

富山県衛生研究所年報
(平成8年度)
第20号

ANNUAL REPORT
OF
TOYAMA INSTITUTE OF HEALTH
(APRIL 1996 ~ MARCH 1997)
NO. 20

1997



富山県衛生研究所

編集委員

委員長 西淵富藏
委員長 谷玲子
米田 豊
石倉 康宏
平田 清久
高柳 信孝
西野 治身

富山県衛生研究所年報

平成8年度(1996)

1997年10月1日 発行

発行 富山県衛生研究所

〒939-03

富山県射水郡小杉町中太閤山17-1

電話 (0766) 56-5506

FAX (0766) 56-7326

印刷 あけぼの企画(株)

富山市住吉町1丁目5-18

電話 (0764) 24-1755(代)

はじめに

平成8年度の年報をお送り致します。人事的には、昨年同様、がん研究部では所長の部長兼任が続いておりますが、本年報でご覧のとおり、各部の職員の努力で、調査・研究業務、検査業務が共に、例年どおり高いレベルで遂行できた事を感謝しております。当県には県直属の試験研究機関10機関の所長懇談会があり、平成8、9年度の2年間、当研究所がその事務局をつとめる事となっております。本年度はその第1年次として、試験研究機関職員が、その成果を国外の国際学会で発表できる、派遣助成費が県の予算として実現し、また、試験研究機関職員交流集会も開催され、試験研究機関共通の問題を話し合う場が作られました。多年ウイルス部長をつとめ、また、3年間次長として、所長と共に研究所の管理・運営に当たって頂きました森田修行博士が、定年の申合せにより退職されました。その功績を讃えると共に、当研究所の発展へのご尽力に感謝致します。

がん発生要因の疫学的研究は、昨年度までの胃がんに加えて、近年本県においても増加傾向が見られる大腸がんについての、発生要因の疫学的調査体制作りに着手致しました。先天性代謝異常等患児の実態及びその検査法の改善に関する研究、環境汚染物質の変異原性に関する研究等が重点的に行われております。衛生動物に関する研究は、幾つかの部で協力で、不快害虫、疾患媒介動物の調査研究が行われ、特に、本県固有の垂直分布を示すダニのQ熱リケッチャ保有と呼吸器疾患との関連が示唆されるに到りました。環境保健の分野では、カドミウムに関する住民の健康調査を引き続き担当すると共に、アルミニウムその他の環境汚染物質の生体影響に関する研究も、成果をあげています。骨代謝指標を用いた骨粗鬆症の実態及び、運動その他の予防的介入の効果の調査研究は順調に進展しております。日本脳炎、ポリオ、インフルエンザを対象とした流行予測事業は、従来通り重要な拠点としての活動成果を報告すると共に、河川水のウイルス汚染調査、C型肝炎ウイルスの母子感染症例の分子疫学的調査等も続けられました。スギ花粉症の免疫学的調査で、特異的IgEの保有が、スギ花粉に止まらず、イネ科花粉、雑草花粉を対象とするものに拡がりつつあり、花粉症全体として範囲が拡大しつつある実態が明らかになりました。細菌疾患としては、腸管出血性大腸菌による感染症が全国的な大問題になりつつある状況下に、当研究所では、サルモネラ、コレラ菌等の研究から、毒素遺伝子の分子疫学的解析の体制を整備して、県下の関係者の研修を行うと共に、O157-H7以外に、O26型菌による集団発生も証明し、全国に警告を発する事ができました。衛生化学関係は、検査対象と検査項目の多数化、複雑化に対応すべく、基礎的な分析技術の研究を行い、多くの成果をあげ、学会でも評価されております。「深層海水の非水産的利用」に関する研究は、当研究所の幾つかの部が担当しておりますが、本年度は第一次として、表層水と比較しての微量成分の特徴、細菌学的特性等の基本的分析が始められました。

次年度より始まる地域保健法の施行に伴う、衛生研究所の新しい役割、保健所のその他の検査機関との役割分担について、調査研究の一層の推進、検査結果と疫学情報の効果的保管と活用等について、衛生研究所全体で討議し、機を逸する事なく、改善と成長を達成すべく努力しておりますので、今後ともご意見と助言をお願い申し上げます。

平成9年6月

富山県衛生研究所長

北村 敬

目 次

1. 運 営

(1) 沿革および組織機構	1
(2) 施設の概要	2
(3) 職員数	2
(4) 職員一覧	3
(5) 予算概要	5
(6) 各部の業務概要	14
(7) 検査状況	25
(8) 講師派遣	29
(9) 研修指導	32
(10) 研修受講	33
(11) 客員研究員等招へい	34
(12) セミナー開催	34

2. 調査研究報告

・先天性代謝異常等マスクリーニングの成果について（平成8年度の検査成績）	35
高橋雅子，米田 豊，北村 敬，井澤朋子	
・オンカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィーによる新生児マスクリーニング血液ろ紙中のアミノ酸の定量	46
米田 豊，高橋雅子	
・アイソクラティック溶出法による新生児マスクリーニング血液濾紙中アミノ酸のAQCプレカラム誘導体化HPLC定量法	53
米田 豊，高橋雅子	
・デジタルカメラによる新生児マスクリーニング検査培地画像の保管とその画像データベース化による管理法	64
米田 豊，高橋雅子	
・ヒト染色体に関する調査研究－血液，骨髓液－	69
林 美貴子，本田幸子，北村 敬	
・ヒト染色体に関する調査研究－羊水・流産胎児－	78
本田幸子，林 美貴子，北村 敬	

・日本脳炎流行予測調査	85
渡辺 譲, 長谷川澄代, 森田修行, 上村 清, 田中桂子, 浦田祐子, 草山真由美, 寺崎さちこ, 藤崎啓子, 広明秀一	
・ポリオ流行予測調査	99
中山 喬, 松浦久美子, 森田修行, 北村 敬, 南部厚子, 田中桂子, 小川寿人, 浦田祐子, 松原勝博, 布野純子, 小池真奈子, 草山真由美, 寺崎さち子	
・インフルエンザ流行予測調査	106
松浦久美子, 中山 喬, 森田修行, 北村 敬, 小川寿人, 寺崎さち子, 小池美奈子, 田中桂子, 布野純子, 松原勝博	
・河川水中のウイルス：富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測（1993年～1995年）	114
松浦久美子, 石倉康宏, 長谷川澄代, 中山 喬, 森田修行, 北村 敬	
・富山県内に流行しているつつが虫病リケッチャの型別	120
石倉康宏, 渡部 譲, 北村 敬	
・富山県における溶血レンサ球菌分離株の菌型と薬剤感受性	128
田中大祐, 細呂木志保, 刑部陽宅, 香取幸治, 赤間美德, 柏木義勝	
・都市河川水のサルモネラ定点観測	133
磯部順子, 田中大祐, 細呂木志保	
・富山県でヒトより分離された大腸菌の血清型, 毒素産生性	141
田中大祐, 平田清久, 磯部順子, 細呂木志保, 刑部陽宅, 赤間美德	
・オンライン固相抽出高速液体クロマトグラフィーによる水道水中のトリクロロ酢酸, ジクロロ酢 酸の分析法	146
松永明信, 山本 敦, 大戸幹也, 小玉修嗣	
・閉経女性の運動習慣と骨代謝マーカーの推移に関する検討	152
西野治身, 田中朋子, 堀井裕子, 熊西忠郎, 伊木雅之, 梶田悦子, 土肥祥子, 日下幸則, 鏡森定信	
・思春期における運動と血清尿酸値との関連－男子高校生について－	159
田中朋子, 堀井裕子, 西野治身, 熊西忠郎, 山上孝司, 鏡森定信	

3. 資 料

- ・マイクロプレートを用いた酵素法によるホモシスチン尿症マススクリーニングの基礎的検討 165
高橋雅子, 米田 豊
- ・入院患者に多発したS R S V感染 171
長谷川澄代, 森田修行, 北村 敬, 江本 誠, 沼田こずえ
- ・小型球形ウイルス (S R S V) による急性胃腸炎の集団発生について 175
長谷川澄代, 森田修行, 北村 敬, 南部厚子, 有沢義夫
- ・富山県における1996年のウイルスおよびリケッチャの検査状況 180
松浦久美子, 長谷川澄代, 中山 喬, 石倉康宏, 森田修行, 北村 敬
- ・富山県におけるヘリコバクター・ピロリ抗体保有率について 182
平田清久, 刑部陽宅
- ・漁港の腸炎ビブリオ実態調査について 184
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
- ・富山県における大腸菌O157感染症の疫学的解析 187
平田清久, 刑部陽宅, 磯部順子, 田中大祐, 細呂木志保
- ・富山県における1996年の病原微生物検出情報 190
田中大祐, 細呂木志保, 刑部陽宅
- ・キャピラリー電気泳動による清涼飲料水中パントテン酸の分析 194
小玉修嗣, 山本 敦, 松永明信
- ・農産物中の残留農薬調査 197
齊藤行雄, 大浦 敏, 大戸幹也, 松永明信
- ・魚介類中のトリプチルスズ化合物の分析 199
大浦 敏, 松永明信
- ・発泡酒中の異物様固体物質苦情事例 201
山本 敦, 小玉修嗣, 松永明信, 岩田栄一, 高田正耕, 今井茂憲
- ・平成8年度水道水質検査の精度管理事業について 203
健名智子, 高柳信孝, 松永明信
- ・富山県内水道水中の有機ハロゲン化合物含有量について 208
健名智子, 大戸幹也, 松永明信
- ・成長期における生化学検査値の変動（その1）—骨代謝指標についての検討— 212
堀井裕子, 田中朋子, 西野治身, 熊西忠郎, 山上孝司, 鏡森定信

・成長期における生化学検査値の変動（その2）	
一血清脂質、酸素、非タンパク窒素化合物についての検討—	217
堀井裕子、田中朋子、西野治身、熊西忠郎、山上孝司、鏡森定信	
・健康成人における尿中アルミニウム濃度について	221
新村哲夫、中崎美峰子、西野治身、熊西忠郎、中川秀昭、成瀬優知、鏡森定信	

4. 業 績

(1) 受 賞	225
(2) 誌上発表	226
(3) 特別講演等	237
(4) 学会発表等	238

T i t l e s

Report

- A Survey Report on Neonatal Mass Screening for Inborn Errors of Metabolism, Congenital Hypothyroidism and Congenital Adrenal Hyperplasia in Toyama Prefecture (April 1996 ~ March 1997) 35
Masako TAKAHASHI, Yutaka YONEDA, Takashi KITAMURA and Tomoko IZAWA
- High-performance liquid chromatography of amino acids with on-column fluorescence derivatization for a neonatal mass-screening test 46
Yutaka YONEDA and Masako TAKAHASHI
- Isocratical High-performance Liquid Chromatography of Amino Acids for a Neonatal Mass-screening Test using AQC Pre-column Method 53
Yutaka YONEDA and Masako TAKAHASHI
- Management System of Agar Medium Picture forNeonatal Screening Test by Digital Camera and Computer System of Picture Database 64
Yutaka YONEDA and Masako TAKAHASHI
- Chromosome Analysis of Human Blood and Bone Marrow Cells 69
Mikiko HAYASHI, Sachiko HONDA and Takashi KITAMURA
- Chromosome Analysis of Antiotic Fluid Cells and Fetal Cells 78
Sachiko HONDA, Mikiko HAYASHI and Takashi KITAMURA
- Epidemiological Surveillance of Japanese Encephalitis in Toyama Prefecture in 1996.... 85
Mamoru WATANABE, Sumiyo HASEGAWA, Osayuki MORITA, Kiyoshi KAMIMURA, Keiko TANAKA, Yuko URATA, Mayumi KUSAYAMA, Sachiko TERASAKI, Keiko FUJISAKI, Shuichi HIROAKI
- Epidemiological Surveillance for Poliovirus in Toyama Prefecture 99
Takashi NAKAYAMA, Kumiko MATSUURA, Osayuki MORITA, Takashi KITAMURA, Atsuko NAMBU, Keiko TANAKA, Hisato OGAWA, Yuuko URATA, Katsuhiro MATSUBARA, Junko NUNO, Minako KOIKE, Mayumi KUSAYAMA and Sachiko TERASAKI
- Epidemiological Surveillance for Influenza Virus Infection in Toyama Prefecture 106
Kumiko MATSUURA, Takashi NAKAYAMA, Osayuki MORITA, Takashi KITAMURA, Hisato OGAWA, Sachiko TERASAKI, Minako KOIKE, Keiko TANAKA, Junko NUMO and Katsuhiro MATSUBARA

• Viruses in River Water: Epidemiological Surveillance for Viral Pollution of Rivers in Toyama Prefecture from 1993 to 1995	114
Kumiko MATSUURA, Mitsuhiro ISHIKURA, Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA, Osayuki MORITA and Takashi KITAMURA	
• Serotype of <i>Orientia tsutsugamushi</i> from Patients with Tsutsugamusi Disease and Small Field Rodents in Toyama Prefecture	120
Mitsuhiro ISHIKURA, Mamoru WATANABE and Takashi KITAMURA	
• Serotype Distribution and Drug Sensitivity among Hemolytic Streptococcus Isolates in Toyama Prefecture	128
Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI, Yotaku GYOBU, Koji KATORI, Yoshinori AKAMA, Yoshikatsu KASHIWAGI	
• Salmonella Surveillance on River Water in an Urban Area	133
Junko ISOBE, Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI	
• Serotype and Toxin Production of Esherichiacoli Isolated from Human in Toyama Prefecture	141
Daisuke TANAKA, Kiyohisa HIRATA, Junko ISOBE, Shiho HOSOROGI, Yotaku GYOBU, Yoshinori AKAMA	
• Determination of Trichloroacetate and Dichloroacetate in Tap Water by High- Performance Liquid Chromatography using On-Line Solid-Phase Extraction System	146
Akinobu MATSUNAGA, Atsushi YAMAMOTO, Mikiya OHTO and Shuji KODAMA	
• Association between Change of Habitual Exercise and that of Bone Biochemical Markers in Healthy Post-menopausal Women	152
Harumi NISHINO, Tomoko TANAKA, Yuko HORII, Tadaro KUMANISHI, Masayuki IKI, Etsuko KAJITA, Yoshiko DOHI, Yukinori KUSAKA, Sadanobu KAGAMIMORI	
• Correlation between Exercise and Serum Uric Acid in Adolescence -in High School Boys-	159
Tomoko TANAKA, Yuko HORII, Harumi NISHINO, Tadaro KUMANISHI, Takashi YAMAGAMI, Sadanobu KAGAMIMORI	

Notes

- Basic Study for Neonatal Mass Screening of Homocystinuria by Microfluorometry using Microplate 165
Masako TAKAHASHI, Yutaka YONEDA
- SRSV Infection Prevailing among Inpatients of A Hospital 171
Sumiyo HASEGAWA, Osayuki MORITA, Takashi KITAMURA, Makoto EMOTO and Kozue NUMATA
- An Outbreak of Acute Gastroenteritis with Small Round Structured Virus in A Factory 175
Sumiyo HASEGAWA, Osayuki MORITA, Takashi KITAMURA, Atsuko NAMBU and Yoshio ARISAWA
- Virological and Rickettsiological Examinations of Infectious Diseases in Toyama Prefecture, January to December 1996 180
Kumiko MATSUURA, Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA, Mitsuhiro ISHIKURA, Osayuki MORITA and Takashi KITAMURA
- Seroprevalence of Helicobacter pylori Infections in Toyama Prefecture 182
Kiyohisa HIRATA, Yotaku GYOBU
- Vibrio parahaemolyticus Surveillance at Fishing Ports in Toyama Prefecture 184
Shiho HOSOROGI, Daisuke TANAKA, Kiyohisa HIRATA, Junko ISOBE, Yotaku GYOBU, Masayuki SHIROISHI, Noritsugu NAGASAWA
- An Epidemiological Analysis of Escherichia coli O157 Infection in Toyama Prefecture 187
Kiyohisa HIRATA, Yotaku GYOBU, Junko ISOBE, Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI
- Isolation of Pathogenic Bacteria in Toyama Prefecture in 1996 190
Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI, Yotaku GYOUBU
- Analysis of Pantothenic Acid in Soft Drinks by Capillary Electrophoresis 194
Shuji KODAMA, Atsushi YAMAMOTO and Akinobu MATSUNAGA
- Pesticide Residues in Agricultural Commodities 197
Yukio SAITO, Takashi OHURA, Mikiya OHTO and Akinobu MATSUNAGA
- Determination of Tributyltin Compounds in Fish 199
Takashi OHURA and Akinobu MATSUNAGA

· On the handling for the grievance about lees in sparkling alcoholic beverage	201
Atsushi YAMAMOTO, Shuji KODAMA, Akinobu MATSUNAGA, Eiichi IWATA, Shoukou TANAKA and Shigenori IMAI	
· The Results of External Anality Control on Iron and Zinc in Water	203
Tomoko KEMMEI, Nobutaka TAKAYANAGI and Akinobu MATSUNAGA	
· Contents of Organohalogenated Compunds in Tap Water in Toyama Prefecture	208
Tomoko KEMMEI, Mikiya OHTO and Akinobu MATSUNAGA	
· Changes in Biochemical Indices during the Growth Period (I)	
—Analysis on Biochemical Makers of Bone Metabolism—	212
Yuko HORII, Tomoko TANAKA, Harumi NISHINO, Tadaro KUMANISHI, Takashi YAMAGAMI, Sadanobu KAGAMIMORI	
· Changes in Biochemical Indices during the Growth Period (II)	
—Analysis on Serum Lipids, Enzymes and Non-protein Nitrogen—	217
Yuko HORII, Tomoko TNAKA, Harumi NISHINO, Tadaro KUMANISHI, Takashi YAMAGAMI, Sadanobu KAGAMIMORI	
· Urinary Alminum Concentrations in Healthy Adults	221
Tetsuo SHINMURA, Mineko NAKAZAKI, Harumi NISHINO, Tadaro KUMANISHI, Hideaki NAKAGAWA, Yuchi NARUSE, Sadanobu KAGAMIMORI	

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8年度の検査成績)

高橋雅子 米田 豊 北村 敬 井澤朋子¹

A Survey Report on Neonatal Mass Screening
for Inborn Errors of Metabolism,
Congenital Hypothyroidism and
Congenital Adrenal Hyperplasia
in Toyama Prefecture
(April 1996 ~ March 1997)

Masako TAKAHASHI, Yutaka YONEDA,
Takashi KITAMURA and Tomoko IZAWA¹

要旨 平成8年度の検体総数は11,857件で、スクリーニングの結果、クレチニン症3名、先天性副腎過形成症1名の患者が発見された。また、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20年間で44名、クレチニン症が17年間で55名、副腎過形成症が8年間で8名となり、クレチニン症は全国に比べその発生率が高い。

先天性代謝異常マススクリーニングは代謝異常症を早期に発見し、早期に治療することにより、心身の障害を未然に防止するという目的で全国的に実施されている。富山県においては、昭和52年10月より富山県先天性代謝異常等検査事業実施要綱に基づき、フェニルケトン尿症等の5疾病についてマススクリーニングを開始した。昭和55年4月には先天性甲状腺機能低下症（クレチニン症）、平成元年4月には先天性副腎過形成症の検査が追加された。ヒスチジン血症については、厚生省の通達〔1〕を受けて、平成6年度からスクリーニングを取り止めており、現在は6疾病についてマススクリーニングを実施している。

実施方法

1. 対象疾病

フェニルケトン尿症、ホモシスチン尿症、メイプルシロップ尿症、ガラクトース血症、先天性甲状腺機能低下症（クレチニン症）、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8年4月より、平成9年3月ま

1. 富山県健康課

での検査実施状況をまとめた。

4. スクリーニング方法

(1) 検査検体

県内の各医療機関において採血されたろ紙血液を用いた。

(2) 検査方法

① アミノ酸代謝異常症

フェニルケトン尿症等の3疾病については、枯草菌を用いるGuthrie法(Bacterial inhibition assay-BIA法)で行った[2, 3]。検査条件を表1に示す。

② ガラクトース血症

Beutler法とPaigen・Phage(吉田)法を併用した[4, 5]。

なお、Paigen・Phage(吉田)法については、アルカリリフォスファターゼを添加し、ガラクトース-1-リン酸を含めたガラクトース量を測定した[3, 6]。

③ 先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)

委託機関(財石川県予防医学協会)において、ELISA法(富士レビオ社製キット)によりTSH(Thyroid-stimulating hormone)値の

測定を行った。なお、一部の検体については、FT₄(遊離Thyroxine)の測定を(財)神奈川県予防医学協会に依頼した。

④ 先天性副腎過形成症

委託機関(財)石川県予防医学協会において、ELISA法(カイロン社製3位抗体キット)により17- α -OHP(17- α -hydroxy progesterone)値の測定を行った。

⑤ ヌケ検体の処理

抗生物質の使用等で細菌の発育が阻害されるヌケ現象を示し、判定が不能となつたいわゆるヌケ検体については、ペニシリナーゼ処理後確認検査を行った[3]。

(3) 判定基準

カットオフ値を表2に示した。疑陽性と判定した検体は再採血を依頼し、再検査を行った。再検査でも疑陽性となった場合は、直ちに精密検査機関を受診するよう主治医に報告した。

(4) 集計処理

検査検体の受付事務処理、検査結果の集計およびデータ管理は、当所で開発した先天性代謝異常等検査のデータ管理システム[7]を用いた。

表1. 検査条件

対象疾患	寒天	培地	芽胞懸濁液 ¹⁾	阻害剤 ²⁾
フェニルケトン尿症	伊那食品工業(株) 代謝異常スクリーニングアガーライプ 1.5g	栄研化学(株) ディメイン修正培地 15ml	1.7ml	シグマ社 5mM β -2-TA 0.14ml
ホモシスチン尿症	清水食品(株) Taiyo-Agar 1.4g		1.6ml	シグマ社 1/3mM MSO 0.11ml
メイブルシロップ尿症	伊那食品工業(株) 代謝異常スクリーニングアガーライプ 2.0g		0.3ml	ナカライトスク社 10mM 4-AL 0.45ml

1) 使用量は試薬ロット、温度、湿度等により変動する。

2) 使用量は試薬ロット、温度、湿度等により変動する。

β -2-TA : β -2-Thienyl-DL-alanine, MSO : L-Methionine-DL-Sulfoxime, 4-AL : 4-Aza-DL-leucine

表2. 判定基準

対象疾患	測定物質	疑陽性	緊急に精密検査を要する
フェニルケトン尿症	Phenylalanine	2mg/dl以上	
ホモシスチン尿症	Methionine	1mg/dl以上	
メイプルシロップ尿症	Leucine	2mg/dl以上	4mg/dl以上
ガラクトース血症I型 II型 III型	Galactose (Gal) Galactose-1-Phosphate (Gal-1-P) Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase Galactose	Gal+Gal-1-P 6mg/dl以上 ポイトラー法で 蛍光のない場合 Gal+Gal-1-P 6mg/dl以上 Gal+Gal-1-P 6mg/dl以上	Gal+Gal-1-P 6mg/dl 以上で ポイトラー法で 蛍光のない場合
	Galactose-1-Phosphate		
先天性甲状腺機能低下症 (クレチニン症)	Thyroid-Stimulating Hormone (TSH)	8μU/ml以上	30μU/ml以上
先天性副腎過形成症	17- α -hydroxyprogesterone (17- α -OHP)	直接法 30ng/ml以上 抽出法 7ng/ml以上	直接法 30ng/ml以上で何らかの症状がある場合 抽出法 10ng/ml以上

結果及び考察

1. 検査実施状況

今年度の受付総数は、11,857件で、県内67か所の医療機関（おもに産婦人科医院）より送付されてきたものである。

表3および表4に年度別、月別検査実施状況を示した。

今年度の出生数は10,270人であり、受検率は107.1%となった。100%を越えているのは、里帰り分娩が増加したためで、県内の新生児のほとんどが、この検査を受けているものと思われる。

また、再採血検体数は856件で、受付検査総数の7.2%にあたり、そのうち521件（60.9%）が疑陽性になったための再採血検体であった。

一方、再採血を依頼したのは735件で、そのうち、疑陽性の理由は522件（71.0%）であった。これらのうち、回収できなかったのは、16件（うち死亡3件、病院で再検・追跡4件）で、回収率は96.9%であった。疑陽性の理由以外で再採血を依頼した212件のうち、検体不良のためが54件（7.3%）であった。54件の内訳は、採血後日数が経ちすぎているものが31件、採血が4日以内が14

件、血液が十分しみ込んでいないものが7件、汚染が2件であった。これらは、直ちに再採血を依頼した。また哺乳状態が不良の53件（7.2%）については哺乳状態が良くなつてから再採血を依頼した。

低出生体重児（2,000g以下）の場合には、哺乳が不十分であつたり機能が未熟であつたりするので、2500gに達した時か1か月時のうち、いずれか早い時期に再採血を依頼し、2度検査を行つてゐる。今年度は167人（1.5%）に再採血を依頼したが、そのうち40人は哺乳不良であった。

以上の理由で再採血を依頼した検体のうち、回収できなかつたのは15件（うち死亡2件）で、92.9%の回収率となつた。

再採血を依頼しても1か月以上検体が送られてこない場合は再依頼しているが、疑陽性で再採血を依頼した場合に比べ、回収率は悪かつた。

採血は、生後5～7日目に行うことになつてゐるが、4日以内に行われたものが15件（0.1%）あり、これらのほとんどが生後4日目の採血であった。

採血日から受付までの日数は、ほとんどが7日以内であるが、10件（0.08%）が8日以上かかっ

表3. 先天性代謝異常等検査実施状況

区分 期間	受付総数 (件)	検査実員数 (人)	対象者 (出生数)	受検率 (%)	疑陽性数 (人)			要精検数 (人)		
					代謝 異常症	クレイン 症	副過形成症	代謝 異常症	クレイン 症	副過形成症
52年10月 ～55年 3月	29,229	28,450	39,688	71.7	262	—	—	6(4)	—	—
55年 4月 ～ 1年 3月	122,841	115,435	116,956	98.7	1,811	841	—	75(32)	130(25)	—
1年 4月 ～ 2年 3月	11,633	10,859	10,802	100.5	228	129	84	12(4)	29(2)	14(1)
2年 4月 ～ 3年 3月	11,356	10,594	10,122	104.7	187	190	71	5(1)	35(4)	16(1)
3年 4月 ～ 4年 3月	11,546	10,780	10,613	101.6	172	219	58	14(3)	26(4)	20(3)
4年 4月 ～ 5年 3月	11,311	10,577	9,840	107.5	183	141	80	7(0)	26(6)	22(1)
5年 4月 ～ 6年 3月	11,194	10,485	9,723	107.8	142	124	68	6(0)	28(6)	14(0)
6年 4月 ～ 7年 3月	11,916	11,103	10,373	107.0	218	155	79	9(0)	30(2)	21(1)
7年 4月 ～ 8年 3月	11,502	10,718	9,945	107.8	171	218	95	3(0)	37(3)	20(0)
8年 4月 ～ 9年 3月	11,857	11,001	10,270	107.1	262	145	100	4(0)	28(3)	18(1)
計	244,385	230,002	238,332	—	3,636	2,162	635	141(44)	369(55)	145(8)

() は 患者数

表4. 月別検査実施状況

年 月	平成8年										平成9年			計
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
受付検体総数 (件)	916	1,153	947	1,121	1,059	927	1,045	870	863	1,125	897	934	11,857	
内 初回検査数 (件)	859	1,073	884	1,042	982	863	974	809	792	1,039	827	857	11,001	
再採血総数 (件)	57	80	63	79	77	64	71	61	71	86	70	77	856	
内 再採 血 内 訳	2回目	51	72	57	73	75	62	63	58	67	80	63	75	796
3回目	6	7	4	6	2	1	8	2	4	6	7	2	55	
4回以上	0	1	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	5	
出生数 (人)	834	982	855	949	907	811	860	805	859	862	751	794	10,270	

ていた。特に2週間以上かかったものが8件（最長23日）あり、病院側の出し忘れか、郵便事情によるものか原因不明であった。病院によってはこれを機に、書留郵便で検体を送付してくるようになった。富山県では検査結果が異常検体のみ結果報告することになっており、採血後2週間結果報

告の無い検体は正常と判断されている。そのため、採血された検体が、受付まで日数がかかったり、万が一届かなかった場合は誤って正常と判断される可能性がある。採血された検体が、確実に当所に送付され、確実に検査されているか否かを確認するため、検査結果報告については受付したすべ

ての検体について行うことを検討している。

2. 検査結果

検査成績について、表3には年度別、表5には月別の疑陽性および要精密検査数を示した。本年度の疑陽性人数は、代謝異常症が262人（2.4%）、クレチニン症が145人（1.3%）、先天性副腎過形成症が100人（0.9%）であり、そのうち、それぞれ4人、28人、18人に精密検査の必要が認められた。

表6には、要精密検査者の検査状況と結果をまとめて示した。

症例4は、ガラクトース高値で要精密検査となつた例で、里帰り出産のため千葉県に戻ったが、受診医療機関は不明であった。

症例5～32は、いずれもクレチニン症の検査でTSH高値のため、要精密検査となつたものである。クレチニン症と診断されたのは、症例5、15、27の3人であった。症例5は、生後5日日の初回採血時に哺乳不良であったために、検査結果は正常であったが要再検査となり、生後1か月半の再検査でTSH高値が判明したものである。その後の病院での検査結果は、生後3か月でTSH 20.9 μU/ml、FT₄ 1.1ng/dlで、クレチニン症として治療が開始された。また、この症例はダウン症の診断も受けている。症例15は、生後12日目の検査でTSHが異常高値で即精検となった。生後20日目の病院での検査結果は、TSH 429 μU/ml（血清値）、T₄ 1.2 μg/dl（血清値）、甲状腺スキャ

ンでは正常位置に確認できなかったことから、クレチニン症と診断された。症例27は、生後1か月の病院での検査結果がTSH 62.01 μU/ml、FT₄ 0.9ng/dlで、クレチニン症と診断され、治療が開始された。一過性高TSH血症の疑いで経過観察中の3例のうち、症例25は、生後1か月の病院での検査の結果がTSH 46.5 μU/ml、FT₄ 0.7ng/dlで、甲状腺機能低下の状態であったが、甲状腺シンチグラムでは、甲状腺は正常位置に認められ、大きさ、up takeとも正常であった。一過性高TSH血症と診断された13例のうち、症例16は、姉2人がいるが、次姉はマスククリーニングによりTSHが比較的低値で発見されたクレチニン症であった。また長姉はTSH高値が認められたがクレチニン症ではなかった。家族性と思われたが詳細な検索はできなかった。症例18は、ガラクトース血症疑いの症例4と同様に、里帰り出産で千葉県に戻ったが、受診医療機関は不明であった。

症例33～50は、副腎過形成症の疑いで精密検査を要した例である。患者と診断されたのは、症例47で、単純男性型であった。マスククリーニング結果は、直接法では高値であったが、抽出法の結果はカットオフに近い値であり、見逃す危険性もある非典型的な例と思われた。要精検となった18人のうち、2,000g以下の低出生体重児は7人（38.9%）であった。

全国および富山県の患者発見状況は表7に示し

表5. 月別疑陽性件数および要精密検査数

対象疾患	年 月	平成8年									平成9年			計
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
フェニルケトン尿症		2	0	2	1	1	2	1	1	0	1	4	3(1)	18(1)
ホモシスチン尿症		0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
メイブルシロップ尿症		1	4	3	3	15(1)	18	15	9	24	29	9	7	137(1)
ガラクトース血症		16	11(1)	12	10(1)	7	7	12	10	14	11	7	11	128(2)
クレチニン症		17(8)	12(3)	13(2)	10(3)	12	8	15(3)	10(2)	8	14(2)	14(2)	12(3)	145(28)
副腎過形成症		8(3)	17(2)	2	6(2)	11(2)	8	6(2)	3(1)	4(2)	12(4)	11	12	100(18)
計		44(11)	45(6)	33(2)	30(6)	46(3)	43	49(5)	33(3)	50(2)	67(6)	45(2)	45(4)	530(50)

() は 要精密検査数

表6. 要精密検査者の検査状況と結果

* ; 患者

対象疾患	症例	性別	生年月日	採血月日	日令	検査成績	精検結果
フェニルケトン尿症	1	女	9. 2.18	9. 2.23 2.27 3.10	5 9 20	Phe 4 mg/dl Phe 2 mg/dl Phe 2~4 mg/dl	正常
メイブルシロップ尿症	2	男	8. 7.26	8. 7.31 8. 9	5 14	Leu 2 mg/dl Leu 2 mg/dl 強	正常
ガラクトース血症	3	女	8. 4.15	8. 4.22 4.30 5. 7	7 15 22	Gal+Gal-1-P 16~20 mg/dl ボイトラー 正常 Gal+Gal-1-P 10 mg/dl ボイトラー 正常 Gal+Gal-1-P 10 mg/dl 強 ボイトラー 正常	一過性 高ガラクトース血症
	4	男	8. 6.23	8. 6.29 7. 8 7. 16	6 15 23	Gal+Gal-1-P 8 mg/dl ボイトラー 正常 Gal+Gal-1-P 6 mg/dl ボイトラー 正常 Gal+Gal-1-P 6 mg/dl 強 ボイトラー 正常	不明 (千葉県へ)
クレチニ症	5*	男	8. 2. 7	8. 2.12 3.27 4. 8	5 48 60	TSH 0.6 μU/ml TSH 11.7 μU/ml TSH 12.2 μU/ml TSH 9.1 μU/ml FT ₄ 2.2 ng/dl	クレチニ症
	6	男	8. 4. 2	8. 4. 8	6	TSH 47.0 μU/ml 50.4 μU/ml FT ₄ 1.4 ng/dl	一過性 高TSH血症
	7	女	8. 3.31	8. 4. 6 4.13	6 13	TSH 18.1 μU/ml 15.8 μU/ml TSH 19.9 μU/ml FT ₄ 1.3 ng/dl	一過性 高TSH血症
	8	女	8. 3.13	8. 3.18 3.26 4.16	5 13 34	TSH 12.8 μU/ml 12.5 μU/ml TSH 8.1 μU/ml FT ₄ 2.2 ng/dl TSH 8.4 μU/ml FT ₄ 1.4 ng/dl	一過性 高TSH血症
	9	男	8. 4.11	8. 4.16 4.22	5 11	TSH 17.2 μU/ml 13.9 μU/ml TSH 12.6 μU/ml FT ₄ 2.0 ng/dl	一過性 高TSH血症
	10	女	8. 4.12	8. 4.18 4.24	6 12	TSH 24.6 μU/ml 21.5 μU/ml TSH 20.7 μU/ml FT ₄ 1.5 ng/dl	一過性 高TSH血症
	11	女	8. 4. 9	8. 4.15 4.25	6 23	TSH 8.8 μU/ml 9.3 μU/ml TSH 11.2 μU/ml FT ₄ 2.4 ng/dl	正常
	12	男	8. 4.18	8. 4.23 4.26	5 8	TSH 18.9 μU/ml 19.4 μU/ml TSH 37.8 μU/ml FT ₄ 1.5 ng/dl	一過性 高TSH血症
	13	女	8. 4.28	8. 5. 7 5.13	9 15	TSH 8.8 μU/ml 8.3 μU/ml TSH 12.1 μU/ml FT ₄ 1.7 ng/dl	経過観察中

表6. つづき

対象疾患	症例	性別	生年月日	採血月日	日令	検査成績	精検結果
	14	女	8. 5.13	8. 5.20 5.24	7 11	TSH 8.9 μU/ml 10.5 μU/ml TSH 10.1 μU/ml FT ₄ 1.7 ng/dl	高TSH血症の疑い
	15*	女	8. 5.17	8. 5.29	12	TSH 62.3 μU/ml FT ₄ 0.8 ng/dl	クレチニン症
	16	女	8. 6. 4	8. 6. 9 6.13	5 9	TSH 10.9 μU/ml 13.4 μU/ml TSH 9.7 μU/ml FT ₄ 2.5 ng/dl	一過性 高TSH血症
	17	男	8. 6. 4	8. 6.10 6.19	6 15	TSH 8.4 μU/ml 8.0 μU/ml TSH 9.3 μU/ml FT ₄ 1.5 ng/dl	一過性 高TSH血症
	18	男	8. 6.14	8. 6.20 6.27	6 13	TSH 15.8 μU/ml 17.5 μU/ml TSH 24.4 μU/ml FT ₄ 1.2 ng/dl	不明 (千葉県へ)
	19	女	8. 6.22	8. 6.27 7. 9	5 17	TSH 10.3 μU/ml 9.8 μU/ml TSH 9.5 μU/ml FT ₄ 1.5 ng/dl	経過観察中
	20	男	8. 7. 9	8. 7.15 7.19	6 10	TSH 22.9 μU/ml 18.8 μU/ml TSH 8.9 μU/ml FT ₄ 2.0 ng/dl	正常
	21	男	8. 9.19	8. 9.24 9.30	5 11	TSH 18.5 μU/ml 21.4 μU/ml TSH 25.4 μU/ml FT ₄ 1.5 ng/dl	高TSH血症の疑い
	22	男	8. 9.25	8. 9.30 10. 4	5 9	TSH 11.4 μU/ml 12.8 μU/ml TSH 22.1 μU/ml FT ₄ 2.4 ng/dl	一過性 高TSH血症
	23	男	8.10. 3	8.10. 9 10.17	6 14	TSH 31.0 μU/ml 24.3 μU/ml TSH 17.5 μU/ml FT ₄ 2.1 ng/dl	一過性 高TSH血症
	24	男	8.11. 6	8.11.11 11.16	5 10	TSH 9.1 μU/ml 12.8 μU/ml TSH 10.5 μU/ml FT ₄ 1.9 ng/dl	経過観察中
	25	女	8.11. 2	8.11. 8 11.15	6 13	TSH 10.2 μU/ml 10.3 μU/ml TSH 13.8 μU/ml FT ₄ 1.6 ng/dl	一過性 高TSH血症の疑い
	26	女	8.12.29	9. 1. 4 1.13	6 15	TSH 8.9 μU/ml 9.7 μU/ml TSH 10.0 μU/ml FT ₄ 2.0 ng/dl	一過性 高TSH血症
	27*	男	9. 1. 7	9. 1.12 1.20	5 13	TSH 15.8 μU/ml 22.1 μU/ml TSH 40.9 μU/ml FT ₄ 1.9 ng/dl	クレチニン症

表6. つづき

対象疾患	症例	性別	生年月日	採血月日	日令	検査成績	精検結果
	28	男	8.12.3	8.12.8 9.1.13 2.5	5 41 64	TSH 9.1 μU/ml 12.1 μU/ml TSH 8.3 μU/ml FT ₄ 2.2 ng/dl TSH 11.8 μU/ml FT ₄ 2.6 ng/dl	一過性 高TSH血症の疑い
	29	男	9.1.22	9.1.27 2.12	5 21	TSH 8.2 μU/ml 9.2 μU/ml TSH 8.7 μU/ml FT ₄ 1.2 ng/dl	一過性 高TSH血症の疑い
	30	男	9.2.16	9.2.23 2.27	7 11	TSH 9.3 μU/ml 9.3 μU/ml TSH 9.4 μU/ml FT ₄ 1.5 ng/dl	一過性 高TSH血症
	31	男	9.2.16	9.2.21 3.4	5 16	TSH 12.3 μU/ml 11.4 μU/ml TSH 8.5 μU/ml FT ₄ 2.4 ng/dl	経過観察中
	32	男	9.3.11	9.3.16 3.26	5 15	TSH 13.7 μU/ml 18.4 μU/ml TSH 9.8 μU/ml FT ₄ 2.3 ng/dl	一過性 高TSH血症
副腎過形成症	33	男	8.3.20	8.3.25 4.3	5 14	17-OHP (直接法) 28.7 ng/ml 28.7 ng/ml (抽出法) 7.7 ng/ml 17-OHP (直接法) 35.9 ng/ml 35.9 ng/ml (抽出法) 7.5 ng/ml	正常 在胎週数 36週 生下時体重 2208g
	34	男	8.3.29	8.4.4 4.11	6 13	17-OHP (直接法) 15.8 ng/ml 17-OHP (直接法) 22.1 ng/ml 23.0 ng/ml (抽出法) 11.3 ng/ml	正常 在胎週数 39週 生下時体重 3276g
	35	男	8.4.19	8.4.24	5	17-OHP (直接法) 48.4 ng/ml 46.9 ng/ml (抽出法) 12.5 ng/ml	正常 在胎週数 32週 生下時体重 1868g
	36	男	8.4.27	8.5.2	5	17-OHP (直接法) 42.6 ng/ml 39.4 ng/ml (抽出法) 12.8 ng/ml	正常 在胎週数 35週 生下時体重 2582g
	37	女	8.4.5	8.5.7	32	17-OHP (直接法) 62.5 ng/ml (抽出法) 23.6 ng/ml	正常 在胎週数 26週 生下時体重 846g
	38	男	8.4.13	8.5.1 8.7.8	18 86	17-OHP (直接法) 35.2 ng/ml 39.0 ng/ml (抽出法) 4.4 ng/ml 17-OHP (直接法) 19.9 ng/ml 18.4 ng/ml (抽出法) 8.1 ng/ml	正常 在胎週数 27週 生下時体重 1066g

表6. つづき

対象疾患	症例	性別	生年月日	採血月日	日令	検査成績	精検結果
	39	男	8. 7. 9	8. 7. 15	6	17-OHP (直接法) 44.8 ng/ml 39.4 ng/ml (抽出法) 14.1 ng/ml	正常 在胎週数 34週 生下時体重 2247g
	40	男	8. 6. 21	8. 6. 26 7. 21 8. 7	5 30 47	17-OHP (直接法) 8.9 ng/ml 17-OHP (直接法) 39.2 ng/ml 32.3 ng/ml (抽出法) 4.1 ng/ml 17-OHP (直接法) 38.8 ng/ml 37.3 ng/ml (抽出法) 8.5 ng/ml	正常 在胎週数 29週 生下時体重 1488g
	41	男	8. 8. 8	8. 8. 14	6	17-OHP (直接法) 87.7 ng/ml以上 (抽出法) 17.5 ng/ml	正常 在胎週数 32週 生下時体重 2062g
	42	男	8. 9. 24	8. 9. 29	5	17-OHP (直接法) 45.8 ng/ml (抽出法) 16.3 ng/ml	正常 在胎週数 28週 生下時体重 1404g
	43	女	8. 9. 27	8. 10. 2	5	17-OHP (直接法) 87.7 ng/ml以上 (抽出法) 21.1 ng/ml	正常 在胎週数 28週 生下時体重 1092g
	44	女	8. 11. 8	8. 11. 13	5	17-OHP (直接法) 39.4 ng/ml 39.7 ng/ml (抽出法) 10.9 ng/ml	正常 在胎週数 32週 生下時体重 1956g
	45	男	8. 11. 18	8. 11. 25 11. 29	7 11	17-OHP (直接法) 45.8 ng/ml 50.2 ng/ml (抽出法) 5.5 ng/ml 17-OHP (直接法) 41.5 ng/ml以上 (抽出法) 8.1 ng/ml	経過観察中 在胎週数 38週 生下時体重 2852g
	46	女	8. 11. 27	8. 12. 2	5	17-OHP (直接法) 81.6 ng/ml以上 (抽出法) 17.7 ng/ml	正常 在胎週数 32週 生下時体重 3716g
	47*	男	8. 12. 16	8. 12. 23 9. 1. 6	7 21	17-OHP (直接法) 32.3 ng/ml 33.1 ng/ml (抽出法) 7.5 ng/ml 17-OHP (直接法) 26.2 ng/ml 25.1 ng/ml (抽出法) 8.6 ng/ml	先天性副腎過形成症 (単純男性型) 在胎週数 38週 生下時体重 3302g
	48	女	8. 12. 18	9. 1. 5 1. 14	18 27	17-OHP (直接法) 35.1 ng/ml 34.3 ng/ml (抽出法) 8.4 ng/ml 17-OHP (直接法) 41.5 ng/ml以上 (抽出法) 9.1 ng/ml	経過観察中 在胎週数 34週 生下時体重 2102g

表6. つづき

対象疾患	症例	性別	生年月日	採血月日	日令	検査成績	精検結果
	49	男	9. 1. 5	9. 1. 16 1. 19	11 14	17-OHP (直接法) 40.7 ng/ml (抽出法) 10.2 ng/ml 17-OHP (直接法) 31.3 ng/ml (抽出法) 30.8 ng/ml (直接法) 8.1 ng/ml	正常 在胎週数 35週 生下時体重 2246g
	50	女	9. 1. 12	9. 1. 18	6	17-OHP (直接法) 24.7 ng/ml (抽出法) 28.8 ng/ml (直接法) 10.3 ng/ml	経過観察中 在胎週数 39週 生下時体重 2478g

表7. マススクリーニングによる全国および富山県の患者発見状況

区分		全 国		富 山 県			
実施人間数	(期間)	24,775,377人	(S52. 4～H8. 3)	219,001人	(S52. 10～H8. 3)	11,001人	(H8. 4～H9. 3)
患者数、発見率	疾病名	患者(人)	発見率	患者(人)	発見率	患者(人)	発見率
フェニルケトン尿症	316	1 / 78,400	4	1 / 54,800	0		4 / 57,500
ホモシスチン尿症	147	1 / 168,500	0		0		0
ヒスチジン血症	2,200*	1 / 11,300	33*	1 / 6,600	0		33* / 7,000
メイブルシロップ尿症	56	1 / 442,400	1	1 / 219,000	0		1 / 230,000
ガラクトース血症	647	1 / 38,300	0		0		0
その他の	315	1 / 78,700	6	1 / 36,500	0		6 / 38,300
計		3,681	1 / 6,700	44	1 / 5,000	0	44 / 5,200
実施人間数	(期間)	21,444,421人	(S54. 4～H8. 3)	190,551人	(S55. 4～H8. 3)	11,001人	(H8. 4～H9. 3)
クレチニ症	4,214	1 / 5,100	52	1 / 3,700	3	1 / 3,700	55 / 3,700
実施人間数	(期間)	9,894,615人	(S63. 4～H8. 3)	75,116人	(H1. 4～H8. 3)	11,001人	(H8. 4～H9. 3)
先天性副腎過形成症	592	1 / 16,700	7	1 / 10,700	1	1 / 11,000	8 / 10,800

*ヒスチジン血症の患者数は、全国については平成4年度まで、富山県については平成5年度までの結果

た。

富山県における現在までの患者発見率は、代謝異常症が1/5,200、クレチニ症が1/3,700、副腎過形成症が1/10,800である。全国の患者発見率と比較すると、クレチニ症について、その発生頻度が有意に高いといえる（クレチニ症；P<0.01）。

精度管理については、アミノ酸は当所において検査し、TSHについては委託機関へ送付した。アミノ酸については正答率100%であった。TSHについては、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。来年度からは、代謝異常症の全項目にマイクロ

プレート・酵素法が導入され、また検査を委託していたクレチン症と先天性副腎過形成症のスクリーニングも当所で実施することとなり、これで、患児の早期発見、早期治療による心身障害発生の予防対策は一層充実すると思われる。

文 献

1. 厚生省児童家庭局長 (1992). 児発第764号.
2. 本田幸子, 林 美貴子, 西田義雄, 林 圭子 (1977). 富山衛研年報, 昭和52年度, 22-26.
3. 高橋雅子, 米田 豊, 北村 敬, 高柳礼子 (1996). 富山衛研年報, 平成7年度, 33-43.
4. 本田幸子, 林 美貴子, 森田修行, 林 圭子, 西田義雄, 渡辺正雄 (1978). 富山衛研年報, 昭和53年度, 122-125.
5. 本田幸子, 林 美貴子, 徳満尚子, 吉川俊夫, 植竹久雄, 中島千賀子, 木下清美 (1981). 富山衛研年報, 昭和56年度, 125-131.
6. 先天性代謝異常検査技術者研修会研修テキスト (1986). p65-74, 総合母子保健センター編.
7. 米田 豊, 高橋雅子 (1995). 富山衛研年報, 平成6年度, 58-65.

オンカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィーによる新生児マスクリーニング血液ろ紙中のアミノ酸の定量

米田 豊 高橋雅子

High-performance liquid chromatography of amino acids
with on-column fluorescence derivatization for
a neonatal mass-screening test

Yutaka YONEDA and Masako TAKAHASHI

要旨 蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる新生児マスクリーニング血液濾紙中のアミノ酸の分析法を開発した。アミノ酸の誘導体化はオルトフタルアルデヒド及びN-アセチル-L-システインを用いるオンカラム法で行った。カラムにポリマー系逆相カラムを用いてアセトニトリル-ホウ酸ナトリウム系移動相によるアイソクラティック溶出を行うことにより、15分以内にTyr, Val, Met, Ile, Orn, Phe, Leu, Lys及び内部標準物質としたメチルヒスタミンを分離できた。又、血液濾紙からの抽出は、メタノール-アセトンで血色素を濾紙に固定後、内部標準物質を含有するホウ酸ナトリウム溶液で行うことにより、高速液体クロマトグラフィーに直接注入可能な試験溶液が得られた。本法により、微量のマスクリーニング用血液濾紙中のアミノ酸を迅速かつ簡易に高感度で定量することが可能であった。

先天性代謝異常を新生児のうちに発見し、早期に治療を開始することにより、精神発達遅延等の障害を回避する目的で、全国規模で新生児マスクリーニング検査が行われている。対象疾患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及びガラクトース血症であり、それぞれ、血液濾紙中のフェニルアラニン、メチオニン、ロイシン及びガラクトースが指標物質として測定されている。アミノ酸の代謝異常には前3物質のアミノ酸のほか、オルニチン血症やチロジン血症も知られており、血中のオルニチン及びチロジンを指標物質としている。検査方法としては主に細菌生長阻止法 (Bacterial Inhibition Assay: BIA) であるガスリー法が用いられているが、この方法は半定量法であり、数値化による精度管理

が困難であるなどの短所から、近年、マイクロプレート法への移行もみられる。しかし、マイクロプレート法は複数のアミノ酸を同時分析できず、又、コスト面での難点もある。又、ロイシンの測定では、ロイシンを単独で定量することはできず、バリン及びイソロイシンを加えた分岐鎖アミノ酸として定量することになる。これらのことから高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析も試みられており、又、マイクロプレート法で疑陽性となった検体の確認検査に HPLC を用いている検査施設もある。

一方、アミノ酸の HPLC としては、近年、ポストカラム法よりも、比較的短時間で分析可能な逆相系カラムを用いるプレカラム法が多用される傾向があり、この場合のラベル化剤として、オル

トフタルアルデヒド (OPA) [1, 2] や 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl-Carbamate (AQC) [3] が採用されている。しかし、ポストカラム法及びプレカラム法共グラジエント分析が必要であり、又プレカラム法では蛍光ラベル化のための煩雑な操作を伴うため、多検体をより効率的に検査できる分析法が望まれている。近年、Saito ら [4] は OPA とアミノ化合物が反応して生成される蛍光物質はカラム内では分解し難いことを見いだし、ヒスタミンの分析 [5] をオンカラム誘導体化法で行っている。そこで、今回、オンカラム誘導体化法をアミノ酸分析に適応し、上記のアミノ酸を含む計 8 種のアミノ酸をアイソクラティックな条件で 15 分以内に分析可能な HPLC 条件を確立した。又、血液濾紙からの抽出法についても検討を行った。

実験

1. 装置

島津製作所製高速液体クロマトグラフィー用ポンプ LC-6A に、昭和電工製ポリマー系逆相分離カラム Asahipak ODP-50 (150 × 4.6mm i.d.) を装てんし使用した。なおカラムの前に同社製ガードカラム ODP-50G を、更にその前にジーエルサイエンス社製ガードフィルターを取り付けて使用した。検出には島津製作所製 RF-530 型蛍光検出器を用い、カラム恒温槽は同社製 CTO-2A を使用し、データ処理は同社製インテグレータ C-R1B を用いた。

2. 試薬

アミノ酸標準原液は和光純薬製アミノ酸混合標準液 H 型（各 $2.5 \mu\text{mol}/\text{ml}$ ）を用い、オルニチン標準原液は同社製塩酸 L-オルニチンを 0.1N 塩酸溶液に溶解し $2.5 \mu\text{mol}/\text{ml}$ に調製して用いた。内部標準原液はシグマ社製 1-メチルヒスタミンを 0.1N 塩酸溶液に溶解し $2.5 \mu\text{mol}/\text{ml}$ に調製して用いた。

アミノ酸標準液はアミノ酸標準原液、オルニチ

ン標準原液及び内部標準原液を各々 0.1ml 分取し、これに 4 mM ホウ酸ナトリウム溶液を加え、全量を 25ml にして用いた。内部標準物質含有抽出液は内部標準原液 0.1ml 及び 0.1N 塩酸溶液 0.2ml に 4 mM ホウ酸ナトリウム溶液を加え全量を 25ml にして用いた。なお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、ホウ酸ナトリウム、OPA 及び N-アセチル-L-システイン (NAC) も同社製を用いた。

3. 実験方法

3・1. 試験溶液の調製

新生児マスクリーニング用の血液濾紙からパンチャーを用い直径 3 mm のディスクを 1 個打ち抜き、これをマイクロプレートに入れ、アセトン-メタノール (1 : 1) $25 \mu\text{l}$ を加えた後、37°C の恒温槽内に入れ溶媒を気散させた。次に血液濾紙の入ったマイクロプレートのセルに内部標準物質含有抽出液 $100 \mu\text{l}$ を加え、超音波水槽内で 10 分間抽出を行い、得られた抽出液を別に用意したマイクロプレートに移し、これを HPLC 用試験溶液とした。

3・2. HPLC

2 mM OPA 及び 2 mM NAC (2 mM OPA/NAC) 含有アセトニトリル-4 mM ホウ酸ナトリウム (pH 9.1) (14.6 : 85.4) を移動相に用い、その流速は $0.6 \text{ ml}/\text{min}$ とした。カラム温度は 40°C に設定し、HPLC 用試験溶液 $5 \mu\text{l}$ を注入した。又、検出は励起波長を 340 nm、検出波長を 450 nm とする蛍光検出で行い、定量計算はピーグ面積を用いて内部標準法で行った。又、定量値は直径 3 mm のディスクに含まれる血液量を $3 \mu\text{l}$ として、全血中の濃度に換算した。なお、分析終了後カラム内の移動相を 30% アセトニトリルで置換、洗浄してカラムを保存した。

結果と考察

1. HPLC 条件の検討

1・1. オンカラム法のアミノ酸分析への適用

Saito ら [5] のオンカラム法をアミノ酸に適用したところ、移動相を 1 mM OPA/NAC 含有アセトニトリル-50mM ホウ酸ナトリウム (15 : 85) とし、流速を 1.0 ml/min とした場合、Tyr, Val, Met, Ile, Phe, Leu 及び Lys は 3 分から 25 分の間に、この順に溶出され、概ね良好な分離を示した。しかし、Leu と Orn のピークが重なったため、Orn の分離条件を探すため、アセトニトリル濃度及び移動相の pH を変化させたが、いずれも効果が認められなかった。次にホウ酸ナトリウム濃度を変化させたところ、ホウ酸ナトリウム濃度を 6 mM (pH 9.1) としたとき、全体の溶出終了時間が約 7 分と著しく短くなったが、Orn は Leu 及び Phe より前に分離されて溶出した。そこで、以後ホウ酸ナトリウム濃度を 6 mM として、更に移動相の至適条件を検索することとした。

1・2. 移動相流速の影響

次に保持時間を増大させるため、移動相を 1 mM OPA/NAC 含有アセトニトリル-6 mM ホウ酸ナトリウム (15 : 85) とし、流速を 1.0, 0.8, 0.6 及び 0.4 ml/min に変化させた。移動相の流速を下げる程、ピーク高は大きくなり、感度の向上が認められた。0.4 ml/min では Orn と Lys のピークがややブロードになったため、0.6 ml/min に設定した。この条件で Tyr, Val, Met, Ile, Phe, Leu 及び Lys は 3 分から 12 分の間に溶出された。

1・3. 反応コイルの効果

移動相の流速が感度に与える影響が大きいことから、注入した試料と移動相中の蛍光ラベル化剤の接触時間を長くする目的で、カラム恒温槽内のカラムの入口部に内径 0.5 mm の反応コイルを取り付けその影響を調べた。反応コイルの長さは 2, 3 及び 5 m について検討を行ったが、反応コイルを取り付けない場合と比較し、大差は認められなかったため、反応コイルは使用しないこととした。

1・4. 移動相中の OPA/NAC 濃度の影響

移動相中の OPA 及び NAC 濃度を各々 0.5, 1.0, 1.5 及び 2.0 mM とし、アミノ酸標準液を用いてピークの保持時間、感度及びピーク形状の比較を行った。その結果、ピークの保持時間及び感度に関しては大差が認められなかったが、OPA/NAC 濃度が低いとピークのリーディングが大きくなる傾向が認められた。従って、OPA/NAC 濃度は 2 mM を採用することとした。

1・5. 移動相中のアセトニトリル濃度の影響

以上の実験から移動相の組成を 2 mM OPA/NAC 含有アセトニトリル-6 mM ホウ酸ナトリウム (15 : 85) とし、流速を 0.6 ml/min として、血液濾紙から抽出した試験溶液に適用した。試験溶液中には Met の定量を妨害するピークが認められ、この物質はエタノールアミン (Eam) の保持時間と一致した。そこで、内部標準物質の候補物質としたメチルヒスタミン (Mhi) と併せて、それらの保持挙動を調べるために、再度、移動相中のアセトニトリル濃度を変化させ分離パターンを観察した。その結果を Fig. 1 に示した。アセトニトリル濃度を 13, 14, 14.6,

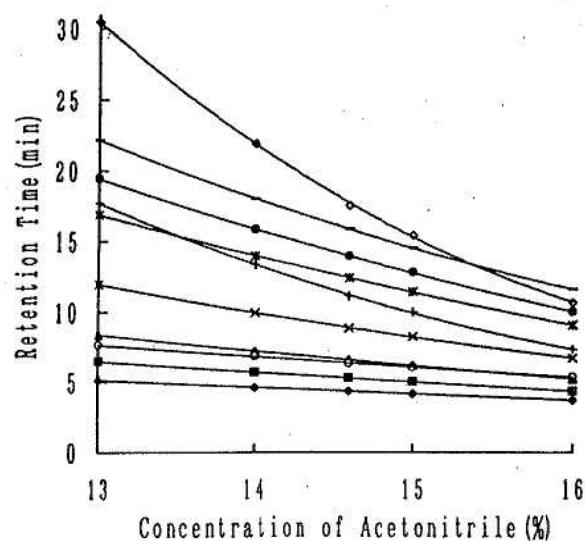


Fig. 1 Effect of concentration of acetonitrile in mobile phase on retention time
◆:Tyr; ■:Val; ▲:Met; ×:Ile; *:Phe;
●:Leu; +:Orn; ◇:Lys; -Mhi; ○:Eam

15及び16%について検討したところ、13%ではMetとEamとの分離は認められるが、PheとOrnのピークが重なり、又、Lysの保持時間が著しく長くなつた。なお、MetとEamとの分離を考慮しなければ、14.6%のアセトニトリル濃度が最も適切に思われた。

1・6. 移動相中のホウ酸ナトリウム濃度の影響

そこで、2 mM OPA/NAC含有アセトニトリル-6 mMホウ酸ナトリウム(14.6:85.4)の組成を更に改良して至適移動相を求めるため、ホウ酸ナトリウム濃度を3, 4, 5, 6, 7及び8 mMと変化させ、各アミノ酸、Mhi及びEamの保持時間に及ぼす影響を観察した。その結果、Fig. 2に示すようにホウ酸ナトリウム濃度を4 mMとした場合、6 mMの場合より、分析時間が短縮される上、EamはMetよりやや遅れて分離、溶出された。以上より移動相の組成は2 mM OPA/NAC含有アセトニトリル-4 mMホウ酸ナトリウム(14.6:85.4)を採用することとした。なお、同一カラムを繰り返し使用した場合、Orn

のピークがIleのピークにやや接近する傾向が見られたため、その程度に応じ、4 mMホウ酸ナトリウム溶液の割合を0.1-0.5%程度増加することにより、分離を改善できた。なお同一カラムで少なくとも500回の分析は可能であった。

2. 血液濾紙からの抽出法の検討

2・1. 抽出溶媒の検討

血液濾紙からの抽出用溶媒として、一般に70%エタノール[1]、70%メタノール[2]又は0.1Nトリクロロ酢酸(TCA)[3]溶液が用いられている。しかし、アルコールは粘度が低いためマイクロピペットで定量的に取り扱うことに難点があり、0.1N TCA溶液は抽出後、中和操作を要するため、操作が煩雑になる。そこで、より簡易な方法として、血液濾紙をアセトン-メタノール(1:1)に浸漬して血色素を濾紙に固定し、溶媒揮散後、濾紙から水で抽出を行い、得られた抽出液をそのままHPLCの試験溶液とする方法について検討を行った。この方法では血液濾紙からの血色素の溶出は肉眼的に殆ど見られず、わずかに褐色を帯びた透明な抽出液が得られた。しかし、これをHPLCに注入した場合、試料抽出液の内部標準物質のピークは、アミノ酸標準液の内部標準物質のピークより低くなり、定量値は理論値より高い値が得られた。この原因はアミノ酸標準原液を水で希釀して調製したアミノ酸標準液はやや酸性であることに対し、血液濾紙からの抽出液は、蛋白質の緩衝作用により、ほぼ中性となるためと考えられた。更に、アミノ酸標準液を繰り返し注入した場合、内部標準物質のピーク面積にバラツキが認められた。このバラツキの原因は試験溶液と移動相のpHの違いによるものと考えられた。そこで、抽出液を移動相の調製に用いる4 mMホウ酸ナトリウム溶液に内部標準物質を溶解した溶液を用い、これに伴いアミノ酸標準液の調製に用いる希釀液も4 mMホウ酸ナトリウム溶液に変更した。その結果、内部標準物質のピークの大きさは安定し、定量が可能となった。

Table 1に標準液を繰り返し注入した場合の再現性を示した。

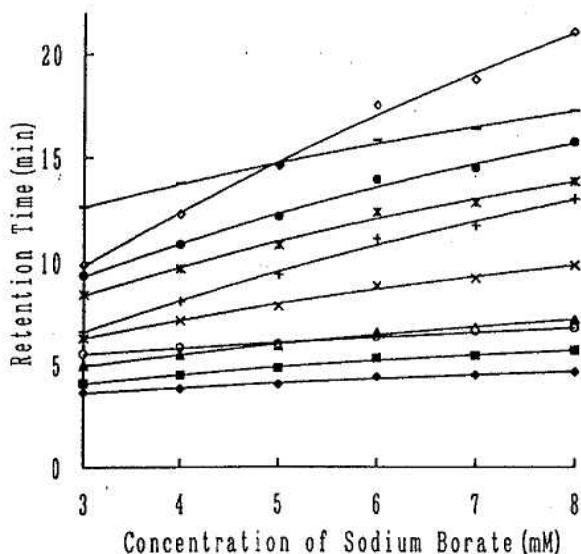


Fig. 2 Effect of concentration of sodium borate in mobile phase on retention time

◆:Tyr; ■:Val; ▲:Met; ×:Ile; *:Phe;
●:Leu; +:Orn; ◇:Lys; -:Mhi; ○:Eam

Table 1 Reproducibilities of on-column HPLC
(means of five injections)

Amino acid	Amounts of injected/pmol	Found, %	RSD, %
Tyr	50	102.2	3.1
Val	50	100.9	3.1
Met	50	100.1	0.8
Ile	50	97.3	1.7
Orn	50	99.1	1.1
Phe	50	100.3	1.5
Leu	50	96.8	2.3
Lys	50	98.1	2.2

2・2. 超音波抽出時間の検討

Leu 及び Phe を各々 5 mg/dl 含む内部精度管理用の血液濾紙から 3 mm ディスクをそれぞれ 1 個打ち抜き、メタノール-アセトンで固定化後、内部標準物質含有抽出液を 200 μl 加え、超音波水槽で抽出を行った。この操作を、抽出時間 1, 5, 10, 15, 20 及び 30 分間にについて行い、抽出時間の影響を調べた。その結果は Fig. 3 に示すよ

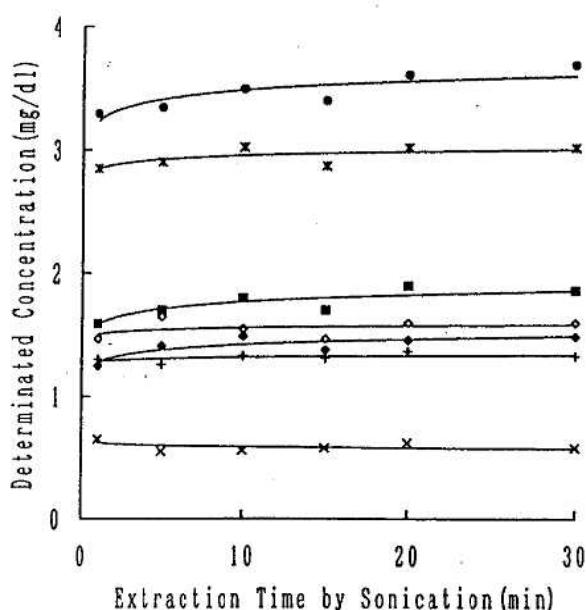


Fig. 3 Effect of extraction time by sonication on determined concentration

◆: Tyr; ■: Val; ×: Ile; ★: Phe; ●: Leu;
+: Orn; ◇: Lys;

うに抽出時間が 1 分間でも 30 分間と大差は認められなかった。本法では抽出時間は 10 分間に設定した。

2・3. 回収率および再現性

Phe, Leu および Met の含有濃度が既知の内部精度管理用血液濾紙（財）東京総合医学研究所製）を用い、本法の回収率及び再現性を調べた。その結果は Table 2 に示すように、Phe, Leu 及び Met の回収率は 95.5 から 106.2% の間にあり、変動係数はいずれも 5% 以下であった。

3. マスクリーニング検体への応用

3・1. 正常値調査

BIA により異常の認められなかった検体 51 検体について、本法により測定した全血中のアミノ酸濃度値を Table 3 に示した。平均値は Tyr, Val, Met, Ile, Orn, Phe, Leu 及び Lys の順に

Table 2 Reproducibilities of determination of amino acids from blood
(means of five samples)

Amino acid	Added by maker/mg dl ⁻¹	Found/mg dl ⁻¹	Recoveries, %	RSD, %
Met	1.5	1.43	95.3	4.0
Met	2.9	3.08	106.2	4.5
Phe	2.8	2.79	99.6	3.9
Phe	4.8	3.08	98.3	4.3
Leu	4.3	4.20	97.7	4.4
Leu	6.2	6.30	101.6	4.9

Table 3 The levels of amino acids in blood of 51 normal neonates

Amino acid	Mean ± S. D./mg dl ⁻¹
Tyr	2.52 ± 0.71
Val	1.93 ± 0.41
Met	0.28 ± 0.12
Ile	0.69 ± 0.17
Orn	1.75 ± 0.46
Phe	1.06 ± 0.19
Leu	1.24 ± 0.29
Lys	1.86 ± 0.36

2.52, 1.93, 0.28, 0.69, 1.75, 1.06, 1.24及び1.86 mg/dl であった。

3・2. 先天性代謝異常患児のクロマトグラム

Fig. 4-1, 4-2 及び4-3にそれぞれ、アミノ酸標準液、正常児及びフェニルケトン尿症患児の血液のクロマトグラムを示した。フェニルケトン尿症患児では正常児に比較し Phe の増加が認められた。

本法を用いることにより、グラジエント装置を用いることなく、又、誘導体化のための装置や煩雑な操作を要せず、短時間にアミノ酸の先天性代謝異常検査を行うことが可能となった。今後、マイクロプレート用オートインジェクター等と組み合わせることにより、更に効率的な分析システムへの発展が可能と考える。

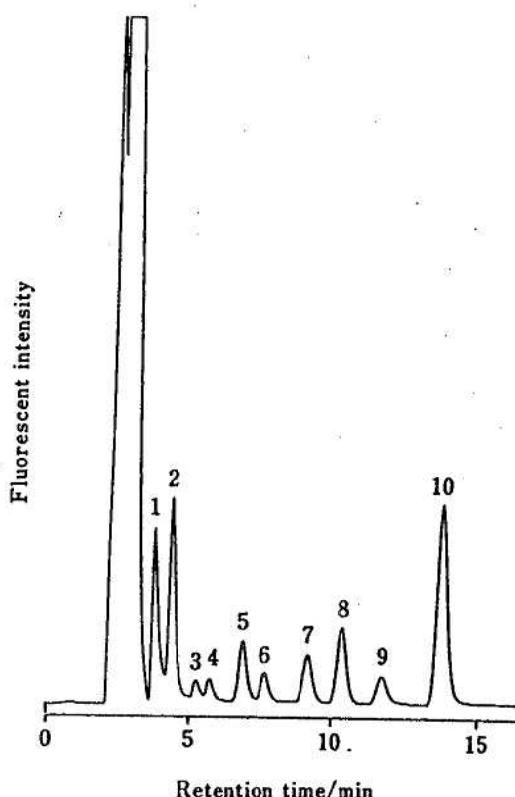


Fig.4-2 Chromatogram of extract from normal blood

4: Eam; Others are described in Fig.4-1

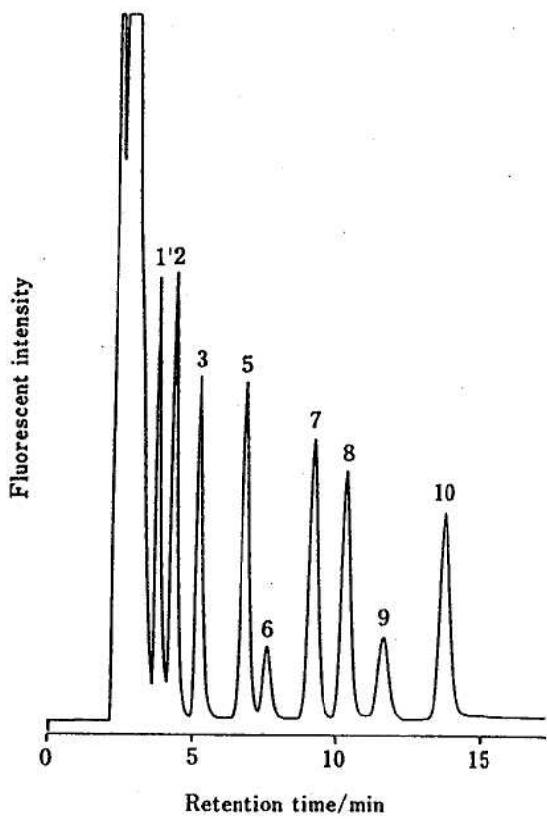


Fig. 4-1 Chromatogram of standard of amino acids

1:Tyr; 2:Val; 3:Met; 5:Ile; 6:Orn; 7:Phe;
8:Leu; 9:Lys; 10:IS

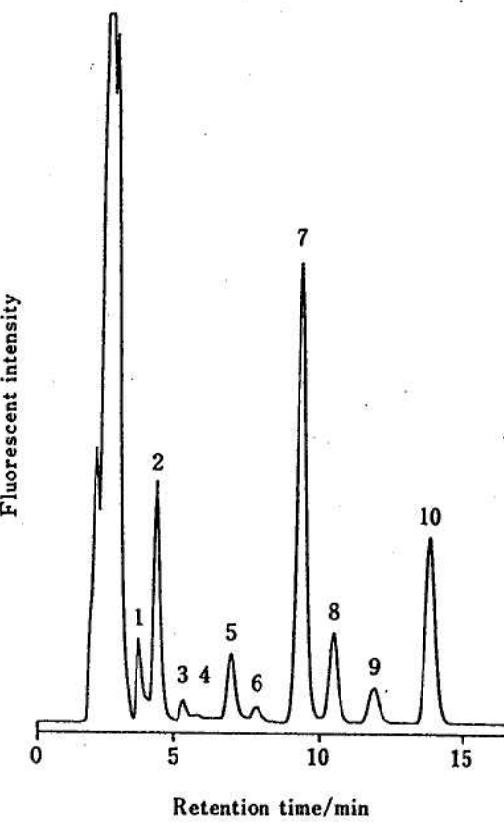


Fig.4-3 Chromatogram of blood of phenylketonuria

Number is described in Fig.4-2

文 献

- 1) Ichihara N., Harada S., Arai J., Kizaki T., Kusunoki Y., Hamano Y., Ganno S. (1994). New Trends in Neonatal Screening, p.57-59, Hokkaido Univ. Press, Sapporo.
- 2) 村田理恵, 柴田実, 安倍昭子, 高野弘紀 (1995). 日本マスクリーニング学会誌, 5, 86.
- 3) 阿部朋子, 鈴木恵美子, 成瀬浩, 丸野清 (1994). 日本マスクリーニング学会誌, 4, 141.
- 4) Saito K., Horie M. (1994). Anal. Chem., 66, 134-138.
- 5) Saito K., Horie M., Nose N., Nakagomi K., Nakazawa H. (1992). J. Chromatogr., 595, 163-168.

アイソクラティック溶出法による新生児マス スクリーニング血液濾紙中アミノ酸のAQC プレカラム誘導体化HPLC定量法

米田 豊 高橋雅子

Isocratical High-performance Liquid Chromatography
of Amino Acids for a Neonatal Mass-screening Test using
AQC Pre-column Method

Yutaka YONEDA and Masako TAKAHASHI

要旨 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるアミノ酸の簡易な新生児マススクリーニング検査法の開発を行った。マススクリーニング用血液濾紙中の血色素をメタノール-アセトン (1 : 1) で固定後、アミノ酸をホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.8) を用いて抽出し、蛍光ラベル化剤に 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) を用いてプレカラム誘導体化を行った。高速液体クロマトグラフィーはカラムに Develosil ODS を用い、移動相にトリエチルアミン (TEA) 含有酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.3) - アセトニトリル (84 : 16) を用いるアイソクラティックな系で行い、約15分でバリン (Val), メチオニン (Met), オルニチン (Orn), リジン (Lys), イソロイシン (Ile), ロイシン (Leu) 及びフェニルアラニン (Phe) を定量することが可能であった。本法による新生児の全血中の各アミノ酸正常値は順に 1.65, 0.36, 1.94, 2.03, 0.81, 1.57 及び 0.73 mg/dl であった。また、本法とマイクロプレート法との比較を行った。

アミノ酸代謝異常の新生児マススクリーニング検査法として一般にガスリー法が用いられている。しかし、ガスリー法は半定量法であるため、近年、より正確で迅速な検査が可能なマイクロプレート法が開発され、各地の検査機関に導入され始めている。しかし、マイクロプレート法は検査コストがかさむこと、また一定時間毎に操作が必要なため、検査者は時間に縛られることになる。更に酵素の基質特異性に基づく検査のため、特異性の低いロイシン脱水素酵素を用いるメープルシロップ尿症 (MSUD) の検査では Leu を単独に測定することはできず Ile 及び Val を加えた分岐鎖アミノ酸 (BCAA) を測定することになる。一方、こ

れらの欠点を解消できる可能性を有する検査法として、HPLC があり、すでに一部の検査機関では検討されている [1, 2, 3]。しかし、現在試みられている HPLC はグラジエント分析であるため、高価な装置を要し、操作も煩雑である。そこで、先に著者らはより簡便に測定可能なアイソクラティック HPLC を検討し、オルトフタルアルデヒド (OPA) を蛍光ラベル化剤とするオンカラム HPLC [4] を開発した。この方法は基本構成の HPLC 装置を用い、且つ簡易な前処理操作で分析可能であるが、ラベル化剤を含む移動相を用時調製する必要があり、また徐々にラベル化剤がカラムに蓄積するため、定期的にカラムを

洗浄する必要があった。そこで、今回ラベル化剤に AQC を用いるプレカラム誘導体化 HPLC をアイソクラティックな系で行う方法を検討し、分析システムの保守が容易で、簡易なアミノ酸の HPLC 定量法を確立した。またマイクロプレート法との比較も行った。

実験

1. 装置

島津製作所製高速液体クロマトグラフィー用ポンプ LC-6A に、野村化学製 Develosil ODS-UG-5 (150×4.6mm i.d.) を装てんし使用した。なおカラムの前に同社製ガードカラム Develosil ODS-UG-5 (10×4.0mm i.d.) を、更にその前にジーエルサイエンス社製プレカラムフィルターを取り付けて使用した。検出には島津製作所製 RF-530型蛍光検出器を用い、カラム恒温槽は同社製 CTO-2A を使用し、データ処理は同社製インテグレータ C-R1B を用いた。マイクロプレートリーダーはコロナ電気株式会社製 MTP-100F を用いた。

2. 試薬

AQC 溶液は日本ウォーターズ株製 AccQ-Fluor Reagent Kit (Catalog No.052880) の添付品を所定の方法で調製したもの用いた。

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。

10 μ Mアミノ酸標準液は和光純薬製アミノ酸混合標準液H型及び2.5 μ mol/ml オルニチン含有0.1N 塩酸溶液並びに2.5 μ mol/ml L-ノルロイシン含有0.1N 塩酸溶液を用い、各々のアミノ酸の濃度が10 μ Mとなるよう0.2Mホウ酸緩衝液(pH 8.8)で希釈し用いた。

内部標準物質含有抽出液は2.5 μ mol/ml L-ノルロイシン含有0.1N 塩酸溶液を0.2Mホウ酸緩衝液(pH 8.8)で希釈し、L-ノルロイシンの濃度が10 μ Mとなるよう調製し用いた。

マイクロプレート法用のアミノ酸測定キットは

カイロン社製エンザプレート PKU-R, MSUD-R 及び HCU-F を用いた。

3. 1. 実験方法

3・1. 試験溶液の調製

新生児マスククリーニング用の血液濾紙からパンチャーを用い直径 3 mm のディスクを 1 個打ち抜き、これをマイクロプレートに入れ、メタノール-アセトン (1 : 1) 25 μ l を加えた後、37°C の恒温槽内に 30 分間以上入れ、溶媒を揮散させた。次に血液濾紙の入ったマイクロプレートのセルに内部標準物質含有抽出液 60 μ l を加え、マイクロプレート上部を粘着シールで覆った後、超音波水槽内で 10 分間超音波抽出を行なった。

3・2. プレカラム誘導体化

超音波抽出して得られた抽出液 40 μ l をポリプロピレン製 1.5 ml ディスポーザブル試験管に分取した。この試験管に AQC 溶液 10 μ l を加え、直ちにボルテックス型ミキサーで混和した後、55°C の水浴中で 10 分間加温しプレカラム誘導体化を行なった。反応後、水冷し、その 10 μ l を HPLC に供した。

3・3. HPLC

カラムに Develosil ODS-UG-5 を用い、4.1 mM TEA 含有 34.1 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.3) - アセトニトリル (84 : 16) を移動相に用い、移動相の流速は 1.5 ml/min とした。カラム温度は 40°C に設定し、検出は励起波長を 250 nm、検出波長を 395 nm とする蛍光検出で行い、定量計算はピーク面積を用いて内部標準法で行った。なお、定量値は直径 3 mm のディスクに含まれる血流量を 3 μ l として、全血中の濃度に換算した。

結 果

1. HPLC 条件の検討

1・1. 移動相の pH がアミノ酸の保持時間及び蛍光強度に及ぼす影響

Cohen らの方法 [5] に準じて15.5mM TEA 含有127mM 酢酸ナトリウム溶液-アセトニトリル (85 : 15) を調製した。酢酸ナトリウム溶液の pH はそれぞれ4.0, 5.0, 5.5, 6.0及び7.0に調整し、これらの移動相を用い、 $10 \mu M$ アミノ酸標準液を実験3・2 の方法により誘導体化後、HPLC に供し、移動相の pH が各アミノ酸の保持時間及び蛍光強度に及ぼす影響を調べた。その結果、Fig. 1 に示すように pH 5.3から5.5で良好な分離を示し、また、Fig. 2 に示すように、感度は pH 5.5で良好であった。なお、pH 4 では Lys のピークは Tyr のピークと重なるため、この実験では pH 4 における Lys の蛍光強度は測定できなかつた。

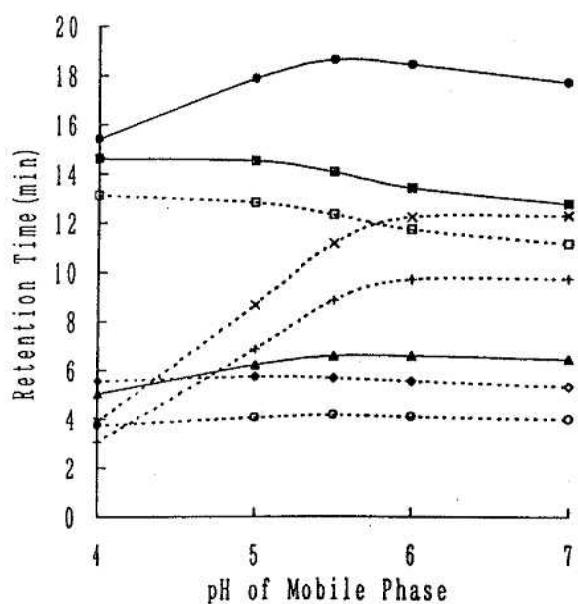


Fig. 1 Effect of pH of mobile phase on retention time

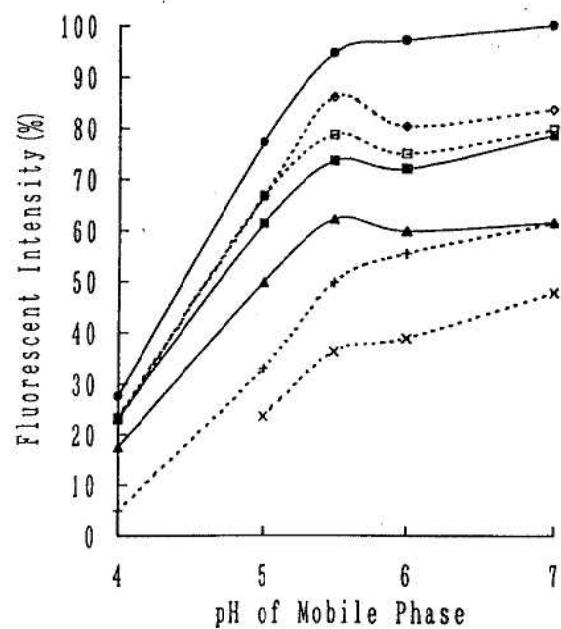


Fig. 2 Effect of pH of mobile phase on fluorescent intensity

1・2. 移動相中の酢酸ナトリウム及びTEA 濃度の影響

170mM TEA 含有1400mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) の水希釀溶液-アセトニトリル (85 : 15) を移動相に用いて、移動相中の TEA 及び酢酸ナトリウム濃度が各アミノ酸の保持時間及び蛍光強度に及ぼす影響を調べた。

酢酸ナトリウム溶液の希釀率は11, 21, 41及び81倍となるよう、それぞれ移動相を調製した。これらの移動相を用い、 $10 \mu M$ アミノ酸標準液をプレカラム誘導体化操作後、HPLC に供し比較を行った。その結果はFig. 3 及び Fig. 4 に示すように希釀率11倍と21倍及び41倍と81倍では保持時間に大差は認められず、11倍及び21倍より41倍及び81倍の方が保持時間の増大が認められた。また蛍光強度は希釀率41倍の時、最大であった。従つて、希釀率は41倍、すなわち4.1mM TEA 含有34.1mM 酢酸ナトリウムに設定することとした。

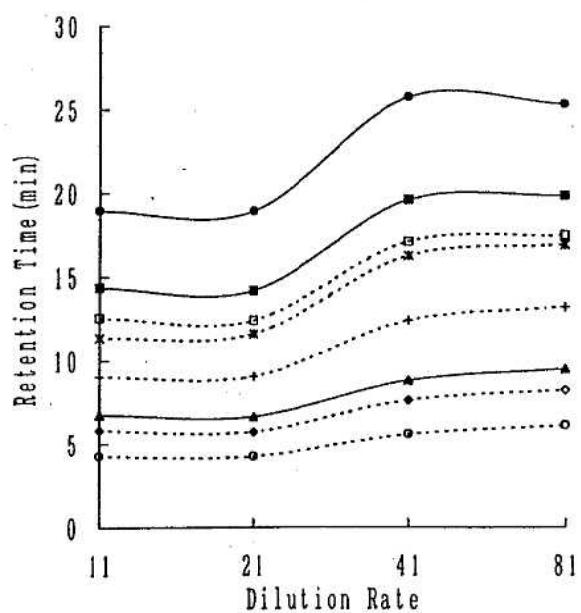


Fig. 3 Effect of dilution rate of buffer in mobile phase on retention time

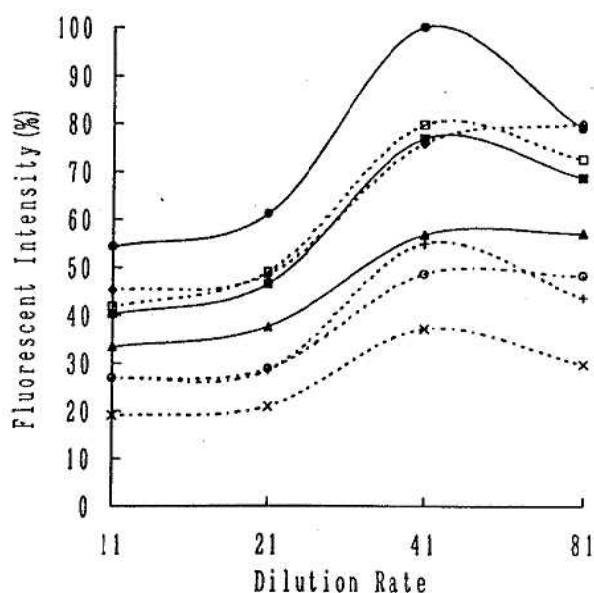


Fig. 4 Effect of dilution rate of buffer in mobile phase on fluorescent intensity

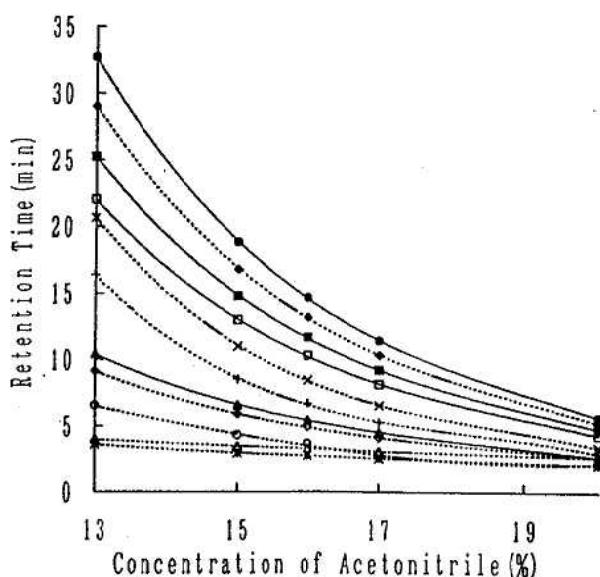


Fig. 5 Effect of concentration of acetonitrile in mobile phase on retention time

1・3. 移動相中のアセトニトリル濃度の影響

移動相に4.1mM TEA 含有34.1mM酢酸ナトリウム溶液-アセトニトリル (100-X : X) を用い、Xの値を13, 15, 16, 17及び20の条件でアミノ酸の溶出パターンを調べた。なお、TEA 含有酢酸ナトリウム溶液のpHはLysとIleとの分離が良好な5.3に設定した。その結果、Fig. 5に示すようにアセトニトリル濃度を16%とした場合、ValとMetの分離が良好で、約15分で分離が可能であった。従って、移動相は4.1mM TEA 含有34.1mM酢酸ナトリウム (pH 5.3)-アセトニトリル (84 : 16) を用いることとした。

2. 血液濾紙からの抽出法の検討

2・1. 抽出溶媒の検討と回収率

血液濾紙からのアミノ酸抽出法として0.2Nトリクロル酢酸 (TCA) で抽出する方法 (A法) 及び50%アセトニトリルで抽出する方法 (B法) 並びに血液濾紙中の血色素をメタノール-アセトン (1 : 1, 固定液) で固定し、溶媒を揮散させ

Table 1 Reproducibilities of determination of amino acids from dried blood disc

Extract solution	Amino acid	added by maker (mg/dl)	Means of five samples		
			found (mg/dl)	recoveries (%)	coefficient of variation (%)
0.2N TCA	Met	1.7	2.31	135.9	12.3
	Met	3.2	3.97	124.0	7.4
	Leu	4.0	3.91	97.8	5.2
	Leu	6.2	5.83	94.0	2.8
	Phe	2.9	2.88	98.6	6.3
	Phe	4.9	4.83	99.5	8.2
50% Acetonitrile	Met	1.7	1.58	92.9	11.1
	Met	3.2	3.26	101.9	4.4
	Leu	4.0	3.19	79.8	5.9
	Leu	6.2	5.18	83.5	4.2
	Phe	2.9	2.70	93.1	3.2
	Phe	4.9	4.43	90.3	5.1
0.2M borate buffer(pH8.8)	Met	1.7	1.72	101.1	7.3
	Met	3.2	3.30	103.1	2.6
	Leu	4.3	4.33	100.8	5.1
	Leu	6.2	5.58	90.1	2.9
	Phe	3.2	3.27	102.2	3.7
	Phe	4.8	4.52	94.2	3.2

た後0.2N ホウ酸緩衝液（pH 8.8）で抽出する方法（C法）の3方法について検討した。抽出試料には内部精度管理用血液濾紙（財）東京総合医学研究所製）を用い、各々10分間超音波抽出を行い比較した。なお、A法及びB法では直径3 mmの血液濾紙1枚に抽出液60 μlを加え抽出を行った後、抽出液20 μlを分取し、これに0.2N ホウ酸緩衝液（A法ではpH 9.5、B法ではpH 8.8）を60 μl、更にAQC溶液を20 μl加え、55℃で10分間反応を行った。C法は実験3・1及び3・2の方法を用いた。その結果をTable 1に示した。A法ではMetの回収率が100%を越え、妨害物質の存在が推測された。B法ではLeu及びPheの回収率が他の2方法より低く、C法では一部を除きほぼ100%の回収率が得られた。また回収率の再現性もC法が最も優れていた。従って、抽出溶媒として0.2N ホウ酸緩衝液（pH 8.8）を用いることとした。

2・2. 超音波抽出時間の検討

アミノ酸のバイオアッセイ（BIA）用標準血液濾紙（フジレビオ社製）を用い0.2N ホウ酸緩衝液（pH 8.8）でアミノ酸を超音波抽出し、抽出時間の検討を行った。直径3 mmに打ち抜いた6 mg/dlのLeu及びPhe用並びに4 mg/dlのMet用標準血液濾紙各々1個をマイクロプレートの同一セルに入れ、固定液50 μlで血色素を固定後、0.2N ホウ酸緩衝液（pH 8.8）180 μlを用いて超音波抽出を行った。この実験を抽出時間1, 5, 10, 15, 20及び30分について行ない、それぞれ抽出液40 μlずつをプレカラム誘導体化し比較を行った。その結果をFig. 6に示した。各アミノ酸は1分間の抽出でも大部分が抽出され、10分間で最高の抽出率を示した。10分間以上の抽出では抽出率の減少が認められた。従って、抽出時間は10分間に設定した。

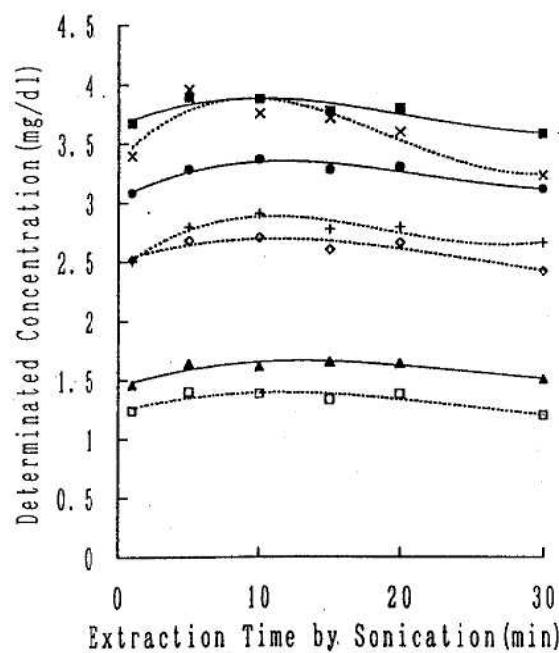


Fig. 6 Effect of extraction time by sonication on determinated concentration

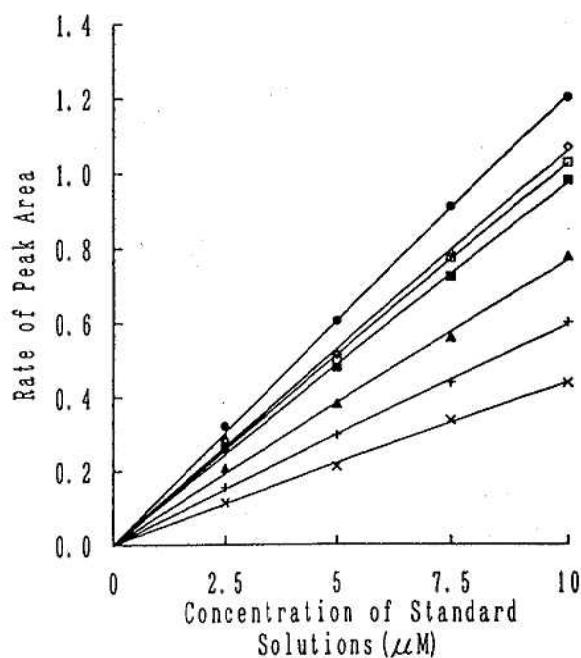


Fig. 7 Calibration curves of amino acids

Table 2 Reproducibilities of HPLC

means of ten injections

Amino acid	amounts of injected derivatives(pmol)	found (%)	coefficient of variation(%)
Val	80	102.2	2.2
Met	80	103.4	2.2
Orn	80	96.6	2.3
Lys	80	96.9	3.7
Ile	80	100.2	3.1
Leu	80	100.4	1.7
Phe	80	99.2	1.5

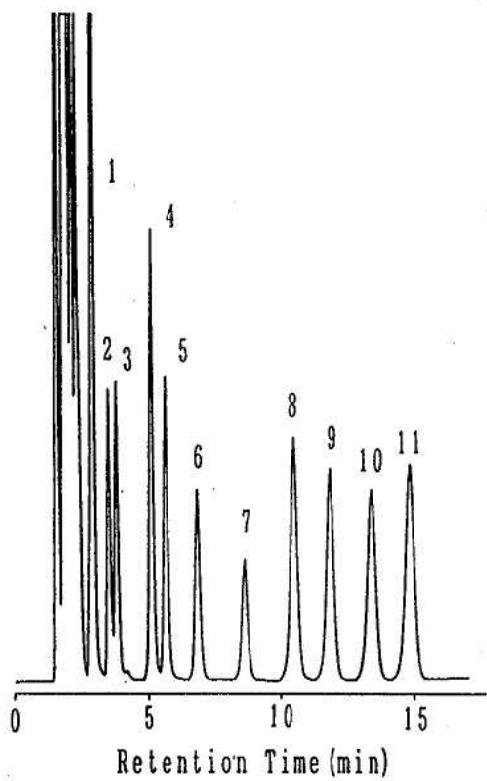


Fig. 8-1 Chromatogram of standard of amino acids

1:X; 2:AMQ; 3:Tyr; 4:Val; 5:Met; 6:Orn;
7:Lys; 8:Ile; 9:Leu; 10:Nle; 11:Phe

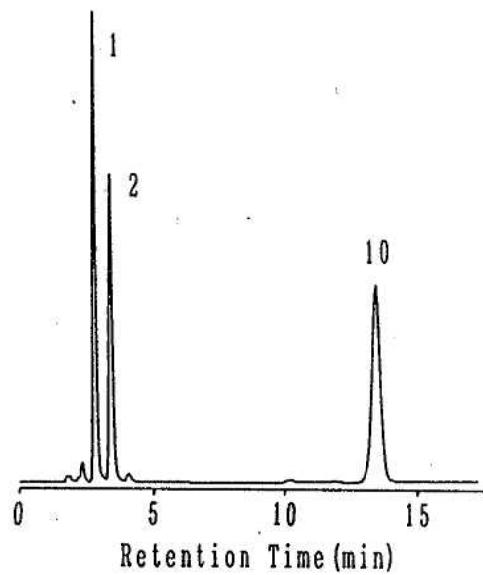


Fig. 8-2 Chromatogram of blank solution of amino acids

1:X; 2:AMQ; 10:Nle

2・3. 検量線及び再現性

$10\mu M$ アミノ酸標準液を内部標準物質含有抽出液で希釈して $2.5, 5.0, 7.5$ 及び $10.0\mu M$ の濃度のアミノ酸溶液を調製し、検量線を作成した。その結果はFig. 7に示すようにいずれのアミノ酸も良好な直線性を有する検量線が得られた。また、 $10\mu M$ アミノ酸標準液をラベル化後、繰り返し10回測定し再現性を調べた。その結果はTable 2に示すように、いずれのアミノ酸も良好な再現性が得られた。なお、Fig. 8-1に $10\mu M$ アミノ酸標準液のクロマトグラムを、Fig. 8-2に対照として内部標準物質含有抽出液をラベル化操作を行って得られたクロマトグラムを示した。

2・4. マイクロプレート法との相関

BCAA 及び Phe について、BIA 用標準血液濾紙（フジレビオ社製）中のアミノ酸をマイクロプレート法及び本法で測定し両方法間の相関を調べた。BCAA は Fig. 9-1 に、Phe は Fig. 9-2 に示すように、両方法間の定量値にはそれぞれ高度の相関 ($r=0.997$ ($n=7$) 及び $r=0.994$ ($n=8$)) が認められた。また、ガスリー法で異常が認められなかった新生児検体を用い、両方法間の相関を調べたところ、Fig. 10-1 及び 10-2 に示すように BCAA 及び Phe 共に高度の相関 ($r=0.906$ ($n=97$) 及び $r=0.817$ ($n=97$)) が認められた。なお、回帰直線は原点を通る直線に近似させた。

また、Met についても同様に HPLC 法とマイクロプレート法の相関を求ることを試みたが、BIA 用標準血液濾紙中の Met のマイクロプレー

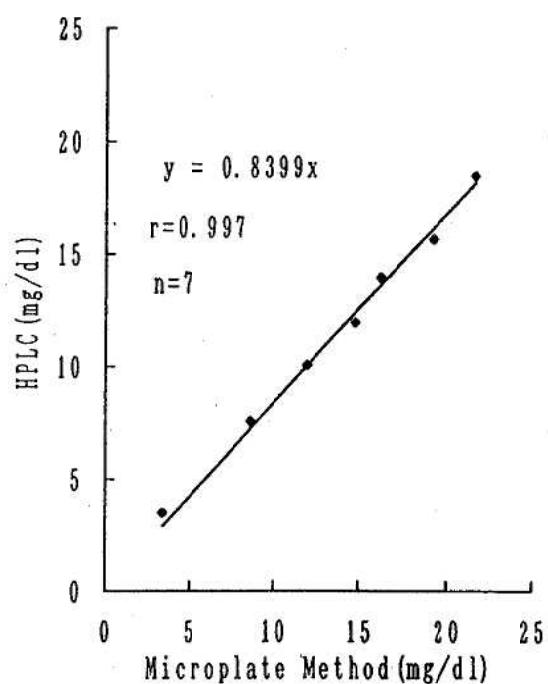


Fig. 9-1 Correlation of determinated concentration of BCAA in standard disc between by HPLC and microplate method

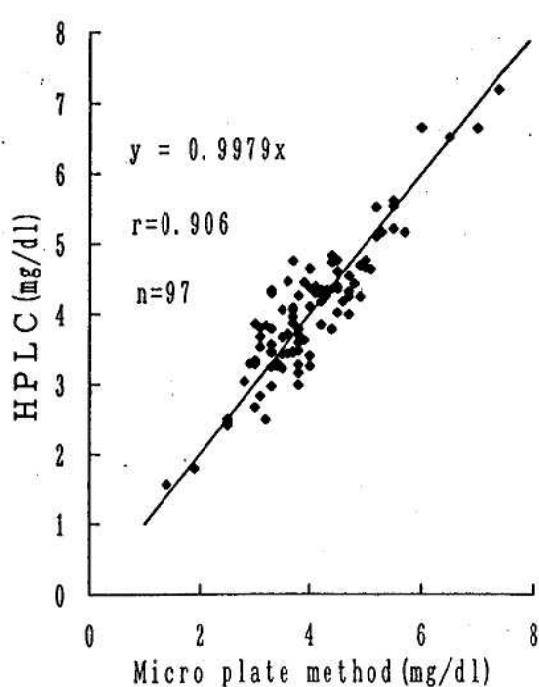


Fig. 10-1 Correlation of determinated concentration of BCAA in sample disc between by HPLC and microplate method

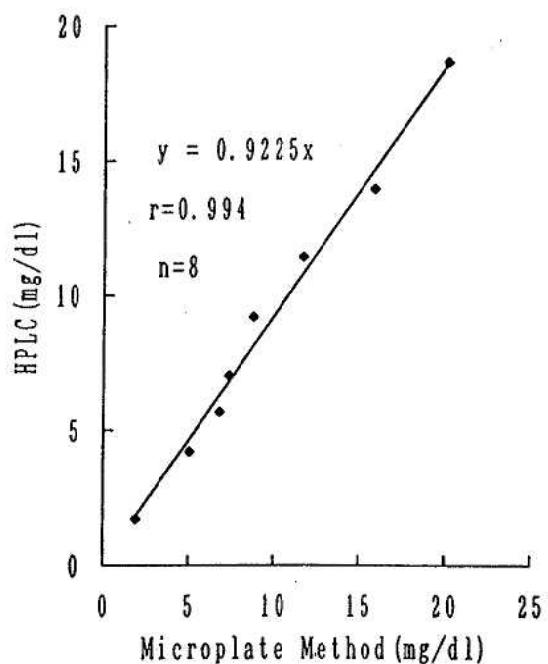


Fig. 9-2 Correlation of determinated concentration of Phe in standard disc between by HPLC and microplate method

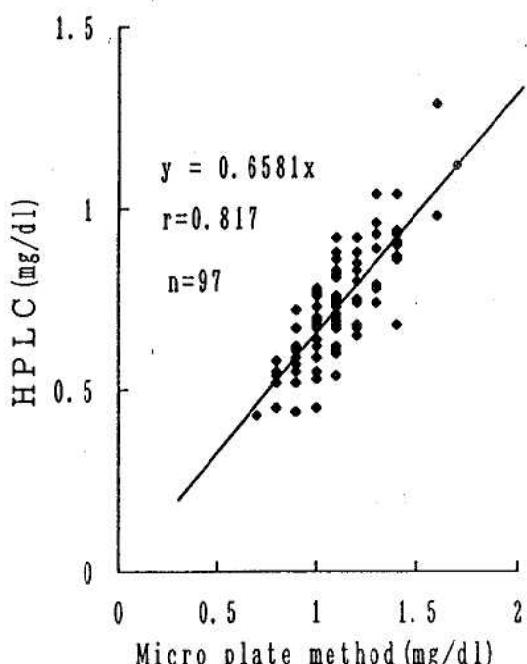


Fig. 10-2 Correlation of determinated concentration of Phe in sample disc between by HPLC and microplate method

Table 3 The levels of amino acids in blood of 97 normal neonates

Amino acid	HPLC	Mean \pm S.D. (mg/dl)
		Microplate method
Val	1.65 \pm 0.41	—
Met	0.36 \pm 0.17	0.34 \pm 0.22
Orn	1.94 \pm 0.69	—
Lys	2.03 \pm 0.45	—
Ile	0.81 \pm 0.23	—
Leu	1.57 \pm 0.37	—
Phe	0.73 \pm 0.16	1.10 \pm 0.19
BCAA	4.02 \pm 0.95	3.99 \pm 0.97

ト法測定値は異常な高値を示し、測定が困難であり、相関を求めるることはできなかった。但し、BIA用標準血液濾紙の表示値とHPLC測定値との間には高度の相関($r=0.994$ ($n=7$))が認められた。また、新生児検体を用いた場合、両法間の相関係数は0.461 ($n=85$)で高度の相関は得られなかった。

3. マススクリーニング検体への応用

3・1. 正常値調査

ガスリー法により異常の認められなかった新生児検体97検体について、本法により測定した全血中のアミノ酸濃度値をマイクロプレート法の結果と併せてTable 3に示した。本法による定量値の平均値はVal, Met, Orn, Lys, Ile, Leu及びPheの順に1.65, 0.36, 1.94, 2.03, 0.81, 1.57及び0.73mg/dlであった。

3・2. 先天性代謝異常患児のクロマトグラム

Fig.11-1及び11-2にそれぞれ正常児及びフェニルケトン尿症患児のクロマトグラムを示した。フェニルケトン尿症患児では正常児に比較し、Pheの著しい増加が認められた。

なお、同一カラムで少なくとも500回の分析は

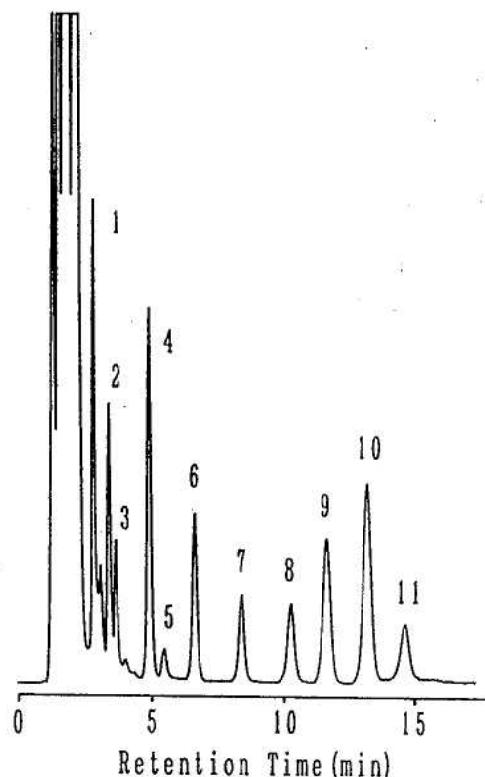


Fig. 11-1 Chromatogram of amino acids from normal blood numbers is described in Fig. 8-1.

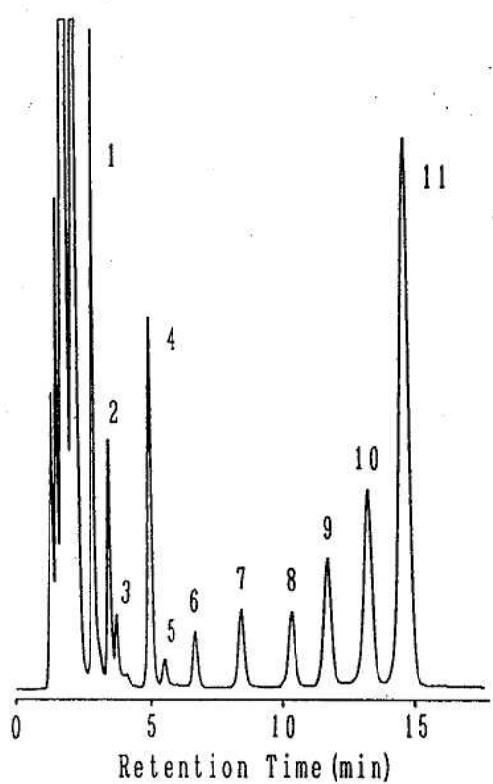


Fig. 11-2 Chromatogram of amino acids from phenylketonuria patient numbers is described in Fig. 8-1

可能であった。

考 察

AQC はアミノ酸と反応して極めて安定な誘導体を生成するため、優れたアミノ酸の蛍光ラベル化剤である。AQC は現在アミノ酸の HPLC 用試薬キットとして市販されているが、このキットは多種のアミノ酸をグラジエント分析することを目的としたものである。

本法では AQC をアイソクラティック分析に適用した。アイソクラティック分析はグラジエント分析に比較し、簡易な装置及び操作で、より高精度の分析が可能である。従って、日常的検査が必要な新生児マスククリーニング検査には好ましい分析法であると言える。しかし、これまで複数の

アミノ酸の同時分析条件の設定が困難なため、やむなくグラジエント分析が採用されてきたものと考えられる。今回、分析条件を検討した結果、アイソクラティック条件であっても Val, Met, Orn, Lys, Ile, Leu 及び Phe の 7 種のアミノ酸を約 15 分で分析できることを明らかにした。Tyr については移動相中のアトニトリル濃度を低くし、溶出時間を遅くすることで、分析可能ではあったが、今回は迅速分析を考慮し、分析対象から除外した。また、カラムに充填剤の粒子サイズが 3 μm である Develosil ODS-UG-3 (75 \times 4.6 mm i.d.) を用いることで、更に分析時間を短縮することは可能であった（未発表データ）。しかし、このカラムでは Orn と Lys のピークに僅かなテーリングが認められたため、今回は粒子サイズが 5 μm のカラムを用いた。今後、カラムの耐久性の比較を含め微小粒子カラムの実用性を検討する必要がある。なお、Leu のピークと保持時間がほぼ一致する僅かな妨害ピークが存在する場合があり、検討したところ、このピークの保持時間はメタノールの AQC 誘導体のピークと一致した。従って、血色素固定液の揮散は完全に行う必要があり注意を要する。

新生児検体を用い本法とマイクロプレート法を比較した実験では、BCAA では両方法の測定値はほぼ一致した。Phe はマイクロプレート法の方が HPLC より高値が得られ、その原因はマイクロプレート法で用いる酵素の基質特異性 [6, 7] に起因するものと推測された。なお、マイクロプレート法で BIA 用標準血液濾紙中の Met の測定を試みたところ、表示値より異常に高い値が得られ測定が困難であったことは、なんらかの濾紙中の夾雑物の影響と推測された。しかし、BIA 用標準濾紙の表示値と HPLC 測定値との間には良好な相関が認められることから、HPLC と BIA は良く相関することが示唆された。従って、新生児検体の Met 測定においてマイクロプレート法と HPLC の相関が良好でない原因はマイクロプレート法の精度に問題があるためと考えられた。

HPLC 法は直径 3 mm の血液濾紙 1 枚で複数の

平成9年10月1日

アミノ酸を同時分析できるため、採血量が少量で済むという利点もある。またHPLCは自動化が可能な分析法であるが、本法により更に自動化が容易になったと考えられる。

文 献

- 1) Ichihara N., Harada S., Arai J., Kizaki T., Kusunoki Y., Hamano Y., Ganno S. (1994). New Trends in Neonatal Screening, p.57-59, Hokkaido Univ. Press, Sapporo.
- 2) 阿部朋子, 鈴木恵美子, 成瀬浩, 丸野清 (1994).

- 日本マスクリーニング学会誌, 4, 141.
- 3) 村田理恵, 柴田実, 安倍昭子, 高野弘紀 (1995). 日本マスクリーニング学会誌, 5, 86.
- 4) 米田豊, 高橋雅子, 北村敬 (1997). 分析化学, 46, 89-94.
- 5) Cohen S. A., DeAntonis K., Michaud D. P. (1993). Techniques in Protein Chemistry, 289-298, Milford.
- 6) Asano Y., Nakazawa A., Endo K. et al (1987). Eur. J. Biochem. 168, 153-159.
- 7) Asano Y., Nakazawa A., Endo K. (1987). J. Biol. Chem. 262, 10346-10354.

デジタルカメラによる新生児マスクリーニング 検査培地画像の保管とその画像データベース化 による管理法

米田 豊 高橋 雅子

Management System of Agar Medium Picture for
Neonatal Screening Test by Digital Camera
and Computer System of Picture Database

Yutaka YONEDA and Masako TAKAHASHI

要 旨 先天性代謝異常検査（ガスリー法及びペイゲン法）の培地画像をデジタルカメラで撮影し、これを画像データベースとして保管管理する方法について検討を行い、その実用性を確認した。

新生児の先天性代謝異常検査では主に細菌生長阻止法（bacterial inhibition assay: BIA）が用いられてきた。BIA は検査の効率性及びコスト面では優れた方法であるが、細菌の発育パターンを観察して判定を行う方法のため、検査結果の保存を行い難く、また結果の数値化による管理を行い難い欠点がある。これらのことから、検査法は次第にマイクロプレート法や高速液体クロマトグラフィーなどへ移行しつつある。一方近年、画像処理の分野において新たな進展がみられており、特にデジタルカメラの普及にはめざましいものがある。デジタルカメラは画像記録をフィルムではなく、電子的に行うため、撮影後、直ちに画像を確認でき、また、画像をコンピュータ上で加工、解析並びに保管できる特徴がある。そこで今回、デジタルカメラで BIA 培地像を撮影し、保管管理する方法について検討を行った。

方 法

1. 使用機器及びソフトウエア

デジタルカメラ：チノン(株)製 ES-3000型（解像度 640×480pixel）

コンピュータ：富士通製 FMV-499D3 (CPU: DX4 100MHz, メモリ: 24M, OS: Windows 3.1) 及び NEC 製 PC9821 V12 (CPU: Pentium 120MHz, メモリ: 16M, OS: Windows95)

プリンタ：キャノン製 BJC-600J 及び NEC 製 PC-PR101/J180

データベースソフトウエア：(株)ソフトヴィジョン 製 DB Pro Ver3.2

2. 操作方法

1) 画像撮影

図 1 に示すように、フェニルケトン尿症、メイプルシロップ尿症、ホモシスチン尿症（以上はガスリー法）及びガラクトース血症（ペイゲン法）の検査用培地を培地観察台に載せ、その上部に三脚に固定したデジタルカメラを設置し明所で撮影した。

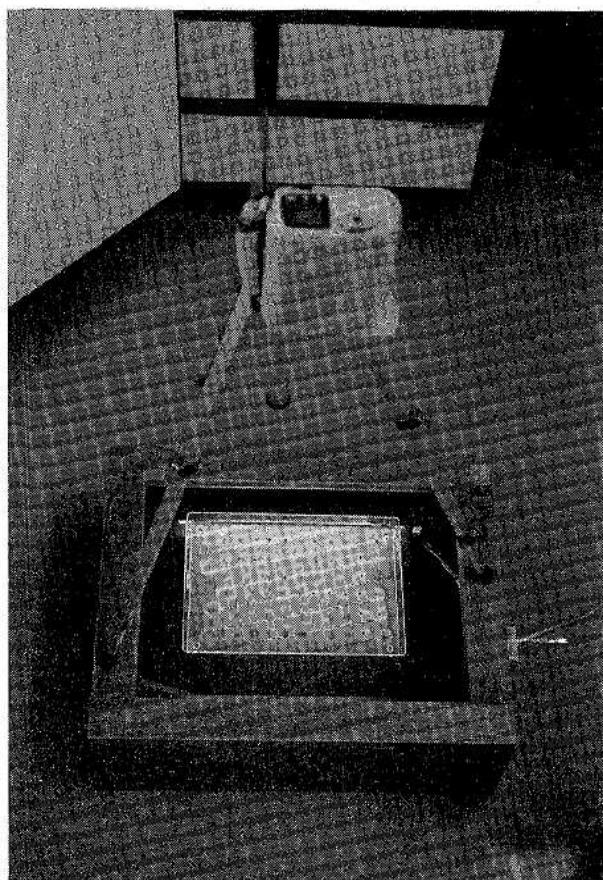


図1. セッティング写真

2) コンピュータカラー モードの設定

FMV-499D3では画面モード設定ユーティリティでカラー モードを65536色モードに、PC9821ではコントロールパネル内の画面プロパティー設定でTrue color モードに設定した。

3) 画像ファイルの転送

撮影後、ファイル転送ユーティリティーソフト(Image Acquisition Utility)を用い撮影画像ファイルをデジタルカメラからコンピュータへ転送した。転送方法にはシリアルポート経由でファイル転送を行う方法とメモリーカードを介して転送を行う方法があるが、今回は前者の方法により57600bpsの転送速度でファイル転送を行い、ハードディスクにビットマップ形式(BMP形式)で画像ファイルを保存した。

4) データベースソフトウェアの設定

DB Pro の表ファイルとして'd写真.dpt'、カ-

ドファイルとして'd写真.dpc'を作成した。

ア) 表ファイルの設定

図2に示すように'd写真.dpt'にはデータ項目として下記の項目を設定した。

[年月日]：検査年月日の入力項目。

[物質名]：検査物質名であるフェニルアラニン(PHE)、メチオニン(MET)、ロイシン(LEU)及びガラクトース(GAL)の別を入力する項目。

[撮影条件]：デジタルカメラの撮影時の画質モードであるノーマル(N)、ファイン(F)、スーパー ファイン(SF)の区別等の入力項目。

[先頭NO]：検体の先頭番号入力用

[最終NO]：検体の最終番号入力用

[GV]：画像ファイル名入力欄。例えば1996年4月1日に撮影したフェニルアラニンのプレート撮影像のファイル名は960401P.BMPとし、この項目に入力した。

なおこの項目の項目属性設定において、起動プロセスにグラフィックファイルビューウェアであるGV(飛田方作フリーウエア)を設定し、表形式編集時に当該項目に入力した画像ファイル名をダブルクリックすることにより、GVを自動起動できるよう設定した。

[ペイント]：[GV]と同様、画像ファイル名入力項目であるが、項目属性の起動プロセス欄にWindows 3.1の標準画像処理ソフトであるペイントブラシ(Windows 95ではペイント)を設定し、ペイントブラシを容易に起動できるようにした。なお、入力内容は[GV]と同一内容を入力した。

イ) カードファイルの設定

図3に示すように、カードには表ファイルの各項目、画像及び操作用のボタンを配置した。

操作用のボタンはカードめくりのための矢印ボタン、カード形式から表形式へ切り替えるためのボタン、カード形式による参照、編集を中止するクローズボタン及び終了用のボタンを配置した。

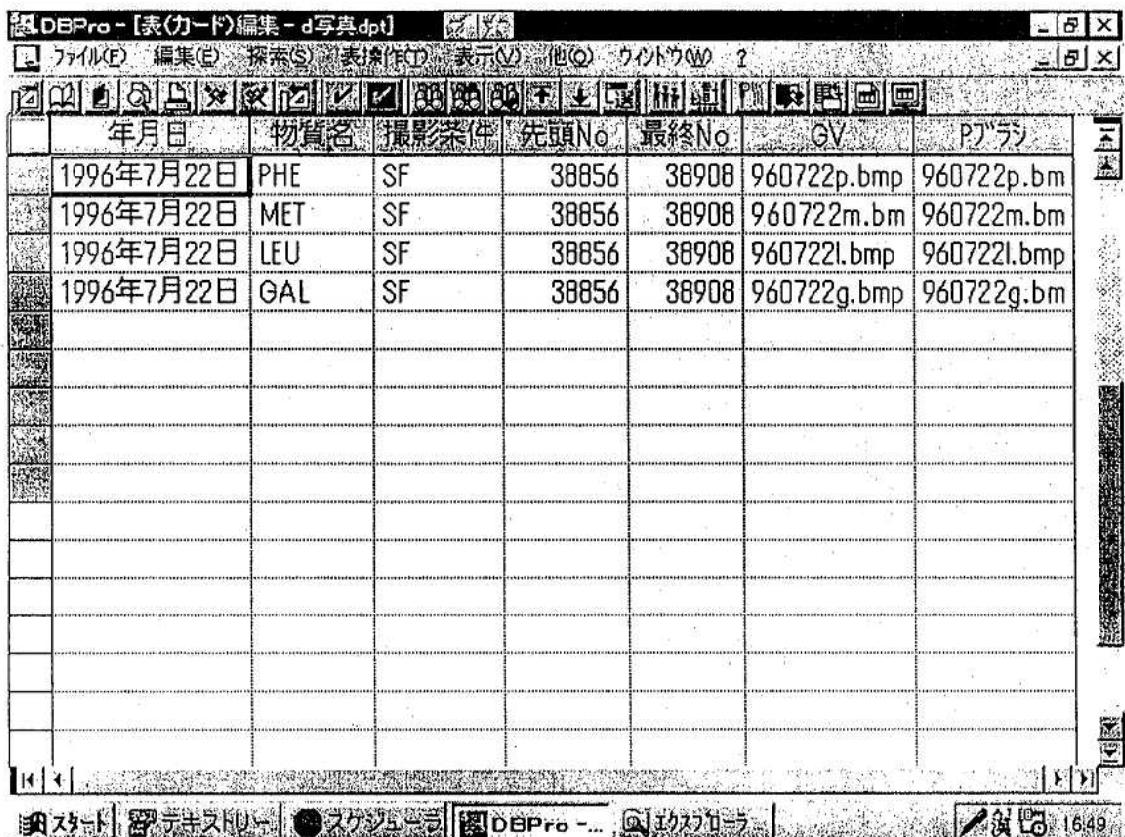


図2. 画像データベースソフトの表形式画面

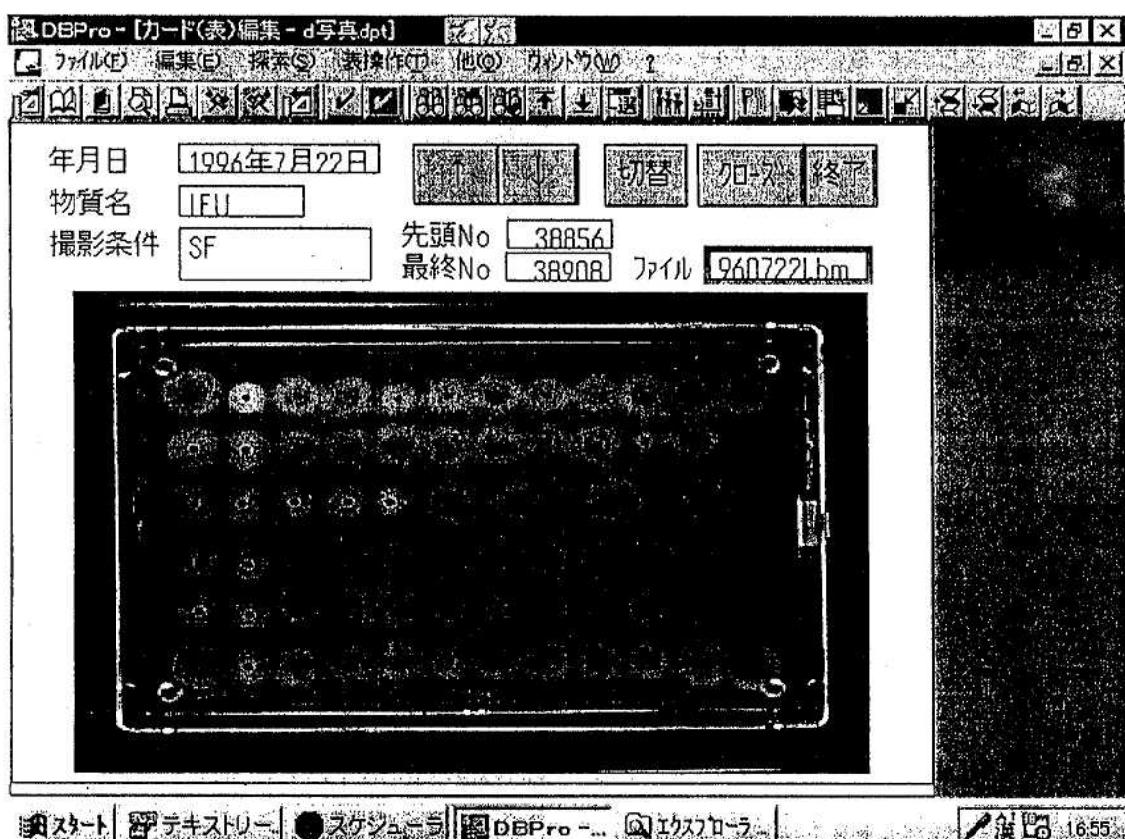


図3. 画像データベースソフトのカード形式画面

結 果

1. 画質

図4, 5, 6及び7にそれぞれフェニルアラニン、ロイシン、メチオニン及びガラクトースの検査用培地をデジタルカメラで撮影した画像を示した。ガスリー法の培地では観察台の光線の関係で、光源側のディスクの発育円がやや濃く写る傾向は見られるものの、概ね明瞭な画像が得られた。な

お、Windows 3.1とWindows 95のいずれの環境においても、ディスプレー上の画像で検査結果を判定することが可能であった。また、2機種のプリンターで印刷した画像においても同様に、共に判定可能であった。

2. ファイルサイズ

デジタルカメラの解像度がノーマルの場合、230454バイト、ファイン及びスーパーファインで

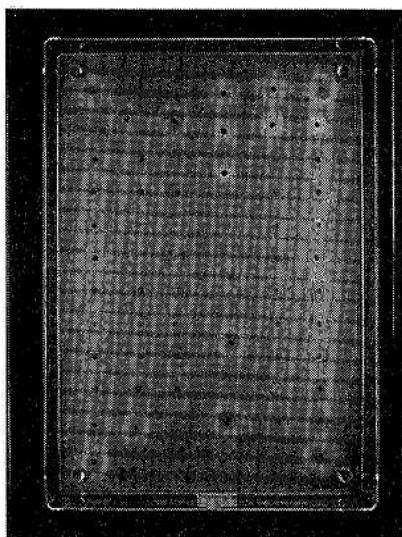


図4. フェニルアラニン検査培地の画像

画質モード：スーパーファイン

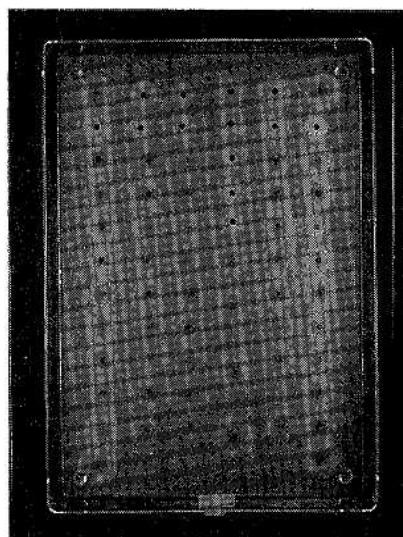


図5. ロイシン検査培地の画像

画質モード：スーパーファイン

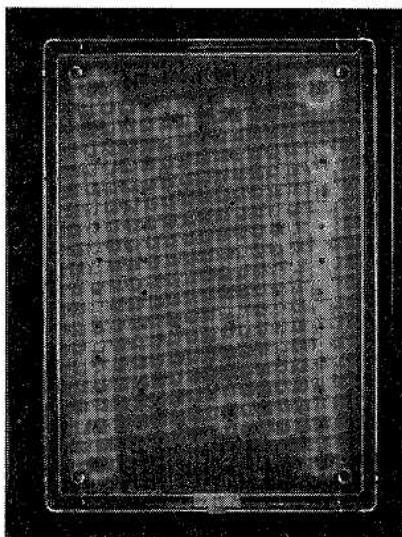


図6. メチオニン検査培地の画像

画質モード：スーパーファイン

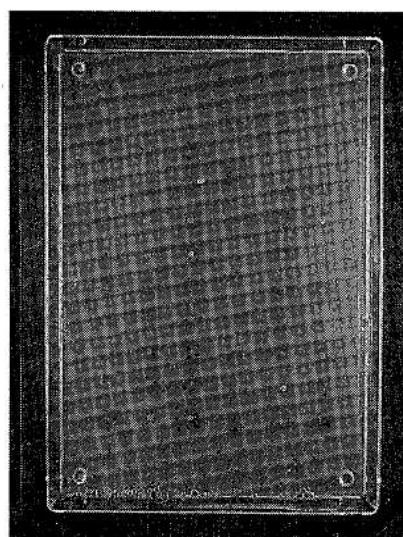


図7. ガラクトース検査培地の画像

画質モード：スーパーファイン

は共に921654バイトの画像ファイルが得られ、培地の発育円の観察にはスーパーファインモードが適切であった。

3. 処理時間

FMV-499D3 で画像の転送速度及び表示速度の比較を行った。スーパーファインモードで撮影した画像のイメージデータの転送に約40秒、そのファイル解凍に約15秒、ハードディスクへの保存に約5秒と合計約1分で1画像の転送が可能であった。画像表示速度に関しては、GV では約 8 秒、ペイントブラシでは約 2 秒、DB Pro の画像表示機能では約 2 秒であった。

従って、フェニルアラニン、ロイシン、メチオニン及びガラクトースの検査培地を各 2 枚ずつ記録する場合の処理時間は、撮影に約 5 分、画像ファイルのコンピュータへの転送に約 8 分、コンピュータ上のデータ整理作業に約 5 分を要した。

考 察

先天性代謝異常検査データの保管は異常あるいは異常の疑いのあるデータの管理に必要なだけでなく、正常と判定された検査データであっても、後に患児であることが判明した場合、検査結果の妥当性を証明する手段として必要である。特に BIA では、肉眼による判定のため、判定に熟練度や個人差が影響する恐れがある。従って、BIA の画像をそのまま記録することは有用と考えられる。

先天性代謝異常検査の培地画像を保存する方法として、寒天を乾燥し保管する方法、発育像をコピー機で複写する方法、スキャナーによる方法等が試みられているが、必ずしも満足できる方法とは言えない。今回検討したデジタルカメラを利用する方法では、良好な保存画像が得られ、コンピュータによる画像データベースとして管理することにより、十分な実用性が認められた。本システムは汎用コンピュータとデジタルカメラがあれば利用可能であるが、日常検査で用いる場合、画像ファイルの保存にハードディスクの他、光磁気ディスク (MO) 等、大量データを低成本で保存可能な記憶装置の導入が好ましいと思われる。ちなみに、230Mの容量を持つ MO を用いた場合の保存コストは 1 プレートあたり 4 円程度 (1000 円 / 250 プレート) になる。また、デジタルカメラからコンピュータへの画像ファイルの転送にメモリーカードを用いることでファイル転送時間の短縮が可能であり、更に、高精度の印刷が可能な昇華型プリンターなどの機器を導入することで、より管理を容易にすることが可能である。今後は、画像処理ソフトの導入により、発育像の解析を行い、検査判定を自動化するシステムへ発展させることも必要である。

謝 辞

本研究にあたり御助言をいただきました、杏林大学 成瀬 浩先生に深謝します。

ヒト染色体に関する調査研究－血液、骨髓液－ (平成8年度)

林 美貴子 本田 幸子 北村 敬

Chromosome Analysis of Human Blood
and Bone Marrow Cells

Mikiko HAYASHI, Sachiko HONDA
and Takashi KITAMURA

要旨 平成8年度の染色体検査受付件数は血液85人と骨髓液1人の計86人であり、うち血液の9人に染色体異常が見られた。検査受付時の依頼理由（主訴）は反復流産または習慣性流産が52人と最も多く、続いて不妊、ダウン症候群、18トリソミー症候群等であった。発見された染色体異常の内訳は、21トリソミー症候群2人、18トリソミー症候群2人、7番逆位保因者1人、7番逆位に由来する7p部分モノソミーと7q部分トリソミー1人、均衡転座型染色体保因者1人、羊水の確認のトリプルX1人と急性骨髓性白血病M7 1人の計9人であった。また、昭和48年度から平成8年度までに検査を行った1,301件（実人数1,282人）中1,269件（同1,259人）が検査可能であり、そのうち202人に染色体異常がみられたため、異常率は16.0%になった（実人数）。異常の内訳は常染色体異常173人、性染色体異常29人で、その主なものはダウン症候群（21トリソミー）99人、次いで、均衡転座型染色体保因者26人、ターナー症候群18人等であった。

最近のヒト染色体分析に関する技術は、従来の分染法の進歩に加え、クロモゾームペインティング法や、遺伝子診断技術の開発により著しく向上してきている。また、最近の染色体分析は先天異常児や流早産を繰り返す夫婦、白血病患者、悪性腫瘍組織、ハイリスク妊娠婦や流産組織等で行われている。さらに、遺伝相談の浸透、体外受精の普及によりその需要は年々高まってきている現状である。

当所では、富山県総合母子保健対策の一環として先天異常児の発生を予防する目的で、染色体異常の有無を検査し適正な指導を行うため、昭和48年度より染色体検査を行ってきた。

ここに、平成8年度の血液と骨髓液の染色体検査の内容とともに、過去24年間に検査を行った1,

301件の検査内容についても報告する。

実施方法

平成8年度の染色体依頼検査件数は血液85件（人）、骨髓液1件（人）の計86件（人）であった。殆ど県内の病院よりの依頼で、その病院別内訳については表1に示したとおりである。

検査方法は通常の方法にしたがったが、その詳細については既報のとおりである[1]。ブルーム症候群の疑いの検体に行った姉妹染色分体交換法については既報のとおりである[2]。

クロモゾームペインティング法は前川らの方法[3]にしたがった。

表1. 検査依頼病院内訳（昭和48～平成8年度）

県別	病院名	年 度	
		H.8	S.48～H.8
県内	県立中央病院	61	694(5)
	富山赤十字病院	8(1)	217(38)
	高志学園	2	89
	富山市民病院		75
	富山医科薬科大学	5	59
	厚生連高岡病院		17
	富山保健所		17
	砺波総合病院		11
	富山通信病院		9
	済生会富山病院		6
	国立富山病院	1	7
	社会保険高岡病院		2
	黒部市民病院		2
	済生会高岡病院		2
	富山労災病院		2
	厚生連滑川病院		2
	氷見市民病院	4	6
	小杉保健所		1
	他	1	25
	小計(件)	82(1)	1,243(43)
県外	国立金沢病院		42
	福井愛育病院	3	12
	珠洲市立総合病院	1	2
	他		2
	小計(件)	4	58
	計(件)	86(1)	1,301(43)

() : 骨髓液

結 果

昭和48年度から平成8年度までの血液、骨髓液の染色体検査受付状況について表2に示した。平成8年度は血液85件(人)、骨髓液1件(人)の計86件(人)であった。また、昭和48年度からの合計件数は血液1,258件、骨髓液43件の計1,301件

になったが、白血病等の血液疾患による重複分19件を除くと、実人数は血液1,244人、骨髓液38人の計1,282人であった。

平成8年度の検査受付時の依頼理由と染色体異常の有無等について表3に示したが、依頼理由の主なものは、血液では、反復流産が52人と最も多く、次いで不妊14人等であった。そのうち、染色体異常が発見されたのはダウント症候群2人、18トリソミー症候群2人、7番逆位保因者1人、7番逆位に由来する7p部分モノソミーと7q部分トリソミー1人、均衡転座型染色体保因者1人、羊水の確認のトリプルX1人と急性骨髓性白血病M71人の計9人であった。(表4)。

依頼理由のうち最も多かった、反復流産または習慣性流産の原因検索を主訴として検査を行った52人(26組夫婦)中1人が均衡転座型染色体保因者であり、その核型は46, XY, t(4;18)(q31.3; q21.3)であり、自然流産2回の経歴があった(表4中の症例1、図1)。4番染色体への転座が小さく18番染色体のクロモゾームペインティング法にて確認した。

ダウント症候群の疑い2人ともに21トリソミーであった。表4中の症例2は母31歳、父33歳の第1子として、在胎38週4日にて出生し、出生時体重3,366g、身長49cm、特有の顔貌、内眼角贅皮、眼裂斜位、扁平な鼻、第5指单一屈曲線等を示した。症例3は母32歳、父34歳の第2子として在胎36週に帝王切開にて出生し、出生時体重2,394g、身長46cm、特有の顔貌、両眼隔離、眼裂斜位、エピカンサス、耳介位置異常、鞍鼻、鼻根扁平、硬口蓋高位、心奇形、鎖肛、筋緊張低下、猿線等を示した。さらに、この症例の両親の妊娠歴をみると、3回の自然流産があり、さらに第1子はPrader-Willi症候群(男子)であった。Prader-Willi症候群と21トリソミー症候群の関連性についてはわからなかった。

18トリソミー症候群の疑い2人ともに47, XX, +18の女児であった。症例4は母31歳、父29歳の第2子として、妊娠39週にて出生し、出生時体重1,600gと著しい子宮内発育不全が認められた。妊娠26週から子宮内発育遅延があり、羊水過多も認

表2. 検査受付状況（昭和48～平成8年度）

年 度	血 液			骨 髓 液			合 計		
	受付数	不能数 ^{*1}	異常数 ^{*2}	受付数	不能数 ^{*1}	異常数 ^{*2}	受付数	不能数 ^{*1}	異常数 ^{*2}
昭和48～昭和52	199	5	48	1		1	200	5	49
昭和53～昭和57	261	9	51	1	1		262	10	51
昭和58～昭和62	188	5	40	4	1	2	192	6	42
昭和63～平成4	297	4	33	32	5	5	329	9	38
平成5	89	1	9	1			90	1	9
平成6	63		6	1			64		5
平成7	76		2	2			78		2
平成8	85		9	1	1		86	1	9
計(件)	1,258	24	198	43	8	8	1,301	32	205

^{*1} 染色体分析不能数^{*2} 染色体異常有数

表3. 染色体検査内容（平成8年度）

依頼理由	検査数	判定数	異常数
血液	85	85	9
内訳			
流産を繰り返す	52	52	1
不妊	14	14	0
ダウン症候群	2	2	2
18トリソミー症候群	2	2	2
多発奇形	2	2	0
低身長	2	2	0
難聴等	2	2	0
特徴的顔貌等	1	1	1
逆位保因者	1	1	1
精神発育遅延	1	1	0
子宮内発育不全	1	1	0
続発性無月経	1	1	0
羊水の確認	1	1	1
白血病(M7)	1	1	1
ブルーム症候群の疑い	1	1	0
全身倦怠	1	1	0

表3. つづき

骨 髓 液	1	0	0
本態性血小板血症	1	0	0
計(件)	86	85	9

められた。臨床症状は耳介低位・低形成、小顎症、両手指の重なり、足親指短小、陰核肥大、完全型心内膜欠損症等であった。症例5は心奇形、小脳低形成の認められた妊娠34週の胎児の血液であった。母35歳、父32歳の第2子であり、途中1回の自然流産の既往があった。

症例6は家系内に3人のダウン症候群がいるという妊娠30週の本人からの訴えにより、羊水検査とともに本人血液の検査を行ったところ、46, XX, inv (7) (p22q34) の7番染色体逆位保因者であった。ダウン症候群といわれているのは本人

表4. 染色体異常の内訳（平成8年度）

症例	疾患名	核型	主要症状等
血液			
No. 1 均衡転座保因者		46, XX, t(4;18) (q31.3;q21.3)	自然流産2回
2 ダウン症候群		47, XY, +21	内眼角贅皮, 眼剣裂斜上, 猿線
3 ダウン症候群		47, XY, +21	前子Prader-Willi症候群, 顔貌
4 18トリソミー症候群		47, XX, +18	小顎症, 耳介低位・低形成
5 18トリソミー症候群		47, XX, +18	胎児血液(34w), 心奇形
6 7番逆位保因者		46, XX, inv(7) (p22q34)	家系内に染色体異常?有り
7 7番逆位由来7pトリソミー		46, XY, rec(7) dup(7p) inv(7) (p22q34)	特有の顔貌, 眉間突出, 口唇裂, および7qモノソミー
8 トリプルX		47, XXX	心奇形, 外表奇形無し
9 急性骨髓性白血病(M7)	46, XX, -7, del(12p), +m等		貧血, 高身長

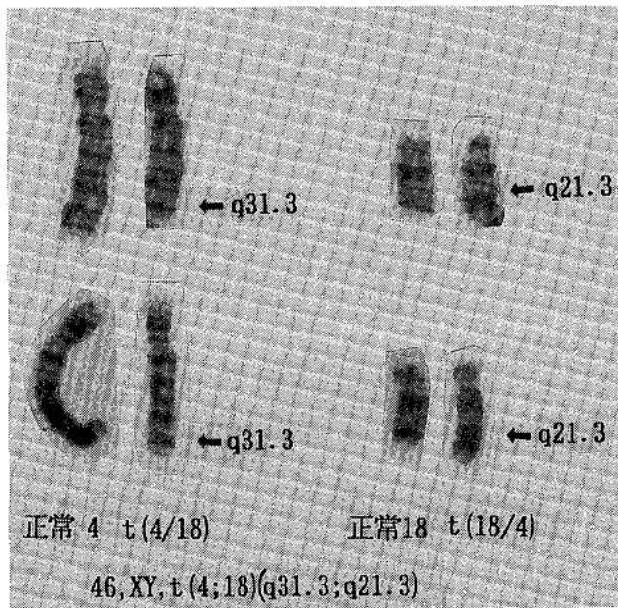


図1. 症例1の部分核型

の弟と母方のいとこ2人であった。弟(症例7)の検査も行ったところ、46, XY, rec(7) dup(7p) inv(ppter→q34 : p22→pter)の核型を示し、ダウン症候群ではなく7p部分トリソミーと7q部分モノソミーによるものであった(図2)。これは症例6, 7の母由来と考えられたが、母や他の家族については未検査である。逆位染色体からは次世代に複雑に遺伝する可能性があり、染色体核型・症状ともに複雑になると考えられる。症例7の臨床症状として、21歳男性、重度の精神発育遅延、低身長(130cm, 22.1kg)、歩行可能、発語・言語理解なし、おとなしく人なつっこい、特有の顔貌、眉間の突出、低い鼻根・鼻背、口唇裂、口蓋裂、上顎の歯は大臼歯のみ、大きい耳等で、四肢、心臓に奇形は認められなかった。

症例8は羊水検査にて47, XXXであったが妊娠続行し、出生した児について確認の検査を行ったところ、同じ核型を示した。外表面形は認められなかつたが、心奇形が認められた。

貧血が認められ、慢性骨髓性白血病(巨核芽球

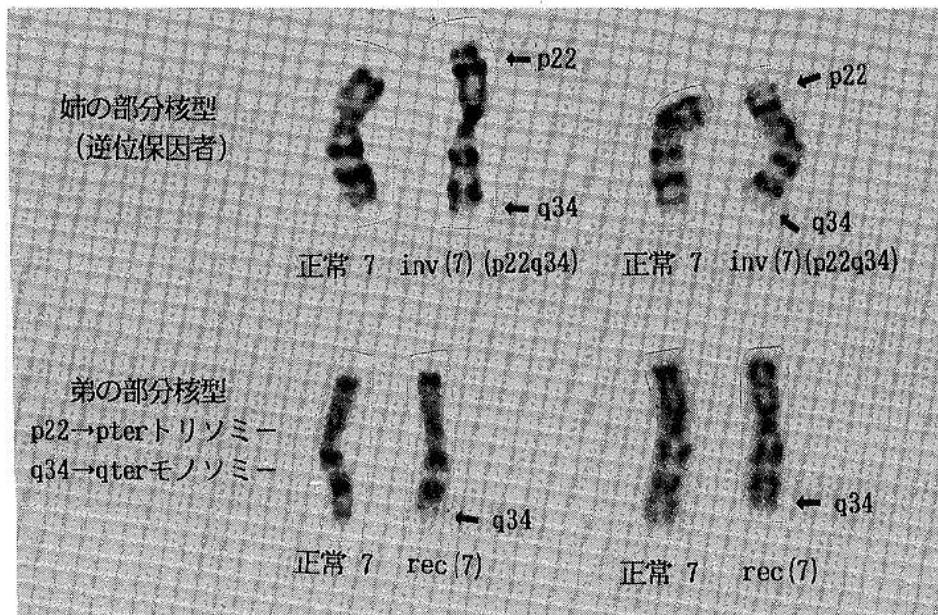


図2. 症例6（上）および症例7（下）の部分核型

性) M7と診断された症例9はPHA培養で46, XX, -7, del(12p), +mを主な核型とした。

他の依頼理由で行ったものについて染色体異常は発見されなかった。

また、不妊の依頼理由の殆どは体外受精に関するものであり、体外受精の普及により増加した。

強い子宮内発育遅延等からブルーム症候群を疑われた症例について姉妹染色分体交換頻度の増加を検討した。その頻度は症例では細胞当たり6.3±2.4、同じく対照では6.9±2.5であり、その間に差は認められなかった。

検査可能であった85件中7件にde novoと思われる染色体異常が各1細胞/観察細胞20~100個中存在したがその由来については判明できなかつた。

表5に昭和48年度から平成8年度までに検査を行った1,282人（実人数）の依頼理由と染色体異常の有無等についてまとめて示した。検査可能であった1,259人中202人に染色体異常（異常率16.0%）がみられた。依頼理由のなかで最も多かったのは流産を繰り返す（1~6回を含む）の397人であり、次いで染色体異常が確認された者の家族、ダウン症候群の疑い、先天奇形などであった。また、染色体異常率の高い主なものをあげると13ト

リソミー症候群の疑い100%，18トリソミー症候群の疑い92.3%，クラインフェルター症候群の疑い83.3%，ダウン症候群の疑い79.8%，ターナー症候群の疑い63.6%などであった。染色体異常の内訳については表6に常染色体異常の内訳（異常率13.7%）、および表7に性染色体異常の内訳（異常率2.3%）を示した。

常染色体異常のなかではダウン症候群が最も多く、57.2%をしめ、以下、均衡転座保因者が15.0%，白血病等約8.7%，18トリソミー症候群約7.5%等であった。

一方、性染色体異常のなかではターナー症候群が62.1%，クラインフェルター症候群が20.7%をしめた。

考 察

今年度受付けた86人のうち9人が染色体異常であり、単純に異常率を計算すると10.5%であったが、当所において過去23年間に検査を行った1,282人（実人数）中、検査が可能であったのは1,259人で、うち202人に染色体異常が認められ、異常率は16.0%であった。これは検査対象者の約

表5. 染色体検査結果一覧（実人数*）（昭和48～平成8年度）

依頼理由	検査数	判定数	異常有数	その他*
血液				
流産を繰り返す	397	396	19	6
家族（染色体異常があった人の）	144	144	8	
ダウン（21トリソミー）症候群の疑い	126	124	99	
先天奇形	98	93	9	
家族（染色体異常が無かった人の）	85	85	0	
発育不良、発育遅延	46	46	1	2
白血病	39	34	6	
無月経	30	30	2	
ターナー症候群の疑い	22	22	14	5
低身長	22	22	0	
不妊	18	18	0	1
半陰陽	13	11	3	
18トリソミー症候群の疑い	13	13	12	
胎児血液	11	11	1	
心臓病	9	9	1	
腫瘍・鎖骨	7	7	0	
性染色体異常の疑い	6	6	0	
クラインフェルター症候群の疑い	6	6	5	
猫なき症候群（5p部分モノソミー）の疑い	6	6	1	
13(D)トリソミー症候群の疑い	4	4	4	
脆弱X染色体症候群の疑い	4	4	0	
副腎性器症候群の疑い	4	4	1	
生理不順	3	3	1	
プラダード・ウイリー症候群の疑い	3	3	1	
ファンコニー貧血	1	1	1	1
色素性乾皮症	1	1	1	
その他	126	123	3	
小計	1,244	1,226	193	15
骨髄液				
白血病等	38	33	9	
計(人)	1,282	1,259	202	15

実人数*：白血病等の理由による再検査は除く

その他*：9番染色体逆位保因者、睾丸性女性化症候群

表6. 常染色体異常と主な核型

疾患名	人数	主な核型
ダウン症候群	99	
(トリソミー型 94)		47,XY,+21 47,XX,+21
(モザイク型 3)		46,XY/47,XY,+21
(転座型 3)		46,XX,-13,+t(13;21) 46,XX,-21,+t(21;21)
18トリソミー症候群	13	
(トリソミー型 11)		47,XY,+18 47,XX,+18
(転座型 1)		46,XX,-18,+iso psu dic(18) (p113)
(モザイク型 1)		46,XX/46,XX,-18,+dic(18)
13トリソミー症候群等	4	
(トリソミー型 2)		47,XY,+13 47,XX,+D
(モザイク型 1)		46,XX/47,XX,+D
(転座型 2)		47,XY,-13,+t(13;13)
13リング症候群等	2	46,XX,r(13) 46,XX,r(D)
9pトリソミー症候群	2	46,XX,t(9;21) 46,XY,-9,-12,+iso(9p),+der(12)
2pトリソミー	1	46,XY,t(2;17)
猫なき症候群(5p部分モノソミー)	1	46,XX,del(5) (qter → p14:)
7pトリソミー+7qモノソミー	1	46,XY,rec(7) dup(7p) inv(7) (p22q34)
プラダード・ウイリー症候群	1	46,XX,del(15) (q11.1q12)
由来不明部分過剰	5	47,XY,+mar 46,XX,t(9;?) 47,XX,+mar
均衡転座保因者	26	45,XX,t(14;21) 45,XX,t(13;15) 45,XX,t(13;21) 46,XY,t(1;7) 46,XY,t(2;17) 46,XX,t(9;21)
逆位保因者	1	46,XX,inv(7) (p22q34)
ファンコニー貧血	1	切断、ギャップが多い
白血病	15	46,XY,t(9;22) (q34;q11) 46,XX/46,XX,Ph ¹⁺ 47,XX,+19 47,XXX,t(4;11) 48,XX,+21,+mar
悪性腫瘍を持つ	1	不特定の染色体異常を持つ
計 (人)	173	

(173人/1,259人 全体に占める異常率13.7%)

表7. 性染色体異常と主な核型

疾患名	人数	主な核型
クラインフェルター症候群	6	
(トリソミー型 5)		47,XXY
(モザイク型 1)		46,XY/47,XXY
ターナー症候群	18	
(モノソミー型 5)		45,X
(モザイク型 13)		45,X/46,XX 45,X/47,XXX 45,X/46,X,r(X) 45,X/46,X,del(X)
トリプルX(超女性)	2	47,XXX
半陰陽	3	45,X/46,XY
計 (人)	29	

(29人/1,259人 全体に占める異常率2.3%)

6人に1人は何らかの染色体異常を有していたことになった。これは新生児集団中の染色体異常率0.6%に比較すると、非常に高率になるが、染色体検査は臨床像、家族歴等から異常の疑いの高い例を検査対象としているためである。

最近の依頼理由の傾向として最も多いのは反復流産を理由としたものであり、近年増加傾向にある。過去に当所で、妊娠初期に自然流産を繰り返す理由で検査を行ったのは397人（判定396人）になり、そのうち19人に染色体異常が発見され、異常率は4.8%になった。さらに夫婦単位別にみると192組の夫婦中18組に染色体異常が発見され、夫婦単位の染色体異常率は9.4%つまり約10組の夫婦に対して1組の割合で染色体異常が発見されたことになった（表5）。表8にその19人の染色体核型を表したが、トリプルX 1人と由来不明部

分過剰染色体保有者1人を除いて、他は均衡転座型染色体保因者であった。染色体異常は夫9人、妻10人のほぼ男女同数であり、従来いわれているような習慣性流産の場合には男性よりも女性の方に染色体均衡転座保因者がが多い〔4〕ということは認められなかった。そのため、反復流産の原因検索のため染色体検査を受ける場合夫婦ともに行なうことが望ましいと考えられた。また、上記の396人中6人（1.5%）に9番染色体逆位が発見された。この、9番染色体逆位は正常変異といわれ、染色体異常としては発見しないとされている。さらに、従来、習慣性流産との関係は否定的であった。しかし、我々が検査を行った全例中の0.95%に比較するとやや多いと思われた。

一般に、出生児の約0.6%が何らかの染色体異常を有することが報告されている。これを富山県

表8. 染色体異常のあった習慣性流産患者18例の核型と既応歴

	核 型	既 応 歴
夫	① 45,XY,t(13q14q)	2回流産
	② 46,XY,t(1;4) (q11;p15.2)	2回流産
	③ 46,XY,t(1;7) (q45;q11)	3回流産
	④ 46,XY,t(1;12) (q425;p13)	3回流産
	⑤ 46,XY,inv(9) (p11q13), t(4;10) (q31;q25)	3回流産
	⑥ 46,XY,t(4;18) (q31.3;q21.3)	2回流産
	⑦ 46,XY,t(5;16) (p13;p13)	3回流産, 2回生産
	⑧ 46,XY,t(8;14) (p11;q32)	4回流産
	⑨ 46,XY,t(8;21) (q24.2;q21.2)	4回流産
	-----	-----
妻	① 45,XX,t(13q14q)	3回流産
	② 45,XX,t(13q21q)	2回流産
	③ 46,XX,t(1;15) (q42;q26)	2回流産
	④ 46,XX,t(3;4) (p13;p16)	3回流産
	⑤ 46,XX,t(3;10) (q29;q22)	3回流産
	⑥ 46,XX,t(7;20) (p23.1;q11.2)	3回流産
	⑦ 46,XX,t(8;15) (q11.2;q26.1)	2回流産, 1回死産
	⑧ 46,XX,t(10;18) (q23;q11.2)	3回流産
	⑨ 47,XXX	2回流産, 1回胎児死亡
	⑩ 47,XX,+mar	2回流産

の場合に単純に当てはめると、最近の年間出生数は約1.1万人であることから、60余人の染色体異常児が毎年生まれ、生存可能な場合は年々加算されていくことになる。このことは、出生率の低下が問題になってきている少産時代の現在では、母子衛生上、かなり大きな比重を占めると考えられる。その中には、ターナー症候群等の性染色体異常の様に、新生児期に判別できない場合が多く、思春期になって初めて疑われるものや、均衡転座染色体保因者の様に反復流産等の症状を示して始めて染色体検査の適応になるものも含まれる。さらに、最近、検査数が増加している白血病のための診断検査を含めると染色体検査に対する需要は年々増加している現状である。その需要に追いつくためには分析技術の開発・導入や人材の確保、画像解析装置などの機器の導入が必要とされている。

出生前診断など遺伝相談を行う際、発端者以外の染色体検査が重要になって来るにもかかわらず、実際には複雑な家庭環境などから行われていないことが多い。実際、均衡転座型保因者が見つかった場合、その家系の染色体検査を進めて行くことは困難である。このように、染色体検査結果の報告は、患者とその家族に大きな影響をあたえると考えられ、秘密保持への配慮や、検査自体の正確さが要求される。

末梢血液を用いた通常の染色体検査では一部の

リンパ球の染色体構成を観察しているにすぎないため、モザイクの一部を見逃している可能性を否定できない。また、顕微鏡で観察しているための検出限界もある。そのため、臨床診断と検査結果が一致しない場合は、観察数の増加、他組織の検査や再検査を実施するとともに、DNA診断技術と併せた判断が必要となってくるであろうと考えられるため、今後、一層、臨床側との連係プレーが大切であると考えられる。

謝辞：各症例の臨床像の提供と採血等について御協力頂きました各病院の関係の方々に深く感謝いたします。

文 献

1. 林美貴子、本田幸子、柏樹久雄（1993）。富山衛研年報、16, 44-55。
2. 林美貴子、本田幸子、大中正光、山上孝司、成瀬優知、鏡森定信（1995）。北陸公衛誌、22 (1), 35-41。
3. 前川雅彦、新宅香織、山下達雄（1997）。臨床FISHプロトコール、79-84。秀潤社。
4. Bourrouillou, G., Colombies, P. and Dastugue, N. (1986). Hum. Genet., 74, 399-401.

ヒト染色体に関する調査研究 －羊水・流産胎児－ (平成8年度)

本田 幸子 林 美貴子 北村 敬

Chromosome Analysis of Amniotic Fluid Cells
and Fetal Cells

Sachiko HONDA, Mikiko HAYASHI
and Takashi KITAMURA

要 旨 平成8年度の羊水および自然流産胎児の染色体の検査は、受付件数が羊水73件、流産胎児8件で、昭和49年度から併せると、羊水819件、流産胎児89件となった。検査の結果、今年度は染色体異常が羊水に4件(47, XX, +13, 45, X0/46, XY, 47, XY, +18, 47, XXX)、流産胎児に3件(47, XX, +16, 47, XY, +10/46, XY, 92, XXYY)であった。羊水では全年度で33件の異常がみられ、流産胎児では27件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、染色体異常児出産既往、羊水過多等が多かった。

近年の女性の高学歴、社会進出による晩婚化、少産傾向、高齢妊娠の増加等により、羊水の染色体検査等の出生前診断の需要はますます増加している。しかしその反面、一部を除き、ほとんどが治療困難であり、また診断結果の信頼性や、社会的、倫理的な問題が残されている。富山県においては、昭和48年度から、富山県総合母子保健対策の一環として、染色体検査事業が実施され、当研究所においては、48年度から血液による検査が始まり、49年度からは羊水、さらに50年度からは自然流産胎児組織、絨毛組織等が加わり、染色体検査が行われてきた。ここに平成8年度の羊水、流産胎児の検査結果とともに、昭和49年度からの結果をまとめ、報告する。

実 施 方 法

1. 羊水

染色体標本作成法は、羊水10ml以上を静置後、沈澱した細胞に培養液(チャン培地)を加え再浮遊し、シャーレ(35mm)2枚以上になるようにし、炭酸ガス培養を行った。5~7日間静置培養後、倒立顕微鏡で細胞の増殖状況を観察し、適当な時期に培養液の交換を行い、コロニーの増大を待ち、分裂中期の細胞が多いことを確認してコルセミド処理を行った。トリプシン液で細胞を遊離後、遠心分離し、細胞を集め、低張処理(0.075M塩化カリウム3:0.9%クエン酸ナトリウム1)を行った。固定液(カルノア液)は2回交換し、パストールピペットでスライド上に滴下し、蒸気乾燥した。染色は通常のギムザ染色およびGバンド分染を行い、必要により、Cバンド法によ

る分染も行った。1検体につき10個以上の中期核板の顕微鏡写真を撮り、判定した。

2. 自然流産胎児

検体はおもに流産胎児の皮膚、肺等の組織、および胎児の付属物として、絨毛、羊膜等の組織であった。これらは、大きさによりハサミで細切し、シャーレ(Plastic petri dish 35×10mm)の上に並べ、培養液を添加し、培養を行った。小さな組織片はピペットで攪拌し、細胞懸濁液を作り、それをシャーレに分注し、同様に培養した。培養液はChang培地を用い、炭酸ガス培養を行った。倒立顕微鏡下で細胞の増殖状況を観察しながら、適当な時期に培養液の交換を行った。以下は羊水細胞と同様の方法で標本作成を行い、染色体分析を行った。

結果および考察

1. 羊水

今年度依頼された検体は、ほとんどが富山県の医療施設の産婦人科からで、そのほか石川県、福井県、新潟県からとなっている。受付件数は73件(受付総件数:819件)で、全て染色体分析が可能であった。表1に年度別の受付件数、染色体異常数等の検査状況を示した。平成8年度および検査開始時から平成8年度までの検査依頼の適応理由(主訴)とその検査結果は表2に示したが、今年度は下記の染色体異常4件(症例1~4)がみられた。

症例1: 検査依頼の理由は、知人にダウン症がいるため心配であるという本人の強い要望であった。今回が3回目の妊娠で、母親の年齢は31歳、今回が3回目の妊娠で、羊水の採取時は妊娠18週

表1. 検査状況(昭和49~平成8年度)

年度	受付数		分析不能数		分析数		異常数	
	羊水	胎児	羊水	胎児	羊水	胎児	羊水	胎児
昭和49	1		0		1		1	
50	5	3	2	1	3	2	0	
51	8	4	0	2	8	2	0	
52	1	2	1	1	0	1	0	
53	10	1	1		9	1	1	1
54	15	1	1	1	14		2	
55	16		2		14		0	
56	23	7	5	1	18	6	3(1)	5
57	32	2	6	1	26	1	1	
58	26	1	4		22	1	0	
59	37	2	1	1	36	1	1	1
60	66	1	2		64	1	0	
61	59	2	3	1	56	1	1	
62	40	1	1		39	1	0(1)	
63	65	3	8	2	57	1	0	1
平成元	48	7	3	2	45	5	4(2)	
2	43	1	0		43	1	1	1
3	33	5	1		32	5	1	1
4	41	10	1	2	40	8	2	5
5	46	9	0	2	46	7	1	4
6	61	7	2	3	59	4	6	
7	70	12	1	2	69	10	4	4
8	73	8	0	3	73	5	4	3
計(件)	819	89	45	25	774	64	33(4)	27

() モザイク等

表2. 羊水検査の依頼理由とその結果（昭和49～平成8年度）

理由（主訴）	昭和49～平成8年度			平成8年度			染色体異常の核型
	受付数	分析数	異常数	受付数	分析数	異常数	
高齢妊娠	430	415	5(3*)	47	47	1	47, XX, +18, 47, XX, +13/46, XX, (46, XX, inv(9)/46, XX), 46, XX, -18p, 47, XY, +21/46, XY
羊水過多症	32	29	7	5	5	2	47, XX, +E, 47, XX, +D, 46, XX, iso psu dic(18)
親類にダウン症や障害児がいる	32	31	(1*)	7	7	2	47, XX, +21; 24, 47, XY, +13, 47, XX, +18
死産希望	18	16	2	2	2	1	(46, XX/47, XX,+2)
本邦入の時、あるいは他の遗传病で感嘆する	19	9	1	2	2	1	69, XX, 46, XX, t(5;6) (q31;p23)
頭髄瘤、アマ接種、体外受精	4	3	1	1	1	1	46, XY/45, X0
その他	2	2	1	1	1	1	
不明	9	6	1	1	1	1	
13	9	1					
親が染色体異常を保有							
D/G	5	5	2				45, XY, t(14q21q), 46, XX, -D, +t (DqGq)
D/D	3	3	2				45, XX, t(13q15q), 21
inv 3	2	1	1				46, XX, inv(3)
3/4	1	1	1				
7/14	1	1	1				
2/17	1	1	1				46, XX, t(2;17) (p23;q25)
父 1/12, 母 13/14	1	1	1				46, XX, t(1;12) (q42;p13)
父親に 9P- の疑い	1	1	1				
母親に XX/XXX の疑い	1	1	1				
染色体異常出産既往							
トリソミー型	118	113	3				47, XX, +G : 2 件、 47, XY, +E
転座型	1	1					
18トリソミー	12	12					
13トリソミー	3	3					
21トリソミー	1	1					
その他	14	14	2				
胎兒異常の疑い							
脛骨性水腫	11	10	2	1	1	1	45, X, 47, XY, +18
脛骨性水腫	7	7	4				47, XX, +21 : 2件、 45, X, 47, XX, +M
脛骨性水腫	4	4					
その他 (奇形等)	4	3	1	2	2	2	47, XY, +18
前子が異常 (染色体異常を除く)	28	25	1				
脛骨性水腫	6	5	1				
脛骨性水腫	4	2					
その他 (奇形等)	31	29					
計 (件)	819	774	33(4*)	73	73	4	

(*) : モザイク等、

であった。過去に流産歴はない。核型分析の結果45, XO/46, XYのモザイクの核型が得られた。その割合は、45:46=15:11であった。その後、人工流産をし、胎児には外陰部の異常が見られたが、核型の確認はされていない。

症例2：検査依頼の理由は、40歳の高齢妊娠で、今回が2回目の妊娠であった。女児1人があり、過去に流産歴はない。羊水の採取時は妊娠17週であった。核型分析の結果、47, XXXのトリプルXであることが判明した。2回目の羊水採取、再検査の希望があり、その結果も同様の核型が得られた。またGバンド法と同時に、クロモゾームペインティング法も併用し、Xの確認を行った。生まれた女児の血液による染色体検査を行ったところ、羊水と同様、47, XXXの結果が得られた。女児には外表の異常は見られなかったが、心奇形があった。

症例3：検査依頼の理由は26週頃からの羊水過多で、超音波診断において、胎児発育遅延、心奇形、食道閉鎖が認められた。母親の年齢は24歳、父親は25歳で、羊水の採取時は妊娠31週であった。核型分析の結果、47, XY, +18の核型が得られた。その後、胎児は死産となり、胎児には関節拘縮、小顎症、二分脊椎等の外表奇形が見られた。

症例4：検査依頼の理由は、羊水過多が見られ、母体血清のAFP低値のために、今回が3回目の妊娠であった。女児1人があり、過去に流産歴が1回ある。母親の年齢は35歳、羊水の採取時は妊娠32週であった。核型分析(Gバンド)の結果、47, XY, +13であった。

49年度からの異常症例の詳細は、既報[1-10]で述べた。

今年度、検査依頼の理由の中で一番多かったのは、高齢妊娠のため、ということで47件あり、受付件数の64%にあたる。その年齢は35歳から47歳で、49年度からの年齢分布では、36歳から39歳が一番多くなっている。母親の加齢と共に異常の出

生率が高くなることはよく知られているとおりであるが、今年度はこのうち1件(症例2)に異常が見られた。

今年度までに当所においてみられた染色体異常33件のうち、高齢妊娠を主訴とした異常件数は5件である。40歳を越えると、数的染色体異常は増加するといわれている。当所においても、37歳以上の異常はすべて、トリソミー等の数的異常となっている。

厚生省の人口動態統計などから、高齢出産は増加する一方で、今後は、全国的にますます検査希望が増加すると言われている。

次に依頼で多いのは、兄弟や親類にダウン症や障害児がいるという理由で、7件の依頼があった。このうち6件がダウン症、1件がターナー症であったが羊水に異常は見られなかった。これらの核型についてはほとんどが不明であり、このうち1件は、家系内にダウン症が3名いるという訴えであったため、転座型ダウン症を疑い、調査したところ、この異常は7番逆位の存在[11]による染色体異常であり、ダウン症ではないことが判明した。このように、羊水検査の直前に転座型ダウン症だけを疑うような訴えでは、限られた時間内に結果を出す必要のある羊水検査に支障を来すため、なるべく詳しい事前情報が今後とも必要であると思われた。

羊水過多による依頼は5件あり、そのうち2件に異常(47, XY, +13, 47, XX, +18)がみられた。羊水過多は胎児の異常が原因で起こることが多く、当然ながら49年度から、判定可能32件中、7件(22%)と高い確率で染色体異常がみられている。しかし羊水過多は妊娠後期に起こることが多く、羊水検査時期に遅れることから、問題も多い。依頼理由で次に多いのは、以前に染色体異常児(両親由来ではない染色体異常)を出産した経験者で3件検査依頼があった。前児の染色体異常の内訳はターナー症1件、17p-が1件、+マーカーが1件であった。今回、これらに異常はみられなかった。

胎児に奇形等の異常が疑われるという理由で3件依頼があったが、いずれも異常は見られなかつ

た。

胎児異常の不安等のため本人の強い希望で2件依頼があり、そのうち1件（症例1：前述）が異常であった。この症例は羊水検査適応のハイリスクには通常相当しない例であった。最近は羊水検査依頼が急増しており、当所の検査可能数も限られていることから、このような依頼には対応できないような状態であった。今後このような、不安を解消するための検査の対処に苦慮しているところである。そのほか流産、死産歴が2件、血中AFPの異常、体外受精、妊娠中のX線撮影がそれぞれ1件であった。

羊水等の染色体検査には、母体細胞混入の危険性があること、染色体異常がすべて把握されるわけではないこと、異常を発見してもほとんどが治療困難であること、などの問題もあり、さらに倫理的、社会的な問題等も多く残されている。また最近では、トリプルマーカー検査の普及により、その結果、かえって不安となり、羊水検査の需要が多くなる可能性があり、当所でもその問い合わせが多く、今後、問題となることが予想される。これらのことと念頭に置き、医師の適切な指導や遺伝相談による染色体検査の運用や、検査体制を整える必要があると思われる。

2. 自然流産胎児

今年度、受付件数は8件であった（表1）。そのうち分析可能であったのは5件である。分析不能の原因は細菌混入による培養不能であった。

平成8年度および検査開始時からの検査依頼の理由および受付件数、検査結果等は表3に示した。

検査開始依頼、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と、初めてではあるが原因不明の流産をしたためで、それぞれ、89件中33件、20件あり、そのうち5回流産している症例が2件あった。分析可能は、前者では25件で、その13件に異常があり、このうち9件はトリソミー型、モノソミー型の異常であった。

他の4件はNo.5の部分欠失の猫泣き症候群、No.1部分欠失、4倍体、10トリソミーモザイクで前者2件は父親が転座染色体保因者と判明した。

初めての流産の分析は13件で、7件に異常がみられた。これらはすべて、トリソミー型と3倍体の異常であった。

次に多い理由は、流産した胎児に奇形等があつたための14件で、そのうち3件に数的異常がみられた。そのほか子宮内胎児死亡に1件転座型異常がみられたが、両親の核型分析は実施できず、不明であった。また、前子が染色体異常（核型は不明）という主訴で1件数的異常がみられ、これも再発の可能性が考えられる。羊水検査で染色体異常があり、流産した胎児の確認検査が3件あり、分析可能の2件はいずれも羊水の結果と一致していた。

依頼された流産胎児の月数は2か月の終りから9か月までにわたっていたが、みつけられた異常検体は、ほとんどが3か月までの胎児であった。自然流産において報告されている染色体異常胎児の率は、研究者によりかなりの開きがあり、それは研究材料、集め方、研究方法による違いであるが、妊娠初期に起こった流産胎児の染色体異常の割合が大きいことは一般に認められている。牧野[12]によると、一般に妊娠の15%は流産で終り、その流産の約80%は妊娠3か月以内に起こるとし、自然流産の約28%は染色体異常を持つと報告していることから、例数はまだ少ないが、当所における傾向は、これにはほぼ一致していると考えられる。

当所における流産胎児の染色体分析はまだ症例数が少ないのでこれらの結果から、確たる結論等は論じられないが、一般にいわれているように、かなり染色体異常もみられることから、この検査を進めていくことが、母子保健対策事業に必要と思われる。

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

表3. 胎児検査の依頼理由および分析結果（昭和50～平成8年度）

理由（主訴）	昭和50～平成8年度			平成8年度			染色体異常の核型
	受付数	分析数	異常数	受付数	分析数	異常数	
過去にも流早産をした	33	25	13	3	3	3	45,X, 46,XY, del(1) (pter → q42:1) 46,XX, del(5) (p13), 47,XX,+21 (2件) 47,XX,+B, 47,XX,+E (2件), 92,XXYY 47,XX,+16 (3件), 47,XY,+10/46,XY 47,XY,+F, 47,XY,+G, 69,XXX (2件) 47,XX,+D, 47,XY,+E, 47,XY,+18 69,XXX, 45,X, 47,XX,+18 46,XX,t (15/D)
初めての流早産（原因不明）	20	13	7				
流産胎児に奇形等ががあった	14	12	3	2	1	1	
子宮内胎児死	7	4	1				
胞状胎	5	5					
羊水検査で染色体異常があつた	3	2	2				
親が染色体異常	2	1	1				
前子が多発奇形	1	1	1				
妊娠中に風疹に罹った	1	2			1		
計（件）	89	64	27	8	5	3	

文 獻

1. 本田幸子, 林美貴子, 吉川俊夫, 植竹久雄 (1986).
富山衛研年報. 9, 51-56.
2. 本田幸子, 林美貴子, 吉川俊夫, 植竹久雄 (1987).
富山衛研年報. 10, 50-54.
3. 本田幸子, 林美貴子, 吉川俊夫, 植竹久雄 (1988).
富山衛研年報. 11, 48-51.
4. 本田幸子, 林美貴子, 井山一郎, 佐藤茂秋 (1990).
富山衛研年報. 13, 47-54.
5. 本田幸子, 林美貴子, 井山一郎, 佐藤茂秋 (1991).
富山衛研年報. 14, 44-48.
6. 本田幸子, 林美貴子, 柏樹久雄, 佐藤茂秋 (1992).
富山衛研年報. 15, 52-58.
7. 本田幸子, 林美貴子, 柏樹久雄, (1993). 富山衛研年報. 16, 56-61.
8. 本田幸子, 林 美貴子, 柏樹久雄, (1994). 富山衛研年報. 17, 56-62.
9. 本田幸子, 林美貴子, 北村 敬, (1995). 富山衛研年報. 18, 76-86.
10. 本田幸子, 林美貴子, 北村 敬, (1996). 富山衛研年報. 19, 63-70.
11. 林美貴子, 本田幸子, 北村 敬, (1997). 富山衛研年報. 20.
12. 牧野佐二郎 (1979). 染色体, 人類の細胞遺伝, 医学書院, 東京.

日本脳炎流行予測調査

渡辺 譲 長谷川澄代 森田修行 上村 清¹
田中桂子² 浦田祐子³ 淺野真由美⁴
寺崎さちこ⁵ 藤崎啓子⁶ 広明秀一⁷

Epidemiological Surveillance of Japanese
Encephalitis in Toyama Prefecture in 1995

Mamoru WATANABE, Sumiyo HASEGAWA, Osayuki
MORITA, Kiyoshi KAMIMURA¹, Keiko TANAKA²
Yuko URATA³, Mayumi ASANO⁴, Sachiko
TERASAKI⁵, Keiko FUJISAKI⁶, and Shuichi
HIROAKI⁷

要旨 日本脳炎の発生および流行を監視する目的で、富山県内7か所の定点（畜舎）で、6月から9月まで、コガタアカイエカの捕集調査を行うと共に、豚のHI抗体保有調査を行った。蚊の捕集数は5定点において昨年よりも減少した。発生消長は各定点で異なっていたが、年1山型は婦中友坂の8月上旬のみであった。他は年2山型でその中で、7月下旬と8月下旬に捕集数が多くなる定点は富山月岡のみで、残り5定点は、8月中・下旬と9月下旬に捕集数の山が形成された。

豚血清の日本脳炎ウイルス HI 抗体調査では、調査開始日の7月16日から10月1日の調査終了時まで、抗体保有豚はわずかに14頭（5.8%）であった。その14頭のうち、2ME感受性が認められたのは、10月1日採血の一頭のみであった。

富山県における近年の日本脳炎真性患者の発生は、1982年（昭和57年）の1例のみであり、その1982年には、コガタアカイエカに非常に強度な殺虫剤抵抗性の発現が認められた〔1, 2〕。それが主因で、1982～87年はコガタアカイエカ発生量も多い傾向にあった〔3～6〕。しかし、その後のコガタアカイエカの発生量は、1970年代の少ない時期に次いで少ない傾向がみられた。だが、1994年には再びコガタアカイエカの発生量が多く

なった。このように、近年のコガタアカイエカの発生量の増減変化は激しく、この原因を確かめることが、今後の日本脳炎患者の発生を未然に防ぐ方策の一助となると考え、1995年に引き続き日本脳炎を媒介するコガタアカイエカ、および日脳ウイルスの動態を、6月から10月まで監視してきたので報告する。

1. 富山医薬大 2. 黒部保健所 3. 上市保健所 4. 氷見保健所 5. 福野保健所
6. 小矢部保健所 7. 県健康課

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。1969年から1995年まで調査を行って来た富山萩原は、牛の飼養を止めたため定点から除外され、定点は1995年の8か所から7か所に減少した。

調査期間と調査方法は前年までと同じで、富山月岡と婦中友坂の2定点は6月1日から10月中旬までの連日捕集を、他の5定点は6月中旬から9月下旬までの週1回のライトトラップ（東京エース社製）による捕集調査を行った[3, 4]。

2. 調査結果と考察

表2に各調査定点別の毎週水曜日に行った捕集成績を、図1に定点別年間捕集数の過去28年間の変動を示した。しかし、表2と図1および表4とは、年間捕集数に微妙な違いがある。すなわち、

表2, 4は同じ成績を用いているために同一であるが、図1は連日調査地点の富山月岡、婦中友坂と他地点を比較し易い様に、連日調査を行ったとして、週1回調査地点は6.7の係数を掛けて年間捕集数とした。

各定点とも調査開始の6月中旬から、前年に比べ発生数は少なく推移した。その結果、年間捕集数は連日捕集を行っている、富山月岡と婦中友坂を除いた5定点で、前年よりも少なくなった。連日捕集定点の富山月岡は全数比較で1.7倍、婦中友坂は2.1倍に増加した。図2に富山県全体をまとめて季節変動を示した。1996年度は6～7月は少なく推移したが、8月は1995年度よりも多くなり、上旬と下旬にピークがみられた。しかし、そのピークは1995年度よりも低かった。以下、各定点別に捕集結果を述べる。

〔富山月岡〕表3に連日捕集成績を示した。調査開始の6月上旬から捕集数は1995年よりも少なかつ

表1. 1996年度（平成8年度）調査地点（トラップ設置畜舎）の概要

番号	地点名	類別	地點の概要
1	富山月岡	牛舎	富山市大井、合田初男所有。乳牛15頭。 平野部水田地帯、約1km離れたところに他牛舎あり。 300m南に熊野川が流れ、対岸は水田、そして丘陵に連なる。
2	婦中友坂	豚舎	婦中町友坂、数井白三郎所有。親豚14頭、肥育豚40頭。 丘陵部縁の水田地帯、集落の外れ。近くに他畜舎なし。 丘陵の雑木林、竹林および杉植林地まで約100m。
3	黒部	牛舎	黒部市植木、松村彰所有。乳牛11頭。 平野部水田地帯、人家点在。近くに他畜舎なし。 北300mに海岸、東200mに黒部川。
4	上市	牛舎	上市町青井出新、沖田竹雄所有。肉牛8頭。 平野部水田地帯、集落内。近くに他畜舎なし。 人家周辺に水田あり。
5	福野	牛舎	福野町二日町、河合精一所有。乳牛26頭。 平野部水田地帯、人家点在。 近くに他畜舎なし。
6	小矢部	牛舎	小矢部市金屋本江、西田芳夫所有。乳牛50頭。 平野部水田地帯、人家点在。近くに他畜舎なし。 西150mに小矢部川が流れる。
7	氷見	牛舎	氷見市加納、桜打寛所有。乳牛44頭。 丘陵部の縁、集落内。 前面は水田、裏手は雑木林および杉植林。

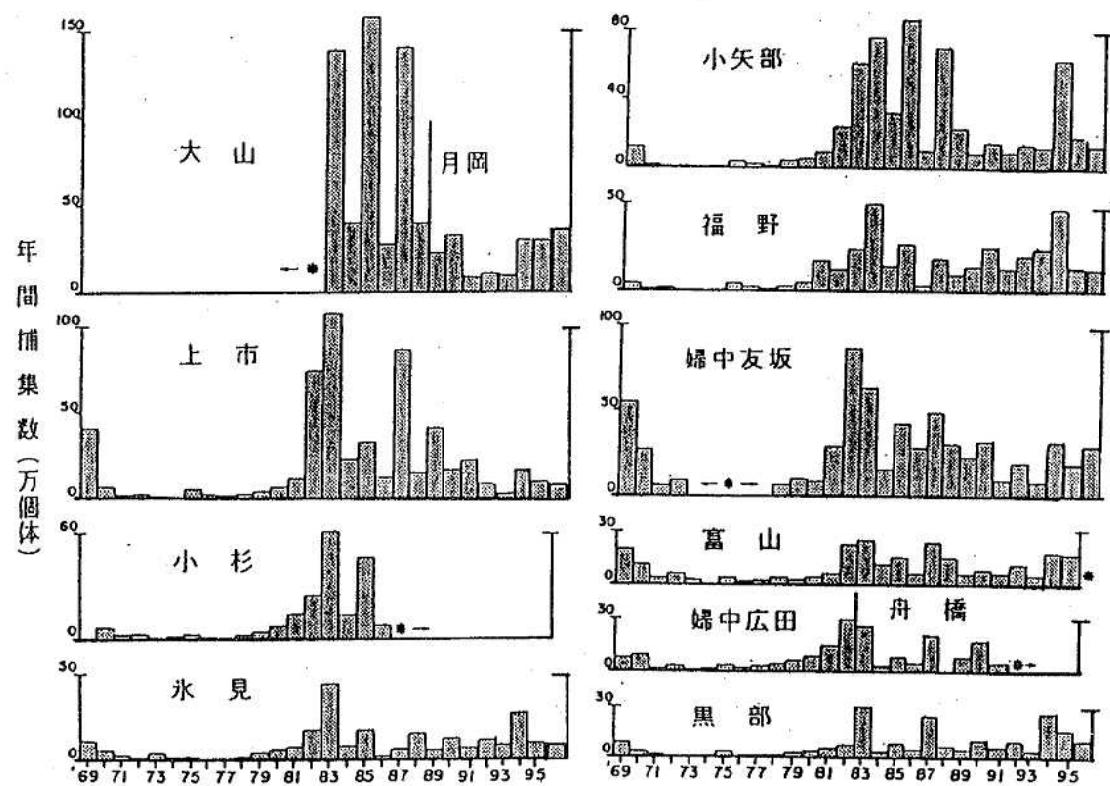


図1. 富山県の各調査定点におけるコガタアカイエカ捕集数の年変動

(大山、月岡、婦中友坂、婦中広田の各定点は6～9月の毎日、その他の定点は週1回の調査を行った。ただし、捕集数は全地点とも毎日調査したとして示した。*印は調査を行っていないことを示す。)

たが、7月から8月は逆に1995年よりも多く推移した。結局、年間捕集数は1995年の170%になつた。日最高捕集数は8月23日の17,775個体であり、1995年（7月24日；6,435）に比べ1カ月遅れた。〔婦中友坂〕この定点も6月上旬から1995年よりも少なかったが、7月から8月には1995年よりも多く推移した。年間捕集数は1995年度の200%になつた。日最高捕集数は1995年度の8,205個体（8月29日）に対し、1996年度は180%の15,048個体（8月18日）であった（表3）。

〔黒部植木〕1994年度の年間捕集数は13,655個体と近年の中では最も多かったが、1995年度は6,398個体（47%）に低下し、さらに、1996年度は2,034個体に低下した（表4）。発生消長は1996年度と同様、晩夏発生型の消長を示した（表2-2）。

〔上市湯上野〕1995年度は8月31日に主ピーク

（480個体）、9月21日に副ピーク（210個体）を持つ年2峰性を示したが、1996年度は9月18日に全捕集数の半分を占める大きなピーク（770個体）がみられ、晩夏発生型の消長を示した（表4）。

〔福野二日〕年間捕集数は1995年度の11%と大幅に減少した。日最高捕集数は1995年度の1,780個体（7月20日）に対し、1996年度は1,525個体（8月14日）になった（表2-2）。発生消長は8月中旬から下旬に、3週間にわたり主ピーク、9月中旬に副ピークを示す年2峰性であった。

〔小矢部金屋〕この定点は、例年福野と発生消長、捕集傾向もほぼ酷似しており、1996年度もほぼ同様な消長を示した。ただ、主ピークは8月下旬の2週間と、福野に比べ短くなった。小矢部の日最高捕集日は福野の日最高捕集日より1週間遅れて8月21日（1,642個体）で、次週の8月28日は1,385個体であった（表2-2）。年間捕集数は

表2-1. 7定点(畜舎)における蚊雌成虫の捕集数(1996年度, H 8)

(毎週水曜日ライトトラップ一晩捕集)

定点 種類 調査日	1. 富山月岡					2. 婦中友坂				
	A s	C t	C p	その他	計	A s	C t	C p	その他	計
6. 12	0	48	0	0	48	0	3	3	0	6
19	0	64	5	0	69	0	54	2	1	57
26	0	423	45	1	469	0	285	8	0	293
7. 3	0	790	32	0	822	0	48	1	0	49
10	0	1,376	73	0	1,449	0	112	1	0	113
17	0	2,012	13	0	2,025	0	977	1	0	978
24	0	3,189	84	0	3,273	0	823	2	1	826
31	0	5,412	9	0	5,421	0	1,649	2	2	1,653
8. 7	0	2,276	6	0	2,282	4	13,464	0	0	13,468
14	0	3,654	6	0	3,660	0	3,240	2	0	3,242
21	0	4,866	0	0	4,866	4	6,912	0	4	6,920
28	0	5,331	0	0	5,331	3	4,751	0	0	4,754
9. 4	0	2,469	4	0	2,473	3	4,166	0	3	4,172
11	0	1,373	4	0	1,377	1	1,925	1	1	1,928
18	0	2,575	5	0	2,580	0	255	0	1	256
25	0	447	4	0	451	0	193	0	1	194
計	0	36,305	290	1	36,596	15	38,857	23	14	38,909

定点 種類 調査日	3. 黒部					4. 上市				
	A s	C t	C p	その他	計	A s	C t	C p	その他	計
6. 19	0	4	0	0	4	0	2	0	1	3
26	0	6	0	0	6	0	2	0	0	2
7. 3	0	5	0	0	5	0	4	0	0	4
10	0	8	0	0	8	0	8	0	0	8
17	-	-	-	-	-	0	4	0	0	4
24	0	35	0	0	35	1	8	0	0	9
31	0	60	0	0	60	1	33	0	0	34
8. 7	0	61	0	0	61	0	13	0	0	13
14	0	221	0	0	221	0	76	0	0	76
21	0	286	0	0	286	0	180	0	0	180
28	0	457	0	0	457	0	24	0	0	24
9. 4	0	195	0	0	195	0	150	4	0	154
11	0	93	0	0	93	0	166	2	0	168
18	0	542	0	0	542	3	770	0	0	773
25	0	61	0	0	61	0	122	0	0	122
計	0	2,034	0	0	2,034	5	1,562	6	1	1,574

注. 1. A s = Anopheles sinensis シナハマダラカ、C t = Culex tritaeniorhynchus コガタアカイエカ、C p = Culex pipiens アカイエカ表わし、その他にはカラツイエカ、オオクロヤブカ、ヒトスジヤブカなどが含まれる。

2. 一印はトラップなどの故障で捕集が出来なかったことを示す。

平成9年10月1日

表2-2. 7定点(畜舎)における蚊雌成虫の捕集数(1996年度, H 8)

(毎週水曜日ライトトラップ一晩捕集)

定点 種類 調査日	5. 福野					6. 小矢部				
	A s	C t	C p	その他	計	A s	C t	C p	その他	計
6. 19	0	19	2	0	21	0	33	0	1	34
26	0	49	15	0	64	1	84	17	1	103
7. 3	0	41	3	1	45	1	164	2	0	167
10	0	127	7	1	135	6	146	3	0	155
17	0	155	2	0	157	4	375	10	0	389
24	0	392	7	0	399	0	622	6	0	628
31	0	607	5	0	612	0	319	5	0	324
8. 7	0	465	0	0	465	0	134	2	0	136
14	0	1,525	0	0	1,525	0	35	0	0	35
21	0	1,317	2	0	1,319	0	1,642	0	0	1,642
28	0	1,388	2	0	1,390	0	1,385	0	0	1,385
9. 4	0	896	8	1	905	0	763	0	0	763
11	0	1,187	1	0	1,188	0	1,032	0	0	1,032
18	0	237	3	0	240	0	752	3	0	755
25	0	212	2	0	214	0	197	0	0	197
計	0	8,617	59	3	8,679	12	7,683	48	2	7,745

定点 種類 調査日	7. 水見									
	A s	C t	C p	その他	計	A s	C t	C p	その他	計
6. 19	78	6	10	0	94					
26	242	30	0	0	272					
7. 3	96	80	0	0	176					
10	52	93	0	0	145					
17	16	78	0	0	94					
24	201	175	0	0	376					
31	570	303	0	0	873					
8. 7	510	465	0	0	975					
14	321	672	0	0	993					
21	308	1,690	0	0	1,998					
28	187	820	0	0	1,007					
9. 4	34	173	0	0	207					
11	15	117	0	0	132					
18	8	669	0	0	677					
25	2	329	0	0	331					
計	2,640	5,700	10	0	8,350					

- 注. 1. A s = Anopheles sinensis シナハマダラカ、C t = Culex tritaeniorhynchus コガタアカイエカ、C p = Culex pipiens アカイエカ表わし、その他にはカラツイエカ、オオクロヤブカ、ヒトスジヤブカなどが含まれる。
 2. 一印はトラップなどの故障で捕集が出来なかったことを示す。

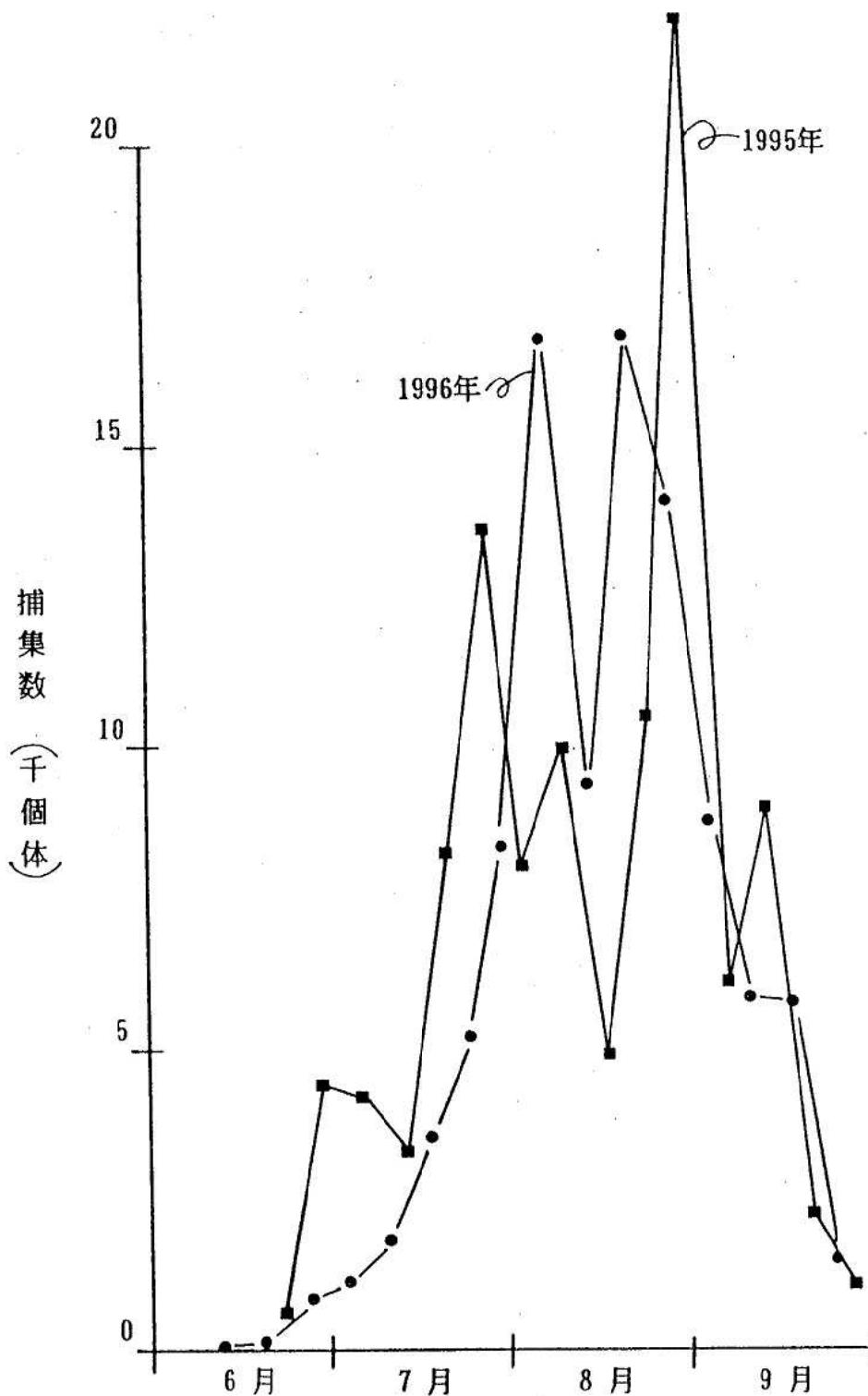


図2. 富山県における1995年と1996年のコガタアカイエカ捕集数の季節変動

表3-1. 2定点における蚊雌成虫ライト・トラップ連日捕集成績(1996年度, H.8)

定点 種類 捕集日	富山月岡牛舎					婦中友坂豚舎				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
6. 1	-	-	-	-	-	0	0	2	0	2
2	-	-	-	-	-	0	4	0	0	4
3	0	69	0	0	69	0	6	0	0	6
4	0	21	2	0	23	-	-	-	-	-
5	0	46	1	0	47	0	23*	4*	0	27*
6	0	2	0	0	2	0	5	5	0	10
7	0	24	0	0	24	0	29	4	0	33
8	0	98	0	0	98	0	11	4	0	15
9	0	101	2	0	103	0	8	1	0	9
10	0	63	3	0	66	0	7	1	0	8
11	0	110	3	0	113	-	-	-	-	-
12	0	48	0	0	48	0	3*	3*	0	6*
13	0	31	4	0	35	0	2	1	0	3
14	0	110	0	0	110	0	9	2	0	11
15	0	76	7	0	83	0	16	4	0	20
16	0	147	9	0	156	0	12	10	0	22
17	0	163	13	0	176	0	26	3	0	29
18	0	158	6	0	164	-	-	-	-	-
19	0	64	5	0	69	0	54*	2*	1*	57*
20	0	159	4	0	163	0	17	7	0	24
21	0	321	8	0	329	0	38	0	0	38
22	0	325	0	0	325	0	20	4	0	24
23	0	351	15	1	367	0	98	7	0	105
24	0	531	4	0	535	0	72	4	0	76
25	0	841	39	0	880	-	-	-	-	-
26	0	423	45	1	469	0	285*	8*	0	293*
27	0	490	75	0	565	0	145	1	0	146
28	0	749	78	1	828	0	137	2	0	139
29	0	1,021	49	0	1,070	0	132	7	0	139
30	0	733	39	0	772	0	86	3	0	89
計	0	7,275	411	3	7,689	0	1,245	89	1	1,335

- 注. 1. As = Anopheles sinensis シナハマダカ、Ct = Culex tritaeniorhynchus コガタアカイエカ、Cp = Culex pipiens アカイエカを示し、その他にはカラツイエカ、オオクロヤブカ、ヒトスジシマカなどが含まれる。
 2. ×印はトラップなどの故障による欠測を示す。
 3. aの数値は前日との2日分の捕集数を示す。

表3-2. 2定点における蚊雌成虫ライト・トラップ連日捕集成績（1996年度, H.8）

定点 種類 捕集日	富山月岡牛舎					婦中友坂豚舎				
	A s	C t	C p	その他の	計	A s	C t	C p	その他の	計
7. 1	0	732	56	0	788	0	164	0	0	164
2	0	668	20	0	688	0	237	1	0	238
3	0	790	32	0	822	-	-	-	-	-
4	0	586	22	0	608	0	95 ^a	2 ^a	0	97 ^a
5	0	252	28	0	280	0	73	0	1	74
6	0	435	22	0	457	0	95	0	0	95
7	0	689	69	0	758	0	150	0	0	150
8	0	685	67	0	752	0	213	1	0	214
9	0	912	87	0	999	0	884	2	0	886
10	0	1,376	73	0	1,449	-	-	-	-	-
11	0	659	39	0	698	0	224 ^a	2 ^a	0	226 ^a
12	0	382	5	0	387	0	203	1	0	204
13	0	1,086	51	0	1,137	0	298	0	0	298
14	0	1,916	64	0	1,980	0	203	3	0	206
15	0	1,525	49	0	1,574	0	275	2	1	278
16	0	1,426	21	0	1,447	-	-	-	-	-
17	0	2,012	13	0	2,025	0	977 ^a	1 ^a	0	978 ^a
18	0	1,054	27	0	1,081	0	1,162	1	0	1,163
19	0	1,713	27	0	1,740	0	437	3	0	440
20	0	3,083	62	0	3,145	2	1,008	7	0	1,017
21	0	2,148	45	0	2,193	0	824	1	0	825
22	0	1,980	12	0	1,992	0	918	1	0	919
23	0	3,507	15	0	3,522	2	921	0	1	924
24	0	3,189	84	0	3,273	0	823	2	1	826
25	0	3,189	84	0	3,273	0	1,190	1	0	1,191
26	0	5,175	21	0	5,196	0	1,536	3	0	1,539
27	0	2,526	24	0	2,550	0	1,467	4	1	1,472
28	0	4,893	8	0	4,901	1	1,930	2	1	1,934
29	0	5,172	0	0	5,172	1	1,828	2	1	1,832
30	0	6,123	0	0	6,123	3	1,258	2	2	1,265
31	0	5,412	9	0	5,421	0	1,649	2	2	1,653
計	0	65,295	1,136	0	66,431	9	21,042	46	11	21,108

注. 1. A s = *Anopheles sinensis* シナハマダカ、C t = *Culex tritaeniorhynchus* コガタアカイエカ、C p = *Culex pipiens* アカイエカを示し、その他にはカラツイエカ、オオクロヤブカ、ヒトスジシマカなどが含まれる。

2. ×印はトラップなどの故障による欠測を示す。

3. aの数値は前日との2日分の捕集数を示す。

表3-3. 2定点における蚊雌成虫ライト・トラップ連日捕集成績（1996年度, H.8）

定点種類 捕集日	富山月岡牛舎					婦中友坂豚舎				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
8. 1	0	3,450	3	0	3,453	0	1,396	2	0	1,398
2	0	5,429	6	0	5,435	0	1,075	1	0	1,076
3	0	3,189	15	0	3,204	0	-	0	0	0
4	0	6,045	27	0	6,072	6	3,663	4	0	3,673
5	0	2,826	6	0	2,832	9	6,382	1	0	6,392
6	0	2,256	0	0	2,256	-	-	-	-	-
7	0	2,276	6	0	2,282	4 ^a	13,464 ^a	0	0	13,468 ^a
8	0	566	7	0	573	4	2,678	2	1	2,685
9	0	49	0	0	49	3	4,583	0	2	4,588
10	0	1,379	2	0	1,381	-	-	-	-	-
11	0	381	1	0	382	0	2,853 ^a	2 ^a	0	2,855 ^a
12	0	2,985	3	0	2,988	0	3,244	0	0	3,244
13	0	3,162	15	0	3,177	0	3,243	0	0	3,243
14	0	3,654	6	0	3,660	0	3,240	2	0	3,242
15	2	6,798	12	0	6,812	0	1,426	0	0	1,426
16	0	6,654	18	0	6,672	0	14,740	0	0	14,740
17	0	5,754	0	0	5,754	0	14,376	0	8	14,384
18	0	2,504	0	0	2,504	8	15,040	0	0	15,048
19	0	3,981	15	0	3,996	4	6,654	0	0	6,658
20	0	9,849	3	0	9,852	5	4,523	0	1	4,529
21	0	4,866	0	0	4,866	4	6,912	0	4	6,920
22	0	13,188	0	0	13,188	3	2,668	0	0	2,671
23	0	17,739	36	0	17,775	4	7,464	0	0	7,468
24	0	3,207	18	0	3,225	0	9,768	0	0	9,768
25	0	3,657	15	0	3,672	0	10,612	0	0	10,612
26	0	5,562	0	0	5,562	0	8,364	0	0	8,364
27	0	13,293	12	0	13,305	8	6,752	0	4	6,764
28	0	5,331	0	0	5,331	3	4,751	0	0	4,754
29	0	2,285	5	0	2,290	0	7,070	4	0	7,074
30	0	2,547	3	0	2,550	1	2,521	0	0	2,522
31	0	2,004	5	0	2,009	-	-	-	-	-
計	2	146,866	239	0	147,107	66	169,462	18	20	169,566

- 注. 1. As = Anopheles sinensis シナハマダカ、Ct = Culex tritaeniorhynchus コガタアカイエカ、Cp = Culex pipiens アカイエカを示し、その他にはカラツイエカ、オオクロヤブカ、ヒトスジシマカなどが含まれる。
 2. ×印はトラップなどの故障による欠測を示す。
 3. aの数値は前日との2日分の捕集数を示す。

表3-4. 2定点における蚊雌成虫ライト・トラップ連日捕集成績（1996年度, H.8）

定点 種類 捕集日	富山月岡牛舎					婦中友坂豚舎				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
9. 1	0	2,654	4	0	2,658	0	1,831 ^a	1 ^a	0	1,832 ^a
2	1	1,738	3	0	1,742	0	3,214	1	1	3,216
3	1	1,925	5	0	1,931	1	3,634	0	1	3,636
4	0	2,469	4	0	2,473	3	4,166	0	3	4,172
5	0	1,652	2	0	1,654	1	3,219	0	1	3,221
6	0	3,205	3	0	3,208	2	4,174	0	1	4,177
7	0	1,854	3	0	1,857	2	2,896	1	0	2,899
8	0	3,826	3	0	3,829	0	258	1	1	260
9	0	4,755	4	0	4,759	2	960	2	0	964
10	0	3,294	3	0	3,297	2	1,041	0	1	1,044
11	0	1,373	4	0	1,377	1	1,925	1	1	1,928
12	0	2,138	5	0	2,143	0	778	2	0	780
13	0	4,456	4	0	4,460	0	620	1	0	621
14	0	3,521	5	0	3,526	0	1,633	0	1	1,634
15	0	3,264	3	0	3,267	0	1,370	0	2	1,372
16	0	2,857	6	0	2,863	0	675	0	1	676
17	0	790	11	0	801	0	286	0	0	286
18	0	2,575	5	0	2,580	0	255	0	1	256
19	0	2,494	5	0	2,499	0	665	0	0	665
20	0	1,396	17	0	1,413	1	292	0	0	293
21	0	681	17	0	698	0	162	0	0	162
22	0	842	9	0	851	1	277	0	1	279
23	0	509	13	0	522	0	196	1	1	198
24	1	481	6	0	488	0	72	0	0	72
25	0	447	4	0	451	0	193	0	1	194
26	0	916	3	0	919	0	117	1	2	120
27	0	73	4	0	77	0	92	0	0	92
28	0	79	7	0	86	0	69	0	0	69
29	1	122	4	0	127	0	38	1	0	39
30	0	135	5	0	140	0	10	0	2	12
計	4	56,521	171	0	56,696	16	35,118	13	22	35,169

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

2. ×印はトラップなどの故障による欠測を示す。

3. aの数値は前日との2日分の捕集数を示す。

表3-5. 2定点における蚊雌成虫ライト・トラップ連日捕集成績（1996年度, H.8）

定点 種類 捕集日	富山月岡牛舎					婦中友坂豚舎				
	A s	C t	C p	その他	計	A s	C t	C p	その他	計
10. 1	0	127	0	0	127	0	5	0	0	5
2	0	169	0	0	169	0	8	0	0	8
3	0	276	1	0	277	0	8	0	0	8
4	0	119	0	0	119	0	13	0	0	13
5	0	44	0	0	44	0	11	0	2	13
6	0	100	0	0	100	0	10	0	0	10
7	0	287	0	0	287	0	15	0	1	16
8	0	57	0	0	57	0	2	0	0	2
9	0	153	1	0	154					
10	0	28	11	0	39					
11	1	84	1	0	86					
12	0	129	4	0	133					
13	0	19	0	0	19					
14	0	10	0	0	10					
15	0	16	0	1	17					
16	0	1	0	0	1					
17	0	20	0	0	20					
18	0	29	0	0	29					
19	0	3	0	0	3					
20	0	2	0	0	2					
計	1	1,673	18	1	1,693	0	72	0	3	75

注. 1. A s = Anopheles sinensis シナハマダカ、C t = Culex tritaeniorhynchus コガタアカイエカ、C p = Culex pipiens アカイエカを示し、その他にはカラツイエカ、オオクロヤブカ、ヒトスジシマカなどが含まれる。

2. ×印はトラップなどの故障による欠測を示す。

3. aの数値は前日との2日分の捕集数を示す。

1996年度に比べ35%と大幅に減少した。

〔氷見加納〕日最高捕集数は8月21日の1,690個体で、1995年度の1,362個体（9月14日）よりもわずかに増加した。しかし、年間捕集数は1995年度の79%に減少した。また、例年通りにシナハマダカが7定点の中で最も多かった（表2-2）。

近年は各定点とも、おおむね7月中・下旬と8月中旬に発生数の山がみられる、年2峰型の発生消長を示す場合が多い傾向にあったが〔4〕、1996年度は7月下旬に発生のピークが見られたの

は、富山月岡の1定点のみであった。他の定点は、8月中・下旬と9月中旬に発生数の山がみられ、例年よりも発生は遅れる傾向であった。

富山では5～6月に気温が高く推移すると、コガタアカイエカの発生が活発になることが知られているが、1995年度は5～7月が低く推移しこガタアカイエカの年間捕集数が大幅に減少した。1996年度は5～6月の気温が高く推移したにもかかわらず、年間捕集数が低下した理由は現時点で不明である。ただ、6月の日照時間が平年値よりも少

表4. 7定点におけるコガタアカイエカ雌成虫捕集数の比較（1996年度、平成8年）
(毎週水曜日ライトトラップ一晩捕集)

調査日	定 点								計
	月岡	友坂	上市	福野	小矢部	黒部	氷見		
6. 12	48	3	-	-	33	4	-	51	182
19	64	54	2	19	84	6	6	879	
26	423	285	2	49	164	5	30	1,132	
7. 3	790	48	4	41	146	8	80	1,870	
10	1,376	112	8	127	375	-	93	3,601	
17	2,012	977	4	155	622	35	78	5,244	
24	3,189	823	8	392	319	60	175	8,383	
31	<u>5,412</u>	1,649	33	607	134	61	465	16,878	
8. 7	2,276	<u>13,464</u>	13	465	221	672	9,423		
14	3,654	3,240	76	<u>1,525</u>	35	286	<u>1,690</u>	16,893	
21	4,866	6,912	180	1,317	1,385	457	820	14,156	
28	5,331	4,751	24	1,388	1,032	195	173	8,812	
9. 4	2,469	4,166	150	896	763	93	117	5,893	
11	1,373	1,925	166	1,187	752	542	669	5,800	
18	2,575	255	<u>770</u>	237	197	61	329	1,561	
25	447	193	122						
計	36,305	38,857	1,562	8,617	7,683	2,034	5,700	100,758	
平成7年度	26,247	12,697	1,790	10,138	21,751	6,398	7,194	108,840	
捕集比	1.38倍	3.06倍	0.87倍	0.85倍	0.35倍	0.32倍	0.79倍	0.85倍	

注. 数字に下線が引いてあるのは最大捕集数を示す。
捕集比=平成8年度の捕集数／平成7年度の捕集数

なく、これが影響したのかもしれない（図3）。今後は、さらに気象状況と発生源の水田、および吸血源の畜舎などと、コガタアカイエカ自身の生産性（繁殖能力）を詳細に調べ、発生数を予測する方法を確立したい。

II. 豚血清の日本脳炎 HI 抗体保有調査

1. 調査対象と検査方法

7月16日から10月1日まで、毎週火曜日に富山食肉総合センターに搬入される、生後6か月の県内産（主として小矢部市と氷見市）の豚を対象として、毎回20頭から血液を採取して、日本脳炎抗

体の保有状況を調査した。抗体価の測定は、例年の如く伝染病流行予測検査術式〔7〕に従った。被検血清は2回アセトン処理を行って、非特異阻止物質（インヒビター）を除去し、市販の日本脳炎ウイルスJaGAr 01株（デンカ生研）を抗原として、赤血球凝集抑制反応（HI）で抗体価を測定した。血球は1日齢のニワトリの赤血球を用い、反応はマイクロタイマー法で行った。

2. 調査結果と考察

採血日とHI抗体価の検査結果を表5に示した。調査開始の7月16日に抗体価160倍の豚が1頭認められたが、2ME感受性を検討したところ、新鮮感染が否定された。その後、7月30日、8月20

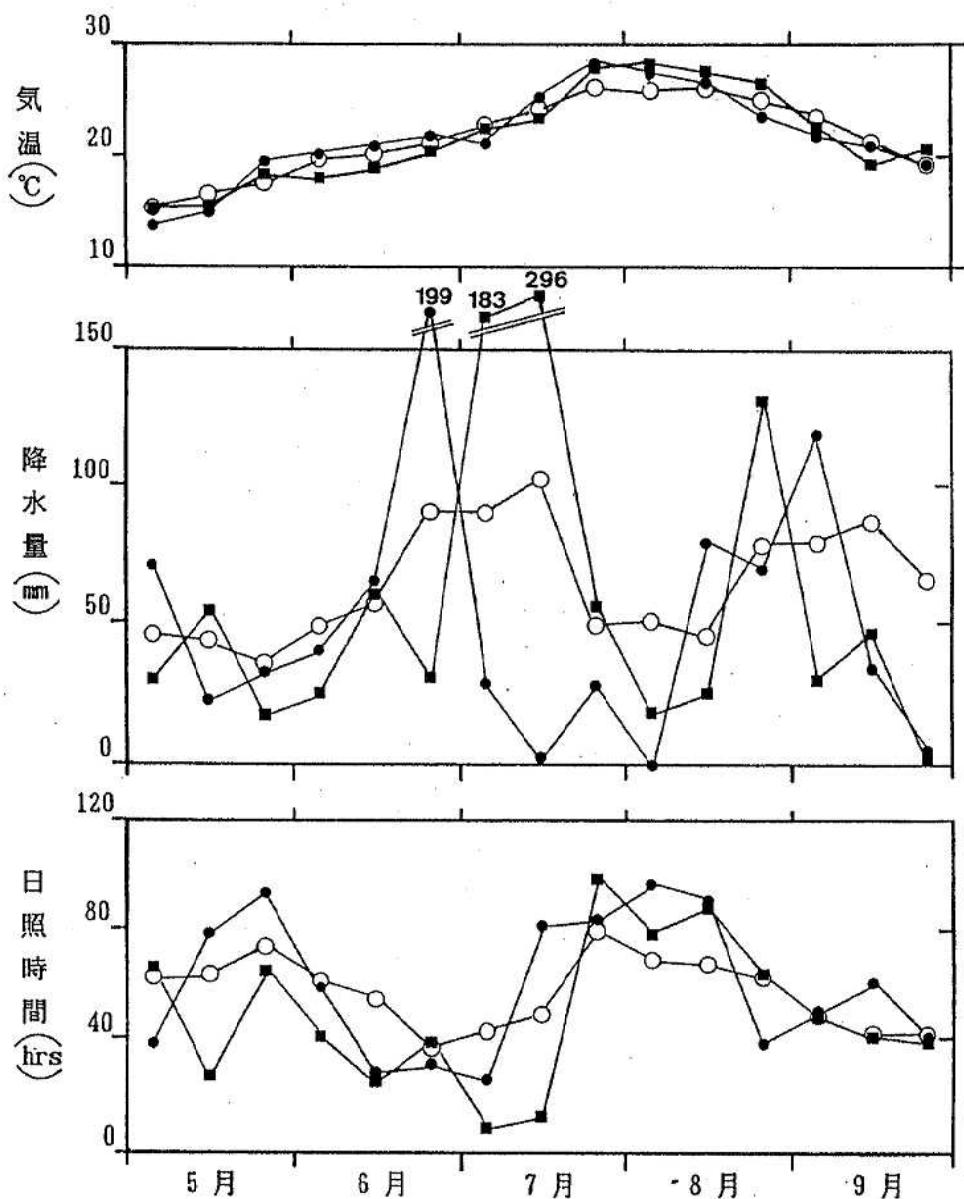


図3. 富山県の旬別気象要因の比較 ●1996年, ■1995年, ○平均値

データは日本気象協会富山県支部発行の富山県気象月報から富山気象台の観測データを引用作成した。

日, 27日, 9月10日に, 抗体価10~20倍を保有する豚が認められた。しかし, 2ME感受性の豚が認められたのは, コガタアカイエカの発生も終わり近くなった10月1日で, 日本脳炎ウイルスの侵入は遅く, 豚での拡大も起こらなかったと思われる。以上のコガタアカイエカの捕集数と, 豚の抗体保有を総合的に考察すると, 蚊の発生数が, とくに7月下旬まで少なく(図2), しかも, 日本

脳炎ウイルスの侵入が遅かったため, 豚での拡大が起こらなかったと思われ, それが原因で患者の発生もなかったと推定される。

謝辞: 本調査の実施にあたり, 御協力を頂いている各定点畜舎および食肉検査所の関係各位に深謝致します。

表5. 1996年豚血清における日本脳炎ウイルスの HI 抗体保有状況（平成 8 年度）

検体 採取日	抗体価								2-ME 感受性 陽性数
	<10	×10	×20	×40	×80	×160	×320	≥640	
7. 16	18 (90)	1 (5)				1 (5)			
23	20 (100)								
30	16 (80)	4 (20)							
8. 6	20 (100)								
13	20 (100)								
20	19 (95)	1 (5)							
27	18 (90)		2 (10)						
9. 3	20 (100)								
10	17 (85)	3 (15)							
17	20 (100)								
24	20 (100)								
10. 1	18 (90)		1 (5)		1 (5)				1 (100)
計	226 (94.2)	9 (3.8)	3 (1.3)	0	1 (0.4)	1 (0.4)	0	0	1 (100)

注. 1. 抗体価10倍以上を陽性とみなし、さらに40倍以上を示した血清について2-メルカプトエタノール（2-ME）処理を行ない、ウイルスの新鮮感染を検討した。
 2. 表中の数字は観察実数を表わし、括弧内の数字はパーセントを示す。

参考文献

- 1. 上村 清, 丸山由紀子 (1983), 衛生動物, 34, 33-37.
- 2. 渡辺 譲, 竹部幸子, 荒川 良, 上村 清, 小橋恭一 (1985), 富山衛研年報, 8, 33-37.
- 3. 渡辺 譲, 長谷川澄代, 森田修行, 南部厚子, 橋爪淑子, 松原勝博, 布野純子, 草山真由美, 布村 洋子, 金木 潤 (1995), 富山衛研年報, 18, 97-110.
- 4. 富山県厚生部編 (1996), 平成 7 年度伝染病流行予測調査報告書, 26-43, 富山県.
- 5. 渡辺 譲 (1988), 生活と環境, 1988年 5 月号, 33-38.
- 6. 渡辺 譲, 荒川 良, 上村 清 (1990), 衛生動物, 41, 51-58.
- 7. 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 松浦久美子 森田修行 北村 敬 南部厚子¹
田中桂子² 小川寿人³ 浦田祐子⁴ 松原勝博⁵ 布野純子⁶
小池美奈子⁷ 草山真由美⁸ 寺崎さち子⁹

Epidemiological Surveillance for Poliovirus in Toyama Prefecture

Takashi NAKAYAMA, Kumiko MATSUURA, Osayuki MORITA, Takashi KITAMURA, Atsuko NAMBU¹, Keiko TANAKA², Hisato OGAWA³, Yuuko URATA⁴, Katsuhiro MATSUBARA⁵, Junko NUNO⁶, Minako KOIKE⁷, Mayumi KUSAYAMA⁸ and Sachiko TERASAKI⁹

要旨 平成8年度は、感染源調査と平成6年度以来2年ぶり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か月以上経過した時点で、0歳から6歳までの乳幼児から採取した糞便60検体についてウイルス分離検査を実施した。その結果、ポリオウイルスは分離できなかつたが、コクサッキーウィルスB4型(Cox. B4)が11株、エコーウィルス22型(Echo22)が3株で、合計14株の腸管系ウイルスを分離した。

感受性調査は、全年齢層を対象として採血し、0歳から71歳までの238名の血清中の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、全体で1型が89.1%，2型が97.9%，3型が69.3%であった。また、抗体保有者の平均抗体価は、全体で1型が126.8倍、2型が133.8倍、3型が20.9倍で、抗体保有率と同様に高い方から2型、1型、3型の順であった。

厚生省流行予測事業で、国内のポリオウイルスの動向を監視するために国からの依頼を受け、毎年実施している調査である。WHOは予防接種によるポリオ撲滅戦略を展開しているが、東南アジアなどには依然として野生型ポリオの感染が発生している。商用や観光で海外に渡航する機会が多くなっている今日、海外からのポリオウイルス侵入に対する監視体制を中止することはできない。

平成8年度は昨年度に引き続いてウイルス分離による感染源調査と、平成6年度以来2年ぶりに住民抗体保有状況を把握するための感受性調査を実施した。

I. 感染源調査 調査および検査方法

-
1. 魚津保健所 2. 黒部保健所 3. 富山市保健所 4. 上市保健所 5. 八尾保健所
6. 小杉保健所 7. 高岡保健所 8. 氷見保健所 9. 福野保健所

調査時期は春期生ワクチン投与後2か月以上経過した時点とし、魚津保健所管内の6歳以下の乳幼児から糞便を採取した。ウイルスの検索は伝染病流行予測調査検査術式(一部改定) [1]に準じて行った。採取した糞便を Eagle-MEM 培養液(日水製薬K.K)で約10%乳剤を作製し、10,000回転30分間の遠心上清に抗生物質を加えたものをウイルス分離材料とした。使用細胞は Vero 細胞および MA-104細胞を用い、細胞変性効果を指標としてウイルス分離検査を実施した。ウイルス分離陽性の場合、エンテロウイルス混合抗血清(デンカ生研K.K)および型特異抗血清(デンカ生研K.K、日本ポリオ研究所)を用いた中和試験によりウイルスの同定を行った。

結果および考察

男児37名、女児23名の乳幼児60名から糞便を採取し、ウイルス分離検査を実施した。その結果は Table 1 に示すとおりである。検査した60検体から男児10名と女児4名の糞便から計14株(分離率23.3%)の腸管系ウイルスを分離したが、ポリオ

ウイルスは分離できなかった。分離したウイルスの内訳は、コクサッキーウィルスB4型(Cox.B4)が11株、エコーウィルス22型(Echo22)が3株であった。これらのうち、コクサッキーウィルスB4型は発熱、上気道炎、無菌性髄膜炎や発疹性疾患を起こすことがよく知られており、全国的にみても1996年6月から9月にかけて多数分離されている[2]。県内においては、富山県結核・感染症サーベイランス事業のウイルス検査で、10月初旬に風邪様症状を示した幼児から1株分離された。しかし、当該ウイルスが分離された魚津市の幼児は、臨床的所見を示さず、不顕性感染であった。エコーウィルス22型は、これまでのこの調査でよく分離されたので、けっして珍しいウイルスではないが、全国的にも分離報告は少ない。不顕性感染または軽度の「夏かぜ」を起こすかもしれない。コクサッキーウィルスB4型11株の内10株は、男女とも1~3歳の幼児から分離され(6歳男子から1株)、エコーウィルス22型は3株とも0~2歳の乳幼児から分離された。両ウイルスとも低年齢の乳幼児の間に浸淫していたものと思われた。

これらの結果から、検体を採取した本年9月に

Table 1. Virus Isolation from Feces of Children

Area	Sex	Age (year)	No. of feces	Virus isolation positive		Identification of isolates	
				No.	Rate	Cox. B4	Echo 22
Uozu	Male	0	3				
		1	5	2	40.0%	1	1
		2	10	5	50.0%	4	1
		3	6	2	33.3%	2	
		4	0				
		5	6				
		6	7	1	14.3%	1	
	Subtotal		37	10	27.0%	8	2
Female	Female	0	2	1	50.0%		1
		1	4	1	25.0%	1	
		2	5	1	20.0%	1	
		3	4	1	25.0%	1	
		4	0				
		5	5				
		6	3				
	Subtotal		23	4	17.4%	3	1
Total			60	14	23.3%	11	3

Date of Survey : Sep. 4~17, 1996

においては、Cox. B 4, Echo22などの腸管系ウイルスが県内に浸淫していたものと考えられるが、ポリオウイルスは分離されなかった。調査地区および対象者数が少ないので全県的な状況にまで言及することはできないが、後述の感受性調査成績から見ても、県内に野生型ポリオウイルスは存在し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

黒部、富山、高岡、福野、魚津、八尾、小杉、上市、氷見の各保健所管内で、平成8年7月から12月にかけて、乳児から成人までの全年齢層を対象に予防接種歴の調査と採血が行われた。

中和抗体価の測定方法は、伝染病流行予測調査検査術式（一部改定）[1]に準じて行った。被験血清を維持培養液で4倍希釀し、56℃30分間非効化した後、その $50\mu l$ を96穴マイクロプレート上で滅菌チップを用いて2倍段階希釀した。希釀された血清それぞれに $100\text{TCID}_{50}/50\mu l$ となるように調製した弱毒セーピンウイルス $50\mu l$ を加えてよく混和し、37℃3時間および4℃一晩の中和反応を行った。中和後Vero細胞浮遊液（ $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ml）を $100\mu l$ ずつ加え37℃で培養した。ウイルスによる細胞変性効果（CPE）を1週間観察し、接種ウイルスを50%以上中和した血清の最高希釀倍数の逆数を中和抗体価とした。

本年実施した測定方法は一部改定されており、血清の最終希釀倍数は従来法の512倍から1024倍に改められた。したがって後述の平均抗体価の算出結果においては、特に高抗体価を示す年齢層で従来法で実施した結果よりも高い抗体価を示すことになる。抗原として使用した弱毒セーピンウイルスは、1型、2型、3型とも昭和59年度に国立予防衛生研究所から分与されたウイルスを当研究所でVero細胞に7代継代したウイルスを使用した。

結果および考察

採血された血清は0歳から71歳までの合計238件である。検体の年齢区分とその検査件数およびポリオウイルスの各型に対する中和抗体価の測定結果をTable 2に示す。抗体価4倍以上を陽性とした抗体保有者の抗体保有率は、全体で1型は89.1%（212/238）、2型は97.9%（233/238）、3型は69.3%（165/238）を示し、2型がもっとも高く、次いで1型、3型の順で、3型の抗体保有率がやや低いものの、いずれの型も集団免疫としては良好な抗体保有状況を示し、前回実施した平成6年度の調査結果と同様な傾向であった[3]。ウイルス型別に年齢区分の抗体保有率を見ると、1型では20～24歳の保有率が65.4%とやや低い傾向を示したが、0～1歳と25～29歳が75.0%，その他の年齢区分では90～100%であり、2型では各年齢区分とも90～100%と高率を示した。一方3型では0～1歳が35.0%と低率であり、10～14歳および15～19歳がそれぞれ57.6%，58.1%，25～29歳では60.0%とやや低く、その他の年齢層では73.1%～95.5%の保有率を示した。平成6年度の本調査結果では年齢層における抗体保有率の変動は少なかった[3]。本年度の結果に見られた抗体保有率の年齢区分によるばらつきは平成5年度の調査で見られた抗体保有率の低い年齢層[4]が、加齢とともに移行したためと考えられ、このことは、1991～94年度流行予測調査の全国集計[5]で指摘されているところである。抗体保有者の平均抗体価（抗体価 ≥ 1024 倍は1024倍として計算）は、2型が全体で133.8倍であり、いずれの年齢区分でも高い値を示していた。1型では全体で126.8倍であったが、20～24歳では39.2倍を示すなど、低い値を示す年齢区分が見られた。また、3型では0～1歳で172.3倍、2～3歳で69.4倍を示したが、その他の年齢層では若年層にも低い抗体価が多めに見られ、全体の平均抗体価も20.9倍と低かった。

ワクチン歴別の抗体保有状況をTable 3に示した。1型と2型の各抗体は、1回のワクチン接種でいずれも充分な抗体獲得率を示した。しかし、

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

Type 1

Age group (years)	No. of serum with neutralizing antibody titer										Positive rate	Geometric mean titer*	
	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024	Total		
0~1	5	0	0	0	0	1	0	1	5	8	20	75.0%	615.9
2~3	2	0	0	0	0	0	0	3	0	16	21	90.5%	822.7
4~6	0	0	0	0	0	3	3	3	3	10	22	100.0%	397.9
7~9	1	0	0	0	1	3	3	7	3	4	22	95.5%	247.7
10~14	1	1	1	4	3	7	6	3	4	3	33	97.0%	94.5
15~19	0	2	2	4	2	10	3	3	4	1	31	100.0%	65.4
20~24	9	0	5	0	5	4	1	0	1	1	26	65.4%	39.2
25~29	5	1	2	0	1	5	5	1	0	0	20	75.0%	53.2
30~39	2	1	0	6	3	2	1	4	1	0	20	90.0%	48.9
40~	1	2	0	1	8	4	3	2	1	0	22	95.5%	49.1
Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	100.0%	512.0
Total	26	7	10	15	23	39	25	27	23	43	238	89.1%	126.8
	10.9%	2.9%	4.2%	6.3%	9.7%	16.4%	10.5%	11.3%	9.7%	18.1%	100.0%		

Type 2

Age group (years)	No. of serum with neutralizing antibody titer										Positive rate	Geometric mean titer*	
	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024	Total		
0~1	2	0	0	0	0	0	1	3	4	10	20	90.0%	620.7
2~3	0	0	0	0	0	2	1	5	10	3	21	100.0%	368.1
4~6	0	0	0	0	1	5	4	5	5	2	22	100.0%	199.0
7~9	1	0	0	0	2	8	5	5	1	0	22	95.5%	106.5
10~14	0	0	0	2	5	9	8	6	2	1	33	100.0%	99.5
15~19	0	0	2	3	4	12	7	3	0	0	31	100.0%	59.8
20~24	1	1	0	0	3	3	8	7	1	2	26	96.2%	131.6
25~29	1	0	1	0	4	3	5	4	1	1	20	95.0%	102.8
30~39	0	0	0	3	2	2	4	6	2	1	20	100.0%	119.4
40~	0	0	0	3	4	5	7	1	1	1	22	100.0%	77.3
Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	100.0%	512.0
Total	5	1	3	11	25	49	50	45	28	21	238	97.9%	133.8
	2.1%	0.4%	1.3%	4.6%	10.5%	20.6%	21.0%	18.9%	11.8%	8.8%	100.0%		

Type 3

Age group (years)	No. of serum with neutralizing antibody titer										Positive rate	Geometric mean titer*	
	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≥1024	Total		
0~1	13	0	0	1	1	0	1	1	2	1	20	35.0%	172.3
2~3	4	0	2	0	4	7	0	1	2	1	21	81.0%	69.4
4~6	3	0	5	1	2	7	2	2	0	0	22	86.4%	39.8
7~9	4	1	6	6	1	3	1	0	0	0	22	81.8%	17.3
10~14	14	8	8	2	1	0	0	0	0	0	33	57.6%	6.9
15~19	13	2	6	4	2	3	1	0	0	0	31	58.1%	16.6
20~24	7	4	8	4	2	1	0	0	0	0	26	73.1%	10.3
25~29	8	4	5	1	1	0	0	1	0	0	20	60.0%	10.1
30~39	5	4	3	2	3	1	2	0	0	0	20	75.0%	16.0
40~	1	1	5	3	4	2	6	0	0	0	22	95.5%	30.0
Unknown	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.0%	—
Total	73	24	48	24	21	24	13	5	4	2	238	69.3%	20.9
	30.7%	10.1%	20.2%	10.1%	8.8%	10.1%	5.5%	2.1%	1.7%	0.8%	100.0%		

* Titer of ≥1024 was calculated as 1024

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

Type 1		Times of vaccination				No vaccination		Unknown	
Age group (years)	No.*	Twice		Once		Unknown		No.*	Rate
		No.*	Rate	No.*	Rate	No.*	Rate		
0~1	10/11	90.9%		3/3	100.0%			1/5	20.0%
2~3	15/15	100.0%		2/2	100.0%			1/3	33.3%
4~6	20/20	100.0%						1/1	100.0%
7~9	16/16	100.0%		1/1	100.0%	2/2	100.0%	0/1	0.0%
10~14	25/25	100.0%		1/1	100.0%	3/3	100.0%		
15~19	21/21	100.0%				7/7	100.0%	1/1	100.0%
20~24	1/1	100.0%				1/1	100.0%		
25~29	2/3	66.7%				1/1	100.0%	1/1	100.0%
30~39	1/1	100.0%				1/1	100.0%		
40~						1/1	100.0%	11/12	91.7%
Unknown								9/9	100.0%
Total	111/113	98.2%		7/7	100.0%	16/16	100.0%	16/24	66.7%
				134/136	98.5%			62/78	79.5%

Type 2		Times of vaccination				No vaccination		Unknown	
Age group (years)	No.*	Twice		Once		Unknown		No.*	Rate
		No.*	Rate	No.*	Rate	No.*	Rate		
0~1	11/11	100.0%		3/3	100.0%			3/5	60.0%
2~3	15/15	100.0%		2/2	100.0%			3/3	100.0%
4~6	20/20	100.0%						1/1	100.0%
7~9	16/16	100.0%		1/1	100.0%	2/2	100.0%	0/1	0.0%
10~14	25/25	100.0%		1/1	100.0%	3/3	100.0%		
15~19	21/21	100.0%				7/7	100.0%	1/1	100.0%
20~24	1/1	100.0%				1/1	100.0%		
25~29	3/3	100.0%				1/1	100.0%	1/1	100.0%
30~39	1/1	100.0%				1/1	100.0%		
40~						1/1	100.0%	12/12	100.0%
Unknown								9/9	100.0%
Total	113/113	100.0%		7/7	100.0%	16/16	100.0%	21/24	87.5%
				136/136	100.0%			76/78	97.40%

Type 3		Times of vaccination				No vaccination		Unknown	
Age group (years)	No.*	Twice		Once		Unknown		No.*	Rate
		No.*	Rate	No.*	Rate	No.*	Rate		
0~1	6/11	54.5%		0/3	0.0%			0/5	0.0%
2~3	14/15	93.3%		1/2	50.0%			1/3	33.3%
4~6	17/20	85.0%						1/1	100.0%
7~9	14/16	87.5%		1/1	100.0%	1/2	50.0%	0/1	0.0%
10~14	15/25	60.0%		0/1	0.0%	3/3	100.0%		
15~19	14/21	66.7%				3/7	42.9%	0/1	0.0%
20~24	0/1	0.0%				0/1	0.0%		
25~29	2/3	66.7%				1/1	100.0%	1/1	100.0%
30~39	0/1	0.0%				1/1	100.0%		
40~						1/1	100.0%	12/12	100.0%
Unknown								8/9	88.9%
Total	82/113	72.6%		2/7	28.6%	10/16	62.5%	15/24	62.5%
				94/136	69.1%			56/78	71.8%

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

3型の場合ワクチン接種者全体の抗体保有率は69.1% (94/136) で、1型、2型と比べて低率であり ($p < 0.01$)、1回接種者28.6% (2/7)、2回接種者72.6% (82/113) であることから、3型ワクチンでは2回接種は不可欠であると考えられる。また、3型ワクチン接種者の0~1歳では2回接種者の抗体保有率が54.5% (6/11)、1回接種者では0% (0/3) と低率を示したことの理由は不明で、今後検討すべきであろう。

Table 4に示すように検査した238人の個人レベルの型別抗体保有は、1+2+3型と全ての抗体を保有している人は、全体の65.1% (155/238) であり、年齢区分では、ワクチン未接種者の多い0~1歳を除いて、20~24歳、25~29歳がともに50.0%，10~14歳および15~19歳がそれぞれ57.6%，58.1%であった。ついで1+2型保有者が23.9% (57/238)、2+3型が3.8% (9/238) であった。また、1種類の抗体のみを保有している人は全体の5.7%であった。一方、全型抗体陰性者は、0歳および1歳が各1名（ワクチン歴なし）、8歳1名（ワクチン歴なし）、24歳1名（ワクチン歴不明）の合計4名1.8%であった。

以上の結果、全体として見ればポリオ1~3型

の各型に対する抗体保有率は高率であり、3種類の型に対する抗体をすべて保有している人も全体の64.9%を占めていることから、集団免疫としては良好な抗体保有状況であった。しかし個人的には3型に対する抗体を保有しない人が30.7%であり、年齢層によっては1型や3型に対する抗体保有率が低い場合がある。また、20歳代では3種類の抗体を全て保有している人が50%であることなどから、ポリオ常在国からの野生株ポリオウイルスの侵入の可能性など、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 と め

感染源調査、感受性調査の結果から、本年度もポリオウイルスは検出されず、また、ポリオウイルスに対する抗体保有率は1型、2型、3型とも集団免疫としては充分高く、国内においてはポリオ流行の可能性は少ないと考えられる。しかし、年齢区分によっては抗体保有率がやや低い年齢層が見られ、それにともない1、2、3型とともに抗体を保有する人の割合も低くなっている。現在国内には野生株のポリオウイルスは存在しないと考えられる。

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

Age group (years)	No. of sera	Negative			Positive against					
		against all types	Type1	Type2	Type3	Type1&2	Type2&3	Type1&3	Type1,2&3	
0~1	20	2	0	3	0	8	0	0	7	
2~3	21	0	0	2	0	2	0	0	17	
4~6	22	0	0	0	0	3	0	0	19	
7~9	22	1	0	0	0	3	0	0	18	
10~14	33	0	0	1	0	13	0	0	19	
15~19	31	0	0	0	0	13	0	0	18	
20~24	26	1	0	2	0	4	6	0	13	
25~29	20	0	0	3	1	5	1	0	10	
30~39	20	0	0	1	0	4	1	0	14	
40~	22	0	0	0	0	1	1	0	20	
Unknown	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
Total	238	4	0	12	1	57	9	0	155	
		100.0%	1.7%	5.0%	0.4%	23.9%	3.8%		65.1%	

えられている。しかし、野生株ポリオウイルスはポリオ常在国から国内に持ち込まれる危険性があり、幼小児期のポリオワクチンの定期接種は不可欠である。

ワクチン未接種の成人男性のポリオ疑似症例の報告〔6〕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。厚生省は各都道府県、指定都市の衛生主管部（局）長に対して、ポリオの抗体保有率の低い年齢層〔現在19歳から21歳（昭和50年から52年生まれ）の者〕を対象とする「当面のポリオ予防対策について」（健医感発第147号、平成8年11月28日付）の通知を出している。成人の場合も各人の抗体保有状況を把握し、海外旅行時ばかりでなく、家族内にワクチン接種を受ける人がいる場合は、感染発症しないように注意が必要である。

謝辞：本調査を実施するに当たり、ご協力頂いた魚津市立吉島保育所、黒部市民病院、小児科諸橋医院、厚生連高岡病院、正木医院、魚津市立東部中学校、県立八尾高等学校、富山県立大学、その他関係各位に感謝いたします。

文 献

1. 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課、国立予防衛生研究所流行予測事業委員会編（1996）。伝染病流行予測調査検査術式（一部改定）、2-8。
2. 国立予防衛生研究所、厚生省保健医療局エイズ結核感染症課編（1997）。病原微生物検出情報月報、18：74-78。
3. 中山喬、松浦久美子、森田修行、草山真由美、南部厚子、吉田慶子、田中桂子、川尻千賀子、小池美奈子、川越久美子、松井博保、遠藤京子、寺崎さち子（1995）。富山衛研年報、18、111-117。
4. 中山喬、松浦久美子、長谷川澄代、森田修行、草山真由美、南部厚子、吉田慶子、田中桂子、橋爪淑子、小池美奈子、川越久美子、水木路男、遠藤京子、布野純子（1994）。富山衛研年報、17、93-99。
5. 国立予防衛生研究所、厚生省保健医療局エイズ結核感染症課編（1997）。病原微生物検出情報月報、18：1-2。
6. 国立予防衛生研究所、厚生省保健医療局エイズ結核感染症課編（1996）。病原微生物検出情報月報、17：219-220。

インフルエンザ流行予測調査

松浦久美子 中山 喬 森田修行 北村 敬
小川寿人¹ 寺崎さち子² 小池美奈子³
田中桂子⁴ 布瀬純子⁵ 松原勝博⁶

Epidemiological Surveillance for Influenza
Virus Infection in Toyama Prefecture

Kumiko MATSUURA, Takashi NAKAYAMA, Osayuki
MORITA, Takashi KITAMURA, Hisato OGAWA¹,
Sachiko TERASAKI², Minako KOIKE³, Keiko
TANAKA⁴, Junko NUNO⁵ and Katsuhiro
MATSUBARA⁶

要 旨 1996年6月と、12月から1997年3月にかけてのインフルエンザ様患者114名について、ウイルスの検出と血清インフルエンザHI抗体価の測定を試みた結果、以下のような成績を得た。

1. 6月下旬に発生した「集団かぜ」の患者からA(H3)型ウイルスが分離された。冬期にも、12月9日に発病した患者(定点観測)からA(H3)型が分離され、A(H3)型ウイルスによるインフルエンザの流行となった。このA(H3)型ウイルスによる流行は2月中旬まで続き、その後はB型ウイルスによるインフルエンザの流行となった。

2. A(H3)型の分離株(43株)に対する抗A/武漢/359/95のHI価は256~1024倍(ホモ:1024倍)、B型の分離株(10株)に対する抗B/三重/1/93のHI価は128~256倍(ホモ:512倍)であった。

3. 冬期に発生した「集団かぜ」は、12月17日のK中学校を初発として、2月上旬まで続いた。それ以降しばらく発生は認められなかったが、3月5日に1小学校で発生した。学年または学級閉鎖の措置が合計36施設でとられ、累積患者数は1,912人であった。

本調査は、インフルエンザ様疾患の患者について調査することにより、インフルエンザ患者の実態を把握し、インフルエンザ流行の予測ならびに予防に資することを目的とするものである。インフルエンザ様患者の咽頭拭い液からのインフルエンザウイルス検出と血清抗体の測定を実施した。

調査および検査方法

-
1. 富山市保健所 2. 福野保健所 3. 高岡保健所 4. 黒部保健所 5. 小杉保健所
6. 八尾保健所

1. 調査期間

1996年6月、1996年12月～1997年3月

2. 調査対象

定点観測では、正木医院（福光町）、館小児科医院（高岡市）、小児科諸橋医院（富山市）および二本垣医院（黒部市）の協力により、1定点あたり1ヶ月間に約5名のインフルエンザ様疾患の患者を対象として調査した。一方、「集団かぜ」の発生に際しては、1集団あたり約5名の患者を対象として調べた。

3. 検査方法

定点観測の患者からは咽頭ぬぐい液を、「集団かぜ」の患者からは咽頭ぬぐい液と血液を採取した。

1) インフルエンザウイルスの検出

ウイルスの分離は咽頭拭い液をMDCK細胞に接種して行い、分離されたウイルスの同定は、日本インフルエンザセンターから分与された抗A／山形／32／89（H1N1）血清、抗A／武漢／359／95（H3N2）血清および抗B／三重／1／93血清を用いて行った。インフルエンザウイルスの遺

伝子検出は前年報〔1〕で述べたRT-PCR法を用いて行った。

2) インフルエンザウイルス HI 抗体

急性期血清と回復期血清について、インフルエンザHI抗体価を測定した。HI抗体価測定用の抗原は、デンカ生研より市販されている今シーズのワクチン株のA／山形／32／89（H1N1）株、A／武漢／359／95（H3N2）株およびB／三重／1／93株を用いた。

結 果

1. インフルエンザ様疾患の発生状況

1996年6月下旬に富山市S小学校の1クラスで「集団かぜ」が発生した。その後は、インフルエンザ様疾患の患者が11月中旬まで発生していなかつたが、下旬より発生しはじめ、12月には患者が多くなった。Fig. 1に示すように、12月17日にはT中学校、12月20日にはD小学校で「集団かぜ」が発生した。そして1月に入り、学校の3学期が始まつてすぐの1月13日には8小、中学校で「集団かぜ」

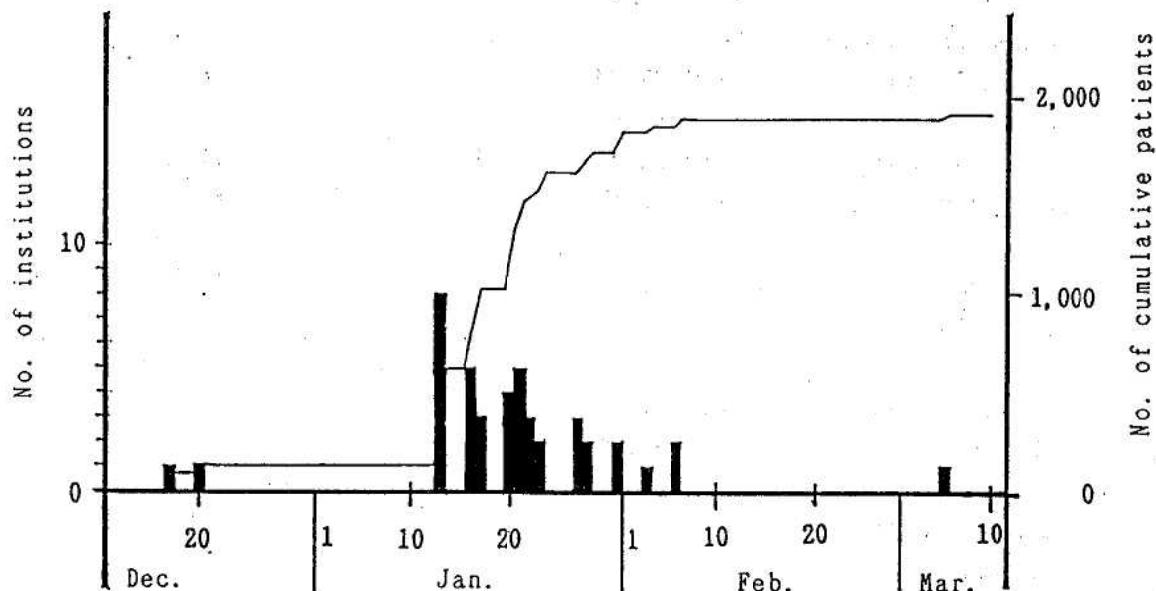


Fig. 1. Outbreaks of Influenza-like Disease in Institutions from Dec. 1996 to Mar. 1997.

■ : Number of institutions (Total number of institutions, 36)

— : Number of cumulative patients (1,912 patients)

が発生し、本格的なインフルエンザの流行期に入った。「集団かぜ」の発生は2月上旬まで続き、それ以降しばらく発生しなかったが、3月5日にK小学校で発生した。この「集団かぜ」が届出された最終のものであった。1996年12月から1997年3月までの冬期において、学年または学級閉鎖の措置が合計36施設でとられ、累積患者数は1,912人であった。

2. インフルエンザウイルスの検出

1996年6月から1997年3月までに採取した定点観測76検体、集団かぜ（7集団）33検体および検査依頼5検体（合計114検体）について、インフルエンザウイルスの検出を試みた成績をTable 1, 2, 3に示す。6月に発生した「集団かぜ」の患者からはA (H3) 型ウイルスが検出された

(Table 3)。定点観測において、12月9日に発病した患者から今冬期の初めてのインフルエンザウイルスが検出され、A (H3) 型と同定された。その後、2月の中旬まではA (H3) 型ウイルスが検出されたが、それ以降はB型ウイルスが検出されるようになった (Table 2)。冬期の「集団かぜ」では、12月に発生した2施設、1月の最初に発生した3施設および3月に発生した1施設の患者について調べた結果、6施設のうち5施設の患者からはA (H3) 型ウイルスが検出された。残りの1集団（3月発生）からはウイルスは検出できなかった (Table 3)。

114検体中44検体よりA (H3) 型ウイルス、10検体よりB型ウイルスが検出された。なお、合計54検体のうち53検体はMDCK細胞を用いてウイルスが分離され、1検体はPCR法でA (H3) 型

Table 1. Virological Examination of Patients with Influenza-like Disease (Sporadic Cases)

Sampling station	Virus detection			
	Throat swab		No. of virus detected	Type
	Date of sampling	No. of samples		
Morohashi pediatric clinic(Toyama)	Dec. 9, 1996 ～Feb. 25, 1997	15	8	A(H3)
Masaki internal clinic(Fukumitsu)	Dec. 5, 1996 ～Mar. 7, 1997	21	10	A(H3)
			6	B
Tachi pediatric clinic(Takaoka)	Dec. 7, 1996 ～Mar. 11, 1997	20	1 ¹⁾	A(H3)
			1	B
Nihongaki clinic (Kurobe)	Dec. 17, 1996 ～Mar. 11, 1997	20	8	A(H3)
			3	B
Sainou hospital (Toyama)	Dec. 22, 1996	5	4	A(H3)
Total		81	31	A(H3)
			10	B

1) Detection of Influenza virus in throat swab by RT-PCR

Table 2. Influenza Virus Detection from Patients with Influenza-like Disease (Sporadic Cases)

Date of sampling	No. of	No. of Influenza virus detected			
	sample	Fukumitu	Takaoka	Toyama	Kurobe
H8. Dec. 1～Dec. 7	2				
Dec. 8～Dec. 14	11	4, A(H3) ¹⁾			
Dec. 15～Dec. 21	6			1, A(H3)	1, A(H3)
Dec. 22～Dec. 28	6			5, A(H3)	
Dec. 29～					
H9. Jan. 4	1			1, A(H3)	
H9. Jan. 5～Jan. 11	3	2, A(H3)		1, A(H3)	
Jan. 12～Jan. 18	10	2, A(H3)		1, A(H3)	5, A(H3)
Jan. 19～Jan. 25	5	1, A(H3)	1, A(H3) ²⁾	1, A(H3)	
Jan. 26～Feb. 1	2	1, A(H3)		1, A(H3)	
Feb. 2～Feb. 8	7			1, A(H3)	
Feb. 9～Feb. 15	8				2, A(H3), 1, B
Feb. 16～Feb. 22	3	1, B			
Feb. 23～Mar. 1	3	1, B			
Mar. 2～Mar. 8	4	4, B			
Mar. 9～Mar. 15	10		1, B		2, B
Total.	81	10, A(H3)	1, A(H3)	12, A(H3)	8, A(H3)
		6, B	1, B		3, B

1) No. of virus and type detected

2) Detection of Influenza virus by RT-PCR

ウイルスの遺伝子が検出された。分離株はニワトリ赤血球をほとんど凝集せず、ヒトO型赤血球をよく凝集した為、ウイルス同定にはヒトO型赤血球を用いて行った。分離株に対するインフルエンザ抗血清のHI値はTable 4に示すようであった。A (H3) 型の分離株（43株）に対する抗A／武漢／359／95血清のHI値は256～1024倍（ホモ：1024倍）、B型の分離株（10株）に対する抗B／三重／1／93血清のHI値は128～256倍（ホモ：512倍）であった。A (H1) 型の抗A／山形／32／89血清のHI値は、全分離株に対して32倍未満であった。

3. 患者の血清H I 抗体価

「集団かぜ」の患者から採血された急性期血清30件と回復期血清29件について、HI抗体価を測定した。急性期から回復期にかけて、A／武漢／359／95 (H3N2) 抗原に対して抗体価の有意上昇（4倍以上）したのが20名、B／三重／1／93抗原に対しては2名認められた（Table 3）。A／山形／32／89 (H1N1) 抗原に対しては有意上昇したものはなかった。

抗体価の有意上昇とウイルス検出との成績を総合すると、調べた7集団のうち6集団の「かぜ」はA (H3) 型ウイルスの感染、残りの1集団の「かぜ」はB型ウイルスの感染によると判断された。これらのインフルエンザ罹患者の急性期と回復期の抗体価分布を示すとTable 5のようである。

Table 3. Virological and Serological Examinations of Patients with Influenza-like Disease (Epidemic Cases)

Sampling station	Virus detection			HI antibody examination				No. of influenza patients	Type		
	Date of sampling	No. of isolates	Type	No. of sera		No. of significant increase ¹⁾					
				Acute	Convalescent	A(H1N1)	A(H3N2)				
Shinmei primary school(Toyama)	Jun. 27, 1996	4	1	A(H3)	3	3	0	2	0	3 A(H3)	
Kosugiminami junior high school(Kosugi)	Dec. 20, 1996	5	1	A(H3)	5	5	0	4	0	4 A(H3)	
Demachi primary school(Tonami)	Dec. 20, 1996	5	1	A(H3)	5	4	0	3	0	4 A(H3)	
Oida primary school(Toyama)	Jan. 13, 1997	4	3	A(H3)	3	3	0	3	0	4 A(H3)	
Funami junior high school(Kurobe)	Jan. 13, 1997	5	4	A(H3)	5	5	0	4	0	4 A(H3)	
Jyouyama junior high school(Yatsuo)	Mar. 6, 1997	5	0	A(H3)	5	5	0	4	0	4 A(H3)	
Kosugi primary school(Kosugi)					4	4	0	0	2	2 B	
Total		33	13	A(H3)	30	29	0	20	2	23 A(H3)	
									2	B	

1) Antigen, A(H1N1); A/Yamagata/32/89, A(H3N2); A/Wuhan/359/95, B; B/Mie/1/93

Table 4. HI Titers of Reference Antisera against Isolated Virus Strains

Antigen ¹⁾	HI titer ²⁾ of Anti-A/Wuhan /359/95(H3N2)	Antigen	HI titer of Anti-A/Wuhan /359/95(H3N2)
A/Wuhan/359/95	1024	A/Toyama/8/97	512
		A/Toyama/9/97	512
A/Toyama/39/96	1024	A/Toyama/10/97	512
A/Toyama/40/96	512	A/Toyama/11/97	512
A/Toyama/41/96	256	A/Toyama/12/97	256
A/Toyama/42/96	512	A/Toyama/13/97	256
A/Toyama/43/96	512	A/Toyama/14/97	512
A/Toyama/44/96	512	A/Toyama/15/97	512
A/Toyama/45/96	256	A/Toyama/16/97	512
A/Toyama/46/96	256	A/Toyama/17/97	256
A/Toyama/47/96	256	A/Toyama/18/97	256
A/Toyama/48/96	512	A/Toyama/19/97	256
A/Toyama/49/96	256	A/Toyama/20/97	256
A/Toyama/50/96	512	A/Toyama/21/97	256
A/Toyama/51/96	256	A/Toyama/22/97	1024
A/Toyama/52/96	256	A/Toyama/23/97	512
A/Toyama/1/97	512	A/Toyama/24/97	256
A/Toyama/2/97	512	A/Toyama/25/97	512
A/Toyama/3/97	512	A/Toyama/26/97	512
A/Toyama/4/97	256	A/Toyama/27/97	256
A/Toyama/5/97	256	A/Toyama/28/97	256
A/Toyama/6/97	512	A/Toyama/29/97	1024
A/Toyama/7/97	256		

Antigen ¹⁾	HI titer ²⁾ of Anti-B/Mie/ 1/93	Antigen	HI titer of Anti-B/Mie/ 1/93
B/Mie/1/93	512	B/Toyama/5/97	256
		B/Toyama/6/97	256
B/Toyama/1/97	256	B/Toyama/7/97	256
B/Toyama/2/97	256	B/Toyama/8/97	256
B/Toyama/3/97	256	B/Toyama/9/97	256
B/Toyama/4/97	256	B/Toyama/10/97	128

1)A/Wuhan/359/95 and B/Mie/1/93 antigens were supplied from Japan Influenza Center.
 A/Toyama/39/96~A/Toyama/29/97 antigens and B/Toyama/1/97~B/Toyama/10/97 antigens were isolated from throat swabs of patients with influenza-like disease in Toyama Prefecture from June 1996 to March 1997.

2)HI titers of antisera were examined with human type O erythrocytes. Antisera were supplied from Japan Influenza Center.

Table 5. Distribution of HI Antibody Titers among Influenza Type A(H3) and Type B Patients

Patient	Serum	HI antibody titer ¹⁾								Total
		<16	16	32	64	128	256	512	1024	
A(H3)	Acute	1	1	5	12	2				21
	Convalescent				1		8	9	2	20
B	Acute					2				2
	Convalescent						1	1	2	

1) Antigen: A(H3N2), A/Wuhun/359/95; B, B/Mie/1/93

A (H3) 型罹患者21名の急性期の抗体価は1名(<16)を除き16~128倍、回復期は64~1024倍であった。一方、B型罹患者2名の急性期抗体価は128倍、回復期は512と1024倍であった。これらの罹患者の年令は9~15歳で、ワクチン接種を受けた者はいなかったが、ほとんどの罹患者は急性期にワクチン株に対する抗体を保有していた。

考 察

インフルエンザの流行シーズンから外れた6月下旬に「集団かぜ」が発生し、その患者からA (H3) 型ウイルスが分離され、血清学的にもA (H3) 型ウイルスの感染が確認された。ほかの県でも非流行期にA (H3) 型が検出[2, 3]された。非流行期に検出されたウイルスは、次期の流行シーズンの流行株になる可能性が指摘されていることから、今冬期はA (H3) 型ウイルスによるインフルエンザの流行が予測された。

12月より定点観測と「集団かぜ」のインフルエンザ様患者について調査した結果、富山県における冬期のインフルエンザは、予測されたように、

A (H3) 型ウイルスによって12月上旬より発生した。このA (H3) 型ウイルスによるインフルエンザの流行は2月中旬まで続いたが、この頃よりB型ウイルスによるインフルエンザも発生しはじめ、3月にはB型ウイルスによる患者ばかりとなった。従って、今冬期も、2種類のインフルエンザウイルスによる「かぜ」が発生したこと明らかとなった。県内では、冬期に学年または学級閉鎖の措置が合計36施設でとられ、累積患者数は1,912人で、中規模の流行であった。3月末でインフルエンザの流行は終息したように推測されるが、感染症サーベイランスの感染症情報によると、4月、5月にもインフルエンザ様疾患の患者が散発的にみられる。他県では4月、5月にもインフルエンザの患者が発生し、B型ウイルスが検出されている[4]。

A (H3) 型分離株(43株)に対する抗A／武漢／359／95血清のHI価は256~1024倍(ホモ:1024倍)、B型分離株(10株)に対する抗B／三重／1／95血清のHI価は128~256倍(ホモ:512倍)を示し、分離株にはワクチン株とは抗原性が少し異なった株も含まれている可能性が示唆された。

謝辞：検査材料の採取と臨床症状の調査にご協力頂いた小児科諸橋医院、正木医院、館小児科医院および二本垣医院の関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 松浦久美子、中山喬、長谷川澄代、森田修行、吉田慶子、水木路男、布野純子、南部厚子、大垣由香里、遠藤京子、田中桂子（1993）。富山衛研年報、

- 16, 106-114.
2. 水田克巳、庄司真、鈴木宏（1996）。国立予防衛生研究所・厚生省保険医療局エイズ結核感染症課編、病原微生物検出情報、17, 270.
3. 島田慎一、淵上博司、井上豊、篠原美千代、内田和江、後藤敦（1996）。国立予防衛生研究所・厚生省保険医療局エイズ結核感染症課編、病原微生物検出情報、17, 270.
4. WHOインフルエンザ・呼吸器ウイルス協力センター（1997）。インフルエンザ流行情報（5）。

河川水中のウイルス：富山県内河川の ウイルス汚染に関する定点観測 (1993年～1995年)

松浦久美子 石倉康宏 長谷川澄代 中山喬
森田修行 北村敬

Viruses in River Water: Epidemiological
Surveillance for Viral Pollution of Rivers
in Toyama Prefecture from 1993 to 1995

Kumiko MATSUURA, Mitsuhiro ISHIKURA,
Sumiyo HASEGAWA, Takashi NAKAYAMA,
Osayuki MORITA and Takashi KITAMURA

要旨 1993年10月より1995年9月までの2年間、富山県内の3河川（いたち川、千保川、小矢部川）におけるウイルス汚染の実態調査を行った結果、以下の成績を得た。

1) 河川水からポリオウイルス、エコーウイルス、コクサッキーウイルスB型およびレオウイルスが検出された。なかでもレオウイルスは高い頻度で検出されたが、夏期より冬期に検出率が高かった。

2) いたち川のウイルス検出状況を前回調査（1979年～1985年）の検出状況と比較すると、今回の検出率は前回より低くなった。特に、ポリオウイルスは1995年6月に1株分離されただけであった。また、レオウイルスの検出頻度もやや減少の傾向がみられた。このことは、河川のウイルス汚染度が低くなつたことを示唆し、下水道普及率が前回の調査時より約20%上昇、環境の整備も進み、また生活様式の変化したことなどによると推測される。

飲料水または貝類に起因したA型肝炎やウイルス性急性胃腸炎の患者が発生し、問題となつてゐる。これらの感染症の予防のためには、水系のウイルス汚染の状況を把握し、水中でのウイルスの生態を解明することが重要である。これらの観点から、我々はこれまでに生活水とかかわりの深い河川についてのウイルス汚染に関して1979年から1981年にかけて第1回目の実態調査、次に1983年から1985年にかけて第2回目の実態調査を行い、富山県内の河川は多種類の腸管系ウイルスでかなり汚染されていること、検出されたウイルスはほとんどのヒト由来であることなどを報告してきた

[1, 2, 3]。今回、第3回目の実態調査を1993年10月から1995年9月までの2年間を行なつたので、その調査結果について報告をする。

調査方法

(1) 調査地点と試料： Fig. 1 に示した富山県内の3河川のI, S, O定点で毎月2回（原則として第2週と第4週）試料を採取した。I定点は富山市の中心部を流れる「いたち川」の最も下流地域（前調査報告のI 2定点）、S定点は高岡市内

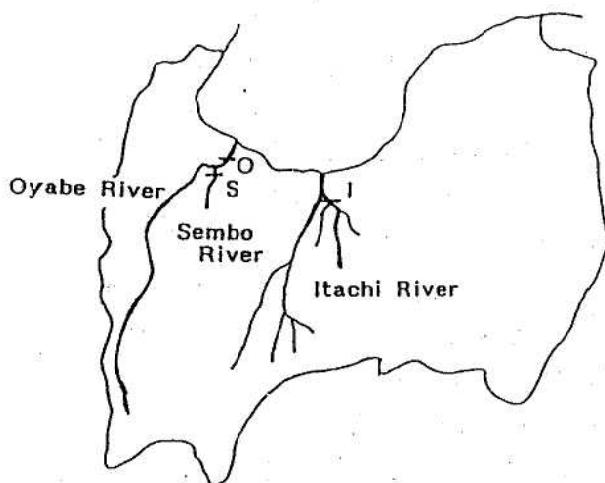


Fig.1. Rivers Examined and Sampling Stations in Toyama Prefecture.

Station I: Itachi River; Station S: Sembo River; Station O: Oyabe River

に流れる「千保川」の下流地域およびO定点は県の西部に流れる「小矢部川」の下流地域に設定した。なお、「小矢部川」には「千保川」がS定点より下流地域で合流しており、この「小矢部川」の川幅は他の2河川より3倍程大きい。これらの定点にタンポン(約50g脱脂綿)2個を2日間河川水中に浸漬し、そのタンポンから絞り出した河水700~800mlを調査試料とした。

(2)調査期間： 1993年10月～1995年9月

(3)ウイルス分離： 採取した河川水試料をFig. 2のように処理して濃縮試料を作製し、Vero細胞、RD-18S細胞およびMA104細胞に接種、また一部の試料はMK細胞にも接種して培養を行った。CPEやヒトO型赤血球との凝集性を指標としてウイルス分離を行った。

Two cotton pads(50g each) were immersed in the river for 2 days

↓
Sample : 700-800 ml river water squeezed from the cotton pads

↓
Centrifugation at 3,000 rpm 30 min

↓
Supernatant, addition of MgCl₂(0.05M),
pH adjusted to 3.5(0.5N HCl)

↓
Filtration through cellulose nitrate membrane
filter(0.45μm)

↓
Filter membrane in 3% beef extract solution(10 ml)

↓
Sonication 5 min

↓
Centrifugation at 12,000 rpm 30 min

Concentrated sample : Supernatant(addition of antibiotics)

Virus detection : Virus isolation by cell culture
(RD-18S, Vero, MA104 cells)

Fig.2. Procedure for Virus Isolation from River Water

結 果

Table 1 に 3 定点 (I, S, O) におけるウイルス検出状況を示す。検出されたウイルスはレオウイルス、ポリオウイルス、エコーウイルスおよびコクサッキーウイルス B 型であった。このうちレオウイルスの検出頻度が最も高く、頻繁に検出されたが、夏期より冬期の方が検出率は高い傾向であった。ポリオウイルスは 6 株分離された。未同定株については現在検討中である。3 定点の検出状況をみると、3 定点ともエコーウイルス 3 型がほぼ同時期に、レオウイルス 2 型が多く検出されたことから、3 定点の検出ウイルスの種類に大きな違いはなかった。しかし、O 定点の検出率は他の 2 定点よりやや低かった。

I 定点は前回調査（1979年～1985年）より継続して採取している定点なので、今回のウイルス検出状況と前回調査の検出状況とを共に示すと Table 2 のようである。ポリオウイルスは、前回では乳幼児へのポリオワクチンが実施された後の時期に必ず検出されたのが、今回は1995年6月に1株のみ分離された。また、レオウイルスが前回ほとんど調査毎に検出されていたが、今回は夏期に検出されない時期があった。他の腸管系ウイルスの種類や検出頻度も今回は少なかった。

考 察

第1回目の河川におけるウイルス汚染調査をおこなった1979年頃の富山県の下水道普及率は約30%で、生活排水の多くが河川中に流入している状態であった。その頃、ウイルスに汚染された水に起因すると推測される感染症の発生がときおり報告され、水中のウイルス汚染が問題にされていた。しかし、水中からのウイルス検出法はまだ確立されておらず、またウイルス検出まで長期間必要な爲、日本では環境水中のウイルス汚染の実態について調られてなかった。著者らは、ウイルスをメンプランフィルターに吸着させる方法を導入して、河川水約1,000mlからウイルスの検出を試みたと

ころ、多種類のウイルスが検出された。これより河川はウイルスによってかなり汚染されていることが判明し、水系の微生物汚染の監視にはウイルスの調査も必要であることを指摘してきた。

この1979年の第1回調査を行なってから15年たった1993年では、下水道普及率は約50%台に上昇、環境の整備もなされつつあり、また乳児の多くが紙オムツを使用等と生活様式も変化してきた。このような状況のもと、今回第3回目の調査を行い河川のウイルス汚染状況を把握しておくことは、公衆衛生上たいへん重要である。

今回調査した1993年から1995年にかけての河川水のウイルス汚染状況を、1979年から1985年頃と比較すると、ポリオウイルスの検出状況に大きい変化がみられた。前回、I 定点において乳幼児にポリオ生ワクチンの実施後の時期には、河川水からポリオウイルスが必ず分離されていたのが、今回は1995年6月に1株だけであった。他の S や O 定点でも少なく、3 定点の検出株は合計して 6 株であった。これらの株の由来については、PCR-RFLP 法による遺伝子型別を用いて検討中である。このポリオウイルスの分離数が少なかったことは、1979年～1985年頃に比べて1993年～1995年の河川のポリオウイルスの汚染度は低くなった考えられる。一方、レオウイルスは今回も多く検出されたが、夏期には検出されないことがあった。前回は年間を通して頻繁に検出されていた。これよりレオウイルスの汚染度も下がったことが示唆される。他のウイルスの検出種類や頻度も減少した。従って、総合すると、河川のウイルス汚染度は低くなったと考えられる。しかし、まだ河川はウイルスによって汚染されており、河川水は水道水源として利用される場合が多いので、生活排水や下水の完全処理の早期実現が望まれる。

平成9年10月1日

Table 1. Virus Isolation from Water Samples of Itachi, Sembo and Orabe River
(Octover 1993-September 1995)

Stations	Isolates	1993 ¹⁾			1994								
		Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	
<p>2)</p>													
St. I	E, CB, +					E3		E3		E3			
	R	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
<p>P</p>													
St. S	E, CB, +		E3+	E3	E3	+	E3	E3	E3	E3			
	R	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R1		
<p>P</p>													
St. O	E, CB, +				E3+	E3	E3			E3			
	R	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	
<p>1994</p>													
	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.
<p>P1</p>													
St. I	E3,+ CB5,+												
	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R1,2
<p>P3</p>													
St. S	E3	+	CB1	+	E25								CB3
	R2	R2	R2	R2	R2	R1	R2			R2	R2	R2	
<p>P2</p>													
St. O		+											
	R2	R2								R1			R1

1) Year and month collected water samples

2) P, Poliovirus; E, Echovirus; CB, Coxsackievirus type B; R, Reovirus; +, Unidentified

Table 2. Virus Isolation from Water Samples of Itachi River

Survey	Year	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.
	1979						*	R2	R2	Ns		P1, 2, 3 R1, 2, 3	P2, 3, CB4 R1, 2, 3
First	1980	Ad5	Ad5			P1, 2, CB5	CB5				E25	P2, 3 R1, 2	CB4 R1, 2
		R2, 3	R1, 2	Ns	R2, 3	R1, 2	R2	R2					
	1981			P2, CB2, 4	P2	P2	P2, CB2**						
				R2	Ad2, E25, R2	R2	R2						
	1983						*	R2	Ns		*	P2	
Second	1984		P2		P2, 3, *		CB5					P2	
		R2	Ns	R2	Ns	R2	Ns	R1, 2	Ns	R2	Ns	R1, 2	Ns
	1985	+	R1, 2	Ns	R1, 2, 3	Ns	P2 **						
	1993								*				
Third	1994	E3	E3	E3	R2	R2	E3	R2			R2	R2	R2
		R2	R2	R2	R2	R2							
	1995						P1	R2	R2		**		

1) Year and month collected water samples

2) * , the beginning of survey; ** , the end of survey

3) P, poliovirus; E, echovirus; CB, coxsackievirus type B; Ad, adenovirus; Reo, reovirus; +, unidentified;
Ns, not surveyed.

文 獻

1. Matsuura, K., Hasegawa, S., Nakayama, T., Morita, O. and Uetake, H. (1984). Microbiol. Immunol. 28, 575-588.
2. Matsuura, K., Hasegawa, S., Nakayama, T.,
- Morita, O. and Uetake, H. (1988). Microbiol. Immunol. 32, 1221-1234.
3. Matsuura, K., Ishikura, M., Nakayama, T., Hasegawa, S., Morita, O., Katori, k. and Uetake, H. (1993). Microbiol. Immunol. 37, 305-310.

富山県内に流行しているつつが虫病リケッチャの型別

石倉康宏 渡辺 譲 北村 敬

Serotype of *Orientia tsutsugamushi* from Patients with
Tsutsugamushi Disease and Small Field
Rodents in Toyama Prefecture

Mitsuhiro ISHIKURA, Mamoru WATANABE
and Takashi KITAMURA

要 旨 富山県内で流行している *Orientia tsutsugamushi* (Ot) の血清型を交叉吸収 IF 法と nested PCR 法 (PCR 法) で型別した。

PCR 法と IF 法で型別した成績を総合すると、これまで県内に発生した205名のつつが虫患者のうち、188名が Kawasaki 型、14名が Karp 型、1名が Gilliam 型、2名が型不明の Ot に感染しており、kawasaki 型の感染者が圧倒的に多かった。特に、患者が多発している黒部、入善地区では Karp 型感染者が4名で、181名が Kawasaki 型に感染していた。そして、Kawasaki 型に感染した患者は全例秋に、karp 型に感染した患者は10例が春に、4例が秋に発生していた。

患者発生地に生息する野鼠から分離した90株の Ot を PCR 法で型別すると、Karp 型が 81 株と圧倒的に多く、Kawasaki 型はドブネズミから分離された 2 株だけであった。そのほかに、Karp 型と Kawasaki 型との混合型が 5 株、残りの 2 株は型別できなかった。

つつが虫病の原因菌である *Orientia tsutsugamushi* (Ot) には多くの血清型が存在する。日本における血清型は、これまでに Kato, Karp, Gilliam, Kroki, Kawasaki, Shimoskosi の 6 つの型が存在することが明らかにされている [1, 2]。また、血清型とこれを保有するツツガムシ種との間には密接な関係があり、アカツツガムシは Kato 型、フトゲツツガムシは Karp 型と Gilliam 型、タテツツガムシは Kawasaki 型と Kuroki 型の Ot をそれぞれに保有することが明らかにされつつある [1-7]。したがって、患者や野鼠に感染した Ot の血清型を正確に型別できれば、媒介ツツガムシの種を推定できるし、その分布も知ることができ、つつが

虫病の予防に重要な情報を得ることができる。

以上の観点にたって、我々これまでに県内に発生した患者や野鼠に感染した Ot の血清型を交叉吸収IF法で型別して来たが [9-10]、今回、Furuya ら [11] が開発した nested PCR 法で再確認をしたのでその結果を報告する。

材 料 と 方 法

1. 供試リケッチャ

Kato, karp, Gilliam の外に、Kawasaki, Kroki (福井衛研より分与) の 5 株を L 細胞で増殖させ、使用した。

2. 感染した *Ot* の型別法

患者や野鼠から分離した *Ot* 株、患者の血餅、血清を材料にして nested PCR 法と交叉吸収法で感染した *Ot* の型別を行った。

a. nested PCR 法 (PCR法)

この方法は Furuya ら [11] が開発したもので、*Rt* の主要抗原である 56-kDa タンパク遺伝子をタゲットとし、*Rt* の血清型に特異的なプライマーを構築し、nested PCR 法で型別する方法である(図1)。

マウスを用いて分離された *Rt* からの鑄型 DNA は、マウス脾臓の小片(約 2 mm四方)を 1.5ml 用チューブに入れ、1% SDS 加 TAE buffer (40mM Tris base, 20mM acetic acid, 1mM EDTA) を 450ul 加え、それに 1 mg の proteinase K (和光) 加え、55°C, 60分反応後、反応液はフェノールとクロロホルムで処理し、アルコール沈殿によって精製した。患者餅血からの鑄型 DNA は、血餅に等量の蒸留水加えガラスホモジナイザーでホモジナイズした後、2% SDS の入った 2 倍濃度の TAE buffer を等量と 1 mg

の proteinase K を加え、55°C で 1 時間反応後、反応液はマウス脾臓と同様に処理し、精製した。*Rt* 感染 L 細胞からはマウス脾臓と同じ方法で抽出精製した。

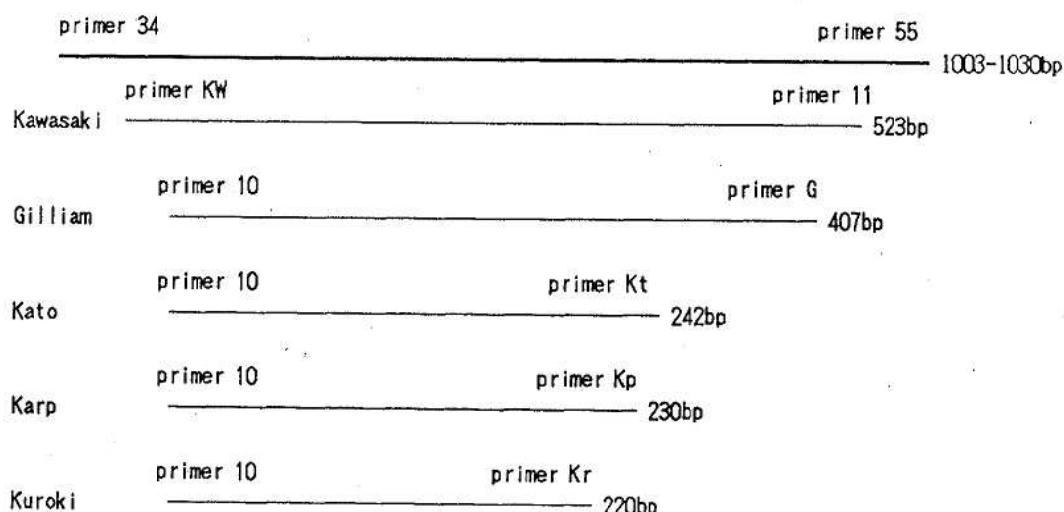
プライマーは furuya ら [11] の方法にしたがつて合成した。即ち、Gilliam 株と Karp 株の 56-kDa 抗原遺伝子から *Rt* 遺伝子だけが検出できる一対のプライマーを選定し、その内側に *Rt* の血清型特異的なプライマーを選定したものである(図1)。PCR の試薬は TAKARA の PCR キットを用い、反応は熱変性 94°C 30秒、アニーリング 57°C 2 分、相補鎖の合成 70°C 2 分を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。2nd PCR は、1st PCR 産物 (5ul) を鑄型として同様に行った。

PCR によって増幅された DNA は 2% アガロースゲルによる電気泳動を行い、エチジウムプロマイド染色により、紫外線下で検出した。

b. 交叉吸収 IF 法

この方法は我々によって開発 [8, 9] されたもので、回復期の患者血清を各血清型の異なる *Rt* 感染 L 細胞で交叉吸収し、残存抗体を蛍光抗

O. tsutsugamushi の 56-kDa 抗原遺伝子



Furuya et al J. Clin. Microbiol. 31, 1637, 1993.

図1. Nested PCR に使用した primer

体法で測定することによって感染した *Ot* の血清型を推定するものである。

結 果

1. ヒトに感染した *Ot* の血清型

a. 患者の血清型

患者血液から分離した17株の *Ot* (L細胞分離株: 14株, マウス分離株: 3株) を PCR 法で型別した。患者発生地の黒部入善で秋に発生した患者から分離した15株の *Ot* は全て Kawasaki 型で、黒部入善地区以外で発生した患者から分離した残りの 2 株は Karp 型であった。

-70°C のフリーザーに保存してあった33件の患者（血清学的につつが虫病と確認された患者）血餅から鑄型 DNA を精製し、PCR 法で感染した *Ot* を型別した。10病日までに採血された23件の血餅は全て型別され、Karp 型が 5 例、Kawasaki 型が18例であった。一方、11病日以後に採血された11例の血餅では 2 例だけが型別可能で 2 例とも Karp 型であった。

PCR 法で型別された成績と交叉吸収 IF 法の成績を比較すると、交叉吸収 IF 法で Karp 型と型別された *Ot* は PCR 法でも全て Karp 型であったが、我々が Gilliam N と仮称した型 [8, 10] は全例 Kawasaki 型であることが明らかとなつた。

PCR 法と交叉吸収 IF 法で型別した成績を総合すると、これまで県内で発生した208名の患者のうち、191名が Kawasaki 型、14名が Karp 型、1 名が Gilliam 型（新潟県での感染が濃厚）、2 名が型不明であり、Kawasaki 型の感染が圧倒的に多かった。特に、患者が多発している黒部入善地区では、Karp 型感染者が18年間に 4 名発生しただけで、184名は Kawasaki 型の *Ot* に感染していることが判明した。一方、血清型と発生時期の関係を見ると、Kawasaki 型感染患者は全て 9 月から12月の秋季に発生し、Karp 型感染者患者は14名中10名が春季に、4 名（黒部入善）秋季に発生していた（表 1）。

b. 一般住民の血清型

一般住民で *Ot* に対する抗体を保有する人の血清を用いて、感染 *Ot* の血清型を交叉吸収 IF 法で型別した。

患者発生地の黒部入善地区の住民51名の成績みると、27名が Karp 型、14名が Kawasaki 型の *Ot* に感染しており、患者と異なり Kawasaki 型感染者より Karp 型の感染者が多くなった。一方、患者非発生地の平野部居住の住民は、患者発生地の住民と同様な成績であったが、山間・山脚部居住の住民の97%が Karp 型の感染者であった（表 2）。

2. 野鼠に感染した *Ot* の血清型

a. 野鼠から分離した *Ot* の血清型

免疫抑制剤非投与の ddY マウスを用い、野鼠の脾臓から分離した90株（85株は患者多発の黒部入善捕獲野鼠、5 株は他の患者発生地捕獲野鼠）の *Ot* の血清型を PCR 法で型別した。karp 型の *Ot* が 81 株と圧倒的に多く、kawasaki 型はドブネズミから分離された 2 株だけであった。その外に、Karp 型と Kawasaki 型との混合株が 5 株あり、残りの 2 株は型別できなかった。Kawasaki 型に感染していた 2 匹のドブネズミと、Karp と Kawasaki 型の混合感染をしていた 5 匹アカネズミは平野部の比較的人家に隣接した所で捕獲され、Karp 型感染野鼠は河川敷や山脚部で捕獲された野鼠が多かった（表 3）。

b. 野鼠の *Ot* 抗体陽性血清を用いた交叉吸収 IF 法による型別成績

患者多発地である黒部入善で捕獲された *Ot* 感染野鼠のうち、人家のすぐ近く捕獲されたドブネズミは 100% (24/24) が Kawasaki 型、人家に近い平野部で捕獲されたアカネズミ、ハタネズミは karp 型に 62% (24/39)、Kawasaki 型に 31% (12/39) が感染していた。それに反して、河川敷や山脚部で捕獲されたアカネズミは 91% (20/22) が Karp 型に、9% (2/22) が Kawasaki 型に感染していた。一方、患者非発生地で捕獲された野鼠は、Karp 型と Gilliam 型が感染の主流であったが、山間山脚部捕獲野鼠は、100% (22/22) karp 型の感染であった（表 4）。

表1. 1978年から1997年までに富山県内で発生したつつが虫病患者数と感染した
O. tsutsugamushi の血清型

発生地	患者数	血清型			
		Karp	Kawasaki	Gilliam	型不明、未検
朝日	3	3 *			
黒部・入善	188	4	184		
魚津	2		2		
富山	3	1 *	1	1 *	
上市	7	2 *	4		1
八尾	1	1 *			
小矢部	1	1 *			
氷見	2	1 *			1
井波	1	1 *			
計	208	14	194	1	2
		(7%)	(92%)		

1) 型別成績は交叉吸収法（患者血清）と nested PCR 法（患者分離株、患者血餅）で型別したものである。

*印は春に発生した患者、*印のないものは秋に発生した患者。

3. フトゲツツガムシ幼虫から分離された Ot の血清型

患者多発地である黒部・入善地区で捕獲されたアカネズミに付着していたフトゲツツガムシ幼虫から分離した3株のOtの血清型をPCR法で型別した。3株ともKarp型であり、これは補体結合反応でも確認された（表5）。

考 察

富山県内で発生したつつが虫病患者へ感染した

Otの血清型を交叉吸収 IF 法と PCR 法で型別した。kawasaki型感染患者はこれまでに発生した患者の90%（191/208）を示し、圧倒的に多数であった。そして、患者は全例秋季に発生しており、タテツツガムシ幼虫の出現時期と一致していた。この事実からも、富山県でも kawasaki型の Ot はタテツツガムシが媒介していることは間違いないであろう。県内での Kawasaki型感染患者は黒部入善地区の外に、魚津（経田）、上市（大岩）、富山（呉羽）で発生している。このうち、これまでに黒部・入善と魚津の平野部にはタテツツガムシが生息していることは確認されているが [10]，

表2. 野鼠より分離した *O. tsutsugamushi* の血清

分離株 ²⁾	供試株数	血清型 ¹⁾			
		Karp	Kawasaki	Karp+kawasaki	不明
ドブネズミ由来株	2		2		
ハタネズミ由来株	10		10		
アカネズミ由来株	78	71		5	2
計	90	81	2	5	2

1) 型別は Furuya らが開発した nested PCR 法によった。

2) 各野鼠からの *O. tsutsugamushi* (Ot) の分離は、野鼠の肝、脾乳剤を ddy マウスの腹腔内に接種することによって行った。鑄型 DNA は腹腔内細胞に Ot が確認されたマウスの脾臓の一部から精製した。表3. 富山県における一般住民の *O. tsutsugamushi* の血清型（交叉吸収 IF 法）

調査地	血清数	血清型				
		(抗体陽性)	Karp	Gilliam	Kawasaki	Karp+Gilliam (Gilliam N)
患者発生地						
平野、水田部	51	27	2	14		8
		(53%)	(4%)	(28%)		(16%)
患者非発生地						
平野、水田部	40	17	6	7	2	8
		(43%)	(15%)	(18%)	(5%)	(20%)
丘陵、山脚部	30	29			1	
		(97%)				(3%)

Gilliam N 型は PCR 法で型別すると Kawasaki 型であることが判明。

表4. 富山県に生息する野鼠に感染している *O. tsutsugamushi* の血清型（交叉吸収IF法）

捕獲地	種類	血清型			
		(抗体陽性)	Karp	Gilliam	Kawasaki
患者発生地					
平野部	アカネズミ	39	24	12	3
	ハタネズミ				
	ドブネズミ	24		24	
山脚部	アカネズミ	22	20	2	
計		85	44	38	3
			(52%)	(45%)	(4%)
患者非発生地					
平野部	アカネズミ	18	10	6	1
	ハタネズミ				
山脚部	アカネズミ	22	22		
	スミスネズミ				
計		40	32	6	1
			(80%)	(15%)	(3%)

表5. フトゲツツガムシから分離された *O. tsutsugamushi* の血清型

分離株	血清型
フトゲツツガムシ 1 (20匹)	Karp
フトゲツツガムシ 2 (15匹)	Karp
フトゲツツガムシ 3 (30匹)	Karp

フトゲツツガムシの乳剤はddYマウスの腹腔内に接種し、腹腔内細胞に *O. tsutsugamushi* (Ot) が確認されたら、腹腔内細胞と L 細胞を混合培養し、以後 L 細胞で継代した。錆型DNAは感染 L 細胞から精製した。

富山と上市からはタテツツガムシの生息は確認されていない。今回の型別の結果は、これらの地区にもタテツツガムシが生息していることを示唆している。

Karp 型感染患者は、黒部・入善地区で 4 名が秋季に、他の 10 名の患者は春季に県内各地に散発的に発生している。フトゲツツガムシ幼虫の発生時期は秋季が主体であるが春季にも出現する。したがつて、Karp 型感染患者が秋と春に発生しても不思議ではない。現に新潟県では春と秋に Karp 型感染患者が多数発生している [3]。

野鼠に感染している Ot の血清型をみると、平野部の人家周辺で生息する野鼠は Kawasaki 型の感染が多く、山間、山脚部では Karp 型の感染野鼠が多く生息している。この成績は、ヒトの生活圏にはタテツツガムシが比較的多く生息し、山間、山脚部にはフトゲツツガムシが多数分布していること示唆している。

黒部川扇状地には Ot の媒介種であるタテツツガムシとフトゲツツガムシが多数生息している [12]。特にフトゲツツガムシの生息数は多く、タテツツガムシのおよそ 40 倍も多く生息している

[10]。そして、このフトゲツツガムシの生息数を反映するように、この扇状地に生息する野鼠はフトゲツツガムシが保有する Karp 型 Ot の感染を高率に受けている (表 2, 3)。このように、フトゲツツガムシの生息数が多く、karp 型の感染野鼠も圧倒的に多いのにもかかわらず、この扇状地で発生した患者のほとんどは (188名中184名) タテツツガムシが保有する Kawasaki 型の感染患者で、Karp 型の感染患者は 18 年間に 4 名発生しただけである。同じことは隣接する朝日地区にもいえる。朝日地区ではタテツツガムシの生息は確認されていないが、フトゲツツガムシの生息数は黒部川扇状地に匹敵するくらい多く、生息する野鼠も Karp 型 Ot の感染を高率に受けているにもかかわらず、18 年間に 3 名の Karp 型感染患者しか発生していない。ではこの矛盾をどのように説明したらよいでらうか。

第一の説明として、フトゲツツガムシとタテツツガムシの生息分布の違いを上げることができる。即ち、タテツツガムシはヒトの生活圏内に主に生息し、フトゲツツガムシはヒト生活圏から離れた所に主に分布する。そのため、フトゲツツガムシ

はヒトと遭遇する機会がタテツツガムシよりも少なく、それが患者数に反映しているとする考え方である。第二の説明は、フトゲツツガムシとタテツツガムシのヒトに対する嗜好性の違いを上げることができる。即ち、フトゲツツガムシはタテツツガムシよりもヒトに対して嗜好性が低く、そのためフトゲツツガムシの生息数が多くても、Karp型感染患者が少ないとする考え方である。

しかし、フトゲツツガムシとタテツツガムシの嗜好性の違いを示す科学的データはどこにもない。

第三の説明として、フトゲツツガムシが保有するKarp型Otのヒトに対する病原性の強さ（ビルレンス）は一様ではなく、強ビルレンス株と弱ビルレンス株とがあり、強ビルレンス株を保有するフトゲツツガムシに刺咬されると発病し、弱ビルレンス株を保有する株に刺咬された場合には発病せず、数としては、前者よりも後者を保有するフトゲツツガムシがはるかに多数であるとする考え方である。この説を支持するデータとして、この扇状地に住む一般住民に感染したOtの型別成績である。この成績よれば、一般住民は患者とは異なりKarp型Otの感染を高率に受けており、フトゲツツガムシの生息数とKarp型感染者数は同地に生息する野鼠同様、よく相関している。この事実は、ヒトも野鼠と同様にかなりの率でフトゲツツガムシに刺咬され、Karp型Otの感染を受けているが、大部分の人は発病せず不顕性感染者であることを示すもので、第三の説を強く支持している。

Karp型のOtはヒトやマウスに対して強いビルレンスを持つことが報告されている[1, 2, 7]。事実、Karp型の標準株はマウスに強いビルレンスを示すし、また、1970年以後のつつが虫病患者の死亡例は、全てKarp型の感染によるものであることからもそれを伺い知ることができる。では、Karp型Otには弱ビルレンス株はないのであろうか？我々はこれまでに野鼠から多数のKarp型Otを分離してきたが、そのいずれの株

もマウスに対して標準株よりもビルレンスが弱く、しかも、かなりの株がKawasaki型と同じようにマウスを致死させることができない株であった。このことは、Karp型Otのビルレンスには多様性があることを示唆するもので、今後、このビルレンスの多様性を解明することは、黒部川扇状地や岐阜県でも[13]みられる疫学的な矛盾を明らかにする上で重要である。

文 献

1. 多村 憲 (1987). 薬学雑誌, 107, 751-766.
2. 多村 憲 (1988). 日細誌, 43, 629-639.
3. 関川弘雄, 堅物 実ら (1979). 新潟医学会誌, 93, 661-670.
4. 田中博義, 高田伸弘ら (1987). 北陸公衆衛生学会誌, 14, 19.
5. Kawamori, F., Murata, M. et al (1992). J. Clin. Microbiol. 30, 2842-28
6. 吉田芳哉, 佐藤利明ら (1994). SADI組織委員会(編), ダニと疾患のインターフェイス, p99-103, 福井, YUKI書房.
7. 浦上 弘, 多村 憲 (1996). 日細誌, 497-511.
8. 石倉康宏, 植竹久雄ら (1987). 富山衛研年報, 10, 98-104.
9. Ishikura, M., Watanabe, M. et al (1987). Microbiol. Immunol. 31, 985-999.
10. 渡辺 譲, 石倉康宏, 森田修行 (1994). SADI組織委員会(編), ダニと疾患のインターフェイス, p84-92, 福井, YUMI書房.
11. Furuya, Y., Yosida, Y. et al (1993). J. Cln. Microbiol. 31, 1637-1640.
12. Ishikura, M., Watanabe, M. et al (1985). Microbiol. Immunol. 29, 859-872.
13. 細谷志郎, 山下照夫 (1994). SADI組織委員会(編), ダニと疾患のインターフェイス, p104-109, 福井, YUKI書房.

富山県における溶血レンサ球菌分離株の 菌型と薬剤感受性

田中大祐 細呂木志保 刑部陽宅 香取幸治¹
赤間美徳² 柏木義勝³

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

Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI,
Yotaku GYOBU, Koji KATORI¹,
Yoshinori AKAMA² and Yoshikatsu KASHIWAGI³

要旨 富山県で1982～1996年の間に分離された臨床材料由来溶血レンサ球菌（溶レン菌）について、分離材料、患者の平均年齢と分離株の群の関係、A、B両群の型別分布および分離株の薬剤感受性を調べた。結果は次のようにあった。

1. 分離株の群別分布では、各年次においてB群、次にA群が優勢で、両者が全体の80%以上を占めた。G群は全体の11～16%であり、C群は極めて少なく約1%であった。主としてA群は小児の咽頭から、B群は高齢者の喀痰や化膿巣、分泌物などや尿から分離された。G群は高齢者の喀痰や化膿巣、分泌物などから分離された。

2. A群のT型別分布の変遷を見ると、T4型とT12型が長期間流行しているが、1996年はT2型が最も多く、次にT12型、T1型とTB3264型の順に多く分離された。B群では、1996年にはNT-6型、JM-9型の順に多く分離された。

3. 薬剤感受性に関して、1995年はA群、B群ではTCに対してのみ一部の菌株が耐性であった。A群ではT4型とT2型の菌株がTC耐性であった。

4. 富山県初の劇症型A群レンサ球菌感染症患者から分離されたA群溶レン菌は、血清型T1型/M1型、PCR法で発熱性毒素（SPE）遺伝子A、B陽性であった。

A群溶レン菌は、主として咽頭炎や扁桃炎の原因となるが、近年欧米をはじめ国内でも本菌による劇症型A群レンサ球菌感染症が問題になっている[1]。一方、B群溶レン菌は新生児の敗血症や髄膜炎、高齢者の日和見感染の原因として知られている。

ここでは、富山県下で臨床材料から分離された溶レン菌について、群別、型別、薬剤感受性を調べた結果、および富山県初の劇症型A群レンサ球菌感染症由来菌株の性状について報告する。

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

材 料 と 方 法

病原微生物検出情報収集定点である県内12か所の公立病院の内の2病院の細菌検査室で分離された溶レン菌を用いた。群別はストレプトLA「生研」(デンカ生研)を用いた感作ラテックス凝集反応によって実施し、A群T型別およびB群型別はそれぞれの型別用血清(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), 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剤を使用し、東京都立衛生研究所で行った。

結 果 と 考 察

1996年までの5年間における、分離材料、分離株の群と患者の平均年齢の関係をTable 1に示す。B群、次にA群が優勢で、両者が全体の80%以上を占め、G群は全体の11~16%であり、C群は極めて少なく0~1.2%であった。A群は咽頭から多く分離されるが、その場合は小児が多くかった。喀痰からはB群やG群が高頻度に分離され、その場合は患者の平均年齢は極めて高かった。化膿巣、分泌物などからはA、B、G群が分離されるが、A群の場合は、B、G群に比べて患者の平均年齢が比較的低かった。尿からの分離はほとんどが尿路感染症の原因となるB群であるが、この場合も平均年齢は喀痰同様極めて高かった。血液、髄液からは分離株数が少ないがB群が多かった。その

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

Year	Specimen	Serogroup of Streptococci				Total
		A	B	C	G	
1992	Throat swab	67*(13)**	11(16)	2(6)	11(26)	91
	Sputum	3(53)	38(75)	1(78)	10(50)	52
	Pus, exudate etc.	23(22)	30(47)		9(48)	62
	Urine	1(72)	37(63)			37
	Blood, cerebrospinal fluid	1(40)	1(69)		1(?)	3
Total		95:38.8%	117:47.8%	3:1.2%	30:12.2%	245
1993	Throat swab	70(9)	13(47)		5(25)	88
	Sputum	6(46)	38(64)	2(70)	19(63)	65
	Pus, exudate etc.	20(20)	51(46)	1(37)	13(55)	85
	Urine		43(63)		5(79)	48
	Blood, cerebrospinal fluid	1(63)	1(78)			2
Total		97:33.7%	146:50.7%	3:1.0%	42:14.6%	288
1994	Throat swab	80(8)	11(35)	2(13)	4(24)	97
	Sputum	3(36)	27(67)		13(60)	43
	Pus, exudate etc.	14(39)	48(52)		18(45)	80
	Urine		33(65)		5(83)	38
	Blood, cerebrospinal fluid		3(51)		1(73)	4
Total		97:37.0%	122:46.6%	2:0.8%	41:15.6%	262
1995	Throat swab	46(8)	8(43)		2(23)	56
	Sputum	4(45)	24(68)		6(71)	34
	Pus, exudate etc.	10(28)	52(52)		10(66)	81
	Urine		18(65)	1(76)	1(75)	20
	Blood, cerebrospinal fluid	1(5)	3(51)		2(64)	6
Total		61:32.4%	105:55.9%	1:0.5%	21:11.2%	188
1996	Throat swab	58(8)	1(81)		6(28)	65
	Sputum	2(46)	26(63)		15(67)	43
	Pus, exudate etc.	18(26)	38(50)		12(63)	68
	Urine	1(5)	31(60)			32
	Blood, cerebrospinal fluid		5(51)		1(25)	6
Total		79:36.9%	101:47.2%	0:0%	34:15.9%	214

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

場合、新生児からの分離株も含まれるが、患者の平均年齢は比較的高かった。これらの関係は、毎年極めて類似していた。

1996年のA群分離株のT型別分布をTable 2に示す。表中の最下段の数字は定点12か所の医療機関からの上気道及び下気道からのA群菌の毎月の報告数である。型別結果をみると、T 2型が最も多く、次いでT 12型、T 1型とT B3264型の順に多かった。

当所は溶レン菌の東海北陸ブロックのレファレ

ンスセンターとして、県外からの分離株の型別も行っている。石川県A町において、1996年4月上旬より7月下旬までの4カ月間に患者数約850名の溶連菌感染症の流行があった〔2, 3〕。A町総合病院丸岡達也先生より依頼を受け、分離株の型別を行ったところ、表には示していないが、流行時期の菌株176株中170株(96.6%)がT 12型/M 12型であった。また、福井県の一公立病院から送られてきた菌株を調べたところ、1996年はT 12型が多かった。

Table 2. Monthly Distribution of T Types of Group A Streptococci in 1996

T type	Month												Total
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
1								2		1	4		7
2	1	1	3	1	3	4	2		2	10	4		31
3	1	1											2
4	1		1		1					1			4
9	1												1
11	1									1			2
12	2	1	1		4		1		1		1		11
13											1		1
28		2				1		1		1			5
B3264	1				1		1			1	2	1	7
UT	2	1	2				1	2					8
Total	10	6	7	1	9	5	5	3	5	3	15	10	79
Reported number of strains from 12 Hospitals	83	43	64	72	78	33	25	20	26	34	54	59	591

Table 3. Monthly Distribution of Types of Group B Streptococci in 1996

Type	Month												Total
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	
I a		2	1				1	2			1		7
I b	1	1	1		1	1	1		1		1	1	9
II	1				1		1						3
III	1						1	1	2	2			7
IV													0
V								2	1				3
NT-6	3	3		4	1	5	4	5	1	6	2	3	37
WHO-7271													0
JW-9	1	2			2	3	3	2	1	2	7	1	24
UT	1	1	1					1	2		3	2	11
Total	8	9	3	4	5	11	11	12	7	10	13	8	101

1996年のB群分離株の月別の型別分布をTable 3に示す。近年、分離率が非常に高いNT-6型、次にJM-9型が多く分離され、この二つの血清型の菌株が過半数を占めた。

1982年以後のA群のT型別分布をTable 4に示した。T4型とT12型が長期間流行している様相がうかがえる。15年間に型別に供した2048株の中では、①T12型 504株、②T4型 407株、③T1型 238株、④T3型 209株、⑤T28型 146株、⑥TB3264型 76株、⑦T6型 71株、⑧T13型 62株、⑨T18型 47株、⑩T11型 40株の順に多かつた。1996年に最も多いT2型は、前年にわずか1株だけが分離されていた。

1995年に分離したA群 22株、B群 25株、C群1株、G群 2株、計50株の薬剤感受性試験の結果をTable 5に示す。MIC値が $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である耐性菌は、A群ではTCに対するT4型5株とT2型1株であった。B群でもTCに対して一部の菌株が耐性であった。ペニシリン系のABPCやセフェム系のCFDN、CDTRに対しては、すべての菌株が高い感受性を示した。

1996年10月に発病して、数日後に死亡した富山県内で初の劇症型A群レンサ球菌感染症患者が砺波総合病院でみられた。分離されたA群溶レン菌について当所で調べたところ、表には示さなかつたが血清型T1型/M1型、PCR法で発熱性毒素(SPE)遺伝子A、B陽性であった。劇症型A群レンサ球菌感染症由来菌株では、T1型とT3型が多いと報告されている[1]。T1型の菌株は、表4にみられるように富山県で長期にわたり

Table 4. T Type Distribution of Clinical Isolates of Group A Streptococci in Toyama since 1982

Year	T type															UT	Total		
	1	2	3	4	5	6	8	9	11	12	13	18	22	28	B3264	Imp. 19	14/49		
1982	20 ^{2*}		2							27 ¹	4		3	2	3	6 ³		9	76
	(26.3)**									(35.5)						(7.9)			
1983	2		69 ¹							41 ²	22 ³		1	11	6			10	162
			(42.6)							(25.3)(13.6)									
1984	6		8	30 ²	1		1		2	42 ¹	9		1	10 ³	3	1		11	125
				(24.0)						(33.6)				(8.0)					
1985	3		55 ¹	26 ³		1			3	31 ²	8	1	1	7	2			5	143
			(38.5)(18.2)							(21.7)									
1986	1		64 ²	27 ³	1	1	6		11	125 ¹	8	8	1	15				9	277
			(23.1)(9.7)							(45.1)									
1987	29 ³		13	44 ²	1	17	1		5	69 ¹	4	22		22	2			15	244
	(11.9)		(18.0)							(28.3)									
1988	66 ¹	2	43 ²		15 ³	1		1	14		7		6					24	179
	(36.9)		(24.0)		(8.4)														
1989	11		46 ¹	29 ²			4	8	2	2		18 ³	8					22	150
			(30.2)	(19.3)								(12.0)							
1990	14	1	26 ¹		8		1	3	22 ²		1	16 ³	3					23	118
			(22.0)						(18.6)			(13.6)							
1991	20 ²		20 ²		1	3	4	51 ¹	1			12	15			2	9	138	
	(14.5)		(14.5)					(36.9)											
1992	21 ¹	14	19 ²		1		2	6	3	4		4	15 ³					13	102
	(20.6)		(18.6)									(14.7)							
1993	18 ²	21 ¹	18 ²		2	1	2	14				6	6					9	97
	(18.6)		(21.6)(18.6)																
1994	12		17 ²	14 ³		1	1	34 ¹		2		7	3					6	97
			(17.5)(14.4)					(35.1)											
1995	8	1	12 ²	19 ¹				9 ³				5	3					4	61
			(19.7)(31.1)					(14.8)											
1996	7 ³	31 ¹	2	4		1	2	11 ²	1			5	7 ³					8	79
	(8.9)	(39.2)						(13.9)				(8.9)							
Total	238	32	209	407	3	71	14	6	40	504	62	47	7	146	76	7	2	177	2048

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

Table 5. Antibiotic Susceptibility of Hemolytic Streptococci in 1995

Group	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$)												
		0.0075	0.015	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
A	ABPC		7	11	4									
	CFDN	2*	20											
	CEX						20	1	1					
	CDTR		22											
	TC				4	12	1							
	CP								12	10			5	1
	EM			8	14								1	
	CAM		2	18	2									
	LCM			1	10	11								
B	ABPC		2	1	22									
	CFDN	2	22	1										
	CEX							2	2	21				
	CDTR	2	16	7				8	8					
	TC										4	16	5	1
	CP												3	5
	EM			1	7	16		1						
	CAM		3	21				1						
	LCM			1	2	18	4							
C	ABPC			1										
	CFDN		1					1						
	CEX													
	CDTR	1							1					
	TC												1	
	CP													
	EM			1										
	CAM							1						
	LCM													
G	ABPC			2										
	CFDN		2											
	CEX						2							
	CDTR	2												
	TC					1					1			
	CP									2				
	EM				2									
	CAM													
	LCM				2									

*: No. of isolates

比較的高頻度に分離され続けているので、今後も監視が必要である。

謝辞：溶レン菌分離株に関して配慮を戴いた砺波総合病院の砂山千明先生、検査担当各位に深謝いたします。

文 献

1. 国立予防衛生研究所編（1994）. 病原微生物検出情報月報、18巻2号、1～2.
2. 本庄峰夫（1997）. 地方衛生研究所全国協議会東海北陸支部細菌部会抄録集、15.
3. 南陸男（1997）. 北陸と公衆衛生第43号、20～23.

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

*Salmonella Surveillance on River Water
in an Urban Area*

Junko ISOBE, Daisuke TANAKA,
and Shiho HOSOROGI

要旨 1979年から1996年に富山市内の4河川に11定点、1996年に射水郡内の河川に3定点を設け、定期的に採水して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菌との比較を行った。また、1996年は多くの地点で大腸菌についても調査を行った。結果は次のようにあった。

1. 1996年に富山市内河川水からのサルモネラの検出率は5/40(12.5%)で、分離されたサルモネラは4血清型、5株であった。この数は調査をはじめてからの18年間で最低であった。分離されたサルモネラの血清型は、*Salmonella Corvallis* 2株、*S. Typhimurium* 1株、*S. Agona* 1株、*S. Infantis* 1株であった。一方、射水地区の河川水からは、5月に*S. Tennessee* が1株分離されただけであった。

2. 1996年にヒトから分離され、衛生研究所に集まったサルモネラは30血清型118株で、この数は、*S. Enteritidis*(以下S.E)による大規模な集団発生のあった1994年に次いで多かった。菌型別にみるとS.Eが54株(45.8%)と最も多く、次いで*S. Infantis* 19株(16.1%)、*S. Typhimurium* 4株(3.3%)の順であった。

3. 過去17年間に河川水およびヒトから分離されたサルモネラの主な血清型をみると、河川水では*S. Paratyphi B*(116株、11.8%)、*S. Typhimurium*(68株、6.9%)、*S. Infantis*(57株、5.8%)の順に多く、ヒトではS.E(377株、34.4%)、*S. Typhimurium*(172株、15.7%)、*S. Paratyphi B*(127株、11.6%)の順に多かった。

4. 分離された主な血清型のサルモネラの薬剤耐性を調べると、耐性株頻度は*S. Enteritidis*で203/416(48.8%)、*S. Litchfield*で42/105(40.0%)、*S. Typhimurium*で93/240(38.8%)であった。耐性菌の耐性パターンではストレプトマイシン(S)単独耐性が最も多く、次いでテトラサイクリン(TC)単独耐性、TC、S2剤耐性、その他の順に多かった。

5. 11定点の河川水について、いくつかの大腸菌(O6, O18, O148, O157)を検査したところ、O148が1株分離された。

サルモネラは動物や自然界に広く分布し、ヒトに急性胃腸炎を引き起こす細菌性食中毒の原因菌

である。サルモネラは、1992、1993年に食中毒原因菌の第1位であったのをはじめ、その後もサル

モネラ食中毒による患者数は全体の約4割を占め、1995年には死者の発生も報告されている[1, 2]。われわれは、このサルモネラの環境の汚染実態と、ヒトにおける流行状況を把握する目的で、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、1996年を中心に河川水およびヒトからのサルモネラの分離状況および分離株の血清型、薬剤耐性について述べる。

調査定点および方法

調査定点は、図1に示す富山市内を流れる4河川、いたち川(I), 松川(M), 赤江川(A), 土川(D)に設けた11定点とした。しかし本年は、それらのうち比較的距離の近い3箇所を定点からはずして8定点とし、新たに射水地区内の新堀川とそれに注ぐ支流に3定点を設けた。採水は、富

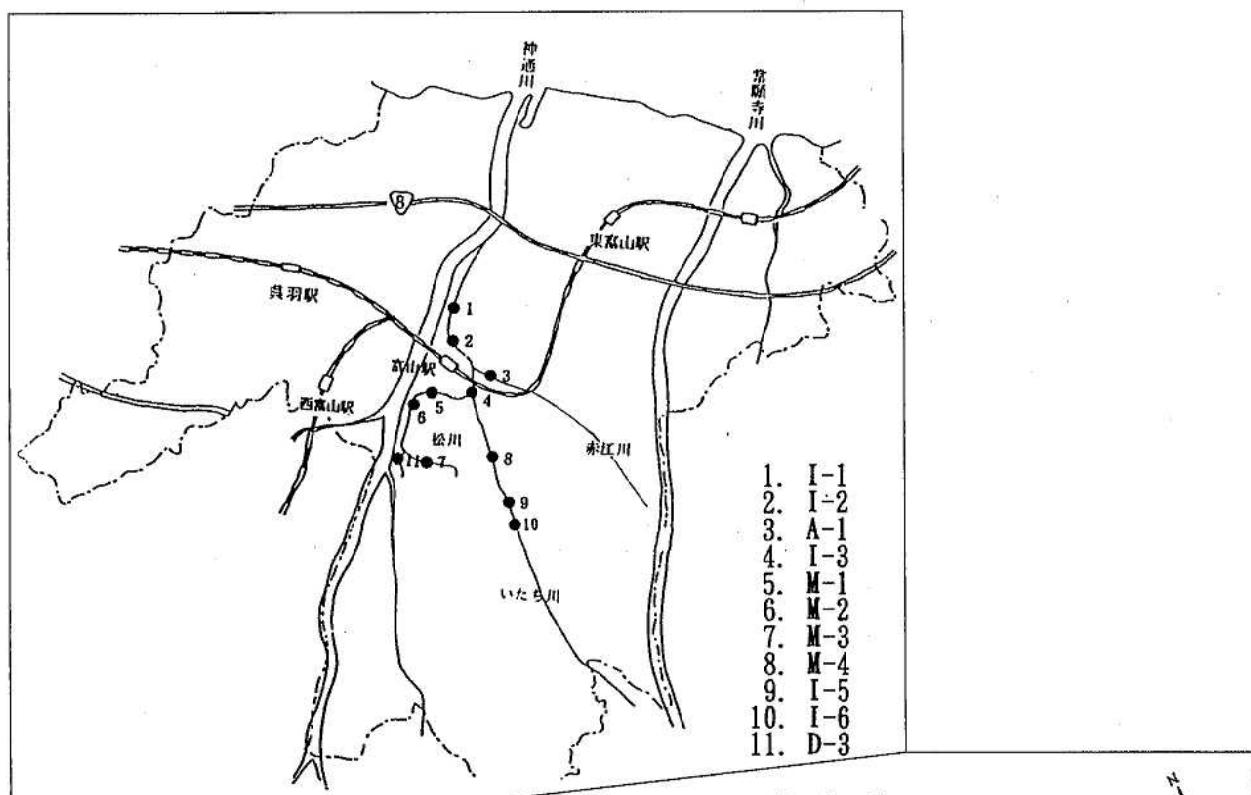
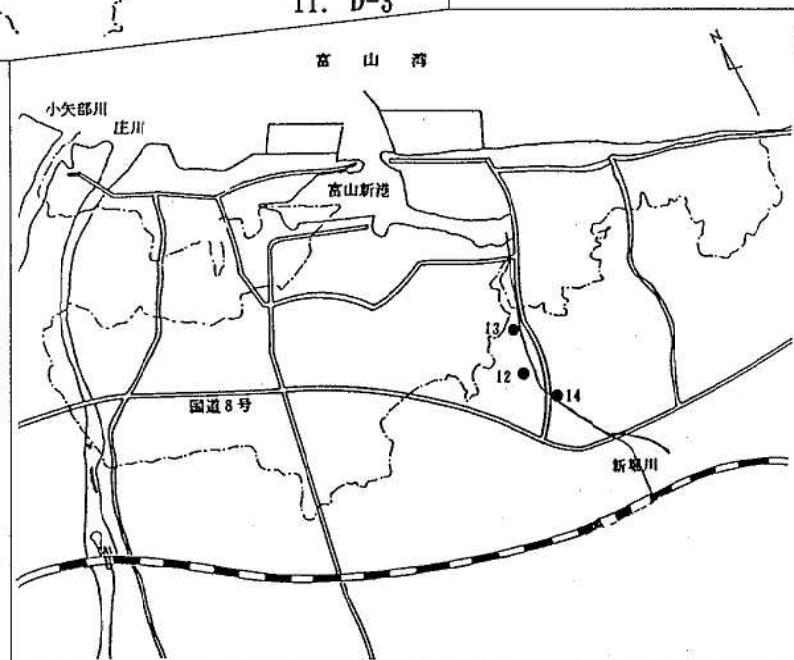


図1. 富山市採水地点



射水地区採水地点

山市内河川水については1979年6月から1981年5月まで毎月1回、その後は隔月に、一方、射水地区内は1996年3月から12月まで毎月行った。

サルモネラ検査は既報〔3〕のとおりであるが、増菌培地はセレナイト及び変法セレナイトに代えて、ラパポート培地（栄研化学）およびハーナーのテトラチオニン培地（ニッスイ）を使用した。また、薬剤感受性には、米国臨床検査標準委員会(NCCLS)の規格に準拠したセンシティスク(BBL)のCP(クロラムフェニコール), SM(ストレプトマイシン), TC(テトラサイクリン), KM(カナマイシン), GM(ゲンタマイシン), CL(コリスチン), CET(セファロチン), NA(ナリジクス酸), ABPC(アミノベンジルペニシリン)の9種類を用いて行った。

大腸菌群数測定は、BGLB(ニッスイ)培地、1段階5本を用いたMPN法によった。

大腸菌の検査は、血清型O157については検水250mlを0.45μmのメンプランフィルターで濾過し、そのフィルターをノボビオシン加mEC培地(極東)へ投入し42℃24時間培養した。その後CTサプリメント(アスカ純薬)加ソルビットマッコンキー寒天(栄研化学)に塗抹、培養し、疑わしいコロニーをCLIGおよびLIM培地に釣菌して性状を確認した。一方、血清型O6, O18, O148については、前述のBGLB培地陽性検体からEMB培地に塗抹培養し、生育したコロニーをTSI寒天、LIM寒天、VP半流動寒天培地に釣菌した。その後IMVCシステムにて確認した大腸菌について凝集反応等の検査を行った。

ヒト由来サルモネラは、県内の公立病院および保健所で患者および保菌者から分離され、同定のため当所に送付された1440株について各種性状を調べた。

結果および考察

定点別のサルモネラ分離状況を表1(富山市)、表2(射水地区)に示した。1996年の富山市各定点からの分離数は極めて少なく、M-1, M-3,

D-1からは分離されなかった。全体の分離率は5/40(12.5%)で、この数値は調査を始めた1979年からの18年間で最低であり、最も多く分離された1980年156株のわずか3%にすぎない。定点I-1, I-3(7月)で分離されたS.Corvallisは稀な血清型であるが、A-1(7月)で分離されたS.Infantisは、表5に示すように本年ヒトや家畜からも多く分離された。

表3には、一般生菌数および大腸菌群数を、調査を開始した1979年当時の成績とあわせて示した。比較すると一般生菌数はほとんど同じであるが、大腸菌群数は約1/10少なかった。病原性大腸菌(O6, O18, O148, O157)の分離率を表4に示した。いずれの河川からも分離はほとんどなく、定点12で5月にO1481株が分離されただけであった。

表5, 6は、過去18年間に河川あるいはヒトから分離された主な血清型のサルモネラの年次別分布を示す。河川についてみると、分離数はS.Paratyphi B 116株(11.8%), S.Typhimurium 69株(7.0%), S.Infantis 57株(5.8%)の順に多かった。また、S.Typhiは1989年までほぼ毎年分離されたが、1990年以降1996年までの7年間全く分離されなかった。年間分離株数は1981年以前は100株以上であったが、1982年頃から減少はじめ、1986年には50株以下となり、1993年には12株、そして1996年は5株と少数であった。この値は、この18年間で最も少ない数であり、最も多く分離された1980年の156株のわずか3%にすぎない。1981年から1982年にかけての減少は、既報〔4〕にもあるとおり松川への取水が始まった時期と一致しているので、原因として取水による流水量の増加が関係していると考えられる。しかし、この取水以後も減少傾向が全体としてみられるので、富山市の下水道普及率(表7)の上昇や鶏の飼育数の減少なども関係しているものと思われる。

一方、ヒトから分離されたサルモネラ(表5)についてみると、1991年から6年間連続してS.Eが最も多く、1996年は54株で全体の46%を占めた。次いでS.Infantisが19株(16.1%)と多かった。18年間についてみるとS.Eが376株(26.1%)と

表1. 富山市内サルモネラ定点観測成績（1996年）

定点	3月	5月	7月	9月	11月	サルモネラ陽性率
I-1	(-) * 未検査	S. Corvallis** 1.1×10^4 *** 1.7×10^4 ****	(-) 2.1×10^4 3.3×10^3	(-) 1.8×10^4 5.4×10^4	(-) 7.4×10^4 5.4×10	1/4*****
I-2	(-) 4.8×10^3 9.2×10^2	未検査				0/1
I-3	(-) 2.2×10^3 9.2×10^2	S. Corvallis 7.7×10^3 2.2×10^4	(-) 7.9×10^3 5.4×10^4	(-) 3.4×10^4 9.2×10^3	(-) 5.6×10^3 3.5×10^3	1/5
I-4	(-) 4.2×10^3 5.4×10^2	S. Typhimurium (-)	(-) 7.6×10^3 1.3×10^4	(-) 7.0×10^3 2.2×10^3	(-) 1.5×10^4 3.5×10^4	1/5 3.9×10^3 5.4×10^3
I-5	(-) 8.5×10^3 9.2×10^2	S. Agona (-)	(-) 5.5×10^3 1.7×10^4	(-) 6.3×10^3 1.3×10^4	(-) 1.7×10^4 1.3×10^3	1/5 5.4×10^3 1.6×10^4
M-1	(-) 1.2×10^3 9.2×10^2	(-) 6.8×10^3 1.1×10^4	(-) 1.2×10^4 3.3×10^3	(-) 2.0×10^4 3.5×10^3	(-) 5.4×10^3 9.2×10^3	0/5
M-3	(-) 2.3×10^3 5.4×10^2	(-) 4.8×10^3 2.8×10^4	(-) 1.0×10^4 3.3×10^3	(-) 4.7×10^4 3.5×10^4	(-) 1.8×10^4 1.6×10^4	0/5
A-1	(-) 9.6×10^3 5.4×10^2	(-) 1.6×10^4	(-) 7.0×10^3 5.4×10^4	(-) 1.1×10^4 3.5×10^4	(-) 1.4×10^4 1.6×10^4	1/5
D	(-) 3.1×10^3 5.4×10^3	(-) 1.1×10^4 1.3×10^4	(-) 2.7×10^3 7.9×10^3	(-) 4.5×10^4 2.8×10^4	(-) 5.6×10^3 2.4×10^4	0/5
合計	1/8	0/8	4/8	0/8	0/8	5/40(12.5%)

(-) * : サルモネラ陰性

** : 検出サルモネラの血清型

*** : 一般生菌数(個/ml)

**** : 大腸菌群数(MPN/100ml)

***** : サルモネラ陽性数/検体数

表2. 射水地区サルモネラ定点観測成績（1996年）

定点	3月	4月	5月	6月	7月	9月	10月	11月	12月
12	(-) # 3.6×10^3 ## 2.4×10^3 ##	(-) # 4.0×10^4	(-) # 5.5×10^3	(-) # 7.7×10^3	(-) # 1.7×10^4	(-) # 6.2×10^4	(-) # 7.9×10^5	(-) # 1.0×10^4	(-) # 3.9×10^3
	(-)	(-)	S. Tennessee	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	(-) # 3.6×10^3 9.2×10^3	(-) # 4.9×10^4	(-) # 7.9×10^2	(-) # 7.3×10^3	(-) # 1.9×10^4	(-) # 1.0×10^4	(-) # 1.3×10^4	(-) # 1.5×10^4	(-) # 7.8×10^3
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	(-) # 3.9×10^3 2.4×10^3	(-) # 1.1×10^2	(-) # 1.7×10^4	(-) # 4.0×10^3	(-) # 2.0×10^4	(-) # 3.2×10^4	(-) # 4.3×10^5	(-) # 5.5×10^3	(-) # 4.6×10^3
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

: サルモネラ陰性

: 一般生菌数(個/ml)

: 大腸菌群数(MPN/100ml)

表3. 河川水の一般生菌数と大腸菌群数

定点	一般生菌数(個/ml)		大腸菌群数(個/100ml)	
	1996年	1979年	1996年	1979年
I-1	3.1×10^4	3.3×10^4	2.0×10^4	1.7×10^5
I-2	4.8×10^3	3.2×10^4	9.2×10^2	1.3×10^5
I-3	1.1×10^4	2.6×10^4	1.8×10^4	1.3×10^5
I-4	3.6×10^3	1.3×10^4	1.1×10^4	4.5×10^4
I-5	1.2×10^4	1.2×10^4	9.6×10^3	4.1×10^4
I-6		9.8×10^3		2.2×10^4
M-1	9.0×10^3	2.5×10^4	5.6×10^3	1.0×10^5
M-2		2.9×10^4		5.5×10^4
M-3	1.5×10^4	2.7×10^4	1.7×10^4	6.8×10^4
A-1	1.2×10^4	3.6×10^4	2.6×10^4	2.3×10^5
D	1.3×10^4		1.6×10^4	

最も多く、以下 S. Typhimurium 153株 (10.6%)、S. Paratyphi B 144株 (10.9%) であった。これら3血清型は毎年分離されているが、特に分離数の多い年次、即ち1980年の S. Typhimurium 21株、1988年の S. Paratyphi B 22株、1994年の S.E 134株はいずれも集団発生を反映している。

この18年間に分離されたサルモネラの薬剤感受性を調べ、その内のおもな10血清型の薬剤耐性率を表8に示した。結果を由来別に比較すると、河川由来菌の中で9種類の薬剤のいずれかに耐性を示したのは計459株中58株 (12.6%) であるのに対し、ヒト由来菌では計1006株中350株 (34.8%) と多かった。ただし、S. Infantis については河川由来菌で耐性を示す株が多く、その割合は河川で57株中9株 (15.8%)、ヒトでは88株中6株 (7%) であった。この河川由来株とヒト由来株の耐性率の相違について、原因は明らかではない。表9には主な10血清型の耐性株の耐性パターンを示した。最も多いのは、SM単独耐性で全体の

表4. 河川水からの大腸菌の分離状況(1996年)

定点	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	M-1	M-2	M-3	A-1	D	12	13	14
病原性大腸菌分離数	0/8*	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/10	0/10

* : 大腸菌(06,018,0148,0157)分離数/検体数

表5. 河川からのサルモネラの年次別分離状況

血清型	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	計
Paratyphi B	5	20	8	15	20	16	19	3	1	3			3	2	1	116			
Typhimurium	13	11	9	1	4	8	2	6	2	2	2	2	2	1	5	1	69		
Infantis	4	20	14		1	1	6	3	2	1	2	1	1			1	57		
Enteritidis	2	3	9	6	3	2				4	3		2	1	4		39		
Typhi	1	10	5	1	1	2	4	5	3									32	
Agona	1	2	1	8	2	3	5		5	2		2		1	1		1	33	
Litchfield	1	5	11	1	1	3	2	4	2						1			31	
Tennessee	3	1				1			1	3	5	2	4	9	2			31	
Thompson	4	1	7	2	1		2	1	1	2	3		5					29	
Braenderup	1	11	1		2		4						2					21	
その他	97	79	37	27	40	23	37	25	9	19	28	23	16	12	5	30	18	2	527
分離菌株数	128	156	108	65	75	57	80	39	26	27	45	38	21	21	12	49	32	5	985
血清型数	38	37	22	16	19	14	20	11	10	14	18	14	7	9	6	18	16	4	

表6. ヒトからのサルモネラの年次別分離状況

血清型	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	計
Enteritidis	1	4	39	1	4	1	1	3	1	7	26	4	16	20	40	134	20	54	376
Typhimurium	1	21	12	4	6	8	12	6	9	5	10	7	2	11	7	18	10	4	153
Paratyphi B	11	11	7	12	15	11	14	5	5	22	6	2	5	12	1	2	2	1	144
Typhi	12	7	16	9	5	9	2	3	3	1	3	5	5	3			2	85	
Litchfield	1	8	5	3	4	9	13	6	5	5	2	3	2	2	4	3	1	1	77
Montevideo					30	18	3			1	2	2	2	1	3	5	2	2	71
Infantis	3	21	3	1	1	7	7	2	3		7	2	2		4	6	19	88	
Braenderup	3	1		4	1	5	3	3		1	3	11	2	4	1	3	45		
Havana							35					1				1	1	37	
Hadar							2	1	4	7	4	2	1		1	1	1	23	
その他	17	9	28	16	20	13	19	15	15	16	20	24	16	13	11	40	19	30	341
分離菌株数	46	84	111	46	89	77	76	45	80	61	76	59	55	74	71	210	62	118	1097
血清型数	20	20	18	16	14	15	20	21	20	18	24	25	16	16	17	18	30	30	1440

表7. 富山市の下水道普及率と定点からのサルモネラ分離率

年次	富山市 下水道普及率(%)	サルモネラ分離率(%)		
		いたち川	松川	
1979	26	36.1	77.8	81.4
1980	27	54.2	75.0	78.3
1981	29	61.1	50.0	76.3
1982	30	55.6	61.9	66.7
1983	31	50.0	66.7	68.3
1984	32	50.0	73.9	62.1
1985	35	44.4	43.5	80.3
1986	37	22.2	41.7	45.5
1987	39	22.2	33.3	33.3
1988	44	27.8	29.2	36.4
1990	47	44.4	33.3	48.5
1991	47	27.8	25.0	42.4
1992	51	16.7	12.5	27.3
1993	52	27.8	20.8	24.2
1994	56	33.3	32.1	19.7
1995	58	50.0	33.3	42.4
1996	60	20.0	0.0	5.0

表8. 分離されたサルモネラにおける薬剤耐性株頻度

血清型	由来	
	ヒト (%)	河川 (%)
Paratyphi B	23/128*(18.0)	8/116 (6.9)
Typhimurium	72/171 (42.1)	22/69 (31.9)
Enteritidis	200/377 (53.1)	3/39 (7.7)
Infantis	6/79 (7.6)	9/57 (15.8)
Litchfield	34/74 (45.9)	8/31 (25.8)
Typhi	6/85 (7.1)	1/32 (3.1)
Tennessee	1/15 (6.7)	3/32 (9.4)
Agona	1/14 (7.1)	4/33 (12.1)
Thompson	2/18 (11.1)	0/29 (0)
Braenderup	5/45 (11.1)	0/21 (0)
合 計	350/1006(34.8)	58/459 (12.6)

* : 分子は、SM, TC, CP, KM, GM, CL, CET, NA, ABPCの内1剤以上に耐性であった菌株数を示し、分母は調べた菌株数を示す。

表9. 主な血清型のサルモネラの薬剤耐性パターン

血清型	耐性パターン	河川	ヒト	合計	血清型	耐性パターン	河川	ヒト	合計	
Paratyphi B	SM	1	1	2*	Infantis	SM	1	1		
	SM, TC	1	3	4		SM, TC	2(1)	2		
	SM, TC, CP	2	2			SM, TC, KM	1(1)	2(1)	3	
	SM, TC, NA	1	1			SM, TC, ABPC	1	1		
	SM, TC, CP, KM, CET	1	1			SM, TC, CP, ABPC	1	1		
	TC	3	10	13		SM, TC, CP, KM, ABPC	2	2		
	TC, CP	3	3			SM, TC, CP, KM, CL	1	1		
	TC, CP, KM	1	1			TC	1	1		
	KM	1	1			TC, ABPC	1	1		
	ABPC	1	1			ABPC	1	1		
	NA	1	1			TC, CP, KM, ABPC	1	1		
	ND	1	1			計	11	9	15	
計	12	8	23	31	Litchfield	SM	1	1		
Typhimurium	SM	1	1	2		SM, TC	1	1	2	
	SM, TC	1	3	4		SM, TC, CP	2	2		
	SM, TC, KM	4	4			SM, TC, ABPC	2	2		
	SM, TC, CP	3	3			SM, TC, CP, NA	1	1		
	SM, TC, CP, KM	2	1	3		SM, TC, KM, ABPC	1	1		
	SM, TC, CP, ABPC	5	5			SM, ABPC	1	1	2	
	SM, TC, CP, KM, ABPC	1	21(1)	22		TC	1	10	11	
	SM, TC, CP, KM, CL	3	3			TC, ABPC	1	1	2	
	SM, TC, CP, KM, ABPC, CL	1	1			TC, CP	3	13	16	
	SM, TC, ABPC	7	2	9		CP	1	1		
	SM, TC, KM, ABPC	2	2			ABPC	1	1		
	SM, TC, KM, ABPC, GM	5	5			計	13	8	42	
	SM, TC, KM, ABPC, NA	1	1			Typhi	SM	3	3	
	SM, KM, CF	1	1			SM, TC, ABPC	2	2		
	SM, CP, KM, ABPC	1	1			KM, ABPC	1	1		
	SM, TC, CP, KM, ABPC, CL, ND	1	1			ABPC	1	1		
	TC	1	6	7		計	4	1	6	
	TC, CP	1	3	4		Tennessee	SM	3	1	
	TC, KM	1(1)	1	2		計	1	3	4	
	TC, CP, ABPC	3(1)	3			Agona	SM	1(1)	1	
	TC, CP, KM, ABPC	4	4	8		SM, TC, KM	1	1		
	KM	1	1			TC	1	1		
	ABPC	2	2			KM, ABPC	1	1		
計	24	22(1)	72(2)	92		TC, CP	1	1	5	
Enteritidis	SM	1	181(4)	182		Thompson	SM	1	1	
	SM, ABPC	1	1			TC, ABPC	1	1		
	SM, TC	1	16(1)	17		計	2	0	2	2
	SM, TC, CP	1	1			Braenderup	SM	1	1	
	SM, CP, ABPC, CF	1	1			SM, TC, KM, AM	1	1		
	TC	1	1			SM, KM	1	1		
計	6	3	200(5)	203		CM	1	1		
※ : 菌株数 ()は1996年の分離数の再掲										
KM										
計										
5										
0										
5										

47.8%を占め、以下 TC 単独耐性8.3%, TC, SM 2 剂耐性7.1%の順で、SM 単独耐性菌の多くは S.E であった。表示しなかったが、ヒト由来の場合には、SM 単独耐性菌は1989年から出現しはじめ、全国的に本菌食中毒の最も多かった1993～1994年には全体の8割以上を占めた。S. Typhimurium については24の耐性パターンが認められた。この血清型では3～7剤の多剤耐性株が多く、なかでも SM, TC, CP, KM, ABPC の5剤耐性が多かった。既に述べたように、近年、富

山市内の河川からのサルモネラ分離率は非常に低下した。その一方で、ヒトから分離された病原菌では、依然としてサルモネラが多く [1]、その分離率に減少傾向は認められない。このサルモネラ感染症を予防するために今後、環境だけでなくや食品中のサルモネラの動向を把握しなければならない。

文 獻

1. 国立予防衛生研究所編, 病原微生物検出情報 (1997). 3, 1-2.
2. 厚生省保健医療局食品保健課, 食品衛生研究

(1996). 46, 31-41.

3. 山崎茂一, 園家俊雄, 畑 祥子 (1981). 富山県衛研年報, 4, 221-226.
4. 磯部順子, 安井伊津子, 児玉博英, 山崎茂一 (1991). 富山県衛研年報, 14, 142-149.

富山県でヒトより分離された大腸菌の 血清型、毒素産生性

田中大祐 平田清久 磯部順子 細呂木志保
刑部陽宅 赤間美徳¹

Serotype and Toxin Production of *Escherichia coli* Isolated
from Human in Toyama Prefecture

Daisuke TANAKA, Kiyohisa HIRATA, Junko ISOBE, Shiho
HOSOROGI, Yotaku GYOBU and Yoshinori AKAMA

要旨 1991～1996年の間に、富山県内の病院で下痢症患者より分離された大腸菌247株、保健所で健康者あるいは海外旅行者下痢症より分離された大腸菌38株、計285株の市販血清に凝集する大腸菌について、血清型と毒素産生性を調べた。結果は次のようにあった。

1) 病院で分離された247株はOとH抗原により91種の血清型に分けられた。124株(50.2%)はEPEC, 12株(4.9%)はETEC, 27株(10.9%)はEHECで、EIECは1株であった。EHEC 27株の内19株は1996年に分離された菌株で、その内訳はO26:NM 1株、O26:H11 1株、O157:H7 17株であった。EPECでは血清型O18, O1, O111, その他の順に多く、ETECではO169:H41 4株、O25:NM 2株、その他の順に多かった。

2) 保健所で分離された38株はOとH抗原で25型に分けられた。健康者由来菌ではEPECが24株中19株(79.2%)を占めたが、海外旅行者下痢症由来菌ではETECが14株中7株(50.0%)を占めた。

大腸菌は、健康者の腸内に常在し、多くは無害である。しかし、一部の大腸菌には病原性があり、病原機序によって病原血清型大腸菌(EPEC), 組織侵入性大腸菌(EIEC), 毒素原性大腸菌(ETEC), 腸管出血性大腸菌(EHEC)の4種のカテゴリーに分類されている。

富山県では、毒素原性大腸菌O148による食中毒が多く、患者数数百名におよぶ大規模な食中毒が1993～1994年の間に3事例発生している。しかし、1996年はO157による大規模な集団発生が全国各地であり[1]、富山県でもO26やO157など

のEHECによる感染症が多かった。

当所では、1980年頃より富山県における本菌の実態を知るために調査を行ってきた。これまでに、1980～1990年の間に富山県で分離された菌株では、健康者ではEPEC、海外旅行者下痢症ではETECが多いことなどを報告した[2]。今回、1991年以降に分離された菌株について調べた結果を報告する。

1. 富山市民病院

Table 1. Serotype and Toxin Production of *E. coli* isolates from Hospitals

Serotype	No. of isolates	Toxin production				
		ST	LT	ST+LT	VT1	VT2
1 NM	9					
6	1					
7	8					
?	4					
NT	8					
6 NM	1					
4	1					
5	1					
7	1					
12	4					
16	1					
?	9					
NT	6					
8 NM	1					
4	1					
7	2					
16	1					
?	1					
NT	3					
15 45	1					
?	4					
NT	3					
18 NM	2					
4	4					
5	2					
7	7					
12	1					
?	5					
NT	14					
20 NM	1					
?	1					
25 NM	3	2				
12	1					
?	1					
NT	3					
26 NM	4			1		
11	2			2		
?	2					
28ac NM	1					
9	1					
?	1					
NT	1					
29 10	1					
44 NT	1					
55 NM	1					
7	2					
9	2					
?	1					
NT	3					
63 6	1					
78 10	1					
11	1					
NT	1					
Total	247			9	2	1
				3	4	20

材 料 と 方 法

1. 菌株

1991年から1996年の間に、富山県内の病院（主に富山市民病院）で散発下痢症患者から分離された247株、保健所で海外旅行者下痢症あるいは健康者から分離された38株計285株を用いた。

2. 血清型別

市販の病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて調べた（O165 : H25は除く）。

3. 毒素産生性の検査

耐熱性エンテロトキシン（ST）産生性はコリストEIA（デンカ生研）、易熱性エンテロトキシン（LT）産生性はVET-RPLA（デンカ生研）を用いて検査した。Vero毒素（VT）産生性は培養Vero細胞に対する致死作用あるいは大腸菌ペロトキシン検出用キット（デンカ生研）によって調べた。

結 果

1. 病院由来菌の血清型と毒素産生性

病院で分離された大腸菌247株について、血清型と毒素産生性を調べたところ、Table 1に示すように、菌体抗原による型別では、O18 35株、O1 30株、O157 25株、O6 24株、その他の順に多かった。

感染症検査情報システムマニュアルに示されるカテゴリーと血清型の関係によって菌のカテゴリーを判定すると、EPECは全体の50.2%を占め、O18 35株、O1 30株、O111 12株、O55とO128 9株、O86 8株、O26 5株、O126 5株、O125 3株、O20 2株、O44、O114、O119、O142、O146、及びO159 1株の順に多かった。

STやLTを産生するETECは247株中12株（4.9%）であった。これらの内ST単独産生菌はO25 : NM 2株、O126 : H12 1株、O128 : H12 1株、O148 : H28 1株、O169 : H41 4株、LT単独産生菌はO159 : H7 1株、O159 : H34 1株、STとLTを同時に産生する菌はO6 :

H16 1株であった。一方、VTを産生するEHECは247株中27株（10.9%）で、VT1単独産生菌はO26 : NM 1株、O26 : H11 2株、VT2単独産生菌はO157 : H7 3株、O165 : H25 1株、VT1とVT2を同時に産生する菌はO157 : H7 20株であった。表には示していないが、EHEC27株中19株は1996年に分離された菌株で、その内訳はO26 : NM 1株、O26 : H11 1株、O157 : H7 17株であった。

2. 保健所由来菌の血清型と毒素産生性

保健所で分離された大腸菌38株について血清型と毒素産生性を調べ、Table 2に示した。海外旅行者下痢由来菌14株では、O27 : H7 1株とO148 : H28 3株がST単独産生、O6 : H16 3株がSTとLT産生性であり、ETECが、14株中7株（50.0%）と多かった。EPECはO18 2株とO44 1株の合計3株であった。

健康者由来24株では、EPECが24株中19株（79.2%）と多かった。その内訳はO1 6株、O18 1株、O26 4株、O86 1株、O111 6株、O127 1株であった。EHECは患者の家族の健康者より分離されたO157 : H7 1株のみであった。

考 察

刑部ら[2]は、1980～1990年の間に富山県で分離された大腸菌ではEPECが多く、海外旅行者下痢由来ではETECが多かったと述べている。今回、その後の6年間に分離された菌を調べたところ、ほぼ同様な結果であった。しかし、その詳細をみると病院由来の菌株の場合、1980～1990年の間に分離されたO血清型別可能菌23株では毒素を生産するETECとEHECが1株も認められなかったのに対し、1991～1996年はETECが12株（4.9%）、EHECが27株（10.9%）認められた。ETECの増加の原因として、近年の海外旅行者の増加に伴い、ETECが分離された病院の患者にも少なからず海外渡航者が含まれていたこと、

Table 2. Serotype and Toxin Production of *E. coli* isolates from Health center

Source	Serotype		No. of isolates	Toxin production				
	O	H		ST	LT	ST+LT	VT1	VT2
Oversea traveller	6	16	3			3		
	18	9	1					
		?	1					
	25	?	1					
	27	7	1	1				
	44	4	1					
	143	?	1					
	148	28	3	3				
	153	?	2					
	Total		14	4		3		
Healthy carrier	1	NM	2					
		7	1					
		12	1					
		?	1					
		NT	1					
	18	4	1					
	26	NM	2					
		?	2					
	86a	?	1					
	111	NM	1					
		21	5					
	115	10	1					
	127a	NT	1					
	148	?	1					
	153	NM	1					
	157	7	1				1	
	169	?	1					
	Total		24				1	

国内において ETEC が増加したことなどが考えられる。ETEC 12株のうち、O169 : H41が4株と多かった。富山県では、これまでに本菌による食中毒の報告はないが、1991年以来国内各地で本菌による大規模な食中毒が多発している [3, 4] ので、その動向に注目したい。EHECについては、富山県では1991年にO157 : H7による感染症の初発が確認されて [5] から、1995年までに分離された菌株は我々が扱った限り8株であったが、1996年は19株と多かった。1996年は、全国的にO157などのEHECによる感染症が頻発し、富

山県でも EHEC についての検査が各地で行われたことを反映しているように思われる。

なお、表には示さなかったが、O28ac : NM 1株は EIEC の血清型に該当し、PCR 法で *invE* 遺伝子陽性であることから EIEC と判定した。

文 献

1. 国立予防衛生研究所編 (1996). 病原微生物検出情報月報, 17卷 8号, 1~11.
2. 刑部陽宅, 磯部順子, 林美千代, 安井伊津子, 石

平成9年10月1日

- 田繁, 児玉博英 (1991). 富山衛研年報, 14, 134–141.
3. 国立予防衛生研究所編 (1994). 病原微生物検出情報月報, 15卷1号, 4.
4. 国立予防衛生研究所編 (1995). 病原微生物検出情報月報, 16卷10号, 4 ~ 5.
5. 児玉博英, 林美千代, 刑部陽宅, 吉田喜美子, 岩口力男 (1992). 富山衛研年報, 15, 192–194.

オンライン固相抽出高速液体クロマトグラフィーによる 水道水中のトリクロロ酢酸, ジクロロ酢酸の分析法

松永明信, 山本敦, 大戸幹也, 小玉修嗣

Determination of Trichloroacetate and Dichloroacetate in Tap Water
by High-Performance Liquid Chromatography using On-Line
Solid-Phase Extraction System

Akinobu MATSUNAGA, Atsushi YAMAMOTO,
Mikiya OHTO and Shuji KODAMA

要旨 トリクロロ酢酸 (TCA) およびジクロロ酢酸 (DCA) は不揮発性の消毒副生成物であり、水質基準項目を補完するための監視項目に指定され、指針値が設定されている。水道水中の TCA, DCA を測定するための公定法は、煩雑な操作を必要とし、長時間を要する方法である。そこで高速液体クロマトグラフを用い、イオン交換系の濃縮カラムで水道水中の目的成分の捕集・抽出を行い、逆相分配系の分析カラムで分離し、検出器で定量する一連の操作を連続して行なう自動分析法を開発した。この方法で測定した値は公定法での測定値と良く一致した。本法は公定法に比較して、簡便・迅速であり、また有害な試薬を使用しないクリーンな方法であり、日常の検査業務の省力化に適した分析法と考えられる。

水道水の安全性の確保を図るために、水道法の水質基準が平成4年に改正された。また水質基準を補完するものとして監視項目が設定され、指針値が提示された。トリクロロ酢酸 (TCA) およびジクロロ酢酸 (DCA) は不揮発性の消毒副生成物であり、監視項目に指定されている。著者らは、県内の水道水について、これらの消毒副生成物の含有量を継続調査している [1, 2]。ところで、TCA, DCA の分析は、検水を強酸性条件下にて有機溶媒を用いて抽出した後、ジアゾメタンでメチル化し、ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MS) で定量する方法が公定法に採用されている。この方法は有害な試薬を使用し、操作が煩雑であり、長時間を必要とする。最近、急速に関心が高まっていることであるが、実験室あるいは地球的規模の環境に優しい、いわゆるクリー

ンな分析法が求められている。TCA, DCA の分析法としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC), イオンクロマトグラフィー (IC) を利用したクリーンな方法も報告されている [3, 4]。しかしながら、これらの方では検出感度が低いために、水道水を直接分析することは困難である。

著者等は、日常の検査業務の省力化を図るために、水中の微量有機化合物（農薬等）の簡易・迅速分析法の開発を行なってきた [5-7]。即ち、濃縮カラムに検水を大量に注入して目的成分を抽出・濃縮した後、スイッチング・バルブで流路を切り換えて、目的成分を溶出させ、分析カラムで分離し、検出器で定量する方法である。この方法を利用して、水中の TCA, DCA の分析法を確立することを試みた。TCA 等はカルボン酸に基づくイオン性と塩素原子に基づく疎水性を有する化

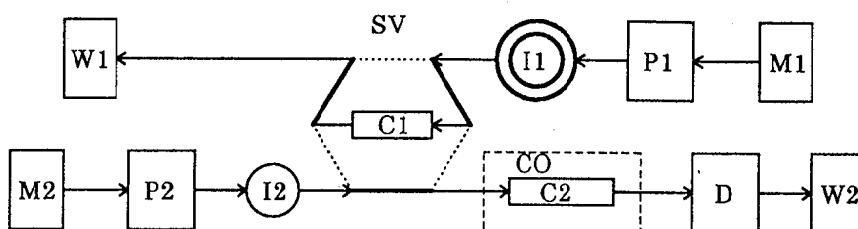


Fig. 1. Schematic Diagram of HPLC using On-Line Solid-Phase Extraction System.

M1:washing solution, P1:pump for extraction, I1:injector (3ml),
 SV:switching valve, C1:column for extraction, W1:waste,
 M2:mobile phase for separation, P2:pump for analysis, I2:injector (0.1ml),
 C2:column for separation, CO:column oven, D:UV-UIS detector, W2:waste

合物である。この性質を利用し、イオン交換系の濃縮カラムと逆相分配系の分析カラムを組合せることにより、水道水に適用できる良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

水道水を平成8年9月に採水し、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過したものを試料とした。

2. 試薬

標準品のTCA, DCAおよびモノクロロ酢酸(MCA)はそれぞれ和光純薬工業(株)の生化学用、一級品および特級品を用いた。アセトニトリルおよび蒸留水(以下、水)は関東化学工業(株)のHPLC用を、その他は特級品を使用した。

3. 標準溶液の調製

TCA, DCAおよびMCAを、それぞれ164,129および94.5mgを精秤し、水に溶解して100mlとしたものを標準原液(10mM)として冷蔵保存した。使用時に、この3種の標準原液を水で適宜希釈、混合して標準溶液($0.01\sim 1.0\mu\text{M}$)を調製した。

4. 装置構成

HPLC装置は、日立製作所(株)のL-6300型ポンプを濃縮・抽出用に、東ソー(株)のCCPD型ポンプを分離・分析用に、島津製作所(株)のSPD-6AV

型紫外・可視検出器、同CTO-10AC型カラム恒温槽、同C-R5A型データ処理装置、センシュー科学(株)のEIE010型スイッチングバルブおよびレオダイン社のループサイズ3mlおよび $100\mu\text{l}$ の7125型試料注入器(2個)を組合せ、濃縮カラムは三菱化成工業(株)のMCI GEL SCA02(4mm $\phi \times 32\text{mm}$:自家充填)を、分析カラムは昭和電工(株)のShodex RSpak DE-613(6mm $\phi \times 150\text{mm}$)を用い、Fig. 1に示すように構成した。

5. HPLC測定条件

サイズ3mlの試料注入器1(Fig. 1.中のI1)のループを、標準溶液または試料で充分に置換した。これを濃縮ポンプから送られる洗浄液(1mM硫酸-8%アセトニトリル)で、濃縮カラムに1ml/分の流速で5分間送液してTCA等を捕集・抽出した。次に、濃縮ポンプからのタイミング信号に基づいてスイッチングバルブを切り換え、分析用ポンプからの移動相(40mM硫酸-60mM水酸化ナトリウム-7.7%アセトニトリル:pH 2.1)を1ml/分の流速で濃縮カラムに送液した。溶出されたTCA等を分析カラムに導入し、分離された目的成分は波長210nmで検出した。分析カラムの温度は30°Cに設定した。なお、バルブの切り換え時にデータ処理装置を始動した。また分析終了後に再度バルブを切り替え、次の分析のために、濃縮カラムを1~2分間平衡化した。

6. GC/MSによるTCA, DCAの測定

試料中のTCAおよびDCAは公定法に準じて

GC/MS 法で定量した [8]。

結果と考察

1. HPLC 測定条件の検討

TCA, DCA のような紫外外部の低波長領域にだけ吸収を持つ成分の測定では、妨害成分の影響を充分に排除することが必須である。TCA, DCA はイオン性と疎水性を合わせ持つ化合物であり、イオン交換系と逆相分配系の両方のカラムに保持される [3, 4]。濃縮カラムと分析カラムの分離モードを異にすれば、夾雑成分の除去に好都合と考えられる。TCA, DCA はイオン交換樹脂には強い親和力を示したが、逆相系のカラムに対する保持は弱かった。そこで、濃縮カラムにイオン交換系を、分析カラムには逆相系を用いることにした。

濃縮カラムのイオン交換容量が大き過ぎると、バルブを切り替えた時に、分析用の移動相で瞬間に目的成分が溶出されない恐れがある。交換容量の小さな MCI GEL SCA02 ($30 \mu\text{eq/g}$) を充填して用いた。分析カラムについて検討したところ、ODS カラムでは保持が弱く、夾雑成分との分離が不充分であった。Asahipak ODP カラムでは保持力は充分であるが、ピーク形状が悪くて実用的でなかった。中極性ゲルの Shodex RSpak DE-613 では良好な保持およびピーク形状が得られたので、以後このカラムを用いて移動相の検討を行なった。

イオン交換系の濃縮カラムから TCA, DCA を瞬間に脱離させる強い溶出力を有し、検出波長 210nm で光吸収の無い塩として、硫酸塩を移動相の構成成分とした。硫酸イオン濃度と保持時間の関係を調べて、Fig. 2 A に示した。30mM以下の硫酸イオンでは、濃縮カラムからの溶出力が小さいためか、TCA, DCA に由来するピークは幅広い形状であった。ピーク形状と保持時間を考慮して、硫酸濃度は 40mM に設定した。次に、移動相の pH と保持時間の関係を Fig. 2 B に示した。pH の低下に伴って保持は強くなった。実試料の

分析では、始めに多くの夾雑成分の溶出が想定されるから、目的成分はある程度遅く溶出されることが好ましい。TCA と DCA との完全な分離を考慮して、pH は 2.1 に設定した。この pH は、 40mM 硫酸に 60mM 水酸化ナトリウムを添加して調整した。移動相のアセトニトリル濃度との関係は、Fig. 2 C に示すように、濃度の増加に伴って

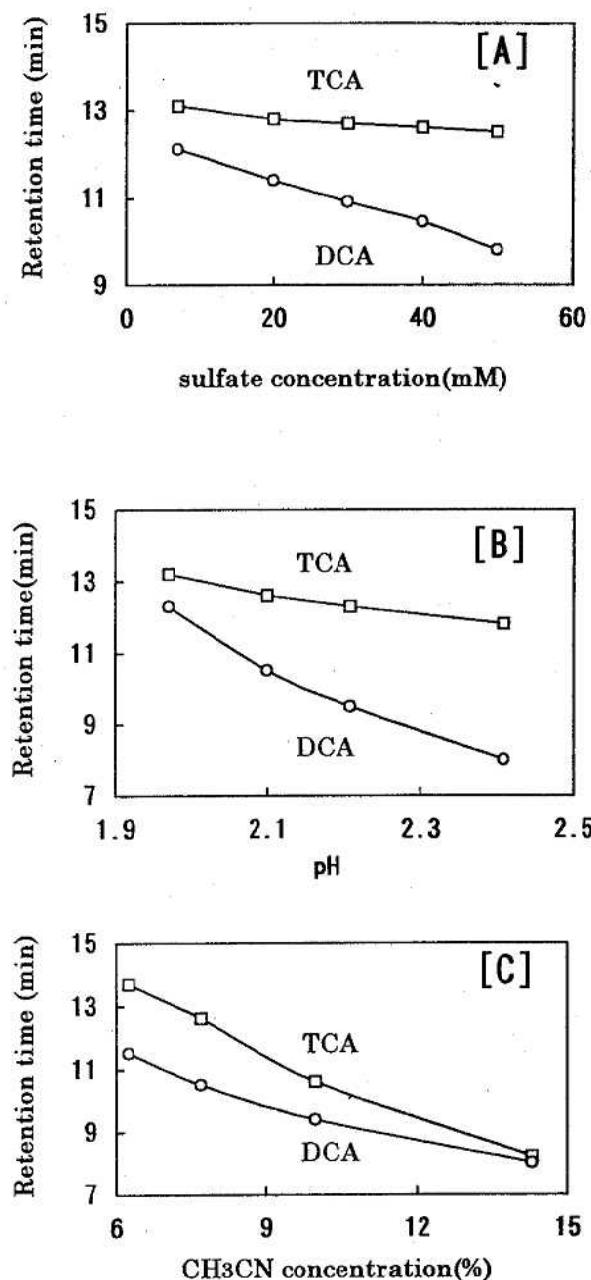


Fig. 2. Effect of Mobile Phase on the Retention Time of TCA and DCA

TCA, DCA の溶出は早くなつたので、両者の分離を考慮して、濃度は7.7%に設定した。

標準溶液または試料 3 ml を濃縮カラムへ完全に送液するためには、濃縮用ポンプから洗浄液を 3 ml 以上送液する必要がある。前報 [7] を参考にして、洗浄液量は 5 ml、即ち抽出時間は 5 分にした。濃縮カラムから試料の夾雜成分を予め洗浄・溶出するために洗浄液には 8 % アセトニトリルと、カラムを酸性に保つために 1 mM 硫酸とを添加した。以上の検討結果から、実験方法に記載の HPLC 測定条件を設定した。この条件で分析した標準溶液 ($0.3 \mu M$) のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。なお MCA は濃縮カラムに捕集されなかつたので、測定対象から除外した。

2. 検量線の作成

0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 μM の TCA および DCA 標準溶液 3 ml を注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。TCA は 0.01~1.0 μM の範囲で、DCA は 0.03~1.0 μM の範囲で原点を通る良好な直線性を示した。これらの検量線は、100倍濃度の標準溶液 30

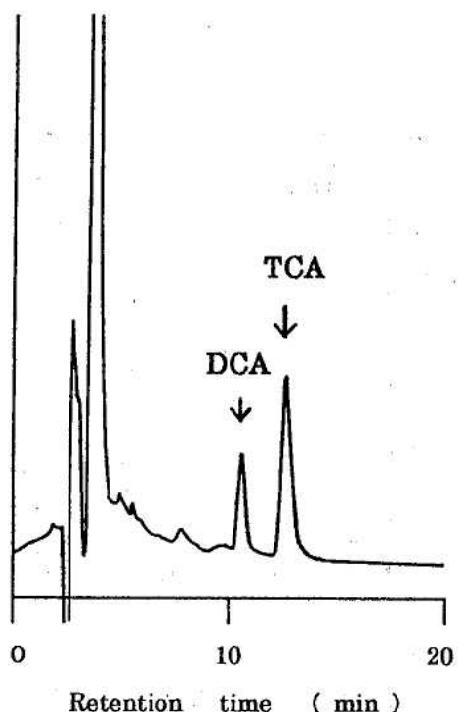


Fig. 3. Typical Chromatogram of DCA and TCA

μl を試料注入器 2 を用いて直接測定した場合の検量線とほぼ同一であった。したがつて、3 ml の標準溶液は濃縮カラムに定量的に補足されると推定された。

3. 試料液量の検討

標準溶液の場合には、少なくとも 3 ml までは濃縮カラムに定量的に補足されたので、水道水についての検討を行なつた。TCA および DCA が検出されないことを GC/MS 法で確認した水道水に、 $1.0 \mu M$ TCA, DCA を添加して試料とした。試料注入器 1 のループを 1~5 ml サイズに交換して、試料液量と各成分の回収量の関係を調べて、Fig. 4 に示した。なお、濃縮・抽出のための洗浄液量は、試料液量に 2 ml を加えた値に設定した。TCA は 5 ml までほぼ定量的に回収された。一方、DCA では試料液量の増加に伴つて、回収率は Fig. 4 に示すように 3 ml 以上では急激に減少したので、試料液量は 3 ml に設定した。

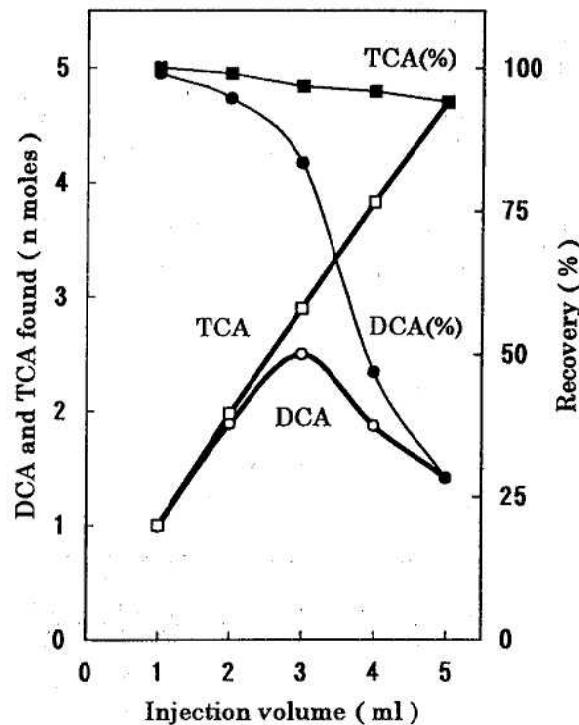


Fig. 4. Effect of the Sample Volume injected on the on-line Extraction Column on the Recoveries of DCA and TCA from a Tap Water

4. 添加回収実験

TCA および DCA が検出されない 7 検体の水道水に、TCA および DCA をそれぞれ $0.1 \mu\text{M}$ あるいは $1.0 \mu\text{M}$ 添加して回収実験を行った。クロマトグラムの一例 ($0.1 \mu\text{M}$ 添加) を Fig. 5 に示した。妨害成分の影響を受けること無く、TCA および DCA の定量が可能であった。なお、夾雜成分を全て溶出させるのに約 40 分を要したので、試料の分析は約 45 分間隔で行った。添加回収率を算出して Table 1 に示した。平均回収率はいずれ

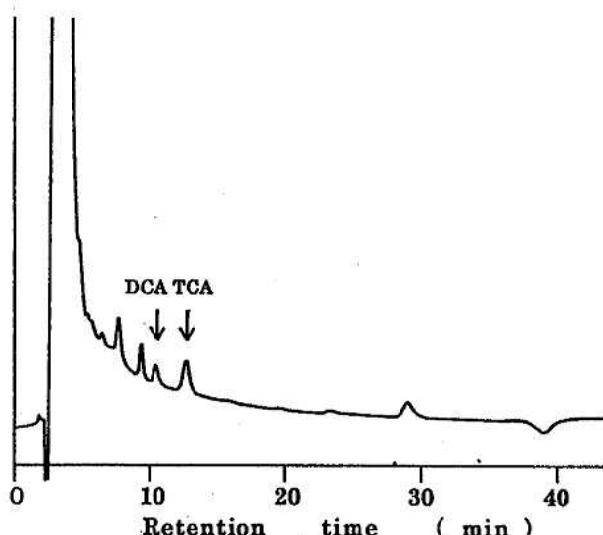


Fig. 5. Chromatograms of DCA and TCA spiked in Tap Water Samples

Table 1. Recoveries of DCA spiked to Tap Water Samples

Spiked	DCA (%)		TCA (%)	
	$0.1 \mu\text{M}$	$1.0 \mu\text{M}$	$0.1 \mu\text{M}$	$1.0 \mu\text{M}$
No.1	63.7	81.5	89.7	96.4
No.2	87.7	92.4	91.4	100.1
No.3	104.6	83.2	94.6	90.4
No.4	93.3	95.4	92.8	98.4
No.5	87.8	78.2	79.3	90.6
No.6	106.7	96.8	101.5	97.5
No.7	86.6	98.7	79.1	101.1
Mean	90.1	89.5	89.8	96.4
S.D.	14.2	8.3	8.1	4.3

の場合にも約 90% 以上であった。 $0.1 \mu\text{M}$ DCA の場合では回収率にバラツキ (63.7~106.6%) がみられるものの、その他の場合には標準偏差が 10% 以下と良好であった。

5. 公定法との比較

公定法で測定して TCA または DCA が検出された水道水について、本法を用いて測定した。両方法で得られた値を Fig. 6 に示した。検体数は少ないが、両法の値は概ね良く一致した (TCA での相関係数は 0.9389, DCA では 0.9294)。なお本法の定量下限は、TCA では $2 \mu\text{g/L}$ ($0.01 \mu\text{M}$)

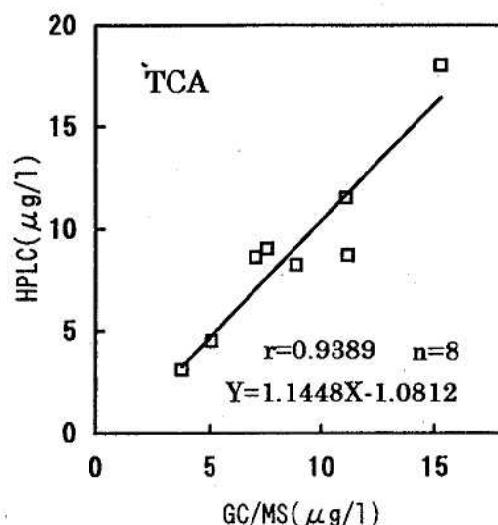
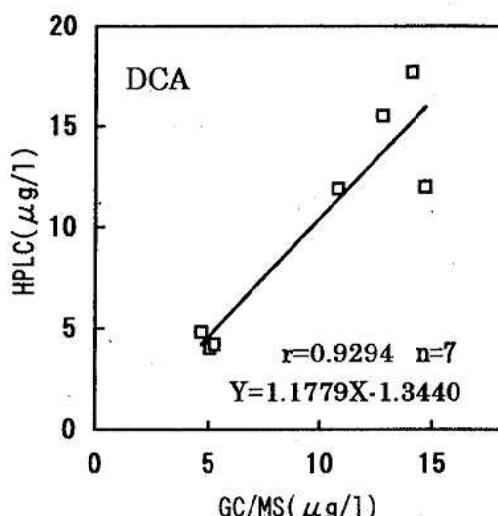


Fig. 6. Comparision of DCA and TCA contents determined in tap waters by HPLC and GC/MS method

M), DCA は $4 \mu\text{g/L}$ ($0.03 \mu\text{M}$) であり、両者の指針値それぞれ $300 \mu\text{g/L}$ および $40 \mu\text{g/L}$ に対して $1/10$ 以下であった。したがって、今回確立した簡易・迅速なる HPLC 法は、有害な試薬を使用しないクリーンな方法であり、日常の検査業務に利用するスクリーニング法として実用的な方法と考えられる。

文 献

1. 大戸幹也, 松永明信 (1995). 富山衛研年報, 18, 158-162.
2. 大戸幹也, 篠名智子, 大浦 敏, 松永明信 (1996). 富山衛研年報, 19, 211-213.
3. Husain, S., Narsimha, R., Alvi, S. N. and Nageswara, R. R. (1992). J. Chromatogr., 600, 316-319.
4. Nair, L. M., Saari-Nordhaus, R. and Anderson, Jr. J. M. (1994). J. Chromatogr. A, 671, 309-313.
5. 山本 敦, 大戸幹也, 細呂木志保, 松永明信, 水上英一 (1992). 衛生化学, 38, 374-377.
6. 大戸幹也, 山本 敦, 松永明信, 水上英一 (1994). 分析化学, 43, 71-74.
7. 小玉修司, 松永明信, 大戸幹也, 山本 敦, 水上英一 (1995). 環境化学, 5, 81-86.
8. 厚生省 (1992). 平成4年12月21日 衛水第264号 生活衛生局水道環境部長通知.

閉経女性の運動習慣と骨代謝マーカーの推移に関する検討

西野治身 田中朋子 堀井裕子
 熊西忠郎 伊木雅之¹ 梶田悦子²
 土肥祥子³ 日下幸則¹ 鏡森定信⁴

Association between Change of Habitual Exercise
 and that of Bone Biochemical Markers in
 Healthy Post-menopausal Women

Harumi NISHINO, Tomoko TANAKA, Yuko HORII,
 Tadaro KUMANISHI, Masayuki IKI¹, Etsuko
 KAJITA², Yoshiko DOHI³, Yukinori KUSAKA¹
 and Sadanobu KAGAMIMORI⁴

要旨 中高年から始めた軽度の運動習慣が、骨量低下の予防に効果があるかを評価するための縦断的調査を実施した。調査開始時に運動習慣が“なし”と回答した健常な自然閉経者を4年間追跡し、2年後以降運動習慣“あり”に変更した変容群と4年間運動習慣“なし”的未変容群について骨代謝マーカーの変化を腰椎骨密度（BMD）とともに比較したところ、以下の結果を得た。

1. 骨代謝回転の指標とされる血清中の骨型 gla protein (BGP) は、運動習慣のない未変容群で4年後に有意に上昇し、代謝回転の亢進が推測されたが、変容群では有意な上昇はみられなかった。
2. 骨吸収マーカーとされる尿中 hydroxyproline (Hyp) は、未変容群では4年後に開始時と同レベルの高値を示したが、変容群では2年後以降有意な低下が観察され、運動による骨吸収抑制の可能性が推測された。
3. BMD は、未変容群で追跡期間中に有意に低下したが、変容群での低下は認められず、軽度の運動の骨粗鬆症予防への効果が示唆された。

高齢化が進むなか、誰もが老後も健やかな生活を送りたいという願いは強く、寝たきり予防に対する関心は急速に高まりつつある。それに伴い、寝たきりの原因疾患である骨粗鬆症への関心も高

まる一方である。

骨粗鬆症の予防には、思春期や成年期において最大骨量をできるだけ高めるとともに、閉経周辺からの骨量減少をいかに抑えるかが重要といわれ

1. 福井医科大学環境保健学 2. 富山医薬大老年地域看護学 3. 奈良医大公衆衛生学
 4. 富山医薬大保健医学

る。それ故に、中高年女性の骨塩量に影響する要因やその程度を明らかにすることは、閉経後に多発するこの疾患の一次予防に有効な資料を提供できるものと考えられる。

影響要因のなかで、改善可能なライフスタイル要因が注目され、特に運動が重要視されている。しかし、この要因も成人では若年者に効果があると報告[1]されているものの、高齢者では効果はないとする報告[2]もみられる。

そこで今回、中高年から開始した運動習慣が骨量低下の防止に役立つかを明らかにするため、運動習慣のない閉経女性を4年間追跡し、追跡期間中に運動習慣を持った変容群と、その後も運動習慣を持たない未変容群について、追跡期間中の骨代謝マーカーの推移を骨密度と併せて比較検討したので報告する。

対象および方法

1. 調査対象

福井県の某地域に住む48~75歳までの自然閉経者108人を4年間追跡した(表1)。開始時のアンケート調査で運動習慣“なし”と答えた83人(76.9%)を抽出し、2年後および4年後に再度同じ調査を実施した。2年後以降、運動習慣が“あり”に変容した11人(10.2%)を運動習慣“変容群”とし、2年後および4年後も運動習慣“なし”的55人(50.9%)を“未変容群”とした。変容群には、他に2年後のみ“あり”(7人、6.5%)、または4年後のみ“あり”(10人、9.3%)の2群が存在したが、今回は対象から除外した。対象者は、いずれも骨塩量に影響するような既往歴や手術歴がなく、全員からは事前に調査の承諾を得ている。

Table 1. Follow-up Study on Habitual Exercise in Healthy Post-menopausal Women
(N=108)

		N	%
Without habitual exercise at baseline	<u>Not changed group</u> Without habitual exercise during follow-up period <u>Changed group</u> With exercise 2 ys after With exercise 4 ys after With exercise both 2 and 4 ys after	55 7 10 11	50.9 6.5 9.3 10.2
	Total	83	76.9
With habitual exercise at baseline	<u>Not changed group</u> With habitual exercise during follow-up period <u>Changed group</u> Without exercise 2 ys after Without exercise 4 ys after Without exercise both 2 and 4 ys after	8 2 7 8	7.4 1.8 6.5 7.4
	Total	25	23.1

N : Number of subjects

ys : years

2. 方法

調査内容は、骨塩量および骨代謝マーカーの測定、既往歴、月経歴、ライフスタイルに関する面接調査などである。

骨塩量の指標は、第2～第4腰椎BMDをDXA法で測定し、その平均BMDとした。

骨代謝の生化学指標として、骨吸収マーカーとされる尿中 Hydroxyproline creatinine 比（以下 Hyp/Cr）と Calcium creatinine 比（以下 Ca/Cr）ならびに骨形成マーカーとして血清中の骨型 Alkaline phosphatase（以下 B-ALP）と BGP を測定した。さらに初回時のみ骨吸収マーカーである Pyridinoline (Pyr/Cr), Deoxypyridinoline (DPyr/Cr) を測定し解析に加えた。各測定法については既に述べた通りである [3]。

ライフスタイル要因として取り上げた運動習慣には、仕事以外の運動（散歩、山歩き、登山、かけあし、ジョギング、ラジオ体操、ダンス、ゲートボール、テニスなど）の有無を質問した。同時に食品群別に摂取量の調査を実施し、栄養素摂取量として算出した。

3. 統計学的処理

尿中 Hyp/Cr 比ならびに血清 BGP は対数正規分布を示したので幾何平均値を用いた。4年間の

経年変化の有意性は対応ある t-検定により行い、5%以下を有意とした。

結 果

表1に自然閉経者108人（平均年齢 59.9 ± 5.6 歳）の運動習慣を4年間追跡した結果を示す。開始時に運動習慣を持っていたのはわずか25人（23.1%）で、残りの83人（76.9%）は運動習慣“なし”と回答した。今回対象とした変容群と未変容群の基本的特性を表2に示したが、両群の年齢、体格、閉経後年数に有意差はみられなかった。

表3は、開始時、2年後、4年後の腰椎BMDを両群で比較したものであるが、どの時期のBMDにも2群間に差はみられなかった。しかし、BMDの経年変化を、対応するt-検定で検討したところ（図1）、変容群では2年後、4年後と横這いに推移し、BMDの低下はみられなかったのに対し、未変容群では徐々に低下傾向を示し、4年後には開始時より有意に低下していることが明らかとなった。

同様に、骨代謝マーカーについても比較検討したが、開始時（表4）および追跡時（表5）の2群間のマーカーに差を認めるものはなかった。一

Table 2. Basic Characteristics of the Changed and Not Changed Group without Habitual Exercise at Baseline

Without exercise at baseline [N=83]			
	Changed group With exercise both 2 and 4 years after [N=11]	Not changed group Without exercise during follow-up [N=55]	
Age (years)	59.5 ± 5.3	60.1 ± 4.0	
Height (cm)	148.7 ± 6.6	148.7 ± 5.5	
Weight (kg)	52.3 ± 8.1	54.4 ± 7.3	
BMI (kg/m ²)	24.6 ± 2.9	23.6 ± 2.0	
Age at menopause	48.9 ± 4.4	47.9 ± 3.8	
Years after menopause	11.4 ± 3.5	11.2 ± 6.7	

N : Number of subjects

Table 3. Comparison between Lumbar Bone Density of the Changed and Not Changed Group without Habitual Exercise at Baseline in Healthy Post-menopausal Women

Bone density (g/cm ²)	Changed group [N=11]	Not changed group [N=55]	t-test
At baseline	0.753±0.096 ^a	0.784±0.158	NS
2 ys after	0.747±0.098	0.770±0.149	NS
4 ys after	0.751±0.100	0.764±0.143	NS

^a : Mean ± SD

ys : years

NS : Not significant

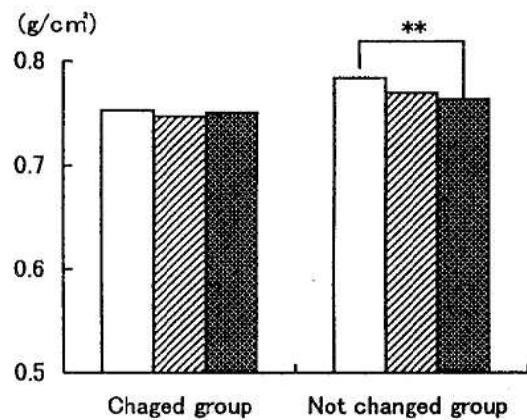
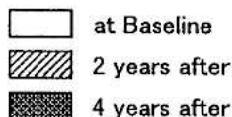


Fig. 1. Lumber Vertebral Bone Loss in the Changed and Not Changed Group of Habitual Exercise during 4 Years Follow-up Period



方、マーカーの経年変化を検討したところ(図2)、血清中のBGPは、未変容群で、4年後に開始時より有意な上昇がみられたが、変容群での変化は認められなかった。尿中Hyp/Cr比は、変容群において2年後および4年後に有意な低下が認められた。未変容群では2年後に低値を示したもののが4年後に差は消失し、開始時の高レベルに戻った。他のマーカーである血清中のB-ALPと尿中Ca/Cr比は一定の変化を示す傾向はみられなかつた。

た。

骨代謝に影響する要因を分析するにあたっては運動習慣とともに食習慣についても考慮する必要がある。そこで、調査開始の食事調査から栄養摂取量を計算し2群間で比較したところ、表6に示すように、今回の対象者ではエネルギー摂取量や蛋白、Ca、I-Pなどの栄養素量に違いは認められなかった。

考 察

女性の腰椎骨密度に対する影響要因として先ずあげられるのは年齢と閉経である。しかし、これらは制御できない要因であり、予防対策を立案するうえで重要視されるのは、改善可能なライフスタイル要因である。特に、運動の影響は予防上期待されるところが大きい。

骨量の減少は、骨吸収と骨形成のバランスである程度推測することができる[4]。これまで、著者らは骨代謝指標を通して骨密度への影響要因を検討してきたが[5]、運動と骨代謝指標との関係では、以前の小学生の調査[6]において、運動クラブに入り運動量が多い学童ほど骨吸収マーカーが低値を示す結果を得た。これは、運動が骨吸収を抑え、相対的に骨形成を活発にすることでの骨量増加に役立っている可能性を示唆するものである。

Table 4. Biochemical Markers of Bone Metabolism at Baseline of the Changed and Not Changed Group without Habitual Exercise at Baseline in Healthy Post-menopausal Women

Biochemical markers at baseline	Changed group [N=11]	Not changed group [N=55]	t-test
B-ALP (BLU)	1.55±0.62	1.54±0.42	NS
BGP# (ng/ml)	7.3 (1.77)	8.4 (1.67)	NS
Hyp/Cre# (mg/gCre)	47.9 (1.63)	42.3 (1.47)	NS
Ca/Cre# (mg/gCre)	206.5 (1.910)	230.7 (1.714)	NS
Pyr/Cre# (nmol/mmolCre)	30.7 (1.30)	35.2 (1.28)	NS
DPyr/Cre# (nmol/mmolCre)	6.2 (1.39)	6.7 (1.40)	NS

: Geometric mean (Geometric SD)

B-ALP : Bone alkaline phosphatase

BGP : Bone gla-protein

Hyp/Cre : Hydroxyproline Creatinine ratio

Ca/Cre : Calcium Creatinine ratio

Pyr/Cre : Pyridinoline Creatinine ratio

DPyr/Cre : Deoxypyridinoline Creatinine ratio

Table 5. Biochemical Markers of Bone Metabolism at Follow-up 2 Years or 4 Years After of the Changed and Not Changed Group without Habitual Exercise at Baseline in Healthy Post-menopausal Women

Biochemical markers at follow-up	Changed group [N=11]	Not changed group [N=55]	t-test
2 years after			
B-ALP	1.73±0.81	1.60±0.43	NS
BGP#	8.3 (1.64)	9.1 (1.45)	NS
Hyp/Cre#	31.8 (1.35)	34.7 (1.49)	NS
Ca/Cre#	320.6 (1.622)	243.8 (1.787)	NS
4 years after			
B-ALP	1.54±0.68	1.53±0.34	NS
BGP#	9.9 (1.92)	11.8 (1.56)	NS
Hyp/Cre#	34.7 (1.60)	38.2 (1.50)	NS
Ca/Cre#	318.4 (1.531)	238.2 (1.585)	p<0.1

: Geometric mean (Geometric SD)

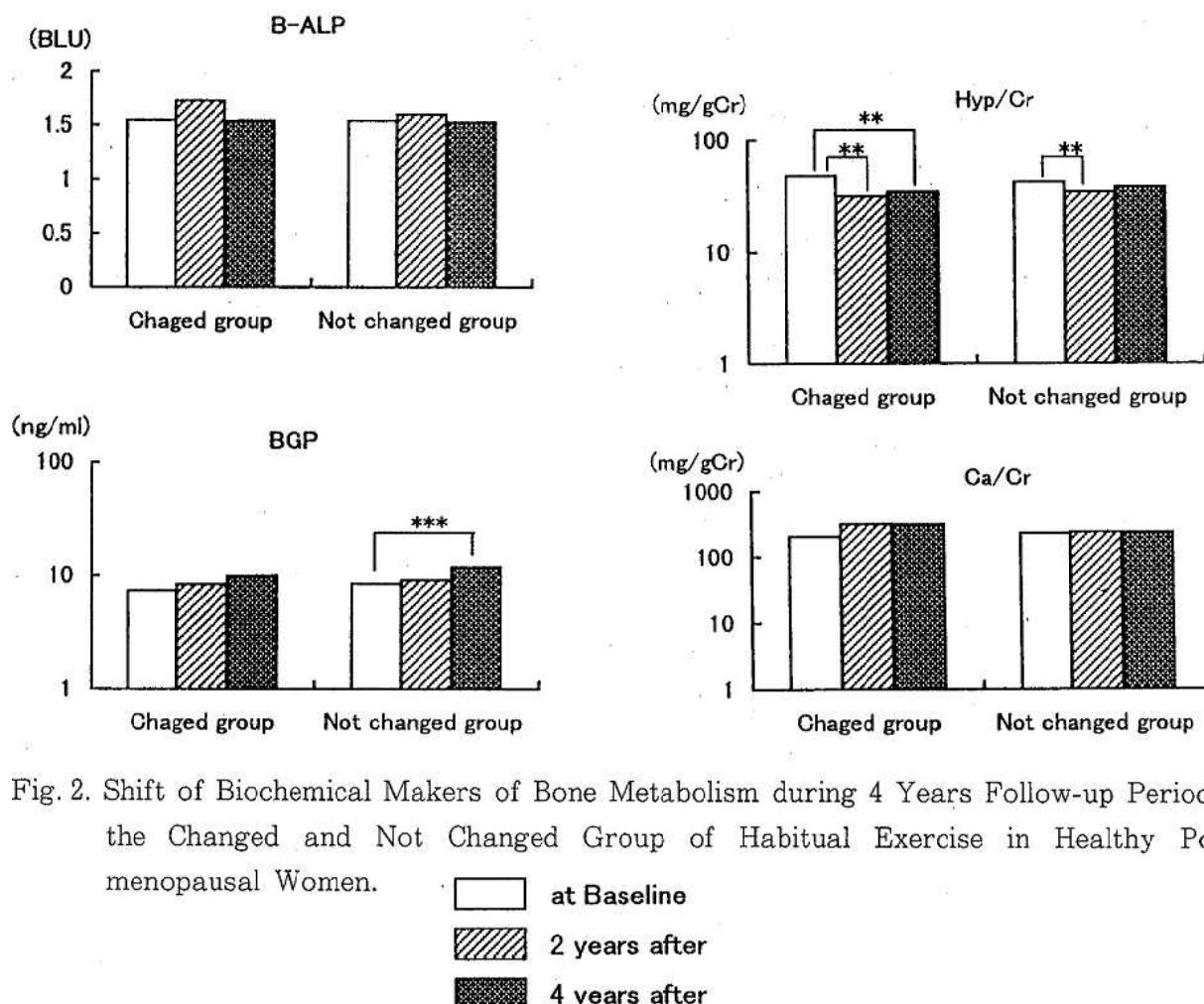


Fig. 2. Shift of Biochemical Makers of Bone Metabolism during 4 Years Follow-up Period in the Chaged and Not Changed Group of Habitual Exercise in Healthy Post-menopausal Women.

Table 6. Nutrients Intake at Baseline of the Chaged and Not Changed Group without Habitual Exercise at Baseline in Healthy Post-menopausal Women

Nutrients per day		Changed group [N=11]	Not changed group [N=55]
Energy	(kcal)	2085±403	2113±436
Protein	(g)	74.5±9.2	73.6±16.6
Lipid	(g)	49.7±9.3	49.4±12.6
Carbohydrate	(g)	318 ± 85	323 ± 83
Na	(g)	17.5±6.7	14.8±4.0
K	(mg)	3091±535	2848±633
Ca	(mg)	676±150	630±146
I-P	(mg)	1094±148	1072±225
Fe	(mg)	11.4±1.8	10.6±2.1
Fiber	(g)	17.9±3.4	16.6±3.8

佐藤ら [7] は、運動の骨代謝に対する影響について、骨髄内の血流量を増加させ、骨芽細胞を活性化するとともに、骨に対する機械的外力によって骨量や筋肉量を増加させると述べている。著者らが調査したところ、中高年者では実際に激しいスポーツを実施しているものはほとんどみられず、体操、山歩き、ゲートボールなどの軽い運動が試みられていた。このような軽い運動で直接骨芽細胞を活性化しうるか、そして骨量の維持に役立つかは明らかではない。また、その調査のために軽い運動量を定量的に評価することは容易ではないが、運動歴”なし”については比較的正確に把握できるので、中高年になってからの運動習慣の変容で骨代謝への影響が推測できるのではないかと考えた。縦断的調査により閉経女性を4年間追跡の結果、期間中全く運動習慣を持たない群（未変容群）では、骨吸収優位のアンバランス状態で高回転型に移行している可能性を示した。そのため、骨密度は4年後に減少してしまったものと推測される。一方、2年後から2年間運動を継続した群では、運動による骨吸収の抑制が観察された。その結果、骨形成の相対的な割合が増え、骨密度は大きくは低下しなかったのであろう。

影響要因として運動とともに重要視されているものに、カルシウムを中心とする栄養摂取量があげられる。実際に、運動は食欲増進につながり、運動群で栄養素摂取量が多いことを確認している（未発表）。今回の対象者でも運動習慣を持つようになった変容群で、結果としてカルシウム摂取量が多い可能性があったが、実際には栄養摂取量に差はなかった。また、両群の年齢、体格、閉経後

年数に違いはないので、これらの影響も小さいものと思われる。

従って、骨量とマーカーに影響する主な要因は本研究では運動と考えられる。中高年からの運動は、循環器系や糖代謝系疾患などに有効であることが指摘されているが [8]、本調査により、骨粗鬆症でも、中高年からの歩くなどの軽い運動習慣による予防の可能性が示唆された。

文 献

1. 揚 鴻生 (1991). 公衆衛生, 55, 22-26.
2. 西野治身, 田中朋子, 堀井裕子, 伊木雅之, 梶田悦子, 土肥祥子, 日下幸則, 鏡森定信 (1995). 富山衛研年報, 18, 167-172.
3. 西野治身, 田中朋子, 堀井裕子, 伊木雅之, 日下幸則, 梶田悦子, 鏡森定信 (1994). 富山衛研年報, 17, 155-160.
4. 折茂肇 (1987). カルシウム・ビタミンと骨粗鬆症, 35-38, メジカルビュー社.
5. 西野治身, 伊木雅之, 田中朋子, 堀井裕子, 土肥祥子, 梶田悦子, 日下幸則, 鏡森定信 (1995). 北陸公衆衛生学会誌, 22, 78-85.
6. 堀井裕子, 西野治身, 田中朋子, 林 徹雄, 山上孝司, 成瀬優知, 鏡森定信 (1993). 富山衛研年報, 16, 152-155.
7. 佐藤哲也, 小池達也 (1993). 医学のあゆみ, 165, 581-588.
8. 厚生省老人保健課監修 (1991). 生活習慣改善マニュアル, 社会保険出版社 (東京).

思春期における運動と血清尿酸値との関連 —男子高校生について—

田中朋子 堀井裕子 西野治身
熊西忠郎 山上孝司¹ 鏡森定信¹

Correlation between Exercise and Serum
Uric Acid in Adolescence
— in High School Boys —

Tomoko TANAKA, Yuko HORII, Harumi NISHINO,
Tadaro KUMANISHI, Takashi YAMAGAMI¹
and Sadanobu KAGAMIMORI¹

要 旨 高校3年生男子の血清尿酸値と運動クラブ活動の有無およびスポーツテスト成績との関連を検討したところ、運動クラブ活動の有無による違いはなかったが、スポーツテストの得点が高いもの（運動量の多い者）では低値を示し、高校生における運動習慣は高尿酸血症に起因する種々の成人病予防に有用と考えられた。

高尿酸血症、痛風発症の原因の一つとして激しい運動をする運動選手で血清尿酸値（以下UA）が高くなるいわゆる運動性高尿酸血症についてはよく知られているところであり、古くからオリンピック選手やプロ野球選手の血清尿酸値が高値を示し、高尿酸血症の出現率も多いという報告がある〔1, 2〕。しかし、近年ではむしろ活動度の高い人は尿酸値が低いことや〔3〕、有酸素運動であれば必ずしも尿酸値を上昇させないこと等〔4〕が報告され、運動と血清尿酸値との関連がみなおされている。一方、最近では、高尿酸血症、痛風発症の若年化が懸念されているが〔5〕、成長期におけるUAの動態、特に運動との関係は必ずしも明らかにされていない。そこで、高校3年生男子について、UAと運動との関連をスポーツテスト(ST)成績を用いて検討した。

対象および方法

1. 調査対象

対象は県立高校の3年生男子のうちST全種目を実施できた46名とした。

2. 調査方法

採血は昼食前に実施した。測定項目はUAの他、肝機能項目としてGOT, GPT、脂質では総コレステロール(TChol), HDLコレステロール(HDLChol)、であり、TChol, HDLCholよりアテローム性動脈硬化指数(AI)〔HDLCholに対する(TChol-HDLChol)の比〕を求めた。腎機能項目はクレアチニン(Cr)、尿素窒素(BUN)である。UAとの関連を検討したのは肥満度〔BMI 22に相当する体重を標準体重として算出〕、生化学項目、学内での運動クラブ活動の

1. 富山医科大学保健医学

有無のほか、ST成績として反復横跳び、垂直とび、背筋力、握力、伏臥上体そらし、立位体前屈、踏み台昇降の成績と以上7項目を総合した体力診断テスト合計得点、および50m走、走り幅跳び、ハンドボール投げ、懸垂、持久走の成績とそれら5項目から算出した運動能力テスト合計得点である。

結 果

1. UA の平均値および高尿酸血症の出現率について

全対象者のUAおよびその他の生化学項目、肥満度について平均値、最大値、最小値をTable 1に示した。UAの平均値士標準偏差は 5.8 ± 1.07 mg/dl、最大値9.3、最小値3.7mg/dlであった。7.0mg/dl以上を高尿酸血症とすると4名(8.7%)がこれに該当した。

2. 他の生化学指標および肥満度との関連について

UAとの関連は肥満度をはじめ、肝機能項目、

Table 1. Serum Uric Acid and Other Chemicals

	Mean \pm S.D.	Min.	Max.	Correlation to uric acid
UA (mg/dl)	5.8 ± 1.07	3.7	9.3	—
GOT (U/l)	31 ± 8.0	18	57	0.001
GPT (〃)	30 ± 9.6	12	63	0.145
TChol(mg/dl)	156 ± 24	87	234	0.054
HDLChol (〃)	56 ± 9.5	40	91	0.041
AI ^{a)}	1.83 ± 0.52	0.93	3.42	0.031
Cre (〃)	1.2 ± 0.11	1.0	1.4	0.247
BUN (〃)	14.8 ± 4.21	8.6	25.2	0.191
Degree of obesity (%)	0.1 ± 10.3	-18.9	27.1	0.131

a) Atherogenic index

Table 2. Serum Uric Acid and Other Chemicals in Subjects of No-Sport Club and Sport Club

	No-Sport club (n=11) Mean \pm S.D.	Sport club (n=35) Mean \pm S.D.
UA (mg/dl)	5.9 ± 0.84	5.8 ± 1.16
GOT (U/l)	28 ± 3.9	32 ± 8.8
GPT (〃)	34 ± 14.6	29 ± 7.5
TChol(mg/dl)	157 ± 20	156 ± 26
HDLChol (〃)	55 ± 7.8	56 ± 10.1
AI ^{a)}	1.89 ± 0.52	1.82 ± 0.53
Cre (〃)	1.1 ± 0.11	1.2 ± 0.11
BUN (〃)	12.8 ± 2.10	15.5 ± 4.57
Degree of obesity (%)	-0.1 ± 11.8	0.0 ± 10.1

a) Atherogenic index

Table 3. Physical Fitness Performance in Subjects of No-Sport Club and Sport Club

	No-Sport club (n=11)	Sport club (n=35)	t-test
Side-step(steps)	48.1±1.38	50.7±3.97	**
Vertical jump(cm)	66.9±6.50	68.0±7.24	
Back strength(kg)	130.0±13.4	132.7±25.9	
Grip strength(kg)	39.4±5.43	41.5±5.61	
Step test(points)	66.8±12.9	74.5±13.2	
Trunk extension(cm)	58.3±10.11	52.4±8.28	
Standing trunk flexion (cm)	10.8±6.77	8.6±7.80	
Physical fitness score (points)	25.0±3.20	24.9±2.74	
50M dash(sec)	6.95±0.25	6.84±0.41	
Running long jump(cm)	424±26.1	447±51.8	
Ball throw(m)	25.1±4.53	29.7±5.19	*
Pull ups(fre.)	4.2±2.99	8.1±5.38	*
1500M run(sec)	376±40.2	337±37.1	**
Motor ability score (points)	35.8±8.67	52.0±16.06	***

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

Table 4. Relationship between Serum Uric Acid and Physical Fitness Performance in Subjects of No-Sport Club and Sport Club

	No-Sport club (n=11)	Sport club (n=35)	Total (n=46)
Side-step	0.725*	0.076	0.096
Vertical jump	-0.348	-0.402*	-0.394**
Back strength	-0.115	-0.221	-0.211
Grip strength	0.040	-0.416*	-0.338*
Step test	-0.531	-0.236	-0.267
Trunk extension	-0.446	0.047	-0.036
Standing trunk flexion	0.217	-0.317	-0.224
Physical fitness score	-0.120	-0.492**	-0.422**
50M dash	0.729*	0.301	0.344*
Running long jump	-0.062	-0.318	-0.296*
Ball throw	-0.059	-0.471**	-0.397**
Pull ups	-0.183	-0.272	-0.265
1500M run	0.412	0.157	0.208
Motor ability score	-0.526	-0.381*	-0.379**

* : P<0.05, ** : p<0.01

脂質、腎機能項目のいずれの項目とも認められなかった (Table 1)。

3. 運動との関連について

運動クラブ活動の有無別に、UA、各生化学項目、肥満度を比較した (Table 2)。しかし、UA をはじめ、いずれの項目についても有意差は認められなかつた。

次に、ST 成績をクラブの有無で比較したところ (Table 3)，クラブ有りが反復横跳び、ボール投げ、懸垂、持久走、運動能力総合でクラブ無しに比べ高得点を示した。

そこで、UA と ST 成績との関連を運動クラブの有無別に検討した (Table 4)。クラブ無しでは反復横跳び、50m走と正の相関、クラブ有りでは、垂直跳び、握力、体力総合、ボール投げ、運動能力総合と負の相関が認められた。

考 察

1. UA の平均値および高尿酸血症の出現率について

一般に男性の UA は女性に比し高く、さらに思春期には生理的に高値を示すといわれており、5 歳毎の年齢区分で 15~19 歳の平均値は 6.18mg/dl であり、前後の年齢層より高かったという報告がある [6]。一方、われわれが行った学童期からの UA の調査 [7] では高校 1 年生、2 年生の UA はそれぞれ 6.1, 6.3mg/dl であり、今回の全対象者の平均値 5.8mg/dl はこれらの数値に比べやや低く、思春期における UA 高値のピークを過ぎていると考えられた。さらに、一般成人についての最近の調査では、5.5mg/dl~6.0mg/dl の報告が多く [8~11]、高校 3 年生のレベルはこの範囲内であった。しかし、高尿酸血症の出現率 (8.7%) はこれらの報告 (10%~15%) に比し少ない傾向にあった。

2. 肥満度および他の生化学指標との関連について

成人における高尿酸血症、痛風の危険因子として、多くの調査 [3, 11, 12] で肥満が重要であ

るとしている。しかし、本調査では両者には関連が認められなかつた。近年では、肥満による UA の上昇に関与するのは体脂肪量、特に内臓脂肪量であるといわれている [13, 14]。これについて、今回は肥満度として BMI 22 に相当する体重を標準体重とし、それに対する割合を用いたが、肥満の概念はあくまでも体に脂肪が過度に蓄積した状態であつて、体重の過多ではない。近年では、体脂肪率が簡便に測定できるようになってきたことから、肥満を体脂肪量により判定することが試みられている。今後は、若年者についても UA との関連をより明らかにするために、体脂肪量を測定する必要があると考えられる。

UA と他の生化学指標との関連について、成人では肝機能や脂質代謝との関連、腎機能との関連を指摘している報告は多い [15, 16, 17]。しかし、今回の対象者ではいずれとも関連は認められなかつた。このことについては、この年代では飲酒習慣がないと考えられることや、腎機能異常者、高コレステロール血症者がみられないこと等がその理由としてあげられるであろう。

3. 運動との関連について

今回、運動クラブ活動の有無による UA の違いは認められなかつたが、運動クラブに入っている者のうち、ST 成績の良い者の UA は低値を示した。ST 成績は運動量を反映する [19] とされることから、運動量の多い者ほど UA が低値を示したといえる。

これまで、激しい運動をすると UA が高くなるいわゆる運動性高尿酸血症はよく知られており [18]、痛風患者や高尿酸血症者に対して、運動を制限する治療法がとられてきた。しかし、近年では激しい運動とは無酸素運動であり、骨格筋中のプリン体の分解が進むために UA が高くなるが、有酸素運動の範囲内であれば UA を上昇させないと言われるようになってきた [4]。実際、内藤らは 40 歳代の成人男性において、日常身体活動量の大きい者の UA は低値を示したと述べており、比較的軽度の運動が UA を低下させる可能性を指摘している [3]。このことについて、山中は運動そのものが UA を下げるかどうか不明

であるが、体脂肪の減少を介して長期的には低下させる可能性があると述べている [20]。今回の調査では、運動習慣が体脂肪の減少をもたらすかどうかを明らかにすることはできなかったが、高校生における運動習慣は、UAを低下させる可能性が示唆され、高尿酸血症予防に有用と考えられた。

文 献

1. 工藤寿一 (1989). 昭和55年度日本体育協会スポーツ科学研究報告.
2. 西岡久寿樹, 広瀬和彦, 大井淑雄, 御巫清允, 中山年正, 北村元仕 (1977). 尿酸, 1, 107-113.
3. 内藤義彦 (1994). 日本公衛誌, 41, 706-718.
4. 伊藤 朗, 三上俊夫, 丹 信介, 後藤浩史, 井川幸雄 (1984). 尿酸, 8, 38-45.
5. 山中 寿, 作山理子, 渡辺純子, 鎌谷直之, 柏崎禎夫 (1994). 高尿酸血症と痛風, 2, 23-28.
6. 西岡久寿樹 (1985). 日本臨床, 43, 247-250.
7. 堀井裕子, 田中朋子, 西野治身, 熊西忠郎, 山上孝司, 鏡森 定信 (1997). 富山衛研年報, 20, 212-216.
8. 富田真佐子, 草野史郎, 小高 稔, 小野崎雅也, 松岡芳子, 稲田次郎, 内藤俊之, 佐久間光史, 山口百子, 吉田康夫, 渡辺 隆 (1993). 日本公衛誌, 40, 213-216.
9. 七川歓次, 竹中善考, 川田陽一 (1988). Medical Practice, 5, 380-381.
10. 藤森 新, 伊藤 洋, 赤岡家雄 (1995). プリン・ピリミジン代謝, 19, 123-133.
11. 吉田英世, 岩田弘敏, 井奈波良一 (1991). プリン・ピリミジン代謝, 15, 45.
12. 秋月 章, 岡村吾郎, 松浦尊磨 (1979). 尿酸, 3, 226.
13. 野崎秀一, 松沢佑次 (1996). 臨床科学, 32, 796-801.
14. 松本美富士 (1994). 高尿酸血症と痛風, 2, 71-79.
15. 山内俊一 (1995). 高尿酸血症と痛風, 3, 23-29.
16. 細谷龍男 (1993). プリン・ピリミジン代謝, 17, 127-129.
17. 中村治雄 (1996). プリン・ピリミジン代謝, 20, 136-138.
18. 西岡久寿樹 (1990). 代謝, 27, 59-63.
19. 予防医学ジャーナル (1995). 307, 8-20.
20. 山中 寿, 木村 孝 (1993). 高尿酸血症と痛風, 1, 65-72.

3. 資 料

マイクロプレートを用いた酵素法による ホモシスチン尿症マスクリーニングの基礎的検討

高橋 雅子 米田 豊

Basic Study for Neonatal Mass Screening
of Homocystinuria by Microfluorometry
using Microplate

Masako TAKAHASHI and Yutaka YONEDA

1977年に開始された先天性代謝異常症の新生児のマスクリーニングの検査法には、当初から細菌生長阻止法（BIA）が採用されている。この方法は、検査の効率性、コスト面では優れた方法であるが、検査条件の設定が難しいこと、半定量法であること、結果判定を肉眼で行うため客観性に欠けること、さらにその結果保存が困難であるなどの問題点があった。

そこで、最近、これらの問題点を補う検査法の開発が行われ、マイクロプレートを用いた酵素法が確立された〔1, 2〕。フェニルケトン尿症とガラクトース血症については既報〔3〕のとおり酵素法によるスクリーニングの検討を行ったが、その後、これらの反応系が改良され〔4, 5〕、より感度の高い測定法となっている。また、メイプルシロップ尿症についても同様の反応系による酵素法が確立されている〔4〕。

一方、ホモシスチン尿症のスクリーニングについては、他の疾患とは反応系が異なる、メチオニンアーリアーゼを用いる方法〔4, 6〕を山口らが開発した。この酵素はホモシスチンについても活性を有するためメチオニンとホモシスチンの総量を測定することが可能である。

今回、この反応系を利用した「エンザプレート HCU-F」（カイロン社製）で、その基礎的検討を行ったので報告する。

方法：1) 対象；平成9年2, 3月に受付をした先天性代謝異常等マスクリーニング検査済濾紙血液の一部

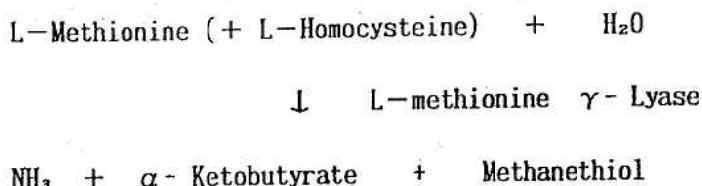
2) 測定原理；図1に示す。まず、検体ろ紙血液中からメチオニンおよびホモシスティンを溶出し、これにメチオニンアーリアーゼを作用させるとアンモニアが遊離される（酵素反応）。このアンモニアを0-フタルアルデヒトと2-メルカプトエタノールで、中性域で反応（蛍光反応）させると、蛍光物質を形成する。この蛍光物質から得られる蛍光は、検体中のメチオニンとホモシスティンの総量を反映することから、検量線により濃度の算出を行うことができる。

3) 試薬の構成及び調製法；表1に示すとおりである。酵素試薬は、溶解後6時間以内に使用した。また、蛍光試薬は、調製後は冷蔵保存し、1か月以内に使用した。

4) 測定法；概略を図2に示した。酵素反応以下の操作は手早く行い、プラスチックフィルムにより厳密にシーリングを行った。

5) 蛍光強度測定；MTP 100F（コロナ電気製）を用い励起波長415nm、蛍光波長530nmで測定した。（設定条件：Ex SENSI 4, Em SENSI 3, RESPONSE 3）

<酵素反応>



<蛍光反応>

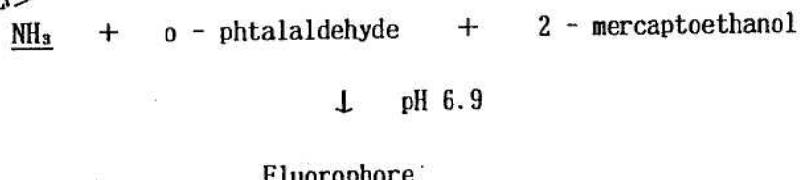


図1. 測定原理

表1. 試薬構成

固 定 液	エタノール、アセトン、精製水
酵 素 剤	メチオニン γ リーゼ 1.5 IU / バイアル
酵素溶解液	りん酸緩衝液、ジチオトレイトイール、EDTA
蛍光試薬-1	o-フタルアルデヒド
蛍光試薬-2	エタノール
蛍光試薬-3	緩衝液
反応停止液	0.5N トリクロロ酢酸
標準ろ紙血液	メチオニン添加ろ紙血液 7 濃度
コントロールろ紙血液	メチオニン添加ろ紙血液 3 濃度

<試薬の調製>

酵素試薬(100 テスト分) : 1 バイアルの酵素剤に 6 ml の酵素溶解液を加えて調製する。

溶解後は 6時間以内に使用する。

蛍光試薬(1000テスト分) : 1 バイアルの蛍光試薬-1 に、全量の蛍光試薬-2 を加え、放置して溶解させる。この全量を蛍光試薬-3 に加え混合し調製する。

調製後は 4°Cで保存し 1か月以内に使用する。

乾燥ろ紙血液 3 mm Disc 1枚 (平底マイクロプレート)

固定液 10 μ l

乾燥 37°C 60分

酵素試薬 50 μ l

酵素反応 25°C 60分

蛍光試薬 100 μ l

蛍光反応 25°C 30分

反応停止液 50 μ l

反応液 160 μ l を測定用の蛍光用プレートに分取

蛍光強度測定 (Ex / Em = 418 nm / 538 nm)

図2. 測定手順

結果：1) 標準曲線；標準滤紙血液の各濃度での蛍光強度の平均値、標準偏差及び変動係数を表2に示した。さらに、これを図3に標準曲線として表した。いずれの濃度でも変動係数が10%以内となり良好な再現性が見られた。

表2. 標準血液滤紙の蛍光強度

表示濃度 (mg/dl)	Mean	SD	CV (%)
0.5	165.4	15.7	9.49
1.5	217.0	17.0	7.83
3.0	290.5	21.7	7.47
5.6	396.6	27.8	7.00
8.6	536.2	38.7	7.22
12.5	709.4	53.9	7.60
18.0	945.7	60.5	6.40

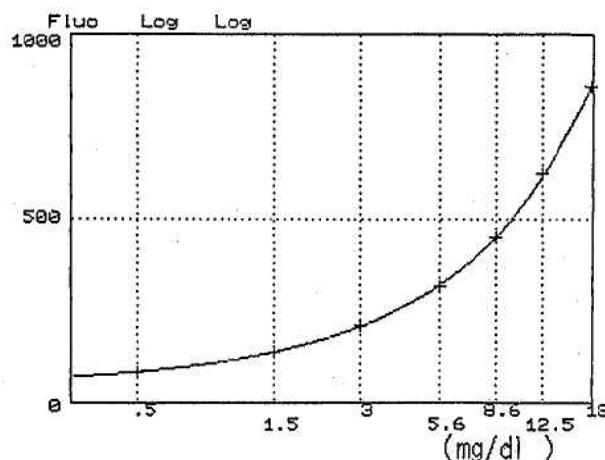


図3. 標準曲線

2) 再現性；キットに添付された3濃度の精度管理用コントロール滤紙血液を用いて、測定内及び測定間の変動を検討した。表3に結果を示した。変動係数は、測定内は6.62~9.70%と良好な結果であった。測定間は、低濃度域で13.89%と少しばらつきが見られたが、個々の測定値は表示濃度範囲内であった。

3) マスクリーニングへの応用；

① 一般新生児のヒストグラム

図4に、一般新生児995人のヒストグラムを示した。分布は、ほぼ正規分布に近い結果となり、平均値±SD (mg/dl) は、0.78±0.31であった。カットオフ値は、従来法のBIAのカットオフ値、再採血率等を考慮して、1.9mg/dlとした。カットオフ値以上の検体は5件(0.5%)であった。

② 一般新生児における再現性

正常新生児26人について、メチオニンおよびホモシスティン総量の測定を同一検体で2回行い、その再現性を、回帰分析プログラム[7]により検討した。その結果、図5に示すように1回目と2回目の測定値には、相関係数0.794と良好な相関が認められた。また、1回目と2回目の測定値の平均値には有意差が認められず、同一の検体における平均値であるといえる。

表3. 再現性

	測定内 (n=10)			測定間 (n=18)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Mean	1.27	3.30	8.16	1.44	3.83	9.41
SD	0.09	0.32	0.54	0.20	0.30	0.40
CV	7.10	9.70	6.62	13.89	7.83	4.25
Min - Max	1.2-1.4	2.9-3.9	7.6-9.2	1.2-1.8	3.0-4.3	8.7-10.1
表示濃度	1.5±0.40	3.9±1.00	9.6±2.40	1.5±0.40	3.9±1.00	9.6±2.40

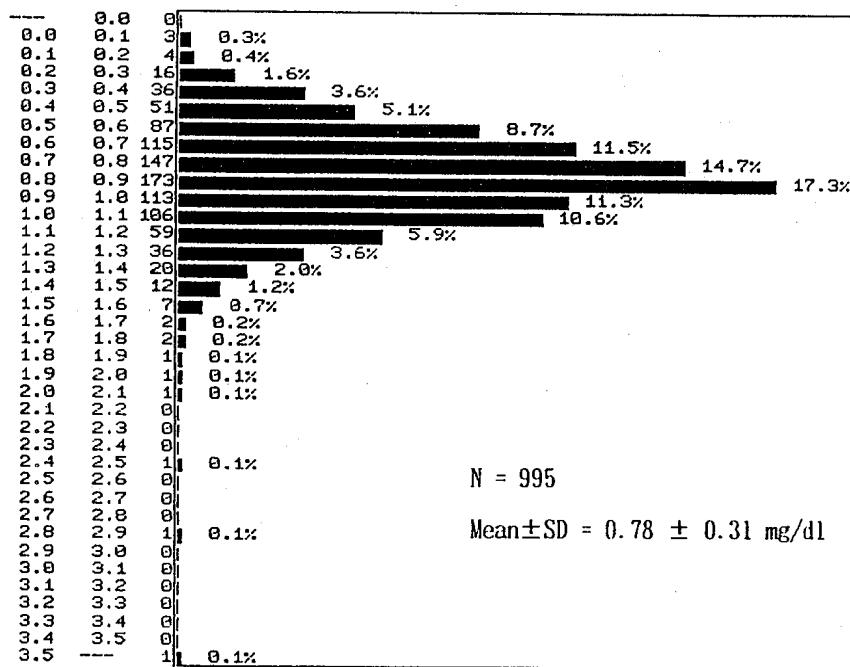


図4. 一般新生児のヒストグラム

2回目 Y

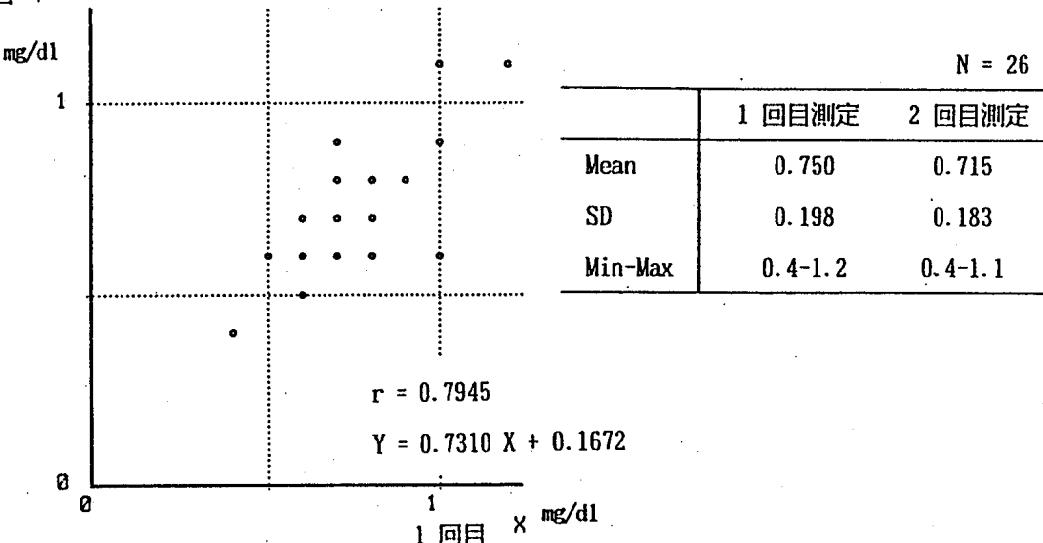


図5. 一般新生児における再現性

考察：ホモシスチン尿症スクリーニングは、従来法のBIAではメチオニンを指標としている。しかし、ホモシスチン尿症のほとんどを占めるシステチオニン合成酵素の障害では、メチオニンの上昇は二次的であるため、新生児期にはメチオニンが上昇せず、BIAによるスクリーニングで見逃された例が報告されている[8, 9]。そのため、酵素障害により一次的に上昇するホモシステインを測定する方法の開発が行われ、メチオニンとホモシステインの総量を測定することが可能な、メチオニン γ -アセチル化法が確立された。これにより、より信頼性の高いスクリーニングが可能となつた。しかし、この方法はアンモニア測定系であるため、手指や空気中からのアンモニアの汚染に対して操作上の注意が必要となる[10]。今回の検討では、酵素反応以下の操作は、十分に水分を含んだ紙を敷いたトレーのなかで行い、反応時間中は、プラスチックフィルムで厳密にシーリングを行ったマイクロプレートを、このトレーに入れふたで密閉した。これにより、空気中からのアンモニアの汚染を防止した。ただし、トレーに敷く紙の水分が十分でない場合にはアンモニアの汚染を完全に防ぐことができず、測定値にばらつきが見られた。手袋は着用しなかったが、特に測定値に

影響はなかった。

また、メチオニンおよびホモシステインの血中レベルは極めて低く、正常値付近では十分な感度が得られない[10]といわれているが、今回の我々の検討では、正常新生児の測定値には再現性が見られ、正常値付近での精度は良かった。

メチオニン γ -アセチル化法によるホモシスチン尿症スクリーニングが確立されたことで、客観的結果に基づく、信頼性の高い新生児マスクスクリーニングが可能となり、すでにルーチン化されている他の代謝異常症3疾患と合わせて、より迅速で、確実なスクリーニングシステムの構築が期待される。

文 献

- Yamaguchi, A., Mizushima, Y., Fukushi, M., Shimizu, Y., Kikuchi, Y. and Takasugi, N. (1992). Screening, 1, 49-62.
- 成瀬 浩, 大橋雄子, 辻 章夫, 前田昌子, 中村 健二, 藤井 正, 山口昭弘, 松本 勝, 柴田 実 (1991). 日本マス・スクリーニング学会誌, 1(2), 47-48.

3. 高橋雅子, 柏樹久雄 (1994). 富山衛研年報, 平成5年度, 177-183.
4. 山口昭弘, 石橋麻里子, 中澤恵実理, 荒井 修, 福士 勝, 佐藤泰昌, 菊地由生子, 大竹治美, 藤本昭栄, 大浦敏明, 長谷 豊 (1995). 札幌市衛研年報, 22, 72-80.
5. 藤本昭栄, 大谷隆三, 大浦敏明, 山口昭弘, 長谷 豊 (1995). 日本マス・スクリーニング学会誌, 5(2), 83.
6. 山口昭弘, 福士 勝, 清水良夫, 菊地由生子, 津田脩臣, 江崎信芳, 左右田健次 (1993). 札幌市衛研年報, 20, 67-74.
7. 米田 豊 (1990). 富山県食肉検査所年報, 平成元年度, 45-51.
8. 長谷 豊 (1995). 臨床化学診断学, ソフトサイエンス社 松本 勇, 坂元正一編. p230-234.
9. 黒田泰弘, 武田英二, 伊藤道徳 (1989). 厚生省心身障害研究「マススクリーニングに関する研究」昭和63年度研究報告書, 111-113.
10. 菊地由生子, 山口昭弘, 福士 勝, 新井純理, 市原 侃, 木村浩男, 望月孝一, 山口修一, 武村佐智子, 石黒 満, 田崎隆二, 梅橋豊蔵, 大橋雄子, 成瀬 浩 (1996). 厚生省心身障害研究 平成7年度報告書, 215-217.

入院患者に多発したS R S V感染

長谷川澄代 森田修行 北村敬
江本誠¹ 沼田こずえ¹

SRSV Infection Prevailing among Inpatients of A Hospital

Sumiyo HASEGAWA, Osayuki MORITA, Takashi KITAMURA,
Makoto EMOTO¹ and Kozue NUMATA¹

近年、急性胃腸炎の患者糞便から多くの小型球形ウイルス (small round virus: SRV) が電子顕微鏡下で観察する方法により検出されるようになった。これらSRVは食品 [1, 2] あるいは水 [3, 4] を介した食中毒の原因ウイルスの一つとして注目されている。

今回我々は、富山県内の病院に入院中の患者で発生した急性胃腸炎の集団発生事例からSRVを検出したので、その発生状況およびウイルス学的検索結果について報告する。

事例の概要：氷見市内のA整形外科病院に入院中の患者34名中11名が1996年11月27日午後10時から11月28日午前6時30分にかけて下痢、嘔吐、腹痛、吐き気等の急性胃腸炎の症状を呈した。入院患者は高齢者が多く身体機能回復のため、短期、長期の入院と様々であった。入院患者は、病棟の階を越え、病室も特定せずに発生した。院長は保健所への届け出とともに、11月28日、3名の患者から速やかに下痢便を採取していた。翌日（11月29日）院内の調理従事者からも採便された。

検索材料：患者糞便は11月28日（第1病日）に3件、調理従事者からの糞便は11月29日に2件、血液は12月2日（第5病日）に10件、それから2週間後を回復期として6件採取された。

電子顕微鏡観察：糞便材料は、ウイルス下痢症検査法 [5] に準じて粗精製して電顕試料とし、

2%リンタングステン酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡（日立600 A）でウイルス検索を行った。

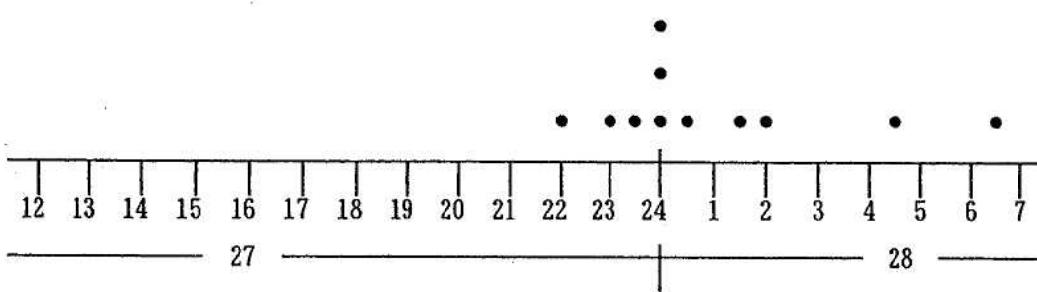
免疫電子顕微鏡法 (immune electron microscopy, IEM) :被検血清はP B Sで20倍に希釀し56℃30分間非動化した。この血清と電顕試料を等量混合し、室温で1時間反応させた後、4℃で1晩放置した。この反応液にP B Sを加えて17,000r.p.m. 90分間遠心し、抗原と抗体の結合体を沈査にして少量の蒸留水に懸濁後、2%リンタングステン酸でネガティブ染色を施し、検鏡した。IEMの判定は、Kapikianら [6] の方法に準じてウイルス粒子に付着している抗体量を0～+4の5段階に設定し、急性期と回復期の血清で1段階以上の抗体付着量の上昇のあったものをIEM陽性とした。

結果と考察：

1) 患者発生状況：11月27日22時から11月28日6時30分までの8.5時間に患者は発生していた (Fig. 1)。11月27日22時～11月28日2時にかけての4時間の間に9名(82%)が発症していた。入院患者用の給食は院内で調理されていたが、11月26日、27日のメニューには生で食するような食品の提供はなく原因食は特定できなかった。

2) 臨床症状：患者11名の臨床症状は、下痢(64%)、吐き気(55%)、嘔吐(46%)、腹痛(36%)などの胃腸炎症状の他に、倦怠感(64%)脱

1. 氷見保健所



Nov. 1996

Fig. 1. Time of Onset of Symptoms. ●: Patient

Table 1. Characteristics of illness in patients

Symptoms	No. of patients n=11	frequency (%)
Diarrhea	7	63.6
Malaise	7	63.6
Nausea	6	54.5
Vomiting	5	45.5
Abdominal pain	4	36.4
Fever	4	36.4
Sweating	4	36.4
Chill	4	36.4
Eruption	4	36.4
Headache	3	27.3
Shiver	2	18.2

力感 (55%), 発熱 (36%), 発汗 (36%), 悪寒 (36%), おくび (36%), 頭痛 (27%), 戰慄 (18%)などの症状がみられた (Table 1)。

3) 電子顕微鏡によるウイルス粒子の検出および I EM 法による血清反応：検査を行った患者 3 名と無症状の調理従事者 2 名の糞便から S R S V が検出された (Table 2)。この病院では調理従事

者も給食を摂食しており、食品を介してウイルスに感染していたことが考えられ、調理従事者が、感染源と特定できなかった。検出されたウイルスは直径が 30nm で辺縁に突起状構造物がある形態をしており Caul ら [7] の形態学的特徴による分類では、表面に構造物のある Norwalk 因子、Hawaii 因子などを含む S R S V に属すると考え

Table 2. Detection of SRV in Feces by Electron Microscopy

Name	Date of onset	Date of collected	Detection of SRV
S. Y ^A	11.28	11.28	+
K. T ^A	11.28	11.28	+
R. S ^A	11.28	11.28	+
T. S ^B		11.29	+
J. N ^B		11.29	+

A : Patient

B : Cook

Table 3. Antibody Development in Paired Sera by IEM

Patient			Date of onset	Rating of serum antibody response	
Sex	Age (y)	Name		Acute	Convalescent
F	54	R. S.*	11.28	0~1+	2~3+
F	73	K. T.*	11.28	0~1+	2~3+
F	73	K. U.	11.27	0~1+	4+
F	71	E. T.	11.28	0~1+	3+
F	55	Y. W.	11.28	0~1+	3~4+
F	84	M. Y.	11.27	0~1+	4+
M	59	T. K.	11.28	0~1+	N T
F	83	T. N.	11.27	2+	N T
M	31	M. M.	11.28	0~1+	N T
M	81	S. Y.*	11.28	0~1+	N T

SRVs from patient S.Y. were used as antigen.

*:SRV positive patient.

0~4+:rating of serum antibody response to SRV particles.

N T:not tested.

F:female. M:male. y:year.

られる。患者(S.Y.)の糞便から粗精製した抗原を用いてIEMで患者の抗体価を測定したところ、急性期と回復期の対で血液がとれた6名で有意な抗体上昇が認められた(Table 3)。このことから今回の急性胃腸炎はSRSVによるものと断定された。

今回の集団発生例では、患者、調理従事者どちらも同一の給食を摂食しており、どちらからもウイルスが検出され、感染源は特定できなかったが、病院内での給食を介したものであろうと推測された。

文 献

1. Murphy, A. M., Grohmann, G. S., Christopher, P. J. Lopez, W. A., Davey, G. R. and Millsom, R. H. (1979). Med. J. Aust. 2, 329-333.
2. Gill, O. N. Cubitt, W. D. Mcswiggan, D. A., Watney, B. M. and Bartlett, C. L. R. (1983). Brit. Med. J. 287, 1532-1534.
3. Kaplan, J. E., Goodman, R. A., Schonberger, L. B., Lippy, E. C. and Gary, G. W. (1982) J. Inf. Dis. 146, 190-197.
4. Brondum, J., Spitalny, K. C., Vogt, R. L. Godlewski, K., Madore, H. P. and Dolin, R. (1985) J. Infect. Dis. 152, 834-837.
5. 厚生省：レファレンスシステム研究班（1985）ウイルス性下痢症検査法。
6. Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R. and Chanock, R. M. (1972). J. Virol., 10, 1075-1081.
7. Caul, E. O. and Appleton, H. (1982). J. Med. Virol., 9, 257-265.

小型球形ウイルス（SRSV）による 急性胃腸炎の集団発生について

長谷川澄代 森田修行 北村敬
南部厚子¹ 有沢義夫¹

An Outbreak of Acute Gastroenteritis with
Small Round Structured Virus
in A Factory

Sumiyo HASEGAWA, Osayuki MORITA, Takashi KITAMURA,
Atsuko NAMBU¹ and Yoshio ARISAWA¹

1997年2月18日～19日にかけて松下電子工業株
魚津工場（松下電子従業員在籍者数1307名、企業
内食堂：与太呂食品株従業員在籍者数25名）内で
155名（松下電子の従業員151名、企業内食堂：与
太呂食品株従業員4名）が急性胃腸炎症状を訴え
た。主な症状は下痢、吐き気、嘔吐、発熱、腹痛、
倦怠感、頭痛であった。細菌性食中毒、ウイルス
感染性胃腸炎の両面から調査が行われたが、病原
性細菌は検出されず、患者糞便中に電顕的検索に
より small round structured virus: SRSV
(直径30～35nm、辺縁に突起状構造物あり) が認
められた(5/11)。

患者血清のS R S Vに対する抗体を免疫電顕法
(immune electron microscopy, IEM) で測定
したところ、急性期と回復期にかけて有意に抗体
上昇を示した。

急性胃腸炎患者の起因ウイルスとしてNorwalk
virus [1] の報告以来、糞便中のウイルス粒子
を電子顕微鏡観察によって、患者糞便から多数の
S R Vが検出されるようになった。本邦各地でも
S R Vが検出報告されて、電顕観察による形態学
的分類が試みられている [2]。

1997年2月19日午後5時30分頃、魚津市の松下

電子工業株魚津工場から魚津保健所へ急性胃腸炎
患者が多発しているとの報告があった。これら急
性胃腸炎についてのウイルス学的検索および調査
について報告する。

材 料 と 方 法

1) 発生状況

患者の発生状況並びに、臨床症状等の調査は魚
津保健所によって調査された。

2) 細菌学的検査

細菌性食中毒検査のため糞便31件(2月20日採
取)、ふき取り20検体、検食は12日、13日、14日、
17日の4日間分(2月20日採取)、飲料水9件
(2月20日、21日、24日3月4日採取)について
細菌学的検査が行われた。

3) ウィルス学的検査

糞便は2月20日から22日にかけて患者から11件
(松下電子従業員8名、与太呂食品3名)、無症状
の与太呂食品従業員21名から21件採取された。さ
らに急性胃腸炎患者で風邪様症状の患者から咽頭
ぬぐい液5件、採取された。

S R Vの検索：糞便をウイルス性下痢症検査法

1. 魚津保健所

[3]に準じて粗精製して電顕試料とし、2%リンタンクスチレン酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡（日立H600A）でウイルス検索を行った。

免疫電子顕微鏡法（IEM）：被検血清はPBSで20倍に希釈し、56℃30分間非動化した。この血清と電顕試料を等量混合し、室温で1時間反応させた後、4℃1晩放置した。この反応液にPBSを加えて17,000r.p.m.90分間遠心し、抗原と抗体の結合体を沈査にして少量の蒸留水に懸濁後、2%リンタンクスチレン酸でネガティブ染色を施し、検鏡した。IEMの判定は、Kapikianら[4]の方法に準じ、ウイルス粒子に付着している抗体量を0～+4の5段階に設定し、急性期と回復期の対の血清で1段階以上の抗体付着量の上昇があったものをIEM陽性とした。

①患者発生状況—患者は2月11日に1名発生していたが、2月18日の夕方から19日の午前にかけて127名(81.9%)が、集中的に発生していた(Fig. 1)。患者の発生状況から単一暴露による食中毒が疑われた。感染経路についてA. 食品による感染、B. 調理員から食品を介しての感染、C. 直接接触、飛沫などによる感染が考えられて調査されたが喫食状況では松下電子の従業員、与太呂食品の従業員どちらも殆どが与太呂食品の食事を摂っており、有症者の発生状況と2月12日から2月18日までの喫食状況をみると、有症者は喫食の有無に関係なく発生しており、感染源としての食品を特定することは出来なかった。調理員もほぼ同時期に発症していることから、調理員を介して感染が広がったとは考えられなかった。松下電子の患者発生は、工場の部署間に特別な偏りは見られなかった。

②臨床症状—患者155名の主な臨床症状(Table

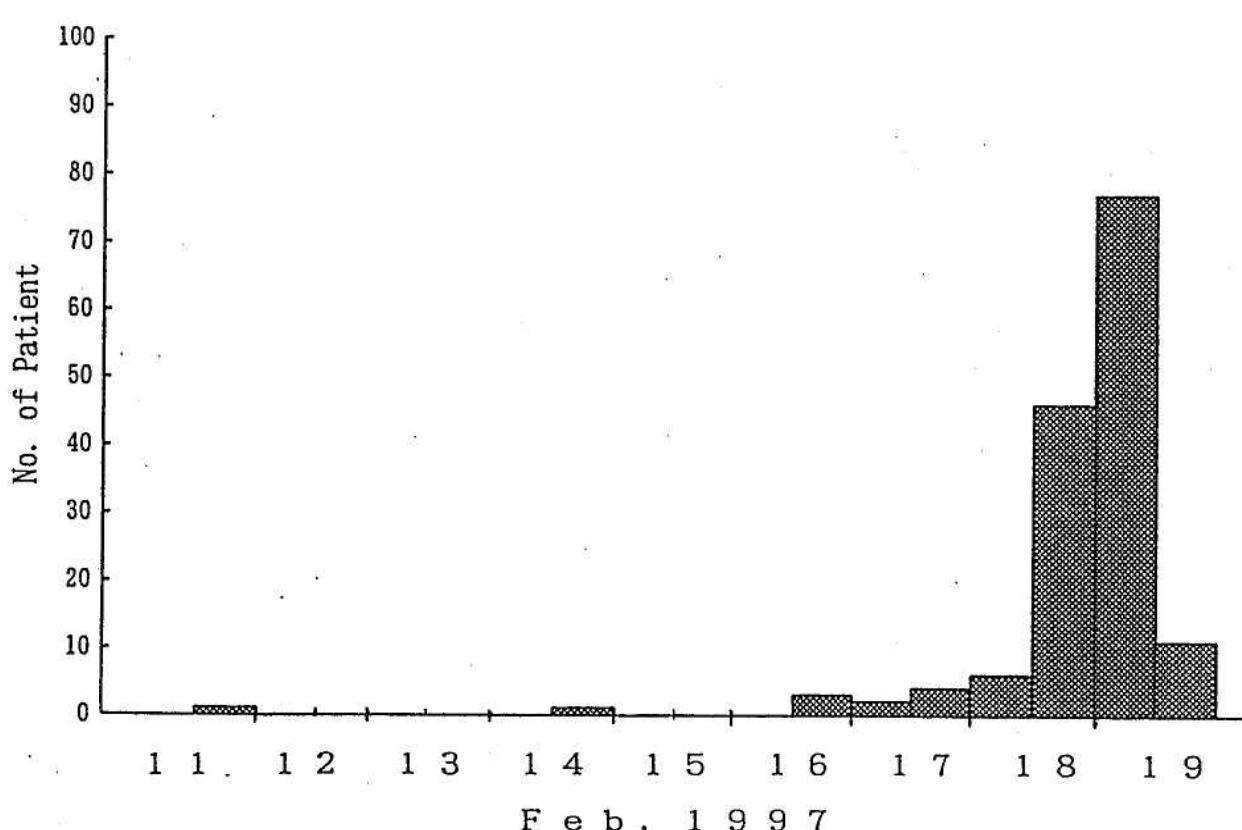


Fig. 1. Development of the Outbreak of Acute Gastroenteritis in A Factory by Interval of 12 Hours.

1)は、下痢(78.7%), 吐き気(58.1%), 嘔吐(49.0%), 腹痛(42.6%), 嘔氣(3.2%)等の胃腸炎症状の他に発熱(45.8%), 悪寒(38.1%), 倦怠感(28.4%), 頭痛(23.2%), の症状がみられた。これら臨床症状(下痢, 嘔吐, 発熱)の程度をTable 2.に示した。下痢4回以上の激しいものは41.8%みられ、嘔吐4回以上の程度の強いものは28.9%であった。発熱は37.0~37.9℃が71名中44名(62.0%)と半数以上であった。しかし、発熱38.0~39.0℃が27名(38.0%)と高熱のものも少なくなかった。

③ウイルス粒子の検出およびIEM法による血清反応-細菌学的検査では、病原性細菌は検出されなかつたが、糞便材料の電顕観察の結果11名中5名からSRVを検出した(Table 3.)。咽頭ぬぐい液からインフルエンザの検出を試みられたがすべて陰性であった。これら患者の糞便採取は第3~5病日であったので、殆どの患者糞便の性状は普通便であり、精製濃縮して電顕観察でウイルス粒子の検索を行つたが、糞便中のSRVは少な

かった。これらSRVの直径は30~35nmで、表面に突起状の構造物がみられた。このSRVはCaulら[4]の形態学的特徴による分類では、表面に構造物のあるNorwalk因子, Hawaii因子などを含むSRSV(small round structured virus)に属すると考えられる。今回の場合、患者糞便中のウイルス粒子数は非常に少なかった。しかし、患者H.I.の糞便の性状は軟便であり、ウイルス粒子の形態がきれいで他の検体より比較的数が多いので、この糞便濃縮材料を抗原として、患者のペア血清のIEM法を行つた。ペアで血清が得られた13名全例に抗体上昇が確認された(Table 4.)。

安東ら[5]は冬期に「集団風邪」として処理されている事例の中にはSRVによるものが含まれると報告している。SRVによる急性胃腸炎は食物や飲料水などによる経口感染で起こると考えられているが、伝播様式はいわゆる感冒の起因ウイルスなどと似た様な形態をとる事も考えられる。今回の集団発生例では、患者は松下電子従業員と

Table 1. Characteristics of illness in patients

Symptoms	No. of patients n=155	frequency (%)
Diarrhea	122	78.7
Nausea	90	58.1
Vomiting	76	49.0
Fever	71	45.8
Abdominal pain	66	42.6
Chill	59	38.1
Malaise	45	29.0
Headache	36	23.2
Eruption	5	3.2
Shiver	1	0.6

Table 2. Frequency of Symptoms in Patients (Diarrhea and Vomiting) and Distribution of Pyrexia of Patients

Symptoms	No. of positive/ No. of examined	Frequency (%)
Diarrhea (n=122)		
one time	38/122	31.1
2~3 times	33/122	27.0
4 times<	51/122	41.8
Vomiting (n=76)		
one time	31/76	40.8
2~3 times	23/76	30.3
4 times<	22/76	28.9
Pyrexia (°C) (n=71)		
37.0~37.4	25/71	35.2
37.5~37.9	19/71	26.8
38.0~38.4	18/71	25.4
38.5~38.9	7/71	9.9
39.0	2/71	2.8

Table 3. Detection of SRV Particles in Feces by Electron Microscopy

Patient	Date of onset	Date of collected	days after onset	Detection of SRV
Name	Age (years)			
T. I.	29	2. 18	2. 21	-
T. M.	44	2. 18	2. 21	+
I. H.	48	2. 18	2. 21	+
N. K.	41	2. 18	2. 21	+
I. T.	25	2. 19	2. 21	+
M. T.	25	2. 19	2. 21	-
A. K.	25	2. 19	2. 21	-
D. S.	25	2. 19	2. 21	-
N. H.	43	2. 19	2. 22	-
I. A.	30	2. 19	2. 22	+
S. H.	34	2. 19	2. 22	-

Table 4. Antibody Development in Paired Sera by IEM

Patient			Date of onset	Rating of serum antibody response	
Sex	Age (y)	Name		Acute	Convalescent
F	41	N. K.*	2.18	0~1+	3~4+
F	44	T. M.*	2.18	1+	3~4+
F	48	I. H.*	2.18	1+	3~4+
M	30	M. Y.	2.19	0~1+	3~4+
M	42	N. S.	2.19	1~2+	3~4+
M	29	N. T.	2.18	0~1+	3~4+
M	36	Y. T.	2.19	0~1+	3~4+
M	32	H. I.	2.18	1~2+	4+
M	47	O. S.	2.18	0~1+	4+
M	35	T. H.	2.19	0~1+	4+
M	34	S. H.	2.18	0~1+	3~4+
M	29	I. T.	2.18	0~1+	3~4+
M	28	K. K.	2.18	0~1+	3~4+

SRVs from patient I.H. were used as antigen.

*:SRV positive patient.

0~4+:rating of serum antibody response to SRV particles.

F:female. M:male. y:year.

与太呂食品の、調理従事者にもほぼ同時期に出ており、どちらも与太呂食品の食事を摂っており、喫食状況からは感染源の食品は特定できず、感染経路を明らかにすることは出来なかった。

M. (1972). J. Virol., 10, 1075-1081.

2. 石田名香雄, 今野多助, 浦沢正三, 中尾 亨, 松野重夫, 稲葉右二, 鈴木 栄, 大石 功, 栗村 敬 (1981). ウイルス, 31(2), 167-170.

3. 厚生省: レファレンスシステム研究班 (1985) ウィルス性下痢症検査法.

4. Caul, E. O. and Appleton, H. (1982). J. Med. Virol., 9, 257-265.

5. 安東民衛, 蔡内 清 (1989). 病原微生物検出情報, 月報, 10, 48-49.

文 献

1. Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica A. R. and Cahnock, R.

富山県における1996年のウイルス およびリケッチャの検査状況

松浦久美子 長谷川澄代 中山喬
森田修行 北村敬 石倉康宏

Virological and Rickettsiological Examinations
of Infectious Diseases in Toyama Prefecture,
January to December 1996

Kumiko MATSUURA, Sumiyo HASEGAWA, Takashi
NAKAYAMA, Mitsuhiro ISHIKURA, Osayuki
MORITA and Takashi KITAMURA

1996年1月から12月までの1年間に、富山県結核・感染症サーベイランス事業、伝染病流行予測事業、行政依頼検査および一般依頼検査などの検体から検出されたウイルスおよびリケッチャを、疾病別、月別に表1に示す。

1月から3月にかけてのインフルエンザ患者からA(H1)型インフルエンザウイルスが検出された。A(H1)型ウイルスによるインフルエンザは4年ぶりであり、このウイルスによる患者が多く発し、「集団かぜ」による学年または学級閉鎖などの措置が18施設でとられ、累積患者数は1,784人であった。一方、A(H3)型インフルエンザウイルスは3月に1例、次いで6月に1施設での「集団かぜ」の患者から、12月に入り2施設の「集団かぜ」や多数の患者から検出され、次年(1997年)の冬期流行ウイルスとなった。

1月から5月には、嘔吐や下痢などをともなった小児の急性胃腸炎患者(0~2才、散発例)からロタウイルスが多く検出された。1月、10月および11月に集団発生した食中毒様の急性胃腸炎患者について検査を行なった。1月の事例では、新年会での飲食後に23名中13名(23~45才)が急性胃腸炎を発症し、4名の患者について調べたところ、3名の便より小型球形ウイルス(SRSV)が

検出され、急性期から回復期にかけて抗体価の有意上昇も確認された。SRSVを保有していた生ガキの摂食が原因と判断された。11月の事例では、病院の入院患者34名中11名(28~84才)が急性胃腸炎になった。患者と調理師の5名について調べたところ、全員の便からSRSVが検出され、抗体価の有意上昇も認められた。この事例では、感染源を特定できなかったが、同一の入院食を摂食した同病院の調理師(無症状)からもSRSVが検出されたことから、給食を介したものであろうと推測された。10月に発生した保育所園児の事例では、ウイルス学的検査は陰性であった。

9月に発生した発疹症患者からはコクサッキーウイルスA9型、そして11月、12月に発生した患者からはエコーウィルス9型が検出された。かぜ症状患者などからコクサッキーウイルスB2型やB4型が検出された。このB4型ウイルスは、9月に調査した健康な乳幼児(0~6才)の糞便からも多数(60検体中11検体)検出され、このウイルスの不顕性感染が多く認められた。

春に平村で1名、秋に黒部市と入善町で3名の恙虫病患者が発生した。患者の血液からPCR法(遺伝子增幅法)で恙虫病リケッチャの検出を試みたところ、春に発生した患者からはKarp型、

表1. 1996年疾病別、月別ウイルスおよびリケッチア検出状況

疾 病	検出されたウイルス、リケッチア	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
インフルエンザ	インフルエンザA(H1) インフルエンザA(H3)	(36) 16	(31) 19	(11) 2			(4) 1						(35) 13	(117) 15
急性胃腸炎	ロタ S R S V ³⁾	(16) 6 3	(34) 24	(29) 23	(2) 1	(2) 2					(9) 3	(3) 3		(95) 56 6
発 痢 症	コクサッキーA9 エコー-8									(10) 2	(2) 1	(4) 11	(14) 12	(30) 2 12
そ の 他	コクサッキーB2 コクサッキーB4	(7)					(3) 1	(2) 1	(2) 1	(4) 1	(2) 1			(20) 1 1
無 症 状	S R S V コクサッキーB4 エコー-22									(60) 11 3		(2) 2		(62) 2 11 3
恙 虫 痘	恙虫病リケッチア				(1) 1	(3) 1					(2) 1	(3) 2	(1) 1	(10) 4
合 計		(59) 25	(65) 43	(40) 26	(3) 1	(5) 3	(7) 1	(2) 2	(2) 16	(74) 3	(15) 8	(12) 8	(50) 24	(334) 150

1) 被検者数

2) ウィルスが検出された被検者数

3) 小型球形ウィルス

秋の患者からは Kawasaki 型の恙虫病リケッチアが検出された。前者はフトゲツツガムシ、後者はタテツツガムシの刺咬による感染であることが示唆された。

富山県におけるヘリコバクター・ピロリ抗体保有率について

平田清久 刑部陽宅

Seroprevalence of *Helicobacter pylori* Infections
in Toyama Prefecture

Kiyohisa HIRATA and Yotaku GYOBU

Helicobacter pylori（以下 HP と略）は、初期感染により胃炎、持続感染により胃潰瘍、十二指腸潰瘍を引き起こすことが知られている。また、本菌の長期感染は萎縮性胃炎や腸上皮化生病変にかかわることから、胃ガンとの関係も疑われている [1]。

ヒトの、HP の感染状況は、抗体検査で調べられ、これまで抗体保有率は地域、人種、環境、衛生状態、生活習慣、社会経済状況などによって変動し、また、年齢層によつても差が認められることが明らかになっている [2, 3]。

富山県では胃ガン発生率が高く全国 4 位（平成 4 年）となっている。しかし、その原因は必ずしも明らかでない。富山県における胃ガン発生率が高いことに関連して、HP 感染状況を調べておくことは意義のあることと思われる。このことより、今回県内でのHP感染状況を、血清抗体価を測定することにより調査した。

材料と方法 1. 血清：富山県衛生研究所がジフテリア、百日咳の流行予測調査のために、平成元年から平成 6 年の間に県内の病院、保育所あるいは小学校で集めた血清 176 件、栄養調査のために昭和 62 年に富山県射水郡〇町あるいは婦負郡 Y 村で集めた血清 155 件合計 331 件を用いた。これらは -20°C のフリーザーに保存されていた。2. 抗体測定：ピリカプレート G ヘリコバクターキット（B IOMERICA INC, USA, 販売富士レビオ）を使用した。判定は、8 倍希釀陽性対象血清の吸光度から陰性対象血清の吸光度（△NCX）を引いた

値を Cut Off 値とし、Cut Off 値を越えるものを陽性、また、16 倍希釀陽性対象血清の吸光度から△NCX を引いた値を、P 値（Positive の頭文字）とし、P 値以下のものを陰性とした。

結果と考察：10 歳以上の年齢階層について、HP 抗体保有状況を表 1 に示す。年齢別にみると、陽性率は 10~19 歳では 5.9% と低いが、20~29 歳では 43% と急激に高くなり、40~49 歳では 56% と更に高くなった。しかし、その後は 60 歳以上でも 56~59% と横ばいであった。一方、男女別でみると男で 32/71 (45.1%)、女で 44/84 (52.4%) と男女で統計的に有意な差（P = 0.05）を認めなかつた。また、20 歳未満では共に低かった。

表 2 は、表 1 で得られた成績を平野部の射水郡〇町と、山間部の婦負郡 Y 村の住民に分けて示す。抗体保有率は 20~39 歳の場合、〇町で 50%、Y 村で 40~44.8% とあまり差はなかったが、40 歳以上の場合、〇町で 41.6%~55.5% であるのに対して、

表 1. 年代別抗体保有状況

年齢	男		女		合計	
	検査数	陽性数(%)	検査数	陽性数(%)	検査数	陽性数(%)
10~19	9	0(0.0)	8	1(12.5)	17	1(5.9)
20~29	8	2(25.0)	6	4(66.7)	14	6(42.9)
30~39	11	6(54.5)	15	6(40.0)	26	12(46.2)
40~49	8	5(62.5)	17	9(52.9)	25	14(56.0)
50~59	12	7(58.3)	12	8(66.7)	24	15(62.5)
60~69	11	5(45.5)	14	9(64.3)	25	14(56.0)
70~	12	7(58.3)	12	7(58.3)	24	14(58.3)
合計	71	32(45.1)	84	44(52.4)	155	76(49.0)

表2. 地区別抗体保有状況

年齢	O町		Y村	
	検査数	陽性数(%)	検査数	陽性数(%)
10~19	4	1(25.0)	13	0(0.0)
20~29	4	2(50.0)	10	4(40.0)
30~39	10	5(50.0)	16	7(43.8)
40~49	12	5(41.6)	13	9(69.2)
50~59	9	4(44.4)	15	11(73.3)
60~69	12	6(50.0)	13	8(61.5)
70~	9	5(55.5)	15	9(60.0)
合計	60	28(46.7)	95	48(50.5)

表3. 9歳以下の低年齢層における抗体保有状況

年齢	男		女		合計	
	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数(%)
0	8	0	3	0	11	0(0)
1~2	11	0	12	0	23	0(0)
3~4	15	0	10	0	25	0(0)
5~6	34	2	28	1	62	3(4.8)
7~9	27	1	28	0	55	1(1.8)
合計	95	3	81	1	176	4(2.3)

Y村の場合は60~73.3%と町部より山間部でやや高かった。

9歳未満の低年齢層176名についての年齢別抗体保有状況を表3に示す。抗体保有率は、0~4歳で0/59(0%), 5~9歳で1/55~3/62(1.8~4.8%)と、5~9歳でやや高かったが、いずれも表1に示す20歳以上に比して低かった。

伊藤ら[1]は、東京都での調査で、陽性率は10歳未満で2.2%すぎなかつたが、10歳代で35.7%，30歳代で60%，60歳代では80%であったとし、高橋ら[4]は、高知県での調査で、10歳未満で3.4%，10歳代で13.0%，30歳代で35.1%，50歳以上で54.5%であったとしている。また、竹田ら[5]は、山形県での調査で、10歳未満で11.9%，

10歳代で19.6%，20歳代で41.2%，50歳以上で71.2%であったとしている。今回の県内調査の結果をこれらの成績と比較すると、高知県での高橋らの成績に最も近いように思われる。抗体保有率が10歳以下で10%以下、20~30歳代で約40%という状況は、東京都、高知県、山形県と似ている。しかし、10歳代の抗体保有率5.9%は、いずれの県と比較しても低い。この理由は明らかでない。富山県、山形県、高知県における胃ガン発生率は全国上位であり、東京都のそれは下位である。日本における胃ガン発生率と、ピロリ菌感染との関係を疫学的観点より論ずるため、他の多くの県での調査が望まれる。今後は菌を分離し、胃ガン患者から分離される菌はどのような特徴をもっているかについて検討したい。

謝辞：稿を終えるに当たり、多くの血清の提供を戴いた、当研究所環境保健部西野治身博士に深謝いたします。

文 献

1. 伊藤武、新垣正夫、柳川義勢、甲斐明美、平田一郎、高橋信一、増淵尚子、星谷聰、二宮英彦(1996). モダンメディア, 42, 15-24.
2. 片桐雅樹、加藤元嗣、工藤俊彦、小松嘉人、佐藤富士夫、助川真、加賀谷英俊、西川恵子、工藤峰生、穂刈格、大饗由之、武田宏司、浅香正博(1997). 臨床検査, 41, 127-135.
3. Klein, P. D., Gastrointestinal Physiology Working Group, Graham, D. Y., Gaillour, A., Opekun, A. R., Smith, E. O. (1991). Lancet, 337, 1503-1506.
4. 高橋富世、安岡富久、出口祐男(1996). 高知県衛生研究所年報, 42, 35-37.
5. 竹田久子、相川勝悟(1996). 山形県衛生研究所年報, 12, 29-31.

漁港の腸炎ビブリオ実態調査について

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¹ 長沢憲嗣¹

Vibrio parahaemolyticus Surveillance at
Fishing Ports in Toyama Prefecture

Shiho HOSOROGI, Daisuke TANAKA, Kiyohisa
HIRATA, Junko ISOBE, Yotaku Gyobu, Masayuki
SHIROISHI¹, Noritsugu NAGASAWA¹

平成8年の食中毒発生状況によると、患者数では、サルモネラが、事例数では、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*, 以下V.p) が最も多い。V.pは、平成2年頃までは、細菌性食中毒の半数近くを占めていたが、平成4年～5年にかけて減少した。しかし、翌平成6年より再び増加傾向となっている(1)。富山県においても、V.pによる食中毒の発生例は多い。近年の発生状況は、平成6年が6件(総件数21件)、7年が10件(13件)、8年が1件(5件)であった。県では、昭和54年以来、腸炎ビブリオの生態やその汚染実態を知るため、市販魚介類の調査を実施し、平成8年度より「VP(腸炎ビブリオ)マリン実態調査」として、県内の4漁港の海水、海泥中のV.pについて調査を実施した。ここでは、平成8年に得られた結果を報告する。

材料と方法 調査期間：平成8年6月22日～10月7日の間、隔週、計8回調査を行った。

調査地点：県内の生地、魚津、新湊、氷見の4漁港を定点とし、漁港内の同一地点で表層の海水および海底泥を採取した。

菌数の測定：海水はそのまま、海泥は10gを3%NaCl溶液90mlに加えて懸濁したものを原液と

し、測定に供した。測定は、増菌培地に食塩ポリミキシンブイヨン、分離培地にTCBS寒天培地を用い、MPN3本法で実施した。V.pについては、TCBS上の濃緑色コロニーを釣菌し、同定したが、*Vibrio alginolyticus*(以下V.a)については、TCBS培地上にV.aが疑われる黄色いコロニーを認めた場合に陽性とした。

神奈川現象陽性株の検出：TCBS培地上の濃緑色のコロニーができるだけ多く(1検体当たり9～122ヶ)我妻培地(自家製)に接種し、37℃、一晩培養した。溶血が疑われた株については、さらにKAP-RPLA(デンカ生研)を用いて、耐熱性溶血毒(TDH)産生を確認した。

結果および考察：調査期間中のV.p数は、海水で100mlあたり(以下、菌数は100mlまたは100gあたりで表示) <3～7.5×10²、海泥で<3～1.1×10⁶の範囲であった。海水におけるV.p数の推移は、図1に示すように、いずれの定点でも6月下旬には3ヶ以下であるが、7月初旬から数ヶから数十ヶの範囲で認められるようになり、以後、少しずつ増加し、8月中旬～9月下旬には最も多い数十から数万の範囲であった。減少傾向は10月初旬に認められた。定点による明らかな差は認めら

1. 県薬務食品課

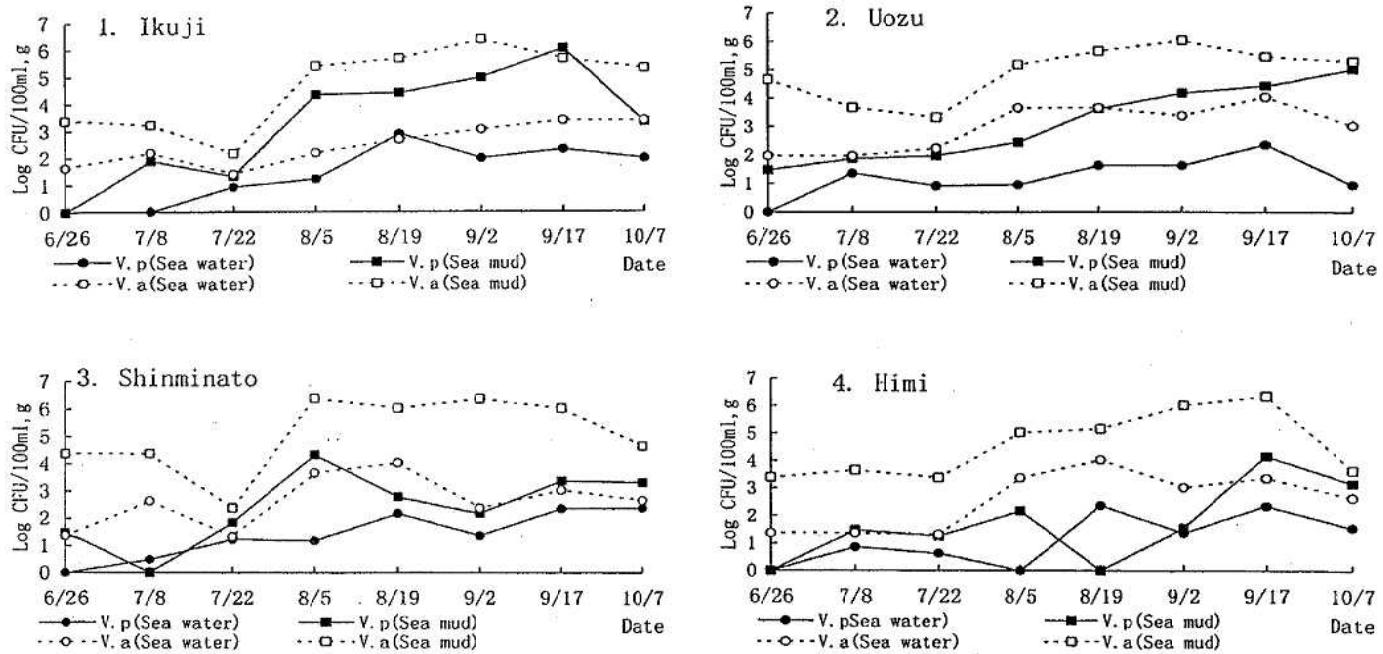


Fig. 1 Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from Sea water and Sea mud in Fish Ports.

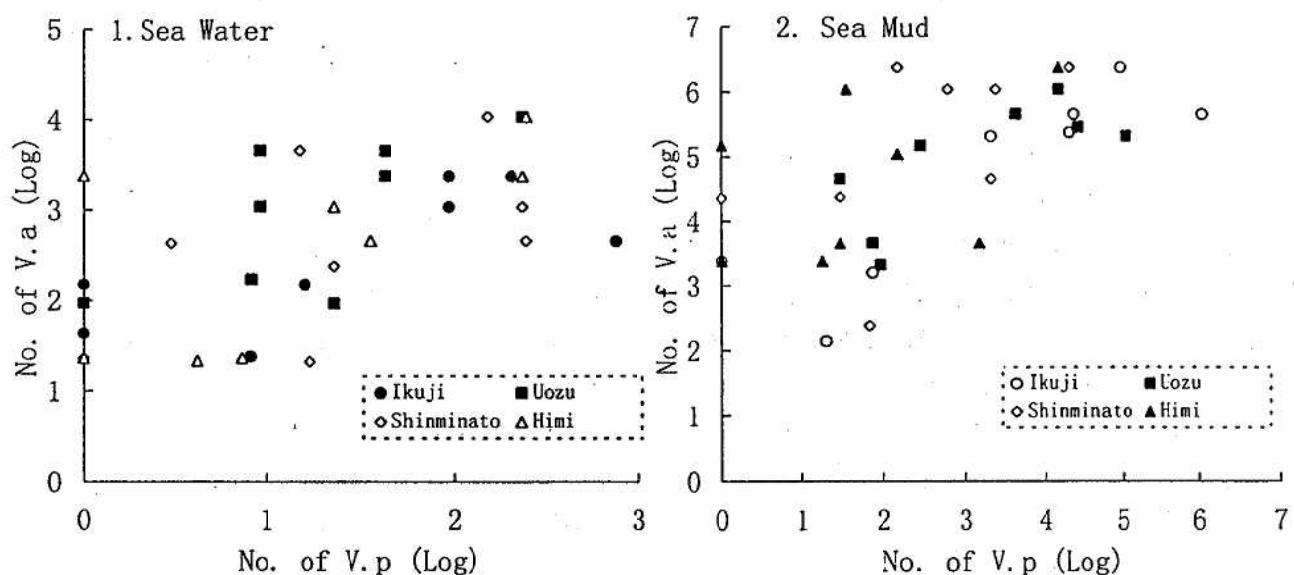


Fig. 2 Relationship between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*

れず、いずれの定点においても海水中より海泥中のV.p数が2～3オーダー高かった。昭和43年から47年にかけて似た調査が氷見、新湊、魚津漁港で行われている(2)。このときの値と比較するとV.p数は必ずしも少なくなかった。

V.a数は、調査期間中、海水で $1.4 \times 10^2 \sim 1.1$

$\times 10^4$ 、海泥で $1.4 \times 10^2 \sim 2.4 \times 10^6$ の範囲であった。各定点におけるV.a数の推移は、図1にV.p数の推移と併せて示した。V.pと同様に海水中より海泥中のV.a数が2～3オーダー高く、菌数の変動もほぼV.pと同じ傾向を示した。

図2は各定点における、海水中のV.pとV.a

Table 1 Detection of TDH-positive *Vibrio parahaemolyticus*

	6/26	7/8	7/22	8/5	8/19	9/2	9/17	10/7	Total
1. Ikuji Sea water	0/4		0/74	0/66	0/42	0/36	0/71	0/66	0/359*
2. Ikuji Sea mud		0/28	0/22	0/203	0/90	0/122	0/95	0/34	0/594
3. Uozu Sea water		0/83	0/67	0/66	0/27	0/73	0/39	0/10	0/365
4. Uozu Sea mud	0/66	0/14	0/77	0/108	0/122	0/69	0/48	0/77	0/581
5. Shinminato Sea water		0/30	0/123	0/33	0/87	0/15	0/31	0/33	0/352
6. Shinminato Sea mud	0/3		0/52	0/130	0/43	0/29	0/52	0/40	0/349
7. Himi Sea water		0/41	0/14	} 0/39	0/46	0/19	0/39	0/34	} 0/382
8. Himi Sea mud	0/9	0/42				0/10	0/41	0/48	
Total		0/73	0/205	0/471	0/645	0/457	0/373	0/416	0/2,982

* No. of TDH-positive colony / No. of colony examined.

数の相関をみたものである。相関係数は海水の場合, $r=0.60$ ($p<0.05, p<0.01, n=32$), 海泥の場合, $r=0.61$ ($p<0.05, p<0.01, n=32$) と有意であった。

V.p の季節変動をはじめとする生態調査については多くの報告 (2, 3, 4) があり, 海水中の *V.p* 数は初夏より増加し, 8月頃に最大となり, 冬にはほとんど0になることが知られている。富山湾の各漁港においても同様な結果であった。

TDH は, *V.p* の腸管起病性に重要な関わりをもち, 患者から分離される株はこの毒素を產生するが, 食品や環境から分離される株のほとんどが陰性であることは広く知られている。分離培地上の腸炎ビブリオが疑われる濃緑色コロニー2,982株について TDH 產生能を調べたところ, すべてが陰性であった (表1)。

平成9年以後も, 引き続き, 県内の漁港における *V.p* の推移, 分離株の TDH 產生能等のデータ

を蓄積し, 食中毒発生との関連を究明する予定である。

謝辞: 本調査にご協力いただいた富山県薬務食品課および各健所の関係各位に深謝いたします。

文 献

1. 国立予防衛生研究所編 (1996). 病原微生物検出情報, 17, 1-2
2. 刑部陽宅, 山崎茂一, 児玉博英 (1973). 日公衛生誌, 20, 673-676
3. 砂原千寿子, 吉田真由美, 今田和子, 三木一男 (1994). 香川県衛生研究所報, 22, 79-85
4. 崎田勉, 杉枝正明, 堀 渉, 服部 担, 岩田正明, 大田匡史, 多田武弘, 遠藤寿, 野田哲郎 (1995). 静岡県衛生環境センター報告, 38, 51-55

富山県における大腸菌O157感染症の疫学的解析

平田清久 刑部陽宅 磯部順子
田中大祐 細呂木志保

An Epidemiological Analysis of *Escherichia coli* O157
Infection in Toyama Prefecture

Kiyohisa HIRATA, Yotaku GYOBU, Junko ISOBE,
Daisuke TANAKA and Shiho HOSOROGI

大腸菌の一つである腸管出血性大腸菌は、出血性下痢の他に、溶血性尿毒症症候群（HUS）、脳症など重症合併症を起こすことがある。特に血清型O157:H7については、1982年米国の大オレゴン州、ミシガン州でのビーフハンバーガーによる集団発生をはじめとし、1990年埼玉県の幼稚園での、井戸水による集団発生により注目されてきた。その後、1996年には、大阪府堺市をはじめ国内で1万名近くの患者が発生し、世界的にも大きな関心が寄せられた。

富山県では、腸管出血性大腸菌O157は、1991年に2名〔1〕、1993年に3名、1994年に1名から分離されている。しかし、1996年は21名という多数の感染者がみられた。

食中毒や感染症の原因菌の由来を追求する手段として、菌の血清型、毒素産生性の有無、プラスミドプロファイル、パルスフィールド電気泳動法（PFGE）を用いたDNA分析による型分類が使われている。今回、富山県において1996年に多発した病原性大腸菌O157の感染の背景を知る目的で、分離菌についてこれらの分析を行った。

材料と方法：1) 菌株：1996年に富山県内の病院で分離したペロ毒素（VT）産生性大腸菌O157、21株とVT非産生性大腸菌O157、2株、計23株を使用した。2) 毒素遺伝子及び毒素産生性：毒素遺伝子の検出はPCR法によった。プライマーは、VT1、VT2遺伝子をそれぞれ検出する市販

プライマー（タカラ社製）を用い、手技は同社の説明書によった。また、毒素産生性はデンカ生研株式の大腸菌ペロトキシン検出用キットを用いたRPLA法によった。3) 染色体DNAの制限酵素切断パターン：パルスフィールド電気泳動法（PFGE）を用いて調べた。制限酵素はSfi Iを用いて、前報〔2〕の手技によって実施したが、泳動条件は電圧：150V、パルスタイム：5から60秒、温度：14°C、泳動時間：24時間とした。4) プラスミドプロファイル：アルカリ-SDS法〔3〕によった。

結果と考察：供試菌計23株についてPFGEを実施したところ、Fig. 1に示す11パターンが認められた。各パターンに任意に記号を付した。この内、Ia～Igまでは、100～300Kbpで同じで、300Kbp以上及び100Kbp以下で異なっていた。一方、プラスミドプロファイルを調べたところ、140, 56, 20, 8.9, 7.8, 6.8, 5.4, 4.1, 3.6, 2.8, 2.1, 1.7Mdのプラスミドサイズが認められ、供試23株は表1に示す10型のいずれかに分類された。表2は、1996年に富山県内で発生した大腸菌O157感染症について発生した月、場所及び分離菌の血清型、毒素、PFGE型、プラスミド型を示す。発生は他の細菌性食中毒と同様、7, 8, 9月に多く、4市4町で認められた。分離されたO157、23株の内21株は、VT1、VT2産生のO157:H7で、2株は毒素非産生性のO157:H45であつ

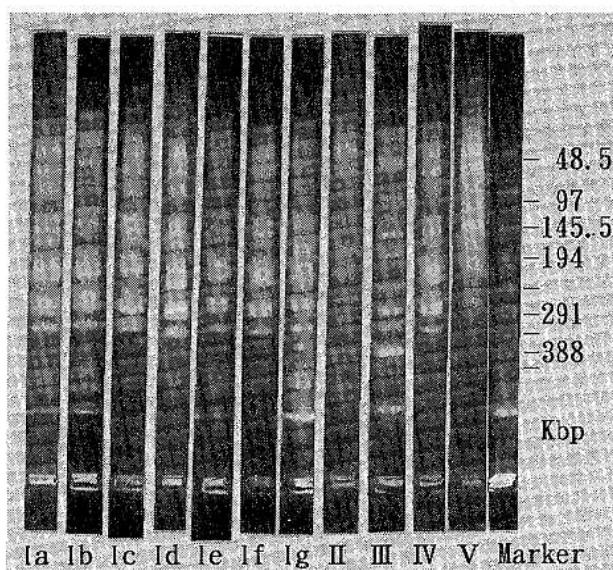


Fig. 1. 分離菌株の PFGE 像

表1. プラスミドプロファイルによる大腸菌O157の型別

型(検出されるプラスミド)	菌株数
A (140, 56, 20Md)	4
B (140, 56, 2, 8, 1.7Md)	5
C (140, 56, 8, 9, 6, 8, 5, 4, 3, 6, 2, 8, 1.7Md)	2
D (140, 56, 5, 4, 4, 1, 2, 8, 2.1Md)	1
E (56, 7, 8, 6, 8, 5, 4, 3.6Md)	2
F (140, 2.8Md)	2
G (140, 5, 4, 3, 6, 2, 8, 2.1Md)	2
H (140, 56, 5, 4, 2.8Md)	1
I (140, 7.8Md)	1
J (140Md)	3

表2. 富山県で分離された腸管出血性大腸菌O157のPFGE型とプラスミド型

患者番号	発症月日	患者の住所	血清型	毒素産生		plasmid型	P富山衛研(Sfi I)	F富山衛研(Sfi I)	G富山衛研(Sfi I)	E感染症研(Xba I)	型
				VT1	VT2						
1	6.12	新湊市	O157:H7	+	+	E	I d	I b	I	I	
2	6.18	滑川市	O157:H7	+	+	F	V	I a'	I	I	
3	6.27	富山市	O157:H7	+	+	D	II	II a	II b	I	
4	7.01	富山市	O157:H7	+	+	H	I e	II a	II b	I	
5	7.12	新湊市	O157:H7	+	+	E	IV	II a	II b	I	
6	7.14	魚津市	O157:H7	+	+	F	IV	II a	II b	I	
7	7.23	富山市	O157:H45	-	-	G	III				
8	7.24	富山市	O157:H45	-	-	G	III				
9	7.31	福野町	O157:H7	+	+	J	I f	ND	ND	I	
10	8. 3	福光町	O157:H7	+	+	J	I f	ND	ND	I	
11	8. 2	福光町	O157:H7	+	+	J	I a	ND	ND	I	
12	8.21	富山市	O157:H7	+	+	A	I a	II a	II b	I	
13	8.26	富山市	O157:H7	+	+	A	I a	II a	II b	I	
14	8.28	富山市	O157:H7	+	+	A	I a	II a	II b	I	
15	8.30	富山市	O157:H7	+	+	A	I a	II a	II b	I	
16	9. 3	滑川市	O157:H7	+	+	B	I c	I a	I	I	
17	9. 9	富山市	O157:H7	+	+	B	I c	I c'	I	I	
18	9. 9	富山市	O157:H7	+	+	B	I c	I c'	I	I	
19	9.16	富山市	O157:H7	+	+	B	I c	I a	I	I	
20	9.15	富山市	O157:H7	+	+	I	I c	I a	I	I	
21	9.12	婦中町	O157:H7	+	+	B	I g	II a	II b	I	
22	10. 3	上市町	O157:H7	+	+	C	I b	II a	ND	III	
23	10. 8	上市町	O157:H7	+	+	C	I b	II a	ND	III	

注)X:100kb以下のバンドタイプ、Y:100-200kbのバンドタイプ、Z:350kb以上のバンドタイプ

ND:その他の型

た。

1996年の富山県における病原性大腸菌O157感染者では、患者番号12, 13, 14, 15が同一保育園児、患者番号22, 23が親子、患者番号7, 8が兄弟で、そのPFGE型、プラスミド型がそれぞれ同一であった。このことから、保育園、親子、兄弟それぞれで、接触感染が多かったのではないかと推察される。保育園では、同一の給食は提供されていない。一方、番号9, 10及び16, 17, 18, 19の散発患者については、PFGE型、プラスミド型が同一型であり、また、それぞれの患者の住所は離れており、接触があったという情報は得られていないので、共通食があったのではないかと推察される。

なお、国立予防衛生研究所（現：感染症研究所）は全国の菌を収集し、そのDNA分析を行っている。表2にその結果を著者らの成績とともに示した。PFGEにおける型の記号は著者らの記号と全く関係がない。この結果によれば、7月に発生した患者番号3～6までのグループ、患者番号9～11、8月に発生した患者番号12～15のグループ、

9月に発生した患者番号17～18、患者番号19～20、10月の患者番号22～23はそれぞれ同じグループであり、患者番号2は愛知県春日井市と同一のパターンの菌で、患者番号3～6, 12～15, 21は、大阪府堺市で発生した菌とよく似てはいるが、それぞれ堺市の菌とはわずかにパターンが異なっている。以上のことから、富山県における多くの発生例については、分離菌のDNA型が異なることから、感染の原因食は様々であり、1996年は複数のタイプの大腸菌O157が富山県に存在していたと考えられる。

参考文献

1. 児玉博英、林美千代、刑部陽宅、吉田喜美子、岩口力男（1992）。富山衛研年報、15, 192-194
2. 刑部陽宅、磯部順子、田中大祐（1994）。富山県衛研年報、17, 129-132
3. 太田美智男（1989）。新しい遺伝子操作技術の基礎、26-28、日本細菌学会教育委員会編、菜根出版。

富山県における1996年の病原微生物検出情報

田中大祐 細呂木志保 刑部陽宅

Isolation of Pathogenic Bacteria in Toyama Prefecture in 1996

Daisuke TANAKA, Shiho HOSOROGI and Yotaku GYOBU

「病原微生物検出情報」のシステム化は、国立感染症研究所（旧国立予防衛生研究所）を中心に全国レベルで医療機関、地研・保健所等から情報を収集し、それを速やかに活用するために1980年より始められた。富山県では12カ所の公立病院検査室と10カ所の保健所、衛生研究所を定点として実施し、国立感染症研究所への報告と定点機関への県内および全国情報の還元を行っている。このシステムにおける情報処理は1997年からは厚生行政総合情報システム（WISH）とVAN回線網を利用したオンライン化により、国立感染症研究所への報告がより迅速になった。

表1.1)－8)に1996年1月から12月までの県内の病原細菌検出情報を材料別・菌種別に集計し示す。集計にあたって保健所・衛生研究所からの情報はほとんどが糞便からの分離例であったが、それらを医療機関からの情報に含めた。また、医療機関から分離された黄色ブドウ球菌については、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）の割合も示した。

表中の○で囲んだ数字は、食中毒など同一フォーカスからの分離株が含まれていることを示し、()内の数字は、海外旅行者分の再掲を示している。

糞便：分離株総数1208株、前年比139%。最も多かったのは黄色ブドウ球菌585株（その内MRSAは71%）であった。次に大腸菌が246株と多く、前年比373%と急増した。1996年は岡山県や堺市をはじめ全国各地で腸管出血性大腸菌O157による大規模な集団下痢症が多発した。富山県で

も、高岡市の保育園において腸管出血性大腸菌O157による患者6名の発生、富山市の保育所において腸管出血性大腸菌O157による患者3名の発生があった。その他、散発事例でO157が16株とO157:H11が1株分離された。サルモネラは142株、前年比146%と分離数は多かったが、集団食中毒の報告はなかった。血清型O9（主にS. Enteritidis）のサルモネラ検出総数に占める割合は46%であった。腸炎ビブリオ、カンピロバクターの分離は前年並であった。

法定伝染病では、赤痢菌11株が分離され、例年に比べ多かった。

海外旅行者からの分離は、サルモネラO4が4株、大腸菌が4株、赤痢菌が4株であった。

穿刺液：分離株総数303株、前年比118%。嫌気性菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌（MRSAは51%）、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌などが多く分離された。

髄液：分離株総数12株、前年比120%。肺炎球菌6株、黄色ブドウ球菌（MRSAは100%）3株の他、インフルエンザ菌、Listeria monocytogenes、B群溶連菌が分離された。

血液：分離株総数448株、前年比118%。コアグラーゼ陰性ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌（MRSAは53%）、大腸菌がおもに分離された。12月にチフス菌が1株海外旅行者より分離された。

咽頭および鼻咽喉：分離株総数1,184株、前年比96%。A群溶連菌が最も多く、次にインフルエンザ菌、肺炎球菌が分離された。

喀痰、気管吸引液および下気道：分離株総数

平成9年10月1日

表1. 月別・菌種別の病原微生物検出状況(1996年)

1) 分離材料:糞便

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Salmonella Typhi													
Salmonella Paratyphi A													
Salmonella O 4			2	2	2	2	2	4(1)		1	⑤(3)	1	21(4)
Salmonella O 7	1		2	2	1	3	5	13	5	3	1	2	38
Salmonella O 8			1				1	1					3
Salmonella O 9					3	13	19	14	8	6	1	1	65
Salmonella その他						1	2	3		2		1	9
Salmonella 群不明						1	1	1	1			2	6
Yersinia enterocolitica							1						1
Y. pseudotuberculosis													
Vibrio cholerae O1													
Vibrio cholerae O139									2				2
V. cholerae O1、O139 以外							⑥	37	34	3			110
Vibrio parahaemolyticus													
Vibrio fluvialis													
Vibrio mimicus													
Aeromonas				1		3	4	3	3				14
Plesiomonas shigelloides													
Campylobacter	5	5	2	1	5	9	16	21	9	8	4	12	97
Staphylococcus aureus	33	36	52	39	36	51	71	60	55	51	⑤2	49	585
Clostridium perfringens													
Clostridium botulinum													
Bacillus cereus													
Entamoeba histolytica													
Escherichia coli 脂肪酸産生性						4	4	1	1				10
" 酒精耐性	1		2(1)			1	13	6	4(1)	5		2	34(2)
" 病原大腸菌血清型		1	2	3		2	18	23(1)	19	9	3	8	88(1)
" EHEC/VTEC						2	4	④	6	3			29
" その他・不明			1	5(1)	4	4	⑤	35	8	2		1	85(1)
Shigella					1	1(1)	④	③(3)			②		11(4)
合 計	40	42	62	55(2)	52	93(1)	226	244(5)	153(1)	94	66(3)	81	1208(12)

2) 分離材料:穿刺液(胸水、腹水、関節液など)

Escherichia coli	5	4	5	9	3	3	5	7	1	4	3	10	59
Klebsiella pneumoniae	3	2	3	3	2	2	3	3	2	3	1	6	33
Haemophilus influenzae				1			1						2
Neisseria meningitidis													
Pseudomonas aeruginosa	7	1	1		3	1	1	3		1	3	4	25
Mycobacterium spp.		1											1
Staphylococcus aureus	6	3	7	1	6	3	5	4	11	3	3	5	57
Staphylococcus, ノックラーゼ陰性	2	5	4	2		6	2	4	3	3	6	5	42
Streptococcus pneumoniae				1									1
Anaerobes	6	11	3	5		4	9	2	6	4	9	24	83
Mycoplasma pneumoniae													
合 計	29	27	23	21	15	19	26	23	23	18	25	54	303

3) 分離材料：膿液

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Escherichia coli													
Haemophilus influenzae												1	1
Neisseria meningitidis													
Listeria monocytogenes							1						1
Staphylococcus aureus	2		1										3
Streptococcus, B		1											1
Streptococcus pneumoniae			1		1			1			2	1	6
合 計	2	1	2	0	1	1	0	1	0	0	3	1	12

4) 分離材料：血液

Escherichia coli	7	3	4	8	12	7	12	4	9	10	9	7	92
Salmonella Typhi												1(1)	1(1)
Salmonella Paratyphi A													
Salmonella spp.		1				1							2
Haemophilus influenzae													
Neisseria meningitidis													
Pseudomonas aeruginosa	5	2	3	3	1	4	6	2	3	5	6	3	43
Staphylococcus aureus	8	5	10	5	10	4	8	14	19	13	9	11	116
Staphylococcus, フラグラー陰性	10	13	7	10	15	10	15	19	8	8	13	14	142
Streptococcus, B		2		1				1		1		1	6
Streptococcus pneumoniae			5	1	1		2	3	1		2	2	17
Anaerobes	2	3	2	3	2	3	6	2	3		2	1	29
合 計	32	29	31	31	41	29	49	45	43	37	41	40(1)	448(1)

5) 分離材料：咽頭および鼻咽喉からの材料

Bordetella pertussis													
Haemophilus influenzae	80	49	41	27	52	53	33	26	14	19	39	48	481
Neisseria meningitidis													
Streptococcus, A	69	39	61	43	72	26	19	13	19	34	52	53	500
Streptococcus pneumoniae	19	22	17	34	37	16	8	3	8	7	15	17	203
C. diphtheriae													
合 計	168	110	119	104	161	95	60	42	41	60	106	118	1184

6) 分離材料：喀痰、気管吸引液および下気道からの材料

M. tuberculosis		1	3	1	2	3	4	3	2	2	2	1	24
Klebsiella pneumoniae	50	42	37	48	57	49	68	69	93	58	66	51	688
Haemophilus influenzae	36	31	29	30	52	34	40	32	23	36	36	43	422
Legionella pneumophila													
Pseudomonas aeruginosa	73	66	67	61	93	76	86	110	111	117	107	89	1056
Staphylococcus aureus	149	140	158	147	203	153	158	177	165	168	177	177	1972
Streptococcus, A	6	4	3	2	6	7	6	7	7		2	6	56
Streptococcus, B	10	14	11	7	12	13	8	11	14	17	20	19	156
Streptococcus pneumoniae	36	29	37	42	55	25	41	30	29	29	31	28	412
Anaerobs													
Mycoplasma pneumoniae													
合 計	360	327	345	338	480	360	411	439	444	427	441	414	4786
M. avium				1									1

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	114	99	132	121	134	120	152	157	150	145	138	159	1621
Enterobacter spp.	17	18	17	26	21	19	22	27	16	27	23	33	266
Klebsiella pneumoniae	32	33	39	18	35	32	28	28	32	56	28	34	395
Acinetobacter spp.	1	2	3	4	4	6	5	5	3	4	4	8	49
Pseudomonas aeruginosa	56	42	56	67	63	72	84	94	107	95	85	74	895
Staphylococcus aureus	33	38	40	34	49	34	39	35	52	51	44	52	501
Staphylococcus, ニアグラーゼ陰性	39	30	33	44	42	43	58	42	27	36	56	57	507
Enterococcus spp.	53	82	57	74	72	68	89	67	71	85	81	82	881
Candida albicans	28	30	30	39	52	31	22	33	30	28	26	27	376
合 計	373	374	407	427	472	425	499	488	488	527	485	526	5491

8) 分離材料：陰部尿道頸管擦過（分泌）物

Neisseria gonorrhoeae	1		1	1			2	2	1				8
Streptococcus, B	5	18	10	14	13	15	14	18	9	8	11	8	143
Chlamydia trachomatis	9	5	14	3	6	4	7	2	1	9	7	1	68
Ureaplasma													
Candida albicans	91	109	99	105	108	85	138	111	89	102	96	74	1207
Trichomonas vaginalis	3	3	4	2		1	5		2		8	3	23
合 計	109	135	128	125	127	105	166	133	102	119	114	86	1449

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。

各表の合計より下の欄は、全国集計には入れていないが、各機関から報告された菌種等についての記載。

4,786株、前年比102%。黄色ブドウ球菌(MRSAは69%)、緑膿菌が多く、他に肺炎桿菌、インフルエンザ菌、肺炎球菌などが分離された。

尿：分離株総数5,491株、前年比101%。各分離材料のなかで最も分離株数が多く、菌種も様々であった。大腸菌、緑膿菌、腸球菌などが多かった。コアグラーゼ陰性ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌(MRSAは67%)なども分離された。

陰部尿道頸管擦過（分泌）物：分離株総数1,449株、前年比89%。ほとんどが、Candida albicansであった。その他、B群溶連菌などが分離された。なお、Chlamydia trachomatis、Trichomonas vaginalisは抗原検出数である。

謝辞：県内12カ所の公立病院と10カ所の保健所の検査担当各位に感謝します。

キャピラリー電気泳動による 清涼飲料水中パントテン酸の分析

小玉修嗣 山本 敦 松永明信

Analysis of Pantothenic Acid in Soft Drinks by
Capillary Electrophoresis

Shuji KODAMA, Atsushi YAMAMOTO and
Akinobu MATSUNAGA

パントテン酸はビタミンB群の一つであり、補酵素A(CoA)の構成成分になっている。他のビタミン同様、パントテン酸を添加した食品が多く市販されている。パントテン酸の定量は、*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014を用いた微生物定量法により行われてきた[1]。しかし、この方法は操作が煩雑で、分析に長い時間を要するため、近年、高速液体クロマトグラフィーによるパントテン酸の分析法が多く報告されている[2, 3, 4]。これに対し、操作性がより簡便で、廃液量が少なく、かつ、微量の試料を短時間で分析できるキャピラリー電気泳動法を用いてパントテン酸を分析した報告はほとんどない。そこで、パントテン酸を添加している市販の清涼飲料水を試料として、キャピラリー電気泳動による分析を行い、その有用性を検討した。

実験方法：試料；パントテン酸を添加している市販の清涼飲料水5検体を用いた。試薬；パントテン酸カルシウム、四ほう酸ナトリウム、りん酸二水素ナトリウム二水和物およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は和光純薬製を用いた。標準溶液の調製；パントテン酸カルシウムを脱イオン水で溶解し、パントテン酸濃度として1mg/1-100mg/1となるように脱イオン水で希釈したものを標準溶液とした。脱イオン水の調製はYamato Auto Still(Model WA-52G)により行つ

た。試料の調製；清涼飲料水を脱イオン水で5倍希釈した後、0.22μmのメンブランフィルターでろ過したろ液を試料とした。添加回収率の測定に際しては、試料中に50mg/1のパントテン酸を添加したときの定量値とパントテン酸無添加のときの定量値から算出した。キャピラリー電気泳動法；HP^{3D}キャピラリー電気泳動システム(Hewlett Packard 製)を用い、常法[5]に準じて行った。泳動緩衝液は6 mM 四ほう酸ナトリウム、6 mM りん酸二水素ナトリウム、18mM SDS を用いた。キャピラリーカラムはヒューズドシリカバブルセルキャピラリー(75μm i.d.×56cm, Hewlett Packard 製)を用いた。試料の注入は加圧法(50mbar, 4sec)により行った。泳動電圧は12kVとした。検出は200nmの吸光度の測定により行った。試料中のパントテン酸の定量は、絶対検量線法を用いてピーク面積法により算出した。

結果および考察：種々濃度の標準溶液をキャピラリー電気泳動に供し、パントテン酸の検量線を作成した。1mg/1-100mg/1の濃度範囲で良好な直線性を示した($r > 0.9999$)。標準溶液および清涼飲料水のフェログラムの代表例をFig. 1に示した。清涼飲料水中にはパントテン酸の他にも種々の水溶性ビタミンが含まれているが、それらビタミンと良好に分離された。キャピラリー電

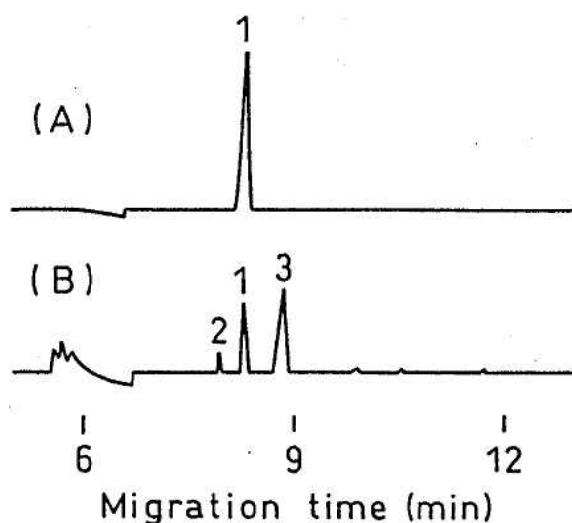


Fig. 1. Electropherograms of standard solution (A) and soft drink (B)

- 1: pantothenic acid
- 2: pyridoxine
- 3: ascorbic acid

気泳動では、試料成分の泳動時間やピーク面積の再現性に課題があるといわれている。標準溶液(10mg/l)および清涼飲料水をそれぞれ5回ずつキャピラリー電気泳動に供したところ、パントテン酸の泳動時間とピーク面積の再現性(CV)はそれぞれ0.8%および1.7%以下と良好な結果が得られた。

清涼飲料水5検体について、キャピラリー電気泳動によりパントテン酸を定量したところ、8.9mg/l~52.7mg/lであった(Table 1)。各検体の添加回収率は97.0%~99.2%と良好な値であった。したがって、本法は、他のビタミンの妨害を受けず、清涼飲料水中パントテン酸定量法として日常分析に適したものと考えられる。

文 献

- 厚生省環境衛生局食品化学課 (1982). 食品中の食品添加物分析法, p336-342.

Table 1. Determined value of pantothenic acid in soft drinks by capillary electrophoresis and recovery of pantothenic acid spiked to soft drinks

Sample	Spiked level (mg/l)	Determined value (mg/l)	Recovery (%)
A	0	30.0	
	50	78.5	97.0
B	0	39.0	
	50	88.2	98.4
C	0	52.7	
	50	102.2	99.0
D	0	8.9	
	50	57.6	97.4
E	0	20.4	
	50	70.0	99.2

2. 志村恭子, 山田隆雄, 桜井憲三, 森善宣, 石須哲也 (1987). 三重県衛生研究所年報, 33, 73-80.
3. 鎌田功, 足立透 (1988). 京都府衛生公害研究所年報, 33, 36-40.
4. Iwase H. (1993). Anal. Sci., 9, 149-151.
5. Hewlett Packard (1994). HPCE Application News No. 1.

農産物中の残留農薬調査

齊藤行雄 大浦徹 大戸幹也 松永明信

Pesticide Residues in Agricultural Commodities

Yukio SAITO, Takashi OHURA, Mikiya OHTO
and Akinobu MATSUNAGA

農薬は農産物生産過程における病害虫や雑草の防除の目的で使用されるが、その使用は食糧確保の観点から不可欠である。現在、我が国における農薬の使用は農薬取締法により規制されており、食品中の残留規制は食品衛生法で実施されている。使用される農薬は登録保留基準が定められており270種〔1〕ある。これに対して食品中の農薬残留基準は138農薬〔2〕のみであることから、厚生省では数年中に約200農薬まで基準を追加設定するとしており、現在その作業が進行中である。

食品安全性確保の観点からは、使用される農薬が安全使用基準を遵守して散布されているか監視する必要がある。農産物中の多種類の農薬を効率的に調査することが求められている。

著者らは、既に前報〔3, 4, 5〕で、試料からアセトン抽出後、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)及び吸着系固相抽出ミニカラムで精製しGC及びHPLCで測定する76農薬の系統分析法を確立した。この系統分析法を用いて平成8年度も継続して県内で生産された農産物中の残留農薬について調査した。

材料と方法：試料は、1996年8月から1996年11月にかけて富山県内で生産されたすいか、ねぎ、さといも、りんご、かき(各2試料)及び玄米(4試料)の6種14試料を用いた。防除暦表から、すいかにダイアジノン、フルバリネット、キノメチオネットが、ねぎにジメトエートが、さといもにDDVP、ホサロン、CYAPが、りんごにDDVP、

CYAP、クロルピリホス、MEP、フェナリモル、NACが、かきにピリダフェンチオン、フェンバラレート・MEP混合剤が、玄米にMEP・BPM C・フサライド混合剤、フサライド・フルトラニル混合剤がそれぞれ散布されていた。

試薬は、前報〔6〕に従った。

調査農薬は、前報〔6〕と同様に76農薬である。GPC装置及びGPC条件、GC、HPLC装置及びこれらの測定条件などは前報〔6〕に従った。検出された農薬については、ガスクロマトグラフ／質量分析計(GC/MS、島津製作所製QP-5000)を使用し選択イオン検出(SIM)モードにより農薬を測定した〔6〕。

結果及び考察：有機リン系農薬については、野菜・果実類及び玄米6種14農産物を分析した結果、ジメトエートがねぎ2試料から0.03ppm, 0.05ppmを検出した。残留基準値は未設定であるが、登録保留基準値〔1〕1ppmの1/20以下であった。その外の試料は全てに不検出であった。防除暦での有機リン系農薬使用は農産物全体としてみると合計8農薬で、含窒素系(5農薬)、ビレスロイド系(2農薬)、有機塩素系(1農薬)に比較して多種類が使用されていた。しかし、残留していたのはジメトエートのみであり、有機リン農薬の残留性が低いことを示していた。

有機塩素系農薬については、フサライドが玄米2試料から0.006ppm, 0.009ppmの残留が認められた。しかし、残留基準値は未設定であるが、登

録保留基準値 [1] 1 ppm の 1/100 以下であった。

ピレスロイド系農薬では、ねぎ及びかきの各 1 試料からフェンバレレート 0.02 ppm 及び 0.01 ppm を検出した。残留基準値はねぎ 0.50 ppm, かき 1.0 ppm であり、各基準値の 1/25, 1/100 であった。ねぎの防除暦ではフェンバレレート未使用になっていたが、生産者の報告洩れであると考えられる。かきの防除暦ではフェンバレレート 10%・MEP30% 混合剤が使用されており、有機リン剤の MEP が不検出であることからフェンバレレートの残留性が高いことを示していた。

含窒素系農薬では、NAC が、りんご 2 試料から 0.08 ppm 及び 0.24 ppm, フルトラニルが玄米 1 試料から 0.11 ppm の数値でそれぞれ残留していた。

NAC やフルトラニルの残留基準値は各々 1.0 ppm であり、残留量は NAC では基準の約 1/4 以下、フルトラニルは基準の 1/9 であった。有機塩素剤のフサライド同様に NAC やフルトラニルの残留性が比較的に高いことを示していた。

以上、県内農産物 14 試料について 76 農薬を分析したところ、ジメトエート（ねぎ 2 試料）、フサライド（玄米 2）、フェンバレレート（ねぎ及びかき各 1）、NAC（りんご 2）及びフルトラニル（玄米 1）の 5 農薬が残留していた。これら残留していた試料中の農薬は全て GC/MS-SIM 測定で確認した。しかし、分析試料については洗浄や剥皮処理を行わないで得られたデータである。ねぎに残留していたジメトエートは水溶解度が高く浸透移行性農薬である [7] が、細かく切って水さらし、流水洗浄及びゆでる等の調理によってかなり残留量が減少すると報告 [8] されている。フサライド、フェンバレレート、NAC 及びフルトラニルは水溶解度が低く、果皮や玄米の糠層に多く残留しており [9, 10]、実際の喫食では果皮を剥いだり、精白した白米を摂取するため、かなり農薬が減少すると報告されている [8, 9, 10]。

これらのことから農産物中に残留していた 5 農薬は、喫食上特に問題はないものと考えられる。

最近における国内農産物からの農薬調査ではフサライド、ジメトエート及び NAC を検出した報告例がある [9, 11, 12]。本調査でのフサライド残留量は報告例よりも低値であり、ジメトエート及び NAC ではほぼ同程度であった。

文 献

1. 農薬環境保全対策研究会編 (1995). 農薬登録保留基準残留農薬基準ハンドブック－作物・水質残留の分析法－, 1085-1098, 化学工業日報社.
2. 厚生省告示第 221 号, 平成 8 年 9 月 2 日.
3. 齋藤行雄, 山本 敦, 松永明信, 水上英一 (1994). 富山衛研年報, 17, 144-154.
4. 齋藤行雄, 大浦 敏, 山本 敦, 松永明信 (1996). 富山衛研年報, 19, 197-201.
5. 大浦 敏, 齋藤行雄, 松永明信 (1996). 富山衛研年報, 19, 202-203.
6. 齋藤行雄, 大浦 敏, 山本 敦, 松永明信 (1996). 富山衛研年報, 19, 204-210.
7. 金沢 純 (1994). 農薬の環境科学, 82-86, 合同出版(株).
8. 杉林幸子, 濱田郁子, 三島郁子, 吉川典子, 片岡寿理, 川口恵代, 藤本祐子, 扇間昌規, 伊藤聰志男 (1995). 日食化誌, 2, 97-101.
9. 斎藤 敏, 山田貞二, 大島晴美, 早川順子 (1997) : 愛知衛所報, 47, 7-11.
10. 永山敏廣, 小林麻紀, 塩田寛子, 伊藤正子, 田村行弘 (1995). 食衛誌, 36, 383-392.
11. 小林麻紀, 永山敏廣, 橋本常生, 羽石奈穂子, 伊藤正子, 田村康宏, 友松俊夫 (1996). 東京衛研年報, 47, 135-140.
12. 北川幹也, 村田 弘, 今井田雅示, 堀 伸二郎 (1996). 大阪府立公衛研所報, 27, 49-52.

魚介類中のトリブチルスズ化合物の分析

大浦 敦 松永明信

Determination of Tributyltin Compounds in Fish

Takasi OHURA and Akinobu MATSUNAGA

トリブチルスズ化合物、トリフェニルスズ化合物等の有機スズ化合物は、生物の成育阻害の効果が強いことから船舶の船底塗装や漁網の汚染防止に長く使われてきた。しかし、1980年代半、環境中や魚介類特に養殖魚に残留していることが明らかとなり、現在、その使用が規制されている。

検査法は、トリブチルスズクロリドとしてGCにより定量する方法、あるいはHPLCによる方法、水素化物に変換してECD-GCで測定する方法等が報告されている。公定法としては、1985年4月に提示されたトリブチルスズクロリドとしてGCにより定量する方法が利用されていたが、1994年2月にエチル化後、FPD-GCにより測定する方法[1]が厚生省から示された。

この方法について検量線作成の再現性、添加回収試験、分析法の適応範囲等を検討し、県内産の魚介類について含有量調査を行った。

材料と方法；検体は1995年11月から1996年12月に県内3ヶ所の漁港で水揚げされた魚介類18種28検体を用いた。試料の採取は、おおむね1973年7月23日環乳第99号「魚介類中の水銀の暫定規制値について」に準じ、大きさによって数匹から十数匹の魚の可食部を取り、混合したものを用いた。

エタノール、メタノール、エーテル、n-ヘキサン、無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用を、亜硫酸ナトリウム、塩酸は特級試薬を用いた。エチル化には東京化成製エチルマグネシウムプロミドのエーテル溶液を使用した。また、東京化成製のジ-n-ブチルスズクロリド(DBTC)、キシダ化学製トリー-*n*-ブチルスズクロリド(TBTC)およ

びトリフェニルスズクロリド(TPTC)を各々50mg秤取りエタノール50mlに溶かして標準原液を調製した。これを適宜、メタノールまたはn-ヘキサンで希釈して添加回収試験、検量線の再現性の検討に用いた。

GC装置は、オートインジェクターを装備した島津製GC-14A(SnモードFPD検出器付)、カラムはJ&W製DB-1701(内径0.53mm、長さ15m、膜厚1μm)を用いた。条件は注入口温度240℃、検出器温度300℃、水素ガス1kg/cm²、空気1kg/cm²に、キャリヤーガスのヘリウムガスは0.8kg/cm²に設定した。カラム温度は初期温度100℃に4分間保持した後、毎分20℃で240℃まで昇温し、その後5分間保持させた。

検量線の作成には標準原液をn-ヘキサンで希釈し、1~4μg/mlの誘導体作成用標準液を調製し、その1mlを取り、室温で30分間アルキル化の操作を行った後、n-ヘキサンで抽出して10mlのアルキル化標準液とした。その3μlをFPD-GCにより測定し、得られたクロマトグラフのピーク高さから絶対検量線法により検量線を作成した。

試験溶液は、厚生省通知に従い、試料の2倍量のメタノールでホモジナイズした後、試料5g相当を取り、エーテル・ヘキサン溶液で抽出し、フロリジルPRカラムでクリーンアップを行った。その後、グリニアル試薬でアルキル化し、ヘキサン抽出を行い、セップパックフロリジルでクリーンアップし、最終検液2mlとした。

結果及び考察；FPD-GCによる有機スズ化合物の定量にはピーク高さを用いる方が合理的とされ

ていること〔2〕。今回の測定でもピーク形状はシャープであったので、ピーク高さから検量線を作成した。検量線の作成は、再現性を検討するため、日時を違えて6回行った。その結果はFig. 1およびFig. 2に示した。濃度0.1~0.4μg/mlの範囲においては得られた6回の値の変動係数はDBTC, TBTCともに1.7~7.2%と良好な結果が得られた。また、濃度0.1~0.4μg/mlの範囲における、各濃度の平均値を利用して作成した検量線の相関係数は、DBTCが0.9985, TBTCが0.9973であり、充分な再現性を確認することがで

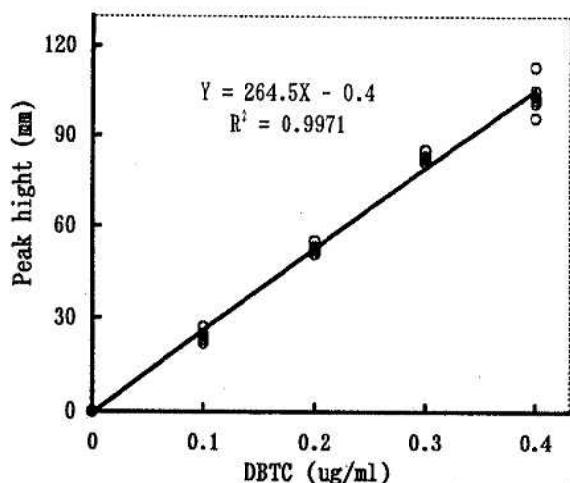


Fig. 1. Calibration curve of DBTC

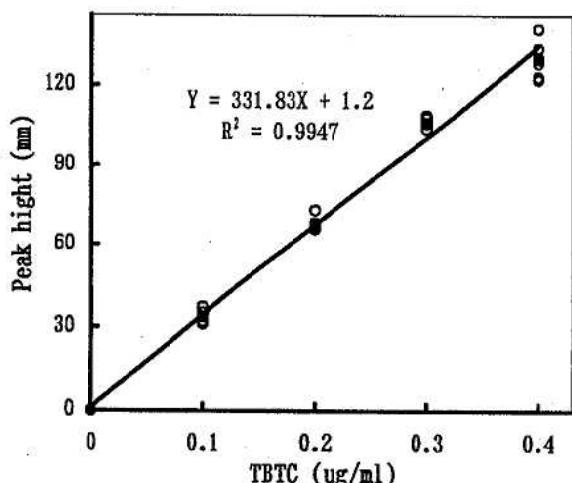


Fig. 2. Calibration curve of TBTC

きた。しかし、この条件におけるTPTCのアルキル化反応は、六角ら〔3〕が報告しているように、非常に不安定であり、さらに反応条件等を検討する必要があった。得られたチャートから求めた検出下限値は、S/N=5において試料換算濃度で0.01μg/gであった。

添加回収試験の試料には、あらかじめ有機スズ化合物の位置にピークが出現しないことを確認した富山県内産のタイを用いた。試料に2倍量のメタノールを加えホモジナイズした後、5g相当を取り、DBTC, TBTC各々0.2μg/gとなるよう標準液を加え、以後、同様に操作して試験溶液を調製した。6回行った添加回収試験については、DBTは平均 $104 \pm 6.7\%$ 、TBTは平均 $89 \pm 3.4\%$ と回収率及びその標準偏差は良好であった。

1995年11月から1996年12月に県内で水揚げされたぶり、はまち、たい、かつお等18種28検体について検査した。その結果、28検体中11検体からTBTOが検出され、その平均値は0.04μg/gであった。ぶり、はまち、さけ等の回遊魚からは検出されなかったが、かつおは検査した2検体から検出された。なお、DBTOについては、全て不検出であった。

今回の検査において、TBTOの検出数や検出された値は、既に報告されている値〔1, 4〕と比較して、低い値であった。これは、本県で水揚げされる魚介類は全て天然魚であることや、漁場周辺の大型船舶の交通量が比較的少ないことに挙るものと考えられる。

文 献

- 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知（1994. 2. 25）衛公第20号
- 厚生省生活衛生局監修（1994）。食品検査指針理化学編、218~223、社団法人日本食品衛生協会
- 六角千恵子、藪内礼子、高橋美穂子、鈴木忠人（1996）。福島衛公研年報、13, 76~79
- 近本武次、都築英明、足立透、時武正明、藤田研（1988）。食衛誌。Vol.29, No. 2, 141~145

発泡酒中の異物様固体物質苦情事例

山本 敦 小玉修嗣 松永明信 岩田栄一¹
高田正耕¹ 今井茂憲¹

On the handling for the complaint about lees
in 'happoushu'

Atsushi YAMAMOTO, Shuji KODAMA, Akinobu
MATSUNAGA, Eiichi IWATA¹, Shoukou TAKATA¹
and Shigenori IMAI¹

一昨年のペットボトル入りミネラルウォータ中の異物混入事件以来、一般消費者に食品中の異物に対する関心が高まってきた。本苦情例も、ニュージーランド産の発泡酒中に澱がある、と消費者より保健所へ寄せられたものである。今回は、沈殿物の化学分析により、その成分を解明することができたので、今後の苦情処理の参考となるよう、以下に解析結果をまとめた。

方法：消費者より保健所に届出されたニュージーランド産アルミ缶入り発泡酒について検査を行なった。発泡酒中の沈殿物は、ADVANTEC 社製0.45 μ mニトロセルロース膜に捕集し、充分水洗した後、105°Cで2時間乾燥した。この0.22mgを精秤し、5mlの10mM酒石酸に溶解して試験溶液とした。

HPLC 装置は、島津 LC-4A ポンプ、レオディン7125型インジェクタ、島津 CTO-6A カラム恒温槽及びウォーターズ432伝導度検出器で構成した。陰イオン分析には横河 CX1 サプレッサを用いた。

陰イオン分析は、東ソー IC-Anion-PW カラムと10mM炭酸水素ナトリウム溶離液の組合せで行なった。除去液には15mM硫酸を用いた。陽イオン分析は、島津 IC-C3 カラムに3 mMシュウ酸

を溶離剤として行なった。いずれもカラム温度40°C、流速1 ml/minで測定した。

結果と考察：写真1に発泡酒中の沈殿物の顕微鏡写真を示す。細かなガラス状の結晶であり、明らかに酵母等の微生物とは異なった。ビール中の結晶状異物としては、シュウ酸カルシウムが結晶として析出することが知られている [1]。そこで、この結晶についてICによる成分分析を試みた。この結晶は、水に難溶性で、酸には溶けた。

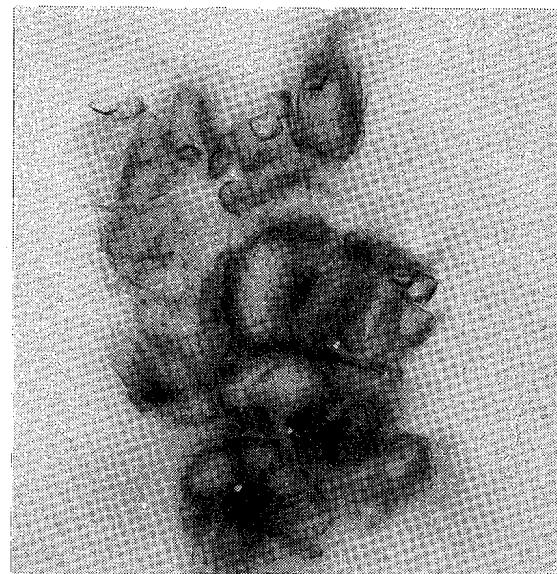


写真1. 発泡酒中の沈殿物

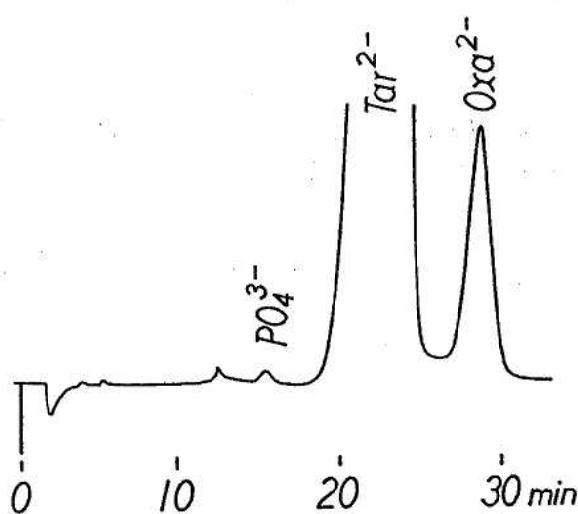


図1. 結晶酒石酸溶液の陰イオンクロマトグラム

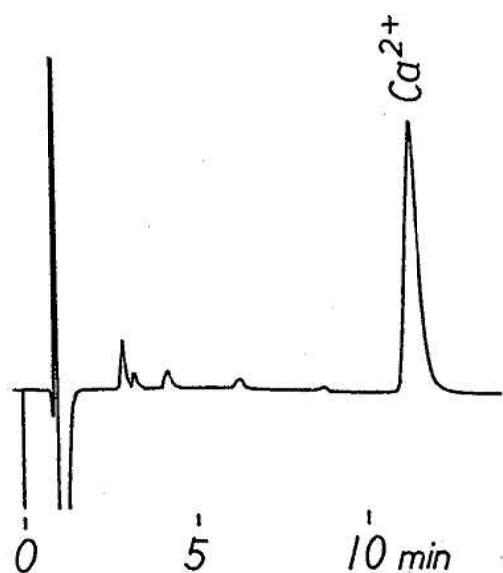


図2. 結晶の陽イオンクロマトグラム

まず、2%トリクロロ酢酸に溶解し、陰イオン成分を測定したところ、主成分としてシュウ酸ピークが観察された。しかし、トリクロロ酢酸は不安定な化合物で、クロマトグラム上には分解により生じた多量の塩化物イオンやその他分解物のピークが多く認められ、シュウ酸以外の測定の妨害となつた。酒石酸の溶出位置にピークが出現しないことが確認できたので、結晶を酒石酸溶液として再分析を行なつた。図1にそのクロマトグラムを示すが、シュウ酸以外にリン酸のピークが確認できた。これより算出される試験溶液中のイオン量は、シュウ酸が0.128mg、リン酸が0.006mgであった。

次に陽イオン成分の測定を試みた。図2にクロマトグラムを示す。カルシウムイオンが主で、微量のナトリウムイオン(2.9min)、カリウムイオン(4.2min)の存在が確認できた。カルシウムイオン量は0.066mgであった。

以上、主要3イオン種だけでその総量の約9割を占めることより、この発泡酒中の沈殿物は、硬度の高い水を使用したために発酵工程で生じたシュウ酸が保存(輸送)中に難溶性のシュウ酸カルシウム、一部リン酸二水素カルシウムの結晶となって沈殿したものと推測された。

文 献

- 桐ヶ谷忠司、松本幸一郎、済田清隆、笹尾忠由、渡部健二郎、水野惇雄、横浜衛研年報、35(1996) 63-65.

平成 8 年度水道水質検査の精度管理事業について

健名智子 高柳信孝 松永明信

The Results of External Analogy Control on Iron and Zinc 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平成 8 年度精度管理が、鉄及び亜鉛の 2 項目について実施された。当所は配布試料の調製、参加機関の報告値の集計および解析を担当した。今回、その結果をまとめたので報告する。

調査方法

- (1) 実施時期：平成 9 年 3 月 10 日～3 月 14 日
- (2) 参加機関：水道事業体 2 機関、水道用水供給事業体 2 機関、水道法第 20 条に規定する指定検査機関 1 機関、10 保健所及び当所の計 16 機関で、県内の水道水質検査を実施する全機関（うち全項目検査を行う機関は 7 機関）が参加した。
- (3) 検査項目：鉄（全 16 機関）及び亜鉛（うち 7 機関）
- (4) 配布試料及び標準原液：試料 30 L は、鉄及び亜鉛標準液を精製水に添加し、更に 1 L につき有害金属測定用硝酸 10 ml を加えて調製した。これをあらかじめ酸洗した 1 L ポリ瓶に小分けし、配布試料とした。なお、試料中の鉄及び亜鉛の濃度範囲を鉄 0.05～0.5 mg/L、亜鉛 0.01～0.1 mg/L と提示したが、実際の調製濃度は鉄 0.20 mg/L、亜鉛 0.020 mg/L であった。また、標準原液として、和光純薬製の鉄標準液 (Fe 1000)、亜鉛標準液 (Zn1000) の同一 Lot 品を配布した。
- (5) 検査方法及び検査結果：検査は、日常の検査業務と同じ方法を用い、5 回の併行測定を行う

こととした。検査結果は、5 回の併行測定すべての測定結果を、有効数字 2 衔として報告することとし、この結果について集計を行った。

結果

(1) 鉄

各機関から報告された鉄の測定結果より、各機関の測定値、変動係数、回収率を一覧表にして Table 1 に示す。16 検査機関のうち、1 機関が 2 通りの方法を使用し報告したことから、17 検査機関として統計処理を行った。17 検査機関のうち、検査方法として誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP 法) を用いた機関は 2 機関、フレームレス原子吸光光度法 (フレームレス法) を用いた機関は 2 機関、吸光光度法を用いた機関は 13 機関であった。全機関の測定値の平均値 ± 標準偏差は $0.207 \pm 0.0193 \text{ mg/L}$ であった。この値から Grubbs の異常値検定（危険率 5 %）を行った結果、棄却される値はなかった。各機関の測定値と平均値を Fig. 1 に示す。1 機関を除き、測定値は平均値 ± 2 標準偏差の範囲内に収まっていた。

各機関内での併行測定における室内変動係数は 0.0～7.5 % と、すべて判断基準である 10 % 未満であった。また、全機関の測定値の平均値についての変動係数（室間変動係数）も 9.3 % と 10 % を下回っていた。

全機関の測定値の平均値を真の値と仮定して、回収率 (= 測定値 / 真の値) を求め、Table 1

Table 1 Summary of Analytical results of Iron

Laboratory No.	Concentration (mg/L) Mean value of 5 runs	CV(%)	Recovery (= Concentration/Average)
1	0.182	2.5	0.88
2	0.252	3.3	1.22
3	0.176	5.1	0.85
4	0.210	0.0	1.01
5	0.210	3.4	1.01
6	0.202	2.2	0.98
7	0.196	5.8	0.95
8	0.212	3.9	1.03
9	0.224	7.5	1.08
10	0.184	3.0	0.89
11	0.200	0.0	0.97
12	0.234	2.3	1.13
13	0.218	3.8	1.05
14	0.214	6.3	1.03
15	0.212	2.1	1.02
16	0.200	0.0	0.97
17	0.190	0.0	0.92
Number of lab.	17	17	17
Max(mg/L)	0.252	7.5	1.22
Min(mg/L)	0.176	0.0	0.85
Average(mg/L)	0.207	3.01	1.000
SD(mg/L)	0.0193	2.28	0.0930
CV(%)	9.3	—	9.3

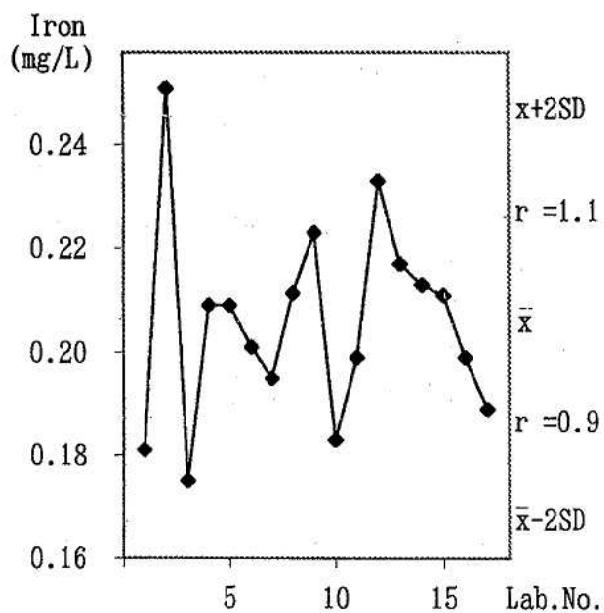


Fig. 1. Concentration of Iron: Mean Value of Each Laboratory and Average

\bar{x} : Average SD: Standard Deviation
 r : Recovery

に示すと共に、回収率が0.9~1.1となる範囲をFig. 1. 上に示す。この範囲内であれば、測定値は良好と判断されるが、5機関がこの範囲からはずれていた。はずれていた機関の検査方法は、ICP法2機関、フレームレス法1機関、吸光光度法2機関であった。

各機関の測定値を、一元配置の分散分析により解析してみたところ、求められたF値より、危険率5%で、機関によりその測定結果に有意な差がみられた。

検査方法の違いによる測定結果の違いをみるために、報告された全測定値について、検査方法ごとに平均値、標準偏差、変動係数、回収率をもとめ、Table 2に示した。回収率はどの方法も、ほぼ0.9~1.1の範囲内にあったが、ICP法は0.9、フレームレス法は1.1と離れた値をとった。また、フレームレス法の変動係数が15%と高かった。検査方法間の分散の同一性(F

Table 2 Differences in Analytical Results of Iron obtained by the Three Analytical Methods

Method	Number of Data	Average (mg/L)	SD (mg/L)	CV (%)	Recovery
Absorptiometry	65	0.209	0.0145	6.9	1.01
ICP	10	0.179	0.0074	4.1	0.86
FLAA	10	0.221	0.0331	15.0	1.07

ICP : Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

FLAA: Flameless Atomic Absorption Spectrometry

検定)を調べたところ、どの検査方法も互いに異分散の関係にあった。そこで Welch の方法により、検査方法の違いによる平均値の差の検定を行った。その結果、フレームレス法と吸光光度法の間には差はみられなかつたが、 ICP 法とフレームレス法、 ICP 法と吸光光度法の間には有意差(危険率 5 %)がみられ、 ICP 法による測定値が有意に低いことがわかつた。

(2) 亜鉛

各機関から報告された亜鉛の測定結果より、

各機関の測定値、変動係数、回収率を Table 3 に示す。7 検査機関のうち、1 機関が2通りの方法を使用し報告したことから、8 検査機関として統計処理を行つた。8 検査機関のうち、検査方法として ICP 法を用いた機関は 2 機関、フレームレス法を用いた機関は 4 機関、フレーム原子吸光光度法(フレーム法)を用いた機関は 2 機関であった。全機関の測定値の平均値士標準偏差は $0.0179 \pm 0.00326 \text{ mg/L}$ であり、調製濃度を 1 割以上下回つてゐた。この値から

Table 3 Summary of Analytical results of Zinc

Laboratory No.	Concentration (mg/L) Mean value of 5 runs	CV(%)	Recovery (= Concentration/Average)
1	0.0186	2.9	0.98
2	0.0104	11.0	0.55
3	0.0182	7.2	0.96
4	0.0204	2.7	1.07
5	0.0166	3.3	0.87
6	0.0200	0.0	1.05
7	0.0192	2.3	1.01
8	0.0198	2.3	1.04
Number of lab.	8	8	8
Max(mg/L)	0.0204	11.0	1.07
Min(mg/L)	0.0104	0.0	0.55
Average(mg/L)	0.0179	3.96	0.942
SD(mg/L)	0.00326	3.46	0.172
CV(%)	18.2	—	18.2
except Laboratory No.2			
Number of lab.	7	7	7
Average(mg/L)	0.0190	2.96	1.000
SD(mg/L)	0.00130	2.15	0.0690
CV(%)	6.9	—	6.9

Grubbs の異常値検定（危険率 5 %）を行った結果、1 機関の測定値が棄却された（検査機関 No. 2）。棄却された測定値を除いた測定値の平均値士標準偏差は $0.0190 \pm 0.00130 \text{ mg/L}$ であった。各機関の測定値と検査機関 No. 2 の測定値を除いた場合の平均値を Fig. 2 に示す。検査機関 No. 2 以外のすべての機関の測定値が、平均値士 2 標準偏差の範囲内に収まっていた。

各機関内の併行測定における室内変動係数は 0.0~11.0% であったが、検査機関 No. 2 以外はすべて 10% 未満であった。また、室間変動係

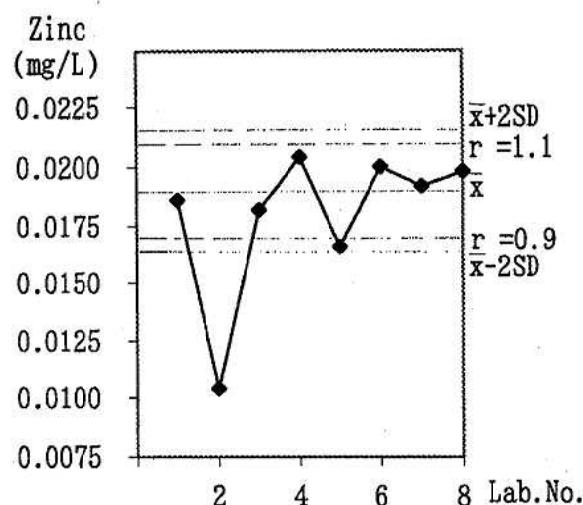


Fig. 2. Concentration of Zinc: Mean Value of Each Laboratory and Average (except Laboratory No.2)

\bar{x} : Average SD: Standard Deviation
r: Recovery

数は 18.2% と 20% 近かった。ただし、検査機関 No. 2 を除いた場合、室間変動係数は 6.9% にとどまった。

検査機関 No. 2 の測定値を除いた場合の平均値を真の値と仮定して回収率を求め、Table 3 に示すと共に、回収率が 0.9~1.1 となる範囲を Fig. 2 上に示す。検査機関 No. 2 のほかに 1 機関が、この範囲からはずれていた。両者は共に検査方法として、フレームレス法を用いていた。

各機関の測定値を、一元配置の分散分析により解析してみたところ、求められた F 値より、危険率 5 % で、機関によりその測定結果に有意な差がみられた。

検査方法の違いによる測定結果の違いをみるために、検査機関 No. 2 を除き、報告された全測定値について、検査方法ごとに平均値、標準偏差、変動係数、回収率をもとめ、Table 4 に示した。どの方法も、回収率は 0.9~1.1 の範囲内にあり、変動係数も 10% 以内であった。検査方法間の分散の同一性 (F 検定) を調べたところ、どの検査方法も互いに異分散の関係にあった。そこで Welch の方法により、検査方法の違いによる平均値の差の検定を行った。その結果、ICP 法とフレームレス法の間に差はみられなかつたが、ICP 法とフレーム法、フレームレス法とフレーム法の間には有意差（危険率 5 %）がみられ、フレーム法による測定値が有意に高いことがわかった。

Table 4 Differences in Analytical Results of Zinc obtained by the Three Analytical Methods

Method	Number of Data	Average (mg/L)	SD (mg/L)	CV (%)	Recovery
ICP	10	0.0184	0.00097	5.3	0.97
FLAA	15	0.0187	0.00171	9.1	0.99
FAA	10	0.0199	0.00032	1.6	1.05

ICP : Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

FLAA: Flameless Atomic Absorption Spectrometry

FAA : Flame Atomic Absorption Spectrometry

考 察

(1) 鉄

鉄の精度管理結果については、各機関内でのばらつきも各機関間のばらつきも判断基準内であり、比較的精度良い検査が行われたと考えられる。一元配置分散分析の結果、機関による検査結果には有意な差がみられたが、このことは、回収率において、判断基準を越える機関が5機関あることからもうかがえた。特に検査方法としてICP法を用いた場合、フレームレス法や吸光光度法を用いた場合に比べ、その測定値は有意に低い値を示していた。

(2) 亜鉛

亜鉛の精度管理結果については、1機関（検査機関No.2）を除き、各機関内でのばらつきも各機関間のばらつきも判断基準内であり、比較的精度良い検査が行われたと考えられる。一元配置分散分析の結果、機関による検査結果には有意な差がみられたが、亜鉛の場合、検査方法としてICP法やフレームレス法を用いた場合、フレーム法を用いた場合に比べ、その測定値は有意に低い値を示していた。

今回、異常値として棄却された検査機関No.2においては、今後測定方法の検討が必要である。

富山県内水道水中の有機ハロゲン化合物含有量について

健名智子 大戸幹也 松永明信

Contents of Organohalogenated Compounds in Tap Water
in Toyama Prefecture

Tomoko KEMMEI, Mikiya OHTO and
Akinobu MATSUNAGA

水の塩素処理により生成する有機ハロゲン化合物に関して、水道法に基準項目として総トリハロメタンおよび個々の物質としてクロロホルム、ブロモジクロロメタン、ジブロモクロロメタン、ブロモホルムに基準値が設定されている。また、監視項目として抱水クロラール、ジクロロアセトニトリル、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸に指針値が定められている。水道水中には、これらハロアセトニトリル、ハロ酢酸のほかに、原水中の臭素イオンの影響により、含臭素ハロアセトニトリル、含臭素ハロ酢酸が存在することが知られている[1]。我々はこれまで、ジクロロアセトニトリルを含む6種類のハロアセトニトリル類を抱水クロラールと一緒に分析により測定し[2]、また、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸を含む7種類のハロ酢酸類の含有量を調査してきた[3]。今回、これらの方法を用い、富山県内の表流水を水源とする水道水について、トリハロメタン4種、抱水クロラール、ハロアセトニトリル6種、ハロ酢酸7種の含有量調査を行い、個々の有機ハロゲン化合物間の相互関係について解析した。

材料と方法：試料は、富山県内の表流水を水源とする水道水23件で、平成8年8月～9月に水道事業体により採水され、当所に搬入されたものである。

各化合物の測定は、「上水試験方法1993年版」に準じて行ったが、詳細は既報による。

トリハロメタン（クロロホルム、ブロモジクロ

ロメタン、ジブロモクロロメタン、ブロモホルム）については、既報[4]に従って行った。

抱水クロラール、ハロアセトニトリル（クロロアセトニトリル、ジクロロアセトニトリル、トリクロロアセトニトリル、ブロモクロロアセトニトリル、ブロモアセトニトリル、ジブロモアセトニトリル）については既報[2]に従って行った。

ハロ酢酸（クロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、ブロモクロロ酢酸、ブロモ酢酸、ジブロモ酢酸、トリブロモ酢酸）については既報[3]に従って行った。

結果と考察：有機ハロゲン化合物測定結果の一覧をTable 1に示す。トリハロメタンはすべての水道水から検出された。化合物別でみると、濃度はクロロホルム>ブロモジクロロメタン>ジブロモクロロメタンの関係にあった。ブロモホルムは1水道水から検出されたのみであった。ハロ酢酸のうち、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸はすべての水道水から検出されたが、ブロモ酢酸とトリブロモ酢酸は検出されなかった。これは、特にトリブロモ酢酸の場合、検出限界が高いことにもよると思われるが、含臭素化合物の生成には原水中の臭素濃度が関係していると考えられるため[1]、ブロモホルム同様検出されにくいと考えられる。ブロモクロロ酢酸は、低濃度ながら高い検出率を示した。抱水クロラールも低濃度ながらすべての水道水から検出された。トリハロメタン、ハロ酢酸にくらべ、ハロアセトニトリルの含有量は低かつ

Table 1. Summary of Analytical Results of Organohalogenated Compounds

			Limit of Detection		Detected number	Detected %	Max ($\mu\text{g/L}$)	Mean of Detected ($\mu\text{g/L}$)
			($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)				
Trihalomethane	Chloroform	CHCl ₃	1	23	100	24	13.5	
	Bromodichloromethane	CHBrCl ₂	1	23	100	15	9.8	
	Dibromochloromethane	CHBr ₂ Cl	1	18	78.3	8	5.5	
	Bromoform	CHBr ₃	1	1	4.3	1	1.0	
	Total Trihalomethane	T-THM	1	23	100	47	27.7	
Haloacetic acid	Monochloroacetic acid	Cl-AA	1	10	43.5	4	2.1	
	Dichloroacetic acid	Cl ₂ -AA	1	23	100	15	6.8	
	Trichloroacetic acid	Cl ₃ -AA	1	23	100	12	8.2	
	Bromochloroacetic acid	BrCl-AA	1	21	91.3	9	3.8	
	Monobromoacetic acid	Br-AA	2	0	0	0	--	
	Dibromoacetic acid	Br ₂ -AA	2	9	39.1	3	2.4	
	Tribromoacetic acid	Br ₃ -AA	20	0	0	0	--	
	Total Haloacetic acid	T-HAA	1	23	100	40	20.3	
Haloacetonitrile	Monochloroacetonitrile	Cl-AN	1	0	0	0	--	
	Dichloroacetonitrile	Cl ₂ -AN	1	16	69.6	2	1.7	
	Trichloroacetonitrile	Cl ₃ -AN	1	0	0	0	--	
	Bromochloroacetonitrile	BrCl-AN	1	14	60.9	1	1.0	
	Monobromoacetonitrile	Br-AN	3	0	0	0	--	
	Dibromoacetonitrile	Br ₂ -AN	1	0	0	0	--	
	Total Haloacetonitrile	T-HAN	1	16	69.6	3	2.6	
Chloral		Chloral	1	23	100	8	4.3	

Table 2. Correlation Coefficient between Organohalogenated Compounds

	CHCl ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl	Cl-AA	Cl ₂ -AA	BrCl-AA	Cl ₃ -AA	Chloral	T-THM	T-HAA	T-HAN
CHCl ₃	0.829 *** 0.599 ** 0.021			-0.014	0.083			0.822 *** 0.591 **			
CHBrCl ₂		0.906 *** 0.281		0.183	0.451 *			0.779 *** 0.665 ***			
CHBr ₂ Cl			0.274	0.158	0.502 *			0.564 ** 0.434 *			
Cl-AA				0.744 *** 0.674 *** 0.210				0.112			
Cl ₂ -AA					0.820 *** 0.191			0.101			
BrCl-AA						0.330		0.326			
Cl ₃ -AA							0.705 ***				
Chloral								0.634 ** 0.329			0.917 ***
T-THM									0.354		0.650 ***
T-HAA										0.464 *	
T-HAN											

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

た。クロロアセトニトリル、トリクロロアセトニトリル、プロモアセトニトリル、ジプロモアセトニトリルは、どの水道水からも検出されなかった。ジクロロアセトニトリルとプロモクロロアセトニトリルが60~70%の水道水に検出されたが、濃度は1~2 μg/Lと低かった。

次に、個々の有機ハロゲン化合物間の相互関係について検討するため、各化合物をnmol/L単位に換算し、相関係数を算出しTable 2にまとめた。クロロホルム、プロモジクロロメタン、ジプロモクロロメタンのトリハロメタンはお互いに高い相関関係を示していた。また、3化合物とも、トリクロロ酢酸及び抱水クロラールと高い相関関係を示し、これらトリハロ化合物が同一の前駆物質から生成されることが示唆された。これに対し、モノ及びジハロ化合物であるクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、プロモクロロ酢酸の3化合物は、お互いに高い相関関係を示し、トリハロ化合物との相関関係は低かった。ただし、トリハロ化合物の間でも、トリクロロ化合物とモノクロロジプロモ化合物間（クロロホルムとジプロモクロロメタン、抱水クロラールとジプロモクロロメタン）の相関は低い傾向にあり、また、トリハロ化合物とモノ・ジハ

ロ化合物の間でも、プロモ化合物の間（プロモジクロロメタンとプロモクロロ酢酸、ジプロモクロロメタンとプロモクロロ酢酸）の相関は高い傾向にあった。これらのことより、トリハロ化合物とモノ・ジハロ化合物は、それぞれ同一の前駆物質から生成されるが、原水中の臭素の存在により、含臭素化合物が塩素化合物に競合して生成されるという説[1]が支持された。

また、各化合物グループ間では、総トリハロメタン、抱水クロラール、ハロアセトニトリル総量の3者間に相関がみられた。

文 献

1. 日本水道協会 (1993). 上水試験法解説編. p472-487.
2. 大戸幹也, 松永明信 (1995). 富山衛研年報, 18, 158-162.
3. 大戸幹也, 健名智子, 大浦敞, 松永明信 (1996). 富山衛研年報, 19, 211-213.
4. 坂田薰代, 松永明信, 高柳信孝 (1994). 富山衛研年報, 17, 229-233.

成長期における生化学検査値の変動（その1）

—骨代謝指標についての検討—

堀井 裕子 田中朋子 西野治身
熊西忠郎 山上孝司¹ 鏡森定信¹

Changes in Biochemical Indices during the Growth Period (I)
—Analysis on Biochemical Makers of Bone Metabolism—

Yuko HORII, Tomoko TANAKA, Harumi NISHINO,
Tadaro KUMANISHI, Takashi YAMAGAMI¹
and Sadanobu KAGAMIMORI¹

高齢化の進む日本においては寝たきりの原因となる骨粗鬆症が社会的な問題となっている。その予防対策としては加齢に伴う骨量の減少を最小限にすることや、若年期において最大骨量をより高めることが大切である。そのため、我々は若年者について最大骨量の増加に有効な要因を骨代謝指標を用いて解析しているところである。しかし、骨代謝指標は小学生と高校生でそのレベルが異なり、身長の伸びと関連がみられることが我々の調査結果で明らかになっている〔1, 2〕。そこで、今回は10~17歳の男女を対象とし、思春期における骨代謝指標の加齢変化を把握することを目的として解析を行なった。

対象および方法：対象は、富山県内の2小学校（対象A, B）、1中学校（対象C）、1高校（対象D, E）の生徒で、各対象群は2~4回にわたり追跡調査を行なった。調査学年は、対象A一小学校5, 6年生時（10, 11歳）、B一小学校5, 6年生時および中学1, 3年生時（10, 11, 12, 14歳）、C一中学2, 3年生時（13, 14歳）、D一高校2, 3年生時（16, 17歳）、E一高校1, 3年生時（15, 17歳）であり、延べ人数は男子748

名、女子872名である。各年齢における対象人数をTable 1に示した。

測定項目は血清中無機リン（以下 I-P）、骨型アルカリフォスファターゼ（以下 B-AlP）、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（以下 Tr-AcP）、尿中ハイドロキシプロリン（以下 Hyp）である。Hypはクレアチニンで補正した値（Hyp/Cr）を用い、以下の検討では、対数変換値を用いた。なお、I-Pの測定は対象Bの中学3年生時と対象Eの高校3年生時では実施していない。Tr-AcPは対象Eの高校1年生時、対象Dの2年生時では測定できなかったため、15, 16歳のデーターは欠損している。

身長は4月に各学校で測定された値を用いた。

第二次性徴の指標として女子については初潮発来の有無をアンケートで調査した。

結果および考察：Table 2にI-P, B-AlP, Tr-AcP, Hyp/Crの性、年齢別平均値を示した。I-Pについて年齢別にみると、男子の10~13歳の値は5.0mg/dl程度と高く、その後加齢に伴い低下した（13~17歳、N=413, r=-0.625, p<0.001）。女子では10歳は男子と同レベルであったが、その後

1. 富山医科薬科大学保健医学

Table 1. Number of Subjects by Age

School year	Age	Boys					Girls					
		A	B	C	D	E	Total	A	B	C	D	E
Elementary school	5th	10	36	47			83	35	37			72
	6th	11	28	51			79	24	39			63
Junior high school	1st	12		51			51		45			45
	2nd	13			94		94			83		83
	3rd	14		47 ¹⁾	91		138		44 ¹⁾	94		138
Senior high school	1st	15				79 ²⁾	79				109 ²⁾	109
	2nd	16				73 ²⁾	73				127 ²⁾	127
	3rd	17				76	75 ¹⁾	151			126	109 ¹⁾
Total							748					872

1) I-P is not determined for these subjects

2) Tr-AcP is not determined for these subjects

Table 2. Mean Values and Standard Deviations of Biochemical Makers of Bone Metabolism by Age

Age	I-P(mg/dl)			B-AlP(BLU)		
	Boys		Girls	Boys		Girls
	A. M. ± S. D.	A. M. ± S. D.	t-test	A. M. ± S. D.	A. M. ± S. D.	t-test
10	5.1±0.4	5.1±0.5		6.2±1.8	6.3±1.9	
11	5.2±0.4	4.9±0.5	***	7.9±1.9	5.7±2.1	***
12	5.1±0.5	4.6±0.5	***	7.8±1.9	4.8±2.0	***
13	5.0±0.6	4.4±0.5	***	6.2±2.2	2.9±1.1	***
14	4.7±0.6	4.5±0.4	**	5.3±2.1	2.2±0.7	***
15	4.0±0.5	3.9±0.4		3.8±1.7	1.8±0.6	***
16	4.0±0.5	3.9±0.4		3.6±1.3	1.7±0.4	***
17	3.7±0.5	3.9±0.5	*	2.5±0.9	1.4±0.4	***

Age	Tr-AcP(BLU)			Hyp/Cr(mg/gCr)		
	Boys		Girls	Boys		Girls
	A. M. ± S. D.	A. M. ± S. D.	t-test	G. M. (G. S. D.)	G. M. (G. S. D.)	t-test
10	0.91±0.17	0.87±0.20		230.1(1.28)	240.4(1.46)	
11	0.86±0.15	0.65±0.19	***	257.0(1.31)	189.7(1.49)	***
12	0.94±0.16	0.68±0.19	***	231.2(1.29)	143.5(1.52)	***
13	0.83±0.22	0.51±0.14	***	167.9(1.51)	85.9(1.58)	***
14	0.73±0.20	0.47±0.10	***	120.5(1.58)	67.9(1.38)	***
15	—	—	—	80.5(1.64)	53.0(1.36)	***
16	—	—	—	70.6(1.55)	43.6(1.42)	***
17	0.48±0.11	0.37±0.07	***	54.7(1.46)	42.7(1.43)	***

A. M.:Arithmetic mean, S. D.:Standard deviation

G. M.:Geometric mean, G. S. D.:Geometric standard deviation

*, **, ***:Significantly different from the boys
at p<0.05, p<0.01, p<0.001, respectively

年齢と共に低くなる傾向を示し($N=719$, $r=-0.646$, $p<0.001$)、男子より早期に低下していた。性差は11~14歳で男子が高く、15歳以後は差がなくなった。

B-AlPについては、男子では10歳(6.2BLU)から11歳にかけて上昇し、11歳で最高値(7.9BLU)となった後、加齢と共に低下した(11~17歳, $N=665$, $r=-0.733$, $p<0.001$)。女子では10歳(6.3BLU)が最高値でその後年齢と共に低下していた($N=872$, $r=-0.795$, $p<0.001$)。

Tr-AcPでは男子は10~12歳はほぼ同レベル(0.86~0.94BLUの範囲)で高い値を示し、12歳以降加齢で低下する傾向を示した(12~17歳, $N=434$, $r=-0.687$, $p<0.001$)。女子はB-AlP同様、10歳の0.87BLUが最高値でその後加齢で低下した($N=636$, $r=-0.735$, $p<0.001$)。

Hyp/Crについても男子ではB-AlP同様11歳が最高値(257.0mg/gCr)で、その後年齢と共に低下し(11~17歳, $N=665$, $r=-0.799$, $p<0.001$)、女子では10歳(240.4mg/gCr)を最高として以後加齢で低下していた($N=872$, $r=-0.825$, $p<0.001$)。性差についてみるとB-AlP, Tr-AcP, Hyp/Crともに10歳では差がみられなかったが、11~17歳では男子が女子より有意に高値であった。

若年者の骨代謝指標の値を女子大生(18歳)について我々が行なった調査結果(B-AlP: 1.2BLU, Tr-AcP: 0.29BLU, Hyp/Cr: 29.5mg/gCr) [3]と比べると、10歳女子の値はB-AlPで約5倍、Tr-AcP約3倍、Hyp/Cr約8倍でかなり高かった。さらに、17歳女子の平均値でも女子大生より高い数値を示し、今後さらに低下するものと思われる。

Table 3. Mean Values and Standard Deviations of Increase of Height by Age

Age	N	Increase of height ¹⁾ (cm/year)		t-test
		Boys	Girls	
9	81	5.4±1.4	6.6±1.5	***
10	78	6.1±1.6	6.6±1.5	***
11	46	7.8±2.2	5.4±2.4	***
12	93	7.8±2.4	3.0±1.7	***
13	129	5.8±3.1	1.3±1.2	***
14				—
15	73	2.1±1.5	0.7±0.7	***
16	75	0.8±1.0	0.3±0.6	***

A.M.:Arithmetic mean, S.D.:Standard deviation

***:Significantly different from the boys at $p<0.001$

1):Increase of height after a year

Table 4. Correlation Coefficients between Biochemical Makers of Bone Metabolism and Increase of Height

	N	Increase of height ¹⁾		Girls
		Boys	N	
I-P	332	0.623***	360	0.720***
B-AlP	332	0.679***	360	0.856***
Tr-AcP	259	0.474***	234	0.758***
Hyp/Cr	332	0.793***	360	0.852***

1):Increase of height after a year

*** $p<0.001$

Table 3 に一年間の身長の伸びを示した。身長の伸びは男子では11および12歳からの一年間の伸びが7.8cmで最大値となり、女子では9, 10歳からの一年間の伸び(6.6cm)が最大であった。身長の伸びは9歳からの一年間は女子が男子より大きい値を示した。その後の年齢では男子が大きかった。

骨代謝指標と指標測定時の後の一年間の身長伸びとの関連を検討したところ(Table 4), 各骨代謝指標と身長の伸びとの間には男女共に有意な正の相関がみられた(全て $p<0.001$)。

I-P は骨の構成成分であるため、骨代謝を反映すると考えられる。また、B-AIP は骨形成の、Tr-AcP, Hyp/Cr は骨吸収の指標になるといわれている[4]。今回の対象者は思春期に相当し、身長や体重増加が著しく、それに伴った骨の形成(骨モデリング)が盛んな時期である。そこで若年者について骨代謝指標と成長との関連を検討した結果、骨代謝指標の年齢別変化は身長の伸びの変化と同様な動きを示し、骨代謝指標が最高値を示した年齢(男子: 10~12歳, 女子: 10歳)と身長の伸びが最大となった年齢は(男子: 11~13歳, 女子: 9~11歳)ほぼ一致した。また、骨代謝指標は身長の伸びと有意な正の相関を示し、骨代謝指標の性差や年齢による変化は成長量の違いによ

るものと考えられる。米山等は小学生について尿中 Hyp/Cr は、測定したその後の身長増加量と関連があり成長の予測指標になると報告している[5]。今回の結果でも、男子については骨代謝指標は身長の伸びが最大になる年齢より前に最高になっており、尿中 Hyp/Cr 以外の指標も成長の予測指標になると考えられた。女子については調査開始時の骨代謝指標および身長の伸びが一番大きくなっていたため、最大時期をすぎている可能性があり、より早期の年齢を調査する必要があるだろう。

次に第二次性徴と骨代謝指標との関連を検討するため、11~13歳の女子について初潮発来の有無別で骨代謝指標を比較した(Table 5)。その結果、初潮有りは無しに比べていずれの年齢、項目においても低値を示した。骨代謝指標と関連がみられた身長の伸びについても検討した結果、やはり初潮有りで伸びが小さかった(Table 6)。

第二次性徴との関連では、女子では初潮発来後に骨代謝指標値や身長の伸びが低下しており、加齢による指標の低下は第二次性徴の影響も受けていると考えられた。

今後は若年者の骨量増加と第二次性徴との関係や骨代謝に影響する生活要因について検討する予定である。

Table 5. Mean Values and Standard Deviations of Biochemical Makers of Bone Metabolism in Relation to Menstrual Status

Age	N	IP(mg/dl)	B-AIP(BLU)	Tr-AcP(BLU)	Hyp/Cr(mg/gCr)
		A. M. \pm S. D.	A. M. \pm S. D.	A. M. \pm S. D.	G. M. (G. S. D.)
11	before menarche	31	5.2 \pm 0.5***	6.7 \pm 2.0***	0.75 \pm 0.16***
	after menarche	29	4.7 \pm 0.5***	4.6 \pm 1.6***	0.53 \pm 0.15***
12	before menarche	10	5.0 \pm 0.3***	6.9 \pm 1.8***	0.89 \pm 0.17***
	after menarche	33	4.4 \pm 0.4***	4.1 \pm 1.6***	0.61 \pm 0.15***
13	before menarche	5	5.1 \pm 0.4***	4.5 \pm 1.0***	0.78 \pm 0.27
	after menarche	77	4.3 \pm 0.4***	2.8 \pm 1.0***	0.50 \pm 0.11

A.M.:Arithmetic mean, S. D.:Standard deviation

G.M.:Geometric mean, G.S.D.:Geometric standard deviation

*** $p<0.001$

Table 6. Mean Values and Standard Deviations of Increase
of Height in Relation to Menstrual Status

Age	Increase of height ¹⁾ (cm/year)		
	N	A.M.	S.D.
11	before menarche	17	6.8±1.7
	after menarche	21	3.9±2.0 ***
12	before menarche	10	5.6±1.2 ***
	after menarche	32	2.1±1.1 ***
13	before menarche	5	2.0±1.5
	after menarche	76	1.2±1.1

A. M. :Arithmetic mean, S. D. :Standard deviation

*** p<0.001

1):Increase of height after one year

文 献

1. 堀井裕子, 西野治身, 田中朋子, 林 徹雄, 山上孝司, 成瀬優知, 鏡森定信 (1993). 富山衛研年報, 16, 152-155.
2. 堀井裕子, 田中朋子, 西野治身, 山上孝司, 成瀬優知, 鏡森定信 (1995). 富山衛研年報, 18, 177-

180.

3. 堀井裕子, 中崎美峰子, 田中朋子, 西野治身, 熊西忠郎, 小嶋康夫, 桑守豊美 (1996). 富山衛研年報, 19, 220-223.
4. 小原範之 (1993). 臨床検査, 37(4), 393-399.
5. 米山京子 (1977). 日本公衆衛生学雑誌, 7, 417-421.

成長期における生化学検査値の変動（その2） —血清脂質、酵素、非タンパク窒素化合物についての検討—

堀井 裕子 田中 朋子 西野 治身
熊西 忠郎 山上 孝司¹ 鏡森 定信¹

Changes in Biochemical Indices during the Growth Period (II)
—Analysis on Serum Lipids, Enzymes and Non-protein Nitrogen—

Yuko HORII, Tomoko TANAKA, Harumi NISHINO,
Tadaro KUMANISHI, Takashi YAMAGAMI¹
and Sadanobu KAGAMIMORI¹

近年、若年者において運動不足や栄養過剰摂取による肥満や高脂血症の増加が指摘され、成人病予防検診として血中脂質の測定等が実施されている。しかし、若年者は成長期にあることや第二次性徴を迎えるなど生体の変化が著しいため、生化学検査値を評価する場合には、発育に伴う変動を把握しておくことが重要である。

そこで我々は、小学校5年生から高校3年生の男女について血清中総コレステロール（以下TChol）、HDLコレステロール（以下HDLChol）に加え血清酵素（GOT, GPT）および非タンパク窒素化合物である尿素窒素（以下BUN）、クレアチニン（以下Cr）、尿酸（以下UA）を測定し、加齢による検査値の変化について調査した。

対象および方法：対象は、男子797名、女子927名で詳細は前報に示した[1]。各年齢における対象人数をTable 1に示した。

測定項目はTChol, HDLChol, GOT, GPT, BUN, Cr, UAである。

結果および考察：①TChol, HDLCholについて：Table 2にTChol, HDLCholの性、年齢別平均

値を示した。年齢変化をみると、TCholは男女共に10歳で最高値（男子182mg/dl、女子188mg/dl）を示した後、12歳で最低値になり、その後上昇に転じた。HDLCholは男女共10歳（男子65mg/dl、女子63mg/dl）から下降し、男子は13, 14歳、女子は12歳で最低値となり、以後上昇傾向を示した。性差は、TChol, HDLChol共に14歳以降で女子が高い値を示した。TCholが中学生で最低値となるという報告が多い[2, 3]。この低下は、中学生は成長が著しく、体成分の急激な増加に伴ってコレステロールの需要が増大したためと考えられており、今回の調査でも同様な結果が得られた。一方、この時期は第二次性徴を迎える時期であり、その影響を女子について検討した(Table 3)。11～13歳の女子を初潮発来の有無別で分け、そのTChol, HDLCholを比較したところ、11才では初潮有りのものは無しに比べてTChol, HDLCholが有意に低値であった。松崎等は初潮が発來した直後に血清コレステロールが最低となる場合が多いと報告しており[2]、我々の結果でも初潮後は低くなった。このことから、12歳の女子でTChol, HDLCholが最低値を示したのは体が急激に成長するためだけではなく、第

1. 富山医科大学保健医学

Table 1. Number of Subjects by Age

School year	Age	Boys					Total	Girls					Total
		A	B	C	D	E		A	B	C	D	E	
Elementary school	5th	10	37	54			91	35	40				75
	6th	11	34	57			91	29	42				71
Junior high school	1st	12		52			52		46				46
	2nd	13			95		95			91			91
	3rd	14		48	108		156		44	102			146
Senior high school	1st	15				79	79				114		114
	2nd	16				73	73				132		132
	3rd	17				78	81	159			139	113	252
Total							796						927

Table 2. Mean Values and Standard Deviations of TChol and HDLChol by Age

Age	TChol(mg/dl)			HDLChol(mg/dl)		
	Boys Mean±S.D.	Girls Mean±S.D.	t-test	Boys Mean±S.D.	Girls Mean±S.D.	t-test
10	182±26.0	188±32.3		65±16.3	63±14.4	
11	174±28.9	182±27.6		61±17.6	58±12.4	
12	151±23.9	156±22.3		54±12.9	52± 9.3	
13	158±25.9	164±22.5		52±11.2	55± 9.7	
14	157±25.9	168±24.9	***	52±11.0	56±10.4	***
15	164±28.2	168±29.6		55± 8.3	59±10.2	*
16	168±26.8	185±32.0	***	58±11.0	61±10.0	
17	162±28.5	176±31.8	***	59±10.4	64±12.1	***

S. D.:Standard deviation

*, ***:Significantly different from the boys
at p<0.05, p<0.001, respectively

Table 3. Mean Values and Standard Deviations of TChol and HDLChol in Relation to Menstrual Status

Age	N	TChol(mg/dl)		HDLChol(mg/dl)	
		Mean±S.D.	Mean±S.D.	Mean±S.D.	Mean±S.D.
11	before menarche	36	189±32.0	62±12.2	* 55±11.9
	after menarche	31	175±20.7		*
12	before menarche	11	160±14.9	56± 5.9	
	after menarche	33	154±22.9	51±10.2	
13	before menarche	5	170±26.1	58± 5.2	
	after menarche	83	162±20.5	55±10.0	

S. D.:Standard deviation

* p<0.05

二次性微の影響も受けていると思われる。

② GOT, GPTについて：性、年齢別で GOT, GPT の平均値を Table 4 に示す。年齢別では、GOT は男女共に12歳が前後の年齢より低値を示した（対象 B-11, 12, 13歳間の比較、対象 A-11歳と B-12歳の比較、対象 B-12歳と C-13歳の比較：全て $P<0.001$ ）ものの、年齢による明らかな傾向は認められなかった。GPTについても年齢で違いはみられなかった。性差は GOT, GPT 共

に全ての年齢で男子が女子より高値であった。GOT, GPT は新生児期および乳幼児期では高く、学童期以降はほぼ一定になると報告されており [4]、我々の調査でも年齢による変化はみられなかった。

③ BUN, Crについて：Table 5 に年齢別で BUN, Cr の平均値を示す。BUN は年齢による違いは男女共になく、ほぼ全年齢で男子が女子より高かった。Cr は年齢と共に高くなる傾向を示

Table 4. Mean Values and Standard Deviations of GOT and GPT by Age

Age	GOT(U/l)			GPT(U/l)		
	Boys Mean±S.D.	Girls Mean±S.D.	t-test	Boys Mean±S.D.	Girls Mean±S.D.	t-test
10	34± 6.2	29± 4.8	***	22±11.5	17± 5.2	***
11	34±12.6	28± 4.9	***	24±22.5	17± 5.5	*
12	18± 8.9	15± 4.3	*	26± 4.4	23± 3.6	**
13	27± 5.8	22± 4.3	***	18± 8.9	13± 3.3	***
14	27± 8.2	23± 3.8	***	20±15.6	15± 4.8	***
15	30± 9.8	24± 7.3	***	23±10.0	17±10.8	***
16	28± 8.1	21± 5.8	***	20±13.1	13± 8.9	***
17	30± 9.2	24± 6.8	***	28±16.5	21±10.3	***

S. D. : Standard deviation

*, **, ***: Significantly different from the boys
at $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, respectively

Table 5. Mean Values and Standard Deviations of BUN and Cr by Age

Age	BUN(mg/dl)			Cr(mg/dl)		
	Boys Mean±S.D.	Girls Mean±S.D.	t-test	Boys Mean±S.D.	Girls Mean±S.D.	t-test
10	15.3±2.9	14.1±3.1	**	0.88±0.11	0.85±0.11	
11	15.0±3.1	13.2±2.8	***	0.94±0.11	0.91±0.10	
12	13.1±3.0	12.1±2.7		0.97±0.09	0.94±0.09	
13	13.6±3.2	12.2±2.8	**	1.07±0.11	1.00±0.10	***
14	14.6±3.2	14.1±3.6		1.15±0.14	1.03±0.14	***
15	15.2±3.5	13.1±3.7	***	1.20±0.12	1.06±0.11	***
16	15.4±3.7	13.4±3.6	***	1.21±0.11	1.04±0.10	***
17	14.9±3.8	13.7±3.7	***	1.17±0.11	1.01±0.10	***

S. D. : Standard deviation

, *: Significantly different from the boys
at $p<0.01$, $p<0.001$, respectively

し（年齢との相関係数：男子 $r=0.647$ ，女子 $r=0.388$ ，共に $p<0.001$ ），男子では16歳（ 1.21mg/dl ），女子では15歳（ 1.06mg/dl ）が最高値であった。性差は13歳以後男子が高値であった。Crはクレアチニンの終末代謝産物であり、クレアチニンはその大半が筋肉に分布するため、Crの産生量は筋肉量に比例するといわれている[5]。このことから加齢によるCrの上昇はこの時期の成長に伴う体の筋肉量の増加を、また性差は男子と女子の筋肉量の違いを反映したものと考えられる。

④UAについて：Table 6に年齢別UAの平均値

Table 6. Mean Values and Standard Deviations of UA by Age

Age	UA(mg/dl)		t-test
	Boys	Girls	
10	3.9 ± 0.81	4.2 ± 0.78	*
11	4.6 ± 0.92	4.5 ± 0.83	
12	5.0 ± 1.04	4.2 ± 0.66	***
13	5.7 ± 1.18	4.4 ± 0.71	***
14	5.8 ± 0.96	4.4 ± 0.75	***
15	6.1 ± 1.20	4.5 ± 0.84	***
16	6.3 ± 1.16	4.4 ± 0.79	***
17	5.7 ± 1.21	4.3 ± 0.82	***

S.D.:Standard deviation

*,***:Significantly different from the boys at $p<0.05$, $p<0.001$, respectively

を示す。UAは男子では加齢で16歳まで上昇傾向を示し（10~16歳 $r=0.590$, $N=637$, $p<0.001$ ），17歳は低下した（対象 D-16, 17歳間の比較： $p<0.001$ ，対象 D-16歳と E-17歳の比較： $p<0.01$ ）。女子は年齢による変化はみられなかった。性差は全年齢で男子が女子より高値を示した。尿酸はアンドロゲン分泌と関係するといわれており[3]，思春期の男子で高くなったのは第二次性徴の影響と考えられた。

以上の結果より，TChol, HDLChol, Crは男女共に発育に伴う値の変化が大きく，さらに男子ではUAにも変動がみられ，成長期においてこれらの値を評価する場合には注意が必要である。

文 献

1. 堀井裕子，田中朋子，西野治身，熊西忠郎，山上孝司，鏡森定信（1997）。富山衛研年報，20，212–216。
2. 松崎俊久（1993）。厚生省心身障害研究「小児期からの成人病予防に関する研究班」平成4年度研究報告書。315–322
3. 矢野敦雄，上島弘嗣，飯田恭子，松崎俊久，児島三郎，田中平三，磯村孝二，小澤秀樹，飯田 稔，高橋 弘，嶋本 喬，小町喜男（1986）。日本公衆衛生学雑誌，33(9)，547–558。
4. 船渡忠夫，斎藤正行（1989）。日本臨床増刊号，47，19–26。
5. 吉村 学，高橋伯夫，西村眞人（1989）。日本臨床増刊号，47，402–406。

健康成人における尿中アルミニウム濃度について

新村哲夫 中崎美峰子 西野治身 熊西忠郎
中川秀昭¹ 成瀬優知² 鏡森定信³

Urinary Aluminum Concentrations in Healthy Adults

Tetsuo SHIMMURA, Mineko NAKAZAKI, Harumi
NISHINO, Tadaro KUMANISHI, Hideaki NAKAGAWA¹,
Yuchi NARUSE², and Sadanobu KAGAMIMORI³

アルミニウム(Al)による環境汚染が憂慮されるようになってきたのは、Alがアルツハイマー病の原因物質として疑われてきて以来である[1]。これまで我々は、Alの汚染指標として血清および尿中Al濃度の簡易測定法を検討し、成人男性について、血清Al濃度および尿中Al排泄量を測定した[2,3]。今回は、健康成人の尿中Al濃度の正常レベルを明らかにすることを目的に、本県と他県の成人男女について尿中Alの測定を行ったので報告する。

対象と方法：調査の対象は、県内のサッシ工場の従業員で20~59歳の男女313名と、神奈川県内の1事業所の男女95名である。アルミニウム取扱作業者は含まれていない。

測定を行った試料は、県内の工場従業員は勤務時間中から翌日までの24時間蓄えた尿(24時間尿)であり、神奈川県内の事業所職員については午前中の健康診断時に採取したスポット尿である。いずれも、測定時まで凍結保存した。

尿中Al濃度の測定方法は、前報のとおりである[2]。スポット尿は、クレアチニン(Cr)濃度を測定し、AlのCr補正值を求めた。24時間尿については排泄量を求めた。

結果および考察：Table 1は、富山県の対象者について、尿中Al濃度、Cr補正值および排泄量の結果を男女別、年齢階層別に表したものである。

富山の男性全体の尿中Al濃度の幾何平均値は、 $5.8 \mu\text{g/l}$ (1S.D.範囲、1.8~19.1 $\mu\text{g/l}$)、女性 $6.9 \mu\text{g/l}$ (1S.D.範囲、2.4~20.0 $\mu\text{g/l}$)であり、1日排泄量は、男性 $7.8 \mu\text{g/day}$ (1S.D.範囲、2.2~28.1 $\mu\text{g/day}$)、女性 $8.1 \mu\text{g/day}$ (1S.D.範囲、2.6~25.1 $\mu\text{g/day}$)であり、いずれも男女差はみられなかった。Cr補正值は、男性 $5.0 \mu\text{g/gCr}$ (1S.D.範囲、1.4~18.0 $\mu\text{g/gCr}$)、女性 $8.0 \mu\text{g/gCr}$ (1S.D.範囲、2.6~25.1 $\mu\text{g/gCr}$)であり、女性が男性に比べて有意に高値を示した。年齢階層別みると、男性では尿中Al濃度、Cr補正值および排泄量のいずれも年齢による有意な差はみられなかつたが、女性ではCr補正值および排泄量が50歳代で20~40歳代に比べて高い傾向を示した。男女の比較では、40~50歳代の女性のCr補正值が同年代の男性に比べて有意に高値を示した。Cr補正值でみられた年齢や男女による違いは、尿中Al濃度および排泄量では差がみられないことから、尿中Cr濃度の違いによることが考えられた。

Table 2は、神奈川県の対象者の結果を表した

1. 金沢医科大学公衆衛生学教室

2. 富山医科大学地域看護学教室

3. 富山医科大学保健医学教室

Table 1. Urinary and Creatinine-adjusted Concentrations of Alminum and Its Urinary Excretion in Workers at A Factory in Toyama Prefecture.

Sex	Age	No.	Urinary conc. ($\mu\text{g}/\text{l}$)		Cr-adjusted conc. ($\mu\text{g/gCr}$)		Urinary excretion ($\mu\text{g/day}$)	
			G. M.	G. S. D.	G. M.	G. S. D.	G. M.	G. S. D.
Male	20 - 29	37	6.8	3.1	4.4	3.3	7.6	3.4
	30 - 39	41	5.9	3.2	5.3	3.5	8.7	3.5
	40 - 49	38	4.2	3.1	3.8	3.4	5.6	3.4
	50 - 59	41	6.7	3.6	6.6	3.7	9.5	3.7
Total		157	5.8	3.3	5.0	3.6	7.8	3.6
Female	20 - 29	35	7.6	2.8	6.7	3.0	7.2	3.0
	30 - 39	39	6.3	2.8	6.5	3.0	7.1	3.0
	40 - 49	36	6.0	3.2	7.5	3.2*	7.7	3.1
	50 - 59	40	8.2	2.7	12.0	2.7*	10.7	2.9
Total		156	6.9	2.9	8.0	3.1***	8.1	3.1

No., number of subjects; G. M., geometric mean.

G. S. D., geometric standard deviation.

*, ***, significant difference ($p<0.05$ and $p<0.001$, respectively) compared with the same age of male.

Table 2. Urinary and Creatinine-adjusted Concentrations of Alminum in Workers in Kanagawa Prefecture.

Sex	Age	No.	Urinary conc. ($\mu\text{g}/\text{l}$)		Cr-adjusted conc. ($\mu\text{g/gCr}$)	
			G. M.	G. S. D.	G. M.	G. S. D.
Male	20 - 29	17	4.2	2.3	3.6	2.3
	30 - 39	18	6.3	2.5	5.1	1.4**
	40 - 49	20	6.1	2.3	7.3	1.9
	50 - 59	4	7.6	2.3	11.3	1.3
Total		59	5.6	2.4	5.5	2.3
Female	20 - 29	19	7.4	1.9*	8.2	1.7*
	30 - 39	6	8.1	1.5	8.3	1.8
	40 - 49	3	9.0	3.6	13.4	1.7
	50 - 59	8	8.6	2.0	9.1	2.0
Total		36	7.9	2.0	8.0	3.1**

No., number of subjects; G. M., geometric mean.

G. S. D., geometric standard deviation.

*, **, significant difference ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) compared with the same age of male.

, *, significant difference ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively) between the different age groups.

もので、男女別、年齢階層別の尿中 Al 濃度および Cr 補正値を示した。

神奈川の男性全体の尿中 Al 濃度は、 $5.6 \mu\text{g/l}$ （幾何平均値、1S.D.範囲、 $2.3 \sim 13.4 \mu\text{g/l}$ ）、女性 $7.9 \mu\text{g/l}$ （1S.D.範囲、 $4.0 \sim 15.8 \mu\text{g/l}$ ）であり、20歳代男性が低い傾向を示したが、全体では男女間に有意の差はみられなかった。Cr 補正値は、男性 $5.5 \mu\text{g/gCr}$ （1S.D.範囲、 $2.4 \sim 12.7 \mu\text{g/gCr}$ ）、女性 $8.8 \mu\text{g/gCr}$ （1S.D.範囲、 $4.9 \sim 15.8 \mu\text{g/gCr}$ ）であり、女性が男性に比べて有意に高値を示した。年齢階層別にみると、男性では Cr 補正値が40～50歳代で20歳代に比べて高い傾向を示した。女性では、年齢別の対象者数が異なる（40～50歳代が少ない）ためか、尿中 Al 濃度および Cr 補正値のいずれも年齢による有意な差はみられなかった。

今回の検体は、富山のものが24時間尿、神奈川のものがスポット尿であるため比較は難しいが、富山のサンプルを用いた検討では、尿中 Al 排泄量と尿中濃度および Cr 補正値との間には、良好な正の相関がみられ（濃度と排泄量： $r=0.947$ 、補正値と排泄量： $r=0.972$ 、いずれも $p<0.001$ ）、尿中濃度や Cr 補正値によって充分に尿中の排泄量が推測できるものと考えられた。このことを参考に、尿中 Al 濃度および Cr 補正値の比較を行った。その結果、尿中 Al 濃度および Cr 補正値は、男女とも富山と神奈川の間に有意の差はみられず、濃度レベルに違いはないものと考えられた。

これまでに報告されている尿中 Al 濃度レベルの文献値の多くは $5 \sim 20 \mu\text{g/l}$ であり [1]、今回の富山および神奈川の結果も上述の範囲内にあつた。一方、多数の女性のスポット尿を測定した内田らは、幾何平均値 $24.3 \mu\text{g/l}$ （1S.D.範囲、 $8.6 \sim 69.0 \mu\text{g/l}$ ）を報告し、理由は明らかにされていないが地域によって違いがみられたと述べている [4]。今回の富山と神奈川の女性の幾何平均値は $6.9 \mu\text{g/l}$ と $7.9 \mu\text{g/l}$ であり、いずれも内田らに比べ低い値を示した。また、2 地域間の尿中 Al 濃度レベルに違いはみられなかった。24時間尿の排泄量についての報告は少ないが、渡辺ら [5] は、内田らと同じ測定法を用い、男性 $26.0 \mu\text{g/day}$ 、女性 $26.9 \mu\text{g/day}$ （1S.D.範囲、男性 $13.1 \sim 51.7$

$\mu\text{g/day}$ 、女性 $12.2 \sim 59.4 \mu\text{g/day}$ ）と報告している。今回の富山における尿中 Al 排泄量は、男性 $7.8 \mu\text{g/day}$ 、女性 $8.1 \mu\text{g/day}$ であり、渡辺らに比べて低値を示した。性差については、渡辺らと同様に認められなかった。内田らや渡辺らの数值は、我々に比べて高い値であり、その異なる理由については明らかではないが、さらに多くの地域の対象者について検討を行うとともに、前処理法を含めた測定法について検討を加える必要があるものと考えられた。

今回の検討で50歳代、特に女性で尿中 Al 排泄量が高い傾向がみられており、アルツハイマー病の発症年齢に相当する高齢者における尿中 Al 濃度の検討を行う必要があるものと考えられる。また、Al を多く含む食品 [6, 7] の摂取頻度や、最近報告された歯磨剤中に水酸化 Al が使用されている例など [8]、尿中 Al 濃度に影響を与えると考えられる因子について検討を加えて行きたい。

謝辞：検体の提供をいただいた株式会社シノテスト相模原事業所の従業員の皆さん、ならびに検体採取の労をお取りいただいた同社常務取締役野口保彦氏、同社研究開発部芳村一氏、同社研究員佐藤誠氏に深く感謝いたします。

文 献

1. 紀平為子 (1993). 治療, 75, 943-950.
2. 新村哲夫, 中崎美峰子 (1995). 富山衛研年報, 18, 235-238.
3. 新村哲夫, 中崎美峰子, 西野治身, 熊西忠郎, 中川秀昭, 成瀬優知, 鏡森定信 (1996). 富山衛研年報, 19, 224-226.
4. 渡辺孝男, 岩見億丈, 内田陽子, 池田正之 (1992). 日衛誌, 47, 292.
5. 内田陽子, 岩見億丈, 渡辺孝男, 池田正之 (1992). 日衛誌, 47, 291.
6. 松島文子, 飯塚舜介, 能勢隆之 (1993). 日衛誌, 48, 864-872.

7. 松島文子, 飯塚舜介, 能勢隆之 (1997). 日衛誌,
51, 763-769.

8. 高柳篤史, 野村登志夫, 山中すみえ, 太田 薫,
高江洲義 (1997). 日衛誌, 52, 92.