンザ標準抗血清によって同定した。本検体については酵素免疫法によるインフルエンザ迅速診断キットでの検出も試みた。インフルエンザ迅速診断キットはデンカ生研のインフルA・B-クイック「生

研」を用いた。

A(H3)型とB型ウイルスの混合分離株からの分別方法：B型の分別には、A型ウイルスはトリプシン存在下でのみMDCK細胞で増殖するが、B型ウイルスは非存在下でも増殖する[2]ことを利用して行った。今シーズンに流行したA(H1)型、A(H3)型ウイルスはモルモット赤血球を凝集するが、ニワトリ赤血球を凝集しない。一方、B型ウイルスはモルモット赤血球とニワトリ赤血球の両方を凝集する。この性質を利用して、A(H3)型の分別を行った。その方法は、混合分離株液中にニワトリ赤血球を加えた後、水中に60分置いてB型ウイルスとニワトリ赤血球とを凝集させる。次に、遠心して血球を取り除いた液(ポアサイズ0.2 μ mフィルターろ過)をMDCK細胞に接種、継代してA(H3)型株を分別した。

患者のインフルエンザウイルスに対するHI抗体：急性期については測定できなかったが、回復期の抗体を測定した。HI抗体測定法はインフルエンザ流行予測調査の方法と同じである。インフルエンザ標準抗原(A/New Caledonia/20/99(H1N1)株, A/Panama/2007/99(H3N2)株, B/Akita/27/2001株およびB/Johannesburg/5/

1 正木医院 2 砺波保健所

99株)とその抗血清は国立感染症研究所から分与された。

結果および考察

患者No.182のウイルス検出, 血清HI抗体の調査成績をTable 1に示す。

ウイルス検出: 患者No.182の咽頭ぬぐい液のインフルエンザ迅速診断キットでの反応像はA型, B型の両方に陽性を示し, 混合感染または検体成分由来の偽陽性の可能性が疑われた。その陽性反応像はB型の方がA型より強かった。咽頭ぬぐい液よりMDCK細胞(トリプシン添加)を用いて分離された株(No.182株, MDCK細胞1代継代)の迅速診断キットでの反応像(Fig. 1)も, A型

とB型の両方が陽性となり, No.182株は2種類のウイルスの混合株であることが示唆された。No.183株(A/Toyama/26/2002)はA(H3)型, No.186株(B/Toyama/10/2002)はB型の分離株の陽性反応像である。このNo.182株のウイルス遺伝子をRT-PCR法によって調べたところ, A(H3)型(727bp)とB型(549bp)のDNAバンドが両方とも検出された(Fig. 2)。A(H1)型(450bp)のDNAバンドは検出されなかった。これよりNo.182株はA(H3)型とB型の混合分離株であり, 患者No.182はほぼ同時期にA(H3)型とB型ウイルスとに混合感染したと判断された。

混合分離株からの分別と分離株の性状: No.182株(MDCK細胞1代継代)は, 2つの分別方法(①ニワトリ血球によるB型ウイルス吸収処理, ②トリプシン非存在下での増殖)によって2株

Table 1. Virological and serological examination of patient No.182 with influenza-like disease

EIA kit ¹⁾	Influenza type A (+), type B (+)			
Virus isolation	Strain No.182 (MDCK 1 passage): Mixture of type A(H3) and B viruses Strain A/Toyama/28/2002 (MDCK 3 passage): type A(H3) virus Strain B/Toyama/11/2002 (MDCK 3 passage): type B virus			
HI antibody (Convalescent serum)	(Vaccine strain) A/New Caledonia/ 20/99 (H1N1)	(Vaccine strain) A/Panama/2007 /99(H3N2)	(Vaccine strain) B/Johannesburg/ 5/99	B/Akita/27/2001
HI titer	<10	40	<10	10

1) EIA kit for rapid detection of Influenza A and B viruses (INFLU A・B-QUICK“SEIKEN”)

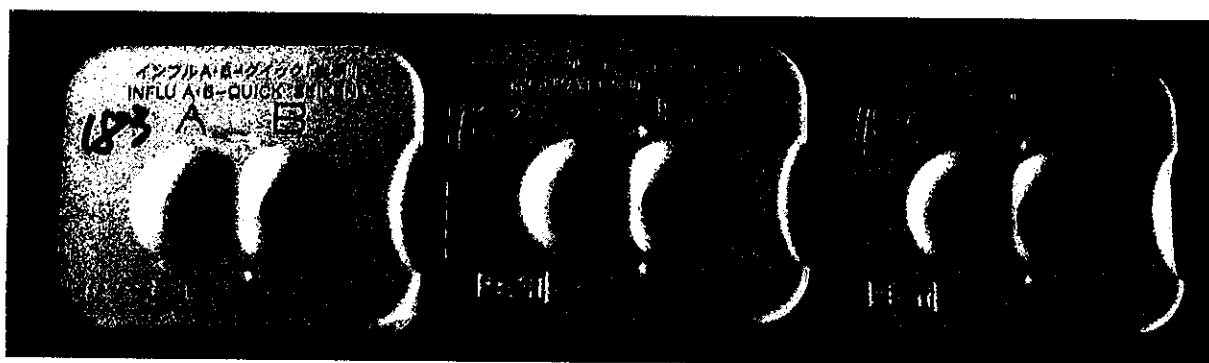


Fig. 1. Dual positive reaction to influenza A and B viruses of No.182 isolates in EIA Kit. Strain No.182, isolates (MDCK passage 1) from patient No.182; strain No.183, type A(H3) isolate; strain No.186, type B isolate.

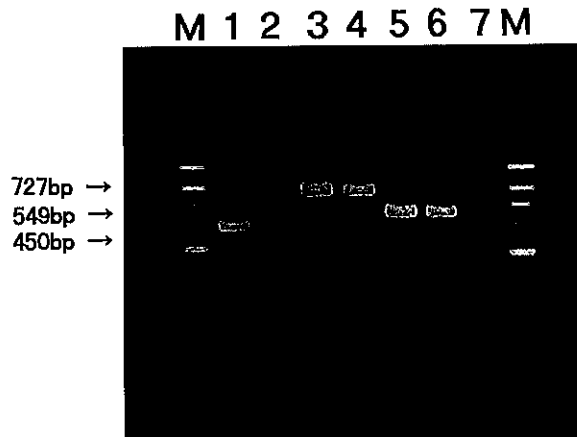


Fig. 2. Derection of influenza virus genes in strains isolated from the patient No.182. Lane M, DNA size marker (ϕ X174/Hinc digest) ; lanes 2, 4 and 6, isolates (MDCK passage 1) from patient No.182 (strain No.182) ; lane 1, type A(H1) isolate (strain No.53) ; lane 3, type A(H3) isolate (strain No.183) ; lane 5, type B isolate (strain No.186) ; lane 7, negative control. RT-PCR was done using type A(H1) (lane 1 and 2), type A(H3) (lane 3and 4) and type B (lane 5 and 6) specific primers.

(MDCK細胞3代継代)に分けることが出来た。RT-PCR法によってこれらの株の遺伝子を調べると、2株はA(H3)型株(A/Toyama/28/2002)とB型株(B/Toyama/11/2002)に分別された株であった。A/Toyama/28/2002株に対する抗A/Panama/2007/99(H3N2)血清のHI価は640倍(ホモ1280倍)であり、この株はPanama株に類似した株と考えられた。B/Toyama/11/2002株に対する抗B/Akita/27/2001血清と抗B/Johannesburg/5/99血清のHI価は、各々40倍(ホモ160倍)、<10倍(ホモ320倍)であった。これよりB/Toyama/11/2002株は今シーズンに流行したAkita株に類似した株であった。

血清HI抗体：回復期血清におけるインフルエンザHI抗体を調べると、A/New Caledonia/20/99(H1N1)株に対しては<10倍であり、A/Panama/2007/99(H3N2)株に対しては40倍であった。B型のB/Akita/27/2001株に対して10倍の抗体価が認められたが、B/Johannesburg/5/99株に対しては<10倍であった。これらの抗体価より、患者No.182はA(H3)型とB型に感染していたことは明らかであった。しかし、急性期血清がないので、A(H3N2)型抗体は今回の感染だけよると断定できないが、B型では今シーズンの

流行株に対する抗体のみを保有していること、年齢が2歳10カ月と若いことから今回の感染による抗体と考えられた。

今シーズンのように3種類のウイルスが同時流行している場合、混合感染の機会はあると考えられるが、混合感染を確認した事例の報告は少ない。日本では酒匂ら[3]が、同一患者より同時に分離されたインフルエンザA(H1)型とA(H3)型ウイルスについて報告した。近年、臨床現場ではインフルエンザ迅速診断キットが使用され、インフルエンザ診断の補助として役立てられるようになった。その反面、非特異反応(偽陽性)も指摘されて問題となっている。このキットでA型、B型の両方陽性になる例が認められるが、検体よりウイルス分離を試みると1種類のウイルスのみが分離される場合がほとんどのである。その結果、混合感染とは判断されず、診断キットの偽陽性と解釈される。A型とB型ウイルスをMDCK細胞に同時感染させた場合、B型はA型よりMDCK細胞に対する感受性が低いため、A型がB型より良く増殖し、B型ウイルスの存在が見落とされる場合があることを新井ら[4]は報告している。

今回、インフルエンザ迅速診断キットでA型、

平成14年10月1日

B型の両方に陽性像を示した検体についてウイルス分離を行ったところ、A型、B型ウイルスが同時に分離され、混合感染であったことが判明した。インフルエンザ迅速診断キットにおけるA型、B型両方の陽性例のなかには混合感染の場合が含まれ、迅速診断キットによって混合感染の手がかりが得られた。A型の亜型間での混合感染の場合、レコンビナントウイルスの出現が示唆されている[3]ので、混合感染についてもっと考慮を払う必要があることを示唆するものといえる。インフルエンザの流行は、最近、2種類あるいは3種類のウイルスによって発生しており、混合感染や1シーズン中に数回インフルエンザウイルスに感染した患者が発生していたと推測される。

文 献

1. 森下孝行, 小林慎一, 三宅恭司, 石原佑弼, 磯村思无, 中島節子, 中島捷久 (1992). 感染症学雑誌, 66, 944-949.
2. 飛田清毅(1976). 臨床とウイルス, 4, 58-61.
3. 酒匂光郎, 中山堯之, 相原勝敏, 岡徹也, 野中実男, 根路銘国昭, 大谷明, 植田浩司 (1980). 臨床とウイルス, 8, 32-35.
4. 新井礼子, 西川眞, 篠川旦 (1997). 第45回日本ウイルス学会総会, 102.

加熱処理におけるビーフ角切りステーキ中の 腸管出血性大腸菌O157:H7の挙動

磯部 順子 細呂木志保 田中大祐
清水美和子 香取幸治 永井美之

Behavior of Enterohemorrhagic *Escherichiae coli* O157:H7
in Tenderized Cubic Beef under Heat Treatment

Junko ISOBE, Shiho HOSOROGI, Daisuke TANAKA,
Miwako SHIMIZU, Kouji KATORI and Yoshiyuki NAGAI

2001年3月、ファミリーレストランのビーフ角切りステーキを原因とする腸管出血性大腸菌O157:H7(以下O157)による感染症が発生した。患者は滋賀県、奈良県および富山県で発生し、当初それぞれ散発事例であると思われた感染症は、広域的散発型集団発生いわゆる diffuse outbreak であることが判明した [1]。

この感染症の原因となったビーフ角切りステーキ(以下ステーキ肉)は加工食肉製品であった。感染者が喫食した時点でO157や大腸菌等の細菌数がどの程度であったかを知る目的で、この加工食肉製品の汚染実態を調べ、さらに調理の再現性試験を行い、加熱に伴う菌数の変化を調べた。結果を報告する。

材料および方法

- (1)食肉加工製品：O157感染症発生の原因施設となった県内のCファミリーレストランのチェーン店から収去されたステーキ肉46件について検査した。
- (2)生菌数と大腸菌数の測定およびO157の検出：ステーキ肉は Trypticase Soy Broth(TSB) にて

10倍乳剤とし、検査に供した。生菌数は標準寒天による混釈法で、また、大腸菌数はEC培地を用いた5本3段階のMPN(最確数)で測定した。O157の検出は上記乳剤を35℃6時間培養し、その培養液について以下の4法による菌の検出を試みた。方法1；免疫磁気ビーズ処理(IMS)した後培地に塗抹、方法2；ノボビオン加mEC(N-mEC)で42℃20時間培養し、ビーズ処理後、培地に塗抹、方法3；N-mECによる選択増菌後、培地に塗抹、方法4；イムノクロマトグラフィー法を原理とするO157検出用試薬「NOW」(アスカ純薬)の使用。いずれの場合にも選択分離培地にはCT-SMAC, CHROMagarO157, RAINBOW agarを使用した。(3)ステーキ肉における菌数変化および肉の内部温度変化の再現性試験：試験には、ステーキ肉から検出されたO157を用いた。ステーキ肉にそれぞれ5,000個/100g, 10,000個/100gになるようにO157を接種し、-20℃で1晩凍結した。その後4℃、一晩で解凍し、ステーキの焼き加減が当該レストランと同じになるよう約260℃のオーブンで4分加熱した。菌数は加熱の前後で測定した。O157の菌数測定は10gからスタートする5本3段階のMPN法によった。検体10gをTSB培地で6時間前培養後、N-mEC培地で42

℃, 20時間培養した。その培養液を各試験管についてビーズ処理し, O157が検出された試験管数によりO157菌数を算出した。

結果および考察

収去されたステーキ肉46検体のうち, 14検体(30.4%)からO157が分離された。方法別のO157の分離結果を表1に示した。O157の検出率は方法2でもっとも高かった。なかでもCT-SMAC培地を使用した時に検出率が高かった。この培地の性能は方法1, 3でも同様であった。方法1は方法2に比し検出率はやや劣るが, 菌分離は一日早まることから, 食中毒の原因追求時にはこの方

法も併用するのが良いと思われた。方法4ではイムノクロマトグラフィー法を原理としているため, 実際に菌を分離することはできない。しかし, この方法は手技が簡便である, 特異性が高い, 免疫磁気ビーズの反応を阻害する脂肪分の多い検体でも感度が比較的良いことなどから, 食品からのO157分離時にしばしばスクリーニングとして用いられる。今回の検査においても10検体が陽性のバンドを示し, これは方法2でCT-SMACを使用した場合に次いで高かった。

ステーキ肉の一般生菌数および大腸菌数は, その検体からのO157分離成績とは関係なく, 一般生菌数が $1.8 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^7/100g$, 大腸菌数が $5 \sim 27/100g$ であった。O157菌数は, O157が検出された検体で $<2 \sim 11/100g$ であった(表2)。ス

表1 ステーキ肉から検査方法別O157検出率

方法	増菌	IMS処理	分離培地	検出率(%)	
1	TSB 35°C6hr	有	CT-SMAC	6/46* (13.4)	
			CHROMagar	2/46 (4.3)	
			RAINBOW	6/46 (13.0)	
2	TSB 35°C6hr	有	N-mEC	11/46 (23.9)	
			42°C8hr	CHROMagar	9/46 (19.6)
				RAINBOW	7/46 (15.2)
3	TSB 35°C6hr	無	N-mEC	3/46 (6.5)	
			42°C8hr	CHROMagar	0/46 (0)
				RAINBOW	0/46 (0)
4	TSB 35°C6hr	無	無	NOW** (21.7)	

*O157 陽性数/検体数

**アスカ純薬「NOW」による検査

表2 ステーキ肉の細菌汚染状況

検体 番号	一般生菌数 (個/100g)	大腸菌数 (個/100g)	O157 菌数 (個/100g)
1	1.6×10^7	7	NT
13	1.1×10^7	27	<2
32	2.7×10^6	5	11
35	1.8×10^6	11	6
41	5.0×10^6	13	<2
T1	4.0×10^6	NT*	2
	2.1×10^6	NT	2
T2	8.8×10^6	NT	2
	1.1×10^6	NT	4

* NT:未検査

ステーキ肉は、埼玉県の食肉加工施設でテンダライズ（筋きり、細切り）処理、タンプリング（味付け）処理および結着処理により加工され、約180g単位で凍結されていた [1]。埼玉県の調査により、原材料の肉からもO157が検出されていることから、加工工程でステーキ肉は内部までO157に汚染されていたと考えられた。そこで、ファミリーレストランの調理過程において、このステーキ肉のO157菌数がどのように変化したかを推測するため、調理の再現性試験を行った。O157を接種したステーキ肉の加熱後の一般生菌数、O157菌数を表3に示した。一般生菌数、O157菌数ともに加熱前にくらべ加熱後でその数は減少した。しかし、加熱後でも一般生菌数は $5.17 \times 10^4 \sim 3.51 \times 10^6$ /100g、O157菌数は98~540個/100g認められた。同様の方法と条件でステーキ肉を加熱し、加

熱前後の肉の内部温度を測定した。14検体について測定し、結果を図1に示した。ほとんど（10検体）が測定開始の4℃から、4分後には約45~90℃まで上昇した。しかし、4検体については10℃に達しなかった。実験に使用したオーブンは当該レストランで使用されていたコンベアオーブンと同一品ではなかったもので、調理時の状態を忠実に反映しているとは思えない。しかし、この再現性試験の結果は、肉をオーブンで調理する時、検体に対する熱のかかり方が必ずしも均等ではなく、内部の温度が設定どおりにまで達しない場合があることを示す。

加工食肉製品では原材料となる肉が汚染されていた場合、その製品は内部まで汚染されている可能性がきわめて高い。今回の食中毒事例において原因となったステーキ肉は、加熱調理の再現性試

表3 加熱による添加O157菌数の変動

検体番号	添加O157菌数 (個/100g)	凍結融解後 O157菌数 (100g)	凍結融解-加熱処理 [*] 後	
			一般生菌数 (個/g)	O157菌数 (100g)
1	10,000	>1600	5.61×10^6	NT
2	10,000	NT ^{**}	6.97×10^4	540
3	10,000	NT	5.28×10^4	460
4	5,000	170	3.51×10^6	NT
5	5,000	NT	4.27×10^5	350
6	5,000	NT	5.17×10^4	98
7	0	NT	8.51×10^6	0

*オーブン(260℃)で4分間加熱

**未検査

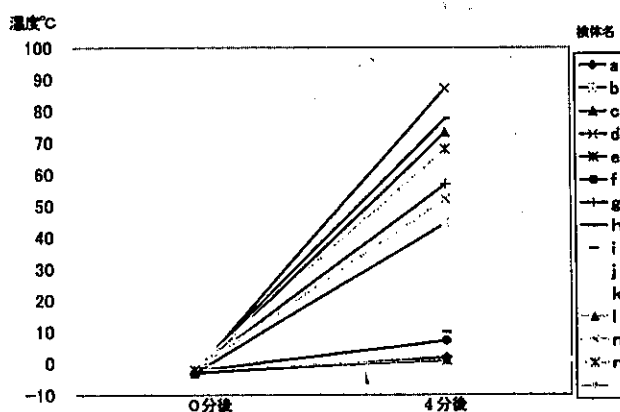


図1 加熱によるステーキ肉の内部温度の変化

験では中心部の温度がしばしば設定どおりに上昇しなかった。このため、食中毒原因菌が生き残ったと考えられた。今後、このような製品を利用する場合には十分な温度と時間をかけて調理することが大切である。

文 献

1. 国立感染症研究所編, 病原微生物検出情報 (2001). 22, 135-139.

漁港における腸炎ビブリオ調査（平成13年）

細呂木志保 磯部 順子 田中大祐 清水美和子
香取幸治 刑部陽宅 永井美之 竹内 崇¹

Vibrio parahaemolyticus Surveillance at Fishing Ports in Toyama Prefecture

Shiho HOSOROGI, Junko ISOBE, Daisuke TANAKA, Miwako SHIMIZU,
Koji KATORI, Yotaku GYOBU, Yoshiyuki NAGAI and Takashi TAKEUCHI¹

腸炎ビブリオ食中毒の発生は、近年、血清型 O3:K6の増加に伴い多くなっている。その主な原因が生食用魚介類加工品であるため、平成13年6月、食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準が一部改正され、食中毒防止のため、新たに生食用鮮魚介類等について表示基準、成分規格、加工基準及び保存基準等が設られた。

県厚生部では、腸炎ビブリオの生態やその食品汚染実態を知り、食中毒防止に役立てるため、昭和54年より平成7年まで市販魚介類の調査を実施してきた。その後、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13年の調査結果を報告する。

材料および方法

調査定点：県内の生地、魚津、四方、新湊、氷見漁港を定点とした。調査期間：平成12年と13年、6月から9月までは隔週ごとに、10、11月は月1回調査を実施した。検体の採取：前報 [1] に従った。腸炎ビブリオ数の測定：前報 [1] に従い、食塩ポリミキシンブイヨン培地（SPB）を用いた

MPN3本法で測定した。菌分離を目的とした増菌培地の比較には、[2] に示されるアルカリペプトン水（APW）を用いたMPN3本法による測定も併せて実施した。海水の塩分濃度：赤沼式比重計を用いて測定した [3]。耐熱性溶血毒（TDH）遺伝子の検索およびTDH産生腸炎ビブリオの分離：前報 [3] に従った。TDH遺伝子が検出された検体について、前報 [4] に従って、免疫磁気ビーズにより血清型O3:K6とO4:K68の分離を試みた。

結果と考察

平成13年の漁港海水中の腸炎ビブリオ数は $<3 \sim 2.4 \times 10^3/100\text{ml}$ で、海泥中の菌数は $<30 \sim 7.5 \times 10^4/100\text{g}$ であった。7月前半から8月前半にかけて菌数は増加し、11月まで検出された（表1）。調査を実施した平成8年～12年の各定点における平均腸炎ビブリオ菌数の季節別推移と平成13年の平均菌数の季節別推移を図1に示した。平成13年の菌数は7月前半や8月前半に、過去5年間の平均菌数をわずかに上回ったが、全体的には平成8年～12年と比較して菌数は少ない傾向であった。

1 食肉検査所

表1 海水、海泥中の腸炎ビブリオ菌数の月別変動

		第1回	第2回	第3回	第4回	第5回	第6回	第7回	第8回	第9回	第10回
		6月11日	6月25日	7月9日	7月23日	8月6日	8月20日	9月3日	9月17日	10月1日	11月5日
生地 (新川)	海水 V.p	<3*	<3	<3	2.0×10 ¹	2.3×10 ¹	2.1×10 ¹	1.1×10 ²	1.6×10 ¹	1.6×10 ²	3.6
	海泥 V.p	7.3×10 ¹	3.6×10 ¹	7.3×10 ¹	1.5×10 ²	4.3×10 ²	3.6×10 ²	7.3×10 ¹	2.9×10 ³	1.5×10 ⁴	6.2×10 ⁴
	水温(°C)	15.7	25.0	25.0	21.5	21.2	22.8	20.0	19.5	17.0	13.8
	塩分(‰)	7.2	7.0	7.6	7.2	6.9	7.2	7.5	7.3	6.8	6.5
魚津 (魚津)	海水 V.p	<3	<3	1.5×10 ¹	7.5×10 ¹	7.3	3.6	7.3	<3	2.3×10 ¹	9.1
	海泥 V.p	3.0×10 ¹	<30	7.5×10 ¹	1.6×10 ²	1.3×10 ²	4.3×10 ²	7.5×10 ²	4.6×10 ²	3.6×10 ¹	7.3×10 ¹
	水温(°C)	18.3	25.0	23.5	25.0	25.0	28.2	25.0	24.9	21.5	16.8
	塩分(‰)	17.1	9.9	21.1	26.1	29.1	27.6	30.2	28.9	29.4	27.9
新湊 (小杉)	海水 V.p	4.3×10 ¹	3.0	2.4×10 ²	9.1	2.1×10 ¹	1.6×10 ¹	2.3×10 ¹	2.1×10 ¹	3.6	2.3×10 ¹
	海泥 V.p	7.3×10 ¹	<30	<30	<30	1.5×10 ²	3.0×10 ¹	3.6×10 ¹	1.1×10 ²	<30	3.6×10 ¹
	水温(°C)	20.0	21.5	24.0	28.0	29.0	29.0	26.0	24.5	19.0	16.5
	塩分(‰)	22.3	19.0	26.7	30.1	29.0	28.1	28.2	17.8	28.5	31.1
氷見 (氷見)	海水 V.p	7.3	3.6	<3	6.2	2.1×10 ¹	2.4×10 ¹	9.1	1.1×10 ¹	<3	2.3×10 ¹
	海泥 V.p	<30	<30	<30	2.1×10 ²	4.3×10 ²	7.3×10 ¹	6.2×10 ¹	9.3×10 ¹	3.0×10 ¹	9.1×10 ¹
	水温(°C)	22.0	22.0	25.0	28.0	29.0	30.0	26.0	26.5	22.0	18.0
	塩分(‰)	29.3	27.4	30.8	33.7	34.7	33.2	32.5	32.8	32.8	33.9
四方 (富山市)	海水 V.p	<3	<3	1.5×10 ¹	7.3	2.9×10 ¹	<3	1.5×10 ¹	1.5×10 ¹	1.5×10 ¹	2.3×10 ¹
	海泥 V.p	3.0×10 ¹	<30	1.1×10 ²	2.0×10 ²	1.5×10 ²	9.3×10 ²	9.1×10 ¹	3.0×10 ¹	2.0×10 ²	2.0×10 ²
	水温(°C)	21.3	23.5	25.1	29.0	29.6	29.6	27.7	25.5	23.3	17.8
	塩分(‰)	22.6	15.7	22.3	25.1	32.7	26.1	32.9	24.1	30.9	31.9

* : 100 ml または 100 g 中の *Vibrio parahaemolyticus* 数(MPN 法により測定した)。

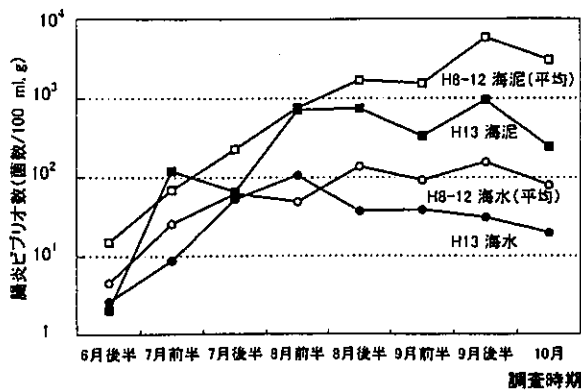


図1 漁港の海水、海泥における腸炎ビブリオの推移

海水 1L または 泥 10g を 3% NaCl 加 TSB で培養し、PCR により TDH 遺伝子の有無を調べた。その結果を表 2 に示した。海水 50 検体中 12 件 (24%)、海泥 50 検体中 16 件 (32%) から TDH 遺伝子が検出された。海水、海泥ともに 7 月前半から検出され、海水は 10 月前半まで、海泥は 11 月前半まで TDH 遺伝子が検出された。TDH 遺伝子が検出された培養液から TDH 産生性の O3:K6 および O4:K68 の分離を試みたところ、海水からは 12 検体中 1 件、海泥からは 16 検体中 6 件より TDH 産生性 O3:

表 2 海水、海泥からの TDH 遺伝子検出と TDH 産生性腸炎ビブリオの分離

項目	調査月日										合計	
	6/11	6/26	7/9	7/23	8/6	8/20	9/3	9/17	10/1	11/5		
海水	TDH 遺伝子	0/5*	0/5	1/5	2/5	2/5	1/5	1/5	2/5	1/5	0/5	10/50
	O3:K6	0/5**	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/50
海泥	TDH 遺伝子	0/5	0/5	1/5	3/5	1/5	0/5	2/5	3/5	2/5	4/5	16/50
	O3:K6	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	3/5	1/5	0/5	6/50

*: PCR 法による TDH 遺伝子検出数/検体数

** : ビーズ法による血清型 O3: K6 の分離数/検体数

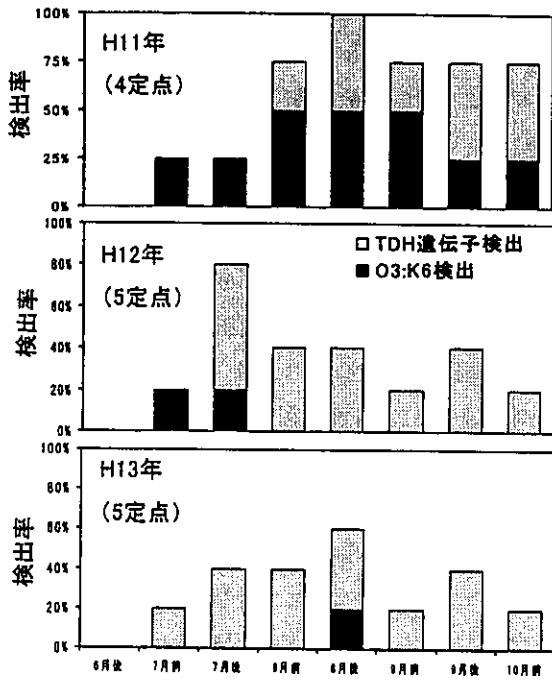


図2 海水からのTDH遺伝子とTDH産生性O3:K6の検出

K6が分離された。O4:K68は分離されなかった。平成11年～13年の海水からのTDH遺伝子とTDH産生性O3:K6の検出状況を図2に示した。いずれの年も7月前半から10月前半までTDH遺伝子またはTDH産生菌が検出されたが、TDH遺伝子の検出率は、11年が18/32 (56.3%)、12年が13/40 (32.5%)、13年が12/40 (30%)と年の経過とともに減少し、TDH産生菌の検出数も11年が10/32 (31.3%)、12年が2/40 (5%)、13年が1/40 (2.5%)と減少した。図3に示したように平成11

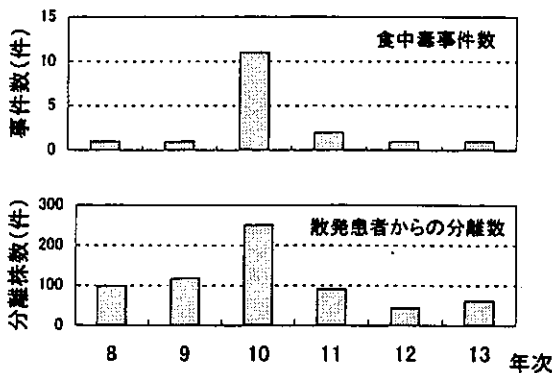


図3 富山県における腸炎ビブリオ食中毒発生の推移

年以降富山県において腸炎ビブリオ食中毒発件数と散発患者数は減少傾向となっている。これらの結果を考え合わせると、海水、海泥中の菌数と県内における食中毒事例や散発患者の発生数とが関連づけられるものと思われる。

従来、食品衛生検査指針では食塩ポリミキシンブイオン (SPB) が腸炎ビブリオの増菌培地として使用されてきたが、平成13年の厚生省令により、成分規格の検査方法では腸炎ビブリオの増菌培地としてアルカリペプトン水 (APW) を使用することとなった。このことより、平成12と13年に、魚津漁港と新湊漁港の海水、海泥68検体について、SPBとAPWで検出される菌数を測定し、両者の関係をみた (図4)。SPBで多く検出された例は15件 (22.1%) で、10倍多く検出された例が1件、APWでは不検出であったがSPBで検出された例が4件であった。APWで多く検出された例は43件 (63.2%) で、10倍多い例が11件 (16.1%)、100倍多い例が16件 (23.5%)、1000倍以上が4件 (5.9%)、SPBでは不検出であったがAPWで検出された例が8件であった。APWでは、SPBで検出されるよりも多い菌数が得られる傾向であった。環境水等の腸炎ビブリオの定量はSPB、APWを用いたMPN法によるほか、疎水性格子メンブランフィルターを用いる方法 [5] やMPN-PCR

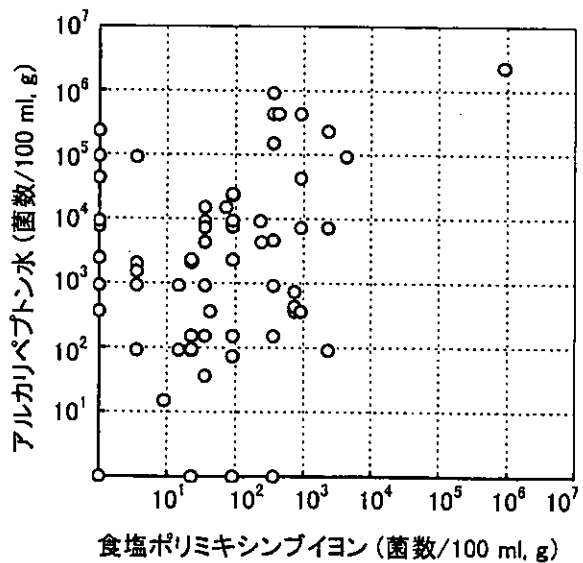


図4 食塩ポリミキシンブイオンとアルカリペプトン水における腸炎ビブリオ数

法 [6] などの報告がある。同一検体であっても方法によって算出される菌数が異なって得られることが少なくない。過去から現在まで、あるいは研究者によるデータを同一水準で論ずるため、方法間の補正を行うためのデータの蓄積が必要であろう。

謝 辞

本調査にご協力いただいた富山県業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. 平成13年厚生労働省令第128号:「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令」, 平成13年厚生労働省告示第212, 213号:「食品, 添加物等の規格基準を一部改正する件」
3. 細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 清水美和子, 香取幸治, 刑部陽宅, 竹内崇, 富田良一(2001). 富山衛研年報, 24, 171-174.
4. 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.
5. 窪田勉, 古屋洋一, 塩沢寛治, 青木慶祐, 森山親, 渡邊茂広, 山口博利, 山口人志 (1991). 静岡県衛生環境センター報告, 34, 39-45.
6. M.J.Alam (2002). FEMS Microbiol Lett., 19, 83-87.

富山県における2001年の病原微生物検出情報

清水美和子 細呂木志保 田中大祐
磯部順子 永井美之

Isolation of Pathogenic Bacteria in Toyama Prefecture in 2001

Miwako SHIMIZU, Shiho HOSOROGI, Daisuke TANAKA,
Junko ISOBE and Yoshiyuki NAGAI

われわれは県内10か所（昨年は11か所）の公立病院検査室，5か所の保健所，衛生研究所を定点として検出された病原細菌の情報収集を行なっている。2001年1月から12月の間の検出情報を材料別・菌種別に集計して表に示した。保健所・衛生研究所の検出病原菌は，ほとんどが糞便材料由来であった。また，医療機関で分離された黄色ブドウ球菌におけるメチシリン耐性ブドウ球菌（MRSA）の割合を本文中に示した。

【糞便】分離株総数は1,754株で，前年比111%と増加していた。最も多かったのは大腸菌692株で，前年比109%であった。その内，腸管出血性大腸菌（EHEC/VTEC）は88株で，その血清型はO157が74株，O26が14株であった。次に多かったのは黄色ブドウ球菌で590株（そのうちMRSAは50%）であった。カンピロバクターも143株と多かったが，前年比93%とやや減少した。サルモネラは118株で，前年比112%と増加し，5月にS. Tennesseeによる食中毒が発生した。ウェルシュ菌は6月に集団食中毒が発生して91株と多かった。前年の同菌分離株数は4株であった。腸炎ビブリオは63株で前年比121%と増加していた。

2類感染症では，赤痢菌が4株分離され，*S. flexneri* 2株は海外渡航歴のない患者，*S. sonnei* 2株はインドネシア旅行歴と中国旅行歴のある患者からの分離であった。また，パラチフスA菌1

株がネパール旅行歴のある患者から分離された。パラチフス患者は県内で6年ぶりの発生であった。

【穿刺液】分離株総数305株，前年比90%で，黄色ブドウ球菌（MRSAは51%），大腸菌，嫌気性菌などが多く分離された。

【髄液】分離株総数17株，前年比85%で，黄色ブドウ球菌（MRSAは25%），B群溶連菌，肺炎球菌が多く分離された。

【血液】分離株総数578株，前年比102%で，コアグラゼ陰性ブドウ球菌，大腸菌，黄色ブドウ球菌（MRSAは57%）が多く分離された。

【咽頭および鼻咽喉】分離株総数1,584株，前年比116%で，インフルエンザ菌，肺炎球菌，A群溶連菌が多く分離された。

【喀痰，気管吸引液および下気道】分離株総数6,513株，前年比96%で，黄色ブドウ球菌（MRSAは69%）が特に多く，他に緑膿菌，肺炎桿菌，肺炎球菌，インフルエンザ菌なども多く分離された。

【尿】分離株総数6,587株，前年比94%で，最も分離株数が多い検査材料であった。大腸菌，腸球菌，緑膿菌，コアグラゼ陰性ブドウ球菌が特に多かったが，黄色ブドウ球菌（MRSAは67%），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2,152株，前年比98%で，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

県内10か所の公立病院と5か所の保健所の検査
担当各位に感謝致します。

月別・菌種別の病原微生物検出状況 (2001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													1(1)
Salmonella Paratyphi A								1(1)					1(1)
Salmonella O4				2		1	3	4	3	1	1	2	17
Salmonella O7	1	1	1	1	(3)	1	3	1	1	1			42
Salmonella O8							1		1				2
Salmonella O9		1	3		3	4	(1)	13	5	7	3	2	52
Salmonella その他				1						1			2
Salmonella 群不明	1			1				1					3
Yersinia enterocolitica	1		1				1	1	1	1			6
Y. pseudotuberculosis													
Vibrio cholerae O1													
Vibrio cholerae O139													
Vibrio cholerae O1, 139以外								1					1
Vibrio parahaemolyticus						1	8	30	18	5	1		63
Vibrio fluvialis								1					1
Vibrio mimicus							1						1
Aeromonas	1	1	5	1	2	3	12	2	2	1		1	31
Plesiomonas shigelloides		3	1	1(1)	2	1	1		1	1			11(1)
Campylobacter	4	11	7	18	10	20	14	20	14	6	7	12	143
Staphylococcus aureus	41	38	42	59	33	54	(9)	46	43	47	42	48	590
Clostridium perfringens						(9)							9
Clostridium botulinum													1
Bacillus cereus	1												1
Entamoeba histolytica											1		2(1)
Escherichia coli組織侵入性								1(1)					1(1)
Escherichia coli毒素原性		4	1	3(3)	1(1)	3	2	8(1)	3	1		5	31(5)
Escherichia coli病原大腸菌	23	29	25	40(1)	39	46	64	42	23	27	36	53	447(1)
Escherichia coliEHEC/VTEC			(2)	2	8	(2)	11	21	8	(1)			88
Escherichia coliその他、不明	11	10	7	14	7	5	9(1)	13	9	8(1)	9	22	124(2)
Shigella		1(1)					1	1(1)			1		4(2)
合計	84	99(1)	95	143(5)	136(1)	253	239(1)	207(4)	132	120(1)	101	145	1754(13)

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	4	12	4	1	7	4	1	2		5	9	6	55
Klebsiella pneumoniae	4	2	2	3	5	3	2	2	2	1	3	1	30
Haemophilus influenzae		1			1			3					5
Neisseria meningitidis													
Pseudomonas aeruginosa	2	2	1	2	1	6	2	1	1	9		3	30
Mycobacterium spp.						2							2
Staphylococcus aureus	3	6	13	5	16	17	5	14	6	4	2	9	100
Staphylococcus コクサリウム陰性	1	3	5	3	5	3	4	2	2	3	3	2	36
Streptococcus pneumoniae				1	1			3					5
Anaerobes	2	9	12	2	3	6				6		2	42
Mycoplasma pneumoniae													
合計	16	35	37	17	39	41	14	27	11	28	17	23	305

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				1	1								2
Haemophilus influenzae						1	1						2
Neisseria meningitidis			1										1
Listeria monocytogenes										2			4
Staphylococcus aureus				2									4
Streptococcus, B	1			2								1	4
Streptococcus pneumoniae		1								1		2	4
合計	1	1	1	5	1	1	1	0	0	3	0	3	17

平成14年10月1日

4) 分離材料：血液

Escherichia coli	9	12	9	11	19	12	19	10	9	7	9	16	142
Salmonella Typhi													
Salmonella Paratyphi A								1					1
Salmonella spp.												1	1
Haemophilus influenzae		1			1	1		1					4
Neisseria meningitidis													
Pseudomonas aeruginosa	2	4	2	7	2	6	4	4	2	6	2	3	44
Staphylococcus aureus	10	5	11	9	14	5	15	19	12	14	16	11	141
Staphylococcus コウダラゼ陰性	12	23	25	13	16	28	22	15	15	16	8	10	203
Streptococcus, B				1	2					1			5
Streptococcus pneumoniae	1		2		4		1	1		4	3	3	19
Anaerobes	3	1	3	1		2		2	1		2	3	18
合計	37	46	52	42	58	54	61	54	39	48	40	47	578

5) 分離材料：咽頭および鼻咽喉からの材料

Bordetella pertussis													
Haemophilus influenzae	58	71	58	61	85	61	62	31	18	24	56	62	647
Neisseria meningitidis										2			2
Streptococcus, A	48	56	64	36	34	45	27	7	14	17	35	38	421
Streptococcus pneumoniae	40	46	34	55	67	47	43	23	14	33	58	54	514
C. diphtheriae													
合計	146	173	156	152	186	153	132	61	46	76	149	154	1584

6) 分離材料：喀痰、気管吸引液および下気道の材料

Mycobacterium tuberculosis	4	3	3	3	3	2	3	5	7	2	4	5	44
Klebsiella pneumoniae	61	59	71	67	76	80	87	97	90	87	103	73	951
Haemophilus influenzae	39	37	52	46	43	36	29	50	35	28	41	44	480
Legionella pneumophila													
Pseudomonas aeruginosa	97	91	97	93	103	104	120	110	100	110	109	100	1234
Staphylococcus aureus	286	223	312	251	309	234	259	233	207	235	238	218	3005
Streptococcus, A	2	3	5	1				1	3	4	3	2	28
Streptococcus, B	17	20	23	20	27	20	28	12	18	14	20	16	235
Streptococcus pneumoniae	37	43	69	47	66	36	33	30	39	43	52	41	536
Anaerobes													
Mycoplasma pneumoniae													
合計	543	479	632	528	627	512	560	540	500	523	570	499	6513

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
Escherichia coli	151	155	178	158	175	163	179	167	153	163	178	152	1972
Enterobacter spp.	17	20	12	14	29	12	27	28	22	17	15	15	228
Klebsiella pneumoniae	37	26	26	23	29	33	31	32	50	48	38	37	410
Acinetobacter spp.	6	5	5	3	3	1	7	12	11	6	3	7	69
Pseudomonas aeruginosa	82	63	84	53	73	65	71	88	98	97	81	62	917
Staphylococcus aureus	36	31	43	46	49	54	58	43	38	47	56	41	542
Staphylococcus コウダラゼ陰性	72	71	79	51	56	79	88	83	81	73	59	63	855
Enterococcus spp.	105	105	140	101	105	120	131	91	98	108	110	77	1291
Candida albicans	41	23	25	28	33	28	28	22	10	25	20	20	303
合計	547	499	592	477	552	555	620	566	561	584	560	474	6587

8) 分離材料：陰部尿道頸管擦過（分泌）物

Neisseria gonorrhoeae	3	1	2	3	2	2	3	8	6	3	6	5	44
Streptococcus, B	32	26	49	37	47	49	35	40	35	41	35	29	455
Chlamydia trachomatis	5	4	6	14	17	15	15	15	15	20	15	13	154
Ureaplasma													
Candida albicans	105	102	132	100	133	134	142	138	117	146	133	116	1498
Trichomonas vaginalis						1							1
合計	145	133	189	154	199	201	195	201	173	210	189	163	2152

液体クロマトグラフ/質量分析計を用いた 富山県内水道水中のハロ酢酸の分析

大戸 幹也 山本 敦 松永 明信

Haloacetic Acids Determination in Tap Water in Toyama Prefecture
by Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Mikiya OHTO, Atushi YAMAMOTO and Akinobu MATSUNAGA

水道水には、殺菌目的の塩素処理により、消毒副生成物が発生する。これらの多くに発癌性や変異原性が指摘され、含有量の把握が求められている。通常、消毒副生成物の分析において、トリハロメタン等の揮発性化合物はページ・トラップーガスクロマトグラフ/質量分析 (GC/MS)、ハロアセトニトリル、抱水クロラールは溶媒抽出後 GC/MS 分析で行われる。難揮発性化合物であるハロ酢酸化合物については、溶媒抽出処理後、更に複雑で危険な誘導体化処理を行って GC/MS 分析されるため [1]、前処理の簡略化が強く望まれている。滝埜らは、検出器を UV 検出器や電気伝導度検出器から質量分析計に換えて精度や感度を高め、飲料水中のこれらを高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) で直接分析する方法を開発した [2]。LC/MS は、近年精度や性能が大きく向上し、急速に普及している。食品中の残留農薬の公定方法として採用されるなど、その応用への期待が高まっている。我々は平成 4 年の水道法改正に伴い、毎年ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸については水道水含有量調査を行っている。平成 7 年にはハロ酢酸 7 種類についての含有量調査も実施し、その結果継続監視の重要性を指摘している [3]。そこで富山県内水道水中のハロ酢酸化合物検査に LC/MS を使用し、実試料で、日常検査への LC/MS 応用の可能性を検討した。

材料および方法

平成 13 年 9 月 11 日、富山県内 16 市町村の中から、給水人口が最も多い水道水をそれぞれ一ヶ所選定し、その各蛇口水を試験に供した。標準試薬は、スペルコ製 EPA552.2 ハロ酢酸 9 種類 (プロモ、プロモクロロ、プロモジクロロ、クロロ、クロロジプロモ、ジプロモ、ジクロロ、トリプロモおよびトリクロロ酢酸) 混合標準液、装置は、HP 社製 HP-1100MSD 型 LC/MS を用いた。なお、検査方法は滝埜ら [2] の方法に準拠して行った。

結果及び考察

ハロ酢酸 9 種類の混合標準液を分析し、そのクロマトグラムを Fig. 1 に示した。ハロ酢酸 9 種類は、全て 16 分以内にそれぞれ分離し溶出した。ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸の 2 種類は、水道法で水道水中の濃度指針値が設定されている。ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸については、定量モードで SIM 分析し、検量線を Fig. 2 に示した。それぞれ 2~200 $\mu\text{g/l}$ の範囲では原点を通る良好な直線性が得られた。

検体は全てが濁りも無く無色透明であったため、メンブランフィルターでろ過せず、つまり全く前

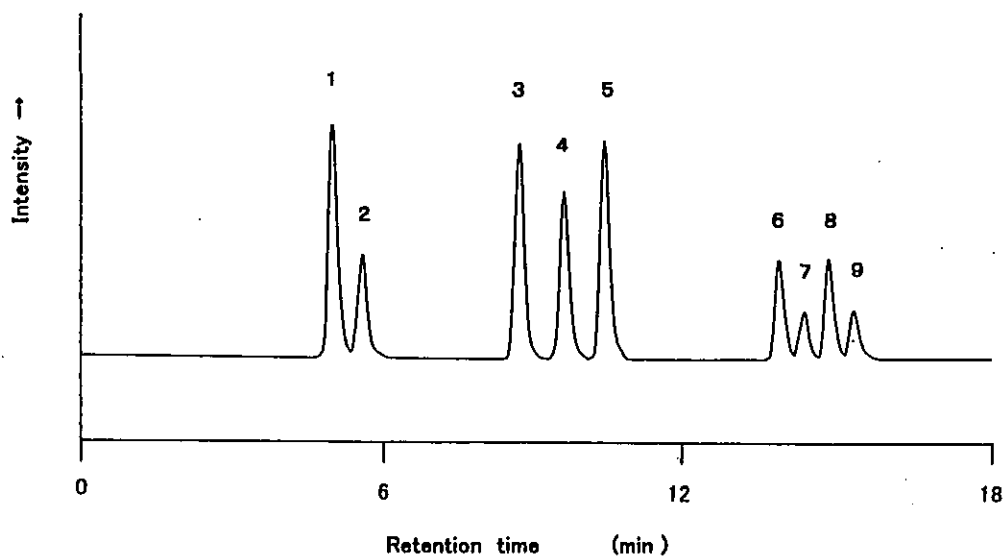


Fig. 1 Total Ion Chromatogram of 9 Haloacetic Acids

Peak 1; chloroacetic acid, Peak 2; bromoacetic acid, Peak 3; dichloroacetic acid
 Peak 4; bromochloroacetic acid, Peak 5; dibromoacetic acid, Peak 6; trichloroacetic acid
 Peak 7; bromodichloroacetic acid, Peak 8; chlorodibromoacetic acid, Peak 9; tribromoacetic acid

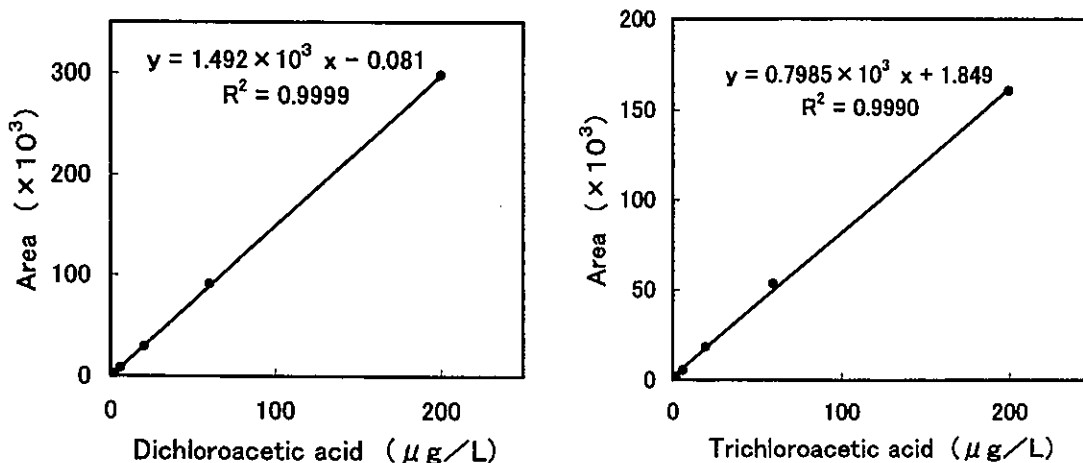


Fig. 2 Calibration Curves of Dichloroacetic Acid and Trichloroacetic Acid

処理を行わずに直にSIM分析を行った。検体の分析に際して、両成分の測定を妨害する成分は見られなかった。結果は、ジクロロ酢酸は、16検体中一検体も検出されず、トリクロロ酢酸は16検体中4検体(2.2, 3.9, 4.6及び5.1 μg/l)で検出された。検出検体の平均濃度は、4.0 μg/lであった。水道法で定められているトリクロロ酢酸の指針値は200 μg/lであるが、全てこれより非常に小さ

く、問題は無かった。

本LC/MS法と公定方法である上水試験方法の溶媒抽出-GC/MS法 [1] とを、主に検査現場サイドの作業内容、労作業等の面で比較した。本法は前処理が不要となったことで、①ジアゾメタン溶液製造に伴う爆発、有毒有害な危険試薬処理が無くなった、②抽出や器具洗浄に伴う有害有機物(tert-ブチルメチルエーテル)や強酸の使

用量や廃液量が減じた, ③試薬量, 器具数, 検査前後の洗浄(器具の洗剤洗浄及び酸洗浄)量が大きく減じた, ④検査成績を得るまでの時間が短縮した。特に労作業面に関しては, 前処理が不要になったことで, 成績を得るまでの時間は, 1.5日間(16検体の分析)短縮した。以上の点からも検査件数が多い場合の利点は大きいと考えられた。

LC/MSは難揮発性化合物分析に関しては非常に優れた定性装置であり, 近年食品中の残留農薬の確認検査として公定方法に採用されるなど, 行政検査での応用範囲は広がってきている。本検査のように前処理が不要となれば, 検査の省力化と検査精度向上の両面に果たす役割は大きく, 公

衆衛生検査機関としてはLC/MS導入の利点は大きいと考えられた。

文 献

1. 日本水道協会(2001), 上水試験方法, p453-457.
2. Takino, M., Daishima, S., and Yamaguchi, K. (1997). *Analyst*. 125. 1097-1102.
3. 大戸幹也, 健名智子, 大浦 徹, 松永明信(1993). 富山衛研年報, 19, 211-213.

平成13年度食品衛生(理化学)検査の精度管理調査について

齊藤行雄 大戸幹也 松永明信 尾崎一郎¹

Quality Control of the Physicochemical Testing of Food

Yukio SAITO, Mikiya OHTO, Akinobu
MATSUNAGA and Ichiro OZAKI

平成9年4月に食品衛生検査施設の業務管理制度が施行となり、検査機関に検査業務管理基準(GLP)が適用されることとなった。本県でも、平成10年12月に「富山県食品衛生検査業務管理要綱」を制定し、保健所、食肉検査所及び衛生研究所に検査水準の維持、向上を目的としたGLPが導入され、平成11年度から各検査機関合同で精度管理調査を実施している[1,2]。本年度は、牛乳中の成分規格試験(酸度及び乳脂肪分)による調査を実施した。同一ロットの市販牛乳を検査機関に配布し、各成分規格値(検査結果)の報告を求め、当所で結果を集計して解析と評価を行ったのでその概要について報告する。

た同一ロットの市販牛乳(品質保持期限2002年1月27日、紙パック200mL)50個を試料とした。

- (5) 検査試料の配布量:各機関に検査試料8個を配布した。
- (6) 測定方法:各機関の検査実施標準作業書(検査SOP)に基づき実施した。
- (7) 検査結果等の報告:酸度は小数点以下2桁まで、乳脂肪は小数点以下1桁まで求めた数値と、参考値として各々1桁多い数値も併せて報告することを指定した。各項目5回の測定値及び検査経過記録等を平成14年2月8日までに当所に送付することとした。

調査方法

結 果

- (1) 実施期間:平成14年1月21日~2月8日
(検査試料の測定期間:平成14年1月21日~1月25日)
- (2) 対象:県内で食品理化学検査を行う5保健所及び衛生研究所の6機関
- (3) 調査項目:牛乳中の酸度(乳酸重量%)及び乳脂肪分規格試験
- (4) 検査試料:試料配布日(1月21日)に購入し

- (1) 酸度
酸度についての集計結果をTable 1に示した。各検査機関が5回測定した平均値(\bar{X})の最大値(Max.)は0.120%、最小値(Min.)は0.102%、その平均値(全機関平均値, \bar{x}) \pm 標準偏差(SD)は、 0.1127 ± 0.0069 %であった。機関間の変動係数(CV)は、6.12%と比較的小さい値が得られ、機関間のばらつきは小さかった。各機関内の

1 国際健康プラザ

Table 1. Analytical Results of Acidity(Lactic Acid Content) in Milk by Titrimetric Method

Laboratory	Content (%)	CV (%)	Range (%)
A	0.110	0	0
B	0.120	0	0
C	0.110	0	0
D	0.114	4.8	0.01
E	0.102	4.4	0.01
F	0.120	0	0
Max.	0.120	4.8	0.01
Min.	0.102	0	0
Average	0.1127	1.53	0.003
SD	0.0069	—	—
CV(%)	6.12	—	—

併行測定におけるCVは0～4.8%の範囲にあり、全て5%以内の小さい値であった。

検査試料の酸度については、当所で試料配布日(1月21日)から1月25日までの5日間の経時変化を調査したところ、数値の変動は無かった。このことから試料中の酸度は0.11%で安定しているものと想定された。仮にこの0.11%を真の値とした場合、最も測定平均値が低いE機関の誤差率(真値に対する誤差の百分率) [3] は-7.3%であり、最も測定平均値が高いB及びF機関の誤差率は9.1%となった。誤差率は全ての機関が-10%～+10%の範囲にあって「良好」と評価できた。また、牛乳の配布日から5日間は数値の変動がなかったことから、測定期間中の日時による誤差は少ないものと考えられた。

\bar{X} -R管理図 [3, 4] を作成し Fig. 1-1 に示した。 \bar{X} 管理図では、検査機関全てが $\bar{x} \pm 2SD$ の範囲にあり、「良好」であった。R管理図においては、D及びE機関の測定値が上方管理限界(UCL)を超えることになり、測定値のばらつきがみられたので滴定時の終点決定などに注意する必要がある、その他の機関では「良好」と判断できた。

z-スコアを Fig. 1-2 に示した。全てその絶対値は2以内であり、全機関が「充分管理されている」と判断できた。

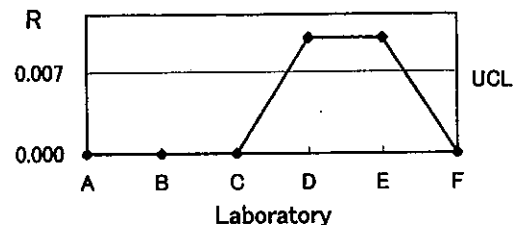
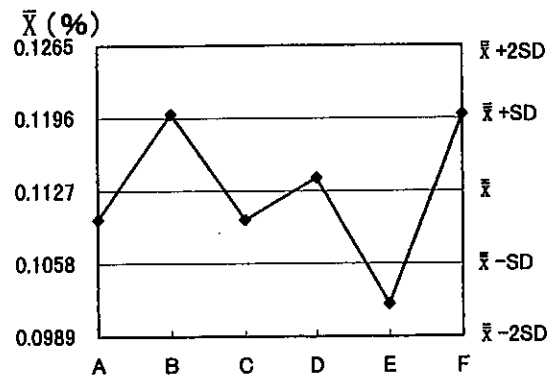


Fig. 1-1. \bar{X} -R Chart of Acidity

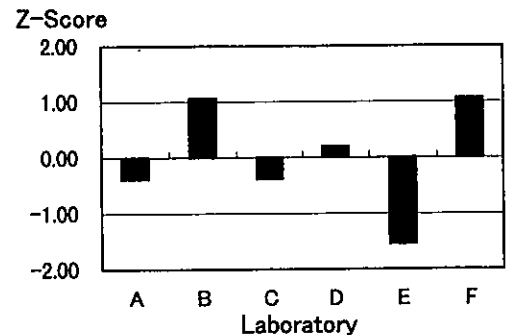


Fig. 1-2. Z-Score of Acidity

(2) 乳脂肪分

乳脂肪分離試薬として界面活性剤法による測定値を報告値とした機関は、B機関のみであり、その他の機関は90%硫酸法による測定値の報告であった。これらの報告値についての集計結果をTable 2に示した。各機関の測定平均値(\bar{X})のMax.は4.20%、Min.は3.92%、 $\bar{x} \pm SD$ は、 4.083 ± 0.098 %であった。機関間のCVは、2.41%と小さい値が得られ、機関間のばらつきは小さかった。各機関内の併行測定における機関内CVは、全てが3%以内であって小さい値であった。

検査試料の乳脂肪分については、当所で試料配布日(1月21日)から1月25日までの5日間の経時変化を調査したところ、数値の変動が無かった。

Table 2. Analytical Results of Fat in Milk by Gerber Method

Laboratory	Content (%)	CV (%)	Range (%)
A	4.04	2.2	0.2
B	3.92	1.1	0.1
C	4.08	1.1	0.1
D	4.16	1.3	0.1
E	4.20	0	0
F	4.10	0	0
Max.	4.20	2.2	0.2
Min.	3.92	0	0
Average	4.083	0.95	0.08
SD	0.098	—	—
CV(%)	2.41	—	—

このことから試料中の乳脂肪分は4.1%で安定しているものと想定された。仮にこの4.1%を真の値とした場合、最も測定平均値が低いB機関の誤差率は-4.4%であり、最も測定平均値が高いE機関の誤差率は2.4%となった。誤差率は全ての機関が-10%~+10%の範囲にあって「良好」とであると評価できた。また、酸度の場合と同様に、測定期間中の日時による誤差は少ないものと考えられた。

\bar{X} -R管理図をFig. 2-1に示した。 \bar{X} 管理図においては、全検査機関が、 $\pm 2SD$ の範囲にあり、「良好」であった。R管理図においては、A機関の測定値が僅かにUCLを超えることになり、若干測定値のばらつきがみられたが、その他の機関では「良好」と判断できた。

zスコアをFig. 2-2に示した。全てその絶対値は2以内であり、「全機関が充分管理されている」と判断できた。

考 察

酸度については、6機関の内、A,B,C,Fの4機関ではR値が0であり、ばらつき無しとなっている。一方、D及びE機関のR値が0.01であり、測定値がR管理図のUCL 0.007を超え、ばらつきありという結果になった。このばらつきは、計

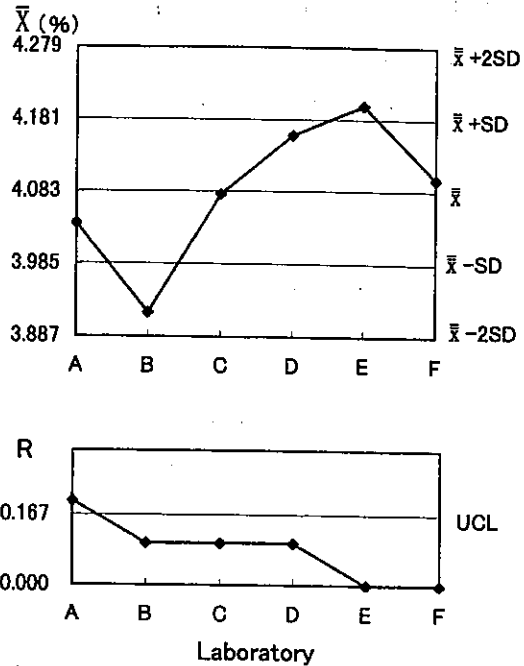


Fig. 2-1. \bar{X} -R Chart of Fat

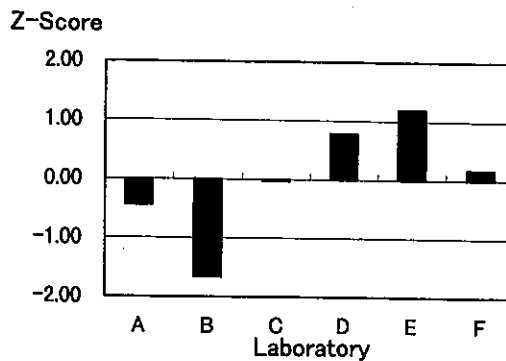


Fig. 2-2. Z-Score of Fat

算上では5回の検査の内、1回0.1moL/L水酸化ナトリウム溶液2~3滴(0.1~0.15mL, 酸度0.01%相当)多めに終点とした場合に発生するものである。しかし、6機関の検査結果を小数点3桁で示した数値からR値を再計算すると、UCL(0.007)内に入ってばらつき範囲が低くなることから、問題ない結果であると考えられた。B及びF機関では0.1moL/L水酸化ナトリウム溶液2~3滴分多めに入れ終点としている傾向にあったが、一定の滴数で終点を決定していることから、ばらつきは低くなっている。ばらつきを少なくするには、終点(微紅色)前から1滴毎に十分に混合しながら緩やかに滴定し注視する必要がある。また、終点が明確に判定しにくいので白板上で対照試料

と比較しながら行い、複数の検査者による判定も終点決定に効果があると考えられる。

乳脂肪分については、6機関における測定値のR値は、E,Fの2機関では0であり、B,C,Dの3機関では0.1であった。一方、A機関では0.2であり、R管理図のUCL 0.167を超え、若干測定値のばらつきがみられた。このばらつきは、6機関の検査結果を小数点2桁で示した数値からR値を求め、UCLを再計算すると0.217となり、全ての検査機関が管理限界範囲内に入っており、問題ないものと考えられる。測定のをらつきを抑えるためには、①試料は牛乳用ピペットで1mL採取し、油脂分が多いので乳脂計内部に緩やかに流下させて全量入れる。②乳脂肪分離試薬と十分に混和することにより、脂肪を覆っているタンパク質被膜を完全に破壊する。③遠心分離は700~1,000rpmに達してから5分間行い脂肪を完全に分離させる。④2人で析出脂肪の目盛りを読取る。1人が実験台上に設置した押棒の上にゴム帽金具部を合わせ、脂肪層を目盛部にまでゆっくり押し上げて下部値を維持して読取り、同時にもう1人が上部値を読取る。この方法では、ゲルベル乳脂計を65℃水浴から上げて1分間までは乳脂肪%の変動が無かった(室温24℃)。以上のことなどを注意して実施すると数値の変動が少なくなるものと考えられる。

ところで、乳及び乳製品の成分規格に関する省

令に基づき(乳脂肪分離試薬:90%硫酸法)イソアミルアルコールの盲試験を実施すると、新規購入の試薬では0%、古い試薬(開封後20年経過のもの)では7.51±0.44%(n=2)となり、悪臭を有した油状物が析出した。この油状物は、硫酸酸化により生成した脂肪酸(3-methylbutanoic acid)と想定された。また、この古いイソアミルアルコールを用いて牛乳試験を実施すると、乳脂肪分は平均5.01±0.02%(n=2)となった。実際の牛乳中ではマトリックス効果で試薬の酸化が抑制されて牛乳由来の乳脂肪(4.1%)より高め5.0%になったものと考えられる。このように、試薬による油状物があると脂肪分が高い数値になるので、盲試験を行ってから用いるべきであるが、イソアミルアルコールは新しい試薬を購入して検査することが望ましいと考えられた。

A,B,Fの3機関からは、参考として90%硫酸法及び界面活性剤法の2方法における測定値の報告があったので、これら乳脂肪分離試薬の比較をTable 3に示した。90%硫酸法における $\bar{x} \pm SD$ は、4.060±0.035%、界面活性剤法における $\bar{x} \pm SD$ は、4.007±0.081%であった。界面活性剤法の場合に若干低めの数値が得られたが、日常の検査では十分に使用可能である。但し、規格基準に近い数値の場合は、省令法の90%硫酸法でも実施する必要がある。

「富山県食品衛生検査業務管理要綱」に基づき、

Table 3. Comparison of Two Different Reagents for Separating Fat in Fat Content Determination in Milk by Gerber Method

Laboratory	90% Sulfuric Acid			Detergent(Tween 80) ¹⁾		
	Content (%)	CV (%)	Range (%)	Content (%)	CV (%)	Range (%)
A	4.04	2.2	0.2	4.08	1.1	0.1
B	4.04	1.4	0.1	3.92	1.1	0.1
F	4.10	0	0	4.02	0.4	0.05
Max.	4.10	2.2	0.2	4.08	1.1	0.1
Min.	4.04	0	0	3.92	0.4	0.05
Average	4.060	1.20	0.10	4.007	0.87	0.08
SD	0.035	—	—	0.081	—	—
CV(%)	0.85	—	—	2.02	—	—

1) Mixture of Tween 80 and sodium salicylate

平成14年10月1日

食品衛生検査を実施する6機関を対象として、牛乳中の成分規格試験（酸度及び乳脂肪分）の精度管理調査を実施したところ、6機関全て管理状態は、良好であった。R管理図では、UCLを僅かに超える機関もみられたが、他機関の繰返し測定値の範囲が極めて狭いことから生じた結果であり、滴定時の終点決定や乳脂計目盛の読取り方法などを一定にすることにより改善されるものと考えられる。今後も食品衛生検査データの信頼性確保の向上に資するために、継続的に調査を実施することが重要である。

文 献

1. 大戸幹也，松永明信，尾崎一郎（2000）. 富山衛研年報，23，175-177.
2. 大戸幹也，松永明信，尾崎一郎（2001）. 富山衛研年報，24，191-194.
3. 日本水道協会（2001）. 上水試験方法解説編，16-20.
4. 日本規格協会（1998）. JIS Z 9021

平成13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

On the External Quality Control of the Quantification of Lead and Iron 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13年度は鉛および鉄の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。

(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。検査結果は鉛については小数点以下3桁で、鉄については小数点以下2桁で記載することとした。

調 査 方 法

- (1) 実施時期：平成14年1月11日～2月1日
- (2) 参加機関：水道事業体1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10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：鉛、鉄
- (4) 配布試料：鉛測定用試料は市販ミネラル水に鉛標準液及び超高純度硝酸(1Lにつき10ml)を添加して25L調製し、あらかじめ酸洗した2Lポリ瓶に小分けして配布した。この試料における鉛の濃度範囲は0.01～0.10mg/Lであると明示した。また鉄測定用試料は市販ミネラル水に鉄標準液及び超高純度硝酸(1Lにつき10ml)を添加して15L調製し、あらかじめ酸洗した1Lポリ瓶に小分けして配布した。この試料における鉄の濃度範囲は0.1～1.0mg/Lであると明示した。

結 果

- (1) 鉛

鉛については、県内の水質検査全10機関のうち7機関が参加し、またこのうち3機関が2通りの方法を使用し報告したことから10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フレームレス原子吸光光度法を用いた機関は4機関、ICP法を用いた機関は3機関、ICP-MS法を用いた機関は3機関であった。

各機関から小数点以下3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4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 1に示した。

全機関の測定値の平均値±標準偏差は0.0186±0.00284mg/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0.0～10.1%であり、ほとんどの機関において判断基準である10%未満であった。

Table 1 Summary of Quantification of Lead

Laboratory No.	Concentration (mg/L) Mean value of 5 runs	CV(%)	Recovery ^{a)}	Method ^{b)}	Internal Standard	Pretreatment	HNO ₃ (v/v%) ^{c)}	
							Sample	Standard
1	0.0128	8.6	0.69	ICP		10-fold concentration	10	1
2	0.0166	3.3	0.89	ICP	○	10-fold concentration	10	10
3	0.0172	2.6	0.92	ICP		10-fold concentration	10	10
4	0.0176	3.1	0.95	ICPMS	○	heat	1	1
5	0.0180	0.0	0.97	ICPMS	○	—	1	1
6	0.0184	3.0	0.99	FLAA (peak area)		matrix modifier addition	1	1
7	0.0202	2.2	1.09	FLAA (peak height)		5-fold dilution + matrix modifier addition	0.2	0.2
8	0.0210	0.0	1.13	ICPMS	○	—	1	1
9	0.0216	10.1	1.16	FLAA (peak height)		matrix modifier addition	1	1
10	0.0224	2.4	1.20	FLAA (peak height)		matrix modifier addition	1	1
Number of lab.	10	10	10					
Max(mg/L)	0.0224	10.1	1.20					
Min(mg/L)	0.0128	0.0	0.69					
Average(mg/L)	0.0186	3.53	0.999					
SD(mg/L)	0.00284	3.30	0.153					
CV(%)	15.3	—	—					

a) Recovery = Concentration/Average

b) FLAA : Flameless Atomic Absorption Spectrometry

ICP : Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

ICPMS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

c) HNO₃ concentration in solution provided for analysis

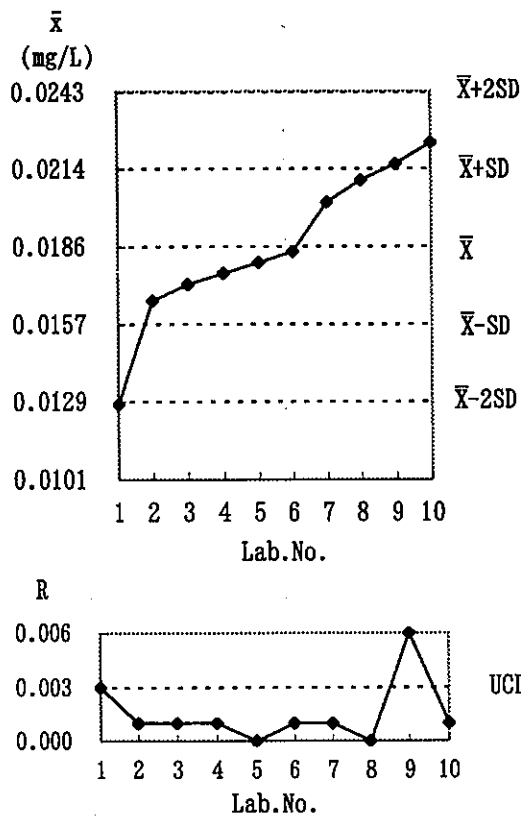


Fig. 1 \bar{x} -R Chart of Lead
 \bar{x} : Average SD : Standard Deviation
 UCL : Upper Control Limit

全機関の測定値の変動係数（室間変動係数）は15.3%と10%を上回った。

鉛については昨年度に引き続いての精度管理である [1]。あらかじめ鉛濃度が0.001mg/L未満であることを確認した市販ミネラル水（マグネシウム5.4mg/L, カルシウム29.5mg/L, ナトリウム9.5mg/Lを含む）に鉛標準液を添加し0.018mg/Lとなるように調製した。測定値の平均値は調製濃度の103%とほぼ一致した。

鉛の \bar{x} -R 管理図を Fig. 1 に示す。機関No. 1を除いた9機関の測定値は平均値±2標準偏差の範囲（0.0129～0.0243mg/L）内に収まっていた。R管理図において、機関No. 9がUCL（上方管理限界）を超えていた。

鉛における z スコアの順位を Fig. 2 に示す。機関No. 1を除いた9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0.0186mg/Lを真の値と仮定し、

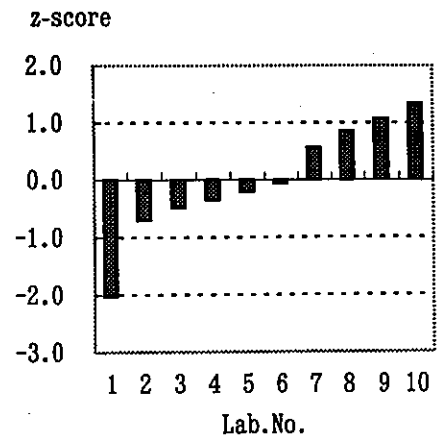


Fig. 2 Z-score Order of Lead

回収率（＝測定値／真の値）を求めると、Table 1 に示す通り、良好と判断される0.9～1.1となる範囲に含まれた機関はNo.3-7の5機関であった。

報告された全測定値を検査方法ごとにまとめた結果を Table 2 に示す。ICP-MS法による測定値の回収率がほぼ100%であったのに対し、フレームレス原子吸光光度法による測定値の回収率は111%と高く、ICP法による測定値の回収率は84%と低かった。

昨年度はフレームレス原子吸光光度法において回収率が低く、その原因として試料水中のマトリックスの影響が考えられた。今年度はフレームレス原子吸光光度法を用いた4機関においてすべてマトリックス修飾剤（市販パラジウムマトリックス修飾剤）が使用されていた。このうちデータ処理においてピーク面積法を用いている機関が1機関、ピーク高さ法を用いている機関が3機関であった。マトリックス修飾剤を使用した場合、標準液と試料ではピークの形状が異なったり、ピーク出現位置が変わったりすることがある。当所においてマトリックス修飾剤を添加しピークの形状を調べたところ、標準液のピークに比べ試料のピークがシャープになり、出現時間も若干早くなった。このため、データ処理においてピーク面積を用いるとほぼ100%の回収率が得られるが、ピークの高さを用いると回収率は大幅に100%を超えた。

今回フレームレス原子吸光光度法を用いている機関の中で、ピーク面積法を用いている機関（機

Table 2 Quantification of Lead by Three Different Methods

Method	Number of Data	Average (mg/L)	SD (mg/L)	CV (%)	Recovery
FLAA	20	0.0207	0.00190	9.2	1.11
ICP	15	0.0155	0.00213	13.7	0.84
ICPMS	15	0.0189	0.00160	8.5	1.01

FLAA:Flameless Atomic Absorption Spectrometry

ICP :Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

ICPMS :Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

関No. 6)は回収率が99%であったのに対し、ピークの高さを用いている機関(機関No. 7, 9, 10)においては回収率が3機関平均115%と高い値を示した。測定機器によってはピーク面積法に対応していない機種もあるため問題が残る。

ICP法による測定値の回収率は昨年度同様低かった。その原因としてICP法を用いた3機関(機関No. 1, 2, 3)とも試料を10倍濃縮していることから物理干渉の影響が考えられる。この場合、上水試験法によると内部標準法や標準添加法による補正が必要とある [2]。

機関No. 2, 3は同一機関、同一測定者が同一日に内部標準法使用有(機関No. 2)、使用無(機関No. 3)の両方法で測定したものである。両者の値はともにやや低め(回収率それぞれ89, 92%)であったが、両者の間に差は見られなかった。この機関においては精度管理の前に試料導入部の調整を行っており、回収率が90%前後に収まったものと思われる。

Table 1に機器分析にかける際の試料溶液と標準溶液の硝酸濃度を示した。ほとんどの機関において両者は同じになっているが、機関No. 1においては試料溶液中の硝酸濃度が標準溶液のその10倍であった。両者は同じにすべきであり、このことも機関No. 1の回収率の低さの原因のひとつと考えられる。

(2) 鉄

鉄については、県内の水質検査全10機関のうち9機関が参加し、またこのうち1機関より2通りの方法、また別の1機関より2名の担当者による

測定値の報告があったことから11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ICP法を用いた機関は1機関、フレームレス原子吸光度法を用いた機関は1機関、吸光光度法を用いた機関は9機関であった。

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3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。この鉄における検査機関番号は、Table 1の鉛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0.557±0.0167mg/Lであり、Grubbsの異常値検定(危険率5%)の結果、棄却される値はなかった。各機関内での併行測定における室内変動係数は、0.0~2.3%とすべて10%未満であった。室間変動係数も3.0%と10%を下回っており、機関内・機関間ともにばらつきは小さかった。

鉄の精度管理は今回が3回目となるが、今回は市販ミネラル水に鉄標準原液を添加し、鉄基準値を超える濃度の試料についての精度管理を行った。

鉄の \bar{x} -R管理図をFig. 3に示す。すべての機関の測定値が平均値±2標準偏差の範囲(0.523~0.590mg/L)内に収まっていた。R管理図においてUCL(上方管理限界)を超える機関はなかった。

鉄におけるzスコアの順位をFig. 4に示す。すべての機関において|z|は2未満で「満足」と評価された。

測定値の平均値0.057mg/Lを真の値と仮定した場合の回収率が0.9~1.1である範囲(0.501~

Table 3 Summary of Quantification of Iron

Laboratory No.	Concentration (mg/L) Mean value of 5runs	CV(%)	Recovery (= Concentration/Average)	Method ^{a)}
1	0.534	1.7	0.96	ABS
2	0.542	1.5	0.97	FLAA
3	0.542	0.8	0.97	ABS
4	0.542	0.8	0.97	ABS
5	0.546	1.0	0.98	ABS
6	0.558	0.8	1.00	ABS
7	0.560	0.0	1.01	ABS
8	0.564	1.0	1.01	ABS
9	0.574	1.0	1.03	ABS
10	0.574	2.0	1.03	ABS
11	0.586	2.3	1.05	ICP
Number of lab.	11	11	11	
Max(mg/L)	0.586	2.3	1.05	
Min(mg/L)	0.534	0.0	0.96	
Average(mg/L)	0.557	1.2	1.00	
SD(mg/L)	0.0167	0.6	0.030	
CV(%)	3.0	—	3.0	

a) ABS : Absorptiometry
 FLAA : Flameless Atomic Absorption Spectrometry
 ICP : Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

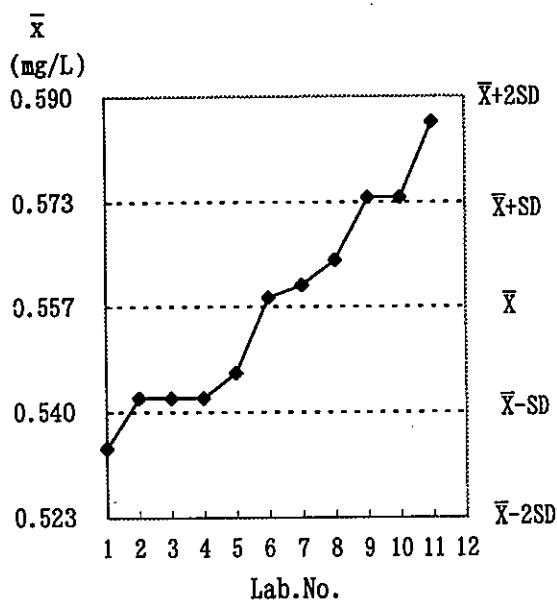


Fig. 3 \bar{x} -R Chart of Iron
 \bar{X} : Average SD : Standard Deviation
 UCL : Upper Control Limit

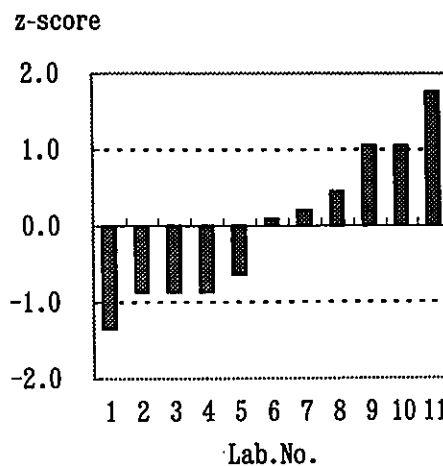


Fig. 4 Z-score Order of Iron

平成14年10月1日

0.612mg/L) をはずれた機関はなかった。

各機関から報告された鉄の検査結果は概ね良好であるといえる。

また3回目の精度管理となった鉄については、すべての機関の測定値が平均値±2標準偏差の範囲内に収まり、機関内・機関間のばらつきも小さく良好な結果であった。

考 察

今年度の水道水質検査精度管理のうち、昨年度に引き続いて行った鉛については、分析法の検討を試みた機関においては回収率の改善が見られ、機関間のばらつきの程度が小さくなり、全体として分析精度は向上した。

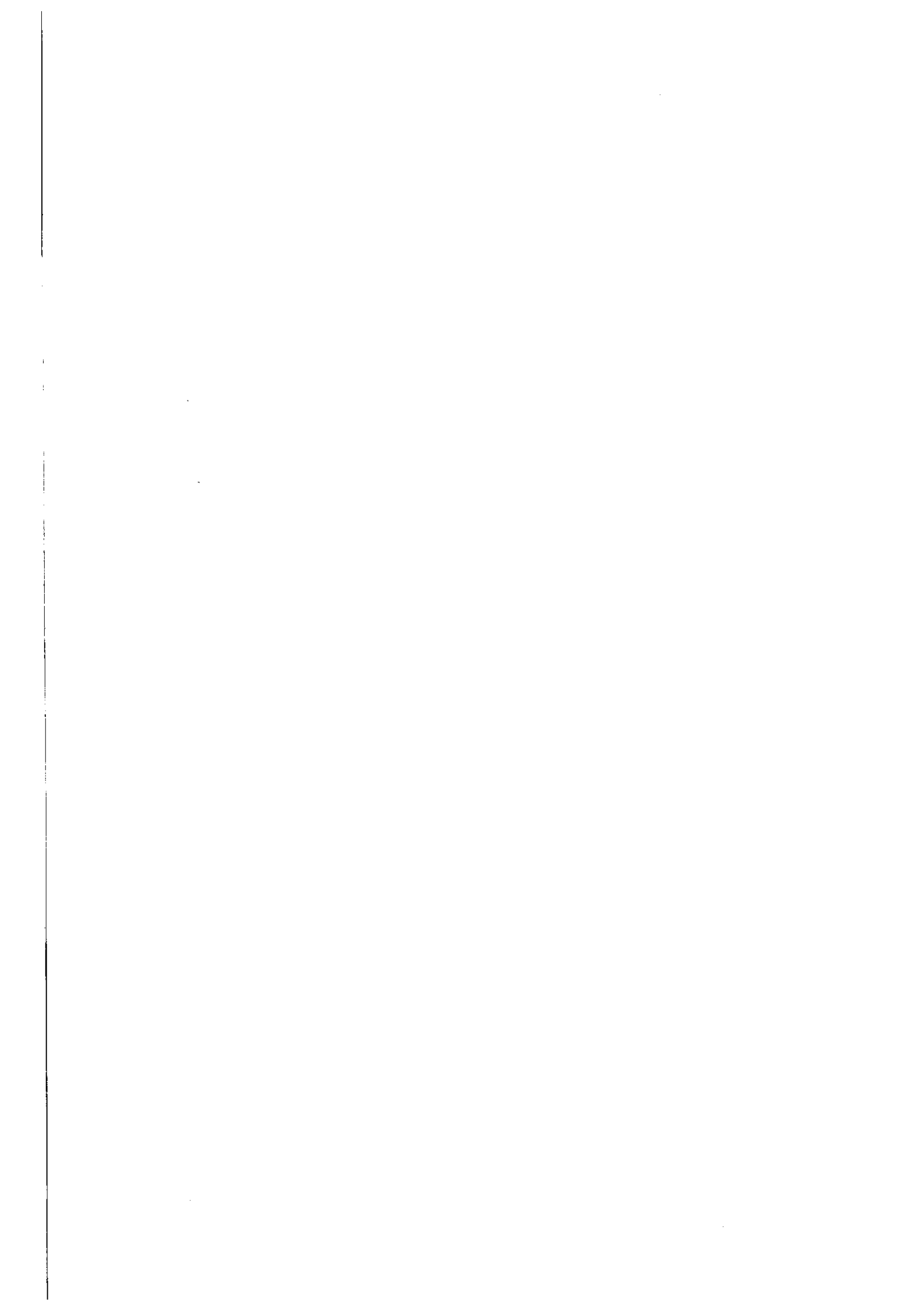
文 献

1. 健名智子, 高柳信孝, 松永明信 (2001). 富山衛研年報, 24, 195-200.
2. 日本水道協会 (2001). 上水試験法解説編. p324.



4. 業

績



4. 業 績

(1) 誌 上 発 表

[原 著]

1) Characteristics of a column suitable for capacity gradient chromatography with a borate eluent

Atsushi Yamamoto, Shuji Kodama, Akinobu Matsunaga, Yoshinori Inoue*,
Tetsuya Aoyama*, Yugo Kumagai*

Analyst, 126, 465-468, 2001.

In capacity gradient elution, the gradient separation of ionic species is achieved by decreasing the ion-exchange capacity of a column during the course of the separation. Diol-type hydroxy groups on the resin surface form anionic complexes with borate as an eluting reagent. Thus, a chemically bonded anion-exchange column enriched with residual hydroxy groups allows the creation of a capacity gradient. An increase in the amount of the complex formed gradually brings about a decrease in the ion-exchange capacity of the column, and strongly bound analyte ions are eluted. We investigated the characteristics of a column suitable for this eluent system. The concentration of borate eluent required to remove the ion-exchange capacity depended inversely on the ratio of the residual hydroxy groups to functional groups. On a column in which this ratio was approximately 100, the ion-exchange capacity could easily be adjusted by using a low concentration of mannitol as a competing reagent. Use of this column led to very small baseline shifts during the borate-mannitol gradients, and to the simultaneous determination of anions with widely varying retention times.

2) 牧野用ボックストラップのイヨシロオビアブ誘引効果

渡辺 護, 斉藤嘉広*, 桔梗 隆*

日本ペストロジー学会誌, 16 (1): 46-49, 2001.

放牧牛に飛来するアブを誘殺するために開発されたボックストラップを用いてイヨシロオビアブ（オロロ）に対する誘引効果を実験した。本トラップの特徴は誘引源として二酸化炭素を用いないことにある。毎年多量のイヨシロオビアブが発生する福光町中河内で実験を行った結果、自動車道路の側に設置したトラップには、比較に用いた二酸化炭素添加キャノピトラップに匹敵するイヨシロオビアブが誘引された。一方、道路から35m離れたボックストラップには前者の1/5しか誘引されなかった。このことは二

酸化炭素無添加ボックストラップの設置場所を吟味することで、多くのイヨシロオビアブを捕獲することが可能であることを示し、二酸化炭素の供給が難しい山間地でのイヨシロオビアブの駆除に利用できることが示唆された。

- 3) Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR (ERIC-PCR); its ability to differentiate *Streptococcus pyogenes* strains and applicability to the study of outbreaks of streptococcal infection.

Matsumoto M*, Suzuki Y*, Miyazaki Y*, Tanaka D, Yasuoka T*, Mashiko K*, Ishikita R*,
Baba J*.

Tohoku J. Exp. Med., 194, 205-212, 2001.

We evaluated the ability of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR (ERIC-PCR) to differentiate 95 *Streptococcus pyogenes* strains with M or T serotypes isolated from sporadic streptococcal infections as compared with M or T serotypings and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Although the ERIC-PCR had less discriminatory power, defined as the ability to divide the strains with the same serotypes into the different sub-types, than PFGE, it consistently classified the strains into 16 patterns with a high correlation with M or T serotyping. The PCR method further discriminated 4 M or T serotypes into sub-types. The application of ERIC-PCR to 5 outbreaks of streptococcal infection produced the results that agreed closely with those of T serotyping and PFGE. ERIC-PCR has sufficient discriminatory power and is a quick and relatively easy technique, making it useful for routine epidemiological investigations.

- 4) Enantiomeric purity determination of malic acid in apple juices by multi-beam circular dichroism detection

Atsushi Yamamoto, Nami Akiba*, Shuji Kodama, Akinobu Matsunaga, Kayoko Kato*,
Hiroyuki Nakazawa*

J. Chromatogr. A, 928, 139-144, 2001.

A multi-beam circular dichroism (CD) detector which is easily constructed by inserting inexpensive optics into a conventional photo-diode array detector has an advantage of simultaneous detection of the absorbance and CD. The enantiomeric purity determination of malic acid in beverages was performed by this detection system. Malic acid when complexed with Cu(II) was found to have an absorbance maximum at around 750 nm. The L-malic acid-Cu(II) complex showed a positive Cotton effect in its absorbance band and its anisotropy factor ($\Delta \epsilon / \epsilon$) was relatively large at about 1/170. This complex was retained on a reversed-phase column with the addition of racemic

平成14年10月1日

2-hydroxy-3-methylbutyric acid to the mobile phase as the ligand. A plot of the relative peak areas between the CD and the absorption ($\Delta \text{abs}/\text{abs}$) versus optical purity showed good linearity with a correlation coefficient of 0.999, and the precision expressed as the relative standard deviation of the errors from the regression line was $\pm 2.7\%$ (2σ). The accuracy of the proposed method was assessed by capillary electrophoresis. Eight commercially available juice products were analyzed using this method. Five of them were thought to adulterated with synthetic malic acid.

5) Direct chiral resolution of malic acid in apple juice by ligand-exchange capillary electrophoresis using copper(II)-L-tartaric acid as a chiral selector

Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Tomoyoshi Soga*,
Kazuichi Hayakawa*

Electrophoresis, 22, 3286-3290, 2001.

Chiral resolution of native DL-malic acid was achieved by ligand-exchange capillary electrophoresis using copper(II)-L-tartrate as a chiral selector. Factors affecting chiral resolution, migration time, and peak area of malic acid were studied. The running conditions for optimum separation of malic acid were found to be 1 mM copper (II)sulfate-1mM L-tartrate (pH 5.1) with an effective voltage of -20kV at 30°C , using direct detection at 280 nm, and resolution (R_s) of racemic malic acid was approximately 4. With this system, D- and L-malic acid in apple juice were analyzed successfully.

6) Direct chiral resolution of tartaric acid in food products by ligand-exchange capillary electrophoresis using copper(II)-D-quinic acid as a chiral selector

Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Kazuichi Hayakawa*

J. Chromatogr. A, 932, 139-143, 2001.

Chiral resolution of native DL-tartaric acid was performed by ligand-exchange capillary electrophoresis using copper(II)-D-quinic acid as a chiral selector. Factors affecting chiral resolution, migration time, and peak area of tartaric acid were studied. The running conditions for optimum separation of tartaric acid were found to be 1 mM copper (II) sulfate-10 mM D-quinic acid (pH 5.0) with an effective voltage of -15kV at 30°C , using direct detection at 250 nm, and resolution of racemic tartaric acid was approximately 1.3. With this system, chiral resolution of DL-tartaric acid in food products was conducted successfully.

7) ホテルで発生した *Salmonella Tennessee* による集団食中毒

小林幹子*, 南部厚子*, 堂高一彦*, 磯部順子

病原微生物検出情報 Vol.22, No.11, 292-293, 2001

2001年5月, 富山県内のホテルの食事を原因とする *Salmonella Tennessee* による集団食中毒が発生した。検査の結果, 患者32人, 従業員6人, 食品14検体から当該菌が検出された。患者発生状況, 患者および従業員の検査, 検食および食材の検査, 疫学調査の概要などについて紹介した。

8) 老人保健施設におけるウェルシュ菌の集団食中毒事例

田中大祐, 磯部順子, 細呂木志保, 清水美和子, 広田昌幸*, 尾崎博子*, 小池美奈子*, 堂高一彦*

病原微生物検出情報 Vol.22, No.11, 294, 2001

2001年5月31日, 富山県内の老人保健施設においてウェルシュ菌による食中毒が発生した。摂食者107名について検便を行ったところ, 90名よりウェルシュ菌が検出された。患者の発生状況, 分離菌のエンテロトキシン産生性, 疫学調査の概要などについて紹介した。

9) 乾燥ろ紙血液中ガラクトースのカラムスイッチングHPLC定量法

米田 豊, 九曜雅子

日本マス・スクリーニング学会誌, 11(3): 53-60, 2001.

新生児のガラクトース血症マススクリーニングのための, 高感度で迅速なガラクトース (Gal) およびガラクトース-1-リン酸 (Gal-1-P) の高速液体クロマトグラフ分析法 (HPLC) の開発を行った。ガラクトースはo-アミノ安息香酸 (ABA) を用いる還元アミノ化法により蛍光標識し, カラムスイッチングHPLCを用いて定量を行った。本法を新生児ろ紙血液に適用したところ, 20分サイクルでガラクトースの定量が可能であり, 検出限界は血中濃度で0.1mg/dlであった。また, 酵素法との良好な相関が認められた。なお, Galの他, Gal-1-P, グルコース (Glc), ラクトース (Lac), グルコサミン (GlcN) 及びガラクトサミン (GalN) の定量も可能であった。

10) 乾燥ろ紙血液中ガラクトースのHPLC定量法 (第2報)

米田 豊, 九曜雅子

平成14年10月1日

日本マス・スクリーニング学会誌, 11(3) : 61-68, 2001.

前報で提案した新生児のガラクトース血症マススクリーニングのためのカラムスイッチング高速液体クロマトグラフ分析法 (HPLC) を一次検査に対応可能な方法に改良した。改良内容は1) HPLCの1分析所要時間を20分間から10分間に短縮, 2) 定量方法を絶対検量線法から内部標準法に変更し, 定量精度を向上, 3) 蛍光ラベル化に用いる還元剤を毒性が高く, また潮解性を有するシアノ水素化ホウ素ナトリウムから, より低毒性のボランジメチルアミン錯体 (BDMA) に変更し, 環境汚染および分析の操作性に配慮, 4) 蛍光ラベル化時の加温方法として80°Cの方法の他, マイクロプレート内で行える緩和な加温条件を設定し, 多検体処理に対応, 5) ガラクトース分析に用いたHPLC装置をアミノ酸分析に用いた場合, ゴーストピークが出現し, 装置の洗浄を要したことから, 移動相中のカウンターイオンを1-ブチルアミンからテトラ-n-ブチルアンモニウムハイドロゲンスルフェート (TBA) に変更し, ゴーストピークの出現を抑制, の5点である。以上により, ガラクトース血症のHPLCによる一次スクリーニング検査が可能となった。

11) Neurovirulence of Type 1 Polioviruses Isolated from Sewage in Japan

Hitoshi Horie*, Hiromu Yoshida*, Kumiko Matsuura, Miwako Miyazaki*, Yoshihiro Ota*, Takashi Nakayama, Yutaka Doi*, and So Hashizume*

Applied and Environmental Microbiology, 68 : 138-142, 2002.

Sixteen type 1 poliovirus strains were isolated from a sewage disposal plant located downstream of the Oyabe River in Japan between October 1993 and September 1995. The isolates were intratypically differentiated as vaccine-derived strains. Neutralizing antigenicity analysis with monoclonal antibodies and estimation of neurovirulence by mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage (MAPREC) were performed for 13 type 1 strains of these isolates. The isolates were classified into three groups. Group I (five strains) had a variant type of antigenicity and neurovirulent phenotype. Group II (four strains) had the vaccine type of antigenicity and neurovirulent phenotype. Group III (four strains) had the vaccine type of antigenicity and an attenuated phenotype. Furthermore, it was demonstrated that the virulent isolates were neutralized by human sera obtained after oral poliomyelitis vaccine (OPV) administration, and the sera of rats immunized with inactivated poliovirus vaccine. Although vaccination was effective against virulent polioviruses, virulent viruses will continue to exist in the environment as long as OPV is in use.

12) 恙虫病の1例報告と北陸3県の発生状況のまとめ

折戸秀光*, 筒井清広*, 川島愛雄*, 村田久仁男*, 高田伸弘*, 石倉康宏

皮膚科の臨床, 44 : 103-106, 2002.

要約 56歳, 男. 石川県能美郡辰口町在住. 5日前より強い前頭部痛と39°C台の発熱を伴い, 全身に痒みのない紅斑が出現. 肝機能障害あり. 第9病日に陰囊部に恙虫病の刺し口を確認し, 塩酸ミノサイクリン200mg/日内服開始. 翌日より解熱し, 症状は速やかに改善. 交差吸収蛍光抗体間接法により病原体はKawasaki型と判明. 北陸3県の最近の発生状況も加えて報告した.

13) Behaviors of D- and L-Lactic acids during the brewing process of sake (Japanese rice wine)

Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Akinobu Matsunaga, Keizou Matsui*,
Kazuya Nakagomi*, Kazuichi Hayakawa*

J. Agric. Food Chem., 50, 767-770, 2002.

The amounts of D- and L-lactic acids during the brewing process of sake were determined by capillary electrophoresis using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a chiral selector. Because L-lactic acid, which prevents the growth of nonuseful microorganisms, is a raw material of sake, the ratio of L-lactic acid to total lactic acid is almost 1.0 at the initial stage of sake brewing. During brewing, the ratio decreased gradually and finally reached 0.39. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for sake brewing produced D- lactic acid, but not L-lactic acid in a culture medium. These results suggest that the decrease in the ratio of L-lactic acid to total lactic acid during sake brewing resulted in D-lactic acid production by yeast. The ratios in 18 brands of sake obtained commercially ranged from 0.23 to 0.78. The levels of D-lactic acid in sake (140-274mg/L) were in a narrower range than those of L-lactic acid (61-461mg/L). Although the D-lactic acid level in sake did not correspond to total lactic acid level, the L-lactic acid level correlated well with total lactic acid level ($R=0.867$). These results suggest that the ratio of L-lactic acid to total lactic acid in sake reflected the amount of L-lactic acid added at the initial stage of sake brewing.

14) Enantioseparation of vinclozolin by γ -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography

Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Yukio Saitoh, Akinobu Matsunaga,
Kazumasa Okamura*, Ryoichi Kizu*, Kazuichi Hayakawa*

J. Agric. Food Chem., 50, 1312-1317, 2002.

Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography was applied to the enantioseparation of vinclozolin, which has been as a fungicide and has an anti-androgenic activity, using γ -cyclodextrin together with sodium dodecyl sulfate. Factors affecting the chiral resolution and migration time of vinclozolin were studied. The optimum running conditions were found to be 20 mM phosphate-5

平成14年10月1日

mM borate buffer (pH8.5) containing 50 mM γ -cyclodextrin and 100 mM sodium dodecyl sulfate with an effective voltage of 20 kV at 20°C using direct detection at 203 nm. Under these conditions, the resolution (R_s) of racemic vinclozolin was approximately 2.1. The sample was concentrated by solid-phase extraction and was fractionated by HPLC. The peak area ratio of (+)- and (-)-vinclozolins in wine was found to be 2:3, namely, not racemic, suggesting that degradation rates were different between (+)- and (-)-vinclozolins. The anti-androgenic activities of (+)- and (-)-vinclozolins on dihydrotestosterone-induced transcription were also investigated. The anti-androgenic activity of (+)-vinclozolin tended to be stronger than that of (-)-vinclozolin, suggesting the possibility that vinclozolin can act as an enantioselective anti-androgen.

15) 海洋深層水温浴効果の心理・生理学的指標による検討

鏡森定信*, 王 紅兵*, アリ ナセルモアデリ*, 張 森*, 関根道和*, 堀井裕子, 新村哲夫,
西野治身, 大村 栄*

日本温泉気候物理医学会雑誌. 65(2) : 73-82. 2002.

In order to investigate effects of deep sea water bathing on psycho-physiological status, body temperature, circulatory and autonomic nervous system functions, and questionnaires on refreshment and sleep were evaluated in comparison with other 3 kinds of bathing including sham (no water), surface sea water and tap water. The skin temperatures of both thighs and lower back were significantly higher for only deep sea water bathing compared with the sham bathing. It was also the case for tympanic temperature. Concerning circularly and autonomic nervous functions there were no significant difference between 4 kinds of bathing. For refreshment and sleep quality both sea water bathing showed higher scores, but not consistently significant differences. However, when taking any kind of bath shorter sleep latency was related to higher cardiac parasympathetic activity during sleep.

16) 閉経後女性のライフスタイル要因からみた骨粗鬆症予防対策に関する研究

梶田悦子*, 伊木雅之*, 西野治身, 三田村純枝*, 日下幸則*

北陸公衆衛生学会誌, 27(2) : 118-123, 2001.

閉経後女性に対する効果的な骨粗鬆症予防対策の立案を目的として, 地域在住の中老年女性99人の腰椎骨密度 (BMD) を4年間追跡した結果, 以下のことが示された. 1. 追跡開始時の BMDは BMD減少群が非減少群に比べて有意に高い傾向を示したが, 4年後の追跡終了時では差はなかった. 2. 一年あたりの変化量 (%BMD) 減少別にみた体力指標に差はなかったが, 農作業時間は BMD減少群では非減少群に比べて有意に少なかった. 3. ライフスタイル別にみた BMD減少率は, 閉経年数5年未満群はそれ以上

の群に比べて有意に低かった。同様に、骨折家族歴を有する群はない群に比べて有意に低かった。4. % BMDを従属変数、独立変数として閉経時年齢、骨折家族歴、握力、体重、ライフスタイル要因の10項目を投入して重回帰分析を行った結果、閉経後年数は長いほど、閉経時年齢は高いほど、牛乳摂取習慣のある者ほどBMDの低下は小さかった。一方、喫煙習慣と骨折家族歴はBMDの低下を大きくする方向で働いていた。以上よりこれらの結果を考慮した保健指導指針を立案する必要性が示された。

[報 告]

1) Q熱病原体 *Coxiella burnetii* の浸淫状況-第2報

平成12年度動物由来感染症情報分析体制整備事業結果報告書, 分担執筆, 富山県厚生部, 2001.

平成11年度に引き続き, Q熱について解析し, 前年度において未解析の範囲について検討した.

2) 吸血昆虫誘引・駆除装置の開発

上野 実*, 谷野克己*, 藤城敏史*, 浅田峯夫*, 牧村めぐみ*, 佐藤一男*, 角崎雅博*,
渡辺 護, 長谷川益夫*, 鈴木 聡*

富山県工業技術センター報告書, 15:IV78-IV79, 2001.

開発したオロロ誘引・駆除装置は, オロロ特有の吸血性質を利用することにより, 他の吸血昆虫を誤捕獲することなくオロロのみを誘引・駆除装置内に誘い込み, 高圧電圧により効率的に電撃駆除することが可能であった.

3) 蚊類の発消長要因の解析

安居院宣昭*, 渡辺 護, 長谷川澄代

厚生科学研究費, 新興・再興感染症研究事業「疾病媒介昆虫の侵入・移動分散の監視・防御に関する研究」平成13年度総括・分担研究報告書, p.102-123, 2002.

富山県において1969年から継続調査が行われている, 日本脳炎媒介蚊コガタアカイエカの発消長調査成績をまとめ, 発生量の年変化の有無を明らかにし, その年変化が生ずる要因の解析を試みた. コガタアカイエカの発生数は明瞭な年変化を示し, 1971年から1978年までの発生数は顕著に少ない状況であったが, 1979年からは増加に転じ, 1981年には急激に増加, それは1983年まで続いた. その後大きな増減, 小さな増減を繰り返して現在に至っている. これらの増減は水田の稲作形態の変遷, 殺虫剤の多量撒布(航空散布)と殺虫剤の変更などと気象要因が様々に関連しあい形成されたと推察された.

4) 分担研究・東海・北陸地方で平成8年から12年に検出された腸管出血性大腸菌O26の解析ソフト「ゲルコンパ II」を用いた分子疫学的解析

主任研究者: 渡辺治雄*, 分担研究者: 田中大祐, 研究協力者: 松本昌門*

平成13年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）「パルスフィールドゲル電気泳動法（Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE）の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究」総括・分担研究報告書，112-122，2001.

東海・北陸地方で平成8年から12年に検出された105株のO26についてそのPFGE画像を解析ソフト「ゲルコンパ II」を用いて解析を行なった。その結果，東海・北陸地方で検出された105株のO26は71の異なったPFGE型に型別分類された。このうちの52の型（73.2%）は1 PFGE型1株であった。少数ではあるが同一のPFGE型を有するO26が同時期に異なった東海・北陸地方の県に存在し，集団事例および散発事例の原因となっていたことを示していた。また，21株の薬剤耐性株のPFGE型を調べたところ，薬剤耐性とPFGE型間に明確な関連は認められなかった。

[著書・総説・解説]

1) 光学純度の測定法

山本 敦，小玉修嗣

食品衛生学雑誌，42，J-152-J-156，2001.

光学活性物質の分離分析法について，カラムによる直接分割法及び光学活性検出器を利用した間接分割法を解説した。

2) アブ科，ハエ目，昆虫綱

渡辺 護

千葉県自然史；本編6 千葉県の動物1，陸と淡水の動物：545-548，2002.

千葉におけるアブ科昆虫の種類とそれらの分布について，主に著者らが1998～99年に調査を行った結果から解説を行った。特記すべき点は北方寒地性のキンイロアブが清澄山周辺で確認されたこと，ヤマトアブが広く優先して分布していることなどである。各地博物館の所蔵標本および文献調査から，千葉県には6属22種のアブ科の生息が確認された。

3) クロマトグラフィーによるイオン性化学種の分離分析

—イオンクロマトグラフィーの基礎理論から実践まで

岡田 哲男，山本 敦，井上 嘉則 編，エヌ・ティー・エス，東京，2002.

平成14年10月1日

(2) 特別講演等

- 1) エイズウイルスと宿主の攻防。感染成立におけるウイルス糖鎖の意義とDNAプライム・センダイベクターブースト法による高度防御免疫の誘導

永井 美之

腫瘍と感染の病態制御国際シンポジウム 特別講演

平13. 10. 19, 名古屋大学医学部鶴友会館 (名古屋市)

- 2) 深層水の成分分析と清浄性

松永 明信

第1回日本海機能水バイオ研究会講演会

平13. 4. 21, 富山県立大学大講義室 (富山県小杉町)

- 3) 富山湾海洋深層水の成分分析

松永 明信

富山県深層水フォーラム

平13. 12. 3, 赤坂プリンスホテル旧館 サファイアホール (東京都)

(3) 学 会 発 表 等

- 1) マレイズトラップの捕獲数からみたイヨシロオビアブの飛来分布
渡辺 護
第53回日本衛生動物学会大会, 平13. 4. 4~6, 山形市
- 2) 海洋深層水温浴による体温と心拍の変化
大村 栄*, 王 紅兵*, アリ ナセルモアデリ*, 関根道和*, 鏡森定信*, 堀井裕子, 新村哲夫,
西野治身
日本温泉気候物理医学会総会, 平13. 5. 24~25, 三重県四日市市
- 3) 海洋深層水のリラックス効果に関する研究
鏡森定信*, 関根道和*, 西野治身, 新村哲夫, 堀井裕子
平成12年度非水産分野深層水利用研究報告会, 平13. 6. 13, 富山市
- 4) ヘクサンボ (カメムシ) の飛来生態
渡辺 護
北陸病害動物研究会第19回研究集会, 平13. 6. 23, 福井県勝山市
- 5) Q熱病原体 (*Coxiella burnetii*) の浸淫調査
安藤秀二, 石倉康宏
第19回北陸病害虫研究会研究集会, 平13. 6. 23, 福井県勝山市
- 6) Positive Correlation between Concentration of Fluoride in Drinking Water and Markers of Bone Resorption
Nishino, H., Zhang, M.*, Shimmura, T., Bi L.*, Liu ZY*, Iki, M.*, Kajita, E.*, and Kagamimori, S.*
The 24th World Conference of the International Society for Fluoride Research, September 4-7, 2001, Ootsu
- 7) 健常日本人女性における骨代謝マーカーによる骨密度変化の予測
伊木雅之*, 秋葉 隆*, 西野治身, 松本俊夫*, 鏡森定信*, 香川芳子*, 松崎俊久*, 米島秀夫*,
丸茂文昭* for JPOS Study Group
第3回日本骨粗鬆症学会, 平13. 9. 13~15, 大阪市
- 8) フタル酸エステルの生体暴露指標としての尿中代謝物の測定
新村哲夫
平成13年度地研東海北陸支部環境保健部会, 平13. 9. 27~28, 富山県大山町

平成14年10月1日

- 9) 骨粗鬆症予防教室における生化学指標を用いた保健指導効果の評価
中崎美峰子
平成13年度地研東海北陸支部環境保健部会, 平13. 9. 27~28, 富山県大山町
- 10) Molecular Cloning of a pathogenic Simian-human Immunodeficiency Virus for HIV/AIDS
Monkey Model.
Koji Sakai*, Katsuaki Shinohara*, Eiji Takahasji*, Yasuyuki Izumi*, Yasushi Ami*,
Yuko Sasaki*, Yuriiko Suzaki*, Shuji Ando, Tadashi Nakasone*, and Mitsuo Honda*.
Sixth International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP), October 5-10, 2001,
Melbourne, Australia
- 11) ファミリーレストランで発生した腸管出血性大腸菌O157:H7による感染症の富山県における発生状況と疫学的検討
磯部順子, 田中大祐, 細呂木志保, 清水美和子, 永井美之, 古城典子, 吉田慶子, 飯田恭子,
堂高一彦
第22回日本食品微生物学会学術総会, 平13. 10. 18~19, 大阪市
- 12) 海洋深層水温浴の生理・心理学的効果
堀井裕子, 新村哲夫, 西野治身, 大村 栄*, 王 紅兵*, アリ ナセルモアデリ*, 張 淼*,
関根道和*, 鏡森定信*
第5回海洋深層水利用研究会全国大会, 平13. 10. 23~24, 神奈川県小田原市
- 13) A群溶血レンサ球菌の発赤毒素遺伝子保有状況
田中大祐, 磯部順子, 細呂木志保, 清水美和子, 永井美之, 中村信一
第38回日本細菌学会中部支部総会, 平13. 10. 25~26, 金沢市
- 14) 漁港におけるTDH産生性腸炎ビブリオの検出状況
細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 清水美和子, 刑部陽宅, 永井美之
第35回腸炎ビブリオシンポジウム, 平13. 10. 25~26, 津市
- 15) 比較的狭い地域におけるクサギカメムシの飛来分布
渡辺 護
第56回日本衛生動物学会西日本支部大会, 平13. 10. 26~27, 岐阜市
- 16) 富山県におけるQ熱病原体 *Coxiella burnetii* の浸淫状況について
安藤秀二, 石倉康宏, 渡辺 護, 永井美之
第56回日本衛生動物学会西日本支部会, 平13. 10. 26~27, 岐阜市
- 17) チオベンカルブスルホキシドの環境動態及び抗エストロゲン作用のキラル選択性
小玉修嗣, 山本 敦, 松永明信, 岡村和政*, 木津良一*, 早川和一*
フォーラム2001 (衛生薬学・環境トキシコロジー); 平13. 10. 30~31, 金沢市

- 18) 飲料水中微量EDTAのイオンクロマトグラフ法による分析
健名智子, 山本 敦, 小玉修嗣, 高柳信孝, 松永明信,
フォーラム2001 (衛生薬学・環境トキシコロジー), 平13. 10. 30~31, 金沢市
- 19) 自然流産胎児の染色体異常についての一考察
本田幸子, 林美貴子
第60回日本公衆衛生学会総会, 平13. 10. 31~11. 2, 高松市
- 20) 不育症夫婦の染色体異常頻度に関する一考察
林美貴子, 本田幸子
第60回日本公衆衛生学会総会, 平13. 10. 31~11. 2, 高松市
- 21) 飲料水中フッ素濃度と骨吸収マーカーとの関連
西野治身, 新村哲夫, 伊木雅之*, 梶田悦子*, 鏡森定信*
第60回日本公衆衛生学会総会, 平13. 10. 31~11. 2, 高松市
- 22) カルシウム入りゼリー摂取の骨代謝への影響
田中朋子, 堀井裕子, 中崎美峰子, 西野治身, 桑守豊美*, 大浦栄次*
第60回日本公衆衛生学会総会, 平13. 10. 31~11. 2, 高松市
- 23) 骨代謝指標を活用した骨粗鬆症予防検診と指導の評価その1 -閉経後の女性を対象として-
中崎美峰子, 堀井裕子, 田中朋子, 西野治身, 稗苗智恵子*, 上野真理子*, 横川博*, 守田万寿夫*,
福島啓子*, 木屋昭*, 松倉知晴*
第60回日本公衆衛生学会総会, 平13. 10. 31~11. 2, 高松市
- 24) 骨代謝指標を活用した骨粗鬆症予防検診と指導の評価その2 -若年女性を対象として-
堀井裕子, 中崎美峰子, 田中朋子, 西野治身, 飯田恭子*, 高井なおみ*, 加藤一之*, 守田万寿夫*,
福島啓子*, 木屋 昭*, 松倉知晴*
第60回日本公衆衛生学会総会, 平13. 10. 31~11. 2, 高松市
- 25) ビタミンD受容体遺伝子多型は体幹筋力とは独立して腰椎骨密度に影響する
伊木雅之*, 土肥祥子*, 斎藤幸江*, 梶田悦子*, 西野治身, 米増國雄*, 日下幸則*
第60回日本公衆衛生学会総会, 平13. 10. 31~11. 2, 高松市
- 26) 骨折患者と非骨折患者の退院後におけるIADLとQOL
梶田悦子*, 吉田久美子*, 広田直美*, 西野治身
第60回日本公衆衛生学会総会, 平13. 10. 31~11. 2, 高松市
- 27) 海洋深層水中の硝酸塩の連続自動分析
松永明信, 黒川弘子, 大浦 徹, 山本 敦, 小善圭一*
第38回全国衛生化学技術協議会年会, 平13. 11. 8~9, 千葉市

平成14年10月1日

- 28) 富山県衛生研究所における流産胎児染色体分析の現状
本田幸子, 林美貴子
北陸先天異常研究会第22回学術集会, 平13. 11. 17, 富山市
- 29) 習慣流産夫婦の染色体異常頻度について—富山県衛生研究所の成績—
林美貴子, 本田幸子
北陸先天異常研究会第22回学術集会, 平13. 11. 17, 富山市
- 30) マルチビームFDCD検出HPLC
山本 敦, 小玉修嗣, 松永明信, 伊藤里恵*, 中澤裕之*, 熊谷浩樹*, 大河原正光*
日本分析化学会第50年会, 平13. 11. 23~25, 熊本市
- 31) 配位子交換キャピラリー電気泳動による酒石酸の光学分割
小玉修嗣, 山本 敦, 松永明信, 早川和一*
日本分析化学会第50年会, 平13. 11. 23~25, 熊本市
- 32) イヨシロオビアブに対する二酸化炭素添加ボックスストラップの誘引効果
渡辺 護
第17回日本ペストロジー学会大会, 平13. 11. 27~28, さいたま市
- 33) ライム病の一例
加治賢三*, 富田郁代*, 東 晃*, 安藤秀二
北陸公衆衛生学会, 平13. 11. 30, 富山市
- 34) 中部保健所における若年期骨粗鬆症予防教室の反省
高井なおみ*, 中島康文*, 得能和美*, 中野信子*, 新畑マサ子*, 加藤一之*, 堀井裕子, 中崎美峰子,
田中朋子, 西野治身
第29回北陸公衆衛生学会, 平13. 11. 30, 富山市
- 35) 中高年に対する骨粗鬆症予防事業の取組み
上野真理子*, 堂田ゆき子*, 渡辺倫子*, 斎藤千代美*, 笠野裕美*, 前田由美子*, 武田幸子*,
横川 博*, 中崎美峰子, 堀井裕子, 西野治身
第29回北陸公衆衛生学会, 平13. 11. 30, 富山市
- 36) 骨代謝マーカー値と骨密度変化, ならびにいわゆるFast bone loserとの関連—JPOS Cohort Study—
伊木雅之*, 秋葉 隆*, 西野治身, 松本俊夫*, 鏡森定信*, 香川芳子*, 松崎俊久*, 米島秀夫*,
丸茂文昭*
第12回日本疫学会学術総会, 平14. 1. 24~26, 東京都

- 37) ファミリーレストランで発生した「ビーフ角切ステーキ」が原因と考えられた腸管出血性大腸菌O157:H7 感染症事例
磯部順子
平成13年度地研東海北陸支部細菌部会, 平14. 2. 14~15, 名古屋市
- 38) 溶血レンサ球菌レファレンス事業報告
田中大祐
平成13年度地研東海北陸支部細菌部会, 平14. 2. 14~15, 名古屋市
- 39) 平成13年度厚生科学研究 [パルスフィールドゲル電気泳動法標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究]
田中大祐
平成13年度地研東海北陸支部細菌部会, 平14. 2. 14~15, 名古屋市
- 40) 富山県における平成13年の腸管系病原細菌検出状況と食中毒発生状況
細呂木志保
平成13年度地研東海北陸支部細菌部会, 平14. 2. 14~15, 名古屋市
- 41) 老人保健施設におけるウェルシュ菌の集団食中毒事例
細呂木志保
平成13年度地研東海北陸支部細菌部会, 平14. 2. 14~15, 名古屋市
- 42) 鉛給水管を使用している水道水の鉛濃度調査
高柳信孝
第28回富山県水道事業研究発表会, 平14. 2. 27, 富山市
- 43) 鉛給水管を使用している水道水の鉛濃度調査
高柳信孝
平成13年度地研東海北陸支部衛生化学部会, 平14. 2. 28~3. 1, 石川県山中町
- 44) キャピラリー電気泳動による乳酸の光学分割—日本酒醸造工程におけるD-及びL-乳酸分析への応用—
小玉修嗣
平成13年度地研東海北陸支部衛生化学部会, 平14. 2. 28~3. 1, 石川県山中町
- 45) 富山県における今冬(2001/2002)のインフルエンザ
中山 喬
平成13年度地研東海北陸支部ウイルス部会, 平14. 3. 7~8, 岐阜県下呂町
- 46) 富山県における *Coxiella burnetii* の浸淫状況(愛玩動物としての犬猫とその飼育者を中心として)
安藤秀二
平成13年度地研東海北陸支部ウイルス部会, 平14. 3. 7~8, 岐阜県下呂町

平成14年10月1日

47) 富山県内のNLVs関連事例における問題点

安藤秀二

平成13年度地研東海北陸支部ウイルス部会, 平14. 3. 7～8, 岐阜県下呂町

48) 濃縮海洋深層水浮遊浴の効果に関する心理・生理学的指標からの調査研究

鏡森定信*, 西野治身

平成13年度新産業創出公募事業成果報告会, 平14. 3. 22, 富山市

49) マルチビームCD検出法における増感効果

山本 敦, 小玉修嗣, 松永明信, 早川和一*, 中澤裕之*, 北岡光夫*

日本薬学会第122年会, 平14. 3. 26～28, 千葉市

50) 日本酒醸造工程におけるD-及びL-乳酸の挙動

小玉修嗣, 山本 敦, 松永明信, 松井圭三*, 中込和哉*, 早川和一*

日本薬学会第122年会, 平14. 3. 26～28, 千葉市

(4) 受賞, 学位授与, 資格取得など

1) 受 章

永井 美之

紫綬褒章

受章日 平成13年11月3日

永井 美之

岐阜県土岐市 土岐市功労章

受章日 平成13年12月19日

2) 受 賞

渡辺 護

日本公衆衛生協会会長表彰

受賞日 平成13年11月15日

編 集 委 員

委 員 長 加 藤 丈 士
委 員 加 納 晴 美
林 美 貴 子
長 谷 川 澄 代
細 呂 木 志 保
高 柳 信 孝
長 瀬 博 文

富 山 県 衛 生 研 究 所 年 報

平成13年度 (2001)

2002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 中央印刷株式会社

富山市下奥井1-4-5

電 話 (076) 432-6572

