富山県

富山県衛生研究所年報　（平成十九年度）　第三十一号

ISSN 0917-0707

富山県衛生研究所年報

（平成19年度）

第３１号

ANNUAL REPORT
OF
TOYAMA INSTITUTE OF HEALTH

（APRIL 2007～MARCH 2008）

NO. 31

2008

富山衛研年報

Annu. Rep. Toyama Inst. Hlth.

富 山 県 衛 生 研 究 所

富山県衛生研究所年報

（平成19年度）

第３１号

富 山 県 衛 生 研 究 所

は　じ　め　に

平成18年12月に改正された「感染症の予防と感染症の患者に対する医療に関する法律」は，19年6月1日に施行された．予想されたとおり，病原体管理の一環として，輸送の問題は大きな障壁となってしまった．つまり，ウランを運搬するが如き輸送規制をつくってしまったため，対象病原体の輸送がほぼ完全に止まってしまった．これは輸送費用と許可をとる手続き，実際の輸送体制と連絡等，従来とは全く異なった次元に入ってしまったことが大問題である．対象病原体1個の輸送費用（例えば富山→東京）は，従来の富山衛研の1年分以上を要するわけで，新たな対応が必要である．施設における管理強化策として，テロ防止の観点からセキュリティ強化の方策が，予算はきわめて乏しいが，ひとつひとつとられているところである．

細菌関係では，3類の腸管出血性大腸菌感染症は40件83名と多い．集団発生事例は15件で，9件は家族内感染例であった．また，海外旅行による赤痢の集団発生（1件6名）がみられている．ウイルス関係では，ノロウイルス（178名）は相変わらず発生が続いている．一方2008年にはいり，農薬成分の混入した中国産冷凍餃子事件，食品表示偽装など，国民の食の安全性に対する信頼を大きく揺るがす事象が次々と発生した．化学部においても，苦情のあった食品について検査がなされたが，幸い農薬成分等は検出されていない．

この3年，パンデミック（インフルエンザ）が危惧されている折から定期サーベイランスが行われていない夏にも網をはり，実験室でのインフルエンザサーベイランスを実施したが，通常（シーゾナル）と異なった型のインフルエンザウイルスは検出されなかった．今後，パンデミックは冬におきるとは限らないので，年間を通して対応検査体制を構築していく予定である．

なお，2007年4月1日付けで，前多隆志が松澤次長の後をうけて，厚生部くすり政策課長から着任した．また，齊藤化学部長の後任には主幹研究員の高柳信孝が就任した．がん研究部副主幹研究員本田幸子は再任用され，継続して研究を行っている．2008年3月31日付けで，がん研究部副主幹研究員林美貴子は定年により退職した．

平成20年12月

富山県衛生研究所長

倉　田　　毅

目　　次

1．運　　営

2．調査研究報告

3．資　料

４．業　　績

Reports

Notes

1　運　　営

(1)　沿　　革

昭和35年 4月 1日	職員9名の構成で発足.
昭和36年 4月 1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により，課・係制が設けられ職員17名に拡充強化（庶務係，細菌課，ウイルス血清課，食品衛生課，生活環境課).
昭和37年11月30日	旧研究所の増築.
昭和38年 4月 1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により，所長代理制が設けられ，また，課名の一部（庶務係を庶務課に，ウイルス血清課をウイルス病理課）を変更.
昭和39年10月 1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により，公害調査課を新設.
昭和44年 4月 1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により，従来の課制を廃止し，部制を設置し，部に主任研究員を配置（病理生化学部，微生物部，食品科学部，公害調査部).
昭和46年 4月15日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により，公害調査部所管の業務が公害センターに移管され，また，各部の名称を変更（病理部，ウイルス部，細菌部，　化学部，　環境保健部).
昭和55年12月20日	研究所新庁舎小杉町中太閤山で建設着工.
昭和57年 6月10日	小杉町中太閤山に新庁舎完成.
平成元年 4月 1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により，病理部をがん研究部に名称を変更.
平成 4年 4月 1日	富山県行政組織規則の一部を改正する規則の施行により，庶務課を総務課に名称を変更.
平成12年 7月 1日	衛生研究所内に富山県感染症情報センターを設置.
平成14年 9月 4日	文部科学省から科学研究費補助金取扱規定第2条第4号の研究機関に指定.
平成15年 5月28日	富山県衛生研究所倫理審査委員会，富山県衛生研究所研究評価委員会を設置.

(2) 施 設 の 概 要

建　　物	構　　造	延　面　積(㎡)
研　究　棟	鉄筋コンクリート造３階（１部４階）建	3,044.59
動物飼育棟	〃　　平屋建	241.76
車　庫	鉄骨造平屋建	34.56
薬　品　庫	コンクリートブロック造平屋建	20.60
ボンベ庫	〃	17.54
ＲＩ排水庫	〃	26.65
排水処理庫	〃	13.57
渡り廊下	鉄骨建	40.50
機　械　室	鉄骨造平屋建	39.24
合　計		3,479.01

(3) 組 織 及 び 業 務

（平成20年5月1日）

所長１名　次長１名

- 総務課　5名(兼務5)
  - １．人事，公印，文書物品，予算経理，出納その他の会計並びに庁舎の管理に関すること．
  - ２．他の主掌に属しないこと．
- がん研究部　6名
  - １．がん予防のための調査研究に関すること．
  - ２．先天性代謝異常及び染色体異常の調査研究に関すること．
  - ３．衛生動物の調査研究に関すること．
- ウイルス部　6名
  - １．ウイルスその他病原微生物の調査研究及び指導に関すること．
  - ２．ウイルスによる疾病の予防に関すること．
  - ３．富山県感染症情報センターに関すること．
- 細菌部　6名
  - １．細菌の調査研究に関すること．
  - ２．感染症及び食中毒等の予防に関すること．
  - ３．富山県感染症情報センターに関すること．
- 化学部　7名
  - １．食品，添加物，容器包装等の調査研究に関すること．
  - ２．食品衛生法による製品検査に関すること．
  - ３．有害物質を含有する家庭用品の調査研究に関すること．
  - ４．温泉，飲料水の調査研究に関すること．
- 環境保健部　5名
  - １．環境変化の人体に及ぼす影響の調査研究に関すること．
  - ２．生活習慣病の調査研究に関すること．
  - ３．産業衛生の調査研究に関すること．

(4) 職　　員　　数

（平成20年５月１日現在）

区分	所・次長 部・課長	主　幹 研究員	副主幹	副主幹 研究員	主任	主　任 研究員	再任用 主　任	研究員	主　任 業務技師	嘱託	計
所　　長	1										1
次　　長	1										1
総　務　課	1（注1）		2（注1）		1（注1）				1（注2）		5（兼5）
がん研究部	次　長 事務取扱			3			2	1			6
ウイルス部	1					1	1	3			6
細　菌　部	所　長 事務取扱			2		3		1			6
化　学　部	1			3		2		1			7
環境保健部	1			2		2					5
合　　計	6	0	2	10	1	8	3	6	1	0	37（兼5）

＊総務課の（注1）は環境科学センター・薬事研究所を兼務.
（注2）は環境科学センターを兼務

(5) 職　員　一　覧

（平成20年5月１日現在）

職　名		氏　名
所　長		倉　田　　毅
次　長		前　多　隆　志
総務課	総務課長（兼）	尾　崎　孝　嗣
	副主幹（兼）	後　藤　郁　子
	副主幹（兼）	春　山　和　則
	主任（兼）	宮　本　伊津子
	業務技師（兼）	高　安　勝　弘
がん研究部	部長	次長事務取扱
	副主幹研究員	米　田　　豊
	〃	品　川　保　弘
	〃	九　曜　雅　子
	再任用主任	本　田　幸　子
	〃	林　　美貴子
	研究員	山　内　健　生
ウイルス部	部長	滝　澤　剛　則
	主任研究員	堀　元　栄　詞
	再任用主任	長谷川　澄　代
	研究員	小　原　真　弓
	〃	岩　井　雅　恵
	〃	中　村　一　哉

職　名		氏　名
細菌部	部長	所長事務取扱
	副主幹研究員	綿　引　正　則
	〃	磯　部　順　子
	主任研究員	木　全　恵　子
	〃	嶋　　智　子
	〃	清　水　美　和　子
	研究員	金　谷　潤　一
化学部	部長	高　柳　信　孝
	副主幹研究員	小　玉　修　嗣
	〃	大　戸　幹　也
	〃	健　名　智　子
	主任研究員	中　山　恵理子
	〃	山　下　智　富
	研究員	村　元　達　也
環境保健部	部長	金　木　　潤
	副主幹研究員	新　村　哲　夫
	〃	田　中　朋　子
	主任研究員	中　崎　美　峰　子
	〃	堀　井　裕　子

注　総務課は環境科学センターおよび薬事研究所を兼務

(6) 予 算 及 び 決 算

平成19年度予算概要（当初）

事業名	予算額 (千円)	財源内訳 使用料手数料（千円）	国支出金（千円）	受託事業（千円）	一般財源（千円）	備考
衛生研究所費	74,710	3,498			71,212	所の運営、維持管理、試験検査等
試験研究費	11,148				11,148	調査研究
設備充実費	3,384				3,384	試験研究及び検査用機械器具
感染症対策特別研究費	1,716				1,716	
がん等特別研究費	9,333		520	1,500	7,313	調査研究
合計	100,291	3,498	520	1,500	94,773	

平成19年度　歳入・歳出決算

(歳　入)

科目	決算額（円）	備考
衛生手数料	7,542,157	衛生研究所費 2,400,547　環境衛生検査 5,141,610
衛生国庫負担金	499,800	
財産運用収入	23,412	特許権等運用収入
衛生研究所受託事業	1,500,000	
納付金	54,365	
合計	9,619,734	

(歳　出)

科目	決算額（円）	備考
人事管理費	1,072,130	嘱託職員の雇用
管理諸費	179,850	協力交流研修員の専門研修費用
児童福祉対策費	11,484,000	先天異常児の早期発見
公衆衛生総務費	200,405	再任用職員の保険料
結核対策費	120,168	研修費用
予防費	12,394,207	感染症関連調査
環境保健対策費	8,948,801	カドミウム環境汚染地域住民関連調査
衛生研究所費	98,759,702	試験検査・研究及びそれに伴う維持管理
環境衛生総務費	7,143,375	温泉・飲料水等検査
食品衛生指導費	6,646,215	食品安全対策検査
公害防止対策費	316,000	海水浴場細菌検査
工鉱業総務費	7,879,929	海洋深層水研究・知的クラスター・科学技術振興
合計	155,144,782	

(7) 重 要 備 品 一 覧

品　　名	型　　式	購入年月
分光光度計	島津製作所 UV-2200	H 2 .9
分光光度計	日立製作所 U-3010	H11. 9
分光光度計	島津製作所　UV-180A	H 5. 3
分光蛍光光度計	日本分光　FP-777	H 3.11
ガスクロマトグラフ	島津製作所　QP-5000	H 9. 3
ガスクロマトグラフ	ヒューレットパッカード　HP-6890	H10 .8
ガスクロマトグラフ	Agilent　6890N	H15. 6
ガスクロマトグラフ	島津製作所 GC-14B	H 4.11
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津製作所 QP-2010	H17.10
ガスクロマトグラフ質量分析計	島津製作所 QP-1100WA	H 5.11
ガスクロマトグラフ質量分析計	Agilent 7890A-GC 'S975C-MSD	H19.11
高速液体クロマトグラフ	日立製作所 L-6300	H 5.12
高速液体クロマトグラフ	ウォーターズ	H 7.10
高速液体クロマトグラフ	島津製作所 LC-9A	H 2. 9
高速液体クロマトグラフ	島津製作所 LC-VP	H10. 6
高速液体クロマトグラフ	ヒューレットパッカード Agilent 1100	H12. 6
液体クロマトグラフ・質量分析装置	waters Quattro micro API ｼｽﾃﾑ	H15.12
全有機炭素計（ＴＯＣ計）	島津製作所　TOC-V CSH	H18. 1
全自動ニンヒドリン法アミノ酸分析システム	日本分光	H 9. 3
イオンクロマトグラフ	日本ダイオネックス DX-500	H 9.11
キャピラリー電気泳動システム	ヒューレットパッカード	H 7. 9
全自動ゲル浸透クロマトグラフ	O.I.ANALYTICAL　AP-512	H11. 3
高速液クロ用オートインジェクター	島津製作所　SIL-10ADV	H10 .7
マイクロウェーブ分解装置	アステック　MARS 5	H11.12
原子吸光光度計	島津製作所　AA-6700	H 8.11
マイクロプレートリーダー	BIO-RAD　Benchmark	H12. 9
分離用超遠心機	日立製作所　CP 101 MX	H12.11
高速冷却遠心機(マルチパーパス)	久保田　6800	H 6. 2
遠心濃縮機	東京理科製 CVE-100	H 7.10
デンシトグラフ	アトー株式会社　ﾌﾟﾘﾝﾄｸﾞﾗﾌ　AE-6911	H 6. 1
透過型電子顕微鏡	日立製作所 H-7600	H13. 3
落射蛍光顕微鏡	オリンパス光学工業	H13　3
落射蛍光顕微鏡	ニコン	H 9. 8
マイクロプレートウォッシャー	米国ダイナテック　(ｳﾙﾄﾗｳｵｯｼｬｰⅡ)	H 5. 3
蛍光式 DNA シーケンサー	パーキンエルマー　310-1-TI	H 9.12
遺伝子導入装置	バイオラド社　(ｼﾞｰﾝﾊﾟﾙｻｰ)	H 7. 3
ELISA 測定システム	BIO-RAD 社	H10. 2
定量 PCR（遺伝子増幅機器）	ABI　PRISM 7000 Sequence	H15.10
二次元電気泳動装置	アマシャムバイオサイエンス　Multiphor Ⅱ	H15 .9
キャピラリー型遺伝子解析システム	ABI　PRISM 3130Ｘ1	H19. 9
超音波骨密度測定装置	ＧＥ横河メディカルシステム　A-1000	H18. 7

（平成20年3月31日現在）

⑻ 各部の業務概要

がん研究部

［行政および依頼検査］

先天性代謝異常等マス・スクリーニング

平成19年度の検体総数は10,067件で，県内42か所の医療機関で採血され，送付されたものである．受検児は出生数の88.2%（里帰り分娩を含めると102.4%）であり，前年同様高い割合であった．検査項目は，フェニルケトン尿症，ホモシスチン尿症，メイプルシロップ尿症，ガラクトース血症，先天性甲状腺機能低下症および先天性副腎過形成症の６疾患である．検査の結果，要精密検査として49人（フェニルケトン尿症疑い1人，ホモシスチン尿症疑い3人，メイプルシロップ尿症疑い1人，ガラクトース血症疑い1人，先天性甲状腺機能低下症疑い22人，先天性副腎過形成症疑い21人）がスクリーニングされ，先天性甲状腺機能低下症の患者8人，先天性副腎過形成症1人が発見された．

染色体検査

平成19年度の検体数は，血液64件，羊水64件と自然流産胎児17件の計145件で，うち，染色体異常を示したものは，血液4件（均衡転座保因者2件，21トリソミー症候群1件，ターナー症候群1件），羊水6件（18トリソミー症候群2件，21トリソミー症候群2件，ターナー症候群1件，均衡転座保因者1件），流産胎児12件（ターナー症候群2件，16トリソミー2件，46,XY/46,XX？モザイク2件，5トリソミー1件，9トリソミー1件，15トリソミー1件，21トリソミー1件，22トリソミー1件，3倍体1件）の計22件であった．染色体検査の依頼理由（主訴）は，血液では流産を繰り返す，羊水では高齢妊娠および胎児異常の疑い，流産胎児では流産を繰り返すが最も多かった．

衛生動物検査

行政検査として，日本脳炎流行予測事業における媒介蚊の発生調査は平成18年度と同一の7ヶ所の畜舎において6月から10月まで行った．19年度は7ヶ所全ての定点で，前年度に比べ明瞭にコガタアカイエカの捕集数が増加した．また，動物由来感染症予防体制整備事業におけるダニ類の調査を春と秋に，蚊類の分布および発生調査を5月から10月まで前年とほぼ同じ規模で行った．マダニ類は8種547個体が得られた．蚊類の調査では，9種類1318個体が得られ，環境による種構成および採集数（生息数）に相違がみられた．

日常の検査として，各厚生センターや市町村などの行政機関および各種事業所からの食品混入昆虫などの同定検査を55件実施した．

［調査研究］

がん発生要因に関する研究

カテキン含有量が多いとされる煎茶粗抽出物を用い，哺乳動物培養細胞の染色体核型への影響を引き続き検討した．チャイニーズハムスター由来培養細胞 V79 の染色体数の数的変動への影響の有無を検討したが，培養中の濃度の高低に関わらず，変化は認められなかった．

富山県における大腸がん発生背景要因についての症例対照研究で得られたデータを，調査サンプルの県内分布（居住地域）を考慮に入れて，再解析中である．かつて実施した胃がん発生背景要因に関する症例対照研究と大腸がん研究のそれぞれの結果について，背景要因の異同を比較検討している．また，胃がん調査時の対照データと大腸がん調査時の対照データの異同について解析中である．

先天性代謝異常症等のマス・スクリーニング検査法に関する研究

ガラクトース血症の定性試験法であるボイトラー試験を定量化する目的で，ろ紙血液からの溶出液にHemogloBind™を加えてヘモグロビンを沈殿させ，上清にボイトラー試液を加えて，一定時間の蛍光強度変化を測定する方法を検討した．また，沈殿したヘモグロビンを再溶解し，同時にヘモグロビンの定量を行うことで，血液ろ紙1枚を用いて，単位ヘモグロビン濃度当たりの酵素活性指標を測定できた．

フェニルケトン尿症（PKU）と同様に血液中のフェニルアラニンが上昇する疾患として，テトラヒドロビオプテリン(BH4)欠乏症があるが，フェニルケトン尿症とは治療法が異なり，早期に鑑別する必要がある．BH4欠乏症は主にジヒドロプテリジンリダクターゼ（DHPR）が欠損していることから，新生児マス・スクリーニン

グ用の血液濾紙を使用し，DHPR 活性を短時間で測定することにより，PKU と簡易に鑑別する方法の検討を行った．

染色体に関する研究

微細欠失，転座，合併異常，モザイク等複雑な染色体異常の場合，通常の染色体分析では正確な判定が得られないことがあり，fluorescence in situ hybridization（FISH）法を併せ判定することが多くなってきた．実際に微細な均衡転座保因者および低頻度のモザイクを示した症例に FISH 法を応用し，判定可能とした．

突然変異原性に関する研究

小核試験は染色体異常のなかの染色体切断を指標とした試験法として確立されている．しかし，どの部位で切断が起きているのかは今の小核試験では特定することはできない．最近マウスのＦＩＳＨプローブが開発されつつあるので,この方法を導入し,新たな変異原性試験法を検討中である．

衛生動物に関する研究

オロロ（イヨシロオビアブ）を主体とする県内のアブ相をより精確に把握することを目的に，ボックストラップとマレーズトラップによる捕獲調査を実施した。

昭和48年度以降に衛生研究所へ問い合わせのあったノミ被害の事例を整理し，その傾向の把握を試みた。被害起因種のほとんどはネコノミであったが，イヌノミ，ヨーロッパネズミノミ，ヤマトネズミノミによる被害も少数確認された．被害内容の多くは人体刺症あるいは室内での出現（不快被害）であった．一方，次のような比較的珍しい被害も確認された：１）ヤマトネズミノミによる人体刺症，２）ネコノミの死体による製品混入，３）ヤマトネズミノミの幼虫による不快被害．

ウ　イ　ル　ス　部

感染症発生動向調査

「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」および「感染症発生動向調査実施要領」に基づき，県内の医療機関や厚生センター・保健所から依頼を受けた検体について，ウイルスおよびリケッチアの検査を行った．インフルエンザおよび呼吸器系疾患については，350症例中327症例からウイルスが検出された（AH1型インフルエンザウイルス152名，AH3型インフルエンザウイルス120名，Ｂ型インフルエンザウイルス55名）．咽頭炎では2症例からコクサッキーウイルス A10型が検出された．脳炎・脳症では，5症例中1症例から単純ヘルペスウイルス1型が検出された．感染性胃腸炎では426症例の依頼があり，このうち184症例においてウイルスが検出された（ノロウイルス GenogroupII; NVGⅡ178名，サポウイルス1名，Ａ群ロタウイルス4名，アストロウイルス1名）．手足口病では，4症例中3症例から CoxA16型が，1症例から CoxB2型が検出された．劇症肝炎では，1症例から単純ヘルペスウイルス1型が検出された．肺炎1症例，四肢麻痺1症例，無菌性髄膜炎3症例，麻しん2症例，つつが虫病1症例，心筋炎1症例，マラリアまたはデング熱疑い1症例については，いずれもウイルス等は検出されなかった．

ＨＩＶ抗体検査

平成19年4月から平成20年3月までの１年間に273件の血液について HIV 抗体検査を行ったところ，すべて陰性であった．

感染症流行予測調査

日本脳炎：県内の日本脳炎ウイルスの状況を把握するために，感染源調査と感受性調査を実施した．

感染源調査：豚の日本脳炎に対する抗体陽性率は7月に23.0%であったが，8月は35.6%に増加し，9月は25.0%，10月は71.3%となった．7月から9月までの間に2頭が新鮮感染を示した．10月以降は新鮮感染を示す豚が毎週みられた．すなわち，19年度の日本脳炎ウイルスの浸淫は7月下旬より始まり10月まで続いた．蚊と豚から，9〜10月に日本脳炎ウイルスが分離された．豚の抗体保有状況を「日本脳炎ブタ情報」として富山県感染症情報センターのホームページに毎週掲載した．

感受性調査：県内住民298名の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況を調査した．その結果，抗体陽性者の割合は全体として49.7%であった．5〜29歳では75%以上が抗体を保有していたが，0〜4歳で3.0%，40〜49歳で

6.1%と抗体保有率が特に低い年齢群があった.「予防接種歴なし」の割合は，0〜4歳で最も多く，5歳以上では減少し，50歳以上で再び増加した．予防接種歴別の抗体保有率は,「接種歴なし」で21.7%,「接種歴不明」で26.9%であったのに対し，1回以上接種歴のある対象者では79.7%であった.

ポリオ：県内のポリオウイルスの動向を把握するために，感染源調査と感受性調査を実施した.

感染源調査：平成20年1月，平成19年9月に，新川厚生センター管内，砺波厚生センター管内における健康な乳幼児61名の糞便を採取し，ウイルス分離を行った．その結果，パレコウイルス1型が1名から検出されたが，ポリオウイルスは検出されなかった.

感受性調査：平成19年6月〜9月に，0歳から66歳までの300名の血清について，ポリオウイルスに対する中和抗体価を測定した．ポリオウイルス各型に対して4倍以上の中和抗体価を保有する割合は，1型では95.0%，2型では98.7%，3型では88.7%であった．また，各型に対する平均抗体価は，1型は138.0倍，2型は112.5倍，3型は38.6倍を示し，集団免疫としては良好な抗体保有状況であった．これらの結果から，本県においては，野生型ポリオウイルスの侵淫や，ポリオ流行の可能性は少ないと考えられた．しかしながら，すべてあるいはいずれかの型の抗体を保有していない人が15.3%おり，ポリオウイルス常在地からのウイルス侵入警戒，海外渡航や育児従事にあたっての注意が必要である.

インフルエンザ：インフルエンザの予防と流行状況の把握のために，ヒト感受性調査（2007年6〜9月）と感染源調査（2007年9月〜2008年6月）を実施した.

感受性調査：インフルエンザ流行期前における富山県住民300名の抗体保有状況について，6種類のインフルエンザ抗原を用いて調べた．血球凝集抑制（HI）抗体価40倍以上の力価を示す抗体保有率は，2007/08シーズンワクチン株の A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)，A/Hiroshima/52/2005(H3N2)および B/Malaysia/2506/2004（ビクトリア系統)，参考株の B/Florida/7/2004(山形系統)，2006/07シーズンワクチン株の A/New Caledonia/20/99(H1N1)および B/Shanghai/361/2002 (山形系統)に対して各々40.7%，38.3%，13.0%，28.0%，51.3%，45.7%であった.

感染源調査：インフルエンザウイルス分離については，AH1型が150株，AH3型が97株，B 型が46株，合計293株が分離された．シーズン序盤は AH3型が主に分離されたが，年明けからは AH1型が中心となり，終盤には AH3型と B 型混在して分離された．分離株の抗原解析の結果，AH1型はワクチン株と異なる抗原性を示す株が多く，AH3型は比較的類似する株が多かった．B 型分離株のほとんどは山形系統で，ワクチン株と抗原性が類似する株が多かった.

［調査研究］

ウイルスウォッチプログラム

富山県における環境水のウイルス汚染実態調査は，河川，下水流入水および名水を対象に，1979年から断続的に実施している．これまでの調査で，富山県内の河川は多種類の腸管系ウイルスで汚染されていること，検出されたウイルスはほとんどヒト由来であることなどが判明した．平成18年度から平成19年度までは，地域における腸管系ウイルスの侵淫状況を把握するために，1下水処理場の未処理流入水について，ウイルス検索を実施した．その結果，ポリオウイルス，ヒトエンテロウイルス B 群（HEV-B)，レオウイルス，アデノウイルス，ノロウイルス，サポウイルスが検出された.

急性胃腸炎の集団発生事例について

富山県内で2007年4月から2008年3月までの1年間に発生届けのあった,ウイルス性の感染性胃腸炎の集団発生事例についてまとめた。2007年度中に調査したウイルス性急性胃腸炎の集団発生は20事例であった。これら全てよりノロウイルス（NV）が検出され，全事例が GenogroupⅡ（GⅡ）であった。17事例が GⅡ/4型，1事例が GⅡ/13型であった．飲食店（食堂，宿泊施設，民宿，旅館等）での発生が多く，11事例あった。その他に，老人保健施設4事例，保育園2事例，病院1事例，公民館1事例，家族内1事例の発生があった。集団発生では，18事例中17事例で該当の検体から遺伝子配列が得られた。これらの遺伝子配列は各事例内で100%一致し，少なくともこの17事例の集団発生は，同一のウイルス由来である可能性が高いことがわかった.

動物由来感染症実態調査（動物由来感染症予防体制整備事業）

野生動物が関連する動物由来感染症の発生監視体制の確立を目的に，野生げっ歯類をモデル動物として調査を行っている．19年度には，つつが虫病及び腎症候性出血熱の浸淫調査のため野生げっ歯類3種24個体を捕獲した.

これらの野生げっ歯類より腎症候性出血熱ハンタウイルスに対する抗体は検出されなかった．一方，6頭（25%）がつつが虫病リケッチアに対する抗体を保有していた．遺伝子検出では，平成18年度に捕獲した1頭から，つつが虫病リケッチア Karp 型の遺伝子が検出された．さらに，紅斑熱を媒介するマダニ類7種546個体を採集した．成虫6個体，若虫2プールより紅斑熱群リケッチアの遺伝子が検出された．

蚊媒介性感染症対策として調査した，県内における蚊の生息状況について平成15〜19年度の結果をまとめた．5年間の調査で6属13種9850頭（9649♀，201♂）の蚊成虫が捕集された．アカイエカ群がもっとも多く，次いでコガタアカイエカ，ヒトスジシマカと続いた．これら3種で総捕獲個体数の96.3%を占めた．蚊の成虫514プール（14,146個体）を用いてウイルス保有調査を行ったが，ウエストナイルウイルス（WNV）は分離されなかった．畜舎周辺で捕集したコガタアカイエカ10プールより，日本脳炎ウイルス（JEV）が分離された．豚血清からも6検体より JEV が分離された．カラス血清100検体およびコウモリ血清20検体について WNV と JEV に対する抗体を調査したが，いずれの検体においても抗体は検出されなかった．

これらの研究は，がん研究部と共同で行った．

［富山県感染症情報センター］

富山県感染症情報センターでは，感染症発生動向調査実施要領に基づき，全数把握感染症については各管内の全医療機関から，定点把握感染症については県内延べ70定点医療機関から各厚生センターおよび富山市保健所へ週報および月報として報告されたデータを集計・解析した．

県内および全国の感染症発生動向の情報は，速報あるいは週報の印刷物として関係機関へ毎週送付するとともに，富山県感染症情報センターホームページで一般公開している．

また，本年度も「富山県感染症発生動向調査事業報告書」を作成し，関係機関に配布した．

細　菌　部

感染症，食中毒

3類感染症：平成19年に感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下「感染症法」という）が改正されたことにより，新たな3類感染症の分類が制定された．細菌由来の感染症では，コレラ，細菌性赤痢，腸管出血性大腸菌感染症，腸チフス，パラチフスが3類感染症に位置づけられた．平成19年度に発生した3類感染症では腸管出血性大腸菌感染症感染事例は40件（83名），パラチフス1件（1名），赤痢1件（6名）が発生した．このうち，腸管出血性大腸菌感染事例の原因菌の血清型は O157 36件（78名），O26 4件（5名）であった．腸管出血性大腸菌による集団発生事例は15件であり，そのうちの9件は家族内感染例であった．また，パラチフス1件は海外渡航歴のない患者からの分離であった．赤痢1件（6名）はカンボジアへの旅行者による集団発生であり，赤痢菌の血清型はボイド4型であった．

細菌性食中毒：平成19年度は細菌性食中毒が4件（富山市1件）発生した．内訳は，腸管出血性大腸菌とカンピロバクターによる食中毒が1件，腸管出血性大腸菌による食中毒が1件，腸炎ビブリオによる食中毒が１件，カンピロバクターによる食中毒が１件発生であった．

病原細菌検出情報：県内10か所の病院と4か所の富山県厚生センター，富山市保健所，衛生研究所における糞便からの病原菌検出数は，1,295株，前年比78.8%であった．最も多かったのは大腸菌579株で，以下，黄色ブドウ球菌の367株，カンピロバクター263株，サルモネラ27株，腸炎ビブリオ27株の順であった．

生活衛生

食品検査：6月に清涼飲料水30件の成分規格試験を行った．すべての検体で大腸菌群陰性であった．また，食品の夏期一斉取締りの一環として，生食用魚介類（刺身等）32検体について腸炎ビブリオの定量検査を行った．すべての検体が成分規格基準に合致していた．7〜11月に，牛生レバー12検体について，一般生菌数，大腸菌群数，腸管出血性大腸菌 O157・O26・O111，カンピロバクターの検査を行った．腸管出血性大腸菌はすべて陰性であった．カンピロバクターは5検体が陽性であった．

海水浴場水検査：生活環境文化部および富山市の依頼により海水浴場水（8定点，のべ128検体）の糞便性大腸

菌群数測定を行った．いずれも水質が良好な「AA」または「A」ランクで「適」であった．このうち26検体について腸管出血性大腸菌 O157検索を行ったがすべて陰性であった．

水道水源水検査：平成19年3月30日付けで改定となった「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」に基づき，富山県内で水道源水として利用される河川水，湧水等43検体について汚染指標菌（大腸菌定量と嫌気性芽胞菌）の検査を行った．指標菌のいずれかが陽性であった8検体についてクリプトスポリジウムおよびジアルジアの検査を行ったところ，1検体からジアルジアのシストが検出された（5個/10ℓ）.その水源水は膜ろ過等の処理設備がないことから，ただちに給水が停止され，配水家庭へ広報された．当所では，給水再開に向け，計830ℓの水について検査を行い，ジアルジアが検出されないことを確認した．

腸炎ビブリオ検査：平成8年度より始まった通称「VP マリン」事業として，6月から11月にかけて県内5漁港の海水（表層及び海底）の腸炎ビブリオを定期的に調べた．その結果，海水中の腸炎ビブリオ数は，100ml あたり<3〜7.5×10^2の範囲であった．

名水調査：県内で飲用されているいわゆる「名水」について，細菌学的な調査を行った．調査は7，10月の2回，採水地点はそれぞれ6か所，計18検体について，生菌数，大腸菌定量，病原性大腸菌定性と嫌気性芽胞菌を実施した．1検体で生菌数が300CFU/ml 以上，１検体で大腸菌数が2 MPN/100ml であった．嫌気性芽胞菌，病原性大腸菌はすべての検体で陰性であった．

依頼検査：食品への異物混入あるいはカビ様の物質の発生等，苦情食品に関する依頼検査が３件あった．うち2件はカビであることが判明したが，1件は物質を特定できなかった．

滑川市から依頼を受け，海洋深層水の一般細菌数および大腸菌定性の検査を14検体，また一般細菌数および病原細菌定性（大腸菌，大腸菌O157，赤痢菌，サルモネラ，腸炎ビブリオ，黄色ブドウ球菌，セレウス菌，腸球菌，緑膿菌，嫌気性菌）の検査を14検体について行った．一般細菌数検査では，多くが0〜1CFU/ml と少なく，清浄性が保たれていた．病原細菌定性検査では，一部の採水地点からセレウス菌，嫌気性菌が検出された．

［調査研究］

サルモネラ

県内の病院，保健所でヒトから分離された菌株の収集解析を行った．2007年1月〜12月までに当所に送付された菌株は17株で，すべて医療機関で分離された．これらの血清型の内訳は *S*.Enteritidis が2株，*S*.Saintpaul，*S*.Typhimurium がそれぞれ2株，その他11株であった．3類感染症であるパラチフスの原因となる *S*.Paratyphi A が1株分離され，このファージ型は１であった．

大腸菌

1992年以降富山県で発生した VT2遺伝子を保有する腸管出血性大腸菌感染事例174事例について VT2低産生性腸管出血性大腸菌のスクリーニングと疫学的解析を行った．その結果，全事例の15.5%が VT2低産生性であった．

深層水

富山湾海洋水より深度別に採取した海洋水から分離した1152株の菌株について2種類の薬剤に対する耐性菌の分離と同定，および耐性遺伝子のうち８種類の耐性遺伝子の検出を行った．その結果，分離した菌株から検査対象とした８種類の薬剤耐性遺伝子は検出されなかった．

溶連菌

平成19年に県内2か所の病院で分離された溶連菌を型別した．A 群52株では，検出率が高い T 型は，順に T1型，T4型，TB3264型，T11型，T12型であった．前年と比較して，T1型，T4型および TB3264型が増加し，T11型，T25型，T12型および T28型が減少していた．B 群40株で検出率が高い型は，順にⅥ（NT6）型，Ⅰb 型，Ⅴ型，Ⅰa 型，Ⅷ（JM9）型であった．

腸炎ビブリオ

平成19年6月から11月の期間，県内の5漁港海水について PCR 法と免疫磁気ビーズ法により耐熱性溶血毒素（TDH）産生性腸炎ビブリオの分布を調べた．その結果，海水100検体のうち，8検体が TDH 遺伝子陽性となった．しかし，TDH 産生性腸炎ビブリオ O3:K6は分離されなかった．

カンピロバクター

平成19年に県内2か所の病院で分離されたカンピロバクターの収集解析を行った．当所に搬入された菌株は38株で,内訳は *C.jejuni* 33株，*C.coli* 4株，*C.fetus* 1株であった．分離菌について薬剤感受性試験，Penner 型別を行った．

［精度管理］

内部精度管理：富山県食品関係試験検査業務管理要綱に示される精度管理規定に基づき，県内4厚生センター，食肉検査所，富山市保健所および衛生研究所の7機関について，内部精度管理調査を行った．試料は当所で作製しそれぞれに配布した．調査項目は，牛乳の一般生菌数測定および模擬食品中の腸管出血性大腸菌(EHEC)の検出とした．なお，模擬食品は豆腐を原料とし，EHEC が陰性であることを確認した.EHECO157を接種，EHEC O111を接種，接種菌なしの 3 検体を各機関に配布した．回答結果は，一般生菌数測定，EHEC の検出ともにすべての機関で良好であった．この回答結果については本年報にその詳細を掲載している．

外部精度管理：前述の精度管理規定に基づき，外部精度管理調査に参加した．

［レファレンスセンター事業］

衛生微生物協議会，希少感染症研究事業の溶連菌感染症の東海・北陸支部レファレンスセンターとして活動した．A 群溶連菌の T 型別については，愛知県衛生研究所51株および富山県衛生研究所52株，計103株の結果を報告した．また，東海北陸地区で発生した3例の劇症型溶連菌感染症例や B 群溶連菌40株の型別結果についても報告した．

化　学　部

食品等の検査

県内で生産されたミネラルウォーターの成分規格試験（混濁，沈殿物，ヒ素，鉛，カドミウムおよびスズ），煮干し等魚介乾製品中の酸化防止剤（BHA，BHT），惣菜等の保存料（安息香酸，ソルビン酸），甘味料（サッカリンナトリウム）及び生めん類等の品質保持剤（プロピレングリコール）等の56検体（総項目数237）の検査を行ったところ，いずれの検体も規格基準または使用基準に適合していた．

残留農薬：県内産主要農産物の玄米，トマト，小松菜等の8種21検体について，有機リン系（フェニトロチオン等），含窒素系（フルトラニル等），ピレスロイド系（ペルメトリン等），有機塩素系（ディルドリン等）の約95農薬を調査した．玄米2検体及び小松菜1検体からテフルトリンが，ほうれんそう1検体からシペルメトリンが，りんご 1 検体からクロルピリホスがそれぞれ検出された．検出量は基準値の1/10以下であった．平成19年12月から平成20年1月の間に中国産冷凍食品中の農薬による食中毒が数件発生したことを受け，県内においても健康被害が疑われた5検体についてメタミドホス，ジクロルボスを検査したところ，いずれも不検出（0.01ppm 未満）であった．

重金属等：富山湾産魚介類について，18魚種20検体（カレイ，サケ等）の総水銀を測定したところ，全ての検体から検出され，濃度は0.01～0.16 ppm（暫定的規制値0.4 ppm）であった．また9魚種10検体のトリブチルスズオキシド，ジブチルスズオキシド，ジフェニルスズオキシド（いずれも規制値なし）を測定したところ，すべての検体でいずれの化合物も不検出であった（定量限界0.02 ppm）．

家庭用品検査

消臭，洗浄スプレーや家具用ワックススプレーなどの家庭用洗浄剤，エアロゾル製品10検体について，テトラクロロエチレン及びトリクロロエチレンあるいはメタノールの規格試験を，また羊毛製品（衣類）5検体についてディルドリンの試験を行ったところ，いずれの製品からも検出されず，規格基準に適合していた．

水質検査

管理目標設定項目：水道水源の水質監視に伴い，水道原水18検体及び浄水14検体について，亜硝酸態窒素，アンチモン及びトルエン等13項目（総項目数141）の検査を行った．また農薬類としてシマジン等43項目（総項目数258）の検査も行った．うち2検体についてウラン（0.0003 ～ 0.0004mg/L：目標値0.002mg/L）が，1件につ

いてニッケル（0.002mg/L：目標値0.01mg/L）が，1件について抱水クロラール（0.003mg/L：目標値0.03mg/L）が，1件についてブロモブチド（0.0004mg/L：目標値0.04mg/L）が，1件についてモリネート（0.00017mg/L：目標値0.005mg/L）が検出された．その他の項目はいずれも不検出であった．

要検討項目：水道水源の水質監視に伴い水道原水15検体及び浄水14検体について，銀など重金属類，スチレンなど揮発性有機化合物，フタル酸ジ(n-ブチル)などフタル酸エステル類，ブロモクロロ酢酸などハロ酢酸類及びトリクロロアセトニトリルなどハロアセトニトリル類等24項目（総項目数381）の検査を行った．うち7検体についてアセトアルデヒド（0.002 ～ 0.006mg/L：目標値なし）が検出された．その他の項目はいずれも不検出であった．

ゴルフ場使用農薬：県内におけるゴルフ場周辺の飲用井戸水について，平成19年5月（21件）および11月（21件）にゴルフ場使用農薬（シマジン等29項目）の検査（総項目数564）を行ったところ，うち1件についてダイアジノン(0.00006mg/L：目標値0.005 mg/L)，フェニトロチオン(0.00012mg/L：目標値0.003 mg/L)，イプロベンホス(0.00015mg/L：目標値0.008 mg/L)，が検出された．また他の1件についてメタラキシル(0.0006mg/L：目標値0.05 mg/L)が検出された．その他の井戸水からは農薬は検出されなかった．

温泉分析

中分析7件（再分析4件及び浴槽水3件）を行ったところ，温泉法第２条に適合するものは4件（浴槽水を除く）であり，そのうち3件は療養泉であった．泉質は，ナトリウム－塩化物・炭酸水素塩泉，ナトリウム－硫酸塩泉，アルカリ性単純温泉であった．また温泉資源保護を目的として，平成7年度から温泉密集地域の16源泉（18年度1源泉追加）の主要成分等について，経年変化調査を行っている．18年度に成分濃度が数倍高くなった源泉は，元の揚湯量に戻すことにより成分濃度はほぼ元通りになった．しかし，新たに1源泉において大幅な成分濃度低下が認められた．これも揚湯量が影響しているものと推定される．

［調査研究］

食品中の成分および添加物に関する調査研究

ビタミンＡは分子内に４つの二重結合を有し，いずれもトランス型である．この二重結合は光や熱によりシス型に異性化するとビタミンＡの有効活性が低下する．また，ビタミンＡの末端はカルボン酸，アルコール，アルデヒド，あるいはエステル結合と多岐にわたっている．ビタミンＡ含有食品中の有効ビタミンＡ含量を測定するために，これらビタミンＡ類の一斉分析法を検討している．

食品等中の残留農薬およびその他の有害物質に関する調査研究

マイクロウエーブ抽出 LC/MS による木製器具類中の農薬分析：マイクロウエーブ装置を箸，串，フォーク，スプーン等の木材製器具類中の農薬，防かび剤等の有機化合物の迅速分析法開発に応用する検討を行っている．約50種類の化合物の添加回収試験結果も良好であり現在，各種試料への応用を検討している．

飲料水および温泉に関する調査研究

飲用されている「とやまの名水」の調査：平成15年度から，飲用されている「とやまの名水」の環境保全や衛生管理・飲用対策の基礎資料とするための水質調査を行っている．平成19年度は名水15箇所について水質基準48項目および主要成分（溶性ケイ酸，硫酸イオン等）6項目の検査を行った（総項目数810）．水質基準項目については検査したすべての名水が基準に適合していた．今回採水を行なった名水の主要成分濃度を H15,16年度に行った1回目の主要成分調査データと比較すると，各名水の主要成分濃度に大差はなく名水の水質は安定していた．

日常の検査業務に適する簡便，迅速な多成分一斉分析法の開発

キャピラリー電気泳動法による光学異性体の分析：光学異性体の新しい分析法として，ホウ酸を中心イオンに用いたキラル配位子交換法を検討し，ジオール構造を有する光学異性体を分離できることを既に報告した．そこで，ポリオール構造を有する単糖類の光学分割について検討した．単糖類はイオン性がなく，吸光度検出できないため，8-アミノナフタレン-1,3,6-トリスルホン酸で誘導体化した．その結果，検討した6種類の単糖類（グルコース，ガラクトース，マンノース，フコース，キシロース，アラビノース）をすべて光学分割できた．今後，植物（野菜や果物など）中の単糖類の光学異性体分析に本法を適用する予定である．

[精度管理調査]

食品検査の精度管理：「富山県食品衛生検査業務管理要綱」の制定（平成10年12月）によって，平成11年度か

ら県内の厚生センター等の公立食品衛生検査機関に対して検査水準の維持，向上を目的とした精度管理調査を実施している．今年度は5機関において，昨年度に引き続き寒天中の保存料（ソルビン酸）の定量試験の調査を実施したところ，全ての検査機関の検査結果は良好で，「充分管理されている」と判断できる結果が得られた．

水質検査の精度管理：「富山県水道水質検査精度管理実施要領」に基づき,平成19年度は県内の水道水質検査を実施する24機関の参加により，鉄及びその化合物と塩化物イオンについて精度管理調査を実施した．今年度は試料として自然水(湧水)を用い，鉄及びその化合物については標準液(0.12 mg/L)および硝酸(10ml/L)を添加して，塩化物イオンについてはそのままのかたちで精度管理用試料とした．

鉄及びその化合物は参加24機関のうち2機関が2通りの測定方法により参加したことから26機関として統計処理を行った．26機関の測定値の平均値±標準偏差は0.123±0.010 mg/L であり，室間変動係数は7.9%，室内変動係数は0.0〜4.8%であった．Grubbs の異常値検定(危険率5%)の結果，1機関の測定値が棄却され，棄却された機関を除く25機関の測定値の平均値±標準偏差は0.121±0.006mg/L であった．

H15年厚生労働省告示261号によると，鉄及びその化合物を測定する測定方法の前処理には加熱する工程が含まれている．今回，前処理として加熱処理を行っている20機関の平均値±標準偏差は0.123±0.005mg/Ｌ，行っていない5機関の平均値±標準偏差は0.115±0.006mg/Ｌで，両者には有意な差がみられた($p<0.05$) (棄却された機関は除いて統計処理を行った)．今回のような自然水に標準液を添加して作製した検体では，加熱処理の有無により測定値に違いが見られることがわかった．

塩化物イオンの精度管理には24機関が参加した．測定値の平均値±標準偏差は13.58±0.03mg/L であり，室間変動係数は2.2%，室内変動係数は0.0〜3.0%と，機関内・機関間のばらつきともに小さく，報告された検査結果は概ね良好であった．

環　境　保　健　部

［行政検査］

カドミウム汚染地域住民健康調査（神通川流域住民健康調査）

１次検診：昭和54年度から実施してきた環境省（庁）委託の健康調査方式が，平成９年度から新しい方式に改められた．平成19年度は，対象者2,121名中736名が１次検診を受診した．

精密検診：１次検診の結果，尿中β2-マイクログロブリン濃度が5.0mg/gCr 以上または尿検査で尿蛋白（±）以上の陽性を示した者134名が精密検診の対象となった．精密検診は指定医療機関である富山大学附属病院，富山県立中央病院，富山市民病院の３医療機関で行われ，受診者109名の尿，血液について所定の検査を行った．

管理検診：イタイイタイ病要観察者1名に対して，管理検診の案内がなされたが受診はなかった．

イタイイタイ病認定申請に伴う検査：申請のあった4名について，該当する尿および血液検査を実施した．

［調査研究］

骨粗鬆症予防法の確立に関する研究　－骨粗鬆症予防に効果的な運動についての検討－

日常の身体活動が骨粗鬆症予防に与える効果を明らかにするために，健康な中高齢者の身体活動量（歩数，速歩時間），体力と超音波骨量指標，骨代謝指標との関連を検討した．身体活動量については，女性において歩数，速歩時間が多いもので骨量指標の超音波伝搬速度（SOS）が高く，速歩時間が多いもので骨吸収指標が低値を示した．体力との関係では，男女ともに体力得点が高いものでSOS が高く，骨吸収指標が低値であった．また，女性では，歩数が多いものは筋力（握力，上体起こし）の成績が良く，速歩時間が多いものは筋力，歩行能力（10m 障害物歩行，6分間歩行）の成績が良い傾向を示したことから，身体活動量が多いことは高い筋力と骨量を維持するように働き，さらに強度が中以上の活動（速歩時間）が多いと筋力に加えて歩行能力が高く，骨代謝では骨吸収の亢進が抑えられることが示唆された．

肥満体質遺伝子と生活習慣病予防に関する疫学的研究

これまでの調査により肥満男性の体重減少には速歩時間の増加が有効であることがわかった．今年度は50歳以上の女性について腹囲の変化を含め検討したところ，歩数11000歩以上，速歩時間40分以上ではそれ未満より体

重，腹囲の減少が大きく，中高年女性の減量には速歩時間のみならず歩数の確保が有効と考えられた。

インスリン抵抗性遺伝子の一つとされるFABP2（小腸脂肪酸結合蛋白をコードする遺伝子）の遺伝子多型と肥満，インスリン抵抗性との関連を検討したところ，肥満者の中でもホモタイプではHOMA指数が高く，インスリン抵抗性を示した．

環境汚染物質の生体影響に関する研究

有機リン系農薬の曝露指標として測定される尿中のアルキルリン酸濃度の日内変動について検討を行った。その結果，1日の中の採尿のタイミングによって尿中アルキルリン酸濃度にあまり差がない者，10倍程度濃度差がある者など，個人差がみられた。尿中クレアチニンで濃度補正をすることによって濃度の変動幅は小さくなり，早朝尿とそれ以外の随時尿との差が小さくなることがわかった．

中国内蒙古フッ素汚染地域における血中ビタミンD_3著高と骨吸収亢進に関する調査研究（文部科学省科学研究補助金基盤研究B海外学術調査）

これまでフッ素曝露による骨への影響は，骨芽細胞刺激による骨硬化症（骨過形成）とされてきたが，先の富山大学医学部および中国内蒙古医学院との共同研究により，飲料水中フッ素汚染がみられた中国・内モンゴル自治区草原地域の中年女性に骨吸収の亢進を観察した．そこで，フッ素曝露が成長期および閉経期の骨量と骨代謝へ及ぼす影響を明らかにし，フッ素摂取量の基準設定への科学的データの提供を目的として，中国・内モンゴル自治区に平成19年7月下旬から8月上旬，10名の調査団を派遣し，現地の研究者とともに疫学調査を行った．

調査対象は，フッ素汚染地域である草原地域（達茂旗市周辺）および対照地域（呼和浩特市，農村地域）で，これまで調査を行ってきた中高年女性および未閉経中年女性とその娘の成長期女性である．フッ素曝露の把握のため，飲料水および当地で常飲されているタン茶浸出液中のフッ素測定を行ったところ，対照（都市）地域に比べて汚染（草原）地域が有意に高かった．尿中フッ素濃度は草原地域が都市地域に比べて有意に高く，年齢が高いほど増加した．尿中の骨吸収マーカーは30歳代以上で草原地域が都市地域に比べて有意に高く，フッ素曝露による骨吸収亢進が示唆された．成長期女性では，尿中フッ素濃度に差はみられたが，骨吸収マーカーに差はみられず，フッ素曝露による影響は明らかでなかった．現在，血液の測定結果や骨密度，アンケート調査，栄養調査などの結果について解析を実施中である．（平成18年度から20年度の3年計画）

カドミウム汚染地域住民健康影響調査（神通川流域住民健康調査）に関する研究

神通川流域のカドミウム汚染地域において，平成9年度以降，新方式により行われた住民健康調査の調査データと，昭和60年度から平成8年度までに，昭和51年方式により環境省（庁）委託事業および富山県単独事業として行われた住民健康調査データについて，集計・解析し取りまとめている．

（環境省カドミウム汚染地域住民健康影響調査検討会にて検討中）

濃縮海洋深層水のスキンケア利用に関する皮膚科学的研究

これまで濃縮海洋深層水を用いた「浮遊浴」の健康増進効果について調査研究を行ってきたが,濃縮深層水の「浮遊浴」のモデルである「死海」では,乾癬やアトピー性皮膚炎などの療養に利用されている.そこで，人間の皮膚に構造上の類似点の多い仔豚を使用して濃縮海洋深層水の抗アレルギー・抗炎症効果を検討した．

平成17年度は，実験的に炎症を誘発した仔豚を濃縮海洋深層水の温水に浸漬し，含有元素の皮膚浸透性について検討を行った．その結果，組織学的観察では，炎症部位における温浴後の蒸留水群と濃縮海洋深層水群に差は認められなかったが，イオン質量分析装置（SIMS，イオン顕微鏡）による炎症部位のイオン濃度測定によって，濃縮海洋深層水成分の皮膚浸透性が示唆された．

平成18年度から19年度にかけて，仔豚の繰り返し温浴による濃縮海洋深層水成分の皮膚浸透性と抗炎症作用について検討を行った．濃縮海洋深層水とあわせて，富山湾海洋深層水，Mgを多く含む苦汁（ニガリ）水から作製したMg水，対照として純水（イオン交換水）の温水に繰り返し（炎症惹起2日後，1週間後，2週間後の3回），1時間温浴させ，バイオプシーにより皮膚組織の採取を行った．現在までにSIMS測定を行った炎症惹起2日目の結果では，炎症部位については前年度のようにNa，K，Caなどの海洋深層水成分が検出された．さらに正常部位（非炎症部位）においても，海洋深層水および濃縮水で，純水に比べて高い濃度の元素濃度が検出され，皮膚浸透性を示唆する結果が得られた．現在，深層水成分の皮膚浸透性と抗炎症作用および治癒効果について解析中である．

平成19年度には，濃縮海洋深層水を足浴に利用した場合の温熱効果について，炭酸水および水道水を比較対照として検討を加えた．年齢30歳代から60歳代の男女6名について，レーザードプラー血流計による皮膚血流の変

化を検討した．その結果，濃縮水は足浴直後から水道水に比べ血流が増加したが，炭酸水では足浴直後は血流の増加がみられず，15分後に最も増加した。炭酸水と濃縮水を混合した炭酸濃縮水では，足浴直後も15分後も血流が増加しており，両者の特徴をあわせた温泉水として開発が期待された．

海洋深層水体験施設に手足浴施設が設置され，一般客に利用されていることから，海洋深層水の温浴と冷水に交互に手足を浸す交代浴によって，皮膚温度と血流がどのように変化するか検討を行った．20代の女性９名を対象に，片手または片足を，温水（42℃，3分），冷水（20℃，20秒）に交互に2回繰り返す交代浴を行い，両手・両足の皮膚温度と血流を測定した．深層水による温冷交代浴では，入浴側の手足の皮膚温度は対照とした水道水と比べ増加はみられなかったが，皮膚血流は有意な増加がみられた．入浴しなかった側の手足の皮膚温度・血流も入浴側と同様の傾向がみられた．海洋深層水を用いた温冷交代手足浴には全身浴と同様に温熱効果が示唆された．

（富山大学医学部，富山県農業技術センター畜産試験場との共同研究，平成17年度から19年度の3年計画）

アレルギー診断薬液等の超音波経皮浸透装置の開発と応用（大学連携先端研究推進事業）

アレルギー検査は皮膚試験と試験管内試験に大別され，試験管内試験が現在のアレルギー検査の主流となっているが，採血や測定時間・費用等の問題がある．そこで，短時間に，一度に多数のアレルギー反応の判定ができ被験者に負担をかけない診断方法の開発が望まれている．本研究では，複数のアレルギー診断薬をそれぞれに独立したパッチに染み込ませ，これを被験者の皮膚の上に貼り，貼ったパッチの上から超音波振動を加えてアレルギー診断薬を経皮浸透させる超音波式アレルギー診断薬浸透装置とアレルギー診断用パッチを開発することを目的とした．

平成18年度は，超音波薬剤経皮注入装置および振動ジグの試作および改良を行い，滴下した色素がモルモットおよび仔豚皮膚を浸透することを確認した．アレルギーテスト（スクラッチテスト）陽性のヒトの皮膚へ，ハウスダストおよびダニアレルゲンを滴下し，超音波装置を使用する方法で島状の赤斑が生じることを確認した．衛生研究所倫理審査委員会に対して，ヒトを対象として実験を行うことについて申請し承認を受けた．

平成19年度は，ヒトを対象として超音波装置を使用する実験および対照としてスクラッチテストを，衛生研究所職員，富山大学医学部保健医学教室員および学生有志の合計89名の協力を得て実施した．アレルゲンとして，ハウスダスト（スクラッチエキストリイ）を滴下して，スクラッチを行う方法と超音波装置を使用する方法の比較を行った．スクラッチテスト陽性者53名中超音波装置で陽性となったのは16名（陽性率30％）であった．アレルゲンを染込ませたゲル状のものと薄膜状のパッチを作製し，少人数への適用で検討を行ったところ薄膜状のものがよかったので薄膜状のパッチを採用した．しかし，薄膜状パッチによる陽性率は，スクラッチテスト陽性者26名中6名（陽性率23％）と低かった．そこで，薄膜状のパッチにアレルゲンを載せシールする方法を用いたところ，スクラッチテスト陽性者16名中12名（陽性率75％）に陽性率は向上した．実用化に向けてさらに検討が必要と思われた．（工業技術センター機械電子研究所，富山大学医学部，同工学部との共同研究，平成18年度から19年度の2年計画）

(9) 検　査　状　況

（　）内項目数

部名	区分	行政検査	依頼検査
がん研究部	先天性代謝異常検査	10,067 (60,402)	
	染色体検査	46 (46)	99 (99)
	衛生動物検査	1,421 (15,239)	9 (9)
	小計	14,055 (72,135)	108 (108)
ウイルス部	感染源検査	931 (931)	43 (43)
	血清学的検査	1,624 (3,140)	
	小計	2,555 (4,071)	43 (43)
細菌部	感染症にかかわる検査	212 (411)	1 (1)
	食中毒にかかわる検査	93 (150)	
	食品検査	149 (269)	1 (1)
	水質検査	373 (864)	49 (56)
	小計	827 (1,694)	51 (58)
化学部	食品にかかわる検査	124 (2,166)	
	家庭用品検査	15 (20)	
	水質検査	116 (1,700)	42 (600)
	温泉分析	19 (250)	4 (120)
	小計	274 (4,136)	46 (720)
環境保健部	カドミウム環境汚染にかかわる地域住民健康調査	849 (3,156)	
	小計	849 (3,156)	

検　査　内　容

（　）内項目数

がん研究部

［行政検査］

1. 先天性代謝異常検査　10,067 (60,402)
2. 染色体検査
   (1) 血　液　32 (32)
   (2) 羊　水　11 (11)
   (3) 胎　児　3 (3)
3. 衛生動物等検査
   (1) 衛生・不快動物　1,419 (15,237)
   (2) 食品混入異物　3 (3)

［依頼検査］

1. 染色体検査
   (1) 血　液　32 (32)
   (2) 羊　水　53 (53)
   (3) 胎　児　14 (14)
2. 衛生動物等検査
   (1) 衛生・不快動物　4 (4)
   (2) 食品混入異物　5 (5)

ウイルス部

［行政検査］

1．感染源検査
   (1) インフルエンザ　357 (357)
   (2) ポリオ　61 (61)
   (3) その他ウイルス　199 (199)
   (4) リケッチア，その他　3 (3)
   (5) 食中毒　311 (311)
2．血清学的検査
   (1) インフルエンザ　ヒト　300 (1,200)
   (2) ポリオ　300 (900)
   (3) 日本脳炎　ヒト　298 (298)
   　　ブタ　428 (428)
   (4) エイズ　273 (274)
   (5) その他のウイルス　22 (22)
   (6) リッチケア，その他　3　18

［依頼検査］

1.感染源調査
   (1) ふん便等　43 (43)

細　　菌　　部

[行政検査]

1．感染症にかかわる検査		
(1) 結核菌	6	(10)
(2) 赤痢菌	6	(6)
(3) コレラ菌	1	(1)
(4) 腸管出血性大腸菌	90	(274)
(5) パラチフスA	1	(2)
(6) ジアルジア	2	(2)
(7) サイクロスポーラ	1	(2)
(8) 溶血性レンサ球菌	95	(95)
(9) 病原大腸菌	9	(18)
(10) ビブリオ・バルニフィカス	1	(1)
2．食中毒にかかわる検査		
(1) カンピロバクター	55	(71)
(2) 病原大腸菌	15	(42)
(3) サルモネラ	14	(28)
(4) セレウス菌	5	(5)
(5) 黄色ブドウ球菌	3	(3)
(6) ウエルシュ菌	1	(1)
3．食品検査		
(1) 収去検査	64	(96)
(2) 集団発生感染源検査	74	(148)
(3) 苦情食品	2	(4)
(4) その他	9	(21)
4．水質検査		
(1) 海水浴場水	80	(100)
(2) 海水	103	(106)
(3) 浴用水	64	(256)
(4) 水道水源水	60	(120)
(5) 深層水	28	(182)
(6) 名水	21	(75)
(7) 河川水	8	(16)
(8) 岩盤浴	9	(9)

[依頼検査]

1．感染症にかかわる検査		
(1) 病原微生物定性	1	(1)
2．食品検査	1	(1)
3．水質検査		
(1) 飲料水	1	(2)
(2) 海水浴場水	48	(54)

化　　学　　部

[行政検査]

1．食品にかかわる検査		
(1) 食品成分および添加物	69	(263)
(2) 残留農薬	25	(1,873)
(3) 重金属類	30	(30)
2．家庭用品検査		
(1) メチルアルコール	5	(5)
(2) テトラクロロエチレンおよびトリクロロエチレン	5	(10)
(3) デイルドリン	5	(5)
3．水質検査		
(1) 水質基準項目	26	(731)
(2) 管理目標設定項目	28	(289)
(3) 要検討項目	25	(301)
(4) ゴルフ場使用農薬	21	(282)
(5) その他	16	(97)
4．温泉分析		
(1) 中分析	3	(90)
(2) その他	16	(160)

[依頼検査]

1．水質検査		
(1) 水質基準項目	5	(96)
(2) 管理目標設定項目	4	(110)
(3) 要検討項目	4	(80)
(4) ゴルフ場使用農薬	21	(282)
(5) その他	8	(32)
2．温泉分析		
中分析	4	(120)

環　境　保　健　部

［行政検査］　　［依頼検査］

1．カドミウム環境汚染にかかわる地域住民健康調査

(1) 神通川流域住民健康調査

1次検診	尿検査	736	(1,472)
精密検診	尿，血液検査	109	(1,620)

(2) イタイイタイ病要観察者の管理検診

	尿，血液検査	0	(0)

(3) イタイイタイ病患者認定申請に基づく検査

	尿，血液検査	4	(64)

⑽　科学研究費補助金

研　究　課　題	所　属	研　究　者	補助金等事業名
寄生虫を生物標識として活用した海産栽培漁業種の生態解明	がん研究部	山内健生	文部科学省 基盤研究Ａ 分担研究者
一住宅において防蚊対策を行った場合の蚊成虫の捕集状況	がん研究部 ウイルス部	山内健生 小原真弓	厚生労働科学研究補助金　新興・再興感染症研究事業　節足動物媒介感染症の効果的な防除などの対策研究
富山県におけるつつが虫病に関する調査とマダニ類調査及び東海北陸地域のリケッチア感染症について	ウイルス部 がん研究部	倉田　毅 小原真弓 山内健生 渡辺　護 品川保弘 中村一哉 堀元栄詞 長谷川澄代 岩井雅恵 滝澤剛則	厚生労働科学研究費補助金　新興・再興感染症研究事業　リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築
富山県における蚊の発生調査（2003～2007年）とウイルス浸淫状況	ウイルス部 がん研究部	滝澤剛則 小原真弓 山内健生 渡辺　護 長谷川澄代 倉田　毅	厚生労働科学研究費補助金　新興・再興感染症研究事業　ウエストナイルウイルス侵入に備えての診断、予防対策への基盤的研究
感染症患者情報と病原体情報の評価について（非流行期のインフルエンザサーベイランス）	ウイルス部	倉田　毅 堀元栄詞	厚生労働科学研究費補助金　新興・再興感染症研究事業　効果的な感染症サーベイランスの評価並びに改良に関する研究
地方衛生研究所の疫学機能強化に関する研究	ウイルス部	堀元栄詞	厚生労働科学研究費補助金　健康安全・危機管理対策総合研究事業 地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究
バベシア原虫の宿主域決定機構の解明	ウイルス部	中村一哉	文部科学省 若手研究Ｂ 研究代表者
新生児マススクリーニングの精度管理体制に関する研究	がん研究部	九曜雅子	厚生労働科学研究費補助金　子ども家庭総合研究事業 タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児スクリーニング体制の確立に関する研究
畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究－腸炎ビブリオ－	細菌部	磯部順子	厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究	細菌部	磯部順子	厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）
地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的，疫学的調査解析機能の強化に関する研究	細菌部	倉田　毅 綿引正則 磯部順子	厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

研　究　課　題	所　属	研　究　者	補助金等事業名
先天性代謝異常症早期診断のための酵素チップの開発（迅速細菌診断法の開発と実用化研究）	細菌部	綿引正則	文部科学省　富山・高岡地域知的クラスター創成事業
病原体保管，輸送，廃棄における一括管理システムの開発	細菌部 ウイルス部	倉田　毅 滝澤剛則 綿引正則	厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
キラル配位子交換法の新展開－ボロスピラン形成に基づく光学分割法の開発	化学部	小玉修嗣	文部科学省（日本学術振興会） 基盤研究Ｃ 研究代表者
大量に排出される金属キレート剤が重金属の環境動態をどう変化させるか？	化学部	健名智子 小玉修嗣	文部科学省（日本学術振興会） 基盤研究Ｃ 研究代表者
シリカナノ細孔薄膜を利用した光学異性体分離精製膜の開発	化学部	山下智富	文部科学省 若手研究Ｂ 研究代表者
内蒙古フッ素汚染地域における血中ビタミンD3著高と骨吸収亢進に関する調査研究	環境保健部	新村哲夫 長瀬博文 堀井裕子	文部科学省 基盤研究Ｂ（海外学術） 研究代表者
西ジャワ農村部における水系の化学物質汚染と学童の健康に関する人類生態学的調査	環境保健部	新村哲夫 中崎美峰子	文部科学省 基盤研究Ｂ（海外学術） 分担研究者
深部体温，体動，心拍連続モニターによる食事・運動・睡眠の基本的生活習慣の包括評価	環境保健部	新村哲夫	文部科学省 基盤研究Ｂ 分担研究者

⑾　講　師　派　遣

主　題	講　師	会合名	年月日	場　所
地域看護学概論（公衆衛生学）	長瀬博文	富山県総合衛生学院 保健学科講義	平19.4.12	富山県総合衛生学院
狂犬病について	堀元栄詞	ネット３（CATV） 「健康サロン」	平19.5.11	立山町町民会館
公衆衛生の技術および産業保健	長瀬博文	厚生連高岡看護専門学校１年生	平19.5.15	厚生連 高岡看護専門学校
地域保健指導論（成人保健）	長瀬博文	富山県総合衛生学院 保健学科講義	平19.6.7,12,19	富山県総合衛生学院
地域看護学研究	長瀬博文	富山県総合衛生学院 保健学科実習	平19.6～ 平20.2年 数回	富山県総合衛生学院
地方衛生研究所における耐性菌検査の現状と課題	綿引正則	衛生微生物協議会 第28回研究会 シンポジウムⅠ 薬剤耐性菌	平19.7.6	岡山市
環境水ウイルス調査について	岩井雅恵	環境水のウイルス調査ワークショップ	平.19.7.23 ～28	中国 CDC
公衆衛生の技術および産業保健	長瀬博文	高岡市立看護専門学校２年生	平19.9.5	高岡市立看護専門学校

主　　題	講　　師	会　合　名	年　月　日	場　所
肥満体質遺伝子と生活習慣病について	田 中 朋 子	きらめきエンジニア事業	平19.9.7	龍谷富山高校
食品添加物の話	中山恵理子	きらめきエンジニア事業	平19.9.14	射水市立東明小学校
染色体，DNA について	林　美貴子	きらめきエンジニア事業	平19.10.1	富山市立堀川小学校
富山県の温泉の特徴について	高 柳 信 孝	第55回富山県高等学校教育研究発表大会	平19.10.3	富山県立富山工業高等学校
最近注目される感染症とその対応について	堀 元 栄 詞	平成19年度養護教諭1/5研修会	平19.11.27	富山県総合教育センター
公衆衛生学	長 瀬 博 文	富山県総合衛生学院第一看護学科講義	平19.11.6～11.27　週1回	富山県総合衛生学院
公衆衛生の技術および産業保健	長 瀬 博 文	高岡市医師会看護専門学校２年生	平19.11.29	高岡市医師会看護専門学校
感染症対策における衛生研究所の役割	倉 田　　毅	遠隔授業	平19.12.6	富山県立北部高等学校
ウイルスの特性について	堀 元 栄 詞	富山県消防学校救急科（第10期）講義	平19.12.7	富山県消防学校
中国内モンゴル学術調査について	新 村 哲 夫	富山湾に学ぶ会	平19.12.15	とやま市民交流館
機器分析学	小 玉 修 嗣	中部大学応用生物学部講義	平20.1.16	中部大学
「細菌ってなに？細菌の見つけ方，見分け方」	木 全 恵 子	きらめきエンジニア事業	平20.1.18	富山県立滑川高等学校
「がん」の発生と環境要因・生活習慣	品 川 保 弘	きらめきエンジニア事業	平20.2.22	富山県立となみ野高等学校
プレゼンテーションの進め方	長 瀬 博 文	富山県総合衛生学院保健学科講義	平20.2.26	富山県総合衛生学院
地域看護学研究報告会	長 瀬 博 文	富山県総合衛生学院保健学科講義	平20.3.3	富山県総合衛生学院

⑿ 研　修　指　導

所属および対象者	研修期間	研修内容	担当
立命館大学文学部人文学科地理学専攻 ４回生	平19.6.22	野外における蚊の調査方法について	がん研究部
富山大学医学部総合診療部実習	平19.6.25 平19.6.27	下水からのウイルス分離と遺伝子解析	ウイルス部
富山県協力交流研修員　張　　潔 （遼寧省疾病予防コントロールセンター）	平19.6.28～11.9	ウイルス分離、検査等の実技研修，及び感染症情報の流れについて研修	ウイルス部
高岡厚生センター受入れ 臨床研修医	平19.7.3 平19.8.6 平19.9.10	腸炎ビブリオ汚染実態調査に関る検査	細菌部
高岡厚生センター受入れ 臨床研修医	平19.7.11 平19.8.8 平19.9.12 平19.9.26 平19.10.24 平19.11.14 平19.12.12 平20.1.30	衛生研究所の役割を把握し HIV 検査を体験する	ウイルス部
夏休み子供科学教室	平19.7.24	細胞から遺伝子（DNA）を取り出してみよう	環境保健部
岐阜大学応用生物科学部獣医学科 ５回生	平19.9.3～14	ウイルス検査及び感染症媒介蚊の調査	ウイルス部
遼寧省環境観測センター　　金福杰	平19.10.23 ～10.26	海産物中の有機スズの測定について	化学部

⒀ 研　修　受　講

受講者氏名	研修期間	研修内容	研修機関	講師所属氏名
倉田　毅 綿引正則 磯部順子 堀元栄詞 嶋　智子 中村一哉	平19.7.5 ～6	衛生微生物技術協議会 第28回研究会	ピュアリティまきび（岡山市）	国立感染症研究所 宮村達男　他
本田幸子 林　美貴子	平19.8.25 ～26	第14回臨床細胞遺伝学セミナー	家の光会館(東京都)	日本人類遺伝学会 東京医科歯科大学 池内達郎　他
小玉修嗣	平19.9.30 ～10.6	脂質分析法	北海道大学大学院 水産学研究院 海洋生物資源化学分野	北海道大学教授 板橋　豊
中村一哉 金谷潤一	平19.10.6 ／10.20 ／11.3	第5回富山県院内感染対策担当者養成研修	富山県医師会館	長崎大学医学部 安岡彰　他
木全恵子	平19.10.22	バイオリスク評価と輸送に関するワークショップ	国立感染症研究所 （東京都）	国立感染症研究所 杉山和良　他
堀元栄詞	平19.11.2	平成19年度動物由来感染症対策（狂犬病予防含む）技術研修会	JA ホール （東京都）	厚生労働省 梅田浩史　他

受講者氏名	研修期間	研　修　内　容	研 修 機 関	講師所属氏名
中 村 一 哉	平19.11.6 ～7	地方衛生研究所東海北陸ブロック微生物部門研修会	名古屋市衛生研究所	国立感染症研究所 小田切孝人　他
中 村 一 哉	平19.11.9	平成19年度 HACCP 講習会	富山県民会館	富山県西部家畜保健衛生所　台蔵正司 富山県西部家畜保健衛生所　後藤利隆
嶋　　智 子	平19.11.12 ～30	特別課程　細菌コース	国立保健医療科学院	国立感染症研究所 伊藤健一郎　他
中 村 一 哉 滝 澤 剛 則	平19.11.22	高病原性鳥インフルエンザ東西合同防疫机上演習	富山県東部家畜保健衛生所	富山県東部家畜保健衛生所　新田正憲　他
岩 井 雅 恵 金 谷 潤 一	平20.2.19 ～20	平成19年度希少感染症診断技術研修会	国立感染症研究所（東京都）	国立感染症研究所 宮村達男　他
磯 部 順 子 嶋　　智 子 清 水 美 和 子	平20.2.20	平成19年度臨床衛生検査研修会	サンシップとやま（富山市）	金沢大学大学院医学系研究科　井関基弘

⑭ 客 員 研 究 員 招 へ い

客員研究員氏名	所　属　職　名	招へい期間	指　導　内　容　等
三　浦　恭　之	東海大学大学院 理学研究科 教授	平19.10.30～31	衛生化学領域におけるイオンクロマトグラフ分析法について

⑮ セ ミ ナ ー の 開 催

衛生研究所、薬事研究所、環境科学センター　3研究機関合同セミナー

演　　題	講師氏名	所　属　職　名	年　月　日
イオンクロマトグラフ分析法について	三 浦 恭 之	東海大学大学院 理学研究科 教授	平19.10.30

⑯ 各 種 規 程 等

名　　称	施　行	最 終 改 訂
放射線障害予防規程	昭和44年 8月 1日	
実験動物管理運営規程・動物実験施設利用規程	昭和59年 4月 1日	平成14年 9月 1日
病原体等安全管理規程	平成10年 4月 1日	平成17年 7月 1日
毒物及び劇物取扱い規程	平成11年 4月 1日	平成12年12月15日
機種選定委員会要綱	平成13年 7月 1日	
研究評価実施要領	平成15年 5月28日	
倫理審査委員会設置要綱	平成15年 5月28日	
組換えＤＮＡ実験安全管理規程	平成15年 9月18日	
競争的研究資金等に関する取扱規程	平成19年11月15日	
感染症発生予防規程	平成19年 6月 1日	

富山県における新生児マス・スクリーニングの成果について
（平成19年度の検査成績）

九曜雅子　　米田　豊　　前多隆志　　向野勝美[1]

Results of the Neonatal Mass-Screening in Toyama Prefecture
(April 2007～March 2008)

Masako KUYO, Yutaka YONEDA, Takashi MAEDA and Katsumi MUKAINO[1]

要 旨　平成19年度の検体総数は10,067件で，スクリーニングの結果，先天性甲状腺機能低下症の患者8人，先天性副腎過形成症の患者1人および高フェニルアラニン血症の患者1人が発見された．また，平成12年度に先天性副腎過形成症と診断された患者は、その後のフォローアップの結果，一過性の副腎不全であったことが判明した．これで，スクリーニング開始当初から現在までの患者数は，代謝異常症が31年間で39人（フェニルケトン尿症5人，メイプルシロップ尿症1人，ホモシスチン尿症0人，ガラクトース血症0人，ヒスチジン血症33人），先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）が28年間で123人，先天性副腎過形成症が19年間で12人となった．また，その他の疾病については，今年度までに，高フェニルアラニン血症12人，チロジン血症2人，グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD）異常症2人，シトリン欠乏症2人が発見されている．

先天性代謝異常マス・スクリーニングは，昭和52年4月に厚生省母子保健事業の一環として導入され，都道府県および政令市が主体となり，代謝異常症の早期発見，早期治療により心身の障害を未然に防止するという目的で実施されてきた．富山県では，昭和52年10月より富山県先天性代謝異常等検査事業実施要綱に基づき，検査料公費負担で，フェニルケトン尿症等6疾病を対象に検査を実施している．平成19年度のスクリーニング結果について報告する．

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，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19年4月より，平成20年3月までの検査実施状況をまとめた．

4．スクリーニング方法

(1) 検査検体

県内の各医療機関において採血された濾紙血液を用いた．

(2) 検査方法

①アミノ酸代謝異常症

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により，濾紙血中のフェニルアラニン，ロイシンおよびメチオニンを迅速分析法（7分法）で測定した[1,2].

②ガラクトース血症

Microplate・酵素法（バイエルメディカル社製キット「GAL-R」使用）により，濾紙血中のガラクトースを測定した．ガラクトースの抽出には，トランスファープレートを使用する改良法[3]を用いた．また，全検体について，自家調製試薬[4]による Beutler 法で，Galactose-1-phosphate uridyl transferase 活性の有無を検査した．なお，判定用の濾紙は，短時間でも判定可能である Watman DE81を使用した[5].

③先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）

ELISA（栄研化学社製キット「クレチン TSH ELISA Ⅱ'栄研'」使用）による TSH（Thyroid stimulating hormone）値の測定を行った．

1．富山県厚生部健康課

表１．判定基準

対象疾病	検査法	測定物質	判定基準値	
			疑陽性	緊急に精密検査が必要
フェニルケトン尿症	HPLC	Phenylalanine (Phe)	≧2.0mg/dl	
ホモシスチン尿症	HPLC	Methionine (Met)	≧1.0mg/dl	
メイプルシロップ尿症	HPLC	Leucine (Leu)	≧3.0mg/dl	≧7.0mg/dl
ガラクトース血症	Microplate 酵素法 ボイトラー法	Galactose (Gal) Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase	≧3.0mg/dl 蛍光がない	Gal 3.0mg/dl 以上でボイトラー法で蛍光がない
先天性甲状腺機能低下症（クレチン症）	ELISA	Thyroid-Stimulating Hormone (TSH)	≧8.0μU/ml	≧30μU/ml
先天性副腎過形成症	ELISA	17-α-Hydroxy Progesterone (17-OHP)	直接法 ≧10ng/ml 抽出法 ≧3.0ng/ml	直接法10ng/ml 以上で何らかの症状がある

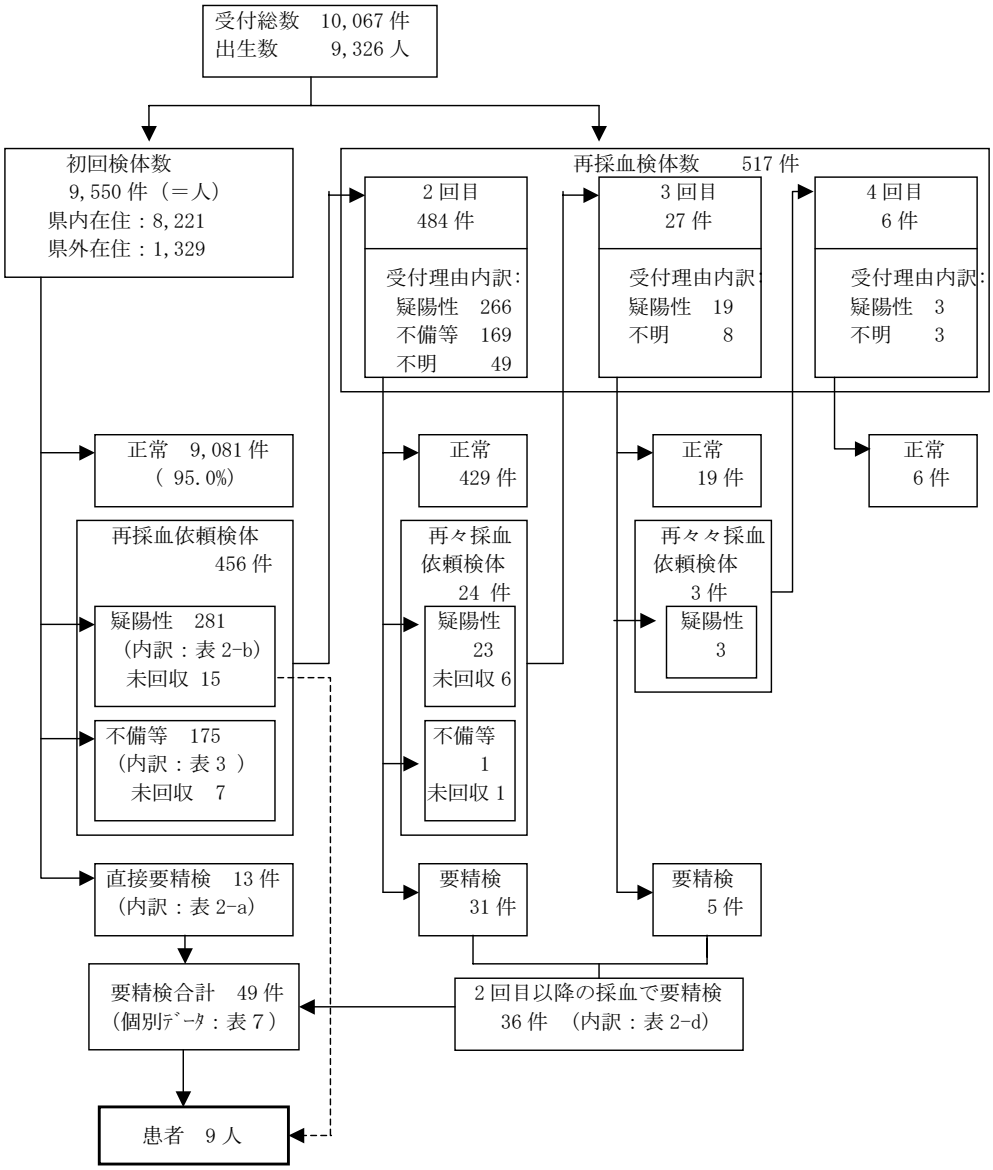


図１．検査の流れおよび検査件数の概要

④先天性副腎過形成症

ELISA（栄研化学社製キット「17-OHP D-ELISA '栄研'Ⅱ」使用）による17-OHP（17-Hydoxy progesterone）値の測定を行った.

(3) 検体のサンプリング

栄研化学社製血液濾紙自動パンチャー「RP-96」で，検体をマイクロプレートにサンプリングした.

(4) 判定基準

表1に示した.

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

(5) 結果報告

毎週金曜日に，その前週の月～金曜日に受付したすべての検体の検査結果を各医療機関に郵送で報告した.

(6) データ処理

検査検体の受付事務処理，検査結果の報告，月報集計，年度集計などのデータ管理は，当所で開発した動的データ管理システム[6]を用いた.

結　　果

1．検査実施状況

(1) 検査件数と検査結果の概要

今年度の受付総数は，10,067件で，県内42か所の医療機関（おもに産婦人科医院）より送付されてきたものである.

図1に検査の流れと検査件数の概要を示した．今年度の出生数は9,326人であり，初回検体数9,550件(人)から計算すると受検率は102.4%となるが，初回検体のうち県内在住者は8,221人，県外在住者は1,329人であることから，いわゆる「里帰り分娩」を含めない受検率は88.2%であった．また，県内在住者が他県で受検するケースも考えられるため，県内の新生児のほとんどが，この検査を受けているものと思われる.

初回検体のうち9,081件 (95.0%) は正常と判定されたが，281件(2.9%)は疑陽性のため，175件(1.8%)は採血後日数が経っている等の不備検体のため，再採血を依頼した．また，13件(0.1%)は初回検査で直ちに精密検査が必要（直接精査）と判定された．また，疑陽性で再採血を依頼したが回収できなかった検体のうち，病院での再検査の結果，患者と診断された例（図1:点線）が1件あった。

再採血検体として受付した517件のうち，31件(6.0%)は要精検と判定され，直接精査分と合わせ，計49件が要精検となった.

(2) 疑陽性による再採血

表2に疾患別の疑陽性による再採血依頼数を示した．再採血率は代謝異常症4疾患で0.6%，クレチン症は1.4%および副腎過形成症は1.2%となり，合計3.2%であった．なお，再採血率の目安は代謝異常症4疾患で0.5%程度，クレチン症は0.5～1.0%，副腎過形成症は0.3～0.5%で6項目合わせて2%程度が適当とされてい

表２．疑陽性による再採血依頼数および要精密検査検体数の内訳

	採血回数					総受付検体		
	初回			2回以上				
	直接精査 (a)	疑陽性による再採血依頼数 (b)	再採血率 (%) (c)	要精検数 (d)	疑陽性による再採血依頼数 (e)	要精検合計〔患者数〕 (f)=(a)+(d)	疑陽性総件数 (g)=(b)+(e)	再採血率 (%) (h)
フェニルケトン尿症	0	5	0.05	1	0	1	5	0.05
ホモシスチン尿症	0	4	0.04	3	4	3	8	0.08
メイプルシロップ尿症	0	12	0.13	1	1	1	13	0.13
ガラクトース血症	0	36	0.38	1	2	1	38	0.38
クレチン症	7	131	1.37	15	5	22〔8〕	136	1.35
副腎過形成症	6	103	1.08	15	15	21〔1〕	118	1.17
（うち低体重児数）	(6)	(51)		(9)	(11)	(15)	(62)	
合計 《うち2疾患以上の重複数》	13	291 《10》	3.05	36	27 《1》	49〔9〕	318 《11》	3.16

〔 〕：患者数

表３．疑陽性で再採血を依頼し回収できなかったが，病院で再検査され、患者と診断された例

症例（男児）	日齢	結果および経過
	5	総合病院産婦人科で採血
	9	検体受付
		検査結果　TSH　30.5　μU/ml 27.1
	11	検査結果の連絡、再採血要求
	54	再採血検体が届かないため再要求
	81	担当医から連絡
		初回検査結果判明後同病院小児科で検査 クレチン症として治療中

表４．疑陽性以外の理由による再採血依頼

不備理由	初回検体のみ	総受付検体
3日以内に採血	5	5
濾紙の汚染	1	1
血液量不足	5	5
古い	12	13
哺乳不良	24	24
低体重、哺乳不良	10	10
低体重	118	118
合計	175	176

る[7]．これに比較すると，今年度は副腎過形成症の再採血率が2〜3倍高くなったが，表2に示したように，疑陽性で再採血依頼した例のうち約半数が，17-OHPが高値となりやすい低出生体重児であったためと考えられた．

また，1検体で2疾患以上が同時に疑陽性となった検体が 9件あった．2疾患での疑陽性は，フェニルケトン尿症と副腎過形成症が1件，ガラクトース血症とクレチン症が2件，ガラクトース血症と副腎過形成症が1件，クレチン症と副腎過形成症が3件であった．3疾患での疑陽性が2件で，フェニルケトン尿症とホモシスチン尿症とガラクトース血症が1件，フェニルケトン尿症とホモシスチン尿症とクレチン症が1件であった．

疑陽性のため再採血を依頼した件数は合計307件で，そのうち，平成19年6月20日現在286件の再採血検体を回収した．回収率は93.2%であった．再採血を依頼しても１か月以上検体が送られてこない場合は再依頼しているが，疑陽性で再採血依頼し回収できなかった症例のうち，結果報告時には死亡していた例が2件，病院で再検査された例が6件あった．また，前述したように、病院での再検査の結果，クレチン症と診断された例が1例あった．この症例の結果および経過を表3に示した．その他の未回収検体のほとんどは，NICUや小児科からの送付された検体であり，これらについては医療機関でフォローアップされていると考えられる．

(3) 疑陽性以外の理由による再採血

表4に疑陽性以外の理由による再採血依頼数を示した．3日以内に採血された検体が5件，濾紙の汚染が1件，血液量が不足している検体が5件，採血後日数が経ち過ぎている古い検体が13件（最長 13日）あった．古い検体のうち，7日以上経って当所に届いた分は，いずれも連休明けや年末年始の休暇明けに受付した検体であった．

2,000g未満の低出生体重児については，体重が2,500ｇに達した時か，１か月時のうち，いずれか早い時期に再採血を依頼している．今年度は128件に対

して再採血を依頼した．このうち哺乳不良が10件あった．また，哺乳不良のみの検体は24件であった．

疑陽性以外の理由で再採血を依頼した検体の総数は176件で，このうち再検査できたのが168件（回収率95.5%）であった．

(4) 月および年度別推移並びに全国結果との比較

検査実施状況の月別比較，年度推移並びに全国集計との比較をそれぞれ表5，表6および表7に示した．

なお,全国集計は，特殊ミルク情報[8,9,10]より数を訂正し引用した．富山県における現在までの患者発見率は，検査対象の代謝異常症が1/8,800，クレチン症が1/2,600，副腎過形成症が1/16,700である．全国の患者発見率と比較すると，クレチン症の発生頻度が有意に高いといえる($P<0.01$).

２．要精密検査者の検査結果

今年度の疑陽性人数は，代謝異常症が64人，クレチン症が136人，先天性副腎過形成症が118人であった．このうち，精密検査の必要が認められたのは，代謝異常症6人，クレチン症22人，先天性副腎過形成症21人であった．

表8に要精密検査者の検査状況と結果をまとめた．当所では，精密検査が必要となった場合には，スクリーニング結果連絡の際に，診断結果記入用紙を同封し，治療病院名，主治医名，精密検査の結果及び診断名を記入し返送してもらうシステムをとっている．この回収率は，89.8%（44例/49例）であった．表8には，主治医から報告された診断名を示した．

また，当所では，要精密検査者のフォローアップ検体を受け入れているが，今年度の49例のうちでは，25例についてフォローアップ検査を行った．

(1) 代謝異常症

フェニルケトン尿症の疑いで1人，　ホモシスチン尿症の疑いで3人，メイプルシロップ尿症の疑いで1人，ガラクトース血症の疑いで1人が要精密検査となった．

フェニルケトン尿症の疑いの症例は，血中，尿中プテリジン分析を行った結果，フェニルアラニン水酸化酵素の異常による軽症高フェニルアラニン血症と診断された．

ホモシスチン尿症の疑いの症例1および2は，当所にフォローアップ検体が送付されてきており，経過観察中である．

ガラクトース血症の疑いの症例は，初回検査ではフェニルアラニンとメチオニンも高値であり，再検査の結果でも，初回検査と同様にフェニルアラニン，メチオニンも高く，ガラクトースについては異常に高値となった．シトリン欠損症の可能性も考えられたため，ガラ

表５．月別検査実施状況

年			平成19年									平成20年			計
月			4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
受付検体総数（件）			778	939	801	827	855	826	938	851	744	896	821	791	10,067
内訳	初回検査数（件）		733	894	742	787	820	782	898	814	698	858	787	737	9,550
	再採血総数（件）		45	45	59	40	35	44	40	37	46	38	34	54	517
	再採血内訳	2回目	39	44	55	35	34	43	38	31	45	35	33	52	484
		3回目	5	1	3	4	1	1	2	5	1	3	1	0	27
		4回以上	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	2	6
疑陽性件数（要精検数）	フェニルケトン尿症		1	1	0	0	0	0	0	2(1)	0	1	0	0	5(1)
	ホモシスチン尿症		0	0	0	0	0	0	1	3(1)	2(1)	2(1)	0	0	8(3)
	メイプルシロップ尿症		0	0	0	1	0	1	0	4(1)	2	2	1	2	13(1)
	ガラクトース血症		2	1	7	5	3	2	2	3	3(1)	3	5	2	38(1)
	クレチン症		13(2)	11(2)	15	5(2)	16(5)	12(1)	10(4)	9(1)	11	13(2)	8(1)	13(2)	136(22)
	副腎過形成症		6	14	12(3)	10(1)	5(1)	6(1)	5(2)	7(1)	13(5)	14(3)	13(3)	13(1)	118(21)
計			22(2)	27(2)	34(3)	21(3)	24(6)	21(2)	18(6)	28(5)	31(7)	35(6)	27(4)	30(3)	318(49)

表６．先天性代謝異常等検査実施状況

区分	受付総数	検査実人員数	出生数	受検率	疑陽性数			要精検数		
期間	（件）	（人）	（人）	（%）	代謝異常症	クレチン症	副腎過形成症	代謝異常症	クレチン症	副腎過形成症
昭和52年度～54年度	29,229	28,450	39,688	71.7	262	－	－	6(4)	－	－
昭和55年度～63年度	122,841	115,435	116,956	98.7	1,811	841	－	75(27)	130(25)	－
平成元年度～13年度	150,397	140,790	132,255	106.5	2,148	1,937	1,182	130(7)	354(60)	207(11)
平成14年度	11,216	10,506	9,766	107.6	42	167	159	8(0)	27(3)	22(0)
平成15年度	11,046	10,374	9,509	109.1	52	134	98	8(0)	25(4)	13(0)
平成16年度	10,582	10,003	9,168	109.1	30	112	90	4(1)	16(4)	7(0)
平成17年度	10,382	9,827	9,079	108.2	33	131	123	8(0)	26(13)	8(0)
平成18年度	10,216	9,711	9,445	102.8	39	135	95	5(0)	25(6)	10(0)
平成19年度	10,067	9,550	9,326	102.4	64	136	118	6(0)	22(8)	21(1)
計	365,976	344,646	345,192	－	4,481*	3,593	1,865	250*(39**)	625(123)	288(12)

（　）は，対象疾病患者数
＊，＊＊：昭和52年度～平成5年度分のヒスチジン血症の数（疑陽性137人，要精検39人，患者33人）を含む
＊　＊：この他に対象疾病以外の患者18人あり（高フェニルアラニン血症12人，チロジン血症2人，G6PD 異常症2人，シトリン欠乏症2人）

表７．マススクリーニングによる全国および富山県の患者発見状況

区分	富山県				全国	
期間	平成19年度		昭和52年度～平成19年度		昭和52年度～平成18年度	
受検者数	9,550人		344,646人		37,934,967人	
患者数，発見率 / 疾病名	患者数（人）	発見率	患者数（人）	発見率	患者数（人）	発見率
フェニルケトン尿症	0		5	1/ 68,900	498	1/ 76,200
ホモシスチン尿症	0		0		189	1/200,700
ヒスチジン血症	——		33	1/ 6,000[1]	2,200	1/ 9,600[4]
メイプルシロップ尿症	0		1	1/344,600	76	1/499,100
ガラクトース血症	0		0		1,043	1/ 36,400
クレチン症	8	1/1,200	123	1/ 2,600[2]	10,064	1/ 3,400[5]
先天性副腎過形成症	1	1/9,600	12	1/ 16,700[3]	1,328	1/ 16,500[6]

1) 昭和52年度～平成 5年度 受検者数 197,180人
2) 昭和55年度～平成19年度 受検者数 316,196人
3) 平成元年度～平成19年度 受検者数 200,761人
4) 昭和52年度～平成 4年度 受検者数 21,119,892人
5) 昭和54年度～平成18年度 受検者数 34,594,583人
6) 昭和63年度～平成18年度 受検者数 23,070,781人

表８．要精検患者の検査状況と結果（１）

疾病名	症例	患者	性別	日令	検査成績	診断名等
ﾌｪﾆﾙｹﾄﾝ尿症	1	*	男	5	Phe 2.09 mg/dl 2.095	高フェニルアラニン血症（軽度）
				13	Phe 2.20 mg/dl 2.42 2.495	
ﾎﾓｼｽﾁﾝ尿症	1		女	4	Met 0.47 mg/dl	乳児一過性高メチオニン血症の疑い
				30	Met 1.27 mg/dl 1.19	
				36	Met 1.12 mg/dl 1.15	
	2		男	6	Met 1.40 mg/dl 1.31	高メチオニン血症で経過観察中
				12	Met 1.33 mg/dl 1.53 1.27	
	3		女	11	Met 1.15 mg/dl 1.165	経過観察中
				16	Met 1.56 mg/dl 1.45 1.28	
ﾒｲﾌﾟﾙｼﾛｯﾌﾟ尿症	1		女	7	Leu 3.02 mg/dl 3.26	異常なし
				17	Leu 3.00 mg/dl 3.18	
ｶﾞﾗｸﾄｰｽ血症	1		女	5	Phe 3.18、3.33 mg/dl Met 1.04、1.09 mg/dl Gal 3.52、2.93 mg/dl	死亡（染色体異常あり）
				13	Phe 3.56、4.37 mg/dl Met 1.34、1.68 mg/dl Gal 9.67、8.52 mg/dl	
クレチン症	1		男	6	TSH 9.42 μU/ml 8.78	クレチン症疑い（または一過性甲状腺機能低下症）
				15	TSH 10.76 μU/ml 9.25	
	2		男	5	TSH 11.15 μU/ml 10.27	一過性高TSH血症
				14	TSH 11.83 μU/ml 11.915	
	3		女	23	TSH 42.67 μU/ml 45.21 17-OHP 40.30ng/ml 17-OHP 6.72ng/ml 直接法 42.76 抽出法	経過観察中
	4	*	男	5	TSH132.34 μU/ml	クレチン症、ダウン症
	5		女	6	TSH 15.50 μU/ml 13.66	他疾患疑い
				10	TSH 19.07 μU/ml 20.54	
	6		男	5	TSH 10.36 μU/ml 10.5	高TSH血症または軽症クレチン症
				12	TSH 8.38 μU/ml 8.15	
				30	TSH 8.72 μU/ml 10.0	
	7	*	女	5	TSH 4.93 μU/ml 4.44	甲状腺機能低下症

表８．要精検患者の検査状況と結果（２）

疾病名	症例	患者	性別	日令	検査成績	診断名等
					17-OHP 3.28ng/ml 直接法 2.70	
クレチン症	7	*	女	32	TSH345.12 μU/ml 17-OHP 93.8 ng/ml 17-OHP27.88ng/ml 直接法 抽出法	甲状腺機能低下症
	8		男	31	TSH175.96 μU/ml 17-OHP214.64ng/ml 17-OHP26.60ng/ml 直接法 抽出法	経過観察中
	9		男	4	TSH 9.76 μU/ml 8.54	一過性高TSH血症
				12	TSH 9.22 μU/ml 10.535	
	10	*	男	5	TSH 8.16 μU/ml 8.45	クレチン症
				15	TSH 22.20 μU/ml 22.745 22.28	
	11		男	5	TSH 8.96 μU/ml 9.88	高TSH血症疑い
				10	TSH 12.83 μU/ml 12.215 11.13	
	12		女	5	TSH 53.82 μU/ml 47.11 42.5	一過性高TSH血症
	13		男	5	TSH 8.75 μU/ml 9.29 8.82	新生児一過性高TSH血症の疑い
				9	TSH 9.25 μU/ml 10.10 9.19	
	14	*	女	5	TSH 41.81 μU/ml 42.71	クレチン症
	15		男	5	TSH 11.59 μU/ml 13.39	一過性高TSH血症
				12	TSH 10.14 μU/ml 9.51	
	16	*	女	6	TSH126.9 μU/ml	クレチン症
	17		男	5	TSH 8.89 μU/ml 8.65	一過性甲状腺機能異常症
				11	TSH 10.15 μU/ml 11.40 9.55	
	18		男	12	TSH 8.98 μU/ml 9.30 10.7	正常
				19	TSH 11.47 μU/ml 11.41 11.17	
	19		女	5	TSH 8.19 μU/ml 9.20	経過観察中
				15	TSH 6.57 μU/ml 17-OHP 3.30ng/ml 6.55 抽出法	
				22	TSH 15.45 μU/ml	

表８．要精検患者の検査状況と結果（３）

疾病名	症例	患者	性別	日令	検査成績	診断名等
					14.05 13.29	
クレチン症	20	*	男	7	TSH 12.57 μU/ml　Gal 11.90 mg/dl 10.62　12.3	クレチン症
				18	TSH 10.56 μU/ml　Gal 5.45 mg/dl 10.72　5.63 11.60	
	21	*	男	5	TSH340μU/ml以上	クレチン症
	22		男	5	TSH 8.13 μU/ml 8.58	乳児一過性高TSH血症（疑）
				14	TSH 12.71 μU/ml 12.61 12.90	
先天性副腎過形成症	1		男	8	17-OHP 12.03ng/ml　17-OHP 3.84ng/ml 直接法 12.125　抽出法	正常 在胎週数 33 週 生下時体重 1952 g
				14	17-OHP 15.40ng/ml　17-OHP 5.13ng/ml 直接法 12.09　抽出法	
	2		男	5	17-OHP 7.06ng/ml　17-OHP 3.07ng/ml 直接法 8.01　抽出法	超低出生体重児 在胎週数 27 週 生下時体重 930 g
				33	17-OHP 10.76ng/ml　17-OHP 3.41ng/ml 直接法 10.27　抽出法	
	3		女	8	17-OHP 11.22ng/ml　17-OHP 5.26ng/ml 直接法 10.46　抽出法	経過観察中 在胎週数 33 週 生下時体重 2240 g
				16	17-OHP 7.08ng/ml　17-OHP 3.19ng/ml 直接法 7.26　抽出法	
				23	17-OHP 5.72ng/ml　17-OHP 4.68ng/ml 直接法 6.96　抽出法	
	4		女	5	17-OHP 17.37ng/ml　17-OHP 8.39ng/ml 直接法 14.78　抽出法	超低出生体重児 在胎週数 27 週 生下時体重 902 g
				30	17-OHP 30.78ng/ml　17-OHP12.06ng/ml 直接法 31.53　抽出法 29.98	
	5	*	女	5	17-OHP 6.01ng/ml　17-OHP 3.25ng/ml 直接法 7.77　抽出法	先天性副腎過形成症（非古典的） 在胎週数 38 週 生下時体重 3058 g
				10	17-OHP 11.17ng/ml　17-OHP 6.96ng/ml 直接法 11.04　抽出法 12.22	
	6		男	8	17-OHP 38.14ng/ml　17-OHP10.56ng/ml 直接法 48.60　抽出法	正常 在胎週数 27 週 生下時体重 995 g
	7		男	10	17-OHP152.28ng/ml　17-OHP26.9 ng/ml 直接法　抽出法	経過観察中 在胎週数 25 週 生下時体重 853 g
	8		女	8	17-OHP 11.02ng/ml　17-OHP 1.55ng/ml 直接法 11.55　抽出法	正常 在胎週数 27 週 生下時体重 1186 g
				11	17-OHP 24.09ng/ml　17-OHP 6.98ng/ml 直接法 25.06　抽出法	
	9		女	7	17-OHP114.58ng/ml　17-OHP60.9 ng/ml 直接法　抽出法	正常 在胎週数 23 週 生下時体重 579 g
	10		男	4	17-OHP 10.53ng/ml　17-OHP 3.30ng/ml 直接法 13.36　抽出法	経過観察中 在胎週数 38 週 生下時体重 2690 g
				10	17-OHP 11.57ng/ml　17-OHP 3.68ng/ml 直接法 11.78　抽出法 13.02	

表８．要精検患者の検査状況と結果（４）

疾病名	症例	患者	性別	日令	検査成績	診断名等
先天性副腎過形成症	11		女	5	17-OHP 10.16ng/ml 17-OHP 2.87ng/ml 直接法 11.44 抽出法	正常 在胎週数 31.3 週 生下時体重 935 g
				31	17-OHP 13.32ng/ml 17-OHP 4.45ng/ml 直接法 11.44 抽出法	
	12		男	5	17-OHP 17.65ng/ml 17-OHP 4.66ng/ml 直接法 18.65 抽出法	異常なし 在胎週数 25 週 生下時体重 920 g
				33	17-OHP 45.84ng/ml 17-OHP11.36ng/ml 直接法 41.41 抽出法 44.665	
	13		男	5	17-OHP 77.52ng/ml 17-OHP14.53ng/ml 直接法 73.26 抽出法	経過観察中 在胎週数 26 週 生下時体重 1002 g
	14		男	5	17-OHP 12.75ng/ml 17-OHP 2.85ng/ml 直接法 12.43 抽出法	先天性副腎過形成症の疑い 在胎週数 34 週 生下時体重 2226 g
				13	17-OHP 10.83ng/ml 17-OHP 3.71ng/ml 直接法 10.56 抽出法	
	15		女	5	17-OHP 9.95ng/ml 17-OHP 3.16ng/ml 直接法 11.48 抽出法	正常 在胎週数 36 週 生下時体重 2618 g
				13	17-OHP 19.44ng/ml 17-OHP 4.48ng/ml 直接法 18.27 抽出法	
				21	17-OHP 18.71ng/ml 17-OHP 6.36ng/ml 直接法 18.51 抽出法	
	16		男	10	17-OHP 14.38ng/ml 17-OHP 3.76ng/ml 直接法 16.62 抽出法	経過観察中 在胎週数 28 週 生下時体重 1037 g
				49	17-OHP 16.72ng/ml 17-OHP 3.99ng/ml 直接法 17.00 抽出法	
	17		男	9	17-OHP 24.53ng/ml 17-OHP11.65ng/ml 直接法 23.28 抽出法	正常 在胎週数 24.2 週 生下時体重 620 g
				30	17-OHP 93.44ng/ml 17-OHP23.69ng/ml 直接法 抽出法	
	18		男	7	17-OHP 15.55ng/ml 17-OHP 6.04ng/ml 直接法 14.62 抽出法	正常 在胎週数 26.3 週 生下時体重 944 g
				30	17-OHP 79.39ng/ml 17-OHP13.84ng/ml 直接法 82.97 抽出法	
	19		男	5	17-OHP 13.97ng/ml 17-OHP 3.17ng/ml 直接法 14.33 抽出法	経過観察中 在胎週数 33 週 生下時体重 2110 g
				9	17-OHP 11.54ng/ml 17-OHP 3.73ng/ml 直接法 12.71 抽出法	
	20		男	5	17-OHP120.22ng/ml 17-OHP22.32ng/ml 直接法 抽出法	正常 在胎週数 30.6 週 生下時体重 1094 g
	21		女	7	17-OHP 66.9 ng/ml 17-OHP11.94ng/ml 直接法 抽出法	正常 在胎週数 28 週 生下時体重 1031 g

クトース血症の疑いで要精検とした．後に主治医からの連絡があり，この症例は検査結果の連絡を受けた後に死亡したが，染色体異常（13-トリソミー）があり，シトリン欠損もあったであろうとのことであった．

(2) クレチン症

要精密検査となった22人のうち，患者と診断されたのは，症例4，7，10，14，16，20，21の7人であった．この中で初回検査で直接精査となったのは，症例4，14，16，21であった．

症例6は，再検査でTSH値が低下傾向にあったものの，カットオフ値よりもわずかに高い値であったため再々検査を行った．その結果，TSH値は低下しておらず，要精密検査とした．医療機関での検査の結果，TSHは上昇しており，高TSH血症またはクレチン症の疑いで経過観察されている．

症例10および20は，初回検査時のTSH値がカットオフ値（8μU/ml）付近で発見された患者であった．

症例21は，兄（H13生）が橋本病である母親からの移行抗体が原因の甲状腺機能低下症であり，この症例も生後5日目の初回検査の結果TSHは異常高値で，結果連絡時にはすでに治療が開始されていた．両大腿骨遠位骨端核の出現はないとのことであった．

また，要精密検査となった症例のうち，低体重児例が4例あり，そのうちの2例が患者と診断されている．

症例5は，1,000g未満の極小未熟児であり，TSH高値のため治療開始されているが，未だ患者と診断されていない．患者と診断されている症例でも経過を追っていくと一過性と診断される例もあることから，これらの症例については，継続的に追跡調査を行うことが必要である．

(3) 副腎過形成症

要精検となった21人のうち，15人が2,000g以下の低出生体重児であった．

症例5は，初回検査の抽出法での17-OHP値がカットオフ値付近の低い値であったが，精密検査の結果，21-水酸化酵素の一部欠損による非古典型副腎過形成症と診断された．

3．精度管理

精度管理センターから毎月10件ずつ送付されてくる精度管理検体については，アミノ酸，ガラクトース，TSH，17-OHPの異常検体は全てカットオフ値以上で拾い上げられており，見逃しはなかった．また，事務処理上の記入もれ，記入間違いもなかった．

また，昨年度に引き続き，ブラインドサンプルによる外部精度管理[11，12]を実施した．今年度は，3検体が2ヶ所の病院から送付された．異常検体だけではなく正常検体も含まれていた．異常検体については，異常項目を見逃すことなく発見し，迅速に確実に病院に連絡した．正常検体については，一般検体の結果とともにまとめて病院に報告した後に，病院からの報告によりブラインドサンプルと判った．そのため，異常検体の場合よりもブラインドサンプルと判明するまで時間がかかった．

考　　察

今年度に発見された先天性副腎過形成症の患者は，17-OHPが疑陽性のカットオフ値よりわずかに高い値で発見された非古典型の患者であった．また，クレチン症の患者でもカットオフ値付近で発見された例があるため，カットオフ値の設定は慎重に行う必要があると考える．新生児マス・スクリーニングの使命は，疾病の罹患率，死亡率を減少させること，疾病によってもたらされる機能不全の防止または軽減することすなわち患者のQOL（Quality of Life）を改善することにある．したがって，可能な限りこれらのような非典型的な患者でも発見できるような検査体制を構築することが必要であろう．

さらに，今年度は，疑陽性で再採血を要求したが検体が届かないため問い合わせた結果，病院で精密検査されており，患者と診断された例があった．また，一過性としてフォローアップされていた症例が遺伝子検査で患者と判明した例や，患者と診断されていた症例が一過性であった例なども経験しており，可能であれば，マス・スクリーニングで異常を示したすべての例について継続的なフォローアップが必要であると感じた．

文　　献

1．米田　豊，九曜雅子(2004)．日本マス・スクリーニング学会誌，14(3)，29-39.

2．米田　豊(2007)．日本マス・スクリーニング学会技術部会第25回研修会資料，基礎講座.

3．藤本昭栄，大浦敏明，長谷　豊 (1991)．日本マス・スクリーニング学会誌，1(1)，211-212.

4．米田　豊，九曜雅子(2005)．富山衛研年報，28，23-32.

5．美澄博雄，高坂睦年，和田　洋，川上幹子，二宮福子，末石照香，市場洋三(1980)．代謝異常スクリーニング研究会会報，5，46-47.

6．米田　豊(1999)．富山衛研年報，22，　54-57.

7．市原　侃，鈴木　健，青木菊麿(1998)．日本マス・スクリーニング学会誌，8 Suppliment 2，73-81.

８．先天性代謝異常検査及びＢ型肝炎母子感染防止事業実施状況　厚生省児童家庭局母子保健課(1999). 特殊ミルク情報，36，136-138.
９．先天性代謝異常検査及びＢ型肝炎母子感染防止事業実施状況　厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課(2001). 特殊ミルク情報，37，99-101.
10. 先天性代謝異常検査等検査状況　厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課(2007). 特殊ミルク情報，43，67-69.
11. 原田正平(2007). 平成18年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）分担研究報告書，161-164.
12. 鈴木恵美子，渡辺倫子，前田昌子，成瀬　浩，望月孝一，山上祐次，安片恭子，田崎隆二，九曜雅子，園山京子，吉井千代子，平原史樹，加藤忠明，松井　陽，原田正平(2008). 平成19年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）総括・分担研究報告書，123-126.

乾燥濾紙血液中の Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase(G6PD) 活性簡易定量法の検討

九曜雅子　　米田　豊

A study of the measurement of Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in dried blood filter paper specimens by rate assay

Masako KUYO and Yutaka YONEDA

要 旨　Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase（G6PD）異常症は，新生児マススクリーニングでガラクトース血症Ⅰ型（Gal-1-P　Uridyltransferase 活性異常）の検査法であるボイトラー法の異常により発見される疾患である．本県で患者が発見されたことを契機に，疾患の鑑別を目的として，乾燥濾紙血液を使用し，反応速度を測定することで酵素活性を定量する Rate assay による G6PD 活性の簡易定量法を検討した．その結果，約1時間で G6PD 活性を定量することが可能となり，ボイトラー法で異常が認められた場合には，早期に Gal-1-P　Uridyltransferase 活性異常と鑑別することができるようになった．この測定法による新生児の乾燥濾紙血液での G6PD 活性の平均値は，5.23±1.16 U/gHb であり，これは，赤血球溶血液を用いて測定した場合の活性値の約73%相当であると推測された．

Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase　(G6PD)異常症は，新生児マススクリーニング対象疾患のガラクトース血症の検査法であるボイトラー法で偶然発見される疾患の一つである．この疾患は，G6PD 活性が無いか著しく低いため，特定の食物や薬剤の摂取によりヘモグロビン変性が起こり溶血性貧血を引き起こす．G6PD の構造決定遺伝子は X 染色体上にあり，伴性劣性遺伝の型式をとるため，発症はほとんどが男性であると言われていたが，最近は，女性の患者例[1]や重症例[2]も報告されている．また，新生児期の黄疸，高ビリルビン血症との関連がある[2,3,4]との報告もある．

この疾患の頻度には地域差があり，熱帯，亜熱帯地方等が高いとされている．日本における頻度は，0.1～0.5%[5]といわれている．

富山県では，平成9年度に患者が1人発見された．さらに平成15年度にはその同胞が患者の可能性が高いことが判明したが，G6PD 活性測定を実施している検査センターがなかったことから，医療機関から G6PD 活性の簡易測定法についての相談があった．そこで，再採血等の患者の負担をできるだけ軽くするために，マススクリーニング用に採血された乾燥濾紙血液を利用した酵素活性の定量法を検討することにした．

G6PD活性の測定法としては，ホルマザン基質である 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide　(MTT) と発色試薬の phenazine methosulfate(PMS)を使ったホルマザン法[6,7,8]や蛍光スポット法[9,10]が報告されている．また，最近になって，新しいホルマザン基質である2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium monosodium salt (WST-8)と発色試薬1-methoxy PMS を使用した WST-8ホルマザン法[11]による測定用キットが試験研究用として開発されたが，いずれも正常検体に対する相対活性の測定である．

一方，International Committee for Standardization in haematology　[12]　が G6PD 測定法として推挙している WHO 標準法[13]は，精製した赤血球を使用した rate assay よる定量法である．我々は，この WHO 標準法を基に，乾燥濾紙血液用に改良し，G6PD 活性を簡易に定量する方法を検討した．

なお，酵素活性の測定について相談のあった患者は，現在は医療機関でフォローアップが行われていないため，今回あらためて呼び出して採血することができなかった．そのため，G6PD 異常患者の酵素活性については，新生児期にマススクリーニング用として採血された乾燥濾紙血液を用いて測定することにした．

1．原理

酵素活性1U は1μg 分子の基質を1分間に変化させる酵素量[14]と定義されており，反応速度を示すものになる．したがって G6PD 活性は，図1.に示すように，

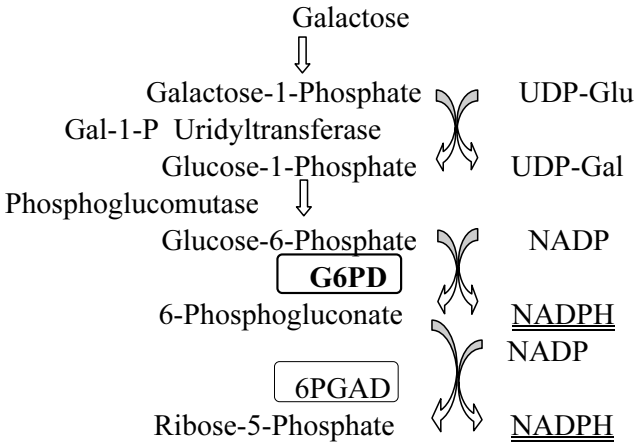


図１．Galactoseの代謝経路

表１．試薬の調整

	WHO標準法		マイクロプレート用
1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0	100 μL		30 μL
0.1M $MgCl_2$	100		30
2mM NADP	100	⇒	30
D.W.	550		160
計	850 μL		250 μL
赤血球溶血液（30倍希釈）	50 μL	⇒	20 μL（濾紙血液溶出液として）
6mM G6P	100 μL	⇒	30 μL

基質であるGlucose-6-Phosphate (G6P)の変化量を測定することになるが，一般的にはその共役反応で生成するNADPHの1分あたりの増加量を測定する．しかし，代謝は G6PD による反応に留まらず，生成された6-Phosphogluconate (6PGA) が，6-Phosphogluconate Dehydrogenase (6PGAD)の働きでRibose-5-Phosphate になる際にも NADPH が生成する．そのため，NADPH の増加量を測定する場合には6PGAD により生成した NADPH も測りこんでしまうことになる．真の G6PD 活性を測定するには，6PGAD により生成した NADPH 量を除くことが必要である．

そこで，我々は，Beutler ら[12]の方法で G6PD 活性を測定することにした．すなわち，基質を G6P+6PGA とする G6PD+6PGAD 系と，6PGA のみを基質とする6-PGAD 系の2つの反応系で1分間に生成する NADPH 量を測定し，その差を求めることで真の G6PD 活性を算出することにした．

２．試薬

①血液濾紙溶出用試薬

濾紙からの血液溶出には，WHO 標準法において赤血球溶血液の安定化試薬として用いられている10μM NADP と 7.0mM 2-mercaptoethanolを含む 2.7mM EDTA (Na pH7)溶液を用いた．

②反応試薬

マイクロプレートを使用するため，総液量が300μL /ウェルになるように，WHO 標準法の反応用試薬量を，表1.のように調製した．

３．測定法

図2.に活性測定法を示した．

濾紙から血液を溶出させるため，U 底マイクロプレートのウェルに濾紙血液1/8インチ disc　1枚と血液濾紙溶出用試薬150μL を入れ，10分間超音波処理した．その上清20μL を血液濾紙溶出液として，平底（測定用）マイクロプレートのウェルに移し，これに反応試薬1を加え混和した後，37℃で10分間インキュ

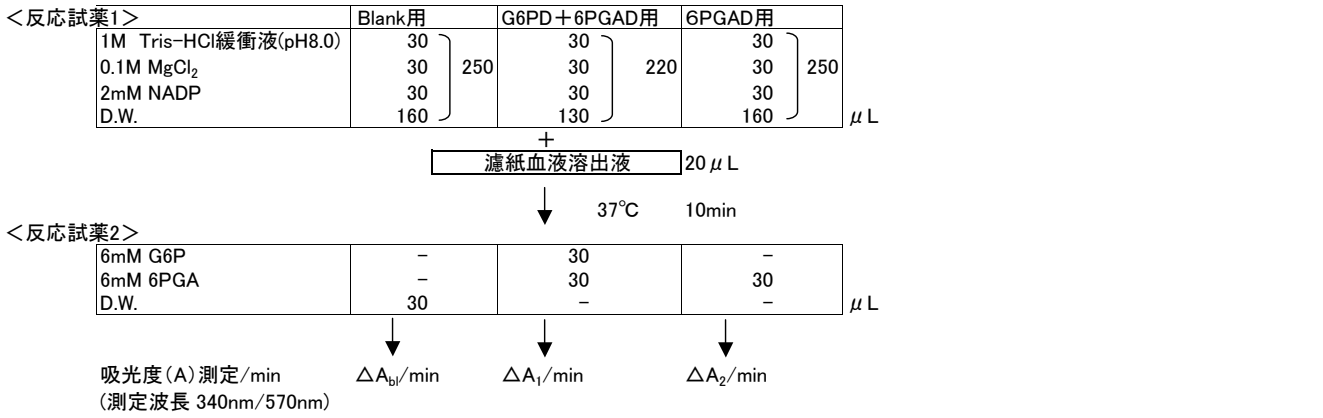
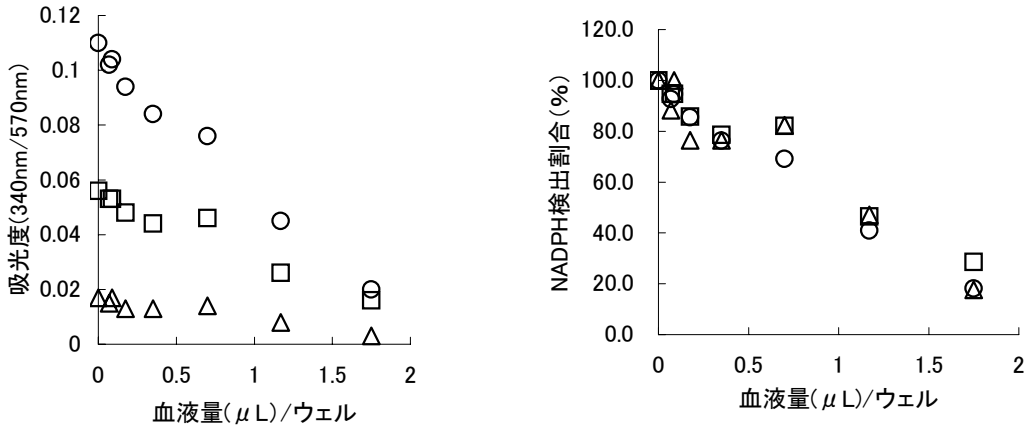


図２．活性測定法



NADPH濃度：△10μM、□50μM、○100μM

図３．血液（Hb)が NADPH 測定に及ぼす影響

ベートした．さらに，基質である反応試薬2を加え，添加直後から7分までの間，1分あたりに生成するNADPH の増加量を，吸光度の変化として測定した．なお，吸光度測定には，コロナ社製マイクロプレートリーダー MTP-120を使用した．測定波長は，ヘモグロビン(Hb)による干渉を排除するため，主波長を340 nm，第二波長を570nm　[15]とした．

酵素活性は，図2及び図7の式により算出した．なお，マイクロプレートによる吸光度測定のため，1ウェル中の液量が300μL のとき0.7cm セル相当とし，セル長補正を行なった．

４．血液量の検討

WHO 標準法では新鮮血から調製した赤血球溶血液を測定しているが，我々は，濾紙から溶出した血液を測定するため，酵素反応に必要な血液量の検討を行なった．

なお，1/8インチ(3.18mm)径の disc に含まれる血液量は，上坂ら[16]の方法で測定した結果，3.5μL とした．すなわち，50μL の血液を濾紙に滴下し，乾燥後の濾紙血液の直径を2方向から測定，面積を算出した．その結果，血液50μL で平均面積が111.3㎟ (N=20)であったことから，1/8インチ disc の面積7.9㎟に相当する血液量を3.5μL とした．

１）血液中の Hb が NADPH 測定に及ぼす影響

血液中の Hb が NADPH の蛍光を抑えるとの報告

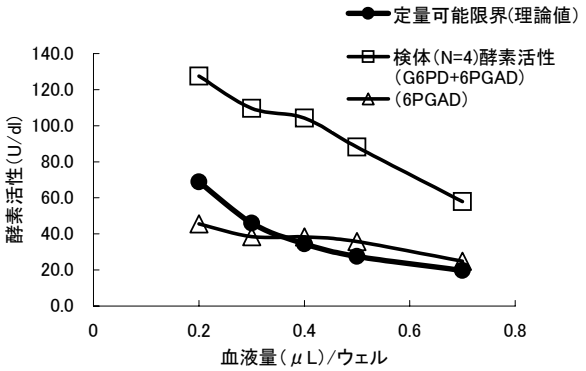


図4-1. 定量可能限界（理論値）と検体の酵素活性

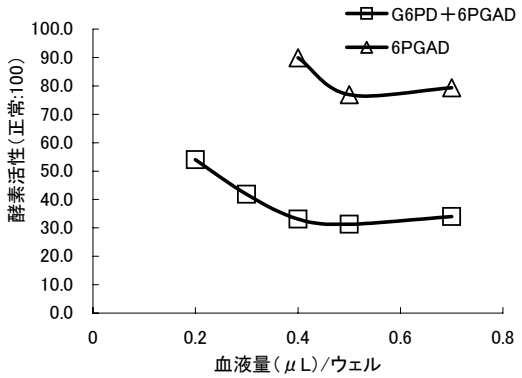


図4-2. 定量可能な酵素活性の下限値

[17]があるため，我々は，Hb の影響が小さいとされる吸光度の2波長測定[15]で行なうことにした．この測定方法において，血液濾紙溶出液中の Hb がどのような影響を及ぼすのか調べた．

方法は，1/8インチ disc 1枚ずつに溶出用試薬の量を変えて加えることで，血液(Hb)濃度の異なる血液濾紙溶出液を調製した．これらの血液濾紙溶出液と，10μM，50μM，100μM の3濃度に調製した NADPH 溶液を各々100μL ずつ，マイクロプレートのウェルに加え，混和し，吸光度(340nm/570nm)を測定した．その結果，図3.のように，血液(Hb)がわずかでも存在すると，NADPH 測定に影響があり，吸光度を低下させることが判った．したがって，NADPH を測定する場合，マイクロプレートの1ウェルあたり血液量は，NADPH 検出率が80%以上となる0.7μL 以下が望ましいと考えられた．

２）定量限界

吸光度測定に使用するマイクロプレートリーダー MTP-120での吸光度測定の限界を0.002とした場合，図2.の計算式の1分あたりの吸光度変化（△A/min）が0.002以上であれば，酵素活性の定量が可能となると考えられた．そこで，△A/min ＝ 0.002として，マイクロプレート1ウェル中の血液量が0.2～0.7μL の場合の酵素活性値(U/dL)を，図2.の計算式により算出し，定量可能限界の理論値とした．

また，無作為に抽出した一般検体（N ＝ 4）について，1ウェル中の血液量を0.2～0.7μL となるように，血液濾紙溶出液を作成し，図2.に従って酵素活性を測定した．吸光度測定は1分毎に10回の計10分間とし，平均の△A/min を求めた．なお，酵素活性は Hb あたりの値が通常であるが，理論値との比較のため，血液1 dL あたりの値を算出した．結果は，定量可能限界の理論値とともに図4-1に示した．一般検体では6PGAD 活性が低く，1ウェル中の血液量が0.4μL 以下では定量可能限界値以下となるため，定量できないことが判った．

さらに，一般検体の酵素活性値を100とした場合の定量可能な酵素活性値の下限値を図4-2に示した．その結果，できるだけ低い酵素活性まで定量するためには，G6PD+6PGAD 測定の場合は1ウェル中の血液量が0.4μL 以上，6PGAD 測定の場合は0.5μL 以上必要であることが判った．また，その場合の定量限界は，G6PD+6PGAD については酵素活性が正常の30%に低下している検体，6PGAD については，酵素活性が正常の80%に低下している検体であると考えられた．

３）測定に用いる血液量

1）血液中の Hb が NADPH 測定に及ぼす影響と2）定量限界の検討結果から，マイクロプレートの1ウェル中の血液量は，0.4～0.7μL が適当であった．また，Hb の影響をできるだけ小さくするためには，血液量は少ない方が良いことから，測定の操作性も考え合わせて，1/8インチ径 disc　1枚を150μL の血液溶出液で溶出し，その溶出液20μL をマイクロプレート測定に使用することにした．すなわち，マイクロプレート1ウェル中の血液量は，3.5μL×20 / 150 ＝ 0.47μL とした．ところで，表1.の WHO 標準法で測定する場合に使用する赤血球溶血液は30倍希釈液で50μL であることから実際の溶血液量は1.67μL となる．これをマイクロプレート用の試薬量（WHO 標準法の試薬量の30%相当）に換算すると，血液量は0.5μL となることから，マイクロプレート測定の場合の血液量0.47μL は適当量であると考えられた．

５．測定時間の検討

定量限界の検討の際には吸光度の連続測定時間を10分間としたが，最適な測定時間を検討するため，無作

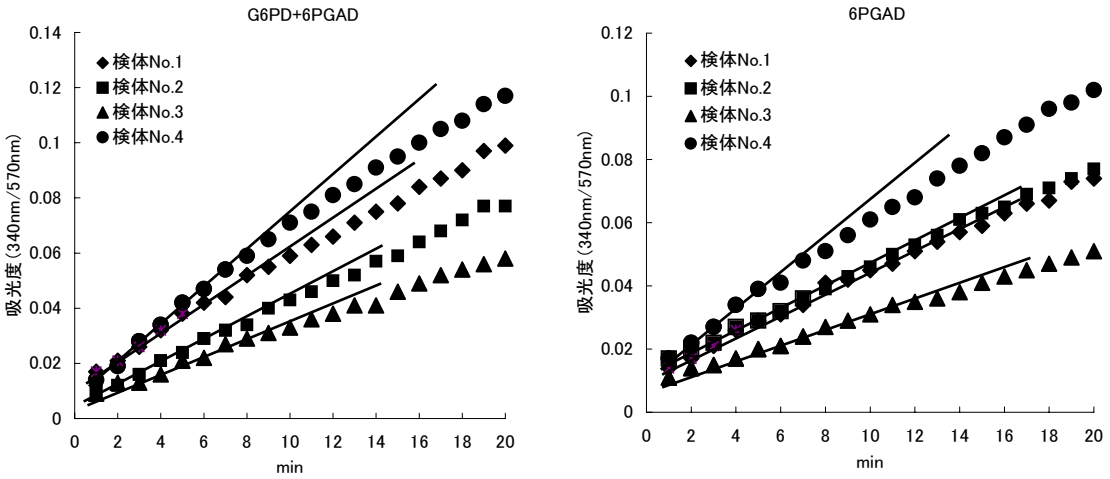


図５．G6PD+6PGAD 測定と6PGA 測定時の吸光度の経時的変化

為に抽出した一般検体4件について，1/8インチ径 disc 1枚を150μL の血液溶出液で溶出した後，図2.の手順に従い，酵素活性測定し，吸光度の経時的変化を見た．その結果，図5.に示したように，G6PD+6PGAD 測定時には，7～8分以降は直線にのらず，△A/min すなわち反応速度が低下した．また，6PGAD 測定時でも，検体による差が認められるものの，同様に7～13分で反応速度が低下した．このように，時間とともに反応速度が低下するのは，反応生成物による反応阻害や温度，pH の変化等が考えられる．これらの影響がない時点の反応速度，すなわち初速度を求めることが必要であることから，測定開始から7分までの直線の傾きを反応初速度△A/min とした．したがって，図2.における試薬2を添加した後の吸光度の連続測定時間を7分間とし，式より酵素活性を算出することにした．

６．基質量の検討

図2.の測定法で，基質として加える G6P および6PGA 量を変えた場合の酵素活性値の変化を検討した．その結果，図6に示したように，G6P が150nmol/ウェル，6PGA が100nmol/ウェル以上で酵素活性値が最大となることが判った．図2の測定法での G6P および6PGA 量は，マイクロプレート1ウェル中では共に180nmol となり，酵素反応には充分量であることが確認された．

７．G6PD 標準液の測定

マススクリーニングのための採血は，通常生後4～6日とされており，この時期に最も近い G6PD 活性の正常値は，戸谷らのデータ[18]から計算すると生後7日で111～138 U/dL 血液（1.11～1.38 U/mL 血液）

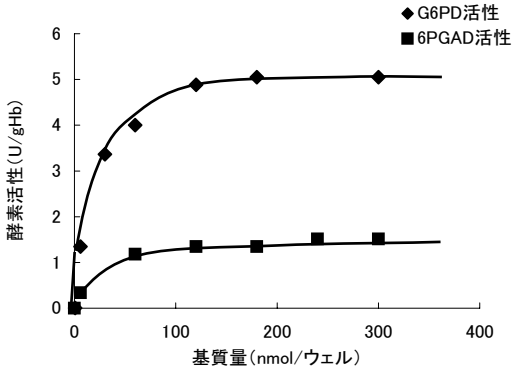


図6．基質（G6P,6PGA）量を変化させた場合の酵素活性

表2．G6PD 標準液の測定結果

G6PD標準液（U/ml）	測定結果 △A/min	測定結果 算出した酵素活性値（U/ml）	検出率（%）
0.26	0.0192	0.2379	91.5
0.52	0.0410	0.5081	97.7
1.04	0.0750	0.9294	89.4
1.41	0.1010	1.2515	88.8
1.88	0.1340	1.6605	88.3
平均			91.1

となった．これを参考に，G6PD 標準液の濃度を，0.26～1.88 U/mL の間の5濃度（表2.）に設定した．濃度の調製は，200UのG6PD(Sigma, Cat.No.G8404)を血液濾紙溶出用試薬で希釈して行なった．調製した各濃度の標準液20μL を用い，図2.の方法で酵素活性を測定した結果を表3.に示した．G6PD 標準液の検出率は平均で91.1%となった．

８．濾紙血液中の Hb 測定

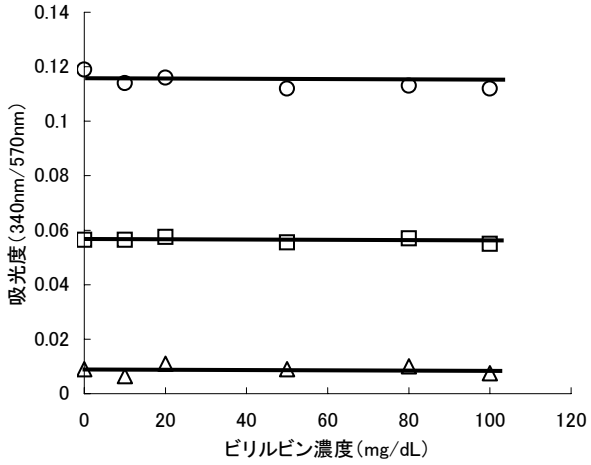
検体(S)調製　　1/8インチdisc 1枚(血液量3.5μL) ＋ 血液濾紙溶出用試薬 150μL → 超音波10min
標準(Std)調製　　Hb標準液(ウマ赤血球15g/dL)3.5μL + 血液濾紙溶出用試薬 150μL → 撹拌

	検体(S)	標準(Std)	対照(Bl)
試料	25μL(血液量0.58μL)	25μL	D.W.25μL
発色試薬	150μL	150μL	150μL

よく混和し、室温で3min放置
↓
吸光度(A)測定(570nm)

Hb濃度(g/dL) = ($A_S - A_{Bl}$ / $A_{Std} - A_{Bl}$) x 15.0

図7. 濾紙血液中のヘモグロビン（Hb)測定法（ヘモグロビン B-テストワコーキット使用）



NADPH濃度:△10μM、□50μM、○100μM

図８．ビリルビンが NADPH 測定に及ぼす影響

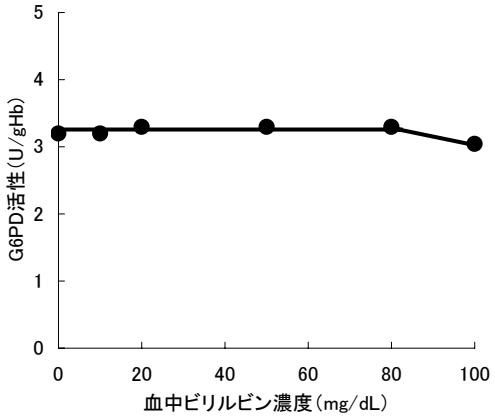


図９．血中ビリルビンが G6PD 活性に及ぼす影響

G6PD 活性を Hb あたりに換算するため，濾紙血液中の Hb 量は，ヘモグロビン B-テストワコー（和光純薬(株)製）キットで測定した．多検体処理に対応するため，マイクロプレートのウェル内で反応させた後，マイクロプレートリーダー MTP-120（570nm）で測定することにした．

試料は，G6PD 測定用に調製した血液濾紙溶出液の残液25μL（血液量として0.58μL）を用いた．また，キット添付の Hb 標準液（ウマ赤血球15.0g/dL）をマイクロプレート1ウェルに3.5μL 分取し，血液濾紙溶出用試薬を150μL 加え撹拌後，その25μL を測定用標準液とした．発色用試薬はキット添付文書の指示通り調製した．発色用試薬は，血液20μL に対し5 mL 必要であることから，血液濾紙溶出液25μL 中の血液量0.58μL に対応する発色試薬量を150μL とした．測定操作および濾紙血液中の Hb 量の算出方法を，図7に示した．

９．一般検体への応用

１）ビリルビンの影響

新生児期には黄疸等で血液中のビリルビン値の高い検体があることから，ビリルビンの影響について検討した．

まず，ビリルビンが NADPH 測定に及ぼす影響を検討した．ビリルビンは，和光純薬製のビリルビン測定用キット『ビリルビン BⅡ－テストワコー』に添付されている10mg/dL ビリルビン標準液を使用した．G6PD 活性測定に使用する血液中のビリルビン濃度に相当するように標準液を調製したものをマイクロプレートのウェルに100μL ずつ分取し，その各々に10μM，50μM，100μM に調製した NADPH を100μL ずつ加え，撹拌後吸光度（350nm/570nm）を測定した．その結果，図8に示したとおり，ビリルビン濃度100 mg/dL までは NADPH 測定に影響がないことが判った．

表3. 採血から測定までの日数毎の測定値

採血から測定までの日数	0	1	2	3	4	5	6	7
n	5	40	35	35	35	41	41	29
Hb（g/dl）	13.93±2.90	12.26±2.62	12.47±2.75	13.34±2.49	13.47±3.06	13.21±2.80	11.86±3.11	13.42±2.92
G6PD（U/gHb）								
M±SD	5.35±1.37	6.12±1.20	5.17±1.04	5.29±1.25	5.14±1.09	4.99±1.19	5.32±1.09	4.67±0.98
Min-Max	3.59-6.98	4.58-10.05	3.52-7.23	2.77-8.92	2.16-7.34	3.12-9.03	3.04-7.10	2.38-6.16
CV(%)	25.6	19.6	20.1	23.6	21.1	23.8	20.5	21.0

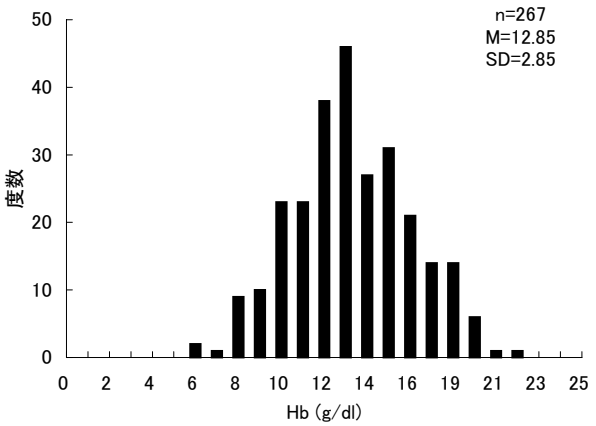


図10-1. 濾紙血液による一般新生児の Hb 測定値のヒストグラム

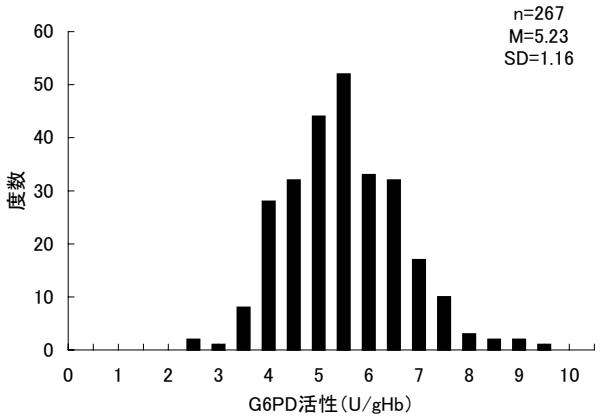


図10-2. 濾紙血液による一般新生児の G6PD 活性値のヒストグラム

さらに，G6PD 活性測定に使用する血液濾紙溶出液に，調製したビリルビン標準液を添加し，酵素活性を定量した．その結果，図9に示したように，血中ビリルビン濃度が100mg/dL で活性の低下の傾向が認められた．光線療法が必要となるのは血清総ビリルビン値が18mg/dL 以上，交換輸血が必要となる基準値は25 mg/dL 以上[19]であることから，重症黄疸の場合を除けば，濾紙血液による G6PD 活性測定にビリルビンの影響はないと言える．

2）濾紙血液中の Hb 量

新生児マススクリーニング検査が終了した，採血から測定までの日数が7日以内となる濾紙血液を，無作為に267件抽出し，前述の方法に従って，Hb 量を測定した結果を図10-1に示した．平均値±SD は12.85±2.85 g/dl であった．また，表3.には，測定した濾紙血液を，採血から測定までの日数毎に分け，それぞれの Hb 量を示した．採血したその日に測定した値（日数0）と経過日数毎の測定値について，t 検定を行なった結果，いずれ測定値も日数0の測定値に対しては有意な差は認められなかった．すなわち，採血後7日間は Hb 測定値に変化が認められなかったといえる．ただし，この結果は，濾紙に採血後は充分に乾燥させ，郵送に要する1～2日後以降は当所の冷蔵庫に保存されていた濾紙血液を使用した場合である．

3）濾紙血液中の G6PD 活性

Hb 量を測定した濾紙血液について，G6PD 活性を測定した．Hb で補正した結果を，図10-2に示した．平均値±SD は5.23±1.16 U/g Hb となった．図3から，NADPH を測定する場合，血液量が0.47μL では NADPH が本来の値の80%に低下すること，さらに，表2から，G6PD 標準液の検出率が平均91.1%であったことから，この測定法における濾紙血液中の G6PD 活性値は，真の値すなわち赤血球溶血液を用いて測定した活性値の72.9%に相当すると推測できる．したがって，新生児濾紙血液中の平均値5.23 U/g Hb の真の値は7.17 U/g Hb と考えられる．この値は，戸谷らのデータ[18]の新生児の赤血球中G6PD活性6.33～7.91 U/gHb と一致するものである．

表3には，採血から測定までの日数毎の G6PD 活性の測定値を示した．Hb 量の場合と同様に，採血したその日に測定した値（日数0）と経過日数毎の測定値について，t 検定を行なった結果，いずれ測定値も日数0の測定値に対しては有意な差は認められなかった．すなわち，Hb 量と同じく，採血後7日間は G6PD 活

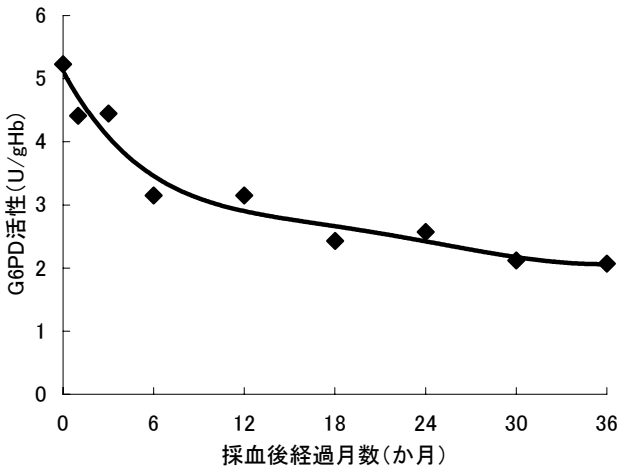


図11. 濾紙血液中の G6PD 活性の経時変化（n=8）

性値が劣化しないといえる．ただし，この結果も，濾紙の保存状態が良好な場合に限られる．

10. G6PD 異常患者の測定値

当所で保管されていたマススクリーニングに使用した患者の乾燥濾紙血液を用いて，酵素活性を測定した．ただし，検体は平成16年3月に採血されたものであったため，活性の劣化が考えられた．そこで，まず，G6PD 活性の経時的変化を検討した．その結果，図11に示したように G6PD 活性は経時的に劣化が認められた．患者の検体が採血された平成16年3月と同時期の検体，すなわち採血後36か月経過した一般検体の G6PD 活性は，採血後7日以内に測定した活性値の約40%にまで劣化し，2.07 U/g Hb (N=8)であった．また，同時に測定した患者検体の G6PD 活性は，0.32 U /g Hb であった．我々の測定法での定量限界は，採血後7日以内に測定した G6PD 活性の正常値の30%に低下した検体までであることから，患者の G6PD 活性測定値は，定量の限界を超えており信頼できる値ではないが，一般検体に比べると明らかに低いといえる．

なお，活性の経時的変化を測定するために使用した検体は，採血後1年間は冷凍（－30℃）で保存，その後は冷蔵保存されていたものである．

また，濾紙からの血液の溶出は，最も古い採血後36か月経過したものでも良好で，Hb 値は12.91 g/dL となり，採血後7日以内の検体で測定した Hb 値と変わらなかった．

11. まとめ

本邦で発見された G6PD 異常症患者（変異型も含む）の G6PD 活性は，正常対象の55%～2%以下[5,20]であり，新生児マススクリーニングのボイトラー法では検出されなかった例[21]もある．しかし，我々の方法の血液濾紙による測定では，酵素活性が正常の30%の検体，すなわち，新生児濾紙血液中の G6PD 活性の平均値が5.23U/gHb であることからその30%活性である1.57U/gHb の検体までは，定量化が可能となった．また，30%以下の検体についても，陽性判定は充分可能であることから，ボイトラー法で発見されなかった例も見落とすことはないと考えられる．なお，濾紙血液で測定した G6PD 活性値は，赤血球溶血液を用いて測定した活性値の約73%に相当することが判った．

さらに，新生児マススクリーニング用の血液濾紙を使用して，約1時間で，酵素活性の定量が可能となったことから，現行のガラクトース血症のスクリーニング検査法の一つであるボイトラー法で発見される，ガラクトース血症Ｉ型（Gal-1-P Uridyltransferase 活性異常）との鑑別が簡単にできるようになった．また，多検体同時測定も可能であり，マススクリーニング用の検査法としても応用できる測定法であると考える．

文　　献

1．Claudio A Sampaio Jr., George J Reclos: The precise analyze of G-6-PD activity in newborn screening using hemoglobin normalization procedure. The 6th Meeting of the ISNS Abstracts: 132, 2006.

2．Sarar HE Mohamed, Amel Hassan, Sahar Dossary, P Sarkis, H El-Khodary, A Nasr: High Incidence of G6PD deficiency in Saudi infants screened at birth. The 6th Meeting of the ISNS Abstracts: 133, 2006.

3．Stephen TS Lam: Neonatal screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. The 6th Meeting of the ISNS Abstracts: 103, 2006.

4．Varsha Atul Shah: Early discharge for newborns with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and predicting significant hyperbilirubinaemia. The 6th Meeting of the ISNS Abstracts: 134, 2006.

5．三輪史朗,藤井寿一,高橋圭介,鈴木早苗,熊川寿郎：G6PD 欠乏症のわが国での頻度調査．先天異常のモニタリングに関する研究．厚生省心身障害研究報告書（昭和59年度）：7-11, 1984.

6．Virgil F. Fairbanks, Ernest Beutler: A Simple

Method for Detection of Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency(G-6-PD Spot Test). BLOOD 20 (5): 591-601, 1962.

7．Hisaichi FUJII, Keisuke TAKAHASHI, Shiro MIWA: A New Simple Screening Method for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. ACTA HAEMATOL. JPN 47:185-188, 1984.

8．Akira HIRONO, Hisaichi FUJII, Shiro MIWA: An Improved Single-Step Screening Method for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 26(1): 1-4, 1998.

9．Ernest Beutler: A Series of New Screening Procedures for Pyruvate Kinase Deficiency, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, and Glutathione Reductase Deficiency. BLOOD 28(4): 553-562, 1966.

10. Ernest Beutler, Margaret Mitchell: Special Modifications of the Fluorescent Screening Method for Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency. BLOOD32(5): 816-818, 1968.

11. Indah S. Tantular, Fumihiko Kawamoto: An improved, simple screening method for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Trop.Med.International Health 8(6): 569-574, 2003.

12. E.Beutler, K.G.Blume, J.C.Kaplan, G.W.Lohr, B.Ramot, W.N.Valentine: International Committee for Standardization in Haemotology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis . British J. Haematology 35: 331-340, 1977.

13. WHO Scientific Group: Standardization of Procedures for the study of Glucose-6-Phosphate Dehydorogenase. WHO Technical Report Series No.366, 1967.

14. 日本生化学会編：酵素研究法（上）．生化学実験講座第5巻，東京化学同人，1985.

15. ヴァイスハイト.ライフ，ブフィチュラー.エルク：医療サンプルの分析におけるヘモグロビン干渉の排除方法．特表平11-510902.

16. 上坂孝昭,松井利夫,正通寛治,杉浦正樹：先天性代謝異常症検査におけるろ紙血のアミノ酸分析の検討.福井衛生研究所年報（平成11年度）38: 45-52, 1999.

17. Mei Lee Lowe, Angelo F. Stella, Beatrice S. Mosher, Jerry B. Gin, James A. Demetriou: Microfluorometry of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in Red Cells. Clin. Chem. 18(5): 440-445,1972.

18. 戸谷誠之，宮坂勝之，白幡　聡：こどもの検査値ノート．医学書院：p58, p68, 2002.

19. 神戸大学医学部小児科編：新版未熟児新生児の管理（第4版）．日本小児医事出版社：p225-240, 2000.

20. 三輪史朗,藤井寿一,高橋圭介：G6PD 異常症スクリーニング法の検討．先天異常のモニタリングに関する研究．厚生省心身障害研究報告書（昭和56年度）：124-127, 1981.

21. 高坂睦年,美澄博雅,市場洋三,和田洋:ガラクトセミアのスクリーニングに関する検討　ボイトラー・テストで検出されない G6PD 欠損症．小児慢性疾患（内分泌,代謝,血液系）に関する研究．厚生省心身障害研究報告書（昭和55年度）：119-120, 1980.

平成20年12月１日

新生児マス・スクリーニングにおけるブラインドサンプルによる外部精度管理導入に向けての取り組み

九曜雅子　二谷　武[1]　吉田丈俊[2]　今村博明[3]　副田善勝[4]　佐竹紳一郎[5]
鈴木恵美子[6]　原田正平[7]

The Approach to Introduction of "Blind Sample" for External Quality Control of Neonatal Mass-Screening in Toyama

Masako KUYO, Takeshi FUTATANI[1], Taketoshi YOSHIDA[2], Hiroaki IMAMURA[3], Yoshikatsu SOEDA[4], Shin-ichiro SATAKE[5], Emiko SUZUKI[6] and Shohei HARADA[7]

要　旨　新生児マススクリーニングにおいて真の精度管理を行うためには，精度管理用検体とは判らないよう一般新生児検体と同じ様式で作成したブラインドサンプルによる外部精度管理（以下ブラインド）が有効であると考えられたことから，本県での導入を検討した．

導入にあたって中心となる機関がなく，コンサルタント医もいない状況の中で，当所が，個々に産婦人科等の医療機関への働きかけや説明を行った結果，総合病院小児科 NICU2ヶ所，産婦人科医（個人病院）2ヶ所の協力が得られた．

現時点で，4回のブラインドを試行したが，特に混乱や問題はなかった．県内の産婦人科医，小児科医は，ブラインドの重要性を十分に認識されており，今後，さらに協力していただける医療機関を増やす予定である．これを機会に，新生児マススクリーニングのためのネットワークを構築し，その中でコンサルタント医を置き，精度管理の中心機関を設置したいと考えている．

なお，本研究は，厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）分担研究課題「新生児マススクリーニングの精度管理体制に関する研究」の補助によって行われている．

目　　的

現在，実施されている新生児マス・スクリーニングの外部精度管理は，新生児スクリーニング研究開発センターから，精度管理用検体が直接，検査機関に送付されるため，一般検体と区別することが可能である．このような方式では，"精度管理検体は一般検体と全く同様に扱う"ことは，難しく，精度管理検体を含むアッセイについては，普段にも増して注意深くなってしまうのが現状である．そのため，真の精度管理を行う上では，ブラインドサンプルを外部精度管理のシステムに導入することが必要であると考えられた．そこで，新生児スクリーニング研究開発センターが中心となり，ブラインドのパイロットスタディが全国数箇所で開始されることになり[1,2]，本県においてもブラインドの導入が可能かどうかを検討した．

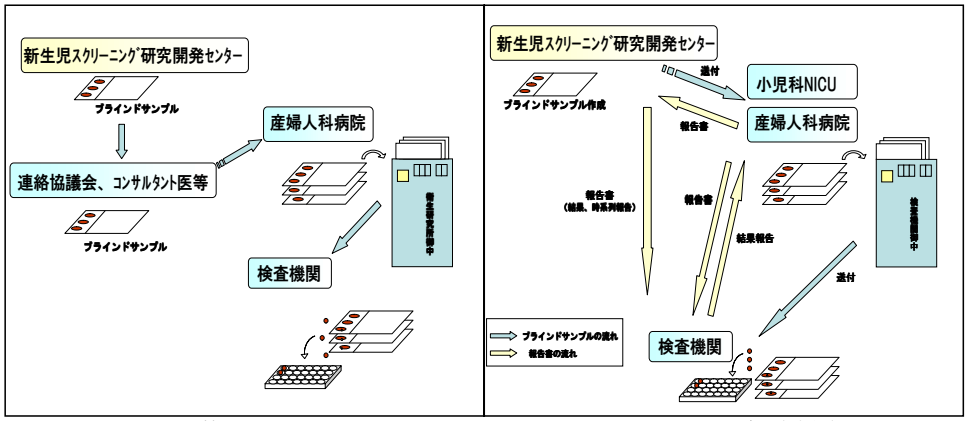
実　施　方　法

１．精度管理システム

図1.にシステムを示した．

ブラインドによる精度管理の場合，検査機関はサンプルが送付される医療機関が判らないようにしなければならない．そのため，新生児スクリーニング研究開発センターがブラインドサンプルを作成し，それを一旦，精度管理の中心となる施設に送付し，そこから各医療機関に配布するシステムにしなければならない．また，サンプルを受け取った医療機関は，架空の母親名，児の生年月日等のデータを記入し，当所へ一般検体とともに送付することになる．

１．富山大学小児科(現　富山県立中央病院小児科)
２．富山大学小児科
３．厚生連高岡病院小児科
４．おとぎの森レディースクリニック
５．さたけ産婦人科
６．日本公衆衛生協会
７．国立成育医療センター



＜一般的なシステム＞　　＜富山県の場合（試行）＞

図１．ブラインドサンプルによる精度管理システム

したがって，ブラインドの導入にあたっては，精度管理の中心となる機関やコンサルタント医が必要となる．しかし，本県には，そのような機関等が設置されていなかったため，検査機関が，直接，採血医療機関に協力を依頼し，新生児スクリーニング研究開発センターが，その協力可能な医療機関の中から1箇所選んで，ブラインドサンプルを配布することにした．

２．医療機関，医師への協力依頼

協力が可能な医療機関は少なくとも2ヶ所以上ないとブラインドサンプルが届く機関が特定され，現行の外部精度管理システムとほとんど変わらないことになる．そこで，新生児マススクリーニングの要精密検査児のフォローアップ等で，常日頃から連絡を密にとっている小児科の医師に協力をお願いすることにした．総合病院小児科の医師は同じ病院の産婦人科や地域の産婦人科医院と連携しており，ブラインドサンプル協力医療機関の数が拡大する可能性があったためである．協力の承諾が得られた場合は，我々がシステム等の説明に赴いた．

結　　果

１．小児科 NICU の協力で試行

我々は，県内の4ヶ所の総合病院の小児科医師に協力依頼の書類等を送付し，ブラインドに協力が可能かを問い合わせたところ，2ヶ所から協力の承諾の返事をいただいた．

そのうち，産婦人科との連携が可能という返事をいただいた大学病院小児科 NICU から試行を開始した．もう１ヶ所の総合病院の小児科NICU の医師からは，地域で連携している産婦人科と協力しての試行が可能であるとの返事をいただいた．

ただし，小児科特に NICU からの検体は，低出生体重児や哺乳状態不良による再採血が必要となる例が多いため，ブラインドサンプルへの属性情報記入にあたっては再採血の必要が無いように配慮していただかなければならなかった．

２．協力医療機関の拡大

開業医にも個別に協力を依頼した．医師一人でお産を年間500以上取り扱う産婦人科医院のうち2ヶ所から協力承諾の返事をいただいた．さらに，300以上取り扱う産婦人科医院でも2ヶ所から協力できるとの連絡をいただいた．

３．結果報告

検査結果については，通常，電話と文書で報告を行っているが，電話での報告の際には，主治医に直接伝わらず，看護師がまず結果を知る場合もある．そのため，ブラインドサンプルに記入されている架空の氏名で結果を報告した際に，電話を受けた看護師が混乱することが懸念されたが，実際は，検査の結果がそのまますぐに主治医に伝えられる体制にあり，問題は起きないと考えられた．問題が起きなかったことの確認のため，折り返し主治医からブラインドサンプルである旨の連絡をもらった．

４．当所での事務処理

当所では，従来の外部精度管理検体は，一般検体と同じように番号をつけて受付し，精度管理用検体として登録している．精度管理用として登録された検体は，統計等の際には除外されるようなデータ処理システムを使用している．そのため，一般検体として登録した

ブラインドサンプルは，結果が判明した時点で，精度管理用検体に変更することで，集計等の問題は起きなかった．

５．試行結果

これまで，4回のブラインド（正常検体を含む）を試行した．

事務処理，結果報告とも混乱や問題は無かった．ブラインドサンプルについては，医療機関から連絡があるまでは，それとは気づかなかった．

考　　察

当所が個々に産婦人科等の医療機関にブラインドサンプル導入についての働きかけを行った結果，県内の産婦人科医，小児科医は，非常に協力的であり，4ヶ所の医療機関から承諾の返事をいただいた．さらに2ヶ所の産婦人科医院で協力いただける予定であり，今後も増える可能性がある．このように，ブラインドに協力していただける医療機関が増えていくということは，多くの産婦人科医はブラインドの重要性，必要性を十分に認識されていると思われた．今後は，県産婦人科医師会としての協力が得られないか働きかける必要もあると考えられた．さらに，産婦人科医や小児科医の協力のもとで新生児マススクリーニングのためのネットワークを構築し，その中でコンサルタント医を置き，連絡協議会などの精度管理の中心となる機関を整備したいと考えている．

文　　献

１．原田正平(2007)．平成18年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）分担研究報告書，161-164

２．鈴木恵美子，渡辺倫子，前田昌子，成瀬　浩，望月孝一，山上祐次，安片恭子，田崎隆二，九曜雅子，園山京子，吉井千代子，平原史樹，加藤忠明，松井　陽，原田正平(2008)．平成19年度厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）総括・分担研究報告書，123-126.

ガラクトース血症マス・スクリーニングのための HemogloBind™を用いるボイトラー試験の定量化

米田　豊　　九曜雅子

Quantitative Beutler Test for Newborn Mass Screening of Galactosemia using HemogloBind™

Yutaka YONEDA and Masako KUYO

要 旨　ガラクトース血症の定性試験法であるボイトラー試験を定量化する目的で，ろ紙血液からの溶出液にHemogloBind™を加えてヘモグロビンを沈殿させ，上清にボイトラー試液を加えて，一定時間の蛍光強度変化を測定する方法を検討した．また，沈殿したヘモグロビンを再溶解し，同時にヘモグロビンの定量を行うことで，血液ろ紙1枚を用いて，単位ヘモグロビン濃度当たりの酵素活性指標を測定できた．

ガラクトース血症の新生児マス・スクリーニングでは，ガラクトース血症Ⅰ，Ⅱ及びⅢ型のうち，主にⅠ型が検査対象とされている．Ⅰ型はgalactose-1-phosphate uridyltransferase（以下トランスフェラーゼ）欠損症であり，スクリーニング検査としてガラクトースの定量と赤血球中のトランスフェラーゼの定性試験であるボイトラー試験などが行われている．ボイトラー試験はろ紙上の蛍光を目視により観察する方法であるため，藤本らは定量化を検討し，血液ろ紙にボイトラー試液を添加し，一定時間反応後，除蛋白した上清の蛍光をマイクロプレートリーダーで測定する方法（藤本法）を報告[1]している．今回我々はHemogloBind™(HGB)のヘモグロビン(Hb)除去作用に着目し，トランスフェラーゼを失活させることなく，酵素活性を測定する方法を検討した．すなわち，血液ろ紙から抽出した血液成分のうちHbをHGBにより，選択的に除去し，トランスフェラーゼを含む上清に，ボイトラー試液を添加し，その反応速度をトランスフェラーゼ活性の指標とする方法である．また，HGBへ吸着したHbを再溶解し，Hbを定量することで，血液ろ紙1枚から単位Hb濃度当たりの酵素活性指標を求めることができた．

実　験　方　法

1　試薬

ウリジン-5'-ジフォスフォグルコース2ナトリウム(UDPG)はシグマ社U4525，α-D-ガラクトース1リン酸2ナトリウム五水和物(Gal-1P)はシグマ社G0380を用い，NADP2ナトリウム(NADP)はロッシュ社128058を用いた．サポニンはICNバイオメディカル社102855を用いた．また，HGBはBiotech Support Group社BTS H0145（フナコシから入手）を用いた．1%サポニン溶液：サポニン250mgを0.75Mトリス緩衝液(pH8.0)25mlに溶解後，ろ過して用いた．ボイトラー試液：5.7mM UDPG，32.4mM Gal-1P，11.9mM NADP及び1%サポニン溶液を各々1mlずつ混合し，更に0.75Mトリス緩衝液(pH8.0)6ml及び27mM EDTA2ナトリウム 0.1mlを添加後，精製水で全量を30mlとした．なお，本試液の基質濃度はオリジナルのボイトラー試液[2]の60%溶液に相当する．

Hbの定量は和光純薬の測定キット「ヘモグロビンBテストワコー」を用いた．

2　装置

蛍光はコロナ社製マイクロプレートリーダーMTP-100Fを用い，吸光度は同社製MTP-120を用いて測定した．なお，蛍光測定の励起波長フィルターは360nm，測定波長フィルターは450nmを使用した．また，吸光度測定用フィルターは570nmを用いた．溶液分取補助用具として，ピペットチップラック（バイオヒット社 Cat. No791201）の下部を切取って作成した分取用具(http://screening.hp.infoseek.co.jp/bunsyu.htm)を用いた．

3　操作法

3.1　トランスフェラーゼ活性の測定

96穴V底マイクロプレートのセルに直径1/8インチの血液ろ紙を各々1個ずつ入れ，精製水150μlを加え

2000rpm,5分間の遠心分離によりろ紙に精製水を浸透させた．このマイクロプレートを振とう器を用いて10分間振とうし，血液成分を溶出した．マイクロプレートの各セルに5倍希釈したHGB溶液を50μl添加し，更に10分間振とう後，2000rpm,5分間の遠心分離を行った．各セルの上清80μlを蛍光測定用のマイクロスプリットセルに分取し，これにボイトラー試液80μlを加え，37℃恒温槽内で反応させた．当該溶液の蛍光を60分後及び180分後に測定し，その蛍光強度の差を求めた．

3.2　Hbの定量

前記のHGB処理したV底マイクロプレートの残液にHb測定キットに添付のHb発色原液(35mmol/lラウリル硫酸ナトリウム含有6.7mMリン酸緩衝液(pH7.2))50μlを加えHbを再溶解した．このマイクロプレートを振とう器を用いて10分間振とう後，別に準備した各セルに精製水100μlを入れた平底マイクロプレートに，Hb再溶解液50μlを移し，混和後，吸光度を測定した．なおHb標準液として，キット添付の15g/dlウマHb溶液35μlを1500μlに希釈し，その150μl(原液3.5μl相当）を用いた．V底マイクロプレートに入れたHb標準液をHGB処理後，上清80μlを除去した残液を用い，検体と同様の操作を行った．またブランクとして精製水100μlにHb発色原液50μl添加した溶液を用いた．

4　測定条件の検討

4.1　トランスフェラーゼ活性の測定に要する反応時間

無作為に抽出した新生児血液ろ紙8検体を用い，3.1トランスフェラーゼ活性の測定の項で述べた方法により，ボイトラー試液による反応を行い，蛍光強度を0,5,15,30,45,60,90,120,150,180及び210分後に測定した．また，反応210分後の時点で66U/mlアルカリフォスファターゼ10μlを添加し，引続き240,270,300及び330分後の時点でも蛍光を測定した．

4.2　溶出液とボイトラー試液との混合比率の検討

任意の新生児血液ろ紙を用い，精製水で酵素を溶出後，HGB処理を行った溶出液とボイトラー試液との混合比率を160:0,140:20,120:40,80:80,40:120及び20:140の条件で，15,30,45,60,90,120,180及び210分間反応を行い，混合比率を求めた．

4.3　Hb定量法の比較

血液ろ紙1個により，トランスフェラーゼ活性及びHb濃度を測定するため，HGB処理後のHb吸着沈殿物をラウリル硫酸ナトリウム溶液により，再溶解して得た溶液によりHbを測定する方法を検討した．操作は3.2 Hbの定量の項で述べた方法により行った．また，HGBによるHbの沈殿を行うことなく，血液ろ紙からの溶出液をそのまま用いてHb測定を行う方法[3]（HGB無処理法）との比較を行った．

4.4　新生児検体への応用

一般新生児の血液ろ紙 355検体に本法を適用し，反応開始から60,120及び180分後の蛍光を測定した．

4.5　藤本法との比較

本法を適用した355検体のうち，89検体について，藤本法1)でも蛍光を測定し比較した．

実　験　結　果

1　トランスフェラーゼ活性の測定に要する反応時間

HGB処理を行った溶出液にボイトラー試液を添加して得られる蛍光を経時的に測定した結果を図1に示した．蛍光強度はボイトラー試液添加後，60分以降に直線的に増大し，アルカリフォスファターゼ(Alp)添加後，蛍光は減衰した．従って蛍光強度差をトランスフェラーゼ活性の指標とする場合は60分から210分までの間で，一定時間の蛍光強度差を求めることが適当とみなされた．ボトラー法では反応時間は2〜4時間としている[4]ことを考慮し，本法ではボイトラー試液添加後，60分から180分までの120分間の蛍光の増大をトランスフェラーゼ活性の指標にすることとした．なお，反応停止剤としてAlpの添加を試みたが，Alp添加後，蛍光は徐々に減衰するため，以後，Alpは使用しなかった．

2　溶出液とボイトラー試液との混合比率

HGB処理を行った溶出液とボイトラー試液との比率を変化させて，蛍光の変化を調べたところ図2に示すように比率を80:80とした場合，ボイトラー試液添

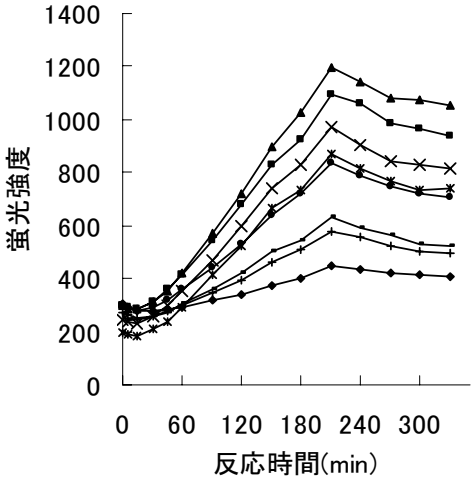


図１．反応時間と蛍光強度の関係

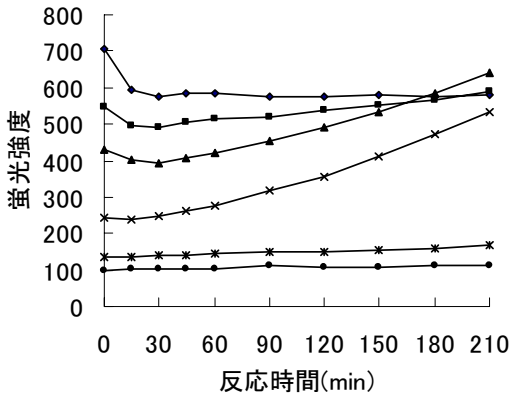
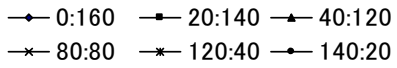


図２．溶出液とボイトラー試液との混合比率の影響



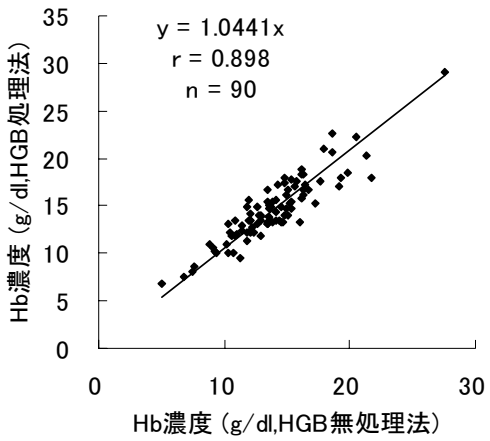


図３．Ｈｂ測定法の比較

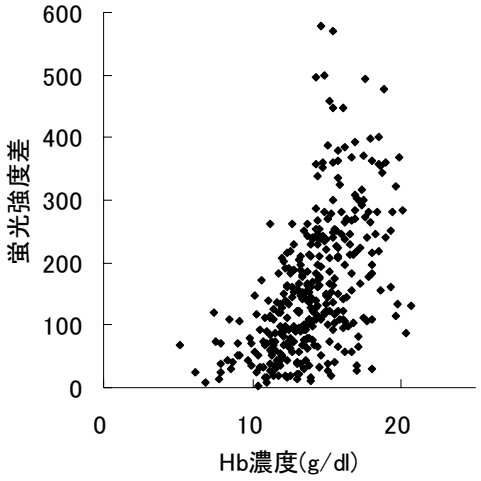


図４．Ｈｂ濃度と蛍光強度差の関係

加後60分から180分までの蛍光増加率は最も高いことから，混合比率は1:1とした．なお，ボイトラー試液の割合が100％の溶液でも反応開始直後から30分までの間は蛍光強度の減少が認められることから，ボイトラー試液自身の蛍光減少が反応初期の蛍光増加率の低い原因とみなされた．

3　Hb 定量法

HGB 処理溶液を用いる方法と HGB 無処理法とを比較した結果を図3に示した．HGB 処理の有無にかかわらず，ほぼ同一の定量値が得られることから，HGB 処理により沈殿した Hb を再溶解して定量することが可能であることが分かった．

4　新生児検体への応用

4.1 Hb 濃度と蛍光強度差の関係

図4に Hb 濃度と60-180分間の蛍光強度差をプロットした．Hb 濃度と蛍光強度差の相関係数は0.537で，あまり高い相関は認められなかった．なお Hb と蛍光強度差の平均値±標準偏差は，それぞれ14.0±2.6g/dl 及び158.2±108.9であった．

4.2 反応時間60,120及び180分間の蛍光強度と60-180分間の蛍光強度差との関係

図5-1に反応速度すなわち反応60-180分間の蛍光強度差と反応時間60分の時点における蛍光強度の関係を示した．また，同様に図5-2及び図5-3に反応時間120分及び180分の時点における蛍光強度と反応速度との関係を示した．各グラフの相関係数は図5-1，5-2及び5-3の順に0.403,0.915及び0.974であり，反応180分時点での蛍光強度は反応速度と高い相関を示した．このことから180分時点の蛍光強度から酵素活性の推定は可能であるが，60分時点または120分時点のみの蛍光測定からの酵素活性の推定は精度が低いことが分かった．なお，トランスフェラーゼ活性の指標として60-180分間の蛍光強度差を用いる方法と60-120分間の蛍光強度差を用いる方法との間には高度の相関(相関係数0.984)が認められるが，本法ではより大きな蛍光強度差が得られる60-180分間の蛍光強度差を用いた．

4.3 蛍光強度の分布

図6-1に60-180分間の蛍光強度差の分布を，また図6-2には単位 Hb 濃度(1g/dl)あたりの蛍光強度差の分布を示した．これらのすべての検体は目視による通常のボイトラー試験で蛍光が観察された．また，初回採血検体のボイトラー目視試験で蛍光が観察されず，２回目採血した検体でボイトラー目視試験が異常なしと判定された児2名の初回採血検体について，本法を実施したところ60-180分間の蛍光強度差は4及び9，Hb 補

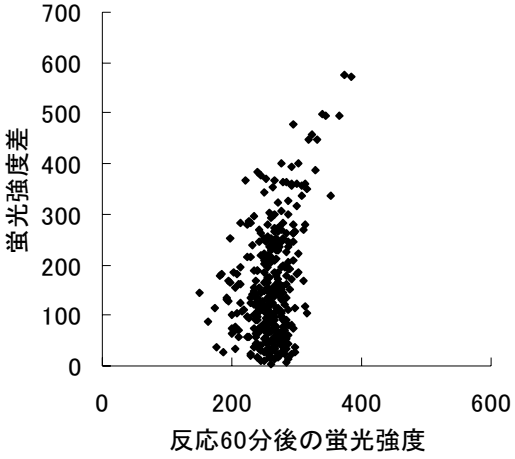


図5-1. 蛍光強度と蛍光強度差の関係(1)

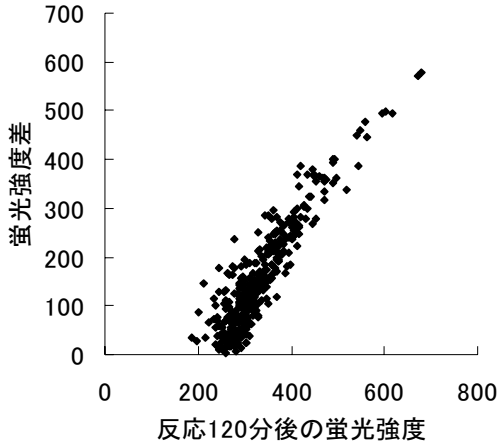


図5-1. 蛍光強度と蛍光強度差の関係(2)

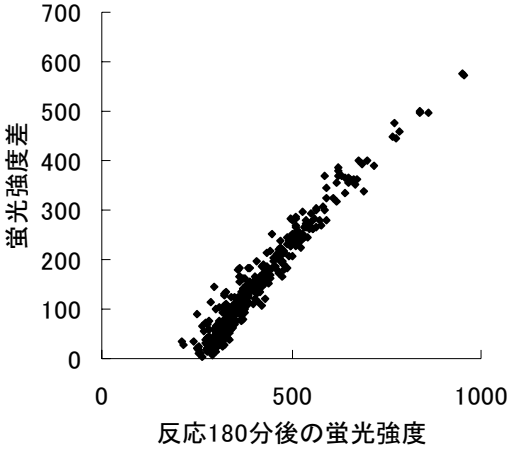


図5-1. 蛍光強度と蛍光強度差の関係(3)

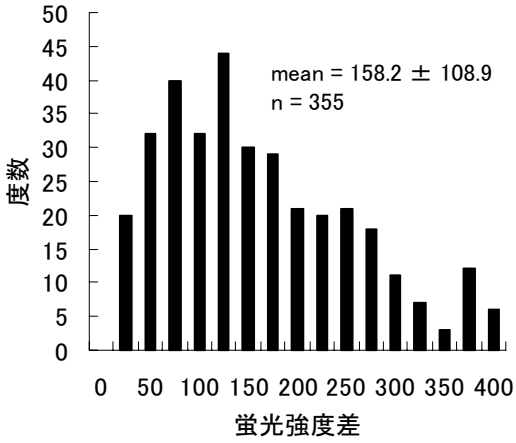


図6-1. 蛍光強度差の分布(Ｈｂ補正なし)

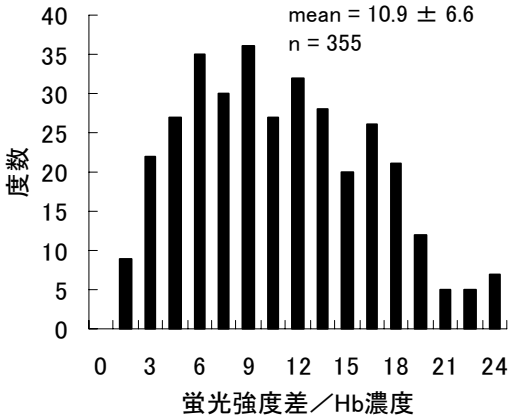


図6-2. 蛍光強度差の分布(Ｈｂ補正あり)

正値は0.3及び0.6であり，明らかな低値を示した．

5　本法と藤本法との比較

一般新生児ろ紙血89検体を用い本法及び藤本法を実施した結果を図7に示した．相関係数は0.685と必ずしも高くはないが，正の相関が得られた．

考　　察

HGB は多価の電荷をもつ高分子の弾性物質（エラストマー）で，微細粒子の浮遊液として市販されている．また，HGB は Hb と特異的に結合し，他の血液成分とは殆ど反応しないため，Hb 除去試薬として用いられている．新生児マス・スクリーニングでは血液ろ紙が検査試料となることから，Hb 除去のためメタノール-アセトン等の除蛋白剤が多用されるが，除蛋白により酵素は失活または除去されてしまう．血液中の酵素活性を反応速度から測定するには，酵素活性を

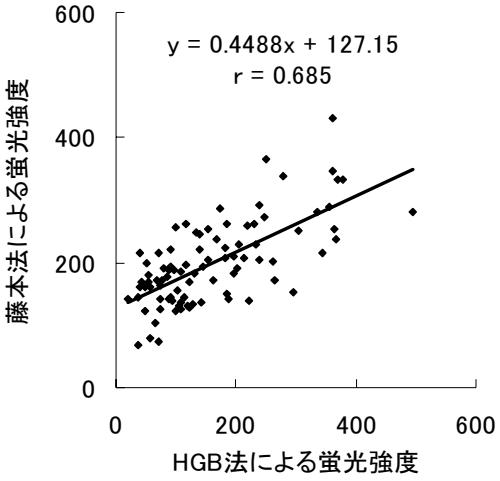


図７．測定法間の比較

維持したまま，Hb 除去を行う必要があり，HGB の利用はこの目的に合致すると考えられる．そこで，今回，HGB をボイトラー試験の定量化に応用した．ボイトラー試験を定量化した藤本法では，高濃度のメタノール-アセトンを含む溶液のピペッティングが必要なこと，及び検体ブランク値を差引く場合や Hb 補正を行う場合，複数のろ紙血液が必要となる．HGB を用いる方法では1枚のろ紙血でこれらの問題点を解決できた．しかし，藤本法と同様にマイクロプレートから別のマイクロプレートへの分取が必要であり，操作上，煩雑なことから，分取用の補助用具を作成し，分取の際，ピペットの先端が沈殿物と接触しないようにしたことで，分取操作が容易になった．なお，HGB にかかる費用は1検体あたり約20円であり，作業時間は反応時間を含め約4時間であった．当所では，これまでにガラクトース血症の患者は発見されていないため，本法を患児の血液に応用できなかったが，目視によるボイトラー試験で蛍光が認められなかった検体に応用し，定量的に酵素活性の低下を確認できた．なお，HGB はトランスフェラーゼ以外にも血液ろ紙中の酵素活性の測定に応用できるものと考えられる．

文　　献

1) Fujimoto A.,Okano Y.,Miyagi T,Isshiki G.,Oura T.(2000). Clin.Chem.46,806-810.
2) Beutler E,Baluda M.C.(1996),J. Lab. Clin Med 68,137-141.
3) 九曜雅子，米田　豊(2007).日本マス・スクリーニング学会誌　17(3)43-52.
4) 鈴木　健,大和田　操(1989). 新生児マススクリーニング　ハンドブック(成瀬　浩，松田一郎編), p240-244 南江堂,東京.

平成20年12月１日

ヒト染色体に関する調査研究　―血液―
（平成19年度）

林　美貴子　　品川保弘　　本田幸子　　前多隆志

Chromosome Analysis of Human Peripheral Blood Cells

Mikiko HAYASHI, Yasuhiro SHINAGAWA, Sachiko HONDA and Takashi MAEDA

要　旨　平成19 年度の血液の染色体分析数は64件，染色体異常数は4件であった。理由は「流産を繰り返す夫婦」が最も多く78%をしめた．染色体異常の内訳は均衡転座保因者が2件,iso(Xp)モザイクが1件とダウン症候群1件であった．

当所では富山県総合母子保健対策の一環として，先天異常の発生原因を明らかにし，その発生を減少させる目的で染色体分析法の研究を行うとともに昭和48年度から染色体検査を行ってきた．

一般に出生児の約0.6%が何らかの染色体異常を有すると報告されている[1]．これを富山県に単純に当てはめると年間出生数1万人に対し，約60人の染色体異常児が毎年出生することになる．さらに年々加算されていくことを考えるとこれは母子衛生上大きな位置を占めると考えられている．上記の0.6%のなかには性染色体異常（ターナー症候群やクラインフェルター症候群等）のように新生児時期に，外見上判別し難いものや，均衡転座保因者のように流産の原因検索のための染色体検査を行い発見されるものもある．また，遺伝相談の普及や，不妊治療の発達に伴い，染色体検査も増加している現状である．さらに，高精度分染法の発達や染色体の部分や特定の遺伝子近傍の DNA プローブを用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）法等の開発により，最近の染色体分析技術は従来に比較し，著しく向上してきている．

ここに，平成19年度の内容について報告する．

実　施　方　法

染色体異常を疑われた，又は他の疾患との鑑別のため，染色体検査を必要とした人の末梢血液(ヘパリン採血)を通常の方法により，3〜4日間培養し，染色体標本を作製した[2]．また，染色法は通常の G 分染法と高精度分染法[3]を併用した．核型分析は中期分裂像を5個以上，数の分析は20個以上について行った．

表１．血液の染色体分析受付病院

病　院　名	件数
富山大学	26
富山赤十字病院	14
さたけ産婦人科	8
県立中央病院	5
富山市民病院	4
黒部市民病院	4
高岡市民病院	1
おとぎの森レディースクリニック	1
福井大学	1
計	64

性染色体異常を疑われた場合はモザイクの可能性を考え，観察数を50個以上に増やした．また，FISH 法はモザイクおよび微細な異常が疑われた場合に併用した．

平成19年度の染色体分析数は64件で，病院・医院内訳は表1に示した．

結　　果

平成19年度の分析数は血液64件(人)であった．最も多い理由は「流産を繰り返す夫婦」であった．その他は低身長（ターナー症候群の疑い）,子宮内胎児死亡等であった．うち，染色体異常は均衡転座保因者2人,

iso(Xp)モザイク１人とダウン症候群1人の計4人であった（表2)。各症例の核型分析結果と臨床症状の概要を下記に示した.

症例1．転座型保因者（夫）
核型；46,XY,t(3;6)(q29;p22)　(図1)
自然流産歴3回（各13週，8週，8週,いずれも心拍確認後）
第3回目の流産胎児の核型；47,XX,+15　[4]［5］
妻；正常核型

症例2．iso(Xp)モザイク（3歳女児）
核型；46,X,idic(X)(q13)/46,XX(14/86) (図2,3)
症状；低身長，ターナー兆候は乏しい

症例3．均衡転座保因者（妻）
核型；46,XX,t(12；19)(p13.1;p13.1)　(図4)
自然流産歴2回，妊娠中
羊水の核型；均衡転座保因　[6]
夫；正常核型

症例4．ダウン症候群　（生後2日女児）
核型；47,XX,+21
症状；出生時，在胎38週4日，2,522g，45cm
出生前から大腿骨短がみとめられた
両眼隔離，眼裂斜位，鞍鼻等

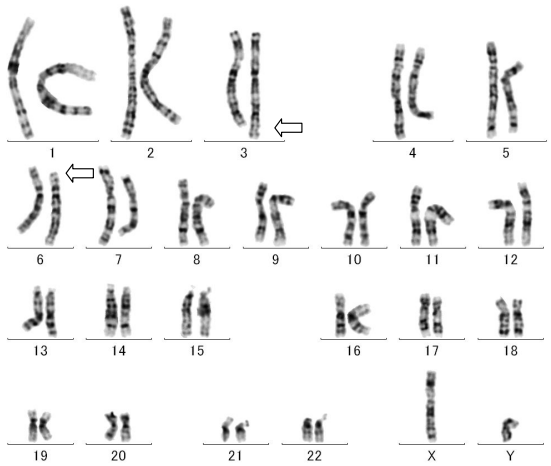
考　　察

最近の分析理由で最も多いものは流産を繰り返すためであった。流産回数と染色体異常の有無について，過去の結果をまとめた．判定可能であった995人中38人に染色体異常が発見され，異常率は3.82%，夫婦単位にすると約14組に1組の割合で染色体異常が認められた（表3)．染色体異常が確認された38人は男性20人：女性18人と男女ほぼ同じ割合であった.流産回数と染色体異常の有無についても検討したところ，2回流産を経験した時点で検査を受けている人が最も多く，さらに，染色体異常のある人は流産歴2～4回に集中していた．その染色体異常と流産歴については表4に示した．一般に流産を繰り返す夫婦（不育症）で発見される染色体異常の男女比は1:2とされる［7］が，当所での検査ではほぼ同数で推移しており，女性の方に染色体異常が多いという偏見をなくすとともに，夫婦同時の染色体検査受検が望まれた．また，流産を繰り返す夫婦（不育症）の原因中，染色体異常である場合，他の理由よりも児を得る可能性が高いといわれている．そのため，不育症夫婦の染色体検査を行うことは今後の妊娠指導や遺伝相談に資するものと考えられた．

最後に，人や家族に大きな影響を与える染色体異常の確定診断は染色体検査に基づいて行われるものであり，重要な臨床検査として位置づけられている．そのため，日本人類遺伝学会では平成6年度より，臨床細胞遺伝学認定士制度を設け，人材育成に積極的に携わっている．当所では2人が臨床細胞遺伝学認定士として

表２．血液の染色体検査依頼理由と結果

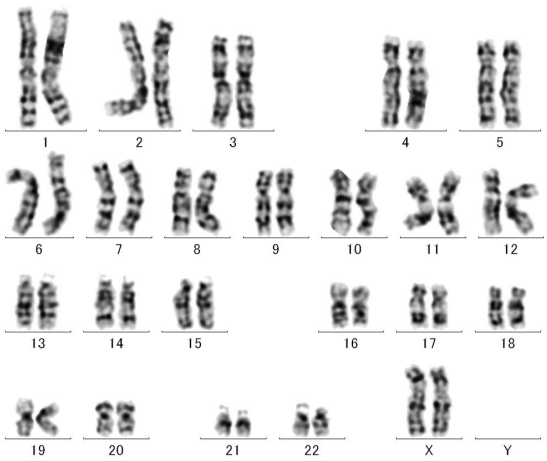
依　頼　理　由	検査数	判定数	異常数	
流産を繰り返す夫婦	50	50	1	症例1
内訳　流産２回	22	22	1	
流産３回	20	20		
流産４回	2	2		
生産児１人と流産２回	2	2		
生産児１人と流産３回	2	2		
生産児２人と流産３回	2	2		
低身長等	5	5	1	症例2
子宮内胎児死亡（両親）	4	4	0	
第１子染色体異常	2	2	0	
羊水検査の確認（両親）	2	2	1	症例3
ダウン症候群の疑い	1	1	1	症例4
計(人)	64	64	4	



46, XY, t(3;6)(q29;p22)

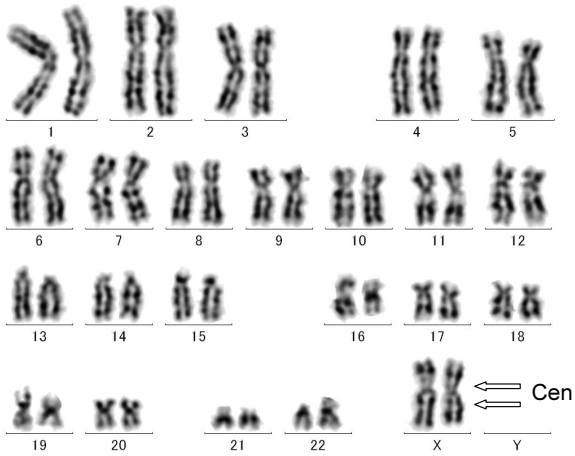
⇦ ; 切断点

図 1 . 症例 1 の核型



46, XX

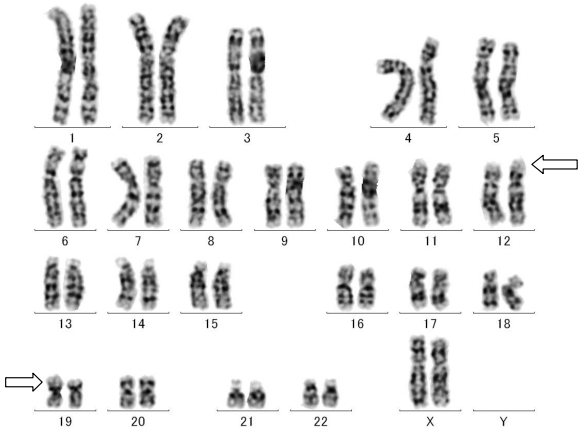
図 3 . 症例 2 の核型



46, X, idic(X)(q13)

Cen ;動原体

図 2 . 症例2の核型



46, XY, t(12;19)(p13.1;p13.1)

⇦ ; 切断点

図 4 . 症例 3 の核型

表 3 . 流産回数と染色体異常の有無

児の有無	児無し			児有り		計　人	異常率
流産回数	夫婦	夫のみ	妻のみ	夫婦	妻のみ		
1	52 (1)		2	12		66 (1)	1.52%
2	462 (11)	1	3	92 (4)	1 (1)	559 (16)	2.86%
3	206 (13)	1	4 (1)	80 (4)	1	292 (18)	6.16%
4	34 (3)			18		52 (3)	5.77%
5	6		1	6	1	14 (0)	0.00%
6	4			2		6 (0)	0.00%
7	2					2 (0)	0.00%
8	4					4 (0)	0.00%
計　人	770 (28)	2 (0)	10 (1)	210 (8)	3 (1)	995 (38)	3.82%

(　) 内染色体異常数

表４．流産を繰り返す夫婦中染色体異常のあった36例の核型と既往歴

No.	核型	検査時既往歴
夫		
①	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	流産２
②	46,XY,t(1;4)(q11;p15.2)	流産２
③	46,XY,t(1;7)(q42;q32)	生産１・流産３
④	46,XY,t(1;7)(q45;q11)	流産３
⑤*	46,XY,t(1;12)(q42;p13)	生産１・流産６・妊娠中
⑥	46,XY,t(1;12)(q42;p13)	生産１・流産３
⑦	46,XY,t(1;12)(q42;q14)	流産１
⑧	46,XY,t(3;6)(q29;p22)	流産３
⑨	46,XY,inv(9)p11q13),t(4;10)(q31;q25)	流産３
⑩	46,XY,t(4;15)(q12;q24)	流産２
⑪	46,XY,t(4;18)(q31.3;q21.3)	流産２
⑫	46,XY,t(5;16)(p13;p13)	生産２・流産３
⑬	46,XY,t(8;14)(p11;q32)	流産４
⑭	46,XY,t(8;15)(q11.2;q15)	流産３
⑮	46,XY,t(8;21)(q24.2;q21.2)	流産４
⑯	46,XY,inv(8)(p21q24.2)	流産４
⑰	46,XY,t(9;17)(q34.1;q21)	流産２
⑱	46,XY,t(11;14)(p15.5;q32.1)	流産２
⑲	46,XY,t(14;20)(q24;q13.1)	流産４
⑳	46,XY,t(14;20)(q24;q13.1)	流産２
妻		
①	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	生産１・流産2・妊娠中
②	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	生産１・流産6・妊娠中
③	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	生産１・死産１・流産３・妊娠中
④	45,XX,der(13;21)(q10;q11)	流産２
⑤	45,XX,der(14;21)(q10;q12)	生産１・流産３
⑥	46,XX,t(1;15)(q42;q26)	流産２
⑦	46,XX,t(3;4)(p13;p16)	流産３
⑧	46,XX,t(3;10)(q29;q22)	流産３
⑨	46,XX,t(3;13)(q25;q11.2)	流産４
⑩	46,XX,t(3;21)(q27;q11.2)	流産２
⑪	46,XX,t(4;15)(q33;q15)	生産３・流産２
⑫	46,XX,t(5;12)(p14;p12)	胎児死亡２
⑬	46,XX,t(7;20)(p23.1;q11.2)	流産３
⑭	46,XX,t(8;15)q(11.2;q26.1)	流産２・死産１
⑮	46,XX,t(10;18)(q23;q11.2)	流産３
⑯	46,XX,t(12;19)(p13.1;p13.1)	流産２・妊娠中
⑰	47,XXX	流産２・胎児死亡１
⑱	47,XX,+mar	流産２

＊；夫婦

認められ，その認定士の中からさらに指導士として2人とも委嘱されている現状である．

謝　　辞

各症例の臨床像のご提供と採血に対しご協力いただきました方々に深謝いたします．

文　　献

１．大濱紘三，三春範夫（1996）．染色体異常の発生頻度，64-74,臨床染色体診断法,金原出版.
２．林美貴子，本田幸子，大江浩，北村敬(2001)．富山衛研年報，24，56-60.
３．Yunis,J.J., Sawyer,R. and Ball,D.W.(1978). Chromosoma, 67, 293-307.
４．林美貴子，品川保弘，本田幸子，前多隆志(2008). 富山衛研年報，31，63-64.
５．林美貴子，本田幸子，本間一正（2007）．日本人類遺伝学会第52回大会抄録集，148.
６．本田幸子，品川保弘，林美貴子，前多隆志(2008). 富山衛研年報，31，59-62.
７．De Braekeleer MD, Dao TN(1990). Hum.Reprod., 5, 519-528.

ヒト染色体に関する調査研究　―羊水―
（平成19年度）

本田幸子　　林　美貴子　　品川保弘　　前多隆志

Chromosome Analyses of Amniotic Fluid Cells

Sachiko HONDA, Yasuhiro SHINAGAWA, Mikiko HAYASHI and Takashi MAEDA

要　旨　平成19年度の羊水の染色体検査は，受付件数が64件で，昭和49年度からの累計件数では1,568件となった．今年度は18トリソミー症候群2件，ダウン症候群2件，ターナー症候群と（12；19）転座型異常がそれぞれ1件で，計6件の染色体異常がみとめられた．今年度までの累計件数では84件の異常がみとめられている．染色体検査の依頼理由(主訴)は，「高齢妊娠」,「胎児に異常が疑われる」等が大半を占めた．

富山県においては、昭和48年度から、総合母子保健対策の一環として、染色体検査事業が開始された。当所における染色体検査は，昭和48年度から血液を対象として始まり，49年度からは羊水，さらに50年度からは自然流産胎児，絨毛等が加わり，今日にいたっている．

最近では、晩婚化傾向にともなう高齢妊娠の増加や、超音波診断装置等の発達により胎児の異常が発見されることが多くなり、染色体検査の要望が高くなっている。また遺伝子診断等の高度な技術も要求されるようになっている。ここに平成19年度の羊水の検査状況、結果等を報告する．

実　施　方　法

染色体標本作成は，主に妊娠15～17週に採取された羊水15ml～20ml を静置または軽く遠心(800～900rpm 5分)し，沈殿した細胞に培養液(AmnioMAX™ Gibco SRL)を加え，再浮遊し，１検体につきシャーレ（Falcon Tissue Culture Dish 35×10mm）２枚以上を作製して炭酸ガス培養(5%CO_2 37℃)を行った．培養期間は9～12日間で，その間，細胞の増殖（コロニー形成）を確認しながら培養液交換を1～２回行った．細胞分裂が十分に行われていることを確認した後，染色体標本作成を行った．方法等の詳細は既年報[１]に従った．

染色は通常のギムザ染色およびGバンド分染を行い，必要により，Cバンド法による分染やクロモゾームペインティング法等の FISH 法を用いて行った．１検体につき20個以上の中期核板の顕微鏡写真を撮り，判定した．

結果および考察

今年度の染色体検査受付総数は64件で，すべて富山県内の医療施設からの依頼であった（表１）．染色体分析はすべて可能であった．分析の結果，染色体異常6件がみられた．依頼理由，結果等は表２に示した．

検査事業開始時から平成19年度までの検査受付総数1,568件のうち，分析可能数は1,521件で，分析率としては97.0％であった．また，異常累計数は84件で，異常率としては5.5％となった．

今年度検査依頼の理由として一番多いのは「高齢妊娠」の37 件で，受付総数の57.8％にあたる．その年齢は34歳から48歳であった。今年度，高齢妊娠を主訴とする依頼検体を検査・分析した結果，18トリソミー症候群（症例1），ダウン症候群（症例2）の染色体数的異常が2件みられた。症例の詳細は下記に記した。母親の加齢とともに，ダウン症候群のようなトリソミー型染色体異常の発生率が高くなることはよく知られている．今年度の主訴が高齢妊娠中の異常は2件であるが，他の主訴で依頼された検体中の異常4件のうち2件（症例3，4）は35歳以上の高齢妊娠で，ともにトリソミー型の染色体異常であった．従って今年度のトリソミー型異常4件は全て35歳以上の高齢妊娠となる．

次に多いのは，「胎児に奇形等の異常が疑われる」という理由で16件の依頼があり，このうち3件に染色体異常がみられた．依頼の内訳では，胎児に Nuchal

translucency (NT) の肥厚（3〜10ｍｍ）がみられたとするものが14件ともっとも多く，このうち1件にダウン症候群（症例3）の異常がみられた．これは最近の超音波診断の進歩により，胎児の状況がよく診られるようになったからと考えられる．特に，妊娠10〜14週胎児の NT の肥厚が異常の判断の指標として採用され，トリプルマーカー等の検査より正確ともいわれてきたが[2]，最近はこれについても異論が出され検討されつつある．しかし当所においては，近年 NT にかかわる依頼が増加しており，異常率も高い傾向にあった [3]．そのほか，小脳低形成，臍ヘルニア，オーバーラップ指等の多発奇形が疑われる1件と，頚部リンパのう胞がみられる 1件の依頼があり，それぞれ18トリソミー症候群（症例4），ターナー症候群（症例5）の染色体異常がみられた．

「染色体異常児妊娠・出産既往」を主訴とする依頼が4件あったが，異常はみられなかった．それらの内訳は「前子が18トリソミー症候群」,「前子がダウン症

表１．染色体検査依頼病院（羊水）（平成19年度）

病　院　名	件数
富山市民病院	12
おとぎの森レディースクリニック	12
富山県立中央病院	11
黒部市民病院	8
富山赤十字病院	5
厚生連高岡病院	5
富山大学附属病院	3
高岡市民病院	3
さたけ産婦人科	3
砺波総合病院	1
菅田産婦人科医院	1
計	64

表２．羊水の染色体検査依頼理由と結果　（平成１9年度）

依頼理由（主訴）	受付数	異常数	染色体異常の核型
高齢妊娠	37	2	
34歳以下	1	0	
35〜39歳	22	0	
40歳以上	14	2	47,XX,+18(症例1)　47,XY,+21(症例2)
胎児異常の疑い	16	3	
Nuchal translusency	14	1	47,XY,+21(症例3)
多発奇形	1	1	47,XX,+18(症例4)
頚部リンパ腫	1	1	45,X(症例5)
染色体異常児妊娠・出産既往	4	0	
前子ダウン症	1	0	
前子ターナー症	1	0	
前子+18	1	0	
不明	1	0	
転座型保因	3	1	
t(12;19)	1	1	46,XY,t(12;19)(p13.1;p13.1)mat(症例6)
t(13;14)	1	0	
t(14;21)	1	0	
トリプルマーカー等	2	0	
前児異常（染色体異常除く）	1	0	
強い希望	1	0	
計	64	6	

候群」,「前子がターナー症候群」,「前子核型不明」がそれぞれ1件であった.

妻または夫が転座型保因者（12；19，13；14，14；21）であることを理由に各1件依頼があり，症例6の検体で親と同じ均衡転座型染色体異常（12；19）がみとめられた.

また，主訴が「トリプルマーカー，クアトロテストが高値」で2件の依頼があった．今回はいずれも異常は見られなかった．ただ，高齢妊娠を主訴とした症例1ではトリプルマーカーの値が1/14と高値であった.

その他に,「前子に異常（染色体異常以外)」,「本人の強い希望」という理由で依頼がそれぞれ１件あったが，異常はみられなかった.

〈症例１〉

年齢・妊婦：41歳
　　夫　：38歳
羊水採取時の妊娠週数：17週
主訴・依頼理由：高齢妊娠
既往歴・他：3回目の妊娠8週で自然流産
今回は4回目の妊娠，今回トリプルマーカー値1/14
分析結果：46,XX+18（18 トリソミー症候群）
経過・予後等：

〈症例２〉

年齢・妊婦：42歳
　　夫　：45歳
羊水採取時の妊娠週数：16週
主訴・依頼理由：高齢妊娠
既往歴・他：前2回の妊娠・出産
分析結果：47,XY,+21（ダウン症候群）
経過・予後等：

〈症例３〉

年齢・妊婦：36歳
　　夫　：37歳
羊水採取時の妊娠週数：17週
主訴・依頼理由：NT 肥厚（3.5〜4.0mm）
既往歴・他：今回5回目の妊娠，第1，3，4回目の妊娠は自然流産
分析結果：47,XY,+21（ダウン症候群）
経過・予後等：

〈症例４〉

年齢・妊婦：40歳
　　夫　：　歳
羊水採取時の妊娠週数：32週
主訴・依頼理由：胎児多発奇形（小脳低形成，臍ヘルニア，オーバーラップ指等）で異常を疑う
既往歴・他：今回5回目の妊娠，第3回目の妊娠は自然流産
分析結果：47,XY,+18（18 トリソミー症候群）
経過・予後等：

〈症例５〉

年齢・妊婦：30歳
　　夫　：28歳
羊水採取時の妊娠週数：17週
主訴・依頼理由：頚部リンパのう胞
既往歴・他：1回目の妊娠
分析結果：45,X（ターナー症候群）
経過・予後等：

〈症例6〉

年齢・妊婦：29歳
　　夫　：31歳
羊水採取時の妊娠週数：15週6日
主訴・依頼理由：均衡転座型保因者 46,XX,t(12;19)
既往歴・他：今回3回目の妊娠，第1,2回目妊娠は自然流産
分析結果：46,XX,t(12;19)(p13.11;q13.1)mat
経過・予後等：

羊水穿刺等による出生前診断は，日本人類遺伝学会等から示されている「出生前診断に関するガイドライン・遺伝カウンセリング」等に従い，次のようなケースについて実施されている.

- 夫婦のいずれかが染色体異常の保因者
- 染色体異常児を分娩した既往がある
- 高齢妊娠
- 妊婦が重篤な X 連鎖遺伝病のヘテロ接合体
- 夫婦のいずれもが重篤な劣性 or 優性遺伝病のヘテロ接合体
- その他，重篤な胎児異常のおそれがある

今年度は検査の依頼理由がこのガイドラインに該当しない症例が1件あった．前にも述べたが，本人が強く希望したということで，その詳細は不明である．以前に同じ依頼理由の中から染色体異常が認められたこ

ともあるので、これらの対処には苦慮している．

検査にあたっては，最近の遺伝子診断技術の急激な進歩に伴い，高精度分染法やクロモゾームペインティング法，FISH 法等により分析精度を上げるよう努力し，異常が疑われる検体については，これらの技術を導入した．しかし，出生前診断としての羊水等の染色体検査には，母親細胞混入の危険性があること，培養細胞を分析していること，微細な染色体異常やモザイク症がすべて把握されるわけではないこと，染色体異常が発見されてもほとんどが治療困難であること等多くの問題がある．また，倫理的，社会的な問題も残されており，臨床の場において，十分なインフォームドコンセントがなされたうえでの検査が必要である．

謝　　辞

ここに発表しました症例の調査にご協力をいただきました各医療施設の関係者の方々に，深謝いたします．

文　　献

１．本田幸子，林美貴子，大江浩，北村敬（2001）．富山衛研年報，24，54-60.
２．佐藤孝道(2001)．臨床検査，45(２)，161-166，医学書院.
１．本田幸子，林美貴子，加藤丈士（2003）.富山衛研年報，26，149 -151.
２．池内達郎(1999)．遺伝子・染色体検査学(奈良信雄編)，p131-135　医歯薬出版.

ヒト染色体に関する調査研究　―流産胎児―
（平成19年度）

林　美貴子　　品川保弘　　本田幸子　　前多隆志

Chromosome Analyses of Abortus Cells

Sachiko HONDA, Yasuhiro SHINAGAWA, Mikiko HAYASHI and Takashi MAEDA

要　旨　平成19年度の流産胎児の染色体検査数は17件で，12件に染色体異常を認めた．理由(主訴)は,半数に出産歴なしで流早産2～4回目，残る半数は出産歴ありで流早産1～3回目であった．

一般に自然流産胎児の約半数に染色体異常がみとめられるが，これまでの当所での結果も50%を超えている．自然流産胎児の染色体検査を行うことは原因不明の流産の原因を明らかにし，次回の妊娠につなげることができることから，重要視されているのが現状である．富山県においては、昭和48年度から、総合母子保健対策の一環として、染色体検査事業が開始され，昭和50年度から自然流産胎児の染色体検査が実施されている．平成19年度の流産胎児の検査状況および結果を報告する．

実　施　方　法

検体はおもに，流産胎児の皮膚組織,および流産胎児の付属物である絨毛組織等であった．受付病院を表1に示した．

検体の培養は2通りの方法で行った．その①，これらの組織をハサミで細切後，シャーレの上に並べ，培養液を添加し，炭酸ガス培養を行った．その②，組織をハサミで細切後，トリプシン処理，コラーゲン処理［1］を行った細胞を①と同様に培養した．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い，標本作成した．培養液はAmnioMAXTM（Gibco）を用いた．詳細は既年報[2]に従った．

結果および考察

平成19年度の受付検体数は17件で，すべて分析可能であった．依頼された流産胎児の週数は6週から16週であった．17件中12件（70.6%）に染色体異常がみとめられた．また今回の流産時点の母体年齢は24歳～41歳（平均33.1歳）で，トリソミー，モノソミーなどの数的異常を持つ症例では平均31.9歳（26～41歳）であった．21トリソミー症候群は母体年齢が高齢になるに従い，発生率が高くなることが知られているが，当所においては症例数がまだ少なく，母体年齢と染色体異常および流産の関係についてはまだ明らかにならなかった．

検査理由は，流産1回目である1人を除いて，「過去にも流早産をしたことがあるため」であった．表2に異常を確認したすべての核型を示した．しかし，46,XY/46,XX の2例については，本当は46,XY の胎児であるにもかかわらず，検体採取時に母細胞の混入があった可能性を否定できなかった．この2例を除くと残る12件の異常はすべて数的異常であった．17件中15件については，末梢血での両親の染色体検査を行った（以前に行っているものも含め）．うち１人が均衡転座保因者であった．父が(3；6)均衡転座で流産3回目の胎児は15トリソミーであった［3］．

表１．流産胎児の染色体分析受付病院

病　医　院　名	件数
富山赤十字病院	4
さたけ産婦人科	4
富山大学	3
県立中央病院	3
黒部市民病院	2
富山市民病院	1
計	17

表２．流産胎児の染色体検査依頼理由と結果

依　頼　理　由		受付・分析数	異常数	染色体異常の核型		
出産歴なし	流早産２回目	4	2	45,X	47,XX,+9	
	３回目	3	3	45,X	47,XX,+15	46,XY/46,XX
	４回目	2	1	47,XY,+16		
出産歴あり	流早産１回目	1	1	47,XY,+16		
	２回目	3	3	47,XX,+22	69,XXY	46,XY/46,XX
	３回目	4	2	47,XX,+5	47,XX,+22	
計(人)		17	12			

一般に，まだ，流産の原因が母体側にあると思われていることが多いが，原因が染色体異常によるものと判明することによって，その精神的負担を軽減している現状もある．このように，流産胎児の染色体分析は今後の遺伝相談の資料として次回妊娠につながるなど，母子医療に役立つと考えられる．

謝　　辞

ここに発表しました症例の調査にご協力をいただきました各医療施設の関係者の方々に，深謝いたします．

文　　献

１．前田徹（1996）臨床染色体診断法，256－259，金原出版．
２．本田幸子，林美貴子，大江浩，北村敬（2001）．富山衛研年報，24，54－60．
３．林美貴子，品川保弘，本田幸子，前多隆志（2008）富山衛研年報，31，54－58．

日本脳炎流行予測調査（感染源調査）2007年

山内健生　　小原真弓　　長谷川澄代　　渡辺　護[1]　　川尻千賀子[2]

Epidemiological Surveillance of Japanese Encephalitis in Toyama Prefecture in 2007

Takeo YAMAUCHI, Mayumi OBARA, Sumiyo HASEGAWA, Mamoru WATANABE[1] and Chikako KAWASHIRI[2]

要　旨　富山県内において，コガタアカイエカの発生消長，豚血清の日本脳炎 HI 抗体保有状況，蚊と豚の日本脳炎ウイルス保有状況を調査した．コガタアカイエカは，調査を開始した6月第1週から各定点において捕集され，7月下旬～9月上旬にピークを形成した．すべての定点において，2007年の捕集数は2006年と比較して大幅に増加した．豚の日本脳炎 HI 抗体保有調査では，調査を開始した7月より毎週抗体陽性の豚がみられ，9月までの間に2頭が新鮮感染を示した．10月に入ってからは新鮮感染を示す豚が毎週みられ，抗体価も640倍以上の豚が多くなった．その後も10月最終週までの間に高い抗体保有率と高い抗体価が維持された．全体として，新鮮感染を示す豚の数は14頭，抗体価640倍以上の豚は47頭であった．蚊と豚から，9～10月に日本脳炎ウイルスが分離され，この時期にウイルスが濃厚に存在したと考えられた．これらの状況から，日本脳炎患者が発生する可能性は2006年より高いと考えられたが，県内において患者は発生しなかった．

近年の国内における日本脳炎患者発生数は少なく推移している．しかしながら，全国での日本脳炎流行予測調査の結果から，ウイルスは確実に活動しているといえる[1,2]．富山県においても毎年ウイルスの流行が確認されており[3-7]，日本脳炎の脅威は続いている．そこで，2007年にも本研究を継続し，日本脳炎ウイルスを媒介するコガタアカイエカの発生状況とウイルスの浸淫状況を調査したので報告する．

I. 蚊の発生調査

1．調査地と調査方法

蚊の捕集定点は2006年[7]と同様であった（表1，図1）．調査期間および調査方法も2006年とほぼ同様であった．すなわち，「3．黒牧」と「4．大井」では6月1日から10月18日まで，ライトトラップ(東京エース製，15W 捕虫円型管)による連日捕集を行なった．なお，ライトトラップの作動は照度感受スイッチ(EE8113K ニュー EE スイッチ，National 松下電工)によってコントロールされるため，捕集時間帯は日没(照度約40ルクス）から日の出（照度約120ルクス）までである．他の5定点では6月6日（第1週）から10月17日（第3週）まで，毎週水曜日にトラップを一晩点灯し，捕集を行なった．なお，前2定点では，畜舎管理者が毎朝トラップ捕集籠の捕獲物をクロロホルムで麻酔した後，70％エタノールの入った500ml ポリ瓶に移した．後5定点では毎週水曜日に畜舎管理者が電源コンセントを差し込み，木曜日の朝に筆者らが電源コンセントを抜き，捕集籠を回収・交換した．このようにして得られた捕集籠内の蚊類を，検査室にて分類・計数した．

2．結果

表2に，全調査定点における毎週水曜日の捕集成績を，表3に「3．黒牧」と「4．大井」における連日捕集の成績を示した．コガタアカイエカは，調査を開始した6月第1週から各定点において捕集され，6月下旬から「2．上市」「4．大井」で顕著な増加がみられた．全体的には7月下旬～9月上旬に発生のピークがみられた．週1日捕集での年間捕集数は「2．上市」が最も多く，「7．射水」「4．大井」と続いた．

表4に，1991年からのコガタアカイエカの定点別捕集数を示した．すべての定点において，2007年の捕集数は2006年のそれに比べて大幅に増加した．

1．国立感染症研究所　　2．富山県厚生部健康課

表１．コガタアカイエカ捕集定点（畜舎）の概要（2007年）

地点番号	地名	飼育家畜	地　点　の　概　要
1	黒部市荻生	肥育豚90頭，親豚30頭	平野部水田・畑作地帯．南西側は幅10m ほどの黒瀬川に接し，北東側に排水処理場．最も近い水田とは30m離れている．
2	上市町湯上野	乳牛48頭，和牛20頭	水田地帯はずれの丘陵地．側面は社叢で，背面は杉林と畑．西100mに厩舎，北東，東100mに水田，北300mに上市川．
3	富山市東黒牧上野	乳牛40頭	丘陵稜線部（標高162m）．周辺には大学などの教育機関，雑木林，畑，民家が点在する．半径300mの範囲に水田は無い．
4	富山市大井	乳牛30頭，和牛6頭，子牛6頭	平野部水田地帯．北側200mに新興住宅団地がある．南東1km に熊野川．近くには他の畜舎は無い．
5	小矢部市鷲ヶ島	乳牛40頭	平野部水田地帯．事業所，人家点在．近くに他の畜舎は無い．東側は幅4mほどの水量豊富な用水に隣接．
6	富山市婦中町友坂	乗用馬9頭	丘陵部の裾野．周囲に水田，畑，雑木林，墓，人家が点在．南東1,000mに牛舎(約50頭）あり．
7	射水市山本新	肉牛60頭	丘陵部水田地帯．人家点在．近くに同一人の肉牛舎あり．周囲は溜池，畑，梨園に隣接．

図１．コガタアカイエカ捕集定点（2007年）

表２．７定点（畜舎）におけるコガタアカイエカ雌成虫の捕集数（2007年）

調査日	調査地点						
	1. 黒　部	2. 上　市	3. 黒　牧	4. 大　井	5. 小矢部	6. 婦　中	7. 射　水
6月6日	20	136	191	656	11	17	268
13日	26	282	448	1,346	309	59	369
20日	163	1,604	1,423	6,718	2,408	80	1,287
27日	127	4,541	770	3,014	430	165	169
7月4日	176	6,364	116	11,568	1,305	189	784
11日	562	6,258	22	5,283	1,164	252	3,603
18日	129	9,869	18	1,934	623	146	1,061
25日	18	4,371	0	4,730	2,568	77	1,235
8月1日	0	4,651	-	2,293	2,497	259	2,609
8日	1	2,350	5	938	2,556	505	1,704
15日	696	5,510	-	-	3,856	2,456	4,059
22日	3,568	21,865	-	5,109	5,371	4,247	20,978
29日	2,320	13,217	377	12,150	5,238	5,801	12,231
9月5日	3,000	27,928	199	2,818	3,281	674	9,629
12日	893	25,928	356	2,115	5,860	488	3,758
19日	1,576	43,236	361	12,389	12,328	828	36,761
26日	564	25,514	48	822	983	111	3,782
10月3日	109	2,783	8	493	467	25	868
10日	29	841	0	165	169	23	68
17日	5	110	0	23	0	6	11
計	13,982	207,358	4,342	74,564	51,424	16,408	105,234

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3日から10月30日までの約4ヶ月間，富山食肉総合センターに搬入された生後6か月の県内産（小矢部市，南砺市，上市町）の豚を対象として，毎週10～30頭から血液を採取し，合計428頭の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況を調査した．抗体価の測定は例年のごとく感染症流行予測調査事業検査術式［8］に従った．被検血清はアセトン処理を2回行い，非特異的赤血球凝集抑制物質を除去し，市販の日本脳炎 CF，HI 試薬「生研」JaGAr01株（デンカ生研）を抗原として，赤血球凝集抑制（HI）反応で抗体価を測定した．血球はガチョウの赤血球を用い，HI 反応はマイクロタイター法で行った．

２．結果および考察

採血日と HI 抗体価の測定結果を表5に示した．7月3日の調査で，抗体価が20倍の豚が1頭みられた．9月までの間に，7月30日の1頭及び9月11日の1頭が新鮮感染を示した．その他の豚は全て20倍までの低い抗体価であった．10月1日以降は新鮮感染を示す豚が毎週みられ，抗体価も640倍以上の豚が多くなった．10月16日には，抗体保有率は93.3%，新鮮感染率は37.5%となり最も高くなった．その後も高い抗体保有率と高い抗体価が維持されたが，10月29，30日に新鮮感染を示す豚が0%となった．全体として，新鮮感染を示す豚の数は14頭，抗体価640倍以上の豚は47頭であった．

以上のことから，2007年の日本脳炎ウイルス動態は，調査を開始した7月には既に一部の豚が感染していたが，本格的な流行は9月中旬頃から始まり，少なくとも10月まで流行が続いたと推測される．

III. 蚊と豚からの日本脳炎ウイルス分離

１．調査対象と検査方法

2007年5月から10月にかけて，県内の公園,林，富山空港，畜舎の計10地点（13ヶ所）で捕集した蚊をウイルス分離に用いた．また，抗体調査に用いた豚血清428検体についてもウイルス分離を行った．分離には，ヒトスジシマカ由来の C6/36細胞とアフリカミドリザル由来の Vero9013細胞を用いた．細胞変性が現れた検体の培養上清について，フラビウイルス NS3領域または日本脳炎ウイルスエンベロープ領域を対象とした RT-PCR を実施した．蚊と豚から得られた，日本脳炎ウイルスエンベロープ領域の PCR 産物について，

表3-1.　2定点におけるライトトラップの連日調査による蚊雌成虫捕集成績（2007年6月）

調査日	3．黒　牧					4．大　井				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
6月1日	0	112	0	7	119	0	350	3	0	353
6月2日	0	61	0	8	69	0	759	9	0	768
6月3日	0	309	2	8	319	0	1,010	12	0	1,022
6月4日	0	176	0	3	179	0	1,029	7	0	1,036
6月5日	0	313	4	12	329	0	765	4	0	769
6月6日	0	191	1	8	200	0	656	2	0	658
6月7日	0	265	0	2	267	0	1,297	5	0	1,302
6月8日	1	107	0	3	111	0	836	5	0	841
6月9日	0	106	1	2	109	0	1,146	3	1	1,150
6月10日	1	46	0	5	52	0	670	4	0	674
6月11日	0	63	1	3	67	0	400	3	0	403
6月12日	2	190	0	2	194	0	1,192	7	0	1,199
6月13日	0	448	0	3	451	0	1,346	6	1	1,353
6月14日	1	579	0	0	580	0	912	0	0	912
6月15日	1	179	2	2	184	0	477	0	0	477
6月16日	2	213	0	8	223	0	1,141	4	0	1,145
6月17日	1	165	0	5	171	0	2,015	4	0	2,019
6月18日	1	307	0	2	310	0	2,167	3	0	2,170
6月19日	3	330	1	2	336	0	2,801	5	1	2,807
6月20日	4	1,423	0	6	1,433	0	6,718	18	0	6,736
6月21日	2	1,670	0	2	1,674	0	2,823	6	0	2,829
6月22日	2	472	1	3	478	0	1,069	7	0	1,076
6月23日	3	981	2	3	989	0	2,805	13	0	2,818
6月24日	1	412	0	0	413	0	3,184	0	0	3,184
6月25日	0	764	1	5	770	0	6,248	6	0	6,254
6月26日	0	1,057	0	10	1,067	0	3,445	11	0	3,456
6月27日	1	770	0	6	777	0	3,114	7	0	3,121
6月28日	0	990	0	3	993	0	7,676	9	0	7,685
6月29日	0	92	0	2	94	0	22,843	5	0	22,848
6月30日	0	218	0	1	219	1	3,517	13	1	3,532
計	26	13,009	16	126	13,177	1	84,411	181	4	84,597

As＝シナハマダラカ，Ct=コガタアカイエカ，Cp=アカイエカ．
その他は，オオクロヤブカ，ハマダライエカ，ヒトスジシマカ，ヤマトヤブカである．

表3-2.　2定点におけるライトトラップの連日調査による蚊雌成虫捕集成績（2007年7月）

調査日	3．黒　牧					4．大　井				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
7月1日	1	111	0	1	113	0	2,926	4	1	2,931
7月2日	0	120	0	0	120	0	5,833	12	0	5,845
7月3日	0	59	0	0	59	0	4,626	3	0	4,629
7月4日	0	116	0	1	117	0	11,568	17	0	11,585
7月5日	0	53	0	0	53	0	5,256	0	0	5,256
7月6日	0	24	0	0	24	0	10,435	35	0	10,470
7月7日	－	－	－	－	－	0	9,799	5	0	9,804
7月8日	0	48	0	0	48	0	11,147	14	0	11,161
7月9日	0	22	0	0	22	0	12,529	28	0	12,557
7月10日	0	64	0	1	65	0	23,654	17	1	23,672
7月11日	0	22	0	0	22	0	5,283	22	0	5,305
7月12日	0	25	0	1	26	0	3,051	25	2	3,078
7月13日	0	22	0	1	23	0	3,678	8	0	3,686
7月14日	0	11	0	0	11	0	4,095	8	0	4,103
7月15日	－	－	－	－	－	0	5,501	12	0	5,513
7月16日	0	8	0	0	8	0	2,860	16	0	2,876
7月17日	0	7	0	0	7	0	1,389	11	0	1,400
7月18日	0	18	0	0	18	0	1,934	10	1	1,945
7月19日	0	21	0	0	21	0	2,601	19	0	2,620
7月20日	0	5	0	0	5	0	4,316	12	0	4,328
7月21日	0	1	0	0	1	0	4,719	12	0	4,731
7月22日	0	9	0	1	10	0	1,687	23	1	1,711
7月23日	0	13	1	1	15	0	1,483	4	1	1,488
7月24日	0	17	1	2	20	0	2,477	7	0	2,484
7月25日	0	0	0	0	0	0	4,730	6	0	4,736
7月26日	0	2	0	0	2	0	4,771	3	0	4,774
7月27日	0	11	0	1	12	0	1,631	10	0	1,641
7月28日	0	4	1	0	5	0	3,930	23	0	3,953
7月29日	0	8	0	0	8	0	8,120	29	0	8,149
7月30日	0	0	0	2	2	0	1,539	5	0	1,544
7月31日	0	45	2	3	50	0	638	2	0	640
計	1	865	5	15	887	0	168,206	402	7	168,615

注．－印はトラップの故障等による欠測，または次日，次々日にまとめて捕集したことを示す．
As＝シナハマダラカ，Ct=コガタアカイエカ，Cp=アカイエカ．
その他は，オオクロヤブカ，ヤマトヤブカ，ハマダライエカ，カラツイエカである．

表3-3.　2定点におけるライトトラップの連日調査による蚊雌成虫捕集成績（2007年8月）

調査日	3．黒　牧					4．大　井				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
8月1日	－	－	－	－	－	0	2,293	5	0	2,298
8月2日	0	21	1	0	22	0	13,737	14	0	13,751
8月3日	0	39	1	1	41	0	1,902	13	0	1,915
8月4日	0	12	1	5	18	0	7,624	10	0	7,634
8月5日	0	12	1	4	17	0	6,026	6	0	6,032
8月6日	0	53	0	2	55	0	2,348	7	0	2,355
8月7日	0	49	0	1	50	0	1,577	9	0	1,586
8月8日	0	5	0	1	6	0	938	3	0	941
8月9日	0	0	0	0	0	0	1,810	5	0	1,815
8月10日	0	15	1	2	18	0	1,437	11	0	1,448
8月11日	0	7	0	2	9	0	1,341	5	0	1,346
8月12日	0	2	1	0	3	0	204	3	0	207
8月13日	0	23	1	0	24	0	375	0	0	375
8月14日	0	9	0	0	9	0	2,520	4	0	2,524
8月15日	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
8月16日	0	17	0	1	18	0	2,215	0	0	2,215
8月17日	0	18	1	0	19	0	3,152	10	0	3,162
8月18日	0	3	0	2	5	0	1,834	5	0	1,839
8月19日	0	37	0	2	39	0	15,872	16	0	15,888
8月20日	－	－	－	－	－	0	3,499	3	0	3,502
8月21日	0	22	1	3	26	0	9,934	2	0	9,936
8月22日	－	－	－	－	－	0	5,109	7	0	5,116
8月23日	2	279	0	9	290	0	2,050	3	0	2,053
8月24日	－	－	－	－	－	0	1,966	6	2	1,974
8月25日	1	183	1	0	185	0	2,018	0	0	2,018
8月26日	0	56	1	3	60	0	4,222	1	0	4,223
8月27日	0	61	1	0	62	0	10,744	0	0	10,744
8月28日	0	326	1	0	327	0	5,151	0	0	5,151
8月29日	0	377	0	2	379	0	12,150	2	0	12,152
8月30日	0	340	1	2	343	0	8,925	0	0	8,925
8月31日	0	178	0	1	179	0	6,684	0	0	6,684
計	3	2,144	14	43	2,204	0	139,657	150	2	139,809

注．－印はトラップの故障等による欠測，または次日，次々日にまとめて捕集したことを示す．
　As＝シナハマダラカ，Ct=コガタアカイエカ，Cp=アカイエカ．
　その他は，オオクロヤブカ，ヤマトヤブカ，ハマダライエカである．

表3-4.　2定点におけるライトトラップの連日調査による蚊雌成虫捕集成績（2007年9月）

調査日	3．黒　牧					4．大　井				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
9月1日	2	847	2	4	855	0	3,156	4	0	3,160
9月2日	2	541	1	1	545	0	1,089	2	0	1,091
9月3日	1	231	2	2	236	0	1,365	5	0	1,370
9月4日	0	252	0	0	252	0	4,964	1	0	4,965
9月5日	0	199	0	2	201	0	2,818	1	0	2,819
9月6日	1	573	0	4	578	0	4,248	3	0	4,251
9月7日	0	322	1	0	323	0	5,856	3	0	5,859
9月8日	0	326	1	3	330	0	2,607	6	1	2,614
9月9日	0	6	0	1	7	0	2,998	10	0	3,008
9月10日	1	151	3	1	156	0	1,754	2	1	1,757
9月11日	1	199	2	4	206	0	2,775	5	0	2,780
9月12日	－	－	－	－	－	0	2,115	3	0	2,118
9月13日	2	356	2	3	363	0	2,003	3	0	2,006
9月14日	2	244	0	0	246	0	2,071	7	0	2,078
9月15日	0	137	1	2	140	0	2,441	4	0	2,445
9月16日	0	240	0	1	241	0	7,746	0	0	7,746
9月17日	0	29	1	0	30	0	25,280	0	0	25,280
9月18日	0	228	0	4	232	0	9,007	6	0	9,013
9月19日	1	361	0	0	362	0	12,389	0	0	12,389
9月20日	0	230	0	0	230	0	11,445	0	0	11,445
9月21日	0	70	0	0	70	0	9,035	3	0	9,038
9月22日	0	188	1	0	189	0	4,464	14	0	4,478
9月23日	0	115	0	0	115	0	798	9	0	807
9月24日	1	75	1	2	79	0	1,354	10	0	1,364
9月25日	0	42	0	2	44	0	1,351	5	0	1,356
9月26日	1	48	0	0	49	0	822	1	0	823
9月27日	0	72	0	0	72	0	548	4	0	552
9月28日	0	13	0	0	13	0	944	4	0	948
9月29日	0	49	0	2	51	0	1,632	3	0	1,635
9月30日	1	69	0	3	73	0	2,533	1	0	2,534
計	16	6,213	18	41	6,288	0	131,608	119	2	131,729

注．－印はトラップの故障等による欠測，または次日，次々日にまとめて捕集したことを示す．
　As＝シナハマダラカ，Ct=コガタアカイエカ，Cp=アカイエカ．
　その他は，オオクロヤブカ，ハマダライエカ，ヤマトヤブカである．

表3-5.　2定点におけるライトトラップの連日調査による蚊雌成虫捕集成績（2007年10月）

調査日	3．黒　牧					4．大　井				
	As	Ct	Cp	その他	計	As	Ct	Cp	その他	計
10月1日	0	20	0	1	21	1	2,278	1	0	2,280
10月2日	0	25	0	1	26	0	456	4	0	460
10月3日	0	8	0	2	10	0	493	1	0	494
10月4日	0	13	0	1	14	0	1,024	4	0	1,028
10月5日	0	12	0	0	12	0	949	2	0	951
10月6日	－	－	－	－	－	0	440	4	0	444
10月7日	0	15	0	0	15	0	82	1	0	83
10月8日	0	4	0	0	4	0	759	1	0	760
10月9日	0	1	0	1	2	0	311	2	0	313
10月10日	1	0	0	0	0	0	165	2	0	167
10月11日	0	5	0	1	6	0	149	0	0	149
10月12日	0	6	0	2	8	0	123	2	0	125
10月13日	0	2	0	0	2	0	48	1	0	49
10月14日	0	0	0	0	0	0	41	1	0	42
10月15日	－	－	－	－	－	0	12	0	0	12
10月16日	0	3	0	0	3	0	3	1	0	4
10月17日	0	0	0	0	0	0	23	2	0	25
10月18日	0	0	0	0	0	0	22	0	0	22
計	1	114	0	9	123	1	7,378	29	0	7,408

注．－印はトラップの故障等による欠測，または次日，次々日にまとめて捕集したことを示す．
　As＝シナハマダラカ，Ct=コガタアカイエカ，Cp=アカイエカ．
　その他は，ヤマトヤブカである．

表４．７定点における近年のコガタアカイエカ雌成虫の捕集数

年	1. 黒部	2. 上市	3. 黒牧		4. 大井		5. 小矢部	6. 婦中	7. 小杉
			毎週水曜	連日	毎週水曜	連日			
1991	1,702	14,322	-	-	7,640	51,218	4,318	-	-
1992	1,968	5,025	-	-	9,998	59,735	5,992	-	-
1993	642	1,100	-	-	8,827	72,509	5,093	-	-
1994	13,655	3,527	-	-	26,275	169,307	94,055	-	-
1995	6,398	1,790	-	-	26,247	161,391	21,751	-	-
1996	2,034	1,562	-	-	36,305	275,957	7,683	-	-
1997	7,054	1,466	-	-	23,743	172,373	45,250	-	-
1998	6,250	5,620	1,843	11,814	96,196	657,900	31,158	-	-
1999	1,954	2,676	1,319	11,379	52,436	344,498	27,944	-	-
2000	1,181	2,965	965	9,147	67,757	495,004	19,477	-	-
2001	1,443	6,574	1,819	10,433	78,846	504,862	12,877	-	-
2002	2,187	1,288	802	7,979	62,135	465,957	1,330	-	-
2003	2,181	195,869	496	2,644	60,527	469,460	17,963	8,555	25,219
2004	4,880	225,945	3,206	18,526	90,578	468,459	12,758	12,733	20,421
2005	8,392	295,817	3,974	13,291	88,321	735,891	12,088	11,424	34,968
2006	891	16,462	544	2,916	15,295	117,306	4,569	3,780	10,909
2007	13,819	203,488	4,143	22,118	73,227	516,504	50,777	16,337	104,019

注．１）6月2週から 9月末までの毎週水曜日におけるライトトラップ一晩捕集による成績．
２）連日捕集の期間は6月1日から9月30日まで．
３）1.黒部では1998年に，2.上市では1994年に定点の場所（畜舎）を変更した．上市ではさらに2003年に畜舎が30mほど移設された．5.小矢部では2003年に畜舎を変更した．

表５．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19年，2007年）

検　体 採取日	抗体価								２－ME 感受性 陽性数
	＜10	×10	×20	×40	×80	×160	×320	≧640	
7月3日	9 (30)		1 (10)						
9日	13 (65)	5 (25)	2 (10)						
17日	29 (97)		1 (3)						
23日	16 (80)	4 (20)							
30日	10 (50)	7 (35)	2 (10)		1 (5)				1/1 (100.0)
8月6,7日	19 (95)	1 (5)							
13,14日	21 (70)	9 (30)						1 (3)	
20日	10 (50)	8 (40)	2 (10)						
27日	8 (40)	10 (50)	2 (10)						
9月3,5日	12 (67)	4 (22)	2 (11)						
10,11日	20 (67)	8 (27)	1 (3)	1 (3)					1/1 (100.0)
18日	19 (95)		1 (5)						
25日	15 (75)	4 (20)	1 (5)						
10月1,2日	8 (27)	12 (40)					1 (3)	9 (30)	1/10 (10.0)
9,10日	14 (47)	5 (17)					5 (17)	6 (20)	2/11 (18.2)
16日	2 (7)	8 (27)	4 (13)			2 (7)	2 (7)	12 (40)	6/16 (37.5)
23日	11 (37)	4 (13)	2 (7)					13 (43)	3/13 (23.1)
29,30日	8 (27)	3 (10)	1 (3)		1 (3)	1 (3)	9 (30)	7 (23)	0/18 (0.0)
計	244 (57.0)	92 (21.5)	22 (5.1)	1 (0.2)	2 (0.5)	3 (0.7)	17 (4.0)	47 (11.0)	14/70 (20.0)

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

２．表中の数字は観察実数を表し，括弧内の数字はパーセントを示す．

３．平成17年度から，２-ME 処理により抗体価40倍から10倍未満に低下した時は2-ME 感受性を陽性とした．

ダイレクトシークエンス法を用いて遺伝子配列の解析を行った．

2．結果および考察

捕集蚊514プール（14,146個体）を調査し，畜舎（牛舎および豚舎）のコガタアカイエカ10プール（500個体）より日本脳炎ウイルスが分離された．ウイルス陽性であった蚊の捕集日は9月5日から10月1日に集中していた．豚血清については，6検体より日本脳炎ウイルスが分離され，それらの採血日は9月11日から10月9日までの間であった．また，3農場全てでウイルスが分離された．分離ウイルスは，エンベロープ領域346bp を比較した遺伝子解析により，いずれもⅠ型であると考えられ，2005年の結果[6]に引き続き，富山県ではⅠ型日本脳炎ウイルスが広く分布していることが示唆された．ウイルスの分離された時期は9〜10月を中心としており，8月中旬頃にコガタアカイエカが増加した際，豚と蚊の間を行き来することでウイルスが増幅され，9〜10月頃に検出されるようになると考えられる．

これまでの調査結果では，2005年にはウイルスが分離され[6]，2006年には分離されなかった[7]．年によってウイルスが濃厚に存在している年と，不活発な年があると考えられ，2007年はウイルスが活発な年であったと思われる．

ま　と　め

コガタアカイエカの捕集数は2006年に比較して大幅に増加した．2007年の豚の抗体保有調査では，7月下旬及び9月中旬に新鮮感染を示す豚が存在したが，本格的な流行は10月から始まったと考えられた．また，蚊と豚からは，9〜10月にウイルスが分離され，この時期にウイルスが濃厚に存在したと考えられた．これらの状況から，日本脳炎患者が発生する可能性は2006年より高いと考えられたが，患者発生はみられなかった．

謝　　辞

本調査の実施にあたり，ご協力を頂いている各定点畜舎，関係厚生センター・支所および食肉総合センター，食肉検査所の各位に深謝する．

文　　献

1．厚生労働省健康局結核感染症課，国立感染症研究所感染症情報センター（2006）．平成16年度感染症流行予測調査報告書，93-114.
2．厚生労働省健康局結核感染症課，国立感染症研究所感染症情報センター（2007）．平成17年度感染症流行予測調査報告書，100-112.
3．渡辺　護，長谷川澄代，小原真弓，安藤秀二(2004). 富山県における日本脳炎流行予測調査35年間のまとめ，82p 図版＋46pp，富山県衛生研究所・富山県厚生部健康課.
4．渡辺　護，長谷川澄代，小原真弓，米道暁彦(2004). 富山衛研年報，27，56-67.
5．渡辺　護，長谷川澄代，小原真弓，米道暁彦(2005). 富山衛研年報，28，52-64.
6．渡辺　護，長谷川澄代，小原真弓，道谷真由美(2006). 富山衛研年報，29，56-68.
7．渡辺　護，長谷川澄代，小原真弓，道谷真由美(2007). 富山衛研年報，30，62-74.
8．厚生労働省健康局結核感染症課(2002). 感染症流行予測調査事業検査術式，27-39，東京.

平成20年12月１日

日本脳炎流行予測調査（感受性調査）2007年

小原真弓　長谷川澄代　堀元栄詞　岩井雅恵　中村一哉
滝澤剛則　倉田　毅　田中桂子[1]　南部厚子[2]
田中有易知[3]　上田順子[4]　嶋尻悟志[5]

Epidemiological Surveillance (Serological Investigation) of Japanese Encephalitis virus in Toyama Prefecture in 2007

Mayumi OBARA, Sumiyo HASEGAWA, Eiji HORIMOTO, Masae IWAI,
Kazuya NAKAMURA, Takenori TAKIZAWA, Takeshi KURATA,
Keiko TANAKA[1], Atsuko NANBU[2],
Yuichi TANAKA[3], Junko UEDA[4], Satoshi SHIMAJIRI[5]

要　旨　日本脳炎流行予測調査（感受性調査）として，富山県住民の日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況を調査した．その結果，抗体陽性者の割合は全体として49.7%であった．5～29歳では75%以上が抗体を保有していたが，0～4歳で3.0%，40～49歳で6.1%と抗体保有率が特に低い年齢群があった．「予防接種歴なし」の割合は，0～4歳で最も多く，5歳以上では減少し，50歳以上で再び増加した．予防接種歴別の抗体保有率は，「接種歴なし」で21.7%，「接種歴不明」で26.9%であったのに対し，1回以上接種歴のある対象者では79.7%であった．

本調査は，日本脳炎ウイルスに対する中和抗体保有状況を調べ，今後の流行の可能性を推定し，感染予防に役立てることを目的として実施した．富山県においては，今回初めて感受性調査を行った．

調査および検査方法

2007年6月から9月に，高岡，新川，中部，砺波の各厚生センターおよび富山市保健所管内で，合計298名について採血と予防接種歴，罹患歴の調査を行った．

日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価の測定は，peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 法を応用したフォーカス計数法にて行った．血清を56℃30分間非働化した後，10倍から2倍階段希釈し，ウイルス液（日本脳炎Beijing-1株）と混合した．37℃，1時間の中和反応ののち，Vero Osaka 細胞に感染させた．37℃で1時間ウイルスを吸着させたのち，培養液を追加し，37℃で46時間培養した．細胞を洗浄・固定後，抗 JEV ウサギ血清を用いた PAP 法によってウイルスフォーカスを染色した．被検血清を加えていないコントロールに比較して，フォーカス数が50%以上減少した最大希釈倍数を中和抗体価とした．抗体価10倍以上を抗体陽性とした．

結果および考察

298名のうち，日本脳炎ウイルスに対する抗体陽性者は148名（49.7%）であった．図1に年齢群別の抗体保有率を示した．5～29歳では75%以上が抗体を保有していたが，0～4歳で3.0%，40～49歳で6.1%と抗体保有率が特に低い年齢群があり，これらの年齢群を谷にＮ字型の曲線を描いていた．全国的にもこのような傾向がみられており[1]，乳幼児における抗体保有率の低さは，ワクチン未接種のためと考えられる．40～49歳の低い抗体保有率の原因は不明であるが，この年齢群は調査年とともに推移している[1]．

調査対象者の予防接種歴を年齢群別に示した（図2）．「接種歴あり」の割合は，10～14歳での100%をピークに山型を描いていた．また，「接種歴なし」の割合は，0～4歳で最も多く，5歳以上では減少するものの，50

1．新川厚生センター
2．中部厚生センター
3．高岡厚生センター
4．砺波厚生センター
5．富山市保健所

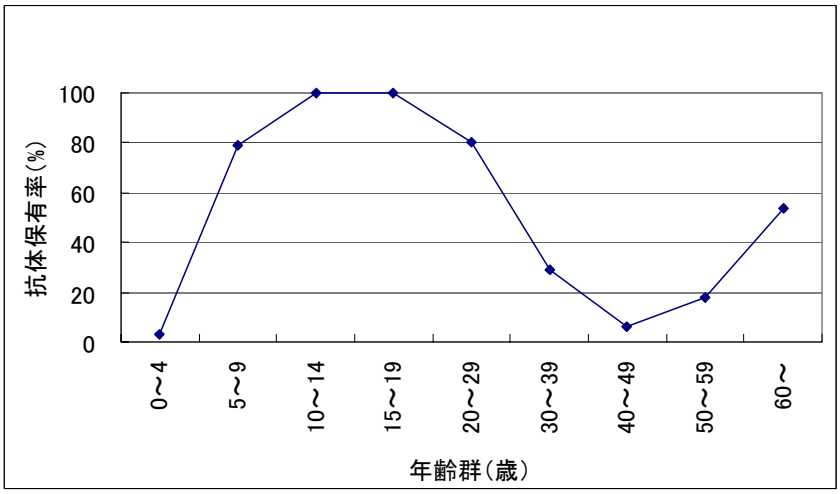


図 1.　年齢群別の中和抗体保有率

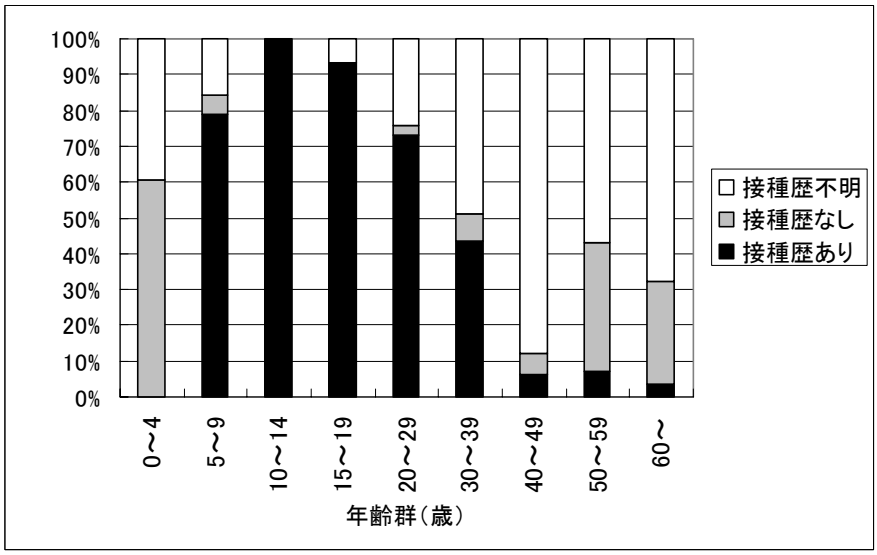


図 2.　年齢群別のワクチン接種歴

表 1.　ワクチン接種歴別の中和抗体保有率

年齢群	接種歴あり			接種歴なし			接種歴不明			合計		
(歳)	陽性数/	検査数	陽性率	陽性数/	検査数	陽性率	陽性数/	検査数	陽性率	陽性数/	検査数	陽性率
0～4	0 ／	0		0 ／	20	0.0%	1 ／	13	7.7%	1 ／	33	3.0%
5～9	14 ／	15	93.3%	0 ／	1	0.0%	1 ／	3	33.3%	15 ／	19	78.9%
10～14	31 ／	31	100.0%	0 ／	0		0 ／	0		31 ／	31	100.0%
15～19	28 ／	28	100.0%	0 ／	0		2 ／	2	100.0%	30 ／	30	100.0%
20～29	25 ／	30	83.3%	1 ／	1	100.0%	7 ／	10	70.0%	33 ／	41	80.5%
30～39	7 ／	24	29.2%	1 ／	4	25.0%	8 ／	27	29.6%	16 ／	55	29.1%
40～49	0 ／	2	0.0%	0 ／	2	0.0%	2 ／	29	6.9%	2 ／	33	6.1%
50～59	1 ／	2	50.0%	3 ／	10	30.0%	1 ／	16	6.3%	5 ／	28	17.9%
60～	0 ／	1	0.0%	5 ／	8	62.5%	10 ／	19	52.6%	15 ／	28	53.6%
計	106 ／	133	79.7%	10 ／	46	21.7%	32 ／	119	26.9%	148 ／	298	49.7%

歳以上で再び増加した．0〜4歳は，「なし」と「不明」で100％を占めていた．日本脳炎の定期予防接種は，「Ⅰ期3 回（2回＋追加1 回），生後6〜90 か月未満（標準3〜4 歳)」,「Ⅱ期1 回，9〜13 歳未満（標準9歳)」,「Ⅲ期1 回，14〜16 歳未満（標準14 歳)」というスケジュールで行われていたが，2005年5月30日に「日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控え」が通知され，調査時の0〜4歳は接種歴のない子供がほとんどになったと思われる．実際，富山県の予防接種率は，2004年までは80％前後[2,3]であったが，2005年には10〜20％となり[4]，2006年度は数％にとどまっている（未報告)．予防接種歴別に抗体保有率をみると，接種歴なしで21.7％，接種歴不明で26.9％であったのに対し，1回以上接種歴のある対象者では79.7％と有意に高かった（表1)．これは，予防接種の効果により抗体を獲得したためと考えられる．しかしながら，年齢群別にみると，1回以上接種歴のある対象者のうち，抗体陽性者の割合は，年齢が上がるにつれ少なくなっており（表1)，年齢とともにワクチンの効果が減弱していると思われる．

「接種歴なし」のうち，抗体陽性者が21.7％存在した．年齢群別にみると，20〜29歳及び30〜39歳で1名ずつ（各年齢群全員に対しそれぞれ2.4％，1.8％)，50〜59歳で3名（10.7％)，60歳以上で5名（17.9％）と年齢が高くなるにつれ割合が高くなった．これは自然感染によるものと推測されるが，罹患歴は全て「なし」または「不明」であり，多くは不顕性感染であったと思われる．1960年代頃までは毎年数百〜数千人の患者が発生しており[5]，高齢者は自然感染の機会が多かったと思われる．また，ワクチン接種は1954年から開始されたため，高齢者の中には，接種機会を逃した人が多かったと推測される．

今回の調査により，県民の抗体保有率は5割程度であること，予防接種歴のある人は8割程度抗体を保有していること，抗体保有率が特に低い年齢群があること，不顕性な自然感染をしている人が2割程度いることなどが判明した．一方，日本脳炎流行予測調査の感染源調査において，県内での日本脳炎ウイルスの存在が確認されている[6]．日本脳炎予防接種積極的勧奨の中止以来，ワクチン接種者は顕著に少なくなっており，このような状況が続くと，中和抗体を持つ人の割合が減り，患者の発生が危惧される．現在，培養細胞を用いた新しいワクチンの導入が検討されており，正式な認可が待たれる．ワクチン未接種の乳幼児，30〜59歳の抗体保有率が低い年齢群，及び発症リスクの高い高齢者は，特に蚊に刺されないための注意が必要である．

謝　　辞

本調査の実施にあたり，検体採取等にご協力いただいた関係各位に深謝いたします．

文　　献

1．厚生労働省健康局結核感染症課，国立感染症研究所感染症情報センター（2006)．平成16年度感染症流行予測調査報告書，93-114.
2．富山県厚生部（2005)．保健統計年報（平成15年度)，55，306-307.
3．富山県厚生部（2006)．保健統計年報（平成16年度)，56，306-307.
4．富山県厚生部（2007)．保健統計年報（平成17年度)，57，304-305.
5．緒方隆幸（1985)．臨床とウイルス，13（2)，150-155.
6．山内健生，小原真弓，長谷川澄代，渡辺　護，川尻千賀子(2008)．富山衛研年報，31，65-75.

平成19年度ポリオ流行予測調査

岩井雅恵　中村一哉　堀元栄詞　小原真弓
長谷川澄代　滝澤剛則　倉田　毅　田中有易知[1]
田中桂子[2]　南部厚子[3]　上田順子[4]　嶋尻悟志[5]

Epidemiological Surveillance of Poliovirus in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2007

Masae IWAI, Kazuya NAKAMURA, Eiji HORIMOTO, Mayumi OBARA,
Sumiyo HASEGAWA, Takenori TAKIZAWA, Takeshi KURATA, Yuichi TANAKA[1],
Keiko TANAKA[2], Atsuko NANBU[3], Junko UEDA[4] and Satoshi SHIMAJIRI[5]

要　旨　平成19年度ポリオ流行予測調査として，感染源調査と感受性調査を実施した．

感染源調査は，ポリオワクチン接種後2カ月以上経過した時点で，0歳から6歳までの乳幼児61名から糞便を採取し，ウイルス分離を実施した．その結果，パレコウイルス1型が1名から検出された．ポリオウイルスは検出されなかった．

感受性調査は，乳児から成人（0歳～66歳）の300名の血清について，ポリオウイルスに対する中和抗体価を測定した．ポリオウイルス各型に対して4倍以上の中和抗体価を保有する割合は，1型では95.0%，2型では98.7%，3型では88.7%であった．また，各型に対する平均抗体価は，1型は138.0倍，2型は112.5倍，3型は38.6倍であった．

富山県におけるポリオ流行予測調査は，国内のポリオウイルスの動向を監視するために，厚生労働省感染症流行予測事業のひとつとして国からの依頼を受け，昭和38年から毎年実施している．本年度は感染源調査および感受性調査が委託された．両調査結果を合わせて報告する．

富山県における過去25年間の感染源調査では，1983年度にポリオウイルス1型が1株，1992年度に同3型が1株，1999年度に同2型が1株，2001年度に同2型が2株，2004年度に同2型が1株，それぞれ分離された．これら6株はすべてワクチン由来であり，野生型は分離されなかった．一方，感受性調査では，富山県民は1型，2型，3型ともポリオの流行を充分に阻止しうる抗体保有状況にあると考えられた．しかしながら，1～3型すべてに対する抗体を保有している人は，県民の約4分の3にとどまっていると推定された．

1988年に世界保健機関(WHO)によって開始されたポリオ根絶計画により，世界のほとんどの地域でポリオウイルスが駆逐されている[1]．日本の属する西太平洋地域においても，2000年10月に根絶が宣言された[2]．2006年の時点で，野生株ポリオウイルスが流行しているのは，アフガニスタン，インド，ナイジェリア，パキスタンとなっている[1]．しかしながら，ポリオの根絶が宣言されたアフリカやアジアの国々において，流行地からの野生株ポリオウイルスの輸入症例が報告されている[3]．また，ワクチン由来ポリオウイルス（VDPV）についても，経口生ワクチンの摂取率が不十分な地域で循環する circulating VDPVs（cVDPVs）や，免疫不全者の体内に長期間残存する immunodeficiency-associated VDPV（iVDPVs）の感染による発症例が，世界各地で報告されている [4]．このような海外からの野生株の侵入や VDPV の伝播を阻止するために，県民の抗体保有状況を把握し，集団および個人レベルの感染防御を保つことが重要であると考えられる．

なお，検体を採取するにあたり，本調査の主旨，およびプライバシーの保護に対する適切な予防措置が行われることなどについて説明し，承諾の得られた場合のみ検査を行った．

1．高岡厚生センター
2．新川厚生センター
3．中部厚生センター
4．砺波厚生センター
5．富山市保健所

Ⅰ　感染源調査

調査および検査方法

砺波厚生センター管内の小矢部市では，春期ポリオワクチン投与後2ヶ月以上経過した平成19年9月に，新川厚生センター管内の黒部市では，秋期ポリオワクチン投与後2ヵ月以上経過した平成20年1月に，それぞれ，健康な乳幼児から採取された糞便について，ウイルス分離検査を実施した．年齢区分ごとの検査対象者数は，小矢部市では0歳児10名，黒部市では1歳児15名，2歳児3名，3歳児9名，4歳児8名，5歳児3名，6歳児13名の計51名，両市の合計は61名であった．また，ポリオワクチン接種歴なども調査した．当該地区のワクチン接種率は，予防接種の手引き[5]に従い，接種者数を対象人員｛(0歳の人口の9/12＋1歳の人口の6/12）×12/15｝で除して求めた．

ウイルスの検索は，「感染症流行予測調査事業検査術式」[6]に準じて行った．採取した糞便にEagle-MEM培養液(日水製薬KK)を加えて約10%乳剤を作製し，10,000rpm，15分間遠心後，フィルター（Pore size 0.45μm）でろ過して雑菌を除いた．得られたろ液を4種類の培養細胞（VeroE6，MA104，RD-18S，HEp-2）に接種し，細胞変性効果の有無を指標としてウイルス分離を行なった．ウイルスは，抗ポリオウイルス抗血清（デンカ生研）を用いた中和試験により同定した．

結果および考察

小矢部市の0歳児1名からパレコウイルス1型が検出された．両市の乳幼児からポリオウイルスは検出されなかった（表1）．これらの乳幼児のポリオワクチン接種時期は，糞便採取日の3ヶ月～6年前であった．また，糞便採取日は，それぞれの市のワクチン集団接種日からは，3～4ヶ月経過した時期であった．当該地区のワクチン接種率は，90.1%～102.1%と高かった．

このように，今年度の調査では野生株やVDPVは検出されなかったため，これらの地域でのポリオウイルス野生株の侵入やVDPVの伝播の可能性は少ないと考えられた．

Ⅱ　感受性調査

調査および検査方法

平成19年6月から9月にかけて，高岡，新川，中部，砺波の各厚生センターおよび富山市保健所管内で，乳児から成人まで合計300名（0～69歳）について，採血と予防接種歴の調査を行った．

中和抗体価の測定は，「感染症流行予測調査事業検査術式」[6]に準じて行った．被験血清をEagle-MEM培養液で4倍希釈し，56℃30分間非働化した後，その50μlを96穴マイクロプレート上で2段階希釈した．希釈血清それぞれに，100TCID$_{50}$/50μlとなるように調製した1～3型の弱毒セービンウイルス50μlを加えて

表１．ウイルス分離検査結果

調査地区	年齢（歳）	検体数	ウイルス分離 陽性数	ウイルス分離 (%)	分離ウイルス内訳* パレコ1	最近のワクチン接種日（人） 3～5ヶ月前	6～11ヶ月前	1～2年前	3～4年前	5～6年前
黒部市	0	0								
	1	15				7	8			
	2	3						3		
	3	9						9		
	4	8						2	6	
	5	3							3	
	6	13							3	9
	小計	61	0	(0)		7	8	14	12	9
小矢部市	0	10	1	(10.0)	1	9				
	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	小計	10	1	(10.0)	1	9				
合計		61	1	(1.6)	1	16	8	14	12	9

調査期間：黒部市；平成20年1月28-30日．小矢部市；平成19年9月12-13日．
*：パレコ1；パレコウイルス1型

表２．ポリオウイルス（セービン株）に対する中和抗体価の分布

1型

年齢区分	検体数	中和抗体価										抗体価4倍以上		
（歳）	（人）	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≧1024	保有者数	保有率(%)	平均抗体価
0～1	15	1	0	0	1	0	0	0	0	0	13	14	(93.3)	760.8
2～3	13	1	0	0	0	0	1	0	1	2	8	12	(92.3)	645.1
4～9	25	0	0	0	0	0	2	5	5	6	7	25	(100)	347.3
10～14	30	0	0	0	0	3	2	6	4	10	5	30	(100)	262.0
15～19	32	1	0	0	0	2	7	5	4	2	11	31	(96.9)	250.3
20～24	20	0	0	2	2	3	1	1	3	5	3	20	(100)	132.5
25～29	21	2	0	1	1	2	4	2	1	6	2	19	(90.5)	148.1
30～34	35	4	1	2	3	9	5	2	2	4	3	31	(88.6)	71.6
35～39	20	1	0	3	4	4	2	5	0	0	1	19	(95.0)	41.3
40～49	33	4	0	3	2	4	3	8	2	4	3	29	(87.9)	100.8
50～59	28	1	1	1	6	3	7	5	2	1	1	27	(96.4)	54.9
60～	28	0	1	6	3	4	2	5	3	2	2	28	(100)	53.8
合計	300	15	3	18	22	34	36	44	27	42	59	285	(95.0)	138.0
（%）	(100)	(5.0)	(1.0)	(6.0)	(7.3)	(11.3)	(12.0)	(14.7)	(9.0)	(14.0)	(19.7)	(95.0)		

2型

年齢区分	検体数	中和抗体価										抗体価4倍以上		
（歳）	（人）	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≧1024	保有者数	保有率(%)	平均抗体価
0～1	15	1	0	0	0	0	0	0	2	2	10	14	(93.3)	760.8
2～3	13	0	0	0	0	0	1	1	3	3	5	13	(100)	436.3
4～9	25	1	0	0	0	0	4	7	6	5	2	24	(96.0)	215.3
10～14	30	0	0	0	1	3	7	13	3	1	2	30	(100)	114.0
15～19	32	0	0	0	3	6	8	5	7	3	0	32	(100)	90.5
20～24	20	0	0	0	0	4	3	6	3	3	1	20	(100)	132.5
25～29	21	1	0	1	0	3	5	6	2	1	2	20	(95.2)	107.6
30～34	35	0	0	0	1	7	8	9	5	3	2	35	(100)	109.2
35～39	20	0	0	0	8	3	1	4	2	1	1	20	(100)	55.7
40～49	33	0	1	2	1	3	5	10	7	2	2	33	(100)	103.8
50～59	28	0	0	0	4	6	8	4	4	1	1	28	(100)	72.4
60～	28	1	1	5	2	6	3	7	2	1	0	27	(96.4)	43.5
合計	300	4	2	8	20	41	53	72	46	26	28	296	(98.7)	112.5
（%）	(100)	(1.3)	(0.7)	(2.7)	(6.7)	(13.7)	(17.7)	(24.0)	(15.3)	(8.7)	(9.3)	(98.7)		

3型

年齢区分	検体数	中和抗体価										抗体価4倍以上		
（歳）	（人）	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	≧1024	保有者数	保有率(%)	平均抗体価
0～1	15	5	2	0	0	0	0	1	1	2	4	10	(66.7)	207.9
2～3	13	4	0	0	1	2	1	2	2	1	0	9	(69.2)	94.1
4～9	25	4	1	2	3	8	4	2	0	1	0	21	(84.0)	34.2
10～14	30	3	3	3	8	7	3	1	2	0	0	27	(90.0)	23.5
15～19	32	7	2	5	6	7	1	4	0	0	0	25	(78.1)	22.3
20～24	20	1	3	5	3	4	1	3	0	0	0	19	(95.0)	18.5
25～29	21	3	3	4	0	3	4	0	2	1	1	18	(85.7)	34.6
30～34	35	3	2	6	3	9	8	1	2	0	1	32	(91.4)	32.0
35～39	20	4	0	2	3	6	4	1	0	0	0	16	(80.0)	30.6
40～49	33	0	2	3	3	7	7	4	5	2	0	33	(100)	51.9
50～59	28	0	1	1	4	5	6	7	4	0	0	28	(100)	56.5
60～	28	0	2	1	2	6	7	7	1	2	0	28	(100)	55.2
合計	300	33	21	32	36	64	46	33	19	9	6	266	(88.7)	38.6
（%）	(100)	(11.3)	(7.0)	(10.7)	(12.0)	(21.3)	(15.3)	(11.0)	(6.3)	(3.0)	(2.0)	(88.7)		

表 3．ワクチン歴別 抗体保有状況

1型

年齢区分（歳）	検体数（人）	ワクチン歴あり 2回接種 陽性数/検査数	保有率(%)	1回接種 陽性数/検査数	保有率(%)	回数不明 陽性数/検査数	保有率(%)	ワクチン歴なし 陽性数/検査数	保有率(%)	ワクチン歴不明 陽性数/検査数	保有率(%)
0～1	15	6 / 6	(100)	8 / 8	(100)			0 / 1	(0)		
2～3	13	10 / 11	(90.9)							2 / 2	(100)
4～9	25	21 / 21	(100)	2 / 2	(100)	2 / 2	(100)				
10～14	30	28 / 28	(100)	1 / 1	(100)	1 / 1	(100)				
15～19	32	29 / 30	(96.7)	1 / 1	(100)					1 / 1	(100)
20～24	20	12 / 12	(100)	1 / 1	(100)	3 / 3	(100)			4 / 4	(100)
25～29	21	14 / 15	(93.3)			2 / 3	(66.7)			3 / 3	(100)
30～34	35	16 / 17	(94.1)	0 / 1	(0)	3 / 3	(100)			12 / 14	(85.7)
35～39	20	9 / 10	(90.0)			1 / 1	(100)	1 / 1	(100)	8 / 8	(100)
40～49	33					1 / 1	(100)	3 / 4	(75.0)	25 / 28	(89.3)
50～59	28					1 / 1	(100)	9 / 9	(100)	17 / 18	(94.4)
60～	28							12 / 12	(100)	16 / 16	(100)
合計	300	145 / 150	(96.7)	13 / 14	(92.9)	14 / 15	(93.3)	25 / 27	(92.6)	88 / 94	(93.6)
				172/179	(96.1 %)						

2型

年齢区分（歳）	検体数（人）	ワクチン歴あり 2回接種 陽性数/検査数	保有率(%)	1回接種 陽性数/検査数	保有率(%)	回数不明 陽性数/検査数	保有率(%)	ワクチン歴なし 陽性数/検査数	保有率(%)	ワクチン歴不明 陽性数/検査数	保有率(%)
0～1	15	6 / 6	(100)	8 / 8	(100)			0 / 1	(0)		
2～3	13	11 / 11	(100)							2 / 2	(100)
4～9	25	20 / 21	(95.2)	2 / 2	(100)	2 / 2	(100)				
10～14	30	28 / 28	(100)	1 / 1	(100)	1 / 1	(100)				
15～19	32	30 / 30	(100)	1 / 1	(100)					1 / 1	(100)
20～24	20	12 / 12	(100)	1 / 1	(100)	3 / 3	(100)			4 / 4	(100)
25～29	21	15 / 15	(100)			2 / 3	(66.7)			3 / 3	(100)
30～34	35	17 / 17	(100)	1 / 1	(100)	3 / 3	(100)			14 / 14	(100)
35～39	20	10 / 10	(100)			1 / 1	(100)	1 / 1	(100)	8 / 8	(100)
40～49	33					1 / 1	(100)	4 / 4	(100)	28 / 28	(100)
50～59	28					1 / 1	(100)	9 / 9	(100)	18 / 18	(100)
60～	28							11 / 12	(91.7)	16 / 16	(100)
合計	300	149 / 150	(99.3)	14 / 14	(100)	14 / 15	(93.3)	25 / 27	(92.6)	94 / 94	(100)
				177/179	(98.9%)						

3型

年齢区分（歳）	検体数（人）	ワクチン歴あり 2回接種 陽性数/検査数	保有率(%)	1回接種 陽性数/検査数	保有率(%)	回数不明 陽性数/検査数	保有率(%)	ワクチン歴なし 陽性数/検査数	保有率(%)	ワクチン歴不明 陽性数/検査数	保有率(%)
0～1	15	5 / 6	(83.3)	5 / 8	(62.5)			0 / 1	(0)		
2～3	13	9 / 11	(81.8)							0 / 2	(0)
4～9	25	18 / 21	(85.7)	1 / 2	(50.0)	2 / 2	(100)				
10～14	30	25 / 28	(89.3)	1 / 1	(100)	1 / 1	(100)				
15～19	32	23 / 30	(76.7)	1 / 1	(100)					1 / 1	(100)
20～24	20	11 / 12	(91.7)	1 / 1	(100)	3 / 3	(100)			4 / 4	(100)
25～29	21	14 / 15	(93.3)			1 / 3	33.3			3 / 3	(100)
30～34	35	14 / 17	(82.3)	1 / 1	(100)	3 / 3	(100)			14 / 14	(100)
35～39	20	8 / 10	(80.0)			1 / 1	(100)	1 / 1	(100)	6 / 8	(75.0)
40～49	33					1 / 1	(100)	4 / 4	(100)	28 / 28	(100)
50～59	28					1 / 1	(100)	9 / 9	(100)	18 / 18	(100)
60～	28							12 / 12	(100)	16 / 16	(100)
合計	300	127 / 150	(84.7)	10 / 14	(71.4)	13 / 15	(86.7)	26 / 27	(96.3)	90 / 94	95.7
				150/179	(83.8%)						

表４．ポリオウイルス中和抗体の型別保有状況

年齢区分（歳）	検体数（人）	1,2,3型ともに抗体陰性	中和抗体陽性血清の型別保有状況						
			1型	2型	3型	1,2型	2,3型	1,3型	1,2,3型(%)
0～1	15	1				4			10 (66.7)
2～3	13			1		3			9 (69.2)
4～9	25		1			3			21 (84.0)
10～14	30					3			27 (90.0)
15～19	32			1		6			25 (78.1)
20～24	20					1			19 (95.0)
25～29	21	1				2	1		17 (81.0)
30～34	35					3	4		28 (80.0)
35～39	20					4	1		15 (75.0)
40～49	33						4		29 (87.9)
50～59	28						1		27 (96.4)
60～	28							1	27 (96.4)
合計（%）	300 (100)	2 (0.7)	1 (0.3)	2 (0.7)		29 (9.7)	11 (3.7)	1 (0.3)	254 (84.7)

よく混和し，37℃，3時間の中和反応を行った．中和後，Vero 細胞浮遊液(1～2×10^5 細胞/ml)を100 μl ずつ加え，37℃，5%CO_2 の条件下で培養した．細胞変性効果を1週間観察し，中和抗体価を測定した．各検体は同時に2回ずつ測定した．弱毒セービンウイルスは，平成15年度に国立感染症研究所から分与され，当研究所において HEp-2細胞1代後 Vero 細胞で1代継代したものを使用した．

結果および考察

ポリオウイルス各型に対する中和抗体価の保有状況をウイルス型別，年齢区分別にまとめて表2に示した．4倍以上を陽性とした抗体保有率は，2型が98.7%（296/300）で最も高く，次いで1型が95.0%（285/300），3型が88.7%（266/300）であった．これらは，昨年度までの調査結果とほぼ同等であり，ポリオウイルスに対する集団免疫が高く維持されていると考えられる[7]．各年齢区分をみると，1型では40～49歳が87.9%で最も低く，次いで30～34歳が88.6%であったが，それ以外の年齢区分では，90%以上の人が抗体を保有していた．2型では，すべての年齢区分で90%以上の抗体保有率であった．一方，3型は0～1歳が66.7%と最も低く，次いで2～3歳が69.2%，15～19歳が78.1%，それ以外の年齢区分が80%以上であり，１型や2型に比べて低かった．

抗体保有者の平均抗体価(幾何平均)は，1型では35～39歳の41.3倍から0～1歳の760.8倍までを示し，平均は138.0倍であった．2型では60歳以上の43.5倍から0～1歳の760.8倍までを示し，平均は112.5倍であった．一方，3型では20～24歳の18.5倍から0～1歳の207.9倍までを示し，平均は38.6倍であり，1型や2型と比べて低かった．

表3にワクチン接種回数別にみた抗体保有状況を示した．ワクチン接種者全体の抗体保有率は，1型96.1%（172/179），2型98.9%（177/179），1回のみの抗体保有率は，1型92.9%（13/14），2型100%（14/14）であり，1回でも十分な抗体獲得率を示していた．しかしながら，3型の場合の陽性率は，ワクチン接種者全体で83.8%（150/179），1回のみの接種では71.4%（10/14）にとどまり，1型や2型と比べて低かった．なお，ポリオ生ワクチンは，日本では1961年から全国の乳幼児を対象に一斉に投与が開始され，1963年からは2回接種が定期的に行われている[8]．

各年齢層における複数の型に対する抗体保有状況を表4に示した．1～3型のすべての型に対する抗体保有率は，全体では84.7%（254/300）であったが，保有率が比較的低い年齢としては，0～1歳の66.7%（10/15），2～3歳の69.2%（9/13）および35～39歳の75.0%（15/20）であった．全体で15.3%（46/300）の人がいずれかの型に対して抗体を持っておらず，このうち2回の接種が済んでいる人は26名，1回が5名，0回が3名，回数不明が2名，接種不明が10名であった．

野生型ポリオウイルスは，インドやアフリカなどで依然として感染が続いており，これらの地域からウイルスが侵入する可能性があるため，その監視は続けなければならない[2]．一方，生ワクチン株が腸管内で増殖する過程で毒性が復帰する可能性も考慮しておかなければならない．毒性復帰株に由来するニ次感染は，約580万回に1回発生するといわれており[9]，子供から二次感染によって家族がポリオ麻痺を発症した事例も報告されている[10]．このような毒性復帰株の根絶

は重要な課題となっており，日本においても生ワクチンから不活化ワクチンへの移行が検討されている[11]．ワクチン由来のポリオウイルスは，通常，ワクチン接種後約1ヶ月間便に排泄され，免疫不全者ではさらに長期間にわたることがある[12-15]．ウイルス増殖が繰り返されるほど変異は蓄積される可能性があるため，生ワクチンを使用している限り，高い集団免疫状況を保つことが大切であると考えられる．今回の調査では，15.3％の人が3種類のポリオウイルスのうち，いずれか，あるいはすべての型に対する抗体を持っていないことが判明した．これらの人は，海外渡航時や育児に携わる期間には注意が必要であると考えられる．

ま と め

感染源調査：平成20年1月，平成19年9月に，それぞれ新川厚生センター管内，砺波厚生センター管内における健康な乳幼児61名を対象に調査した．その結果，パレコウイルス1型が1名から検出された．ポリオウイルスは検出されなかった．

感受性調査：0歳から66歳までの300名の血清について，ポリオウイルス(弱毒セービンウイルス)に対する中和抗体価を測定した．抗体価4倍以上の抗体保有率は1型95.0％，2型98.7％，3型88.7％であった．また，平均抗体価(幾何平均)は1型138.0倍，2型112.5倍，3型38.6倍を示し，集団免疫としては良好な抗体保有状況であった．

これらの結果から，本県においては，野生型ポリオウイルスの侵淫や，ポリオ流行の可能性は少ないと考えられた．しかしながら，いずれか，あるいはすべての型の抗体を保有していない人が15.3％おり，海外からのポリオウイルス侵入に対する警戒や，海外渡航や育児従事にあたっての注意が必要である．

謝　　辞

本調査を実施するにあたり，検体採取等にご協力いただいた保育所，学校，病院，その他関係各位に感謝いたします．

文　　献

1．WHO (2008). Weekly epidemiological record, No.19, 83, 169-176
2．WHO (2000). Weekly epidemiological record, No.49, 75, 397-408
3．WHO (2007). Weekly epidemiological record, No.19, 82, 317-320
4．WHO (2007). Weekly epidemiological record, No.39, 82, 337-344
5．予防接種の手引き<第11版>．木村三生夫ら編，p60 近代出版．
6．厚生労働省健康局結核感染症課，国立感染症研究所流行予測調査事業委員会 (平成14年)．感染症流行予測調査事業検査術式，1－8
7．Iwai, M. Takizawa, T. Nakayama, T. et al. (2008). Scand. J. Infect. Dis., 40, 247-253.
8．厚生労働省，国立感染症研究所（2001）．感染症発生動向調査週報，3（26），8-11
9．日本ポリオ研究所，日本薬局方・経口生ポリオワクチン（セービン）Ⅰ・Ⅱ・Ⅲ型混合添付文書．
10．国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課（2001）．病原微生物検出状況月報，22，63
11．清水博之，武田直和，宮村達男 (2004)．綜合臨牀，53，6，1860-1865
12．WHO（2001）．Polio Laboratory Manual, 13
13．Cherkasova EA, Korotkova EA, Yakovenko ML, et. al. (2002). J. Virol., 76, 6791-6799
14．Kew, O.M., Sutter, R.W., Nottay, B.K., et. al. (1998). J. Clin. Microbiol., 36, 2893-2899
15．Martin, J., Dunn, G., Hull, R., et. al. (2000). J. Virol., 74, 3001-301

インフルエンザ流行予測調査

堀元栄詞　中村一哉　小原真弓　岩井雅恵　長谷川澄代
滝澤剛則　倉田　毅　田中桂子[1]　南部厚子[2]　中澤保文[3]
田中有易知[3]　上田順子[4]　嶋尻悟志[5]

Epidemiological Surveillance of Influenza Virus Infection in Toyama Prefecture, 2007-2008

Eiji HORIMOTO, Kazuya NAKAMURA, Mayumi OBARA, Masae IWAI,
Sumiyo HASEGAWA, Takenori TAKIZAWA, Keiko TANAKA[1], Atsuko NANBU[2],
Yasufumi NAKAZAWA[3], Yuichi TANAKA[3], Junko UEDA[4], Satoshi SHIMAJIRI[5]

要　旨　インフルエンザ流行期前の富山県住民の抗体保有状況，および流行期のインフルエンザ様患者からのウイルス分離を実施した．その結果，以下の成績を得た．

1．インフルエンザ流行期前における富山県住民300名の抗体保有状況について，6種類のインフルエンザ抗原を用いて調べた．血球凝集抑制（HI）抗体価40倍以上の力価を示す抗体保有率は，2007/08シーズンワクチン株のA/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)，A/Hiroshima/52/2005(H3N2)およびB/Malaysia/2506/2004（ビクトリア系統），参考株のB/Florida/7/2004(山形系統)，2006/07シーズンワクチン株のA/New Caledonia/20/99(H1N1)およびB/Shanghai/361/2002 (山形系統)に対して各々40.7%，38.3%，13.0%，28.0%，51.3%，45.7%であった．

2．インフルエンザ患者の報告は例年より早く2007年第43週から始まり，第51週には5.00人/定点まで増加したが，年末年始に一旦減少した．その後，第2週から再度報告数が増加し，第5週でピーク（21.58人/定点）を迎え，その後急速に減少し，第14週には0.98人/定点となった．

3．インフルエンザウイルス分離については，AH1型が150株，AH3型が97株，B型が46株，合計293株が分離された．シーズン序盤はAH3型が主に分離されたが，年明けからはAH1型が中心となり，終盤にはAH3型とB型が混在して分離された．分離株の抗原解析の結果，AH1型はワクチン株と異なる抗原性を示す株が多く，AH3型は比較的類似する株が多かった．B型分離株のほとんどは山形系統で，ワクチン株と抗原性が類似する株が多かった．

本調査は，インフルエンザウイルスに対する集団免疫の現状把握（Ⅰ感受性調査）とウイルス検索（Ⅱ感染源調査）を行い，ワクチン株選定を含めたインフルエンザ流行の予測と予防に資することを目的としている．厚生労働省健康局結核感染症課が主体となり，全国の地方衛生研究所，保健所，医療機関等が協力して実施した．

Ⅰ　感受性調査

インフルエンザ流行期前の県民の抗体保有状況を調べ，県民の免疫状況とインフルエンザ流行の実態を把握し，今後の流行予測および感受性者に対しての注意を喚起する為の資料とする．

調査および検査方法

1．調査期間

2007年6～9月

2．調査対象者数および年齢別構成

本年度は県内住民300名について調査を行った．年齢群別調査数は0～4歳:34名，5～9歳：19名，10～14歳：31名，15～19歳：31名，20～29歳：41名，30～39歳：55名，40～49歳：33名，50～59歳：28名，60歳以上：28名であった．

3．検査方法

調査対象者から採血し，血清中のインフルエンザウイルス赤血球凝集抑制（HI）抗体価を測定した．抗体価の測定は，「感染症流行予測調査事業検査術式

1．新川厚生センター　2．中部厚生センター　3．高岡厚生センター　4．砺波厚生センター　5．富山市保健所

表１．年齢群別インフルエンザ HI 抗体保有状況

A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)

年齢群	人数	各 HI 抗体価別人数										40倍以上抗体保有者(率)	
		＜10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%
0-4	34	30	0	3	0	1	0	0	0	0	0	1	2.9
5-9	19	6	4	3	3	1	0	0	2	0	0	6	31.6
10-14	31	2	1	10	5	9	1	1	1	1	0	18	58.1
15-19	31	2	2	3	6	3	9	4	1	1	0	24	77.4
20-29	41	8	2	2	0	1	12	9	7	0	0	29	70.7
30-39	55	18	8	6	8	2	9	3	1	0	0	23	41.8
40-49	33	14	4	3	3	4	1	2	1	1	0	12	36.4
50-59	28	16	6	2	2	1	1	0	0	0	0	4	14.3
≧60	28	18	1	4	3	2	0	0	0	0	0	5	17.9
合計	300	114	28	36	30	24	33	19	13	3	0	122	40.7

A/Hiroshima/52/2005(H3N2)

年齢群	人数	各 HI 抗体価別人数										40倍以上抗体保有者(率)	
		＜10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%
0-4	34	25	0	2	0	4	2	0	1	0	0	7	20.6
5-9	19	2	3	2	3	7	1	1	0	0	0	12	63.2
10-14	31	0	7	6	5	5	5	2	1	0	0	18	58.1
15-19	31	2	4	6	8	6	4	0	1	0	0	19	61.3
20-29	41	1	5	11	9	10	2	2	1	0	0	24	58.5
30-39	55	17	13	11	6	5	2	1	0	0	0	14	25.5
40-49	33	10	5	10	7	1	0	0	0	0	0	8	24.2
50-59	28	15	4	3	4	1	1	0	0	0	0	6	21.4
≧60	28	17	2	2	4	0	3	0	0	0	0	7	25.0
合計	300	89	43	53	46	39	20	6	4	0	0	115	38.3

B/Malaysia/2506/2004(Vic.)

年齢群	人数	各 HI 抗体価別人数										40倍以上抗体保有者(率)	
		＜10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%
0-4	34	32	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
5-9	19	12	4	1	1	0	0	1	0	0	0	2	10.5
10-14	31	23	4	0	2	1	1	0	0	0	0	4	12.9
15-19	31	12	8	5	4	2	0	0	0	0	0	6	19.4
20-29	41	11	10	8	9	3	0	0	0	0	0	12	29.3
30-39	55	15	17	12	7	2	2	0	0	0	0	11	20.0
40-49	33	15	12	4	2	0	0	0	0	0	0	2	6.1
50-59	28	23	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
≧60	28	25	1	0	1	0	1	0	0	0	0	2	7.1
合計	300	168	63	30	26	8	4	1	0	0	0	39	13.0

B/Florida/7/2004(Yama.)

年齢群	人数	各 HI 抗体価別人数										40倍以上抗体保有者(率)	
		＜10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%
0-4	34	29	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
5-9	19	9	1	5	4	0	0	0	0	0	0	4	21.1
10-14	31	6	3	6	11	2	2	1	0	0	0	16	51.6
15-19	31	3	2	4	13	6	2	1	0	0	0	22	71.0
20-29	41	3	3	11	12	8	4	0	0	0	0	24	58.5
30-39	55	22	14	10	6	2	1	0	0	0	0	9	16.4
40-49	33	14	6	8	4	1	0	0	0	0	0	5	15.2
50-59	28	21	4	2	1	0	0	0	0	0	0	1	3.6
≧60	28	19	3	3	3	0	0	0	0	0	0	3	10.7
合計	300	126	36	54	54	19	9	2	0	0	0	84	28.0

A/New Caledonia/20/99(H1N1)

年齢群	人数	各 HI 抗体価別人数										40倍以上抗体保有者(率)	
		＜10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%
0-4	34	27	2	1	1	2	1	0	0	0	0	4	11.8
5-9	19	4	0	2	8	2	1	0	2	0	0	13	68.4
10-14	31	0	1	5	10	7	6	0	1	1	0	25	80.6
15-19	31	2	2	2	7	5	6	4	2	1	0	25	80.6
20-29	41	8	0	2	3	3	7	14	4	0	0	31	75.6
30-39	55	13	12	8	7	7	4	3	1	0	0	22	40.0
40-49	33	8	4	8	5	2	2	1	0	3	0	13	39.4
50-59	28	13	3	1	5	2	4	0	0	0	0	11	39.3
≧60	28	14	2	2	5	4	1	0	0	0	0	10	35.7
合計	300	89	26	31	51	34	32	22	10	5	0	154	51.3

B/Shanghai/361/2002(Yama.)

年齢群	人数	各 HI 抗体価別人数										40倍以上抗体保有者(率)	
		＜10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	人数	%
0-4	34	29	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	14.7
5-9	19	8	1	2	4	3	1	0	0	0	0	8	42.1
10-14	31	3	3	7	3	10	2	2	1	0	0	18	58.1
15-19	31	1	3	1	5	13	5	2	1	0	0	26	83.9
20-29	41	2	1	2	11	14	8	3	0	0	0	36	87.8
30-39	55	12	10	15	9	7	1	1	0	0	0	18	32.7
40-49	33	6	7	4	11	4	1	0	0	0	0	16	48.5
50-59	28	18	2	4	4	0	0	0	0	0	0	4	14.3
≧60	28	14	5	3	4	2	0	0	0	0	0	6	21.4
合計	300	93	32	38	56	53	18	8	2	0	0	137	45.7

(平成14年発行)」に準じて行い，血清希釈10倍を最低希釈倍数とした．

抗原は，次の6種類を使用した．この内，1，2，3は2007/08シーズンの，5，6は2006/07シーズンのワクチン株である．

1．A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)
2．A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)
3．B/Malaysia/2506/2004（ビクトリア系統）
4．B/Florida/7/2004(山形系統)
5．A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
6．B/Shanghai/361/2002 (山形系統)

抗原については，4以外は全てデンカ生研製のものを使用し，4については国立感染症研究所から送付されたものを使用した．血球は全ての抗原に対し0.5%ニワトリ血球浮遊液を使用した．

結果および考察

1．年齢群別抗体保有状況

HI 抗体価10倍未満から2560倍の抗体保有状況について年齢群別に示した（表１）．また HI 抗体価40倍以上の抗体保有率について，年齢群別に示した（図１）．なお，本書においては，抗体保有率の高低について60%以上を「高い」，40～59%を「比較的高い」，25～39%を「中程度」，10～24%を「比較的低い」，5～9%を「低い」，5%未満を「きわめて低い」として以下の表現に用いた．

A/Solomon Islands/3/2006（H1N1）に対する抗体保有率：本株に対する HI 抗体価40倍以上の抗体保有率は平均40.7%であった．年齢群別では，15～19歳，20～29歳の群でそれぞれ70.7%，77.4%と高く，10～14歳，30～39歳の群でそれぞれ58.1%，41.8%と比較的高かった．また5～9歳と40～49歳の群でそれぞれ31.6%，36.4%と中程度であり，50～59歳，60歳以上の群で14.3%，17.9%と比較的低く，0～4歳の群では2.9%ときわめて低かった．

A/Hiroshima/52/2005(H3N2)に対する抗体保有率：本株に対する HI 抗体価40倍以上の抗体保有率は平均38.3%であった．年齢群別では，5～9歳，15～19歳の群でそれぞれ63.2%，61.3%と高く，また10～14歳，20～29歳の群ではそれぞれ58.1%，58.5%と比較的高かった．30～39歳，60歳以上の群ではそれぞれ25.5%，25.0%と中程度で，0～4歳，40～49歳および50～59歳の群ではそれぞれ20.6%，24.2%および21.4%と比較

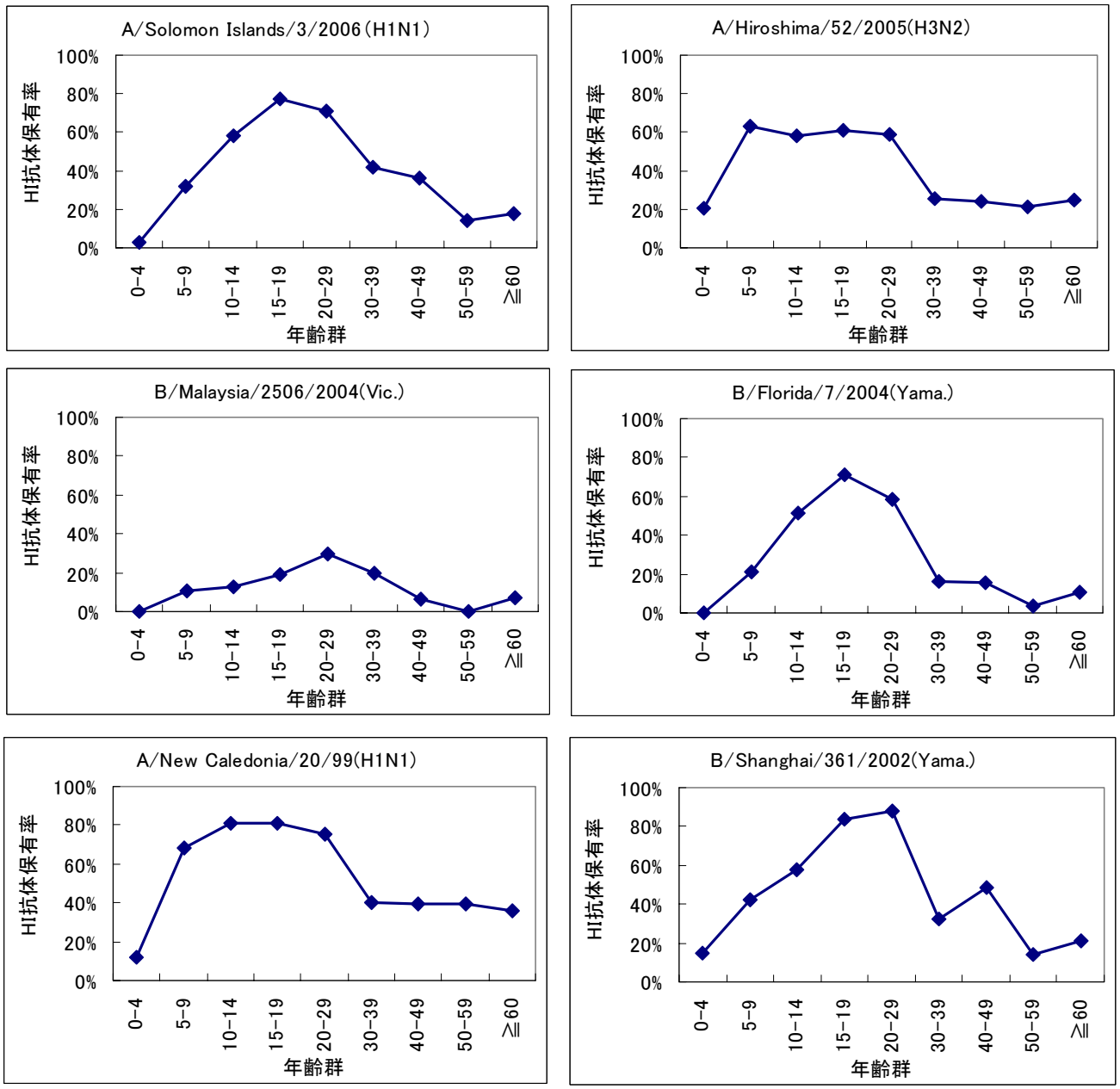


図１．年齢群別 HI 抗体保有率（抗体価40倍以上）

的低かった．

B/Malaysia/2506/2004（ビクトリア系統）に対する抗体保有率： B 型インフルエンザウイルスには，抗原性および遺伝学的に異なる2つの系統（山形系統とビクトリア系統）がある．本株に対する HI 抗体価40倍以上の抗体保有率は平均13.0%であった．年齢群別では，20～29歳の群で29.3%と中程度であり，5～19歳，30～39歳の群で10.5～20.0%比較的低く，40～49歳，60歳以上の群ではそれぞれ6.1%，7.1%と低く，0～4歳，50～59歳の群では，共に0.0%ときわめて低かった．

B/Florida/7/2004(山形系統)に対する抗体保有率：本株に対する HI 抗体価40倍以上の抗体保有率は平均28．0%であった．年齢群別では，15～19歳の群が71.0%と高く，10～14歳，20～29歳の群ではそれぞれ51.6%，58.5%と比較的高く，5～9歳，30～49歳および60歳以上の群で10.7～21.1%と比較的低く，0～4歳，50～59歳の群ではそれぞれ0.0%，3.6%と極めて低かった．

A/New Caledonia/20/99 (H1N1)に対する抗体保有率：本株は2006/07シーズンのワクチン株である．本株に対する HI 抗体価40倍以上の抗体保有率は平均

51.3%であった．年齢群別では，5〜29歳の群で68.4〜80.6%と高く，30〜39歳の群で40.0%と比較的高かった．また40歳以上の群では35.7〜39.4%と中程度であり，0〜4歳の群では11.8%と比較的低かった．

B/Shanghai/361/2002 (山形系統)に対する抗体保有率：本株は2006/07シーズンのワクチン株である．本株に対するHI抗体価40倍以上の抗体保有率は平均45.7%であった．年齢群別では，15〜19歳，20〜29歳の群がそれぞれ83.9%，87.8%と高く，5〜9歳，10〜14歳，40〜49歳の群ではそれぞれ42.1%，58.1%，48.5%と比較的高く，30〜39歳では32.7%と中程度であった．0〜4歳，50〜59歳および60歳以上の群でそれぞれ14.7%，14.3および21.4%と比較的低くかった．

２．予防接種率および予防接種歴別抗体保有状況

各年齢群における抗体保有状況を予防接種歴別に表2および図2に示した．調査対象者300名中，予防接種歴不明の8名を除く292名におけるインフルエンザワクチン接種率（採血時点で2006年度にワクチン接種歴有りと回答した者）は50.7%（148名）であった．年齢群別の接種率は35.7〜61.3%と，各年齢群間で最大約25.6ポイントの差が見られた．

全年齢群における平均抗体保有率について予防接種歴別に見ると，A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)で55.4%：25.0%（接種歴有群：接種歴無群，以下同），A/Hiroshima/52/2005(H3N2) で 49.3% ： 27.8%，B/Malaysia/2506/2004（ビクトリア系統）で23.0%：2.8%，B/Florida/7/2004 (山形系統)で37.8%：17.4%，A/New Caledonia/20/99(H1N1) で70.3%：31.3%，B/Shanghai/361/2002(山形系統)で59.5%：29.9%と，全ての調査株で接種歴有群は無群と比較して20.2〜39.0ポイント高かった．

2007年度の調査の結果，B型（ビクトリア系統）以外については，10〜29歳の群での抗体保有率が他の年齢群に比較して高く，この傾向は2006年度の調査とほぼ同じであった．これは，この年齢層が学校等の集団生活においてインフルエンザウイルスの暴露を頻回に受けることによるものと思われた．また，前シーズン予防接種歴の有無の比較では全ての調査株で接種歴有の群が高く，年齢群別でも多くの年齢群でこの傾向が認められた．AH1型については，今シーズンワクチン株が変更しているが，抗体保有率の比較では10.6ポイントの減少しかなく，十分に交差免疫が存在するものと思われた．しかしながら，全ての調査株に対する0〜4歳の抗体保有率は十分といえず，注意が必要である．また，B型（ビクトリア系統）に対する抗体保有率は全ての年齢群で低かったことから，B型インフルエンザの今後の動向には十分な注意が必要である．

II　感染源調査

インフルエンザ様患者からウイルスを分離することにより，流行株の性状を把握し，それに基づく次シーズンのワクチン株の選定や，新型インフルエンザ出現監視に資することを目的に調査を行った．なお，本年度は厚生労働省科学研究として「非流行期におけるインフルエンザサーベイランス」を行ったが，そのデータと合わせて解析している．

調査および検査方法

１．調査期間

2007年9月〜2008年6月

２．調査対象

定点医療機関として，二本垣医院（黒部市），池田内科医院（上市町），小栗小児科医院（高岡市），パスコこどもクリニック（射水市），力耕会金井医院（砺波市），柳下小児科内科医院（砺波市），正木医院（南砺市），坂本小児科医院（富山市），中島こどもクリニック（富山市），むらかみ小児科（富山市）の協力を得た．

３．検査方法

ウイルス分離は，患者から採取した咽頭・鼻腔拭い液をMDCK細胞に接種して行った．分離したウイルスの型別同定は，国立感染症研究所から配布された次の血清を用いてHI抗体価を測定することにより行った．

１．抗A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)血清
２．抗A/Hiroshima/52/2005(H3N2)血清
３．抗B/Malaysia/2506/2004(ビクトリア系統)血清
４．抗B/Shanghai/361/2002 (山形系統)血清

血球は全て0.75%モルモット血球浮遊液を使用した．

結果および考察

１．インフルエンザ患者の報告状況

富山県感染症発生動向調査によると，インフルエンザ患者の報告は2007年第43週（10月22日〜28日）から始まり，定点あたり1.0人を前後していたが，第51週（12月17日〜23日）には5.00人/定点まで増加した．その後，年末年始で一旦減少したが，年明け第2週（1月7日〜13日）から再度報告数が増加し，第5週（1月28日〜2月3日）でピーク（21.58人/定点）を迎えたが，その後急速に減少し，第14週（3月31〜4月6日）には

表 2． 予防接種歴別 HI 抗体保有率（抗体価40倍以上）

抗原		A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)		A/Hiroshima/ 52/2005 (H3N2)		B/Malaysia/ 2506/2004(Vic.)		B/Florida/ 7/2004(Yama.)		A/New Caledonia/ 20/99(H1N1)		B/Shanghai/ 361/2002 (Yama.)	
予防接種		有	無	有	無	有	無	有	無	有	無	有	無
年齢区分	0-4	6.3%	0.0%	31.3%	11.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	18.8%	5.9%	25.0%	0.0%
	5-9	11.1%	57.1%	77.8%	57.1%	11.1%	0.0%	22.2%	14.3%	77.8%	57.1%	44.4%	28.6%
	10-14	80.0%	37.5%	73.3%	43.8%	26.7%	0.0%	60.0%	43.8%	86.7%	75.0%	73.3%	43.8%
	15-19	92.9%	60.0%	85.7%	40.0%	35.7%	6.7%	92.9%	46.7%	100.0%	60.0%	92.9%	73.3%
	20-29	92.0%	37.5%	72.0%	37.5%	44.0%	6.3%	72.0%	37.5%	96.0%	43.8%	96.0%	75.0%
	30-39	55.6%	28.6%	29.6%	21.4%	33.3%	7.1%	25.9%	7.1%	66.7%	14.3%	44.4%	21.4%
	40-49	47.4%	16.7%	21.1%	33.3%	10.5%	0.0%	21.1%	8.3%	52.6%	16.7%	63.2%	25.0%
	50-59	30.8%	0.0%	30.8%	13.3%	0.0%	0.0%	7.7%	0.0%	69.2%	13.3%	30.8%	0.0%
	≧60	40.0%	5.6%	40.0%	16.7%	20.0%	0.0%	20.0%	5.6%	60.0%	22.2%	40.0%	11.1%
平均		55.4%	25.0%	49.3%	27.8%	23.0%	2.8%	37.8%	17.4%	70.3%	31.3%	59.5%	29.9%

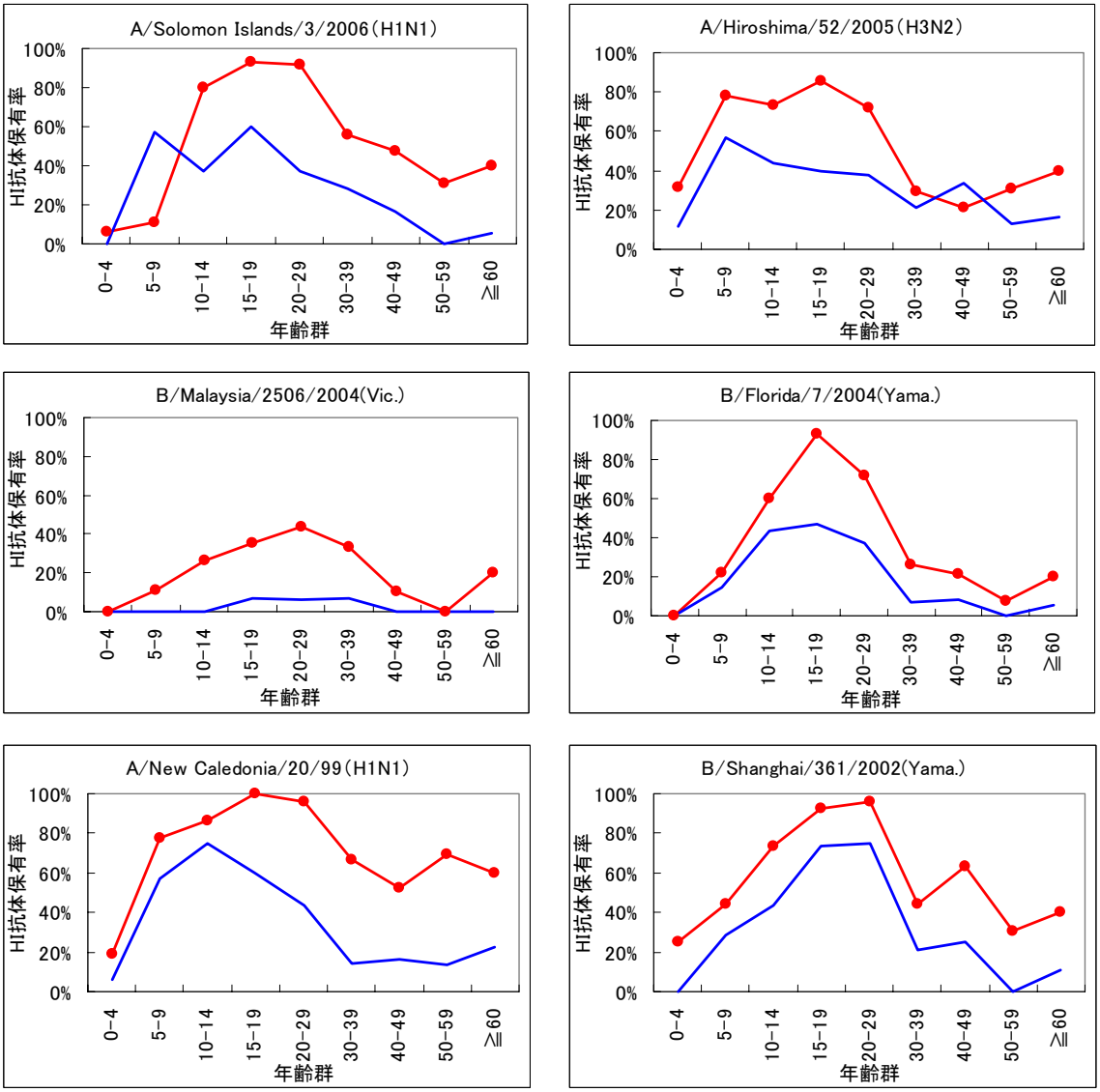


図 2． 予防接種歴別 HI 抗体保有率（抗体価40倍以上）

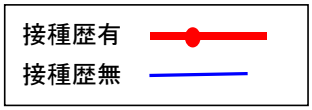


表３．施設別インフルエンザウイルス分離状況

管轄厚生センター・保健所等	検体採取施設	区分	ウイルス検査					
			咽頭（鼻腔）ぬぐい液		ウイルス分離			
						型別内訳		
			採取日	検体数	分離数	AH1	AH3	B
新川	二本垣医院	定点	2007.12.10～2008.4.18	25	24	17	5	2
中部	池田内科医院	定点	2007.12.6～2008.4.18	11	9	7	2	
高岡	小栗小児科医院	定点	2007.11.20～2008.2.25	37	37	26	11	
高岡	パスコこどもクリニック	定点	2007.11.19～2008.5.12	26	24	20	3	1
砺波	力耕会　金井病院	定点	2007.11.5～2008.5.23	77	72	25	28	19
砺波	柳下小児科内科医院	定点	2007.9.10～2008.3.5	27	25	1	24	
砺波	正木医院	定点	2007.10.27～2008.5.14	71	66	27	17	22
富山市	坂本小児科医院	定点	2007.12.7～2008.3.18	23	23	18	4	1
富山市	中島こどもクリニック	定点	2008.2.18～4.25	7	7	4	2	1
富山市	むらかみ小児科	定点	2007.12.12～15	6	6	5	1	
合計				310	293	150	97	46

（注）検体は１人１検体ずつ採取

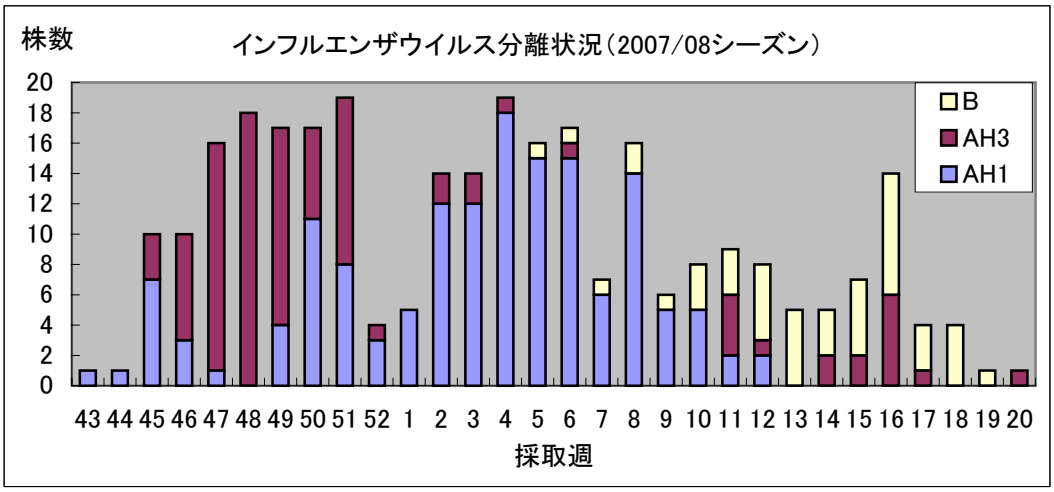


図３．週別・型別インフルエンザウイルス分離状況

表４．標準抗血清に対するＡ型分離株のHI価

抗原（分離株）		抗血清 抗A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	抗血清 抗A/Hiroshima/52/2005(H3N2)
A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)		320	−
A/Hiroshima/52/2005(H3N2)		−	640
1	A/富山/108/2007	40	−
2	A/富山/109/2007	40	−
3	A/富山/110/2007	−	320
4	A/富山/111/2007	10	−
5	A/富山/112/2007	40	−
6	A/富山/113/2007	20	−
7	A/富山/114/2007	−	320
8	A/富山/115/2007	20	−
9	A/富山/116/2007	20	−
10	A/富山/117/2007	160	−
11	A/富山/118/2007	20	−
12	A/富山/119/2007	−	320
13	A/富山/120/2007	−	320
14	A/富山/121/2007	−	320
15	A/富山/122/2007	−	320
16	A/富山/123/2007	−	160
17	A/富山/124/2007	−	320
18	A/富山/125/2007	−	160
19	A/富山/126/2007	80	−
20	A/富山/127/2007	80	−
21	A/富山/128/2007	−	320
22	A/富山/129/2007	−	320
23	A/富山/130/2007	40	−
24	A/富山/131/2007	−	160
25	A/富山/132/2007	−	160
26	A/富山/133/2007	40	−
27	A/富山/134/2007	−	160
28	A/富山/135/2007	−	160
29	A/富山/136/2007	−	160
30	A/富山/137/2007	−	320
31	A/富山/138/2007	−	320
32	A/富山/139/2007	−	640
33	A/富山/140/2007	−	320
34	A/富山/141/2007	−	320
35	A/富山/142/2007	−	640
36	A/富山/143/2007	−	320
37	A/富山/144/2007	−	320
38	A/富山/145/2007	−	320
39	A/富山/146/2007	−	320
40	A/富山/147/2007	−	320
41	A/富山/148/2007	−	320
42	A/富山/149/2007	−	320
43	A/富山/150/2007	−	320
44	A/富山/151/2007	−	320
45	A/富山/152/2007	−	640
46	A/富山/153/2007	−	320
47	A/富山/154/2007	−	640
48	A/富山/155/2007	−	320
49	A/富山/156/2007	−	640
50	A/富山/157/2007	−	640
51	A/富山/158/2007	−	320
52	A/富山/159/2007	−	320
53	A/富山/160/2007	−	640
54	A/富山/161/2007	−	640
55	A/富山/162/2007	−	640
56	A/富山/163/2007	−	640
57	A/富山/164/2007	−	640
58	A/富山/165/2007	−	320
59	A/富山/166/2007	−	640
60	A/富山/167/2007	−	640
61	A/富山/168/2007	−	320
62	A/富山/169/2007	80	−

抗原（分離株）		抗血清 抗A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	抗血清 抗A/Hiroshima/52/2005(H3N2)
A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)		320	−
A/Hiroshima/52/2005(H3N2)		−	640
63	A/富山/170/2007	80	−
64	A/富山/171/2007	40	−
65	A/富山/172/2007	−	160
66	A/富山/173/2007	−	320
67	A/富山/174/2007	−	320
68	A/富山/175/2007	−	160
69	A/富山/176/2007	−	640
70	A/富山/177/2007	−	160
71	A/富山/178/2007	−	320
72	A/富山/179/2007	−	320
73	A/富山/180/2007	80	−
74	A/富山/181/2007	−	160
75	A/富山/182/2007	80	−
76	A/富山/183/2007	−	1280
77	A/富山/184/2007	40	−
78	A/富山/185/2007	40	−
79	A/富山/186/2007	−	320
80	A/富山/187/2007	40	−
81	A/富山/188/2007	−	320
82	A/富山/189/2007	80	−
83	A/富山/190/2007	40	−
84	A/富山/191/2007	40	−
85	A/富山/192/2007	40	−
86	A/富山/193/2007	40	−
87	A/富山/194/2007	80	−
88	A/富山/195/2007	−	320
89	A/富山/196/2007	80	−
90	A/富山/197/2007	−	640
91	A/富山/198/2007	−	320
92	A/富山/199/2007	−	640
93	A/富山/200/2007	−	640
94	A/富山/201/2007	−	1280
95	A/富山/202/2007	−	1280
96	A/富山/203/2007	−	1280
97	A/富山/204/2007	−	640
98	A/富山/205/2007	−	640
99	A/富山/206/2007	−	640
100	A/富山/207/2007	−	160
101	A/富山/208/2007	40	−
102	A/富山/209/2007	−	640
103	A/富山/210/2007	40	−
104	A/富山/211/2007	40	−
105	A/富山/212/2007	40	−
106	A/富山/213/2007	40	−
107	A/富山/214/2007	40	−
108	A/富山/215/2007	80	−
109	A/富山/216/2007	−	640
110	A/富山/217/2007	80	−
111	A/富山/218/2007	80	−
112	A/富山/219/2007	80	−
113	A/富山/220/2007	40	−
114	A/富山/1/2008	40	−
115	A/富山/2/2008	80	−
116	A/富山/3/2008	40	−
117	A/富山/4/2008	40	−
118	A/富山/5/2008	40	−
119	A/富山/6/2008	80	−
120	A/富山/7/2008	40	−
121	A/富山/8/2008	−	640
122	A/富山/9/2008	−	320
123	A/富山/10/2008	40	−
124	A/富山/11/2008	80	−

−: HI抗体価　<1:10

A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)　ワクチン株
A/Hiroshima/52/2005(H3N2)　ワクチン株

表４．標準抗血清に対するＡ型分離株のHI価

抗原（分離株）	抗血清 抗A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	抗血清 抗A/Hiroshima/52/2005(H3N2)
A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	320	−
A/Hiroshima/52/2005(H3N2)	−	640
125 A/富山/12/2008	40	−
126 A/富山/13/2008	80	−
127 A/富山/14/2008	40	−
128 A/富山/15/2008	40	−
129 A/富山/16/2008	80	−
130 A/富山/17/2008	80	−
131 A/富山/18/2008	80	−
132 A/富山/19/2008	40	−
133 A/富山/20/2008	40	−
134 A/富山/21/2008	40	−
135 A/富山/22/2008	40	−
136 A/富山/23/2008	80	−
137 A/富山/24/2008	−	320
138 A/富山/25/2008	−	40
139 A/富山/26/2008	40	−
140 A/富山/27/2008	40	−
141 A/富山/28/2008	80	−
142 A/富山/29/2008	40	−
143 A/富山/30/2008	40	−
144 A/富山/31/2008	80	−
145 A/富山/32/2008	80	−
146 A/富山/33/2008	40	−
147 A/富山/34/2008	40	−
148 A/富山/35/2008	40	−
149 A/富山/36/2008	80	−
150 A/富山/37/2008	40	−
151 A/富山/38/2008	80	−
152 A/富山/39/2008	−	320
153 A/富山/40/2008	20	−
154 A/富山/41/2008	20	−
155 A/富山/42/2008	80	−
156 A/富山/43/2008	40	−
157 A/富山/44/2008	80	−
158 A/富山/45/2008	80	−
159 A/富山/46/2008	40	−
160 A/富山/47/2008	40	−
161 A/富山/48/2008	40	−
162 A/富山/49/2008	20	−
163 A/富山/50/2008	80	−
164 A/富山/51/2008	40	−
165 A/富山/52/2008	40	−
166 A/富山/53/2008	20	−
167 A/富山/54/2008	20	−
168 A/富山/55/2008	40	−
169 A/富山/56/2008	40	−
170 A/富山/57/2008	40	−
171 A/富山/58/2008	40	−
172 A/富山/59/2008	40	−
173 A/富山/60/2008	40	−
174 A/富山/61/2008	40	−
175 A/富山/62/2008	40	−
176 A/富山/63/2008	20	−
177 A/富山/64/2008	40	−
178 A/富山/65/2008	40	−
179 A/富山/66/2008	40	−
180 A/富山/67/2008	40	−
181 A/富山/68/2008	80	−
182 A/富山/69/2008	40	−
183 A/富山/70/2008	40	−
184 A/富山/71/2008	40	−
185 A/富山/72/2008	80	−
186 A/富山/73/2008	40	−

抗原（分離株）	抗血清 抗A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	抗血清 抗A/Hiroshima/52/2005(H3N2)
A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	320	−
A/Hiroshima/52/2005(H3N2)	−	640
187 A/富山/74/2008	80	−
188 A/富山/75/2008	40	−
189 A/富山/76/2008	40	−
190 A/富山/77/2008	40	−
191 A/富山/78/2008	40	−
192 A/富山/79/2008	40	−
193 A/富山/80/2008	20	−
194 A/富山/81/2008	40	−
195 A/富山/82/2008	20	−
196 A/富山/83/2008	40	−
197 A/富山/84/2008	−	320
198 A/富山/85/2008	80	−
199 A/富山/86/2008	80	−
200 A/富山/87/2008	80	−
201 A/富山/88/2008	40	−
202 A/富山/89/2008	40	−
203 A/富山/90/2008	40	−
204 A/富山/91/2008	40	−
205 A/富山/92/2008	80	−
206 A/富山/93/2008	40	−
207 A/富山/94/2008	80	−
208 A/富山/95/2008	40	−
209 A/富山/96/2008	80	−
210 A/富山/97/2008	40	−
211 A/富山/98/2008	40	−
212 A/富山/99/2008	80	−
213 A/富山/100/2008	−	160
214 A/富山/101/2008	40	−
215 A/富山/102/2008	80	−
216 A/富山/103/2008	40	−
217 A/富山/104/2008	40	−
218 A/富山/105/2008	80	−
219 A/富山/106/2008	80	−
220 A/富山/107/2008	80	−
221 A/富山/108/2008	80	−
222 A/富山/109/2008	40	−
223 A/富山/110/2008	−	160
224 A/富山/111/2008	80	−
225 A/富山/112/2008	−	160
226 A/富山/113/2008	−	320
227 A/富山/114/2008	−	160
228 A/富山/115/2008	80	−
229 A/富山/116/2008	80	−
230 A/富山/117/2008	80	−
231 A/富山/118/2008	80	−
232 A/富山/119/2008	40	−
233 A/富山/120/2008	20	−
234 A/富山/121/2008	40	−
235 A/富山/122/2008	80	−
236 A/富山/123/2008	−	320
237 A/富山/124/2008	−	320
238 A/富山/125/2008	−	320
239 A/富山/126/2008	−	320
240 A/富山/127/2008	−	320
241 A/富山/128/2008	−	160
242 A/富山/129/2008	−	320
243 A/富山/130/2008	−	640
244 A/富山/131/2008	−	640
245 A/富山/132/2008	−	640
246 A/富山/133/2008	−	320
247 A/富山/134/2008	−	320

−: HI抗体価　<1:10

A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)　ワクチン株
A/Hiroshima/52/2005(H3N2)　ワクチン株

表５．標準抗血清に対するＢ型分離株のHI価

抗原（分離株）	抗血清 抗B/Malaysia/2506/2004	抗血清 抗B/Shanghai/361/2002
B/Malaysia/2506/2004	160	−
B/Shanghai/361/2002	−	320
1 B/富山/1/2008	−	40
2 B/富山/2/2008	−	40
3 B/富山/3/2008	−	40
4 B/富山/4/2008	−	80
5 B/富山/5/2008	−	160
6 B/富山/6/2008	160	−
7 B/富山/7/2008	−	160
8 B/富山/8/2008	−	160
9 B/富山/9/2008	−	160
10 B/富山/10/2008	320	−
11 B/富山/11/2008	−	160
12 B/富山/12/2008	−	160
13 B/富山/13/2008	−	640
14 B/富山/14/2008	−	320
15 B/富山/15/2008	−	320
16 B/富山/16/2008	−	320
17 B/富山/17/2008	−	320
18 B/富山/18/2008	−	320
19 B/富山/19/2008	−	320
20 B/富山/20/2008	−	160
21 B/富山/21/2008	−	160
22 B/富山/22/2008	−	80
23 B/富山/23/2008	−	160
24 B/富山/24/2008	−	160
25 B/富山/25/2008	−	320
26 B/富山/26/2008	−	320
27 B/富山/27/2008	−	320
28 B/富山/28/2008	−	320
29 B/富山/29/2008	−	320
30 B/富山/30/2008	−	320
31 B/富山/31/2008	−	320
32 B/富山/32/2008	−	320
33 B/富山/33/2008	−	320
34 B/富山/34/2008	−	320
35 B/富山/35/2008	−	80
36 B/富山/36/2008	−	80
37 B/富山/37/2008	−	320
38 B/富山/38/2008	−	80
39 B/富山/39/2008	−	320
40 B/富山/40/2008	−	320
41 B/富山/41/2008	−	320
42 B/富山/42/2008	−	320
43 B/富山/43/2008	−	320
44 B/富山/44/2008	−	320
45 B/富山/45/2008	−	160
46 B/富山/46/2008	−	320

−: HI抗体価 <1:10
B/Malaysia/2506/2004
（ビクトリア系統）ワクチン株
B/Shanghai/361/2002
（山形系統）　参考株

0.96人/定点となった．第16〜17週に主に砺波地域で小さな流行があったが，第20週（5月19日〜25日）には定点あたり0.06人/定点となり流行は終息した．

「集団かぜ」による学級閉鎖等の措置は，1月16日の小学校での学年閉鎖に始まり，4月21日までに19施設で取られた．シーズン中の累積患者数は377名であった．

２．インフルエンザウイルス検出状況

2007年10月〜2007年6月までに，定点医療機関で採取された310検体についてインフルエンザウイルスの分離を試みた．成績を表3に示す．

ウイルス分離はAH1型が150株，AH3型が97株，B型が46株，合計293株分離された．シーズン序盤はAH3型の分離が多数を占めていたが，年明けからはAH1型が多数を占めるようになった．シーズン終盤には，AH3型とB型が混合して分離された（図3）．

標準抗血清に対するA型分離株のHI抗体価を表4に示す．抗A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)血清に反応するAH1型の分離株（150株）のHI抗体価は，10〜 160倍（ホモ価320倍）であった．HI抗体価がホモ価と8倍以上違う分離株は98株あり，AH1型の分離株の約65％はワクチン株と抗原性が異なるものであった．抗A/Hiroshima/52/2005血清に反応するAH3型の分離株（97株）のHI抗体価は，40〜1280倍（ホモ価640倍）であった．HI抗体価がホモ価と4倍以上違う分離株は18株あり，さらに1株は16倍以上違っていた．今シーズン，久しぶりにAH1型が中心の流行となったが，AH1型の流行株がワクチン株と抗原性が異なっていたことも影響している可能性がある．

標準抗血清に対するB型分離株のHI抗体価を表5に示す．抗B/Malaysia/2506/2004血清に反応するB型分離株（44株）のHI抗体価は，40〜640倍（ホモ価320倍）であり，ホモ価と8倍以上違うHI抗体価を示した株は3株あった．また，B/Shanghai/361/2002株血清に反応するB型分離株（2株）のHI抗体価は，それぞれ160，320倍（ホモ価320倍）であった．このように，今シーズン分離されたB型分離株のほとんどは山形系統であった．

今シーズンの富山県におけるインフルエンザの流行は，シーズン総患者報告数では昨シーズンより若干少なく[1]，過去10シーズンでは9番目に多い報告数となった．流行は例年に比べ早く始まったが，年末の流行は小規模の流行であり，年明けから1月下旬をピークに持つ一峰性の曲線を描いた．近年の流行状況からA型が単独で分離されるシーズンは，1月下旬にピークを形成しやすい傾向があり，今シーズンも同様の傾

向があった．

ウイルス分離については，AH1型が51.2%，AH3型が33.1%，B型が15.7%であった．全国の集計では，2008年6月27日時点で，AH1型が83.1%，AH3型が10.4%，B型が6.5%であり，富山県ではAH3型とB型の割合が多い傾向にあった[2]．富山県感染症発生動向調査によるインフルエンザ迅速診断キット診断状況調査では，今シーズンA型が96%，B型が3%となっており，富山県でのB型の分離が若干多くなった事については，B型の検体数の多い定点医療機関が県西部に集中したためと思われる．

分離株の抗原解析の結果，AH1型については約6割がワクチン選定株と異なる抗原性を示していたのに対し，AH3型はワクチン株に類似する株が多かった．B型については，ほとんどが山形系統であり，ワクチン株に類似した株がほとんどだった．世界的には，全てのワクチン株で抗原性がずれていることが確認されており，WHOは2008/09インフルエンザシーズンワクチン（北半球の冬）のワクチン推奨株について，AHI型をA/Brisbane /59/2007類似株にAH3型をA/Brisbane/10/2007類似株に，B型をB/Florida/4/2006類似株に変更した[3]．

謝　　辞

検査材料の採取と臨床症状の調査にご協力いただいた二本垣医院，池田内科医院，小栗小児科医院，パスコこどもクリニック，力耕会金井医院，柳下小児科内科医院，正木医院，坂本小児科医院，中島こどもクリニック，むらかみ小児科に深謝いたします．また，ご協力いただいた多数の関係各位に深謝いたします．

文　　献

1．富山県衛生研究所編集・発行（2008）．富山県感染症発生動向調査事業報告書（平成19年），p21
2．国立感染症研究所感染症情報センター(2008). IASR, http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph-kj.html
3．国立感染症研究所編（2008）.病原微生物検出情報,29,107

平成20年12月１日

下水流入水の腸管系ウイルス調査（2006-2008年）

岩井雅恵　中村一哉　小原真弓　長谷川澄代　堀元栄詞　倉田　毅　滝澤剛則

Enteric viruses in raw sewage in Toyama Prefecture from 2006 to 2008

Masae IWAI, Kazuya NAKAMURA, Mayumi OBARA, Sumiyo HASEGAWA,
Eiji HORIMOTO, Takeshi KURATA, Takenori TAKIZAWA

要　旨　地域住民の腸管系ウイルス感染状況を知るために，2006年4月から2008年3月まで，富山県内の1下水処理場において，毎月1回下水流入水のウイルス調査を実施した．ポリオウイルスは，生ワクチン接種時期から3ヶ月以内に検出され，ウイルス遺伝子のVP1領域の塩基配列解析により，すべてワクチン由来株と判定された．その他，ヒトエンテロウイルスＢ群（HEV-B），レオウイルス，アデノウイルス，ノロウイルス，サポウイルスが検出された．調査期間中，無菌性髄膜炎や感染性胃腸炎の患者と，下水流入水とから検出されたHEV-B，ノロウイルス，サポウイルスの検出状況を比較したところ，コクサッキーウイルスＢ2型（CoxB2），CoxB5，ノロウイルスGenogroup(G)I/8，GII/4，GII/13は，無菌性髄膜炎や感染性胃腸炎の患者からの検出とほぼ同時期に下水流入水からも検出された．下水流入水からは，これら以外にも，多種類の型のウイルスが検出された．

エンテロウイルスや，ノロウイルス，サポウイルスなどの腸管系ウイルスは，経口感染によってヒトの間を伝播する[1，2]．エンテロウイルスは，感染しても無症状のことが多いが，時に上気道炎やヘルパンギーナ，無菌性髄膜炎，脳炎などを起こし[1，3]，ノロウイルスおよびサポウイルスは，感染性胃腸炎の原因となる[2，4]．これらのウイルスによる患者発生動向は，感染症法に基づいて，調査されている．これらの流行状況は毎年異なり，時として大流行を起こすこともあるため，継続的に流行状況を把握することは，公衆衛生上重要であると考えられる．しかしながら，富山県においては，無菌性髄膜炎などの報告症例数が少なく，腸管系ウイルスの流行状況の把握が不十分である可能性がある．そこで，地域住民の便中に排泄されるウイルスが含まれる下水流入水を調査することで，住民のウイルス感染状況を把握することを試みた．下水流入水中には，不顕性感染しながら地域住民の間を伝播しているウイルスも含まれていると考えられる．したがって，本調査では，地域住民の顕性，不顕性を含む包括的な腸管系ウイルス感染状況を明らかにすることを目的として，毎月1回，下水流入水から検出されるウイルスの種類を調べ，ヒト（無菌性髄膜炎や感染性胃腸炎の患者や健康者）由来の腸管系ウイルスと比較した．

材料と方法

１）下水流入水の採取

2006年4月～2008年3月の間に，県内の1下水処理場において，月1回下水流入水を2リットル採取した．当該処理場は，計画処理人口が約30万人の流域下水道の処理施設である．

２）下水流入水の濃縮

下水流入水は，3000rpm，30分間遠心し上清を回収後，「ポリエチレングリコール法」[5]または「フィルター吸着溶出法」[6]により濃縮した．

「ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法」：遠心上清1Lに，80gのPEG6000を添加し，4℃で2時間攪拌した後，10,000rpm，30分間遠心しウイルスを濃縮沈殿させた．沈殿は4mLのリン酸緩衝液に懸濁し，ポアサイズ0.45μmのフィルターを通して雑菌を除き，ウイルス検査材料とした．

「フィルター吸着溶出法」：遠心上清1LにMgCl2を最終濃度0.05Mとなるように加え，さらに0.5N HClを加えてpH3.5に調整し，陰電荷膜（Mixed cellulose ester type membrane フィルター，直径142 mm，ポアサイズ0.45μm，ADVANTEC）にろ過することによりウイルスを吸着させた．次いでフィルターを細断して10mLの3%Beef extract液中で，1分間，超音波処理（TAITEC VP-5S，出力50W，周波数20

kHz）することによりウイルスを誘出した．誘出液の雑菌を除き，ウイルス検査材料とした．

3）患者および健康者のウイルス調査

県内で2006年4月～2008年3月に発症した6名の無菌性髄膜炎患者の糞便，咽頭拭い液，および髄液，805名の感染性胃腸炎の患者から得られた糞便，および134名の健康な乳幼児から得られた糞便を用いた．糞便はPBSで10%乳剤を作製した．便乳剤と咽頭拭い液は13,000rpmで30分間遠心することで雑菌を除き，髄液はそのままウイルス検査材料とした．

4）エンテロウイルス，アデノウイルス，レオウイルスの分離

2）の各処理により得られた下水流入水のウイルス濃縮液および3)のヒトからの臨床検体を，培養細胞（Vero，MA104，RD-18S，HEp-2）に接種し，細胞変性効果やヒトO型血球との凝集性を指標としてウイルス分離を行った．分離ウイルスの同定は，抗エンテロウイルス血清（国立感染症研究所分与，デンカ生研），抗アデノウイルス血清（デンカ生研），抗レオウイルス血清（自家製）を用いた中和試験あるいは赤血球凝集抑制試験によって行った．

5）ポリオウイルス，ノロウイルス，サポウイルスの遺伝子検出と塩基配列の比較

分離ウイルス，または，濃縮処理後の下水流入水から，QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出した．濃縮下水については，DNase処理を行なった．抽出RNAにランダムヘキサマーまたはオリゴdT15～18，およびSuper Script Ⅲ Reverse Transcriptase（Invitrogen）を加え，逆転写反応でcDNAを作製後，Ex Taq（TaKaRa）を用いてPCRを行った．PCRのプライマーは，ノロウイルスGenogroup Ⅰ（GI）用に，GI-SKFおよびGI-SKR，ノロウイルスGII用に，GII-SKFおよびGII-SKR[7]を，サポウイルス用に，SV-F11およびSV-R1[8]を，ポリオウイルス用に，UG1およびUC11[9, 10]を用いた．PCR産物は，ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した．また，2006年7月～10月に採取した下水流入水から検出されたノロウイルスGⅡについては，TAクローニングにより1月につき25プラスミドずつクローニングを行った．

ポリオウイルス分離株の塩基配列は，VP1全領域について，ワクチン株Sabin1，Sabin2，Sabin3の塩基配列（1型906塩基，2型903塩基，3型900塩基）（GenBankアクセッション番号はそれぞれAY184219，AY184220，X00596）と比較した．

ノロウイルス遺伝子の塩基配列は，プライマー部分を除き，GIは291塩基（Norwalk/68/US，M87661のポジション5362-5652），GIIは302塩基（Lordsdale/93/UK，X86557のポジション5065-5366）について，参考株[11-17]と比較し，遺伝子型を決定した．サポウイルス遺伝子の塩基配列は，約686塩基（Manchester virus，X86560のポジション5170-5856）について参考株[18]と比較し，遺伝子型を決定した．

6）ノロウイルス遺伝子の定量

ノロウイルス遺伝子のコピー数は，厚生労働省の通知[19]に従い，Kageyamaら[20]のTaqMan real time PCR法により求めた．

7）大腸菌群数の測定

滅菌水で10倍希釈した下水流入水を1mlずつ，直径90mmのディッシュに入れ，20mlのデソキシコレート培地を加えて混合した後，7mlのデソキシコレート培地を重層し，35℃で一晩培養した．培養後，出現した赤色のコロニー数を計測して，大腸菌群数（CFU/ml）とし，2枚のディッシュのコロニー数を平均した．

結　　果

1）下水流入水からのウイルス検出状況

図1に，下水流入水から検出されたウイルスの種類を月別に示した．下水流入水からは，年間を通して，ポリオウイルス，ヒトエンテロウイルスB群（HEV-B），レオウイルス，アデノウイルス，ノロウイルス，サポウイルスなどの腸管系ウイルスが検出された．

1－1 ポリオウイルス

ポリオウイルスは，2年間で35株が分離された．血清型別では，1型が2006年4月，2007年11月，12月に計4株，2型が2006年5月，6月，10月，11月，2007年5月，6月，11月に計19株，3型が2006年10月，11月，12月，2007年6月，10月，11月に計12株であった．下水処理場所在地域の乳幼児へのポリオワクチン集団接種時期は，2006年4/13-5/24，9/7-10/18，2007年4/11-5/24，9/5-10/18であり，ポリオウイルスは，ワクチン接種時期から約2ヶ月の間に検出された．健康なヒトの場合，腸管で増殖したウイルスは，通常2週間～1ヶ月間排出されることから，今回分離されたポリオウイルスは，流域の地域のワクチン接種に関連して検出されたことが推測された．また，分離株とワクチン株との

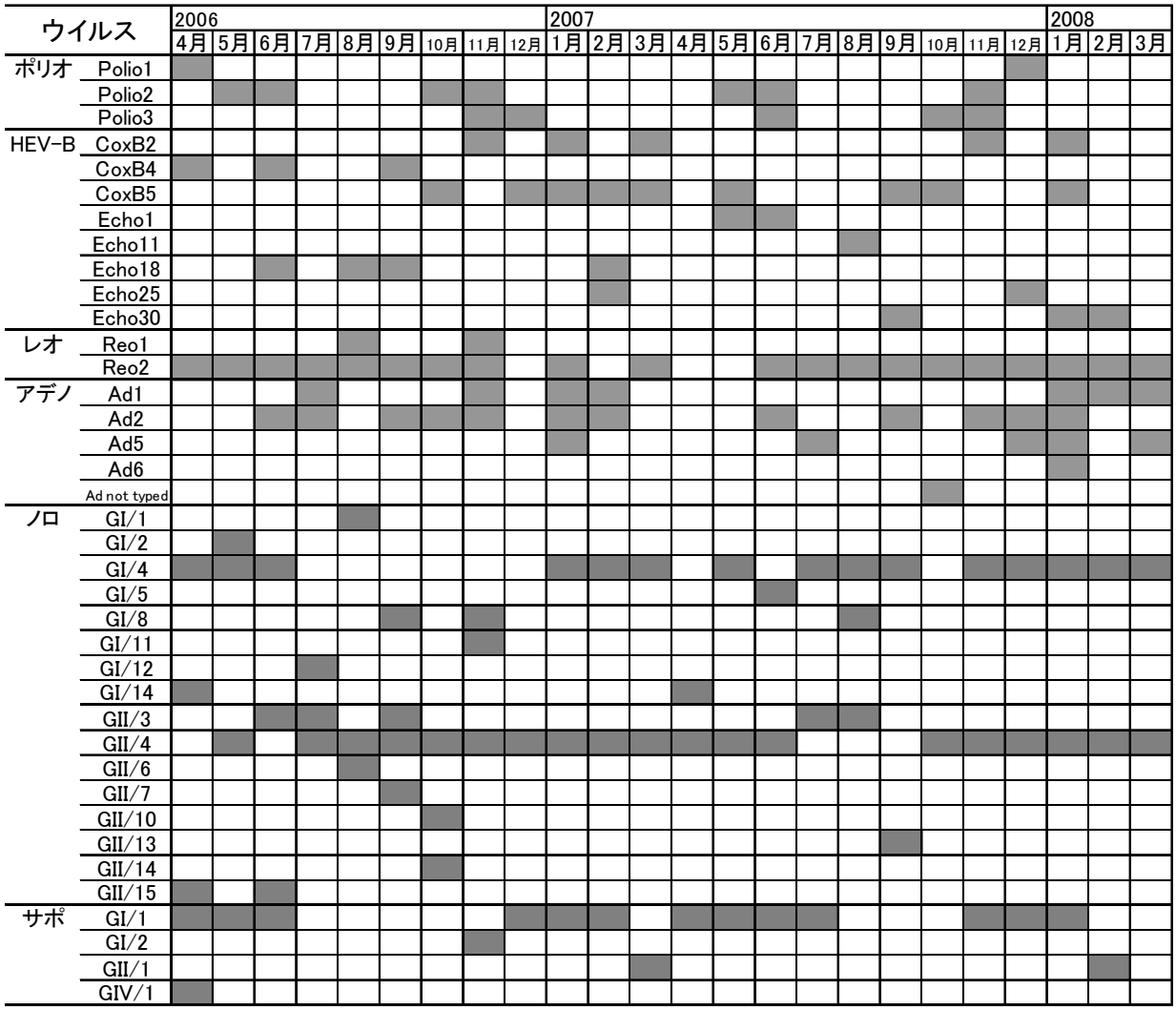


図１．下水流入水からのウイルス検出状況（2006-2008）

VP1領域の塩基配列の差異は，1型では，0～0.33%，2型では，0～0.22%，3型では，0.11～0.56%であった．いずれもワクチン株と1%未満の差であるため，世界保健機関の基準によるOPV（Oral polio vaccine）-likeポリオウイルスであると確認された．このように，今回の調査における分離株は，すべてワクチン由来であり，野生株は検出されなかった．

１－２ HEV-B

調査期間中，HEV-Bは，CoxB2，CoxB4，CoxB5，エコーウイルス1型（Echo1），Echo11，Echo18，Echo25，Echo30の8種類が検出された．このうち，最も頻繁に検出されたのは，CoxB5であり，次いでCoxB2が多かった．その他，CoxB4およびEcho18が主に2006年に，Echo30が2007年9月，2008年1月および2月に検出された．

１－３ レオウイルスおよびアデノウイルス

レオウイルス1型，2型，アデノウイルス1型，2型，5型，6型が検出された．レオウイルスは2型が頻繁に検出された．アデノウイルスでは2型が多く検出され，次いで１型，5型が多かった．

１－４ ノロウイルス

ノロウイルスは，Genogroup Ⅰ（GI）およびGIIともにほぼ毎月検出された．遺伝子型別では，GIがGI/1，2，4，5，8，11，12，14の計8種類，GIIはGII/3，4，6，7，10，13，14，15の計8種類が検出されたが，GIではGI/4が，GIIではGII/4が主であった．GI/4は，特に2007年から2008年にかけて多く，その他のGIの型は散発的に検出された．GII/4は，2006年4，6月，2007年7～9月以外のすべての月で検出された．GII/7は2006年10月に，GII/13は2007年9月に検

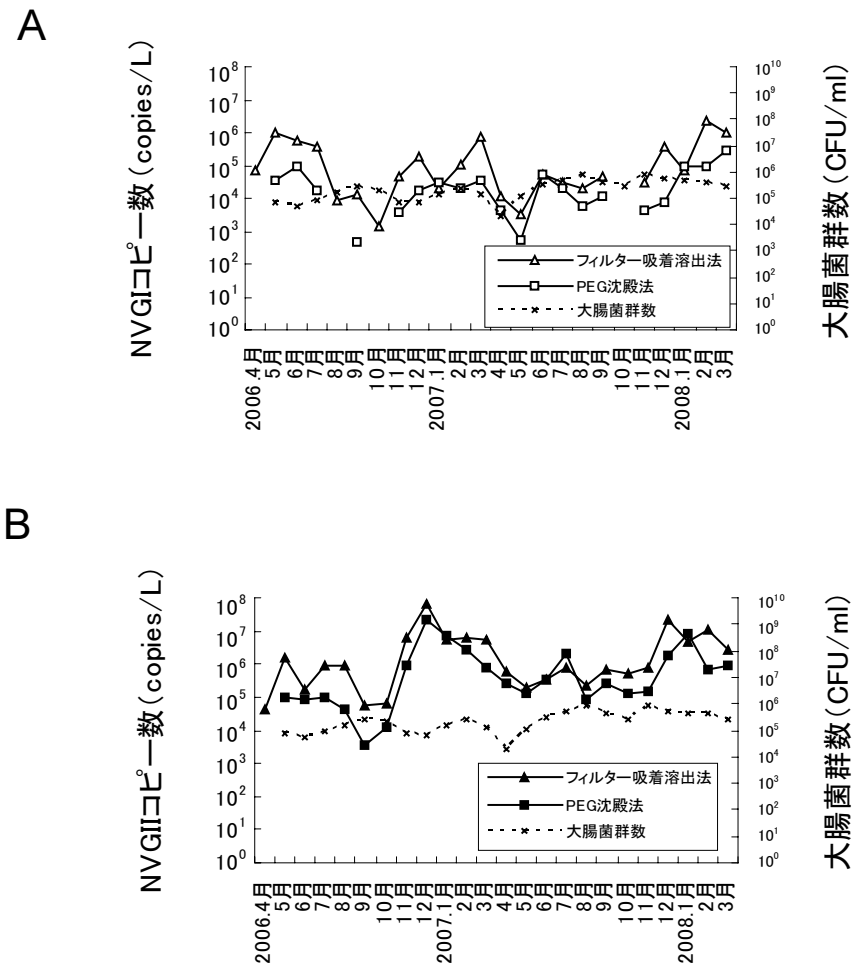


図２．下水流入水中のノロウイルス遺伝子コピー数（2006-2008）
(A) ノロウイルス GI. (B) ノロウイルス GII.

出された．その他の GII の型は，2006年6～10月，2007年7～10月の間に散発的に検出された．

下水流入水中のノロウイルス遺伝子の，リアルタイム PCR による定量結果を図2に示す．ウイルスの濃縮方法について，「PEG 沈殿法」と「フィルター吸着溶出法」の2種類とを比較したところ，フィルター吸着溶出法の方が，PEG 沈殿法よりもノロウイルスの濃縮効率が良かったが，下水流入水中のノロウイルス遺伝子量の季節的な変化は，両方法で類似していた．ノロウイルス GI は，10^3～10^6 copy/L であり，GII は10^4～10^8 copy/L であった．GI，GII ともに夏季よりも冬季にノロウイルス遺伝子量が多く，特に2006/2007年の冬季は，ノロウイルス GII の遺伝子量が多かった．下水流入水中の大腸菌群数は，調査期間中，2.0×10^4～8.1×10^5 CFU/ml，幾何平均は2.0×10^5 CFU/ml であり，変動は少なかった．したがって，雨水などによる下水流入水の変動は少ないものと考えられた．

１－５　サポウイルス

サポウイルスは主に冬季から春季にかけて検出された．遺伝子型別では，GI/1が最も多く検出され，その他，GI/2，GII/1，GIV/1が検出された．

２）患者と健康者からのウイルスと下水流入水からのウイルスとの比較

無菌性髄膜炎，感染性胃腸炎，および健康者からの腸管系ウイルス検出状況を表1に示した．無菌性髄膜炎患者からは HEV-B が，感染性胃腸炎患者からは主にノロウイルスと，ノロウイルスと同じカリシウイルス科のサポウイルスが，また，健康者からは HEV-B，アデノウイルス，ノロウイルス，パレコウイルスが検出されたため，HEV-B，ノロウイルス，およびサポ

表１．患者と健康者からの腸管系ウイルス検出状況

疾患名	ウイルス	2006年 4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	2007年 1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	2008年 1月	2月	3月
無菌性髄膜炎	(被検者数)		1					1		1															
	CoxB2		1																						
	CoxB5							1		1															
感染性胃腸炎	(被検者数)	2					1	1	4	2	3	2	1	3	3					1		3			2
	ノロGII/4								2	2												2			
	ノロGII/6										1														
	サポGII/3											1													
	サポGIV/1																								1
	その他ウイルス*	2					1					1	1	3	3										
健康者	(被検者数)						12				61								10				51		
	CoxB5+ノロGII/13										1														
	Ad1										3														
	Ad2+ノロGII/13										2														
	ノロGII/4										2														
	ノロGII/4+パレコ1						1																		
	ノロGII/7										6														
	ノロGII/13										5														
	パレコ1						7												1						

*その他ウイルス，A 群ロタウイルス，アストロウイルス，アデノウイルス，パレコウイルス 1 型

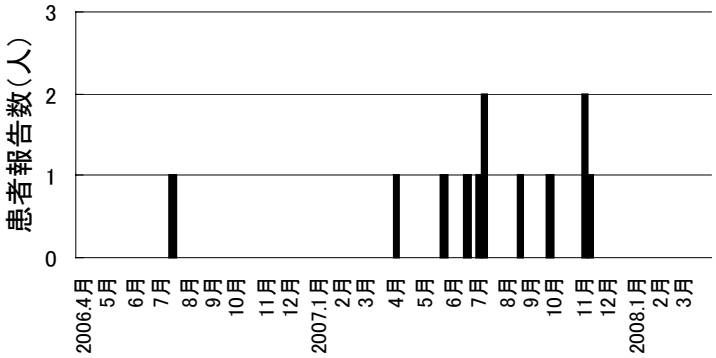


図３．県内5箇所の基幹定点医療機関における無菌性髄膜炎患者発生状況

ウイルスについて，下水流入水由来ウイルスと比較した．

２－１ 無菌性髄膜炎患者と健康者からの HEV-B

県内5箇所の基幹定点医療機関における，無菌性髄膜炎患者発生状況を図3に示す．無菌性髄膜炎患者からは，2006年5月に CoxB2が，2006年10月および12月に CoxB5が検出された（表1）．これらのウイルスが検出されたのは，いずれも0歳児であった．CoxB5は，2007年1月に無症状の健康者1名（6歳児）からも検出された．これらの検出時期は，下水流入水から検出された時期とほぼ一致した．下水流入水からはこれら以外にも数種類の HEV-B が検出されていた（図1）．

２－２ 感染性胃腸炎患者と健康者からのノロウイルスとサポウイルス

2006/2007および2007/2008シーズンの冬季を中心に，ノロウイルス GII/4を原因とする感染性胃腸炎の集団発生事例が多発した（図4-A）[21，22]．小児科医療機関を受診した散発例の患者からも，ノロウイルス GII/4が，2006年11月，12月，および2007年12月に検出された（表1）．下水流入水からのノロウイルス GII/4の検出も患者と同時期であり，下水流入水中のノロウイルス GII 遺伝子量の増減（図2）も，集団発生事例発生状況（図4-A）や小児科医療定点における患者発生数（図4-B）の動向と類似していた．これらの検出されたノロウイルス GII/4は，遺伝子解析により，Chiba-4e，2006a，2006b の3つのクラスターに分類された（図5）[11，12，16，17]．各クラスターの代表株は，それぞれ，Chiba/04-1050/2005/JP（AB220921），Rhyl440/2005/UK（DQ665819），LincolnHouse/2006/UK（DQ676865）である．下水

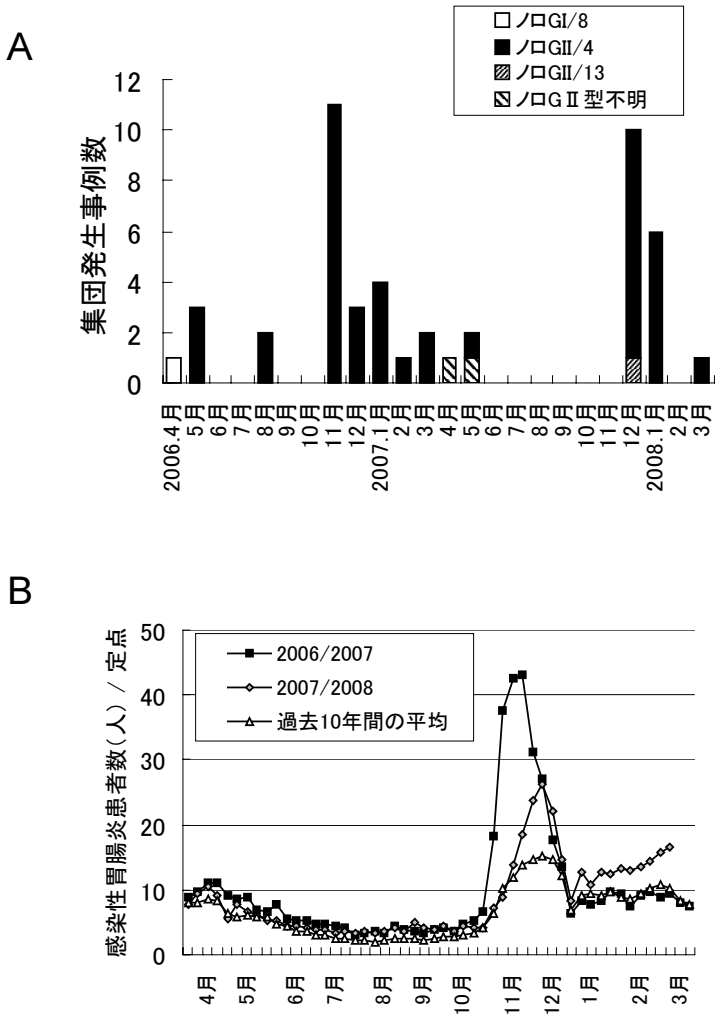


図 4. 感染性胃腸炎患者発生状況.（A）ウイルス性感染性胃腸炎の集団発生事例発生状況.
（B）県内29箇所の小児科定点医療機関における定点あたり感染性胃腸炎患者報告数.

流入水由来では，2006年5月と2006年7-8月に検出されたノロウイルス GII/4がそれぞれ2006a と Chiba-4e に属したが， 2006年7月以降に検出された GII/4は，すべて2006b であった．感染性胃腸炎患者と健康者由来では，2006年5月の集団発生2事例と2006年9月に健康者1名から検出されたノロウイルス GII/4がそれぞれ2006a，Chiba-4e に属したが，それ以外（2006年5月～2008年3月の患者由来株，2007年1月の健康者由来株）はすべて2006b であった．

その他の遺伝子型では，ノロウイルス GI/8が2006年4月に集団発生1事例から，GII/13が2007年1月に8人の健康者，および2007年12月の集団発生1事例から，ノロウイルス GII/6が2006年12月に1名の散発例の患者から，ノロウイルス GII/7が2007年1月に6名の健康者から検出された（図4-A，図5，表1）．下水由来と，感染性胃腸炎および健康者由来のノロウイルスの塩基配列は，解析した領域で，GI/8が99.3～100%，GII/7が96.4～97.4%，GII/13が98.0～99.3%一致した．

サポウイルスは，感染性胃腸炎患者から GII/3と GIV/1が，2007年2月と2008年3月にそれぞれ検出された．健康者からは，検出されなかった（表1）．一方，下水流入水からは，GI/1が頻繁に検出され，2006年4月には GIV/1が検出された．GII/3は検出されなかった（図1）．このように，患者と健康者，および下水流入水からの検出状況は，異なっていた．

考　　察

下水流入水からは，ポリオウイルス，HEV-B，レオウイルス，アデノウイルス，ノロウイルス，サポウイルスなど，さまざまな腸管系ウイルスが検出された．これらのうちのほとんどは，ヒト（無菌性髄膜炎や感染性胃腸炎の患者や健康者）から検出されなかったが，一部，CoxB2やCoxB5，ノロウイルスGI/8，GII/4，GII/7，GII/13などは，ヒトからも検出された．特に，2006年7月以降，下水流入水から検出されたノロウイルスGII/4は，2006/2007シーズンの感染性胃腸炎患者から検出されたGII/4と塩基配列が一致し，その流行[21, 22, 24]をよく反映していると考えられた．しかしながら，感染性胃腸炎の流行時も，下水流入水からはGII/4以外にも多種類の遺伝子型が検出されていた．これらのうち，GII/7とGII/13は健康な乳幼児から，GII/4よりも多く検出されたため，不顕性感染が多かった可能性も考えられる．

HEV-Bは夏季に多く検出されるが，下水流入水からは，夏季のみならず冬季にも検出された．下水流入水から頻繁に検出されたCoxB5は，冬季においても，ヒトーヒト感染が継続していることが推定される．全国の無菌性髄膜炎患者から2006年と2007年にそれぞれ検出例の多かったエコーウイルス18型（Echo18）とEcho30[25, 26]は，県内の患者と健康者からは検出されなかったが，下水調査ではそれぞれの年に検出されたため，富山県においてもこれらのウイルスが侵淫していたのではないかと推測された．

下水流入水からのサポウイルス検出状況が，患者や健康者と一致しなかったのは，ヒトの検査件数が少なかったことが一因と考えられる．アデノウイルス，レオウイルスなどについても同様であり，症例数の少ないこれらのウイルスによる地域住民への感染と発症については，今後検討したい．

ポリオウイルスについては，今回の調査で検出された分離株は，すべてワクチン由来株であり，野生株はみられなかったため，野生株の侵入の可能性は低いと考えられた．しかしながら，これらのウイルスがポリオ流行地から侵入する可能性は否定できないため，伝播の監視は続ける必要があると考えられる．

今後は，県民のウイルス感染状況の実態をよりよく反映する調査となるように，感染症発生動向調査の検査数がさらに増えるように，工夫していく．

謝　　辞

本調査を実施するにあたり，検体採取等にご協力いただいた下水道処理施設，医療機関，厚生センター，保健所，保育所，その他関係各位に深謝いたします．

文　　献

1．White, D.O. and Fenner, F.J. (1996)．医学ウイルス学<第4版>（北村敬訳），p349-352　近代出版.
2．Hedberg, C.W. and Osterholm, M.T. (1993). Clin. Microbiol. Rev., 6, 199-210
3．国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課 (2000). 病原微生物検出情報月報, 21, 211-213
4．Chiba, S., Nakata, S., Numata-Kinoshita, K., Honma, S. (2000). J. Infect. Dis., 181, S303-308
5．Lewis, G.D. and Metcalf, T.G. (1988). Appl. Environ. Microbiol., 54, 1983-1988.
6．Matsuura, K., Hasegawa, S., Nakayama, T., Morita, O., Uetake, H. (1984). Microbiol. Immunol., 28, 575-588
7．Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K. (2002). J. Virol. Methods., 100, 107-114
8．Okada, M., Shinozaki, K., Ogawa, T., Kaiho, I. (2002). Arch. Virol., 147, 1445-1451
9．Balanant, J., Guillot, S., Candrea, A., Delpeyroux, F., Crainic, R. (1991). Virology, 184, 645-654
10. Rico-Hesse, R., Pallansch, M.A., Nottay, B.K., Kew, O.M. (1987). Virology, 160, 311-322
11. Food-borne viruses in Europe network report. (2008). Eurosurveillance, 13,
12. Gallimore, C.I., Iturriza-Gomara, M., Xerry, J., Adigwe, J., Gray, J.J. (2007). Arch. Virol., 152, 1295-1303
13. Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K.. (2004). J. Clin. Microbiol. 42, 2988-2995
14. Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T., Takeda, N. (2002). Virology, 299, 225-239
15. Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Lobue,

A.D., Cannon, J.L., Zheng, D.P., Vinje, J., Baric, R.S. (2008). PLoS Med., 5, e31, 0269-0290.
http://medicine.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pmed.0050031

16. Okada, M., Ogawa, T., Yoshizumi, H., Kubonoya, H., Shinozaki, K. (2007). Arch. Virol., 152, 2249-2252
17. Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R.J., Koopmans, M. (2007). J. Virol., 81, 9932-9941
18. Hansman, G.S., Oka, T., Katayama, K., Takeda, N. (2007). Rev. Med. Virol. 17: 133-141
19. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長 (2003). ノロウイルスの検出法について，食安監発第1105001号
20. Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K. (2003). J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557
21. 長谷川澄代，小原真弓，岩井雅恵，堀元栄詞，滝澤剛則，倉田毅 (2007). 富山県衛生研究所年報 (平成18年度)，30, 91-97
22. 小原真弓，長谷川澄代，岩井雅恵，堀元栄詞，滝澤剛則，倉田毅 (2007). 富山県衛生研究所年報 (平成18年度)，30, 98-104
23. HEV-B 夏季に多い
24. 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課 (2007). 病原微生物検出情報月報，28, 277-286
25. 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課 (2006). 病原微生物検出情報月報，27, 230-232, 254
26. 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課 (2007). 病原微生物検出情報月報，28, 338

平成20年12月１日

ウイルス性胃腸炎の集団発生事例について
（2007年度）

長谷川澄代　　小原真弓　　中村一哉　　岩井雅恵
堀元栄詞　　倉田　毅　　滝澤剛則

Outbreaks of Viral Gastroenteritis in Toyama Prefecture
in the Fiscal Year 2007

Sumiyo HASEGAWA, Mayumi OBARA, Kazuya NAMURA, Masae Iwai,
Eiji HORIMOTO, Takeshi KURATA and Takenori TAKIZAWA

要　旨　2007年4月から2008年3月までの1年間に検査したウイルス性の感染性胃腸炎の集団発生事例についてまとめた.

１．ウイルス性の急性胃腸炎の集団発生事例が２０件あった．これら全てがノロウイルス感染によるものであった.

２．発生施設別にみると飲食店(食堂，宿泊施設，民宿，旅館等)11件，保育園2件，病院1件，老人保健施設４件，公民館1件，家族内1件であった.

３．飲食店はカキの喫食によるものは無く，感染者からのノロウイルスで食品等が汚染されることによって発生したと考えられた.

４．保育園，老人保健施設等での発生は，手指が感染者の吐物や糞便で汚染されてヒトからヒトへ直接伝播したと考えられた.

５．20事例中19事例から検出されたノロウイルスは全てがGenogroupⅡ(GⅡ)であった．そのうち18事例がGⅡ/4で，1事例がGⅡ/13であった.

は　じ　め　に

ノロウイルス（Norovirus:NV）は，冬季に散発及び集団発生する感染性胃腸炎の主たる原因ウイルスであり，乳幼児から高齢者までの全年齢層に経口感染する［1］．NVは遺伝子解析により，GenogroupⅠ（GⅠ）とGenogroup Ⅱ（GⅡ）にわけられる．更に研究者によるが，Genogroup内でもいくつかの遺伝子型に分類される[2,3,4,5].

NVはヒトの小腸で増殖し，吐物や糞便中に排泄され，吐物には1gあたり10^3～10^6個，糞便には10^9個ものNVが含まれている［6］．NVは，感染者から2週間以上にわたり排泄され[7]，環境中でも長期間感染性を維持し，100個以下で感染・発病させるといわれている［8］．このため，感染者である調理従事者の手指を介して食品がNVで汚染され，急性胃腸炎の集団発生を引き起こすこともある［9］．ヒトから排泄されたNVは，海に入り，カキなどの2枚貝の中腸腺に蓄積される［10］．2枚貝を生あるいは不十分な加熱で喫食することによって起こる急性胃腸炎は，NVによる食品媒介事例の約40％を占めている［6］．一方，NVは食中毒のみならず，冬季に小児の間で散発，あるいは集団発生する感染性胃腸炎の流行も引き起こすことが知られている．しかしながら，冬季以外にもNV の流行が認められるようになっており[11]，富山県でも2004年には5,6月にNVが検出されるなど[12]，冬季以外にもNV の流行が認められるようになってきた[12，13].このように近年，本県ではウイルス性胃腸炎の集団発生が2003年度に10事例，2004年度には20事例，2005年度には17事例，2006年度には28事例と年々増加傾向にあり，それらの殆んどが，NVによるものである．そこで，原因ウイルスの特徴と発生傾向を把握するために，ウイルス性胃腸炎の集団発生事例の個別調査を実施した.

材料と方法

検査対象事例および検査材料

(1) 2007年4月～2008年3月までに調査した集団発生事例33事例を対象とした．検体採取と疫学的調査は各事例の管轄保健所，厚生センターで実施した．
(2) NV の検出方法，
糞便からの RNA 抽出法，RT-PCR 法，リアルタイム PCR 法については，厚生労働省通知［14］に準じて行った．PCR 産物の一部は，ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定した［13］．

結果および考察

感染性胃腸炎の集団発生33事例のうち，20事例からウイルスが検出された（表1）．本年はカキ関連の事例はなかった．

1．施設別発生事例数（図1）

飲食店・宿泊施設等での発生は，月別にみると5月に1件，12月に5件，1月に4件であった．老人保健施設等での発生は，11月に1件，1月に2件，3月に1件であった．病院は11月に1件,保育園は11月,12月に各1件であった．他に公民館で4月に1件，家族内が11月に1件であった．

2．月別発生事例数（図2）

平成16年度～19年度の月別発生状況を示したのが図1-2である．本年度の集団発生は4，5，11，12，1，3月に発生し，12，1月に各6件と最多であった．4年間の各年の発生状況を見ると，平成16,17，年度は,1月にピークが見られ，19年度は12月，1月にピークがあった．しかし，18年度は他の年と比べ1～2ヶ月早い11月に他の年の倍近くのピークが見られた．

3．施設別発生状況とウイルス検出状況

1）飲食店等（10事例）

事例 №1，3：事例 №1は旅館の利用者52名（3月27日）中14名が，28～30日に嘔吐，下痢，発熱の症状を呈した．従業員2名（調理人含む）の糞便を検査し，従業員1名からNVGⅡを検出した．患者は全て県外であったが，問い合わせで，NVGⅡであることが判った．

事例 №3はスポーツ大会（5月3～5日）に参加した新潟県，長野県，石川県の学生が5月2～4日にかけて旅館（事例№1と同じ）を利用し，5月4日の夕食後に嘔吐，吐気，下痢，発熱等の症状を呈し医療機関を受診した．27名中14名が発症していた．従業員（調理人含む）2名の糞便からはウイルスは検出されなかった．他県での検査で，患者からはNVGⅡ/4が検出された．この旅館を利用する以前に胃腸炎症状を呈していた患者の存在が認められ，当該旅館が感染拡大の場となったと推定された．

事例 №9：12月1日の披露宴に出席した65名中31名が12月4日に下痢，嘔吐の食中毒症状を呈した．患者14名，関係従業員（仕出し屋「A」4名，仕出し屋「B」4名）の糞便を採取したところ，患者13名，仕出し屋「A」従業員3名，仕出し屋「B」従業員3名からNVGⅡ/4が検出された．「鱒の寿司」は仕出し屋「B」から仕入れており，結婚式の参加者以外にも食べて発症した者がいたことから原因食とされた．「鱒の寿司」について検査を行いNVを検出した．「鱒の寿司」と患者からの検出ウイルスの塩基配列は一致した．仕出し屋「B」の従業員1名が11月30日に下痢症状を呈し，その2，3日後に他の2名も発症していた事がわかった．本事例は従業員が，食品（鱒寿司）を汚染させたことにより発生したと考えられた．

NVが検出された仕出し屋「A」の従業員3名は12月1日に「鱒の寿司」を食べており，不顕性感染者であった．

事例 №10,17：無症状の従業員（調理人等）が食品を汚染することにより起きたと考えられた．

事例 №12：12月15日(土)～16日(日)に宿泊利用した1グループ33名中15名が12月17日に腹痛，下痢，嘔吐の食中毒症状を呈した．患者6名，従業員6名（調理人4名，接客係2名）の糞便を検査したところ，患者5名，接客係1名からNVを検出し，これ等の塩基配列は一致した．同時期に利用した他の2グループでは患者の発生が無かったことから，接客係が感染源と考えられた．

事例 №13：12月24日昼から25日朝にかけて宿泊利用した98名中52名が25日～26日に下痢，嘔吐等の食中毒症状を呈した．患者6名中5名からNVが検出された．更に当該施設従業員内でも有症者がおり，有症の従業員12名中10名，無症状従業員13名中6名からNVが検出された．これら検出NVの塩基配列は一致した．12月24日に発症した従業員1名がいたことからこの従業員が感染源と考えられた．

事例 №11,14,15,16：は従業員が食品(弁当)を汚染することにより発生した事例である．

事例 №11は無症状の従業員が感染源で，他の従業員と弁当喫食者に感染を拡げたと考えられた．

事例 №14は1月8日昼に弁当を食べた25名中16名が9～12日に腹痛，嘔吐，下痢の食中毒症状を呈した．喫食者15名（患者9名，無症状者6名），当該飲食店の従業員6名（調理人3名含む）の糞便を検査した．患者8名，無症状の喫食者3名，従業員（調理人）1名からNVGⅡ/4を検出した．これらNVの塩基配列は一致した．NV陽性の従業員も弁当喫食者の患者とほぼ同時期に発症していたこと，従業員の0歳の子供が1月6

表１．ウイルス性胃腸炎発生事例

事例番号	発生時期	発生地区・状況 （患者数/喫食者数）	ウイルス検出			推定 伝播経路
				検出数／検査数	NV 遺伝子型	
1	2007年3月28日 ～3月30日	旅館 14／52	従業員	1／2	GⅡ	食品
2	4月30日 ～5月1日	公民館（祝勝会） 45／59	患者 従業員	6／8 0／15	GⅡ/4	ヒト-ヒト
3	5月4日 ～5日	旅館 27／67	宿泊者持込 従業員	0／2	GⅡ/4 （他県で検出）	ヒト-ヒト
4	11月29日 ～12月1日	家族内 4人家族	患者（1人）	糞便 1／1 吐物 1／1	GⅡ/4	ヒトーヒト
5	11月28日 ～12月11日	病院 8階南病棟	患者 （職員持込）	4／4	GⅡ/4	ヒトーヒト
6	11月23日 ～12月3日	老人保健施設（80） 27	患者（5人）	糞便 4／5 吐物 1／1	GⅡ/4	ヒトーヒト
7	11月30日 ～12月5日	保育園（福野） 59	患者 調理人	6／7 0／3	GⅡ/4	ヒトーヒト
8	12月2日 ～12月5日	保育園（城端） 34	患者 職員 調理人	2／2 1／1 0／5	GⅡ/13	ヒトーヒト
9	12月3日 ～4日	結婚式披露宴会場 31／65	患者 従業員（飲食店） 従業員（すし屋） 食品（ます寿司）	13／14 3／14 3／4 1／1	GⅡ/4	食品
10	12月10日 ～11日	民宿 29／85	患者 従業員	12／15 7／14	GⅡ/4	食品
11	12月6日 ～12日	弁当屋 32／73	患者（13人） 従業員	糞便11／11 吐物 1／2 2／5	GⅡ/4	食品
12	12月17日	宿泊施設 （1グループ） 15／54	患者 調理人消防学校 宿泊施設従業員	5／6 0／3 1／6	GⅡ/4	食品
13	12月24日 ～26日	宿泊施設 52／98	患者 従業員	5／6 16／25	GⅡ/4	食品
14	2008年1月9日 ～10日	飲食店（弁当） 16／29	患者 喫食者（無症状） 健常者 従業員	7／9 3／6 0／3 1／6	GⅡ/4	食品
15	1月8日 ～9日	飲食店（おせち） 31／51	患者 従業員	5／7 4／5	GⅡ/4	食品
16	1月8日 ～10日	飲食店（弁当） 58／115	患者 従業員	13／14 2／3	GⅡ/4	食品
17	1月14日 ～15日	宿泊施設 3／31	患者 患者家族 従業員	2／3 0／1 4／7	GⅡ/4	食品
18	1月16日 ～21日	老人保健施設（44） 15	患者 職員	7／7 0／7	GⅡ/4	ヒトーヒト
19	1月21日 ～22日	老人保健施設（48） 14	患者 職員	4／4 1／7	GⅡ/4	ヒトーヒト
20	3月2日 ～6日	老人保健施設（18） 9	患者 （職員含む）	4／4	GⅡ/4	ヒトーヒト

GⅡはNVGⅡを表す.

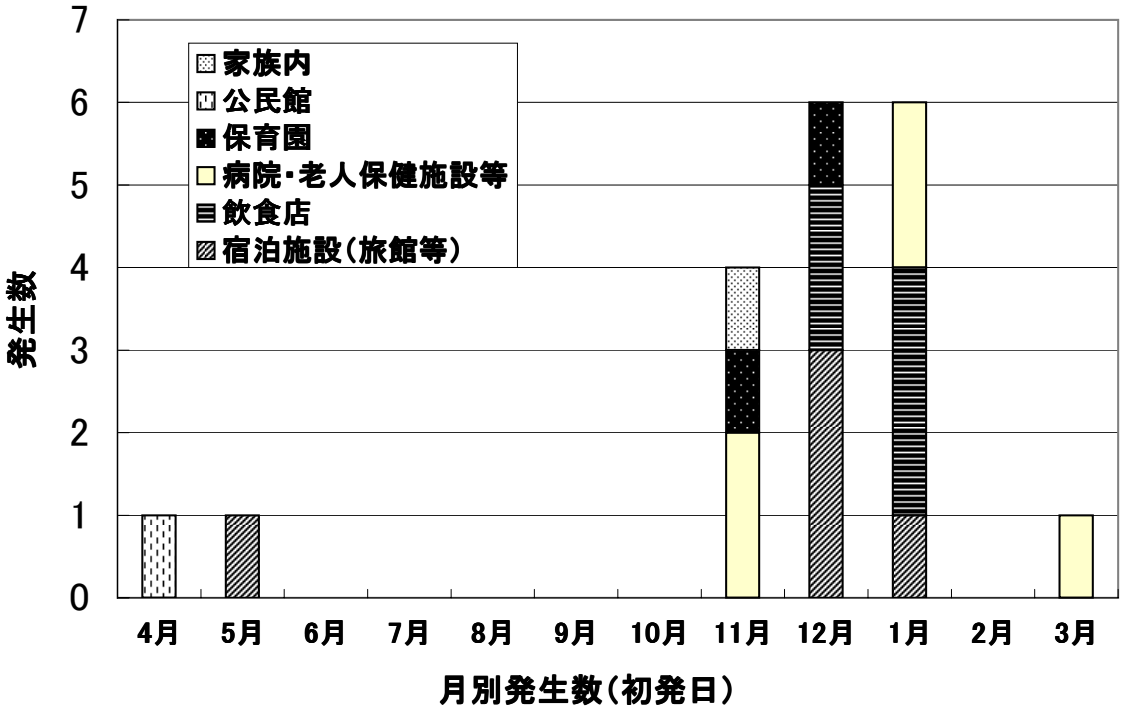


図１．ウイルス性胃腸炎集団発生（平成19年度）

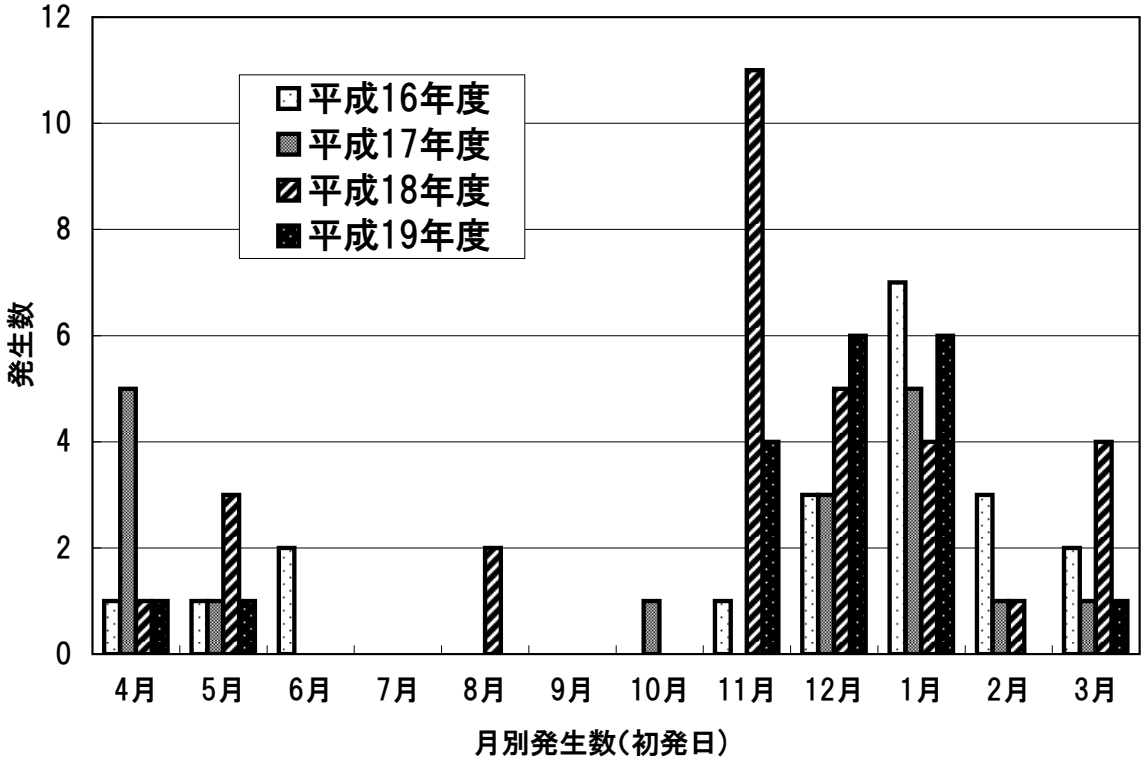


図２．ウイルス性胃腸炎集団発生（平成16～19年度）

日に発症していたことから，従業員の子供が，感染源と考えられた．この事例ではNVで汚染された弁当を食べて感染しても発症しない不顕性感染者がいた．事例№15,16はそれぞれ1月7日におせち料理や持ち帰り弁当を食べて発生した事例である．無症状の従業員が食品を汚染させることにより起きたと考えられた．

２）老人保健施設(4事例)，病院（1事例）

事例№6，18，19，20：病院，老人保健施設での発生である．殆んどの事例で入所者と職員が発生していた．事例ごとに発生期間と患者発生を表すと，№5は11月28日～12月11日（14日間）に13名，№6は11月23日～12月5日（11日間）に27名，№18は1月16日～21日（6日間）に15名，№.19は1月２１日～22日（2日間）に14名，№20は3月2日～6日（5日間）に9名であった．これ等患者糞便からNVGⅡが検出され，事例ごとにそれぞれ塩基配列は一致した．

事例№5，6，19，20では，初発患者からヒトーヒト感染で感染が拡がったと考えられた．

事例№18は老人保健施設での発生で，患者と無症状の調理人1名からNVが検出された．１月21日の17時頃に3名の患者が発生し，22日13時には有症者が14名になった．患者4名，調理人7名の糞便を検査したところ，患者4名，調理人1名からNVGⅡ/4を検出し，これらの塩基配列は一致した．1月20日に当該施設の1階食堂前の廊下や共同トイレが吐物等によって汚染されていたこと，隣接するデーサービス「T」には，月～金曜日に当該施設の昼食が提供されており，「T」利用者の中で1月21～22日に有症者がいたことから当該施設の共同トイレの使用者である入居者や調理人にNVの感染が起き，さらにNV感染の調理人が食品を汚染させることによる感染も起きたと考えられた．

３）保育園（2事例）

事例№７，８：両事例は殆んど同時期に発生した．

事例№７は12月5日現在までに，Ｆ保育園（入所者118名，職員25名）の入所者54名，職員5名が，下痢，吐気，嘔吐，発熱等の胃腸炎症状を呈した．患者7名中6名からNVGⅡ/４が検出され，塩基配列は一致した．1名の園児(感染性胃腸炎で11月26～29日休み)が30日に登園し3回下痢をした．その後，12月1日から，患者（職員含む）が増加していたことから1名の患児から，ヒトーヒト感染で拡がったと考えられた．

事例№8はＳ保育園（入所者281名，職員45名）で12月1日（土），2日（日）と3回に分けて生活発表会がおこなわれ，12月2日に14名の園児が胃腸炎症状を呈した．12月5日現在で，患者は，累計34名になった．患者2名，職員（調理人5名，園長）6名の糞便を検査したところ，患者2名と園長からNVGⅡ/13を検出し，塩基配列は一致した．11月30日以前には，患者がいなかったこと，　NV陽性の職員が無症状であったことから，この無症状の職員から学習発表会の場で接触等により感染拡大したと考えられた．

４）公民館（1事例），家族内（1事例）

事例№2：は公民館で4月29日（日），午後（16時30分～17時30分）少年野球部の関係者（子供，父兄）が祝勝会を行なった．4月30日～5月1日に関係者59名中45名が下痢，嘔吐の症状を訴えた．患者8名と，公民館に食品を搬入した「C」店の従業員3名，「D」店の従業員12名の糞便を採取し検査を行ったところ患者6名からNVGⅡ/4が検出された．しかし，飲食店の従業員からは全く検出されなかった．NVが検出された患者の中で，祝勝会当日の18時ごろに下痢をしている子供がいたことから，このNV感染者の子供から感染が拡がったと考えられた．

事例№4：は家族内で11月29日から～12月1日までに初発患者から接触感染で次々と感染が拡がった事例であった．

４．無症状者からのウイルス検出

発生事例の中で，従業員等の検査を行ったところ，無症状者からNVが検出された（表2）．推定感染経路「ヒトーヒト」6事例（№2，3，7，8,18,19）では39人中3名（7.7%）からNVが検出された．一方，推定感染経路「食品の2次汚染」10事例（№1，9～17）では84人中31人（36.１%）からNVが検出された．このことから食品の2次汚染による事例の無症状者の3割以上がNVに感染していることがわかった．食品などを取り扱う飲食関係の従業員等は，自己の健康管理と施設内作業場等の衛生管理が重要と考えられた．

表２．無症状者からのウイルス検出（平成19年度）

推定感染経路	検査事例	ウイルス検査陽性数/検査数	ＮＶ検出率
ヒトーヒト感染10事例	6件	3/ 39	7.7%
食品２次汚染10事例	10件	31/ 86	36.1%
合　計	16件	34/125	27.2%

５．検出ウイルスの遺伝子解析

2007年度集団発生事例20事例のうち19事例からNVが検出され，全てがNVGⅡであった．これ等集団発生事例19事例のうち検体について塩基配列が得られた

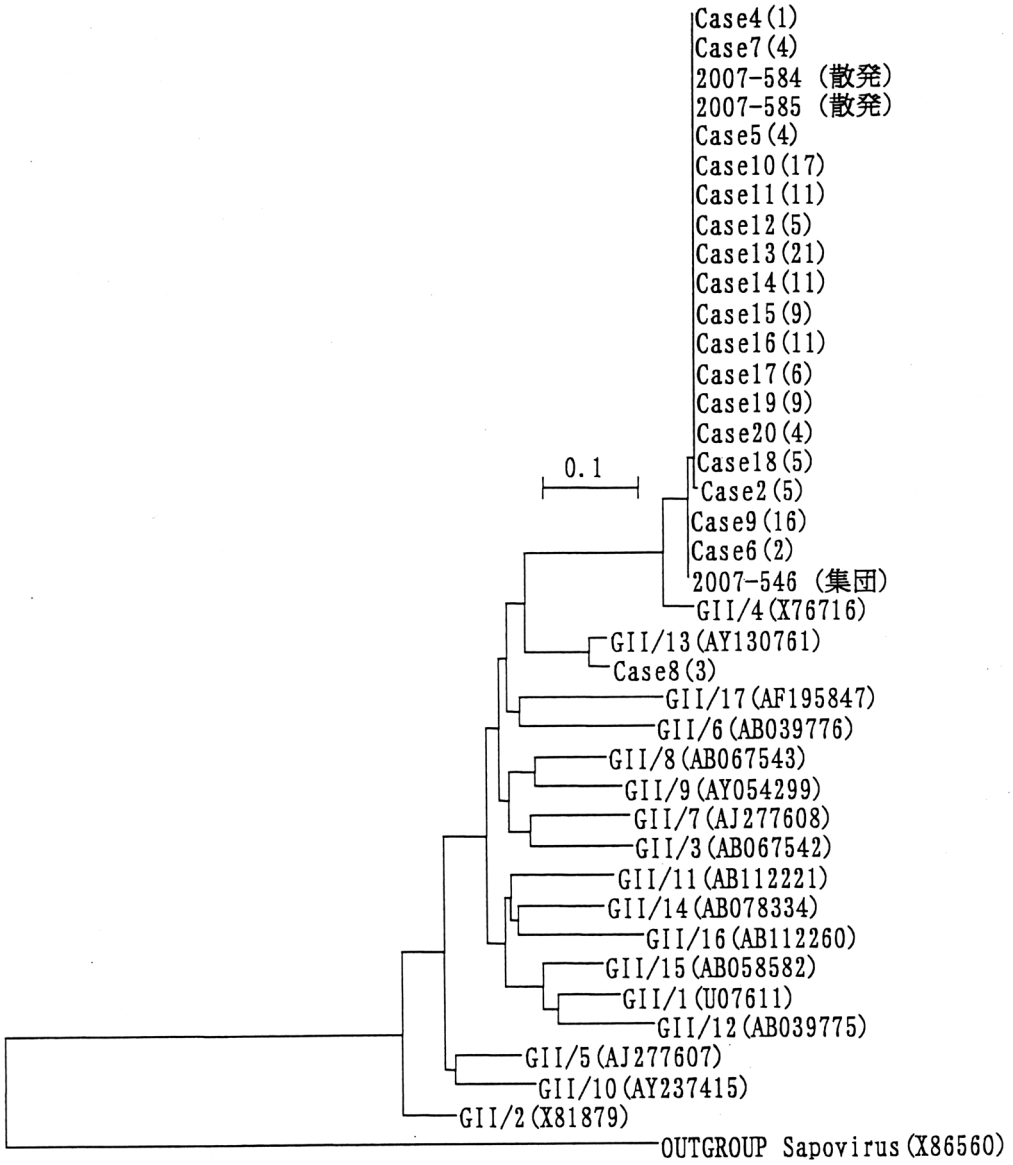


図３．2007年度に検出されたノロウイルスＧⅡの系統樹

集団発生事例の検体は「事例番号(検体数)」，散発例及びノロウイルスが原因ではないと考えられた集団発生事例で得られた検体は「年-検体番号」で示す．参考株については「遺伝子型(accession №)」で示す．

ものは18事例であった．そのうち17事例では同一事例内で2検体以上の増幅領域が一致した．得られた遺伝子配列は18種類で，2つのクラスターに分けられた．ＧⅡ/４が17事例あり，ＧⅡ/13が1事例であった（図３）．図には，NVが原因とは考えられない食中毒の集団発生例からの1例と散発例2例についても記載したが，昨年（2006年）度と同じく，ＧⅡ/4型が流行していたことが分かった．全国的に見てもＧⅡ/4が主流を占めていた．

本年は昨年度と同様に飲食店等での発生は，NVに感染した調理人等による食品の二次汚染によるものであった．

NVの集団発生は冬季に多発するが，本年度は飲食店，公民館，家族内，宿泊施設等では，4月，5月11月，12月，1月に発生があり，ほぼ年間を通して発生していた．保育園，老人保健施設，病院，保育園では11月，12月，1月，3月に発生していた．特に2次感染を起こしやすい施設では，冬以外にも充分な注意が必要と考えられた．

富山県感染症発生動向調査によれば，本年度も一昨年•昨年同様に感染性胃腸炎の患者の報告数は多く，第1位を占めていた．また，これらの発生は感染性胃腸炎が多発していた時期と一致していた．

我々は，昨年[13]調理人などが，NV に感染しても発症しない場合や，発症後に回復した場合でも長い人で2ヶ月近く糞便中にウイルスを排泄していることを確認した．小野らは，学校給食従事者(健康者)の糞便を検査し，NV の遺伝子が，年間を通じて4.7％の割合で検出されることを報告している［15］．我々は，感染経路が食品の2次汚染によると考えられる事例などで，全く症状が無い従業員等の3割以上の糞便からも NV を検出した．この等のことから NV に感染した場合は，発症あるいは発症しなくても，長期にわたりウイルスを糞便中に排泄し続け，感染源となりうる可能性が十分にあることを示唆している．これからも感染症発生動向調査情報により患者発生状況を監視し，食中毒と感染症の両方の観点から事例ごとの個別調査研究を積み重ねていくことが重要と考えられた．

謝　　辞

検体採取等にご協力いただきました富山市保健所，高岡厚生センター，高岡厚生センター氷見支所，高岡厚生センター射水支所，中部厚生センター，新川厚生センター，新川厚生センター魚津支所，砺波厚生センター，砺波厚生センター小矢部支所の関係者各位に感謝します．

文　　献

１．食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究斑：国立予防衛生研究所(1995).
２．Ando, T., Noel, JS., Fankhauser, RL.(2000). J. Infect. Dis., 181,S336-348
３．Kawamoto ,H., Yamazaki, K., Utagawa, E., Ohyama, T., (2001). J. Med. Virol.,64,569-576
４．Katayama, K., Sirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama. T., T., Oka, T.,Hoshino. F., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida. K., Suzuki, Y., Gojobori, T., Takeda, N.,(2002) Virology, 299, 225-223
５．Vinje, J., Green, J., Lewis, DC., Gallimore, Cl., Brown, DW., Koopmans, MP. (2000). Arch. Virol., 145, 223-241
６．西尾 治，新川奈緒美(2002). 日本医事新報，4105，6‐9.
７．杉枝正明，新川奈緒美，大瀬戸光明，徳竹由美，山口 卓，秋山美穂，西尾 治(2004). 臨床とウイルス，32，(3)，189‐194.
８．Glass, R. I. , Noel, J. , Ando, T. , Fankhauser, R. , Belliot, G. , Mounts, A. , Parashar, U. D. , Bress,J.S.,Monroe,S.S.(2000). J. Infect. Dis. 2, S254, 181.
９．長谷川澄代，小原真弓，岩井雅恵，松浦久美子，安藤秀二，永井美之（2004）．富山衛研年報，27，106－111.
10. 染谷雄一（2000）ウイルス，50，(2)，173.
11. 2005年病原微生物検出情報，月報，12，1－2.
12. 長谷川澄代，小原真弓,岩井雅恵，松浦久美子，堀元栄詞，永井美之（2005）．富山衛研年報，28，93－98
13. 小原真弓，長谷川澄代，岩井雅恵，堀元栄詞，滝澤剛則，倉田　毅（2007）．富山衛研年報，30，98－104.
14. 厚生労働省医薬食品局食品案全部監視安全課長（2003）食安監初115001号.
15. 小野哲郎，小河正雄，塚本伸哉 (2000). 大分県衛生環境研究センター年報，21‐23.

環境中のノロウイルスの遺伝的多様性

中村一哉　岩井雅恵　張　潔[1]　小原真弓　長谷川澄代
堀元栄詞　倉田　毅　滝澤剛則

Genetic Diversity of Noroviruses Harboring in the Environment

Kazuya NAKAMURA, Masae IWAI, Jie ZHANG[1], Mayumi OBARA,
Sumiyo HASEGAWA, Eiji HORIMOTO, Takeshi KURATA
and Takenori TAKIZAWA

要　旨　環境中のノロウイルスの遺伝的多様性を下水処理場の流入水、富山湾で採取されたイワガキ、および集団感染事例から検出されるノロウイルスを材料に調査した。流入下水からは、一年を通じてGI群、GII群ノロウイルスが検出された。ヒトでの発症例が増加する冬期間では、主にGII/4遺伝子型が検出されるものの、春から夏にかけては、様々な遺伝子型が検出される傾向にあった。GI群では、2000年に初出したWUG1型組換え株が比較的高い頻度で検出されており、このタイプの株が現在も環境中で維持されていることが示された。GI群、GII群共に新しい遺伝子型や組換え型の株が検出されており、ノロウイルスが変化を続けていることが示唆された。下水処理水が流れ込む海域で採取されたイワガキからはウイルスは検出されず、この海域のノロウイルスによる汚染の程度は低いものと考えられた。2007-2008シーズンのノロウイルス集団感染・発生事例の原因株について解析を行った結果、下水からの検出状況とは異なり、保育園で発生したGII/13型を原因とする１事例を除き、すべてをGII/4型が占めていた。GII/13型が原因となった事例では、不顕性感染の職員から保育園の園児に広まった経緯が推定されており、GII/13型が大人では不顕性感染を起こしやすい株である可能性が想起された。以上の結果を踏まえて、流入下水や臨床例を対象にした調査を引き続き行っていくとともに、不顕性感染の実態を把握するために、健常者検便サンプルを対象にした調査を進めていく予定である.

生活廃水が流入する下水中には，ヒトやペットから排泄されたウイルスが多く含まれており，生活環境中に循環しているウイルスを調査する材料として至適である．ノロウイルスは感染者の糞便中に排泄されるウイルスとして代表的なものであり，下水流入水中にも環境での分布状況を反映しながら存在していると思われる[1, 2]．また，近年ノロウイルスの不顕性感染が着目されているが，生活廃水中には顕性・不顕性に関わらず感染者から排泄されたウイルスが存在していると考えられ，より網羅的な調査を行う対象として期待できる．今回，下水処理場への流入下水を材料に，検出されるノロウイルスについて遺伝学的解析を行い，環境中のノロウイルスの変遷を追った．また，下水処理水が流れ込む海域のイワガキ汚染状況，県内で発生したノロウイルス集団感染事例についても検討し，流入下水中のノロウイルスの存在様式との比較考察を行った．

材料と方法

1　下水採取と濃縮処理

2007年１月から12月の月毎に採取した富山県西部地域の下水処理場への流入下水を調査対象とした．採取した下水のうち１リットルを3,000rpmで30分遠心し，夾雑物を取り除いた上清に最終濃度0.05Mになるように塩化マグネシウムを添加し，0.5規定の塩酸を用いてpH3.5に調整した．前処理後検体を陰電荷膜にろ過吸着させ，この陰電荷膜を3% beef extract 液10mlに浸漬し，超音波処理により吸着分子を溶出した．溶出液を再度遠心後，回収される上清を１００倍濃縮下水検体とした[3]．上記の方法とは別にPEG沈殿法[4]による濃縮操作により２５０倍濃縮下水検体も調整した．

濃縮下水検体からQIAamp Viral RNA Kitを用いてRNAを抽出し，以降の実験に供した．

１．中国遼寧省CDC

２　RT-PCR と増幅産物クローニングおよび塩基配列解析

抽出した RNA について，DNase 処理を行った後，SuperscriptIII 逆転写酵素とランダムヘキサマーを用いて cDNA 合成を行った．ノロウイルスの検出は厚生労働省通知[5]に記載されているプライマー，G1SKF/R または G2SKF/R を用いた PCR 法で行い，増幅産物については塩基配列解析により特異性の確認および遺伝子型の決定を行った．また，ポリメラーゼ遺伝子の高度に保存された領域上でプライマー，1421f および1364f[6]を作製し，GI 群については，1421f または1364f と G1SKR を組み合わせた semi-nested PCR 法で，GII 群については，1421f と NV2oR，1364f と G2SKR それぞれのプライマーペアを用いた nested-PCR 法によって，ポリメラーゼ遺伝子の3'側からカプシド遺伝子の5'側にかけての増幅を試みた．増幅された PCR 産物は pGEM-T ベクターにクローニング後，塩基配列を決定した．決定された塩基配列を用いて，ポリメラーゼ遺伝子3'側領域とカプシド遺伝子5'側領域それぞれについて系統樹解析を行い，得られた系統樹のパターンから組換え型株の存在についての検討も行った．

３　イワガキからのノロウイルス検出

2007年3月から8月にかけて採取された富山湾西部に生息するイワガキを材料とした．中腸腺摘出・乳剤作製から RT-PCR 法によるノロウイルス遺伝子検出に至る一連の実験は，厚生労働省通知[5]に従って行った．

４　集団感染事例

2007年4月から2008年1月にかけて県内で発生した集団発生例の原因株について塩基配列解析を行い，遺伝子型を決定した．患者糞便の処理，RT-PCR 法によるノロウイルス遺伝子の増幅は厚生労働省通知[5]に従って行った．

結　　果

調査期間中，6月と12月を除いた各月の下水中から GI 群ノロウイルスが検出された．使用したプライマーによって検出感度や検出されやすい遺伝子型に相違が認められ，従来のプライマーを用いた PCR 法では GI/4が検出されやすい傾向にあった（表１）．系統樹解析により組換え株の存在について検討を行った結果，GI/2型ポリメラーゼ遺伝子と GI/6型カプシド遺伝子からなる WUG１型組換え株[7]が高い頻度で検出された（図１，表１）．また，2月と3月には，従来報告されている遺伝子型のいずれともクラスターを形成しない未分類型（SW0702-7，SW0702-11，SW0703-10）が検出された（図１）．

GII 群ノロウイルスは，調査を実施した期間中，毎月検出された．ヒトでの発症例が増加する冬期間においては，GII/4が支配的に検出された．それ以外の時期には，GII/4以外の遺伝子型も検出される傾向にあった．5月から7月にかけて GII/3や GII/6が検出されて

表１．流入下水から検出されたノロウイルスの遺伝子型（2007年）

	１月	２月	３月	４月	５月	６月
ＧＩ	WUG1型 （4型）	4型 未分類型	WUG1型 未分類型	ND （4型） （14型）	WUG1型	ND
ＧⅡ	4型 6型	4型	13型 （4型）	4型	6型	4型 （3型）

	７月	８月	９月	10月	11月	12月
ＧＩ	ND （4型）	WUG1型 （4型）	ND （4型）	ND	ND （4型）	ND （4型）
ＧⅡ	4型 （3型）	4型 （3型）	13（組換え）型	4型	4型	4型

（ ）：従来のプライマーを用いて検出された遺伝子型，参考：本年報、岩井らの稿
ND：未検出

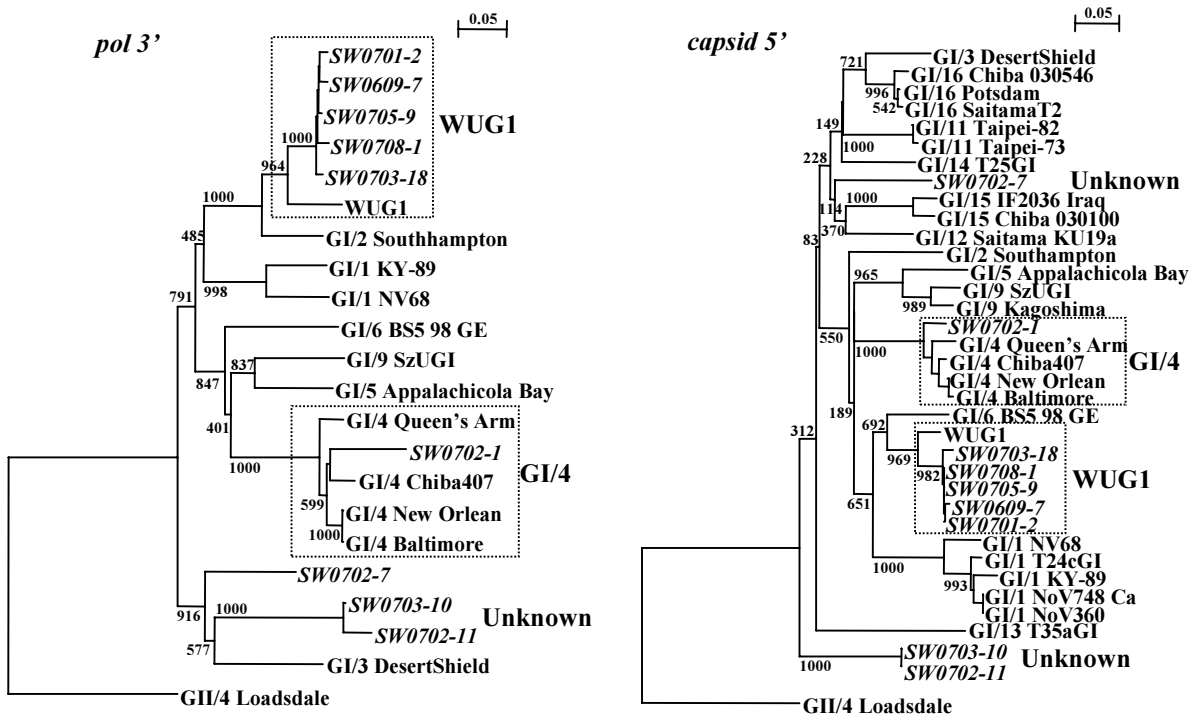


図１．下水から検出されたＧＩ群ノロウイルスの系統樹解析

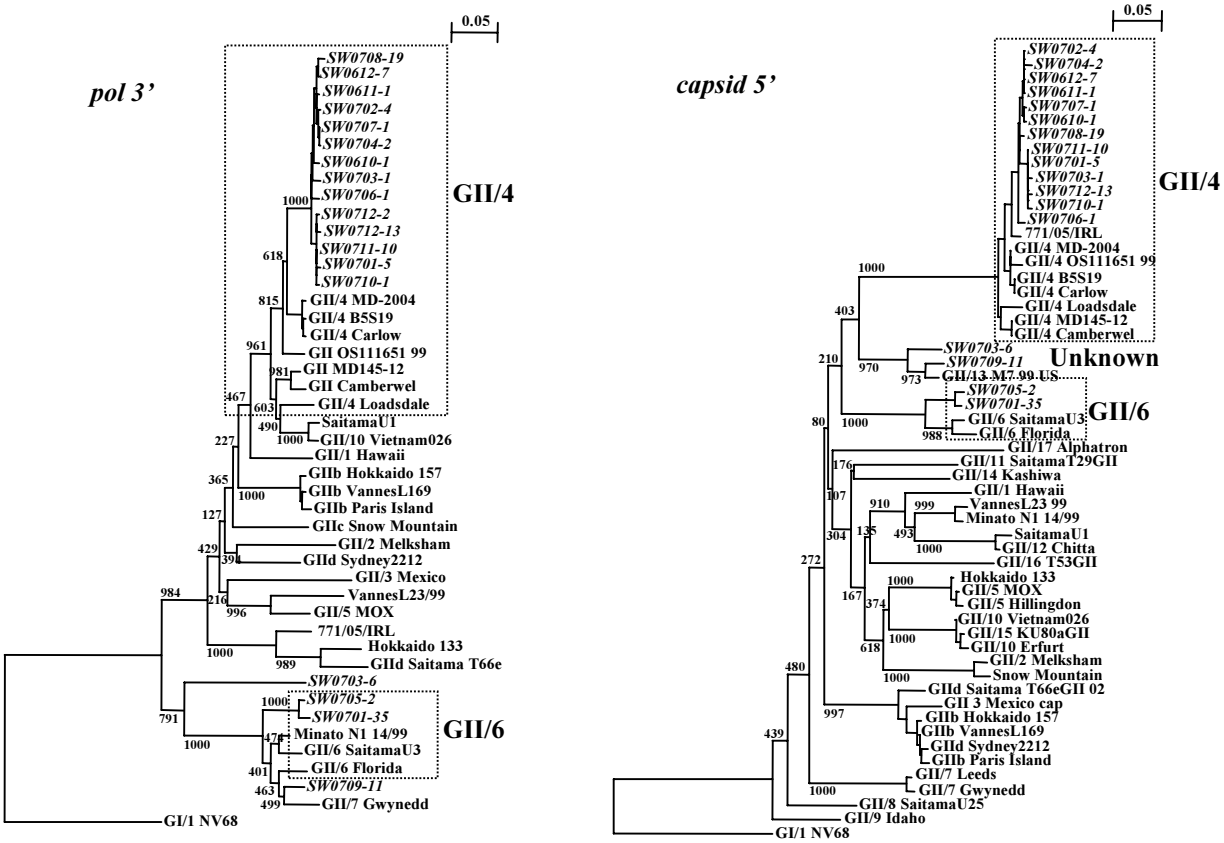


図２．下水から検出されたＧII群ノロウイルスの系統樹解析

表２．イワガキからのノロウイルス検出状況（2007年3月－8月）

	３月	４月	５月１回目	５月２回目	６月１回目	６月２回目	７月	８月
ＧＩ	$<10^1$	ND	ND	ND	$<10^1$	$<10^1$	ND	ND
ＧⅡ	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	ND	$<10^1$	$<10^1$	ND	$<10^1$

表３．富山県内で発生した集団感染事例の原因ウイルスの遺伝子型

発生時期	発生場所	伝播経路	検出遺伝子型
2007年4～5月	公民館	ヒト－ヒト	GII/4 2006b 初期型
2007年　12月	老人保健施設	ヒト－ヒト	GII/4 2006b 初期型
	保育園	ヒト－ヒト	GII/4 2006b 初期型
	保育園	ヒト－ヒト	GII/13 組換え型
	結婚式場	食品	GII/4 2006b 初期型
	病院	ヒト－ヒト	GII/4 2006b 初期型
	宿泊施設	食品	GII/4 2006b 初期型
	食品提供施設（弁当）	食品	GII/4 2006b 初期型
	宿泊施設	食品	GII/4 2006b 初期型
	宿泊施設	食品	GII/4 2006b 初期型
2008年　1月	飲食店（弁当）	食品	GII/4 2006b 初期型
	飲食店（弁当）	食品	GII/4 2006b 初期型
	宿泊施設（弁当）	食品	GII/4 2006b 初期型
	宿泊施設	食品	GII/4 2006b 初期型
	老人保健施設	ヒト－ヒト	GII/4 2006b 初期型
	老人保健施設	ヒト－ヒト	GII/4 2006b 初期型

参考：本年報、長谷川らの稿

おり，3月と9月にはGII/13が検出された（表１）．特に9月に検出されたGII/13（SW0709-11）はポリメラーゼ遺伝子塩基配列に基づく系統樹ではGII/7とクラスターを形成しており，新しいタイプの組換え株であると考えられた．

下水処理場所在地に隣接した海域のイワガキのノロウイルス保有状況を検査した結果，ウイルスは未検出であるか，10コピー/個未満であり，汚染進行は観察されなかった（表２）．

2007年4月から2008年1月にかけて，県内で発生した集団感染事例の原因株について遺伝子型を検討した結果，2007年12月に保育園で発生した１例がGII/13を原因とする以外は，すべてGII/4（2006b 初期型）であった（表３）．このGII/13が組換え型であるか検討したところ，下水中から9月に検出された株に似たGII/7由来ポリメラーゼ遺伝子を持つ組換え型であった．

考　　察

生活廃水中には様々な遺伝子型のノロウイルスが存在し，発症例で報告される検出状況とは異なる態様を示していた．GI群では2000年に初出したWUG1型組換え株が高い頻度で検出されており，このタイプの組換え型ウイルスが現在も環境中に維持されているものと考えられた．また，既知遺伝子型の参照株いずれともクラスターを形成しない未分類の株も検出されており，GI群ノロウイルスが変化を続けている可能性が示された．GII群ノロウイルスでは，検出される遺伝子型の季節との関連性が注目された．冬期間にGII/4が支配的に検出されるのは，GII/4による感染性胃腸炎が流行することに伴う，生活排水中へのGII/4ウイルス排泄量の増加が背景にあると考えられる．冬以外の時期には，GII/4の流行が終息し生活廃水中へのウイルス排泄量が減少した結果，比較的低い割合で環境中に維持されていた遺伝子型も検出されるものと推察された．GII群ノロウイルスの組換え株の探索によりポリメラーゼ遺伝子がGII/7，カプシド遺伝子がGII/13からなる新規の組換え型が検出された．GII群では組換え株の存在が多く報告されており，ノロウイルスが組換えを起こす意義について，さらなる疫学的，

分子生物学的な解析が求められる．

流入下水中には多くのノロウイルスが存在することが明らかとなり，下水処理によるこれらノロウイルスの浄化効率を検討することが今後の課題である．今回，下水処理水が流れ込む海域に生息するイワガキを対象にノロウイルスの汚染状況を調査し，下水処理水中のノロウイルスによる環境水汚染を間接的に評価することを試みた．今回の調査では，対象となったイワガキにノロウイルス汚染は確認されなかった．イワガキは水通しの良い岩場に生息しており，このことがイワガキへのウイルス蓄積量に影響を与えている可能性も想定される．しかし，現時点でのこの海域のノロウイルスによる汚染の程度は低いものと考えられ，下水処理により，流入下水に含まれるノロウイルスは相応に浄化されているものと推察された．

下水中に検出されるノロウイルスの多様性に比べ，集団発生事例の原因になったウイルスはGII/4に偏る傾向が観察された．他の遺伝子型はヒトでの発症例から報告される頻度は相当に低く，これらが環境中でどのように維持されているのか解明が望まれる．今季の集団発生事例にはGII/13を原因とした1例が存在した．この事例は，保育園で園児たちが集団で下痢を発症したことで探知されたものであるが，一連の調査により，全く症状を呈しない不顕性感染者の職員が感染源となった可能性が考えられた．現時点では症例が少なく明言はできないものの，GII/13が成人では不顕性感染を起こしやすい可能性を示している．今回の症例以外にも不顕性感染でノロウイルスを保持しているケースは相当数あると予想される．健常者便を対象にしたノロウイルス調査を実施することで，不顕性感染の実態を把握することができるものと期待される．さらに，より広範囲な宿主の調査を実施することで，流入下水から特徴的に検出される遺伝子型の由来に関して有用な知見が得られるものと思われる．

謝　　辞

本調査を実施するにあたり，検体採取等にご協力いただいた下水道処理施設，厚生センター，その他関係各位に深謝いたします．

文　　献

1．da Silva, A.K., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M. and Le Guyader, F.S. (2007). Appl. Environ. Microbiol. 73: 7891-7897.

2．Lodder, W.J. and de Roda Husman, A.M. (2005). Appl. Environ. Microbiol. 71: 1453-1461.

3．Matsuura, K., Hasegawa, S., Nakayama, T., Morita, O. and Uetake, H. (1984). Microbiol. Immunol. 28: 575-588.

4．Lewis, G.D. and Metcalf, T.G. (1988). Appl. Environ. Microbiol. 54: 1983-1988.

5．厚生労働省医薬食品局食品案全部監視安全課長 (2003) 食安監初115001号

6．La Rosa, G., Fontana, S., Di Grazia, A., Iaconelli, M., Pourshaban, M. and Muscillo, M. (2007). Appl. Environ. Microbiol. 73: 4152-4161.

7．Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F.B., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T and Takeda, N. (2002). Virology 299: 225-239.

平成20年12月１日

改良 RFLP 法による結核菌の分子疫学的解析

清水美和子　磯部順子　木全恵子　嶋　智子　金谷潤一　倉田　毅　綿引正則

Molecular Epidemiological Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by an Improved Restriction Fragment Length Polymorphism（RFLP）Method

Miwako SHIMIZU，Junko ISOBE，Keiko KIMATA，Tomoko SHIMA，
Junichi KANATANI，Takeshi KURATA　and　Masanori WATAHIKI

要　旨　結核菌の分子疫学的解析に利用されている結核菌由来挿入断片 IS*6110*をプローブとした RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）法の改良法を検討した．その結果，検査の簡素化が可能となった．また，当所の保存株52株を用いて，本法により RFLP 解析を行い，得られた RFLP 像から画像解析ソフトを用いてクラスター解析を行った．その結果，同一クラスターになった7クラスターは報告された疫学的背景と相関しており，有用性が確認された．

結核は，平成19年6月1日に改正された感染症法（略称）に統合され，2類感染症に類別された．また，結核菌（多剤耐性結核菌を除く）は4種として，多剤耐性結核菌は3種特定病原体として，保管，運搬等について厳格な管理が求められている．結核は，感染から発症までの期間が長く，他者への感染源となる患者を早期に発見し，感染を断ち切ることが公衆衛生上，非常に重要になる．そこで，感染源を解明するために，分子疫学的な方法として遺伝子型別法が用いられている．

多くの遺伝子型別法の中で，結核菌由来挿入断片IS*6110*をプローブとした RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）法は，結核菌の分子疫学解析に有用であるという報告[1,2]から，頻繁に用いられている．結核菌から抽出した染色体 DNA を制限酵素で切断後，染色体 DNA 断片中に存在する挿入配列の有無を検出するもので，RFLP 像の一致は，同一クローンの株であるという科学的証拠として利用される．当所においても，１年に数件程度ではあるが県内の厚生センターからの依頼により，患者間の感染が疑われた事例や集団感染事例において RFLP 検査を実施している．

しかし，この方法は，操作が煩雑であり，時間を要する．また，その結果は画像データ（RFLP 像）として蓄積されるため，データ量が増加するに伴い，過去のデータとの比較解析は，目視ではほとんど不可能である．

そこで我々は，検査を簡便化することを目的として改良法を検討した．この改良法を用いて，当所で保管されている結核菌分離株の RFLP を実施し，得られた RFLP 像について，解析ソフトを用いてクラスター解析を試みたので報告する．

材料と方法

１．供試菌株

当所で保存されている結核菌52株を用いた．これらは，2000年～2008年に，県内の厚生センターから，結核菌の RFLP，PCR または保存等の依頼を受けて搬入されたものである（表1）．

２．結核菌からの DNA 抽出

培養及び DNA 抽出は，バイオセーフティレベル3実験室内で，クラスⅡの安全キャビネットを使用して行った．

表１．結核菌の搬入年度と管轄厚生センター

年度	新川	中部	高岡	砺波	計
2000	4				4
2001	1				1
2002	1		3	7	11
2003				8	8
2004				7	7
2005	4	1		3	8
2006	1	2	1	1	5
2007		3	1	3	7
2008	1				1
	12	6	5	29	52

結核菌を１％小川培地（極東）に接種し，37℃3～4週間培養した．十分発育した結核菌3～5白金耳の菌を，ISOPLANT（ニッポンジーン）を用いてDNA抽出を行った．

３．RFLP

方法は，高橋ら[3]および岸田ら[4]の方法を参考にした．

抽出したDNAの濃度を測定し，2μg DNAを以後の検査に用いた．制限酵素*Pvu*Ⅱ（ニッポンジーン）24Uを含んだ制限酵素液100μlを加え，37℃，2時間反応した．この反応液に，共沈剤のエタ沈メイト（ニッポンジーン）とエタノールを加えてよく撹拌後遠心操作を行い，DNA沈殿を得た．この沈殿DNAはTE buffer 15μlに溶解した．

電気泳動用ゲルは1%ゲルとし，I. D. NA®agarose（FMC）を用いた．DNA分子量マーカーは，Marker6（λ DNA/*Sty*Ⅰ）（ニッポンジーン）を用い，ゲルの両端と，検体3レーンごとに1レーン配置した．電気泳動は，TBE bufferで50V，3時間行った．

泳動後，VacuGene XL（Pharmacia）を用いて，DNAをゲルからHybond™－N+（Amersham）のメンブレンに転写し，GS GENE LINKER（Bio Rad）でUV固定を行った．

プローブDNAは，結核菌由来挿入断片IS*6110*（245bp）のPCR産物100ngと，マーカーの検出用にMarker6（λ DNA/*Sty*Ⅰ）30ngを使用した．それぞれのプローブDNAをAlkPhos Direct Labelling Reagents（GE Healthcare）を用いて，耐熱性アルカリホスファターゼを直接標識した．

AlkPhos Direct Labelling Reagentsのハイブリダイゼーションbufferを使用し，メンブレンを55℃30分のプレハイブリダイゼーション後，2つの標識プローブを加えて55℃―晩ハイブリダイゼーションを行った．メンブレンを洗浄後，CDP-Star™ Detection Reagent（GE Healthcare）を用いて化学発光させ，ChemiDoc XRS（Bio Rad）にてRFLP像を検出した．画像は，TIFFファイル形式で保存した．

4.　クラスター解析

解析ソフトは，Fingerprinting Ⅱ（Bio Rad）を使用し，デンドログラムを作成した．類似度計算はDice法にて行い，UPGMA法でクラスター解析を行った．トレランス値は1.0%，最適化値は0.5%に設定した．

結　　果

今回，検討した改良RFLP法を用いて，得られたRFLP像を図1に示した．また，当所で保存されている結核菌52株について解析し，得られたRFLP像のクラスター解析を実施した．その結果は，図2に示した．52株のRFLP像は38パターンに分かれた．RFLP像が100%一致した同一クラスターは7つ，21株であった．これらは，疫学的に関連性が判明しており，患者間の感染があったと考えられる．事例７は，砺波厚生センター管内の医療機関において，院内感染と断定された事例である．TB40は，この医療機関との接点はなかったが，事例7の株と同一クラスターであった．TB40の患者も砺波厚生センター管内であることから，何らかの接触があった可能性があると思われた．その他に，疫学的に関連性の認められなかったものが同一パターンを示したものはなかった．

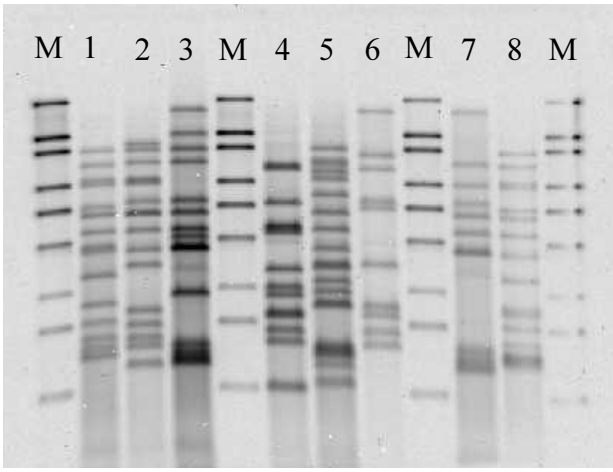


図１．改良RFLP法によるRFLP像

M：Marker6（λ DNA/*Sty*Ⅰ）
1～8 ：結核菌

類似度が90%以上の高い相同性を示したクラスターは5つ（A～E）みられた（図2）．それぞれの類似度は，Aは2株で96.55%，Bは3株で90.00%，Cは2株で92.31%，Dは6株で90.42%，Eは2株で95.24%と高かった．これらは，Dのクラスターに含まれる事例4の3株以外で，疫学的に関連性は確認されていないが，B，C，Eのグループは，それぞれ同じ厚生センター管内の結核患者であった．

IS*6110*のコピー数が5本以下の株は2株で，TB66が4本，TB56が2本であった．

考　　察

RFLP法は，制限酵素切断後，アガロース電気泳動，ナイロン膜への断片DNAの転写，固定及びプローブDNAとのハイブリダイゼーション，化学発光，検

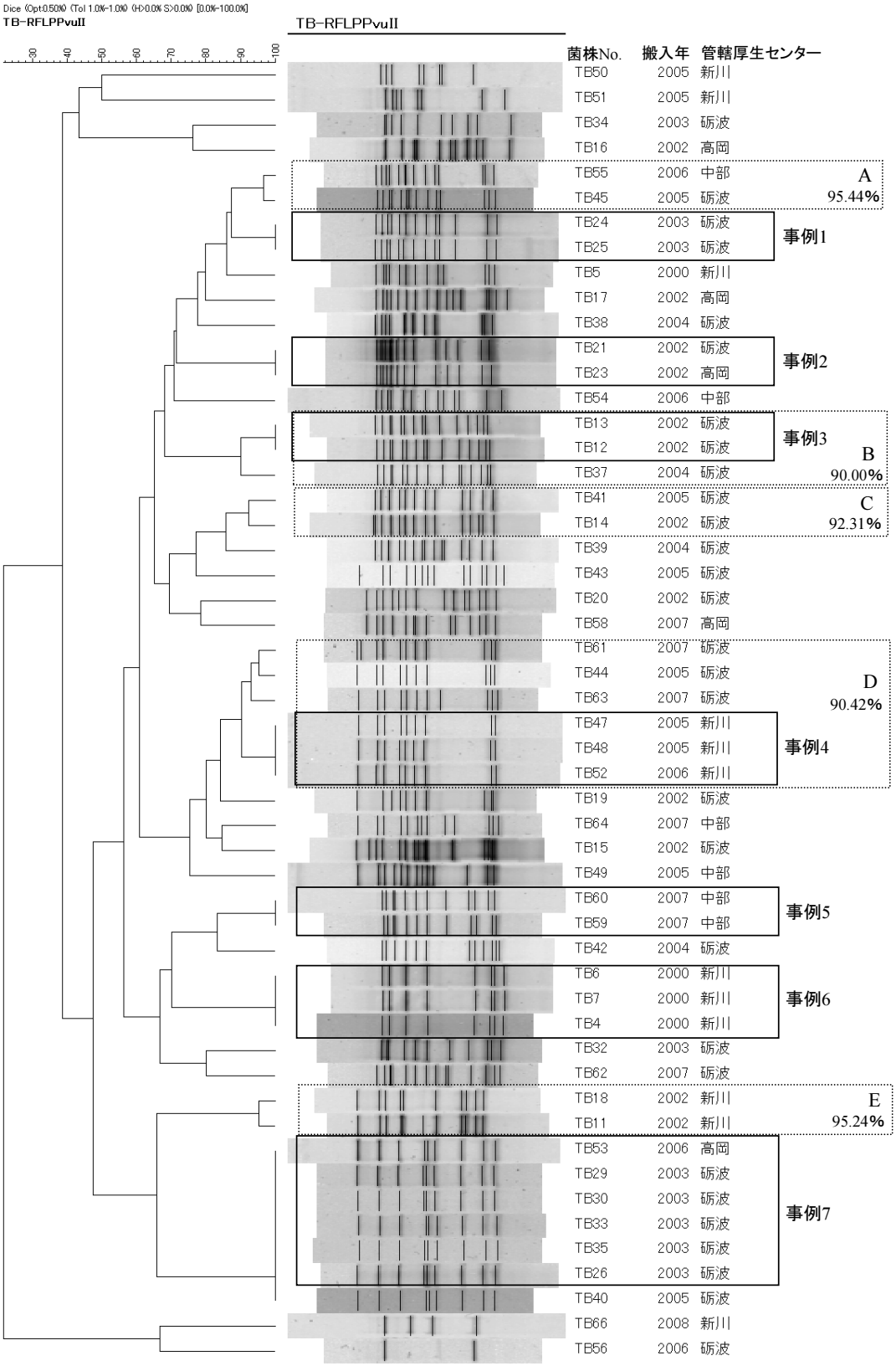


図２．結核菌52株のクラスター解析

出という工程で行われる [1,2]．これらの方法では，プローブの標識をビオチンやジゴキシゲニンを用い，検出の際に，ブロッキング操作や，アルカリホスファターゼなどを標識したアビジンや抗ジゴキシゲニン抗体と二次抗体反応を行い，RFLP 像を検出している．今回の検討では，安定なアルカリホスファターゼをプローブ DNA に直接標識するキット（AlkPhos Direct Labelling Reagent）を使用した．これにより，ブロッキング操作や二次抗体反応が不要となった．
また，解析ソフトによるクラスター解析を行う場合，DNA 分子量マーカーによる補正が必須である．適切な補正を行う方法として，マーカー DNA を全てのサンプルと混ぜて電気泳動する内部マーカー法 [2,3]と，サンプルと同一ゲル上の別レーンで電気泳動する外部マーカー法[4]がある．前者は，サンプルとマーカーを別々に検出するために，ハイブリダイゼーション操作を2回行う必要があり，特に煩雑となる．よって，今回は外部マーカーを用いた方法を検討した．メンブレン上のマーカー DNA 断片の検出には，使用したマーカー DNA をプローブとして用いることとした．使用したマーカーは，大腸菌ファージであるλファージ DNA から調製されている．このマーカープローブと結核菌染色体 DNA とクロスハイブリダイゼーションがないことを確認し，IS*6110* DNA プローブと混ぜてハイブリダイゼーションを行った．これらにより，検査の簡便化及び時間の短縮が可能となった．

この RFLP 法によって，当所保存結核菌を用いてクラスター解析を行ったところ，患者の疫学的な情報とも一致しており，十分その有用性を確認することが出来た．また，画像のデータベース化を行ったことにより，過去の分離株との比較が容易となった．今回用いた株は，厚生センターから検査または保存依頼を受けた菌株のみであり，県内の結核患者から分離された結核菌の一部であるが，今後解析データを蓄積することにより，県内の流行株の実態や，地域別の差などに関する洞察を得ることができると期待され，その有用性が増すと思われる．

一方，今回解析した52株中，IS*6110* のコピー数が2及び4の株が一株ずつ検出された．IS*6110* をプローブとした RFLP 法では，コピー数の少ない株が検出される場合があるとされている．このような株の RFLP 法による解析は困難となり，他の遺伝子型別法の併用が必要である．

分子疫学的ツールとしての遺伝子型別法は，現在，新しい方法がいくつか紹介されている．近年，画像データを用いた RFLP 法の欠点を補う新しい遺伝子型別法である VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats)法[5, 6]が注目されている．VNTR 法は，DNA 上に存在する縦列反復配列の反復数により型別する方法であるが，PCR を基礎としているため，迅速に結果が得られ，またデータが数値化されるため，施設間のデータ比較も容易である．しかし，まだ有用な解析領域の選択など，課題も多いが，今後は当所でも VNTR 法の検討を行っていきたい．

謝　　辞

本研究の実施にあたり，ご協力いただきました県内の厚生センターの関係各位に心より感謝いたします．

文　　献

1．Hermans,PWM., van Soolingen,D., Dale,JW., Schuitema,ARJ., McAdam,RA., Catty,D. and van Embden,JDA. (1990). J.Clin.Microbiol., 28, 2051-2058
2．Hermans,PWM., Messadi,F., Guebrexabher, H., van Soolingen,D., de Haas, PEW., Heersma,H., et al. (1995). J.Infect.Dis., 171, 1504-1513
3．高橋光良（1998）．日本細菌学雑誌，53, 662-668
4．岸田一則, 横山栄二, 内村眞佐子, 一戸貞人(2005), 感染症学雑誌，79, 672-679
5．Frothingham,R. et al. (1998) .Miclobiolgy, 144,1189-1196
6．Mazars,E., et al. (2001). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 1901-1906

平成20年12月１日

富山県における浴用水中 *Legionella* 属菌の分離状況（2007）

磯部順子　　金谷潤一　　清水美和子　　嶋　智子
木全恵子　　倉田　毅　　綿引正則

Isolation of *Legionella* Species from Public Bath Water in Toyama Prefecture, 2007

Junko ISOBE, Junichi KANATANI, Miwako SHIMIZU, Tomoko SHIMA, Keiko KIMATA, Takeshi KURATA and Masanori WATAHIKI

要 旨　2007年9～12月に富山県内の公衆浴場18施設から採取した浴用水64件について，*Legionella* 属菌による汚染実態を調査した．調査は *Legionella* 属菌の検出率，生菌数，分離菌の血清型別について実施した．得られた結果は以下のとおりであった．

１．浴用水の *Legionella* 属菌の検出率は42.2%（27/64件）で，昨年の調査結果（51.9%）に比べ，低かった．

２．浴用水の採水日の遊離残留塩素濃度（以下残塩）は，測定可能であった59検体のうち，*Legionella* 属菌が検出された浴用水24検体の平均が0.344mg/ℓであったのに対し，検出されなかった浴用水36検体の平均は1.063mg/ℓで，後者で残塩が高かった．

３．浴用水100mlあたりの *Legionella* 属菌数は，1.0×10～6.3×10^4cfu，27件の平均は8.6×10であった．

４．分離された *Legionella* 属菌の血清型は，*L.pneumophila* SG1(15検体),SG9,ミクダディ（各5検体）が多かった．

５．血清型別不能であった *Legionella* 属菌(以下UT)について，16S rDNAの配列により同定された菌種は *L.londeiniensis*，*L.pneumophila* および *L.oakridgensis* であった．

Legionella 属菌は土壌や淡水の湖沼，温泉等の自然環境に生息している．しかし，近年は冷却塔，加湿器，循環式浴場等の人工的な水環境にもその生息域を広げている．この菌によって引き起こされるレジオネラ症は劇症型の肺炎，あるいは軽い熱性疾患の病型を示すが，重篤な場合は死に至ることから，もっとも注意しなければならない経気道感染症のひとつである．レジオネラ症は1976年の米国フィラデルフィラで発生した集団事例[1]以来注目されるようになった．日本では2002年7月に宮崎県での循環式浴用施設利用者7名が死亡した集団感染事例[2]をはじめ，多くの事例が報告されている．

富山県においては集団事例こそ発生していないが，レジオネラ症は増加傾向にあり，2005年には死亡例も発生している[3]．そこで我々は2006年からレジオネラ症の発生と浴用水の *Legionella* 属菌による汚染状況との間にどのような関連があるのかを明らかにする目的で、換水や消毒剤の使用方法等、浴用水の管理状況と *Legionella* 属菌の検出濃度との関係を調査している。2007年は富山県内の18浴用施設について *Legionella* 属菌による汚染実態を調査したので報告する．

材料と方法

１．対象と材料

2007年9～12月に県内の公衆浴場18施設の浴槽から採取した浴用水64検体を試料とした．採水は厚生センターの担当者に依頼した．浴用水は採取後直ちにチオ硫酸ナトリウムの入った滅菌採水瓶に入れ，採水当日あるいは翌日に当所へ搬入された．

２．浴用水の濃縮

浴用水500mlをポリカーボネート製メンブランフィルター（直径47mm，0.22μm，日本ミリポア）で吸引ろ過し，さらに滅菌蒸留水50mlでメンブランフィルターおよびろ過用ファンネルを洗浄，吸引ろ過した．吸引後フィルターを50ml滅菌コニカルチューブに入れ5.0mlの滅菌蒸留水を加え，ボルテックスで5分間

振とうし，濃縮試料とした．

３．培養

濃縮試料のうち，2ｍｌをヒートブロックで50℃20分間加熱処理した．冷却後，GVPC 寒天培地(日本ビオメリュー)および WYOα寒天培地(栄研化学)に，濃縮試料原液および10倍希釈した試料100μｌをそれぞれ2枚にコンラージ棒で塗抹した．これらの培地を乾燥しないよう湿潤箱に入れ，37℃で10日間培養した．

４．同定および菌数測定

出現した灰白色のレジオネラ様コロニーすべてを血液寒天培地（栄研化学）および BCYEα寒天培地（日本ビオメリュー）に培養した．そこで BCYEα寒天培地のみに発育したコロニーはグラム陰性桿菌であることを確認し，*Legionella* 属菌とした．その同定されたコロニー数をもって浴用水100ｍｌあたりの *Legionella* 属菌数に換算した．ただし，発育したコロニー数が極めて多い場合は10～20コロニーのみを同定し，その *Legionella* 属菌の割合をもって，全 *Legionella* 属菌数を計算した．培地上に *Legionella* 属菌を認めない場合は計算上，菌数は10未満とした．

５．血清型別試験

浴用水1検体あたり1～20個の BCYEα寒天に発育した菌を用い，病原体検出マニュアル[4]に従い，加熱抗原を作製した．反応はレジオネラ免疫血清（デンカ生研）および Legionella Latex Test Kit(オキソイド）を用いておこなった．

６．16S rRNA 塩基配列による菌種の同定

UT 株について，16S rRNA の塩基配列を解析し，国立遺伝研 DDBJ[5]の Blastn プログラムにより細菌16S rRNAデータベースと相同性解析を実施，分離菌の同定を行った．この方法の詳細は既報[6]に報告している．ただし，DNA は，新鮮分離株を5%キレックス(日本バイオラド)に懸濁し，100℃10分で加熱処理後，遠心(10,000rpm，5分)して抽出した．

結　　果

１．浴用水の種類および温泉の泉質

浴用水64件の内訳は，温泉32（50.0%），白湯24（37.5%），薬湯6（9.0%），その他2であった．これらの給湯方式は，温泉では循環式が27検体，掛け流し方式が5検体であった．一方，白湯および薬湯では1件を除き循環式であった（表1）．また，温泉の泉質は Na-塩化物泉（11検体）が多かった（表2）．

２．浴用水の管理状況

換水は毎日～1回/月の頻度で実施されており，1回/週が17件ともっとも多く，次いで1回/3～4日が16件，毎日実施が14件であった．採水日の遊離残留塩素濃度は0mg/ℓの浴用水が6件，0.4 mg/ℓより高い濃度の浴用水が34件であった．測定不可能であった5件を除く59検体のうち，*Legionella* 属菌が検出された浴用水24検体の平均が0.344mg/ℓであったのに対し，検出されなかった浴用水36検体の平均は1.063mg/ℓと後者で残塩が高かった．

表１．検水の種類と給湯方式

	循環	掛け流し	計
温　泉	27	5	32
白　湯	23	1	24
薬　湯	6	0	6
その他	2	0	2
計	58	6	64

表２．温泉の泉種

温　泉　種	数
アルカリ単純泉	2
Na-Ca 塩化物泉	5
Na 炭酸水素塩塩化物泉	4
Na-塩化物泉	11
含鉄(Ⅱ)‐Na 塩化物強塩泉	4
Na-塩化物強塩泉	3
Na-Cl 泉	3
計	32

表３．泉種別 *Legionella* 属菌検出率(GVPC 培地）

	循環	(%)	掛け流し(%)		計	(%)
温　泉	12/27	(40.7)	3/5	(60.0)	15/32	(46.9)
白　湯	8/23	(34.8)	0/1	(0.0)	8/24	(33.3)
薬　湯	3/6	(50.0)			3/6	(50.0)
その他	1/2	(50.0)			1/2	(50.0)
計	24/56	(44.0)	3/6	(50.0)	27/64	(42.2)

３．*Legionella* 属菌の検出状況

浴用水の*Legionella* 属菌検出率は27/64件（42.2%）であった（表3）．これを泉種別にみると，温泉が15/32件（46.9%），白湯8/24件（33.3%），薬湯3/6件（50.0%）であった．また，給湯方式別の *Legionella* 属菌検出率は，循環式が24/56（44.0%），掛け流し式が3/6（50.0%）であった.また，浴用水の残塩別の *Legionella* 属菌検出率については，レジオネラ症防止指針[7]の中で望ましいとされる残塩0.2～0.4mg/ℓを基準に濃度別の結果を図1に示す．その検出率は，残塩が0～0.1未満（mg/ℓ）で12/16（75.0%），0.2～

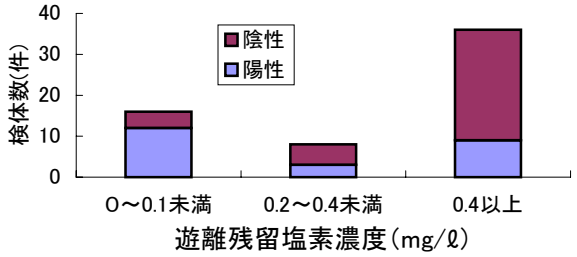


図１．遊離残留塩素濃度とレジオネラ属菌検出率

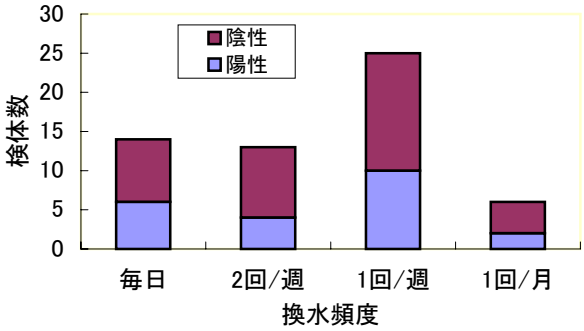


図２．換水頻度とレジオネラ属菌検出率

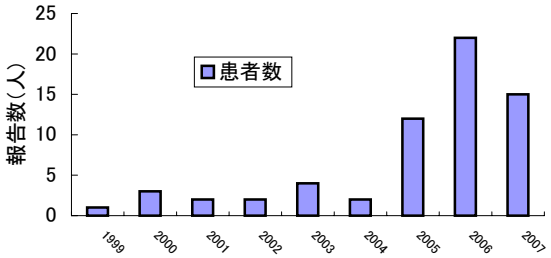


図３．富山県におけるレジオネラ症報告数の年次推移

0.4未満（mg/ℓ）で3/8（37.5%），0.4（mg/ℓ）以上で9/36（25.0%）と，残塩が検出されない浴用水で高かった．一方，換水頻度別の *Legionella* 属菌の検出率は，毎日換水している14検体では6件（42.9%），2回/週の換水15検体では4件（26.7%）,1回/週では25検体では10件（40.0%），月1回の換水4検では2件（50.0%）であり，換水頻度との関連性は明らかではなかった（図2）.

4. *Legionella* 属菌数

Legionella 属菌が検出された27検体の100ml あたりの菌数を表4に示す．*Legionella* 属菌がもっとも多かったのは No.114（6.3×10^4 cfu/100ml）で，8検体は10cfu/100ml と少なく，その平均は8.3×10cfu/100ml であった(表4)．*Legionella* 属菌数が10^3cfu/100ml 以上と多かったのは3検体で，いずれも残塩が0.1mg/ℓ以下と低かった．

5．分離菌の血清型別および UT 株の菌種の決定

分離された *Legionella* 属菌347株の血清型別結果を表4に示した．検体によって分離数が異なり，血清型別に供した菌株は検体あたり1～20株であった．認められた血清型は8種類で，もっとも多い血清型は SG1（155/347株，44.7%），ついでミクダディ(53/347株，15.3%)であった．8件の浴用水に市販抗血清に凝集しない UT が35株認められた．1検体から3種類（UT を除く）の血清型が認められたものもあった．また，UT 株は1検体あたり1～5株分離され，それぞれ16S rRNA の塩基配列解析結果から菌種を決定した（表4）．同定された菌種は *L.pneumophila*(22 株），*L.londiniensis*（9株），*L.oakridgensis*(1株)であった．

考　　察

富山県におけるレジオネラ症の報告数は全国同様，2005年頃から増加し，その動向を監視しなければならない状況にある[図3]．1999～2004年までは1～4人/年で推移していたが，2005年に12人，2006年に22人と急増し，2007年はわずかに減少したものの，その対人口10万人当たりの報告数は全国でもっとも多い．これらはすべて散発事例であるが，富山県でレジオネラ症の発生数が多い原因は不明であるが，岡田らも指摘しているとおり［2］，2003年4月，レジオネラ症の診断のための尿中抗原検出キットが保険適用になったことで検査件数そのものが増加し，その結果として，以前には原因不明の市中肺炎とされていた一部の肺炎患者がレジオネラ症と診断されるようになったことによる．しかし，この増加の原因には，近年の循環式浴槽や冷却塔等，人の生活環境の変化により，*Legionella* 属菌の生息する水環境が拡大し，結果として人が感染する機会が増加している背景があるものと考える．なかでも，わが国においては循環式浴槽を原因とするレジオネラ症の集団感染症[2,8,9]がしばしば起きている．このような状況を考えると，この感染症の蔓延を防ぐためには，循環式浴槽の管理がきわめて重要である．

結果に示したように，調査した浴用施設のおよそ半数から *Legionella* 属菌が検出された．本年の調査による検出率は他府県の調査結果［11,12,13］と比べると高いが，これは検査対象施設の選び方によっても大きく変わるものであり，また，検出方法等，同じ条件での調査によるものではないことから，検出率だけを単純に比較するべきではない．しかし，*Legionella* 属菌数が基準値の100倍以上という高い数値を示した施設が3件あり，早急な管理方法の改善が必要である．

表４．*Legionella* 属菌の分離された施設の管理状況と分離菌の血清型別

検体No.	方式	泉種	水温	pH 値	換水頻度	経過日数	採水日の遊離残留塩素濃度	塩素剤の種類	定量値 cfu/100ml	分離菌血清型			血清型UT株の16SrRNAによる同定結果
62	循環	温泉	41	7.8	1/週	1	0.86	次亜塩素酸Ｎａ	1.0×10	SG1			
66	循環	温泉	42	7.20	1回/月	14	0.2	塩素化ｲｿｼｱﾇﾙ酸	1.0×10	SG1			
67	循環	温泉	40.5	7.25	1回/月	14	0.2	塩素化ｲｿｼｱﾇﾙ酸	1.0×10	SG1			
70	循環	温泉	41	8.9	1/週	2	0.8	次亜塩素酸Ca	1.0×10		SG3		
71	循環	温泉	42	8.86	1/週	2	0.6	次亜塩素酸Ca	4.5×10	SG1	SG3		
80	循環	白湯	42.2	8.7	2/週	3	0.5	次亜塩素酸Na	6.0×10	SG1	SG6		
82	循環	温泉	41.5	8.38	1回/2週	7	0.6	次亜塩素酸Na	1.0×10	SG10			
83	掛け流し	温泉	42	7.71	毎日	1	0	未使用	7.6×10^2	SG1		ミクダディ	UT *L.pneumophila*
85	循環	温泉	42	7.71	1回/2週	7	0.2	次亜塩素酸Na	1.0×10^2	SG1			UT *L.oakridgensis*
87	循環	温泉	40.6	7	1/週	5	0.05	次亜塩素酸Na	1.0×10^2	SG1	SG8	ミクダディ	UT *L.pneumophila*
88	循環	温泉	40.1	7	1/週	7	0.08	次亜塩素酸Na	1.0×10	SG1	SG6	ミクダディ	*L.pneumophila*
89	循環	温泉	39.3	7	1/週	1	0.06	次亜塩素酸Na	2.0×10^2	SG1		ミクダディ	UT
90	循環	温泉	39.5	6	1/週	2	0.01	次亜塩素酸Na	3.6×10^2	SG1	SG9	ミクダディ	
94	掛け流し	温泉	46.5	7.1	毎日	1	0.1	次亜塩素酸Na	3.0×10	SG9	SG15		UT *L.londiniensis*
96	掛け流し	温泉	44.1	7	毎日	1	Tr	次亜塩素酸Na	3.7×10^2	SG1	SG9		UT *L.pneumophila*
97	循環	白湯	42.3	8	1/週	1	UD	次亜塩素酸Na	1.0×10			ミクダディ	
100	循環	白湯	43.1	8.03	毎日	1	0.5	次亜塩素酸Na	1.0×10	NT			
101	循環	白湯	42.4	8.14	3回/週	2	0	次亜塩素酸Na	4.0×10	SG1	SG5		
104	循環	薬湯	42.5	8.44	3回/週	2	測定不可	次亜塩素酸Na	1.0×10^2				UT *L.pneumophila*
105	循環	人口温泉	42	8.8	1/週	3	1.2	次亜塩素酸Na	1.9×10^2	SG1	SG9		
111	循環	白湯	43	8.61	毎日	0	0.6	ﾄﾘｸﾛﾛ塩素化イソシアヌル酸	2.0×10	SG5	SG6		
114	循環	薬湯	43	8.73	毎日	1	0.04	次亜塩素酸Ca	6.27×10^4	SG1			
117	循環	薬湯	42	NT	2/週	2	1.5	塩素化ｲｿｼｱﾇﾙ酸	2.5×10^2	SG1	SG5		
118	循環	温泉	40.5	8.37	1/週	5	0.05	次亜塩素酸Na	2.45×10^3	SG9			
119	循環	温泉	41.5	8.35	1/週	5	0.05	次亜塩素酸Na	1.28×10^3	SG9			
121	循環	白湯	42	8.63	2/週	2	0	次亜塩素酸Na	5.0×10	SG10			
122	循環	白湯	42.5	8.42	2/週	3	0.1	次亜塩素酸Na	3.0×10	SG10			

NT：未検査
UT：型別不能

これら3検体はいずれも循環式浴用水で，残塩が0.04 mg/ℓ，0.05mg/ℓと低かった．これらの内2検体（No.118，119）は換水頻度が1回/週で実施される施設で，今回，採水されたのは換水から５日目の浴用水であった．また，1件（No.114）は薬湯であり，換水は毎日実施されていた．薬湯の場合，塩素剤の効果が充分でないことがあることから，その管理方法にはより注意が必要となる．いずれの浴用水においても，残塩を確認し，塩素剤の投与頻度を高くする等の管理方法の改善が必要であると思われる．岡田らが5,000cfu/100ml を超える菌数に達すると集団発生はいつ起きても不思議ではないと述べていることから，これら *Legionella* 属菌数の多い施設については，そのリスクを説明し，管理の徹底を指導する等の行政側の対応が必要である．

本調査で *Legionella* 属菌の検出率は残塩の低い浴用水で高く、おおむね残塩に相関することが示された．これは2006年の結果も同様であった[10]．また,換水頻度および調査日における換水後の経過日数は *Legionella* 属菌の検出率および菌数と相関しなかった．これは掛け流し方式（No.83,94,96）の浴用水で *Leigonella* 属菌が検出されていることからも明らかである．ただし，これらの残塩はいずれも0.1mg/ℓ以下と低かった.以上の結果は，浴用水の管理において，単に塩素剤を使う，あるいは水を交換するだけでは *Legionella* 属菌を完全に排除するのは難しいことを示唆している．一方で，No.66,67の浴用水は換水頻度が1回/月で，この調査のための検体は換水14日目

の採水であったが，10cfu/100ml と基準よりわずかに多いだけであった．ここに結果は示していないが，この施設の別の浴用水からは *Legionella* 属菌は検出されなかった．この結果は，管理方法によって良好な衛生状態を保つことが出来ることを示すものと思われる．環境からの *Legionella* 属菌の検出に関する報告[11]のなかで温泉•循環風呂から検出された*L. pneumophila* SG1の全国の割合は13.0%であった．冷却塔水ではその割合は *Legionella* 属菌の54.9%を占めている．この *L. pneumophila* SG1については，過去に発生した集団発生のほとんどがこの血清型であることから，病原性を示す *Legionella* 属菌としてもっとも注意しなければならない．今回分離された *Legionella* 属菌の血清型は *L. pneumophila* SG1が多く（44.7%），*Legionella* 属菌が検出された浴用水の59.3%（15/27件）から分離され，その割合は全国と比べると高い．この結果が，富山県においてレジオネラ症患者が多いことと関連するかは明らかではない．なぜなら，富山県におけるレジオネラ症の患者発生地域は県西部，中でも高岡地区に多い[3]が，浴用水からの *L.pneumophilla* SG1の分離状況における地域間差は認められなかった．また，患者の疫学調査から，感染源が必ずしも浴用水に関連しているとは考えられない例も報告されている．原因追求のためには，患者の分離株や生活環境等の情報が必要である．

増加が続くレジオネラ症を減少させるためには，感染源の究明と対策が不可欠である．その感染源のひとつである浴用水の *Legionella* 属菌の汚染状況を把握し，菌を排除するための方法を検討することは今後も必要であると思われる．

謝　　辞

本研究を実施するにあたり，検体採取にご協力いただきました浴用施設および厚生センター，富山市保健所，生活衛生課の関係各位に心より感謝いたします．

文　　献

1．Fraser D.W. et.al (1997), N. Engl. J. Med. 297, 1189-1197
2．岡田美香，河野喜美子，倉　文明，前川純子，渡辺治雄，八木田健司，遠藤卓郎，鈴木　泉(2005). 感染症誌，79，365－374
3．富山県厚生部　富山県感染症発生動向調査事業報告書（平成18年），12
4．病原体検出マニュアル，国立感染症研究所，全国地方衛生研究所，平成15年改定版
5．DDBJ http://www.ddbj.nig.ac.jp/
6．綿引正則，清水美和子，磯部順子，木全恵子，嶋　智子，田中大祐，永井美之(2006)．富山衛研年報，29，126-132
7．厚生省生活衛生局企画課監修，新版レジオネラ症防止指針(2004)
8．杉山寛治，西尾智裕，郷田淑明，張　凡非，増田教子，秋山眞人，宮本秀樹(2000). 静岡県環境衛生科学研究所報告，43，1-4
9．国立感染症研究所編，病原微生物検出情報(2003). 2，27-36
10. 磯部順子，綿引正則，清水美和子，嶋　智子，木全恵子，倉田　毅(2007). 富山衛研年報,30,110-114
11. 鈴木敦子，市瀬正之，松江隆之，天野裕次，寺山　武，泉山信司，遠藤卓郎(2002). 感染症誌，76，703－709
12. 久高　潤，糸数清正，平良勝也，仁平　稔，大野　惇（2006）．沖縄県衛製環境研究所年報.40. 77-81
13. 笹原武志，菊野理津子，奥田舜治，関口朋子，佐藤義則，高山陽子，青木正人，井上松久（2004）．感染症誌，78，545-553

富山県における腸炎ビブリオ食中毒の発生と漁港海水中の腸炎ビブリオ汚染実態について（1998～2007年）

嶋　智子　　磯部順子　　木全恵子　　清水美和子　　金谷潤一　　倉田　毅　　綿引正則

Relationship between the Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* Food Poisoning and the Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in Seawater of Fishing Ports in Toyama Prefecture, 1998-2007

Tomoko SHIMA, Junko ISOBE, Keiko KIMATA, Miwako SHIMIZU, Junichi KANATANI, Takeshi KURATA and Masanori WATAHIKI

要 旨　富山県における腸炎ビブリオ食中毒の発生状況と漁港における腸炎ビブリオの動態との関連性を明らかにする目的で，富山県内5漁港の海水および海泥を検体とし，腸炎ビブリオ数および耐熱性溶血毒（Thermostable Direct Hemolysin：TDH）産生性腸炎ビブリオの分布状況について調査を行った．腸炎ビブリオ数についてはMPN法により測定し，TDH産生性腸炎ビブリオについては，PCR法による*tdh*遺伝子の検出および免疫磁気ビーズ法によるTDH産生性腸炎ビブリオO3:K6の分離を試みた．本調査は1996年から実施しており，2003年までの結果については既報（第27号）で報告している．ここでは，1998～2007年の10年間の調査結果を報告する．

1．漁港の海水および海泥中の腸炎ビブリオ数は，7月下旬から増加し始め，8月から9月にかけてピークとなり，11月まで検出された．菌数は1998年以降減少傾向を示し，2003年は少なかった．

2．漁港の海水および海泥中の*tdh*遺伝子は，7月上旬から検出され始め，検出率は9月頃まで高かった．2003，2004年は6月にも海水から*tdh*遺伝子が検出され，TDH産生性腸炎ビブリオO3:K6も分離された．

3．富山県におけるヒト由来の腸炎ビブリオ分離株数および漁港海水中からの*tdh*遺伝子検出率は，2000～2004年にかけて増加し，その後2005～2007年にかけて激減しており，これらは良く相関していた．

腸炎ビブリオは，沿岸海域や汽水域に広く分布し，海水温の上昇とともに増加する．腸炎ビブリオは，発育至適条件下では急激に増殖することから，本菌による食中毒は夏季に多発する傾向がある．魚介類を生で食する習慣の日本では，腸炎ビブリオは長い間，食中毒原因物質の1～2位を占めていた．とくに，1996～1998年頃に突如出現した血清型O3：K6 pandemic cloneの世界的な流行により，1998年には本菌による食中毒が全国的に多発し，年間患者数が1万人を超えた．

しかし，近年，腸炎ビブリオ食中毒発生数は全国的に減少している（図1）．食中毒全体に占める腸炎ビブリオ食中毒の割合は，1998年の28%から2007年の3%へと，10年で約10分の1となった．この一因として，1999年の「生食用魚介類」および「煮カニ等の加熱加工魚介類」についての4℃以下という低温管理と流通市場内での汚染海水の使用回避による二次汚染防止に

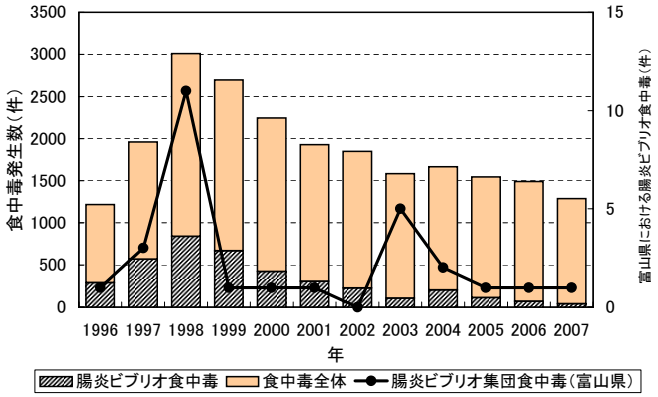


図1．全国および富山県における腸炎ビブリオ食中毒発生状況（1996～2007年）

対する厚生労働省からの通知，2001年の「腸炎ビブリオ食中毒防止対策のための水産食品に係る規格」の改正[1]等の腸炎ビブリオ食中毒予防対策が功を奏していると考えられる．富山県においても，これらの改正等を受け，2002年に県内の魚市場9か所と荷さばき施設3か所に紫外線海水殺菌装置が導入され，食中毒発生予防に活用されている．

富山県厚生部では，食中毒予防の重点項目の一つとして，富山湾における腸炎ビブリオの汚染実態を調査してきた．その中で，1996年から富山県内漁港の海水，海泥中の腸炎ビブリオの実態調査を実施している．鮮魚介類の流通環境が大きく変わる中で実施してきた1998～2007年の10年間の調査結果について，腸炎ビブリオ食中毒の発生状況と併せて報告する．

材料と方法

１．調査期間

1998（平成10）～2007（平成19）年，6～11月の間，月1～2回実施した．

２．調査地点

富山県内の主要5漁港である生地（黒部），魚津，四方，新湊および氷見の5漁港を定点とした（図2）．四方漁港の調査は2000年から開始した．

３．検体採取

1998～2001年は各定点において，表層海水および海泥を採取し，検体とした．表層海水は柄杓で，海泥はエクマンバージ採泥器を用いて底泥を採取した．

2002年以降は，海泥に代えて底層海水を検体とした．底層海水はハイロート採水器を用いて水深約2mの海水を採取した．

４．調査項目

1) 海水の塩分濃度の測定

赤沼式比重計を用いて測定した[2].

図２．腸炎ビブリオ調査定点漁港

2) 海水および海泥中の腸炎ビブリオ数の測定

食塩ポリミキシン培地を用いたMPN3本法で実施した[3].

3) *tdh* 遺伝子の検出

2000年以降の検体を対象として実施した．海水は1,000mlを0.45μmのメンブランフィルターでろ過濃縮し，海泥は10gについてそれぞれ3%NaClとなるよう調製したTrypticase Soy Broth（Becton, Dickinson and Company）に添加し培養後，PCRにより *tdh* 遺伝子を検出した [4].

4) TDH産生性腸炎ビブリオO3:K6の分離

2000年以降の検体を対象として実施した．前項のPCRで *tdh* 遺伝子が検出された検体について，血清型O3:K6を対象とし，K6免疫磁気ビーズ処理を行って，菌の分離を試みた[5]．また，分離菌についてはgroup-specific PCR（GS-PCR）[6]により，新型クローンの確認を行った．

5) 富山県におけるヒト由来腸炎ビブリオ分離株数の集計

富山県感染症情報センター（富山県衛生研究所内に設置）が，県内の厚生センターと主な10か所の公立病院の細菌検査室に対して情報収集しまとめている「病原微生物検出情報」を参照し，集計した．この菌数には，散発および集団発生事例の分離株数が含まれている．

結　　果

１．腸炎ビブリオ集団食中毒発生状況

1998～2007年の10年間の富山県における腸炎ビブリオ集団食中毒発生状況を表1に示した．全国的に食中毒が多発した1998年には，県内の食中毒発生件数も11件と多かった．10年間で腸炎ビブリオ集団食中毒は25事例発生したが，約7割は血清型O3:K6によるものであった．また，原因食品は，特定された事例のほとんどが魚介類であった．

２．調査地点の漁港海水データ

採取した漁港海水の海水温，塩分濃度およびpHの測定値を表2に示した．表層海水については2000～2007年の平均値，底層海水については2002～2007年の平均値を示した．

海水温は6月中は20℃前後であるが，7月に入ると上昇し始め，8～9月には多くの定点で25℃を超えた．塩分濃度は，底層海水ではいずれの漁港でも30～35‰であったが，表層海水では漁港によって異なっており，生地漁港は6.8～9.9‰，魚津漁港は17.3～25.3‰，新湊漁港は21.1～30.5‰と低かった．pHは8.0前後で，

表１．富山県内で発生した腸炎ビブリオ集団食中毒事例（1998～2007年）

事例 No.	発生年月日	発生場所	摂食者数	患者数	原因食品	原因施設	血清型
1	1998.7.27	氷見市	22	7	不明	飲食店(旅館)	O3:K6
2	1998.8.9	滑川市	57	18	不明	飲食店(仕出し)	多種類
3	1998.8.9	魚津市	67	19	刺身，寿司	飲食店(料理)	O3:K6
4	1998.8.13	庄川町	79	38	不明	飲食店(旅館)	O3:K6
5	1998.8.14	入善町	33	11	弁当	飲食店(すし)	多種類
6	1998.9.4	立山町	7	5	カキ酢	飲食店(食堂)	O3:K6
7	1998.9.13	下村	5	5	刺身(イカ)	家庭	O3:K6
8	1998.9.27	富山市	6	2	たこの刺身	家庭	
9	1998.10.2	富山市	約 110	22	カキ弁当	飲食店	O3:K6
10	1998.10.7	魚津市	6	4	寿司折り	飲食店(すし)	O3:K6
11	1998.10.24	砺波市	18	14	弁当	集団給食施設	O11:K4
12	1999.8.19	富山市	71	15	不明	飲食店(料理)	
13	1999.9.15	城端町	67	10	仕出し料理	飲食店(仕出し)	O4:K55
14	2000.7.9	富山市	23	7	弁当	飲食店(食堂)	O3:K6
15	2001.9.17	黒部市	45	30	不明	飲食店(旅館)	O3:K57
16	2003.6.15	高岡市	6	3	仕出し料理	飲食店(仕出し弁当)	O3:K6
17	2003.6.16	氷見市	7	3	昼食料理	飲食店(旅館)	O3:K6
18	2003.6.18	富山市他	68	35	夕食及び朝食	飲食店(旅館)	O3:K6
19	2003.8.17	氷見市他	182	89	料理(刺身)	飲食店(旅館)	O1:K25 O3:K6 O4:K53
20	2003.9.20	新湊市	11	9	仕出し料理	飲食店(料理)	O3:K6
21	2004.8.30	小矢部市	67	26	29 日，30 日料理	飲食店(料理)	O3:K6
22	2004.9.20	小杉町外	355	107	カニの酢の物(推定)	飲食店(料理)	O3:K6
23	2005.8.21	富山市	40	22	8 月 21 日朝食	飲食店(食堂)	O3:K6 O3:K29
24	2006.7.26	氷見市	7	5	茹でかに	家庭	
25	2007.8.12	氷見市	176	36	ﾊﾞｰﾍﾞｷｭｰ料理	ﾊﾞｰﾍﾞｷｭｰ施設	O1:K36

表２．調査地点の漁港海水データ

漁港	海水	項目	6月上旬	6月下旬	7月上旬	7月下旬	8月上旬	8月下旬	9月上旬	9月下旬	10月	11月
生地	表層海水*1	海水温(℃)	17.3	19.5	20.3	19.6	22.2	21.8	20.2	20.0	18.9	15.2
		塩分濃度(‰)	9.2	7.9	8.1	6.8	7.4	8.4	9.1	8.1	8.6	9.9
		pH	7.1	7.2	7.1	7.3	7.2	7.3	7.2	7.3	7.3	7.5
	底層海水*2	海水温(℃)	18.8	21.0	21.3	23.0	26.2	25.2	25.4	24.5	22.6	19.2
		塩分濃度(‰)	32.1	32.9	32.7	28.7	29.6	30.2	31.6	31.5	31.9	32.8
		pH	7.9	7.8	7.9	8.0	8.1	8.0	8.0	8.1	8.2	8.3
魚津	表層海水	海水温(℃)	19.5	20.8	22.2	23.4	26.5	26.1	24.9	24.3	21.1	16.6
		塩分濃度(‰)	22.1	17.3	19.0	19.6	21.2	22.9	23.8	25.3	24.2	22.5
		pH	7.8	7.6	7.7	7.8	8.0	7.8	7.8	8.0	7.8	7.7
	底層海水	海水温(℃)	18.7	20.8	21.9	23.6	27.1	26.4	25.7	24.9	22.8	19.3
		塩分濃度(‰)	33.1	32.0	30.7	29.8	30.0	30.0	31.0	31.2	32.9	33.1
		pH	7.8	8.0	7.9	7.9	8.1	8.0	8.1	8.2	8.1	8.4
新湊	表層海水	海水温(℃)	20.7	21.8	22.8	25.5	27.9	27.5	25.4	24.4	21.8	18.3
		塩分濃度(‰)	21.3	21.1	22.5	21.9	26.6	29.3	26.2	26.5	27.1	30.5
		pH	8.2	8.2	8.3	8.4	8.2	8.2	8.2	8.3	8.3	8.0
	底層海水	海水温(℃)	18.2	20.8	21.3	24.0	26.3	27.0	26.2	24.9	22.8	18.7
		塩分濃度(‰)	31.6	32.3	32.5	32.1	27.2	30.9	32.9	32.9	31.8	34.4
		pH	8.2	8.2	8.2	8.4	8.2	8.1	8.2	8.4	8.3	8.0
氷見	表層海水	海水温(℃)	21.1	21.9	23.5	25.0	28.4	28.1	26.0	25.4	22.9	18.6
		塩分濃度(‰)	30.8	31.4	30.6	32.3	33.1	33.2	32.4	33.5	33.3	33.9
		pH	8.4	8.4	8.4	8.4	8.3	8.3	8.4	8.4	8.4	8.2
	底層海水	海水温(℃)	19.9	21.2	22.3	24.2	26.7	27.0	26.2	24.6	22.5	18.4
		塩分濃度(‰)	33.4	32.2	29.0	32.8	33.3	33.4	32.7	33.6	33.7	34.6
		pH	8.2	8.3	8.4	8.4	8.2	8.2	8.3	8.4	8.3	8.2
四方	表層海水	海水温(℃)	21.9	24.4	25.3	24.9	27.6	27.9	27.5	26.1	25.1	21.0
		塩分濃度(‰)	34.7	30.7	26.5	34.4	33.9	34.4	32.7	34.2	34.6	34.5
		pH	8.1	8.3	7.8	7.9	8.1	7.9	8.1	8.0	8.0	8.0
	底層海水	海水温(℃)	20.6	22.1	22.9	24.7	27.7	28.3	27.5	26.2	23.7	20.0
		塩分濃度(‰)	34.7	30.7	26.5	34.4	33.9	34.4	32.7	34.2	34.6	34.5
		pH	8.0	8.1	7.7	7.7	7.9	7.8	7.9	8.0	7.9	8.0

*1　平均値(2000～2007年)
*2　平均値(2002～2007年)

季節による変動はみられなかった．生地漁港の表層海水は，調査期間をとおし，同港の底層海水および他港の海水に比べて海水温，塩分濃度および pH が低かった．生地漁港は内陸部にあり，河川と合流後に海へつながっている．採取地点の海水表層部では，海水に河川水が混入しているものと思われる．

３．漁港海水および海泥中の腸炎ビブリオ数の変動

1998～2007年の腸炎ビブリオ数は，表層および底層海水で<3～2,400 MPN/100ml，海泥で<30～430,000 MPN/100g であった．腸炎ビブリオ数を対数変換し，図3，4に示した（菌数は100ml あたり又は100g あたりで表示）．さらに図5には， 5定点の漁港海水中の平均菌数を示した．平均菌数は，表層海水では2003年までは年次ごとに減少傾向を示すが，2004年からはほぼ一定の菌数で推移している．底層海水は2002年からのデータのみであるが，表層海水と同様であった．2003年の菌数が少ない理由については明らかではない．

次に，図3，4の漁港別・検体別の結果をみると，いずれの漁港でも，海水および海泥中で腸炎ビブリオ数は1998年から減少傾向を示し，とくに2003年は少なかった．2004年以降はほぼ一定の菌数で推移している．海泥中の腸炎ビブリオ数は，海水中と比べて2～3オーダー多かった．しかし，表層海水と底層海水ではほとんど差はなかった．

採取時期別にみると，いずれの漁港でも7月下旬から菌数が増加し始め，8月から9月にかけてピークとなり，その後11月まで検出される場合が多かった．ただし2004年は，例年はまだ菌数が少ない6月に，生地（表層），氷見（表層）および四方（底層）で100ml あたり10^2を超える菌数が検出され，水温が低下し菌数が減少する10月や11月にも生地（表層・底層），新湊（底層），氷見（表層・底層）および四方（底層）で$10^{2\sim3}$の菌数が検出された．

４．漁港海水および海泥からの *tdh* 遺伝子検出

2000～2007年の *tdh* 遺伝子および TDH 産生性腸炎ビブリオ（以下，TDH-V.p）O3:K6の検出状況を表3に示した． 漁港海水および海泥中の *tdh* 遺伝子は，7月上旬から検出率が上昇し始め，9月下旬にかけて検出される傾向であった．検出率は，7月上旬は25%，7月下旬から9月下旬にかけては25～45%（平均36%）であった． なお，2003，2004年には6月にも海水中から *tdh* 遺伝子が検出された．

漁港別では，魚津および新湊漁港で検出率が高い傾向がみられた．とくに，魚津漁港では，2003，2004年の6月に採取した8検体中すべてから，*tdh* 遺伝子が検出された．

年別では，多くの漁港で2003，2004年の検出率が高く，2005年以降は低くなっていた．前項で述べたように，2003年は腸炎ビブリオ数が少なかったが，*tdh* 遺伝子は高率に検出された．

表層海水と，海泥または底層海水では，検出率に差はなかった．

５．漁港海水および海泥からの TDH-V.p の検出

tdh 遺伝子と同様，TDH-V.p O3:K6もその多くは7月上旬から9月下旬にかけて検出された（表3）．検出率は，6月上旬，10月および11月は0.0～2.5%と低いが，7月上旬から9月下旬にかけては，2.5～13%（平均8.5%）であった．2003，2004年6月の *tdh* 遺伝子陽性検体より，2003年は6月下旬に1検体から，2004年は6月上旬に1検体，6月下旬に5検体から TDH-V.p O3:K6が検出された．TDH-V.p O3:K6の検出率は，年次や漁港等によってかなり異なっていた．

漁港別では，魚津，新湊漁港は他港に比べて検出率が高い傾向がみられた．

年別では，2004年は100検体中22件（22%）から TDH-V.p O3:K6が分離され，検出率は他の年に比べてとくに高かった．2003年は *tdh* 遺伝子の検出率は高かったが，TDH-V.p O3:K6はほとんど分離されなかった．

表層海水と，海泥または底層海水では，検出率に顕著な差はみられなかった．

また，2004年には K25免疫磁気ビーズ法により，海水中から TDH-V.p O1:K25を分離した．これは，2003年8月に県内で発生した集団食中毒事例で患者からこの血清型の TDH-V.p が分離され， group-specific PCR を行ったところ新型クローンであることが判明したことから，2004年の *tdh* 遺伝子陽性検体のうち，6月上旬（3検体），6月下旬（6検体），8月下旬（1検体），9月上旬（1検体）計13検体について血清型 O1:K25の分離を試みたものである．その結果，8月下旬の1検体から TDH-V.p O1:K25，新型クローン株が分離され，海水中に分布していることが確認された．

６．腸炎ビブリオ数と *tdh* 遺伝子検出率

MPN 法による漁港海水中の腸炎ビブリオ数と *tdh* 遺伝子検出率について，2000～2007年の結果を表4に示した．*tdh* 遺伝子は，700検体中172件（25%）から検出された．*tdh* 遺伝子は，菌数が<10のとき318検体中69件（22%），$10^{1\sim2}$のとき302検体中79件（26%），$10^{2\sim3}$のとき80検体中24件（30%）で検出され，菌数と検出率との間にはわずかに相関がみられた．しかし，さらに詳細にデータをみると， 菌数が<10でも2002年は30%，2003年は44%，2004年は48%で *tdh* 遺伝子が検出され，またその逆に，2001，2007年には菌数

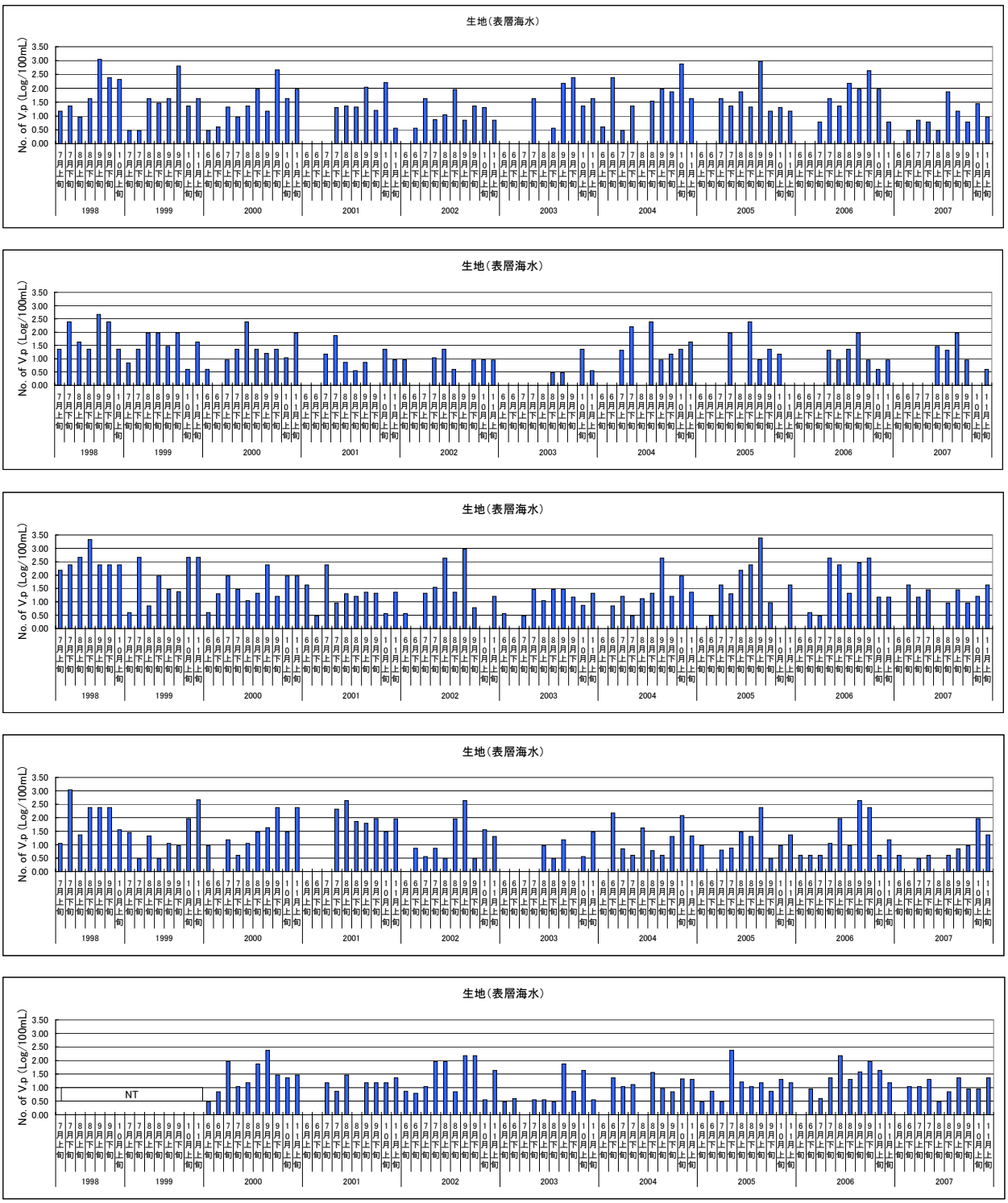
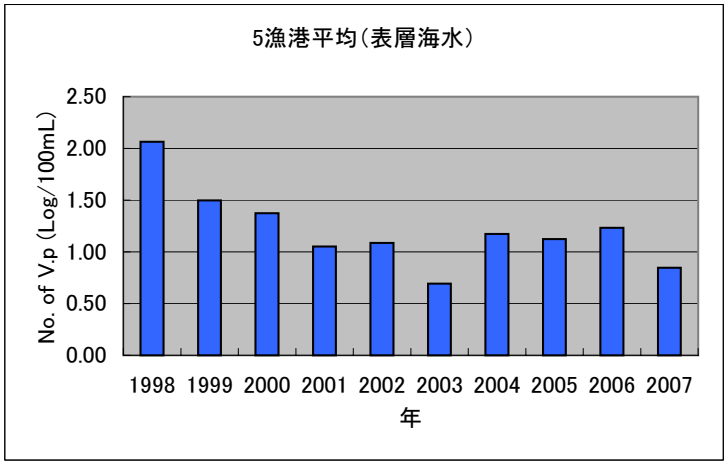


図３．富山県内漁港の表層海水における腸炎ビブリオ数の変動（1998～2007年）

図４．富山県内漁港の海泥および底層海水における腸炎ビブリオ数の変動（1998～2007年）



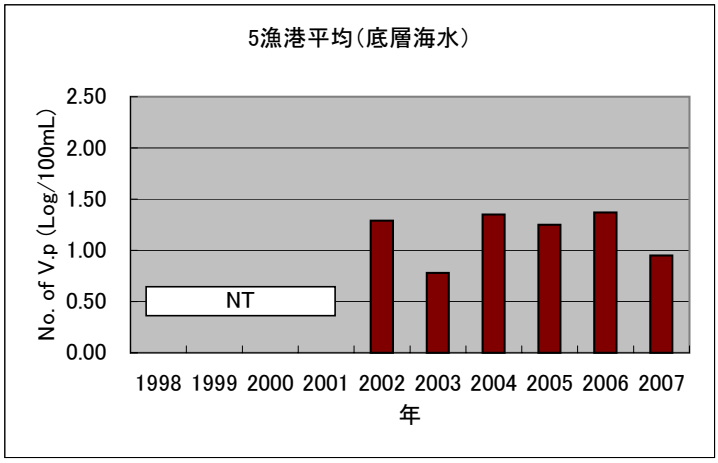


図５．富山県内漁港の海水における腸炎ビブリオ数の年次推移（1998～2007年）

が$10^{2\sim3}$で検出率が0%など，必ずしも菌数と *tdh* 遺伝子検出率が相関しているとはいえない場合もあった．

７．*tdh* 遺伝子検出率，TDH-V.p O3:K6分離率とヒト由来腸炎ビブリオ分離株数の関係

2000～2007年の富山県におけるヒト由来の腸炎ビブリオ菌株数，漁港海水および海泥からの *tdh* 遺伝子および TDH-V.p O3:K6の検出状況について図6に示した．県内のヒト由来腸炎ビブリオ分離株数は，2001～2004年にかけて増加したが，その後，2005～2007年は非常に少なくなっている．海水および海泥における *tdh* 遺伝子検出率は，2001～2003年にかけて増加し，2005～2007年は非常に少なかった．県内のヒト由来腸炎ビブリオ分離株数と *tdh* 遺伝子検出率は良く相関していた．TDH-V.p O3:K6の検出率は，2004年にヒト由来腸炎ビブリオ分離株数と同様に最も高くなっていたが，2003年は低かった．

考　　察

腸炎ビブリオは海水中に生息しており，海水温の上昇とともに菌数が増加し，本菌が付着した生鮮魚介類や加工品，その二次汚染によってしばしば食中毒が発生する．

我々は，腸炎ビブリオ食中毒が多発していた1996年から，毎年，食中毒と富山湾海域における腸炎ビブリオ汚染実態との関連について調査している．実態調査は，海水および海泥中の腸炎ビブリオ数，*tdh* 遺伝子および TDH-V.p O3:K6を指標として実施した．

腸炎ビブリオ数は，2003年までは減少傾向を示し，2004年以降は100ml あたりの対数値が，表層海水では0.85～1.17（1998年の約2分の1），底層海水では0.95～1.37で推移している．それに比べて，*tdh* 遺伝子検出率は2001～2004年まで増加傾向を示し，2005年に激減し，2006，2007年と低値で推移している．一方，腸炎ビブリオによる食中毒の発生状況は，集団食中毒は

表３．富山県内漁港海水および海泥における *tdh* 遺伝子および TDH 産生性腸炎ビブリオ O3:K6の検出状況（2000～2007年）

漁港	年	検体	6月上旬	6月下旬	7月上旬	7月下旬	8月上旬	8月下旬	9月上旬	9月下旬	10月	11月
生地	2000	表層海水	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－
		海泥	－	－	－	－	＋	＋	－	－	＋	－
	2001	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
		海泥	－	－	－	－	－	－	－	＋, O3:K6	－	＋
	2002	表層海水	－	－	－	－	－	＋, O3:K6	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－
	2003	表層海水	－	－	＋	－	－	＋	＋	－	－	－
		底層海水	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－
	2004	表層海水	－	－	＋, O3:K6	－	＋	－	－	－	－	－
		底層海水	＋*, O3:K6**	－	－	＋	＋, O3:K6	－	－	－	－	－
	2005	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－
	2006	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
	2007	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
魚津	2000	表層海水	－	－	－	＋	＋	－	－	＋	－	－
		海泥	－	－	－	＋	－	＋	－	－	－	－
	2001	表層海水	－	－	＋	＋	－	＋, O3:K6	－	＋	－	－
		海泥	－	－	＋	＋, O3:K6	－	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	－	－
	2002	表層海水	－	－	－	＋	＋, O3:K6	＋, O3:K6	＋	＋	＋	－
		底層海水	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
	2003	表層海水	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－
		底層海水	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－
	2004	表層海水	＋	＋, O3:K6	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	＋, O3:K6	－	＋, O3:K6	＋	－
		底層海水	＋	＋	＋, O3:K6	＋, O3:K6	－	－	－	－	－	－
	2005	表層海水	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－
	2006	表層海水	－	－	－	－	＋	＋	－	－	－	＋
		底層海水	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－	－
	2007	表層海水	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
新湊	2000	表層海水	－	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－
		海泥	－	－	＋	＋	＋	－	－	－	－	－
	2001	表層海水	－	－	－	＋	＋, O3:K6	－	＋	＋	－	＋
		海泥	－	－	－	＋	－	－	－	＋, O3:K6	＋	－
	2002	表層海水	－	－	－	－	＋	－	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	－
		底層海水	－	－	－	－	＋	＋	＋, O3:K6	＋	－	－
	2003	表層海水	－	＋, O3:K6	－	＋	－	＋	＋	＋	－	－
		底層海水	－	－	－	＋	－	－	－	＋	－	－
	2004	表層海水	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	＋	＋, O3:K6	－	－	＋, O3:K6	＋	－
		底層海水	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	＋, O3:K6	＋	－	－	－	＋	－
	2005	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	＋, O3:K6	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－
	2006	表層海水	－	－	－	＋	＋	－	＋	－	－	＋
		底層海水	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	＋
	2007	表層海水	－	－	－	－	＋	＋	－	－	＋	＋
		底層海水	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	＋
氷見	2000	表層海水	－	－	－	＋	－	＋	－	＋	＋	－
		海泥	－	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	－	＋	－	＋, O3:K6	＋	－
	2001	表層海水	－	－	－	－	＋	－	－	－	＋	＋
		海泥	－	－	－	＋	＋	－	＋	－	－	－
	2002	表層海水	－	－	－	＋	＋	＋	＋, O3:K6	＋	－	－
		底層海水	－	－	－	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	＋, O3:K6	＋	＋	－
	2003	表層海水	－	＋	＋, O3:K6	－	－	－	＋	＋	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	＋	＋	＋	－	－
	2004	表層海水	－	－	－	－	－	＋, O3:K6	＋	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－
	2005	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	－	＋, O3:K6	－	－	－
	2006	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	＋, O3:K6	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
	2007	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－
四方	2000	表層海水	－	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	－	－	－	－	－	－
		海泥	－	－	－	－	－	＋	－	－	＋	＋
	2001	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
		海泥	－	－	－	－	－	－	－	－	＋, O3:K6	＋
	2002	表層海水	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	＋	＋	－	＋	－	－	－	－
	2003	表層海水	－	－	＋	－	＋	－	－	－	＋	－
		底層海水	－	－	－	＋	＋	－	＋	＋	－	－
	2004	表層海水	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	－	－	－	＋	－	－	＋
		底層海水	－	＋, O3:K6	＋, O3:K6	－	－	－	－	－	－	－
	2005	表層海水	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	＋	－	－	－	＋	－	－
	2006	表層海水	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	＋	＋	－	－	－	－
	2007	表層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
		底層海水	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
検出率	*tdh* 遺伝子	表層海水	2/40 (5.0%)	6/40 (15%)	10/40 (25%)	15/40 (38%)	16/40 (40%)	14/40 (35%)	10/40 (25%)	14/40 (45%)	8/40 (20%)	6/40 (15%)
		海泥, 底層海水	3/40 (7.5%)	4/40 (10%)	10/40 (25%)	18/40 (45%)	13/40 (33%)	15/40 (38%)	12/40 (30%)	13/40 (33%)	8/40 (20%)	5/40 (13%)
	TDH＋O3:K6	表層海水	0/40 (0.0%)	4/40 (10%)	5/40 (13%)	2/40 (5.0%)	4/40 (10%)	5/40 (13%)	1/40 (2.5%)	5/40 (13%)	1/40 (2.5%)	0/40 (0.0%)
		海泥, 底層海水	1/40 (2.5%)	2/40 (5.0%)	4/40 (10%)	4/40 (10%)	2/40 (5.0%)	1/40 (2.5%)	3/40 (7.5%)	4/40 (10%)	1/40 (2.5%)	0/40 (0.0%)

*: *tdh* 遺伝子陽性（PCR法）
**: TDH産生性腸炎ビブリオO3:K6分離（免疫磁気ビーズ法）

表４．富山湾漁港海水中の腸炎ビブリオ数と *tdh* 遺伝子検出率（2000～2007年）

腸炎ビブリオ最確数 (/100ml)	*tdh* 遺伝子検出率 2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Total
<10	1/12* (8%)	4/24 (17%)	13/44 (30%)	28/64 (44%)	15/31 (48%)	1/41 (2%)	4/41 (10%)	3/61 (5%)	69/318 (22%)
$10^{1\sim2}$	10/32 (31%)	6/23 (26%)	15/44 (34%)	15/33 (45%)	17/52 (33%)	4/44 (9%)	7/38 (18%)	5/36 (14%)	79/302 (26%)
$10^{2\sim3}$	2/6 (33%)	0/3 (0%)	8/12 (67%)	2/3 (67%)	4/17 (24%)	4/15 (27%)	4/21 (19%)	0/3 (0%)	24/80 (30%)
Total	13/50 (26%)	10/50 (20%)	36/100 (36%)	45/100 (45%)	36/100 (36%)	9/100 (9%)	15/100 (15%)	8/100 (8%)	172/700 (25%)

*: *tdh* 遺伝子陽性数/検体数

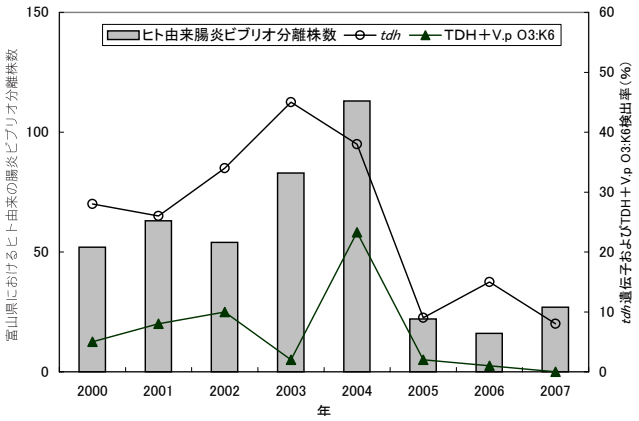


図６．富山湾内漁港海水および海泥中のTDH＋腸炎ビブリオ検出率とヒト由来腸炎ビブリオ分離株数

1998年に11件，そして2003年に5件発生した．また，富山県感染症情報センターに報告されたヒト由来腸炎ビブリオ分離株数は2000～2004年にかけて増加し，2005年以降は激減している．また，2003，2004年のみ6月にも *tdh* 遺伝子が検出されたが，このうち2003年は，県内において6月に集団食中毒が3件発生した．1981年以来，6月に本菌による食中毒が発生したのは初めてであった．これらの結果から，食中毒の発生状況と富山湾海域における *tdh* 遺伝子検出状況は良く相関しており，腸炎ビブリオ数とは関連しないことが明らかとなった．また，免疫磁気ビーズ法により分離された TDH-V.p O3:K6は2004年に多いなど，その検出率はおおむね *tdh* 遺伝子検出率と相関した．しかし2003年は，集団食中毒，ヒト由来分離株数等の食中毒発生状況および *tdh* 遺伝子検出率に比べ，TDH-V.p O3:K6の分離数は極めて少なく，また，海水中の腸炎ビブリオ数も少なかった．2003年は冷夏ではあったが，採水した検体の海水温は他の年と変わりはなく，菌数が少なかった理由については不明である．漁港海水中における腸炎ビブリオ数と *tdh* 遺伝子検出率にはわずかに相関がみられたものの，たとえば2003年のように，菌数が少なくても *tdh* 遺伝子が高率に検出される等，検体によるばらつきがみられた．

腸炎ビブリオは一般的に汽水域に多く分布しているといわれているが，本調査の定点のうち，塩分濃度が低く，いわゆる汽水域である生地漁港の表層海水中の腸炎ビブリオ数は，他の定点と比べ顕著な差はみられなかった．ただし，生地漁港の表層海水は，海水温やpH も低いため，これらの水質条件も菌数に影響を及ぼしている可能性が考えられる．また，*tdh*遺伝子および TDH-V.p O3:K6は，魚津および新湊漁港で検出率が高い傾向がみられた．魚津漁港は県東部，新湊漁港は県西部に位置しており，地理的な偏りはなかった．海水データ（海水温，塩分，pH）にもとくに他港との違いはなく，なぜ両港において検出率が高いのかは不明である．腸炎ビブリオは海水温が15℃以下となる冬季には生きてはいるが通常の培養方法では培養できない状態（viable but not culturable [VBNC または VNC] state）で海泥やプランクトンに付着していると考えられている[7]．これらの漁港の海底や地理的な特徴，あるいは，他のビブリオ属菌などの細菌叢が影響を及ぼしている可能性も考えられる．

海水中の *tdh* 遺伝子は，ヒト由来腸炎ビブリオ分離株数の年次推移と相関しており，　食中毒発生の一指標として有用である．*tdh* 遺伝子 検査法としては，PCR の他にリアルタイム PCR 法や LAMP 法等が開発されている．これらの手技を活用し，海水や魚介類における病原性腸炎ビブリオをリアルタイムに把握できれば，迅速に食中毒に対する注意を喚起できるのではないかと思われる．

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) や

Arbitrarily primed PCR (AP-PCR)等の分子生物学的手法により，1996年以降に分離された *tdh* 遺伝子陽性の血清型 O3:K6，O4:K68，O1:K25，O1:K26および O1:KUT がいわゆる「pandemic group」を形成していることが明らかとなっている [8]．2004年の漁港海水より，GS-PCR 陽性，*tdh* 遺伝子陽性の腸炎ビブリオ O1:K25が分離された． O1:K25は，GS-PCR 陽性のうち O3:K6に次いで2番目に多い血清型であると報告されている[9]．培養法では病原性株を選択的に分離することは現在のところ不可能であるため，富山湾海域における TDH-V.p 汚染実態については血清型 O3:K6に対象を絞り，その検出率を調査してきた．現在は，集団食中毒事例のほとんどが血清型 O3:K6によるものであることから，K6免疫磁気ビーズ法による現行法は有効である．しかし，今後，O3:K6に代わる血清型が新たに流行する可能性は否定できない．血清型によらず，TDH あるいはその類似溶血毒である TDH - related hemolysin（TRH）産生菌の分布状況を迅速，かつ効率的に検査できる手法の開発が望まれる．

謝　　辞

本調査の検体採取は，富山県生活衛生課で作成された計画に基づき，県内各厚生センターおよび富山市保健所職員により行われました．これらの方々，ならびに当細菌部に在籍された諸先生方に深謝いたします．

文　　献

1．厚生労働省医薬局食品保健部長(2001)．食品衛生研究，6，171-172
2．小久保清治 (1969)．海洋生物学，恒星社厚生閣 水産学全集11，200 - 202
3．細呂木志保，田中大祐，平田清久，磯部順子，刑部陽宅，城石将幸，長沢憲嗣 (1997)．富山衛研年報，20，184-186
4．細呂木志保，磯部順子，田中大祐，清水美和子，香取幸治，刑部陽宅，竹内　崇，冨田良一(2001)．富山衛研年報，24，171-174
5．刑部陽宅，細呂木志保，磯部順子，田中大祐，北村敬 (2000)．日食微誌，17，5-10
6．Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H., C., Depaola, A., Kim, Y, B., Albert, M.J. and Nishibuchi, M.(2000). J. Clin. Microbiol., 38, 578-585
7．社団法人　日本食品衛生協会(2007)．食中毒予防必携，第2版
8．Okura M., Osawa R., Iguchi A., Arakawa E., Terajima J. and Watanabe H.(2003). J. Clin. Microbiol., 41, 4676-4682
9．Laohapretthisan, V., Chowdhury, A., Kongmuang, U., Kalnauwakul, S., Ishibashi, M., Matsumoto, C. and Nishibuchi, M.(2003). Epidemiol. Infect., 130, 1-12

富山湾海洋水から分離された細菌種の解析

木全恵子　清水美和子　嶋　智子　金谷潤一　磯部順子　倉田　毅　綿引正則

Characterization of Bacteria Isolated from Seawater in Toyama Bay

Keiko KIMATA, Miwako SHIMIZU, Tomoko SHIMA, Junichi KANATANI,
Junko ISOBE, Takeshi KURATA and Masanori WATAHIKI

要 旨　平成18年，7月と11月に富山湾滑川沖2地点と漁港において海洋水を深度別に採取し，固相担体を用いた増菌培養法による海洋細菌の分離を行った．分離株640株に関して16S rDNA 塩基配列の一部を解析し，417株(65.2%)の菌種・属を同定した．しかし，固相担体を用いた増菌培養法と従来の液相培養法によって得られる分離菌種の有意な差はなかった．417株の採水時期，地点別の分布状況を解析した結果，*Vibrio* sp.，*Pseudoalteromonas* sp.及び *Shewanella* sp.はほとんど全ての採水地点から分離されたが,一部の海洋性細菌群菌種は水深や時季により特有な分布を示した.また，抗生物質 tetracyclin および oxacillin 耐性菌の分離を行った．その結果，得られた耐性菌株には tetracycline 耐性遺伝子 *tetM, tetS, tetB P, tetO, tetQ, tetT*，*tetW*，もしくは oxacillin 耐性遺伝子 *mecA* は検出されず，海洋水にこれらの薬剤耐性遺伝子を保有する薬剤耐性菌の存在は確認されなかった．

はじめに

富山県は標高3000m級の山岳地帯から最深部1200mにも及ぶ富山湾からなり，多様な自然と生物に恵まれている．　近年，富山湾の海洋深層水は滑川および入善の取水施設の充実により，県民がより容易に入手・利用することが可能となった．また，富山湾海洋深層水は平成17年には「富山の名水」のひとつとして選定されている．

深層水は，その低温性，豊富な無機栄養塩類，細菌学的な清浄性が大きな特徴といわれている．我々は，深層水取水口に限定しない富山湾の全体的な特徴を把握する目的で，地点別及び深度別に採水した海水から直接従属栄養細菌の分離培養を行った．その結果，病原細菌は検出されないこと，所謂「深層水」と言われる海水には約10^2cfu/ml 程度の海洋細菌が検出されるに過ぎないことが明らかとなり，富山湾海洋深層水の清浄性を報告した[1]．しかし，陸上から天然水，雨水や下水道排水等を受け入れる富山湾の特性を評価する方法として，環境細菌の直接分離培養法が適切であるかどうかの判断は簡単にできないという問題点は依然として挙げられる．

最近，環境中の細菌の生態に関する研究，特に海洋水の研究で以下のような注目すべき報告がいくつかされている．1）海洋中の細菌の約99%は培養できない細菌であり，我々が培養して解析できるのは１%程度しかない[2]．2）海洋水中に存在する細菌の生態に関して，マリンスノーのような有機性顆粒や動物との関係や VBNC（viable but noncultureable）状態が議論されている[3]．3）世界の外洋海水中から，48kDa の分子量を持つ蛋白質が共通に検出されたという報告がある．この蛋白質をさらに分析したところ，緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*)の外膜蛋白質（OprP)の可能性が指摘された[4]．また，最近，海洋性 *P.aeruginosa* の分離と臨床分離株との遺伝的な関係が報告された．この海洋性 *P.aeruginosa* 分離株は臨床分離株と遺伝的に類似性が高く，多くの薬剤に対して耐性であった [5].

我々がこれまで報告してきた結果を以上の新しい知見を踏まえて考察すると，１）我々の採用している分離法では，化学合成従属栄養細菌の一部のものしか検出できないこと（ただし，人に感染し病気の原因となる菌の存在に関するスクリーニングとしては十分である.），2）*P.aeruginosa* をはじめとする様々な細菌が薬剤に対して耐性を獲得していることが課題として挙げられる．

我々は，これらの２つの課題について富山湾の環境細菌のより詳細な解析を行った．第一に，存在するといわれている細菌の１%程度しか解析できないのであれば，分離方法を工夫する必要があると考えられる．Grossart らは有機顆粒に吸着し，コロニーを形成する細菌群は菌種間の相互作用により有機顆粒上でのコ

ロニー形成パターンを変化させることを報告しており，これらの有機顆粒上に形成されたコロニー群の代謝産物やコロニー群による有機顆粒の分解物が海洋の浮遊層に存在する細菌に与える影響を示唆している[3]．そこで我々は遊離状態というよりも個体表面との接触による細菌の増殖への影響の可能性を鑑み，分離培養前に固相担体と接触させて増菌培養を行った．用いる固相担体と採水地点，深度別海水の違いについてそれぞれ同定した分離細菌相を比較した．第二に， 院内感染で問題となる耐性菌の耐性機構は，そのほとんどが自然耐性とは異なり，所謂「耐性遺伝子」により獲得されたものである．その耐性の獲得は，細菌間における遺伝子伝播により起こることが知られている．従って，これらの薬剤耐性菌と薬剤耐性遺伝子の分布は，ヒトを中心とした生活環境と自然環境の接点であると考えられる．そこで，自然環境に対して我々の生活環境が与える影響について，薬剤耐性遺伝子の検出を富山湾海洋深層水の清浄性の指標として利用可能であるか評価した．

材料と方法

海水の採取：深度別の海水の採取は，富山県滑川市沖で富山県水産試験場（現 富山県農林水産総合センター水産研究所）所有の漁業調査船「立山丸」により平成18年7月19日と11月10日に行なわれた．採水地点は，漁港，滑川市沖の St.40（東経137度17分，北緯36度50分）及び富山湾の中心に近い St.08（東経137度13分，北緯37度0分）である（Figure 1）．採水は漁港水深0m ，St.40においては水深0m，100m 及び St.08においては水深0m，100m，700m の各水深から専用の採水機を用いて，各々2L ずつ滅菌ポリ容器に採水し，10℃以下に保ち当所に搬入した．この検体200ml を，0.2μm メンブレンフィルター（直径47㎜，Advantec Membrane Filter，東洋濾紙）を用いてろ過し，メンブレンフィルターを増菌培養に用いた．

増菌培養：増菌培養は20ml のマリン培地（Marine Broth 2216，Difco）及び20ml 人工海水（アクアマリンS，八州薬品株式会社）を基本培地として用いた．増菌培養時に添加する固相担体として、直径10㎜のレンズ様に固化させたマリン寒天培地（Marine Agar 2216，Difco）をそれぞれ0ml，1ml，10ml，さらに20％ゼラチン加マリン培地10ml、及び無機性の固相担体としてガラス玉（直径4㎜）10ml をそれぞれ添加した．これらの培地に海水50ml 相当量のフィルター（1/4）をそれぞれ添加し，22℃で7日から14日間培養した（Figure 2 ）．通常腸内細菌の培養は35℃から

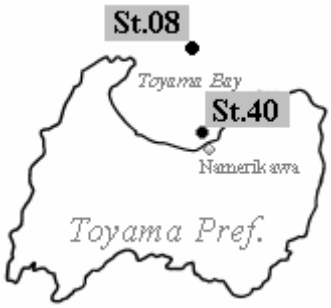


Figure 1．Sampling Spots in Toyama Bay

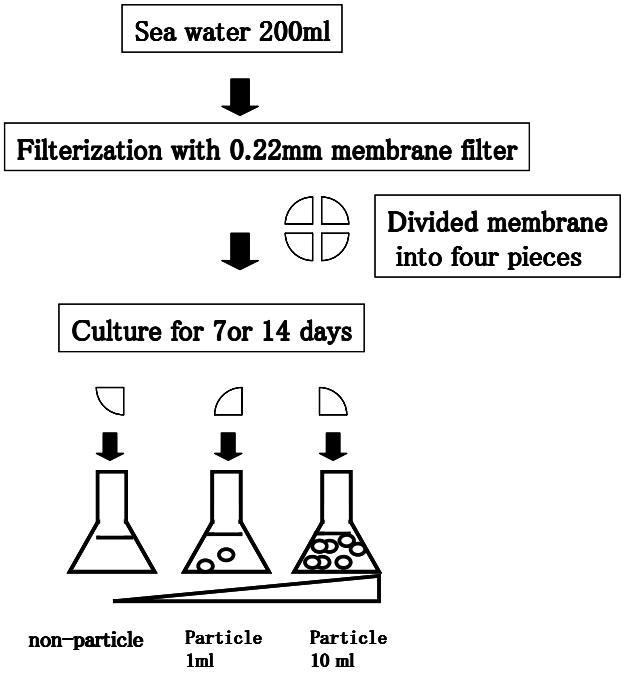


Figure 2．filteration and first-culture

37℃であるが，ここでは海洋細菌，特に好冷性海洋細菌の存在も考慮し，22℃で培養した．各培養条件の7日間培養液及び14日間培養液の1白金耳をマリン寒天培地に塗抹し， 22℃で2日間培養した．発育したコロニーの形状を観察し，形状の異なるコロニーを各培養液につき8株（計640株）をマリン寒天培地に再分離し，合計1280株を分離した．得られた各増菌培養液及び分離菌株は50％グリセロール加マリン培地に懸濁し，－80℃で凍結保存した．

分離菌のDNA抽出：５％キレックス懸濁液（10mM Tris-HCl,1mM EDTA，pH8.8，W/V；Bio-Rad 社）200μl に菌体を懸濁し，100℃ 10分間処理し，直ちに遠心（13,000rpm×３分）した．遠心後の上清約200μl を新しいチューブに移し，DNA 溶液とし，使用まで－20℃にて凍結保存した[6]．

16S rDNA の PCR と塩基配列決定：分離菌の16S

rDNAのPCRは，以下の条件で行った．反応液28μl（Promega社 Green Colorless Go Taq Reaction Buffer，0.25 m M 各 dNTP 及び GoTaq DNA Polymerase 1.5U，プライマー#519 2μM，プライマー#520 2μM）に上述の方法により抽出したDNA 2μlを添加した．反応液を94℃1.5分加熱変性後，PCR反応（94℃ 0.5分，50℃1分，60℃1分）30サイクルを行った．PCR反応はTakara PCR Thermal Cycler MP（タカラバイオ）にて行った．プライマー#519及びプライマー#520は，すべての細菌の16S rDNA遺伝子を増幅するとされているプライマーであり，その塩基配列は#519: 5'－CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'，#520: 5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T－3'である[7]．これらのプライマーは北海道システムサイエンス社に合成依頼した．QIAquick 96 PCR Purification Kit (QIAGEN社)を用いPCR産物を精製した後，プライマー#519とBigDye Terminator Kit V3.1(Applied Biosystems)を用いてダイターミネーター反応を行い，反応産物を精製後，ABI3100 Genetic Analyzer (Apllied Biosystem Japan) を用いて塩基配列を決定した[1].

塩基配列の解析：得られた配列から大腸菌16S rDNA配列の5'末端側430塩基（大腸菌MG1655株の1541塩基から成る*rrsA*遺伝子の塩基番号91-520）に相当する相同領域を抽出し，Blastnプログラム（http://www. ddbj.nig.ac.jp）を用いて相同性検索を行なった[6，8].

薬剤耐性菌の分離と薬剤感受性試験：凍結保存したマリン培地による増菌培養液24サンプルについて1白金耳をマリン寒天培地に塗布し，20℃で2日間培養した．発育したコロニーについてその形態等の特徴を考慮し，なるべく偏らないように1サンプルにつき48コロニー（合計1152コロニー）をマリン寒天培地に再分離した．これらのコロニーを30μg/ml oxytetracycline (oxytetracycline hydrochloride，Sigma ）1%NaCl加ミューラーヒントン寒天培地（関東化学）または30μg/ml oxacillin（oxacillin sodium monohydrate，和光）1%NaCl加ミューラーヒントン寒天培地に接種し，20℃で2日間または3週間培養した．生育したコロニーは16S rDNA塩基配列を決定し，菌種の同定を行った．30μg/ml oxytetracycline存在下において生育したコロニーは，さらに30μg/ml tetracycline（tetracycline hydrochloride，和光）1%NaCl加ミューラーヒントン寒天培地（関東化学）にて発育を確認した後，Kirby-Bauer法に基づいたディスク法（センシ・ディスク，日本ベクトン・ディッキンソン）及びE-test（アスカ純薬）により薬剤に対するMIC測定を行った．方法はCLSIのプロトコールに準拠した[9,10].

薬剤耐性遺伝子のPCR：tetracyclineもしくはoxacillin存在下において生育したコロニーは，ゲノムDNA抽出を行い，PCRでの薬剤耐性遺伝子の検出を行った．各薬剤耐性遺伝子を検出するプライマーおよびPCR反応条件はそれぞれAminovら[11]，Gehaら[12]の報告に従い行った．tetracycline耐性遺伝子はリボソーム阻害型タイプ*tetM, tetS, tetBP, tetO, tetQ, tetT, tetW*の検出を試みた[11]．PCR反応液18μl（Promega社 Green Go Taq Reaction Buffer，0.25 mM 各dNTP及びGoTaq DNA Polymerase 1.0U，各プライマー1μM）にDNA 2μlを添加し，94℃5分加熱変性後，PCR反応（94℃ 0.5分，各アニーリング温度 0.5分，72℃0.5分）25サイクルを行い，最後に72 ℃で7分 加熱した．Oxacillin耐性に関する遺伝子としては指標の一つとして*mecA*遺伝子の検出を試みた[12]．PCR反応液20μl（Green Go Taq Reaction Buffer，0.25mM 各dNTP及びGoTaq DNA Polymerase 1.0U，各プライマー1μM，DNA 2μl）を94℃ 4分加熱変性後，PCR反応（94℃ 45秒，50℃ 45秒，72℃ 1分）30サイクルを行い，最後に72℃で4分加熱した．PCR反応はTakara PCR Thermal Cycler MP（タカラバイオ）にて行った．

結　　果

増菌培養時に添加する固相担体による分離菌へのの影響

今回，我々は固相担体としてマリン寒天培地，ゼラチンをレンズ様の顆粒体に固化させたものとガラス粒子を増菌培地に添加した．培養中では前者の有機担体の分解が観察され，これらの有機担体が細菌増殖時の養分として資化されていた．上述の培養により得られた分離菌についてコロニーの形態等の特徴を考慮してこれらの分離株から640株を選別し,16S rDNA解析を行った．Table 1及びTable 2に16S rDNA解析によって得られた同定結果を示す．全体として，16S rDNA解析に用いた分離菌640株のうち，Ratio値が1.9以上であった株は417株(65.2%)，Ratio値1.7～1.9未満であった株は82株(12.8%)，同定不能であった株は141株(22.0%)であった．同定率に関しては採水地点,培地等による影響はみられなかった．分離株640株のうち，16S rDNA塩基配列の解析により菌種同定が可

能であったのは417株で，固相担体の存在下で得た分離株は295株，液相のみで得た分離株は122株であった．このうち，液相のみで特異的に分離された株は7月採水検体より27株，11月採水検体より23株で採取時期によらず，分離菌株の10%程度であった．特異的に分離された株の菌種間の比較では1株1菌種の分離株が多く，液相のみと固相担体による培養条件の有意な差をみることはできなかった．しかし，採取時期によらず，液層特異的に分離された菌種は Bacterium WP2ISO19（6株）のみであった．

採水時節、地点別及び深度別海水と分離菌

今回，同定された菌種について採水地点・採水時期及び増菌培養時間による分離状況を Table 1及び Table 2に示す．分離菌株のほとんどは海水あるいは海洋生物（魚類や藻類等）より分離が報告された菌種，属であった．同定された微生物群相は培地の種類よりも増菌培養期間（7日間と14日間）及び採水時期（7月と11月）により大きく異なっていた．

増菌培養期間（7日間と14日間）による同定菌種について Table 1及び Table 2に示した． Table 1及び Table 2に示した菌種のうち，14日間増菌培養によってのみ分離された菌種が占める割合は7月及び11月についても漁港(水深0m)， St. 40 (水深0m) ，St. 40 (水深100m)，St. 08(水深0m)ではそれぞれ30～50%と一定の割合を占めていた.しかし，St. 08の水深100m及び水深700mでは，14日間増菌培養固有の分離菌種は7月採水検体ではそれぞれ31.8%，14.3%であったが，11月採水検体では13.3%，53.8%と14日間増菌培養により検出される細菌種の変動が大きかった．

次に採水時期（7月と11月）による分離菌種を比較した(Table 1，Table 2). St. 40 (水深100m)，St. 08（水深100m），St. 08（水深700m）の7月採水検体からは全て *Pseudomona* sp.が分離されたが，11月の同採水地点からは全く分離されなかった．*Bacillus* sp. 及び Bacterium WP1ISO11近縁種は St. 08（水深700m）の11月採水分の検体のみ分離された.海洋表面上の採水地点，漁港(水深0m)， St. 40 (水深0m)では7月においてのみ*Tenacibaculum* sp., *Cellulophaga lytica* 近縁種が検出された．

採水時期ごとに分布が異なる菌種は Bacterium WP3ISO9近縁種であり，7月採水時は St. 40 (水深100m)，St. 08（水深100m），St. 08（水深700m）にて分離されたが，11月採水時は上記の採水地点に加えSt. 40 (水深0m)，St. 08(水深0m)と海面付近においても分離された．

また，*Vibrio* sp.は7月，11月の全ての採水地点から，*Pseudoalteromonas* sp.は11月の St. 08（水深700m）を除く7月，11月の全ての採水地点から検出された.*Shewanella* sp.は7月，11月の水深100m以上の全ての採水地点から分離された．

7月の漁港(水深0m)，St. 40 (水深0m)で分離された黄色細菌,*Tenacibaculum* sp., *Cellulophaga lytica* 近縁種は海洋環境の炭素循環サイクルという点で注目すべき細菌であった.これらの近縁種は7月の漁港(水深0m)， St. 40 (水深0m)からも分離された．

抗生物質耐性菌のスクリーニング

マリン培地により各採水地点，採水時期，採水深度ごとに増菌した培養液24検体から，それぞれ48コロニーを再分離した．これらの計1152個のコロニーについて、tetracyclin および oxacillin の耐性を調べ， 16S rDNA 解析による菌種の同定を行った．その結果と得られた tetracyclin 耐性を示した菌株を Table 3に，oxacillin については Table 5にそれぞれ示した．なお，ここでは増菌培養液より分離を試みたため，同一検体より分離した菌株のうち，16S r DNA 解析により同一種と判定された株については記載していない．今回分離された tetracyclin 耐性菌は11菌株であり，1株を除く全ての菌株は14日間増菌培養液より分離された．また，その72.7%は7月に漁港付近（深度0m）で採水した検体より分離された．これら11株のうち，16S r DNA 解析により属もしくは種まで同定できたのは4株（36.4%）であった．同定された4種及び BLAST による同定 Ratio 値がやや低い1種はそれぞれグラム陰性菌 *Pseudidiomarina* sp.，*Alcaligenes* sp.， *Leucobacter komagatae*，*Bacillus cereus* 2株であった．同定された tetracyclin 耐性菌5株の tetracyclin の MIC は *Pseudidiomarina* sp.を除き，32μg/ml ～48μg/ml であった（Table 4).

oxacillin 耐性菌は Table 6に示した30株であり，その73.3%は14日間増菌培養液より分離された．これらの株の86.7%は漁港付近(深度0m)及び St. 40（深度0m)，St. 40（深度100m）の地点より採水した検体より分離され，季節的な変動は観察されなかった．分離された30株のうち16S r DNA 解析により属もしくは種まで同定できた株は22株（73.3%）であった．同定された20種及びBLASTによる同定Ratioの値がやや低い2種はそれぞれグラム陰性菌 *Pseudoaltermonas* sp. 6株，*Halomonas* sp. 4株，*Pseudomonas* sp. 3株， *Vibrio* sp. 3株,*Marinomonas* sp. 1株，*Shewanella* sp. 1株，*Pseudomonas putida* 1株，*Pectobacterium carotovorum* 1株，*Halomonas venusta* 1株，Bacterium WP1ISO10 (Ratio 値1.89)

Table1.1　Bacterial species in the Yoyama Bay. on 2006 Jul.

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
fishing	AY345405 Bacterium K2-7	1.98	1	
port	DQ985875 Bacterium WP3ISO14	1.9	1	
0m	DQ985882 Bacterium WP3ISO21	1.95	1	
	AB032509 *Cellulophaga lytica*	1.95	2	
	EF134718 *Ruegeria pelagia* strain HTCC2663	1.95		2
	AB201058 *Halomonas* sp. INCT131	1.92		1
	AJ781046 *Leucobacter chromiireducens*	1.98		1
	AJ746337 *Leucobacter komagatae*	1.98		1
	DQ011528 *Marinomonas communis* strain LMG 286	1.93	1	
	AB257299 *Microbacterium esteraromaticum*	1.92		1
	AB176662 *Myroides* sp. SM1	1.95		1
	AJ551132 *Pseudoalteromonas* sp. es32	1.98	1	1
	AY660956 *Pseudoalteromonas* sp. 50/3	1.95	2	2
	AF539789 *Rhodobacteraceae bacterium* R11	1.98		1
	AY955394 *Roseobacter* sp. YSCB-3	1.91		1
	DQ005210 *Shewanella fidelis* isolate CE1F4ITS2	1.95	1	1
	AY661694 *Tenacibaculum lutimaris* strain TF-53	1.98		1
	AB032502 *Tenacibaculum mesophilum*	1.95		3
	DQ068942 *Vibrio parahaemolyticus*	1.98		1
	AJ345064 *Vibrio* sp. LMG 20363	1.9	1	1
	AY837010 *Vibrio* sp. 13D01	1.98		1
		total	11	20

Table1.2　Bacterial species in the Yoyama Bay. on 2006 Jul.

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.40	DQ334341 Bacterium CWISO1	1.98	1	
0m	DQ985847 Bacterium WP2ISO20	1.98	1	1
	EU651806 *Pseudoalteromonas* sp. PS5-2	1.98	4	
	DQ319009 *Pseudoalteromonas* sp. OC-A5-14	1.98		2
	DQ888851 Alpha proteobacterium 1413	1.98		1
	DQ985837 Bacterium WP2ISO10	1.98		1
	DQ985850 Bacterium WP2ISO23	1.96	1	
	DQ985879 Bacterium WP3ISO18	1.9	1	
	DQ985882 Bacterium WP3ISO21	1.95	1	
	DQ825665 *Brevundimonas* sp. LSH-3	1.94		1
	AB032509 *Cellulophaga lytica*	1.97		1
	AB006760 *Oceanospirillum beijerinckii beijerinckii*	1.98	1	
	AY745871 *Pseudoalteromonas* sp. JL-96	1.98		1
	AY745859 *Roseobacter* sp. JL-126	1.97		1
	EF134718 *Ruegeria pelagia* strain HTCC2663	1.98		2
	DQ026023 *Shewanella algae* isolate 27	1.95		1
	DQ883817 *Shewanella algae* isolate 62	1.98		1
	AY661694 *Tenacibaculum lutimaris* strain TF-53	1.98		1
	EU651805 *Tenacibaculum* sp. PS4-6	1.98		2
	AY911397 *Vibrio harveyi* strain SW-4	1.92	1	
	DQ146977 *Vibrio* sp. V125	1.97	2	
	AY836965 *Vibrio* sp. 12F11	1.98	1	
		total	14	16

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.40	DQ334341 Bacterium CWISO1	1.98	1	
100m	DQ985847 Bacterium WP2ISO20	1.98		1
	EU651806 *Pseudoalteromonas* sp. PS5-2	1.98		3
	DQ319009 *Pseudoalteromonas* sp. OC-A5-14	1.98	3	
	AY345405 Bacterium K2-7	1.96		1
	DQ985828 Bacterium WP2ISO1	1.98	1	
	DQ985880 Bacterium WP3ISO19	1.97	1	
	DQ985870 Bacterium WP3ISO9	1.98	3	
	DQ660383 *Photobacterium* sp. JCS285	1.98	1	
	AJ551132 *Pseudoalteromonas* sp. es32	1.98	3	
	AB180385 *Pseudoalteromonas* sp. No. 53	1.97		1
	EF198247 *Pseudoalteromonas* sp. MACL07	1.98		10
	EU438854 *Pseudomonas putida* isolate 24	1.97		3
	EF584096 *Shewanella* sp. WA3	1.98	1	
	DQ834997 *Vibrio* sp. FOH-25	1.98	1	
	AJ874361 *Vibrio splendidus*	1.98	2	
	total	17		19

Table1.3　Bacterial species in the Yoyama Bay. on 2006 Jul.

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.08	DQ888851 Alpha proteobacterium 1413	1.98		1
0m	DQ011528 *Marinomonas communis* strain LMG 286	1.98	2	
	AJ551132 *Pseudoalteromonas* sp. es32	1.98	3	
	DQ334341 Bacterium CWISO1	1.98	1	
	DQ416663 Bacterium w3cb11	1.98	1	
	DQ985828 Bacterium WP2ISO1	1.98	1	
	DQ985846 Bacterium WP2ISO19	1.9	2	
	DQ985847 Bacterium WP2ISO20	1.98	1	
	EF512124 *Marinobacter alkaliphilus*	1.98		2
	AY654760 *Mucus* bacterium 11	1.92		1
	AB006768 *Oceanospirillum pusillum*	1.97		1
	AB180385 *Pseudoalteromonas* sp. No. 53	1.98	3	6
	AM179825 *Pseudoalteromonas* sp. SOBB3	1.92	4	2
	DQ319016 *Pseudoalteromonas* sp. OC-C3-5	1.97		1
	AY870674 *Pseudomonas mendocina* strain 174	1.98		1
	AM184286 *Pseudomonas putida*	1.97		1
	DQ146977 *Vibrio* sp. V125	1.97	1	
		total	19	16

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.08	DQ011528 *Marinomonas communis* strain LMG 2864	1.9	1	
100m	AJ551132 *Pseudoalteromonas* sp. es32	1.98	5	
	DQ985837 Bacterium WP2ISO10	1.98		1
	DQ985850 Bacterium WP2ISO23	1.97	2	
	DQ985870 Bacterium WP3ISO9	1.98	1	
	AM990699 *Pseudoalteromonas* sp. MOLA 432	1.98	4	4
	EU438854 *Pseudomonas putida* isolate 24	1.98		3
	AJ874361 *Vibrio splendidus*	1.97		1
	AF242274 *Vibrio* sp. Sk1	1.97	4	
	DQ985811 Bacterium WP1ISO1	1.98	1	
	AM990785 *Pseudoalteromonas* sp. MOLA 9	1.98	1	2
	EF198247 *Pseudoalteromonas* sp. MACL07	1.98		5
	AM403728 *Pseudomonas* sp. EP37	1.98		1
	AF420313 *Shewanella fidelia* strain KMM3589	1.98	2	
	AB081762 *Shewanella sairae*	1.98	3	
	DQ325519 *Shewanella* sp. I09	1.96	1	
	AY620971 *Vibrio pomeroyi* strain 337.98	1.98	1	
	AM990754 *Vibrio* sp. MOLA 530	1.96	2	
	AY836813 *Vibrio* sp. 1B02	1.93	1	
	AY370017 *Vibrio* sp. L536	1.94	2	
	AY836969 *Vibrio* sp. 12G03	1.97		1
	AY911393 *Vibrio vulnificus* strain MP-4	1.98		1
	total	31	19	

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.08	DQ888851 Alpha proteobacterium 1413	1.93	1	
700m				
	DQ985837 Bacterium WP2ISO10	1.98	1	4
	DQ985850 Bacterium WP2ISO23	1.97	3	
	DQ985870 Bacterium WP3ISO9	1.97	1	
	AM990699 *Pseudoalteromonas* sp. MOLA 432	1.98	1	
	EU438854 *Pseudomonas putida* isolate 24	1.97	3	5
	AJ874361 *Vibrio splendidus*	1.98	1	
	AF242274 *Vibrio* sp. Sk1	1.97	1	
	DQ888854 Alpha proteobacterium 1417	1.93	1	
	DQ983424 Gamma proteobacterium JAUIB93	1.97		1
	EU346569 Marine sponge bacterium PLATEmucin+(1)-25	1.97	3	
	DQ514304 *Phaeobacter arcticus* strain 20188	1.92		2
	FM163071 *Pseudoalteromonadaceae* bacterium ACEMC 4-1	1.98	3	1
	CP000304 *Pseudomonas stutzeri* A1501	1.97	1	
	total	20	13	

Table2.1 Bacterial species in the Yoyama Bay. on 2006 Nov.

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
fishing port 0m	DQ334341 Bacterium CWISO1	1.98	1	
	DQ985848 Bacterium WP2ISO21	1.98	1	2
	DQ985850 Bacterium WP2ISO23	1.98	2	
	DQ985833 Bacterium WP2ISO6	1.94	1	
	AB238790 *Glaciecola sp.* #105	1.97	1	
	AY028201 Marine bacterium Tw-6	1.95		1
	AF366003 Marine CFB-group bacterium SB9	1.93	1	
	DQ480145 *Marinomonas sp.* D6084	1.92		2
	DQ313676 *Pseudoalteromonas sp.* UCH-51	1.98	1	1
	X81621 *S.alga*	1.95		1
	AF420312 *Shewanella fidelia* strain KMM3582T	1.95		1
	AY837008 *Vibrio sp.* 13C11	1.97	3	
	DQ313685 *Vibrio sp.* UCH-85	1.98	1	
	X76333 *V.vulnificus* (ATCC 27562 T)	1.97		1
		total	12	9

Table2.2 Bacterial species in the Yoyama Bay. on 2006 Nov.

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.40 0m	DQ985870 Bacterium WP3ISO9	1.98	1	
	AF420312 *Shewanella fidelia* strain KMM3582T	1.98	1	
	AF420313 *Shewanella fidelia* strain KMM3589	1.95	2	
	DQ313685 *Vibrio sp.* UCH-85	1.98	1	
	DQ985848 Bacterium WP2ISO21	1.98		1
	DQ985850 Bacterium WP2ISO23	1.98		1
	DQ334341 Bacterium CWISO1	1.98	1	
	AY028201 Marine bacterium Tw-6	1.97	1	
	AY745826 *Marinomonas sp.* JL-55	1.98	1	
	DQ313668 *Pseudoalteromonas sp.* UCH-20	1.98	1	
	AJ551132 *Pseudoalteromonas sp.* Es32	1.98	1	2
	DQ313676 *Pseudoalteromonas sp.* UCH-51	1.98	1	
	DQ310476 *Pseudoalteromonas sp.* 28/25	1.98		1
	AY586529 *Shewanella sp.* CAM090	1.98		1
	DQ842241 *Vibrio harveyi* isolate 2	1.95		1
	EF011651 *Vibrio harveyi* isolate VHJR14	1.98		2
	DQ146936 *Vibrio harveyi* strain LB5	1.95	1	
	DQ267796 *Vibrio sp.* UOH-01	1.98		1
		total	12	10

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.40 100m	DQ985870 Bacterium WP3ISO9	1.97	3	2
	AF420312 *Shewanella fidelia* strain KMM3582T	1.98	1	4
	AF420313 *Shewanella fidelia* strain KMM3589	1.98	2	
	DQ313685 *Vibrio sp.* UCH-85	1.98		1
	DQ416575 Bacterium S1cc15	1.9	1	
	DQ985846 Bacterium WP2ISO19	1.9	3	1
	DQ985880 Bacterium WP3ISO19	1.98		1
	DQ401135 *Pseudoalteromonas citrea* clone L3	1.97	2	2
	AY870668 *Pseudoalteromonas piscicida* strain 55.9I	1.97	1	
	AF313497 *Pseudoalteromonas sp.* A3	1.96	1	
	DQ834981 *Pseudoalteromonas sp.* AOH-53	1.98	2	
	AY612754 *Pseudoalteromonas sp.* 18III/A01/057	1.98		1
	AY837010 *Vibrio sp.* 13D01	1.97	1	
	AJ421444 *Vibrio penaeicida*	1.96		2
	DQ316107 *Vibrio sp.* OO-D1-3	1.95	1	
	DQ005876 *Vibrio sp.* A356	1.98		1
		total	18	15

Table2.3 Bacterial species in the Yoyama Bay. on 2006 Nov.

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.08 0m	DQ985870 Bacterium WP3ISO9	1.98	6	2
	AY682201 *Pseudoalteromonas chazhmella*	1.92	1	
	AF420312 *Shewanella fidelia* strain KMM3582T	1.97	1	
	DQ313685 *Vibrio sp.* UCH-85	1.98	2	3
	AY643537 Alteromonadaceae bacterium BA-3	1.98	1	
	DQ334341 Bacterium CWISO1	1.98	1	1
	DQ985836 Bacterium WP2ISO9	1.9	1	
	DQ985872 Bacterium WP3ISO11	1.98		2
	DQ097286 Marine alpha proteobacterium RS.Sph.012	1.9		1
	DQ834981 *Pseudoalteromonas sp.* AOH-53	1.98	3	
	EF028091 *Shewanella sp.* 62(2006b)	1.98		2
	DQ995248 *Vibrio harveyi* isolate VHJR16	1.98		1
	DQ146936 *Vibrio harveyi* strain LB5	1.98		1
	AJ437191 *Vibrio penaeicida*	1.95		1
	AJ421444 *Vibrio penaeicida*	1.97		1
	AY837010 *Vibrio sp.* 13D01	1.97		2
	AY836963 *Vibrio sp.* 12F08	1.96		2
		total	16	19

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.08 100m	DQ985870 Bacterium WP3ISO9	1.98	9	11
	AY682201 *Pseudoalteromonas chazhmella*	1.92	2	4
	AF420312 *Shewanella fidelia* strain KMM3582T	1.97	1	
	DQ313685 *Vibrio sp.* UCH-85	1.98	1	
	AB089204 *Vibrio sp.* No.6	1.98		1
	DQ480140 *Vibrio sp.* D4051	1.98	3	
	X82135 *A.aurantia*	1.92		1
	DQ888851 Alpha proteobacterium 1413	1.94	2	
	DQ985837 Bacterium WP2ISO10	1.98	1	
	DQ923439 *Pseudoalteromonas sp.* W-5	1.98	2	1
	AM111031 *Pseudoalteromonas sp.* 7032	1.9	1	
	AB180391 Rhodobacteraceae bacterium No. 63	1.98	1	
	AF420313 *Shewanella fidelia* strain KMM3589	1.98	3	3
	AY837008 *Vibrio sp.* 13C11	1.95	1	
	AY837096 *Vibrio sp.* 14E05	1.94	1	
		total	28	21

Sampling spot	Closest species	Ratio (Score/ Query)	No. of isolates from 7-days culture	No. of isolates from 14-days culture
St.08 700m	DQ985870 Bacterium WP3ISO9	1.97	3	4
	AB089204 *Vibrio sp.* No.6	1.98		1
	DQ480140 *Vibrio sp.* D4051	1.98	4	4
	EF035137 *Bacillus cereus* strain MT5-5	1.98		4
	DQ207729 *Bacillus cereus* strain CCM 2010	1.97	2	
	AY690703 *Bacillus sp.* HZ02	1.91	2	
	DQ985821 Bacterium WP1ISO11	1.93	7	4
	DQ985880 Bacterium WP3ISO19	1.97	1	3
	AY161043 *Brevibacillus sp.* PLC-3	1.95		2
	AF479358 Glacial ice bacterium SB12K-2-1	1.98		1
	AY435156 Photobacterium phosphoreum strain RHE-1	1.93		1
	AB095446 Photobacterium phosphoreum	1.93		2
	AY837115 *Vibrio sp.* 14G04	1.95		1
		total	19	27

Table3. Numbers of tetracycline-resistant bacteria isolated from seawater

Sampling spot	Depth (m)	Period for culture	Sampling Date Jul.	Sampling Date Nov.
fishing port	0	7 days	0	0
		14 days	8(6)	0
St. 40	0	7 days	0	0
		14 days	0	1(1)
	100	7 days	0	0
		14 days	0	0
St. 08	0	7 days	0	0
		14 days	0	0
	100	7 days	0	0
		14 days	0	0
	700	7 days	0	1
		14 days	0	1

＊No. in parenthesis is of non-identifiable isolates.

Table5. Numbers of species of oxacillin-resistant bacteria isolated from seawater

Sampling spot	Depth (m)	Period for culture	Sampling Date Jul.	Sampling Date Nov.
fishing port	0	7 days	3(1)	0
		14 days	2	5
St.40	0	7 days	0	0
		14 days	3(1)	4(3)
	100	7 days	2(2)	2(1)
		14 days	2	3(3)
St.08	0	7 days	0	0
		14 days	0	0
	100	7 days	0	0
		14 days	1	0
	700	7 days	1	0
		14 days	2	0

＊No. in parenthesis is of non-identical isolates.

Table4. Mic* of tetracycline in drug-resistant bacteria isolated from seawater in Toyama Bay. 2006

strain No.	Sampling spot	Depth (m)	Sampling season	Period for culture	Group or species	MIC (μg/ml)
T3	fishing port	0	July	14 days	unknown	64
T5	fishing port	0	July	14 days	unknown	＞256
T6	fishing port	0	July	14 days	unknown	24
T8	fishing port	0	July	14 days	EF212001 *Pseudidiomarina* sp. C121	＞256
T9	fishing port	0	July	14 days	unknown	＞256
T17	fishing port	0	July	14 days	unknown	＞256
T19	fishing port	0	July	14 days	unknown	＞256
T23	fishing port	0	July	14 days	AJ746337 *Leucobacter komagatae*	32
T45	St.40	0	November	14 days	DQ821755.1 *Alcaligenes* sp. IS-18 strain LL52(ratio 1.89)	48
T30	St.08	700	November	7 days	AB244465 *Bacillus cereus*	48
T47	St.08	700	November	14 days	AB244465 *Bacillus cereus*	48

*MIC:minimum inhibitory concentration

1株であった．

抗生物質耐性遺伝子のスクリーニング

分離された tetracycline 耐性株の耐性遺伝子の検索を Aminov らのプライマーを用いた PCR により実施した．対象とする RPPs 遺伝子 *tetB P*，*tetM*，*tetO*，*tetQ*，*tetS*，*tetT*，*tetW* の検出を試みた．その結果，分離された11菌株は全てこれらの遺伝子を保有していなかった．

以上の結果から今回分離された tetracyclin 耐性の11菌株は ribosomal protection proteins (RPPs)遺伝子を保有していないことから，その耐性機構は tetracyclin によるタンパク質合成阻害への防御作用ではないと考えられた．

また，我々は *Staphylococcus* 属の oxacillin 耐性菌においては *mecA* 遺伝子の保有率が高いことに着目し，*mecA* 遺伝子保有型の *Staphylococcus* 属菌の分離について PCR による検出を試みた．その結果，いずれの株からも *mecA* 遺伝子は不検出であった．

考　　察

富山湾の細菌の分離と分布状況

従来，培養法による「生きた」海洋細菌の分離は，海洋細菌全体の１％程度である[2]．これは細菌分離に用いる培地には全て何らかの生育可能菌の選択性を伴う以上回避不可能な課題である．海洋環境には低栄養状態の液相（海水）に固相担体として有機顆粒（マリンスノー等）のほか藻類やデトリタス（生物の死骸やその断片）が存在している．今回，我々は固相担体

Table 6. Oxacillin-resistant bacteria isolated from seawater in Toyama Bay. 2008

strain No.	Sampling spot	Depth (m)	Sampling season	Period for culture	Group or species
O2	fishing port	0	July	7 days	DQ677306 *Pseudoalteromonas sp.*
O4	fishing port	0	July	7 days	AJ784137 *Vibrio sp.* K3-11
O5	fishing port	0	July	7 days	unknown
O41	fishing port	0	July	14 days	AB201058 *Halomonas sp.* INCT131
O42	fishing port	0	July	14 days	DQ480145 *Marinomonas sp.* D6084
O46	St.40	0	July	14 days	DQ533958 *Halomonas sp.* ice-oil-302
O47	St.40	0	July	14 days	EU162034 *Pectobacterium carotovorum* strain CMG1ad
O50	St.40	0	July	14 days	DQ985820 Bacterium WP1ISO10 (ratio 1.89)
O13	St.40	100	July	7 days	unknown
O14	St.40	100	July	7 days	unknown
O52	St.40	100	July	14 days	DQ319039 *Pseudomonas sp.* SC-A5-7
O57	St.40	100	July	14 days	EU330370 *Pseudoalteromonas sp.* BSi20631
O62	St.08	100	July	14 days	EU310376 *Pseudomonas putida strain*
O36	St.08	700	July	7 days	DQ492724 *Pseudoalteromonas sp.* BSi20173
O68	St.08	700	July	14 days	DQ492724 *Pseudoalteromonas sp.* BSi20173
O70	St.08	700	July	14 days	DQ304685 *Pseudomonas sp.* DSS2
O109	fishing port	0	November	14 days	AY880276 *Halomonas venusta strain*
O110	fishing port	0	November	14 days	AB211031 *Pseudomonas sp.* SSCS3
O111	fishing port	0	November	14 days	EU195929 *Shewanella sp.* P117
O112	fishing port	0	November	14 days	AJ967019 *Halomonas sp.* 223
O114	fishing port	0	November	14 days	EU046604 *Pseudoalteromonas sp.* SAL
O115	St.40	0	November	14 days	EU135666 *Halomonas sp.* YIM C736
O116	St.40	0	November	14 days	EU330363 *Pseudoalteromonas sp.* BSi20602 (ratio 1.82)
O117	St.40	0	November	14 days	EU077544 *Vibrio sp.* HN11(ratio 1.88)
O118	St.40	0	November	14 days	unknown
O85	St.40	100	November	7 days	unknown
O86	St.40	100	November	7 days	DQ834995 *Vibrio sp.* FOH-19
O121	St.40	100	November	14 days	unknown
O123	St.40	100	November	14 days	unknown
O124	St.40	100	November	14 days	unknown

（マリン寒天顆粒体等）を増菌培地に添加し，液相単独よりも海洋環境により近い状態とすることで，富山湾に生息する従属栄養細菌種をより多く分離することを試みた．しかし，液相培地でのみ分離された菌株と，固相担体を添加した液相培地でのみ分離された菌株では1菌種1株のみ分離される場合が多く，液相培地と固相担体を添加した液相培地での分離菌種の有意な比較はできなかった．

一般に，公的な遺伝子配列データベースを利用した遺伝子相同性を調べる Blastn 解析に用いた場合，DNA 配列の塩基数(Query)で相同性の違いから計算される Score 値を除した比（Ratio 値）は 2 に近ければ同一種であるとしてよいと言われている［6］.我々は16S r DNA 解析による Ratio 値が1.9以上を同定可能とし，解析を行った．その結果，分離菌640株のうち， 65.2%を菌種・属のレベルで同定することができた．

分離菌640株のうち，同定不可能もしくは Ratio 値1.7～1.9未満であった株は全体の34.8%（223株）であった.このうち，これらの未同定株の分離は，通常の増菌培養法とは異なる本研究での1)長期の増菌培養期間（7日～14日），2) 従来の海洋細菌用液体培地であるマ

リンブロスのほかに貧栄養状態の培地である人工海水による増菌培養の併用によると考えられる．上記の培養法により得られた未同定株は公共データバンク未登録の菌種である可能性も示唆された．また，未同定株の14%は16SrDNA を標的とした PCR・シークエンス反応が全く不可能であった．これらのなかには16S rDNA 解析対象外となる酵母のような真菌類が含まれると考えられる．

Ratio 値1.7～1.9未満であった株の中には，線虫の体表より分離された *Eubostrichus dianae epibacterium* [14]について Ratio 値1.7を示す株が St. 08(水深0m)より分離された．この株と同様に *Eubostrichus dianae epibacterium* について相同性の低い株が室戸海洋深層水の水深320mの地点からも分離されているが，その関連性は不明である[15].また，アルボラン海の水深200－300mより分離された発光細菌 *Shewanella woodi* [16]について Ratio 値1.88を示す株が7月のSt.08（水深700ｍ）の人工海水培養基（貧栄養培地）を用いた増菌培養液に特異的に分離された．

また，今回の分離菌種のうち生育至適温度が低温（4℃～15℃，生育可能温度が25℃まで）である細菌として *Glaciecola* sp. [17]近縁種，*Phaeobacter arcticus* strain 20188 [18]近縁種，Glacial ice bacterium SB12K-2-1[19]近縁種がそれぞれ，11月の漁港(水深0m)地点，7月の St. 08（水深700ｍ）地点，11月の St. 08（水深700ｍ）地点で分離された．11月の St. 08（水深700ｍ）のみ分離された Bacterium WP1ISO11近縁種および11月（冬季）に特異的に海表面での分布が観察された Bacterium WP3ISO9近縁種についても低温の海洋深層や温度の低下した冬季に海表面に特異的に分布することから生育至適温度が低温（4℃～15℃）である可能性が高いと考えられた．

7月，11月の水深100m 未満の全ての採水地点から分離された *Shewanella* sp.は鉄等の金属イオンの還元を行い，環境内の金属の循環に寄与している環境浄化細菌であることから，比較的生物活性も高く海洋汚染物質も多い水深100m 以上の地点に分布し，環境浄化に寄与していると考えられる．また，夏季の湾岸であり,藻類の光合成や原生動物等の活動など生物活性が高い採水地点である7月の漁港(水深0m)，St. 40(水深0m)からは *Tenacibaculum* sp.，*Cellulophaga lytica* 近縁種が分離された．*Tenacibaculum* sp.，*Cellulophaga* sp.は共に滑走細菌群（Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides，以下 CFB 群)に属する．CFB 群は cellurose，agar，chitin 等を分解する「分解者」であり,溶藻や殺藻菌である *Cytophaga* 等が知られている[20].このような富栄養化環境では CFB 群のような「分解者」が増加した可能性が示唆された．

このように富山湾において生育する海洋性細菌群の分布状況は水深や時季により変化していることが明らかとなった．

富山湾の従属栄養細菌の薬剤耐性

tetracyclin 系の抗生物質 oxytetracycline は養殖魚等の水産動物の疾病（ビブリオ病，連鎖球菌症等）の治療，予防に広く用いられている．近年，Kim ら，Furushita らのグループは養殖場の海水及び養殖魚から oxytetracycline 耐性菌の分離及び tetracyclin 耐性遺伝子の検出を報告しており，養殖施設内の海洋細菌及び養殖魚の腸内細菌が薬剤耐性遺伝子の「受け皿」として薬剤耐性遺伝子を拡散する可能性を示唆している[10，21]．

今回我々は後者の菌体内でのリボゾームへの tetracyclin 結合を阻害する RPPs による耐性作用に着目し，その遺伝子検出を試みた． RPPs をコードする tetracyclin 耐性遺伝子のうち *tetM* はトランスポゾン等によりグラム陰性菌・グラム陽性菌に広く分布しており，最も多くの菌種で検出される tetracyclin 耐性遺伝子である[22].

oxacillin 耐性菌においてはメチシリン耐性ブドウ球菌 MRSA の *mecA* 遺伝子に着目した．MRSA はヒトに関わる薬剤耐性菌としては臨床上重要である．また，*mecA* 遺伝子はペニシリン結合性蛋白(penicillin-binding protein，PBP)の遺伝子変異等による β-lactum 剤結合能の低下に関与する薬剤耐性遺伝子である．

上記の他にこのような特異的な薬剤耐性機構を有しない薬剤耐性菌の例として自然耐性菌が知られている．自然耐性菌は，薬剤を菌体内へ透過させる細胞外膜のポーリンの量が少ないこと，ポーリンの口径が小さいことなどにより薬剤の細胞内透過性が低下し，結果的に耐性を示す[23]．また，この膜透過タンパクの低下により自然耐性菌の多くは生育に必要な栄養源，イオン等の菌体内への取り込みも低下しており，生育も他の菌に比べ比較的遅い．このような自然耐性菌は環境中に広く分布しており，例としてと β-lactum 剤自然耐性菌 *Pseudomonas* sp.，*Alcaligenes faecalis* が知られている．今回，我々が分離した tetracyclin 耐性菌および oxacillin 耐性菌はいずれも上記の特異的な薬剤耐性遺伝子を保有しておらず，生育が遅く14日増菌培養のみ分離可能であった．これらのことから，これらの菌が膜透過タンパクの低下による自然耐性菌である可能性が示唆された．

本研究では分離された tetracyclin 耐性菌及び oxacillin 耐性菌においてはその耐性機構については明らかではない．しかしグラム陰性菌・グラム陽性菌間で広域に伝播する *tetM* やその近縁である RPPs 遺伝子，MRSA 等に保有される *mecA* 遺伝子は検出されなかった．従って，平成18年に採水された富山湾海洋水中には少なくともこれらの薬剤耐性遺伝子を保有する薬剤耐性菌の存在は確認されず，富山湾海洋水の清浄性が保たれていると結論した．

謝　　辞

本研究を実施するにあたり，富山湾海洋水の採取に協力頂きました富山県水産試験場（現 富山県農林水産総合センター 水産研究所）・漁業調査船「立山丸」の関係者に感謝致します．

また，本研究は富山県深層水利用研究事業（平成17年～平成19年）において行われた．

参考文献

1．綿引正則・清水美和子・磯部順子・木全恵子・嶋智子・田中大祐・永井美之（2006）．富山衛研年報，29，126－132.
2．石田祐三郎 (2001). 海洋微生物の分子生態学入門, 1-12. 培風館
3．Grossart, H.A., Kiorbe,T., Tang,K., and Ploug,H. (2003). Appl. Environ. Microbiol., 69, 3500-3509.
4．Tanoue, E., Nishiyama, S., Kamo,M., and Tsugita, A. (1995). Geochim. Cosmochim. Acta., 59, 2643-2648.
5．Khan, N.H., Ishii, Y., Kimata-Kino, N., Esaki, H., Nishino, T., Nishimura, M., and Kogure, K.. (2007). Micobiol. Ecol., 53, 173-186.
6．綿引正則・清水美和子・嶋智子・磯部順子・田中大祐・木全恵子・松永明信・永井美之（2005）．富山衛研年報，28，110－119.
7．Olsen, G.J. and Woese, C.R. (1993). FASEB J., 7, 113-123.
8．Kumar, S. Tamura, K. and Nei, M. (2004). Brief. Bioinform., 5, 150-163
9．CLSI. (2005) Performance standards for antimicrobial susceptibility test. M100-S15
10．Kim, S.-R., Nonaka, L., Suzuki, S. (2004) . FEMS Microbiol. Lett., 237, 147-156.
11．Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N., and Mackie, R. I. (2001) . Appl. Environ. Microbiol., 67, 22-32.
12．Geha, D.J., UHL, J.R, Gustaferro, C.A., and Persing, D.H. (1994) . J. Clin. Microbiol., 32, 1768-1722.
13．Suzuki, E., Hiramatsu, K., and Yokota, T. (1992). Antimicrob. Agents Chemother., 36: 429-434.
14．Polz, M.F.,Harbison, C. and Cavanaugh,C. M. (1999). Appl. Environ. Microbiol., 65, 4271-4275.
15．矢田修一，大場雅行，榎本恵一（2003）.海洋深層水研究，4，47-56.
16．Makemson, J.C., Fulayfil, N.R., Landry, W., Van Ert, L.M., Wimpee, C.F., Widder, E.A., and Case, J.F. (1997). Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 1034-1039.
17．Romanenko, L.A., Zhukova, N.V.,Rohde, M., Lysenko,A.M.,Mikhailov.V.,and Stackebrandt,E. (2003). Int. J. Syst. Evol. Micobiol., 53, 647-651.
18．Zhang, D.C., Li, H.R. , Xin, Y.H., Chi, Z.,M., Liu, H. C., Chi, Z.M., Zhou, P.J., Yu,Y. (2008). Int. J. Syst. Evol. Micobiol., 58,1384-1387.
19．Christner, B.C. (2002). Thesis. Ohio State University, 484 W. 12th Avenue, Columbus, OH, USA
20．Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., and Yamamoto, S. (2001). Int. J. Syst. Evol. Micobiol., 51,1639-1652.
21．Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T. and Ohta,M. (2003). Appl. Environ. Microbiol., 69, 5336-5342.
22．Chopra, I and Roberts, M. (2001). Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65, 232-260.
23．中江太治 (1995) ．臨床と微生物, 22, 529-534. 近代出版

平成20年12月１日

大量注入方式ガスクロマトグラフ/質量分析計を用いた魚介類中の有機スズ化合物（MBT，DMT，MPT，DPT）の残留実態調査

山下智富　小玉修嗣　大戸幹也　中山恵理子　高柳信孝

Analysis of Organotin Compounds in Fishes Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection

Tomohisa YAMASHITA, Shuji KODAMA, Mikiya OHTO, Eriko NAKAYAMA, Nobutaka TAKAYANAGI

要　旨　大量注入方式ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS with large volume injection）を用いた有機スズ化合物の分析法を開発，安定同位体（サロゲート物質）を用いた内標準法によって魚介類中に残留しているモノブチルスズ（MBT），ジブチルスズ（DBT），モノフェニルスズ（MPT），ジフェニルスズ（DPT）の残留濃度を測定した.

はじめに

有機スズ化合物は，主に船底塗料や漁網の生物付着防汚剤として利用されてきた.しかし，非常に低濃度でも生物に対して毒性と内分泌攪乱作用を示すことが明らかとなり，世界的な問題となっている[1,2].日本では1991年に第一種及び第二種特定化学物質に指定され，現在では，国内における有機スズ化合物の製造および使用は規制されている状況である.また，2001年には国際海事機関(IMO)の総会において船舶への使用を禁止する条約が採択されている.しかし，海底の堆積物中には長期間にわたり有機スズ化合物が残留することが報告されており，この海底からの溶出が新たな汚染源になることが懸念されている.有機スズ化合物の環境中における動態については未だ不明な点が多い.有機スズ化合物は魚介類に残留するため，食物連鎖による移行および濃縮により海洋生物に慢性的な影響を及ぼす可能性がある.よって，魚介類中における有機スズ化合物の残留量を調査することは，生物に対する残留実態という観点のみならず環境中における動態を知る上でも非常に有用である.

有機スズ化合物としてはトリブチルスズ（TBT）およびトリフェニルスズ（TPT）が有名であり，国内のみならず世界中で残留実態が定期的に調査されている[1,3].しかし，TBT，TPT の分解物である MBT, DBT, MPT, DPT の残留実態についての報告例は多くない.TBT，TPT と同様に MBT, DBT, MPT, DPT も毒性を有している.そのため，MBT, DBT, MPT, DPT の残留実態を明らかにすることは重要である.

近年，著者らは大量注入方式 GC/MS[4]（Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection）を用いて魚介類中の有機スズ化合物を分析する手法を新たに開発した.従来法では，少量の試料（1～2μL）しか装置に注入できないため，試料溶液を数回にわたって少量まで濃縮する前処理操作が必要であった.そのため，前処理操作が複雑になり，十分な測定精度と添加回収率を得るのが困難となっていた.

新たに開発した方法では，100μL の試料溶液を装置に注入し，濃縮操作を胃袋型ライナー内で行なうため，前処理操作の過程を簡略にすることが可能である（図1）.また，分析精度を向上させるために，安定同位体（サロゲート物質）を内標準として使用した.サロゲート物質には，目的の物質と化学的性質が同じで，質量数が異なっているという性質がある.このサロゲート物質を試料採取または前処理段階の試料に添加することによって，添加段階以降から測定までの分析操作に由来する測定値の変動を補正することができる.この新たに開発した方法を用いて，魚介類中の MBT, DBT, MPT, DPT の残留実態を調査したので報告する.

方　　法

1　試料

平成19年に富山県の魚津港および氷見港で水揚げされた魚介類の可食部を細切したものを使用した.

種類：メダイ，マトウダイ，カンパチ，タルイカ，サワラ，ふくらぎ，まぐろ，かつお，サバ

2　試薬

標準品：Butyltin trichloride (Sigma-Aldrich), Di-n-butyltin dichloride（東京化成工業），Phenyltin trichloride（水質検査用，林純薬工業），Diphenyltin dichloride（水質検査用，林純薬工業）

内標準物質：Butyltin trichloride-d_9（水質検査用，林純薬工業），Dibutyltin dichloride-d_{18}（水質検査用，林純薬工業），Phenyltin trichloride-d_5（水質検査用，林純薬工業），Diphenyltin dichloride-d_{10}（水質検査用，林純薬工業）

測定時内標準物質：Tetrabutyltin-d_{36} (TeBT-d_{36})（環境分析用，関東化学），Tetraphenyltin-d_{20} (TePT-d_{20})（環境分析用，関東化学）

テトラエチルほう酸ナトリウム（林純薬工業）は水質試験用，アセトン（和光純薬工業）およびヘキサン（和光純薬工業）は残留農薬・PCB 試験用，水は TORAYPURE LV-05超純水製造装置（東レ株式会社）で精製したものを用いた.

フロリジルカートリッジカラム：Sep-pak Plus Florisil (Waters)を用いた.使用する直前にヘキサン10mL を通して洗浄した.

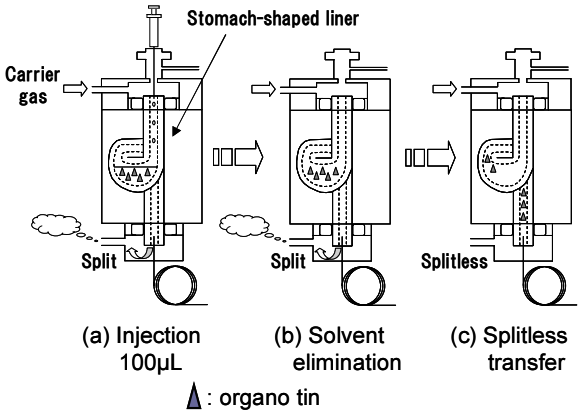


図１．大量試料導入法の概念図

3　ガラス器具の洗浄

試料前処理に用いたガラス器具は，1mol/L 塩酸を含むエタノール，精製水，アセトンで洗浄したものを使用した.その他の器具は，精製水，アセトンで洗浄した.

4　溶液調製

混合標準液の調製： それぞれ標準品を量り、アセトンを加えて定容したものを標準原液とした.それぞれの標準原液から分取して合わせ、アセトンで100 mL としたものを混合標準液とした(1μg/mL).さらにその混合標準液から10mL を分取しアセトンで100 mL とした溶液を調製した(0.1μg/mL).

内標準物質混合溶液： それぞれ内標準物質を量り、アセトンを加えて定容したものを内標準物質原液とした.それぞれの内標準物質原液から分取して合わせ、アセトンで100mL としたものを内標準物質混合溶液とした(1μg/mL).さらに，その内標準物質混合標準液から10mL を分取しアセトンで100mL とした溶液を調製した(0.1μg/mL).

測定時内標準物質溶液： それぞれ測定時内標準物質を量り、少量のアセトンに溶解後，ヘキサンを加えて定容したものを測定時内標準物質原液とした.それぞれの測定時内標準物質原液を分取して合わせ、ヘキサンで100mL としたものを測定時内標準物質混合溶液とした(1μg/mL).さらにその混合液から2mL を分取しヘキサンで20mL とした溶液を調製した(0.1μg/mL).

酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH5)：2mol/L 酢酸及び2mol/L 酢酸ナトリウム溶液を pH5になるように混合した.

表１．SIM 分析におけるモニターイオン

有機スズ化合物（エチル体）	モニターイオン*	内標準物質（エチル体）	モニターイオン*
MBT	235,(233)	MBT-d_9	244,(242)
DBT	261,(263)	DBT-d_{18}	279,(281)
		TeBT-d_{36}	318,(316)
MPT	253,(255)	MPT-d_5	260,(258)
DPT	303,(301)	DPT-d_{10}	313,(311)
		TePt-d_{20}	366,(364)

*(　)内は確認用イオンの質量数

5　装置

GC/MS 装置：GC-17A/QP-5000（島津株式会社）
注入装置：Lavi Stoma（エミネット株式会社）

6　GC/MS 分析条件

カラム：HP-5MS（HP)、内径0.25㎜、長さ30m、膜厚0.25μm

注入口温度； 50℃―100℃/min→280℃(28.7min) Total 31min (100μL試料注入時間；34秒、溶媒蒸発時間；22秒　合計56秒．この後に急速に昇温.スプリット流量；150mL/min、スプリットレス時間；6分)（図2）

カラム槽温度；50℃(4min)－25℃/min→130℃―10℃/min→300℃(9.5min)
Total 34min（図2）

キャリヤーガス；He1.1mL/min
注入；溶媒除去注入法、100μL

インターフェース温度；230℃
圧力設定：　60kPa(3min) － 5.5kPa/min → 170 kPa(11min)　Total 34min

SIM 分析におけるモニターイオン：表1に示す.

7　検量線溶液の調製および試料前処理

検量線溶液の調製方法を図3，試料前処理の方法を図5に示す[5,6].解析時にはサロゲート物質のピークを用いて補正を行なう.

したがって，いずれの過程においても，サロゲート物質を添加した後に調製および前処理を行なった.検量線作成に用いた標準混合溶液 3 ppb (内標準混合溶液 1 ppb を含む)のクロマトグラムを図4に示す.目的物質および内標準物質ともに良好なピークが観測された.

結果および考察

1　測定結果

測定結果を表2に示す.いくつかの魚種から，MBT が検出された.日本国内の他の地域においても魚介類中から有機スズ化合物が検出されている例が多数存在する[1, 7-10].よって，富山県においても有機スズ化合物が検出されることは十分にありうる.

有機スズ化合物の測定は世界中で行なわれており，魚介類，海水，海底堆積物中から検出されている.日本国内においても全国の主要湾内における海底堆積物中の有機スズ測定が定期的に実施されており，富山湾においても海底堆積物中に TBT が微量ながら存在していることが報告されている[3]（最小値0.0002㎎/g 未満（不検出)，最大値0.0087㎎/g: 海洋汚染調査報

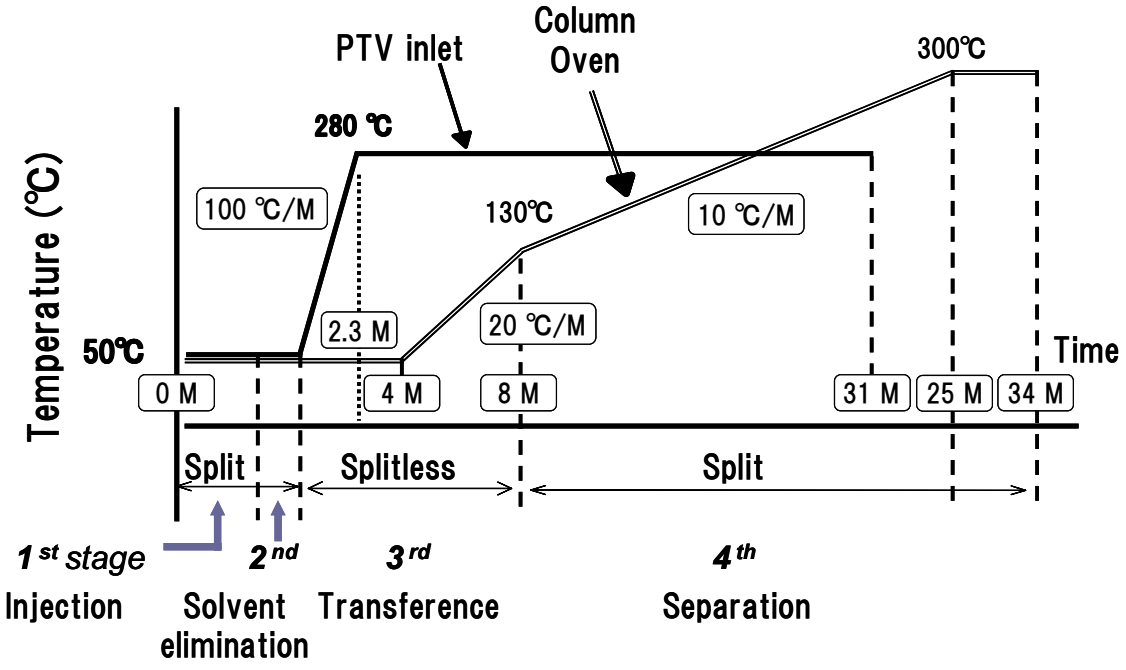


図２．有機スズ化合物分析における注入口とカラム槽の昇温条件

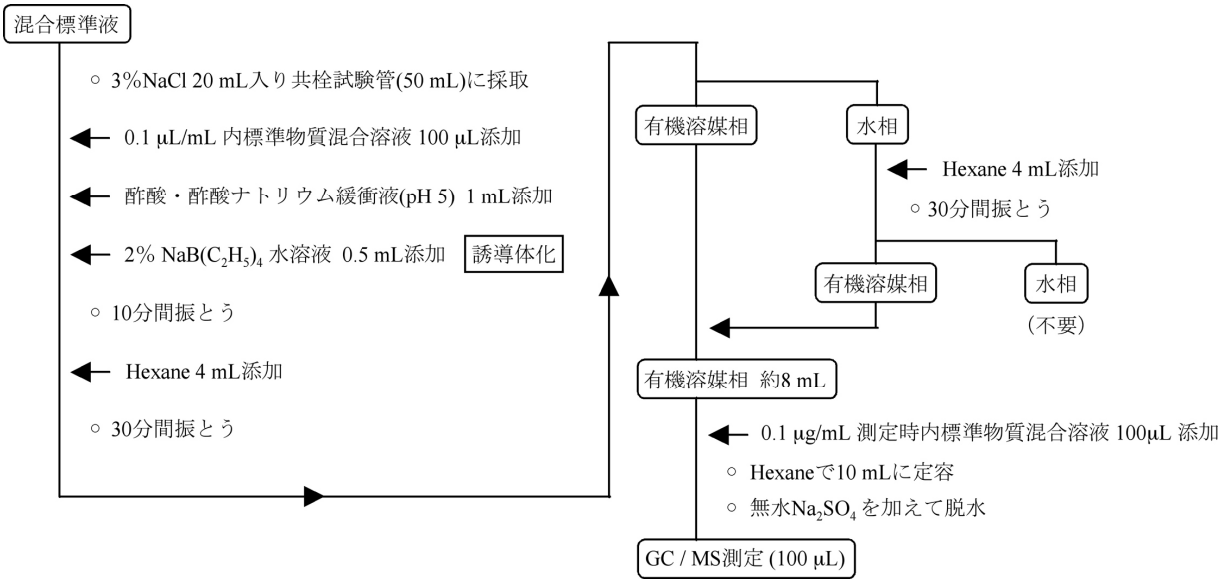


図３．有機スズ化合物分析における検量線溶液の調製

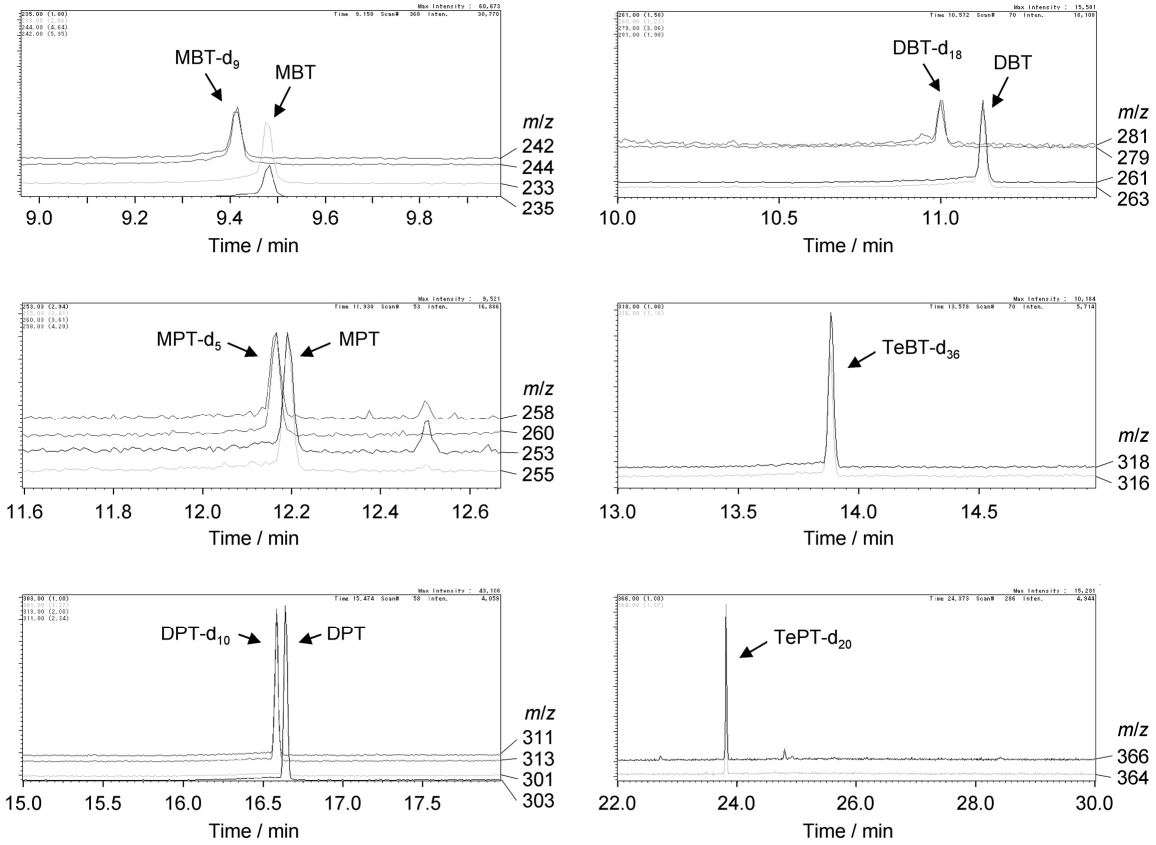


図４．標準混合溶液３ppb（内標準混合溶液１ppb を含む）のクロマトグラフ

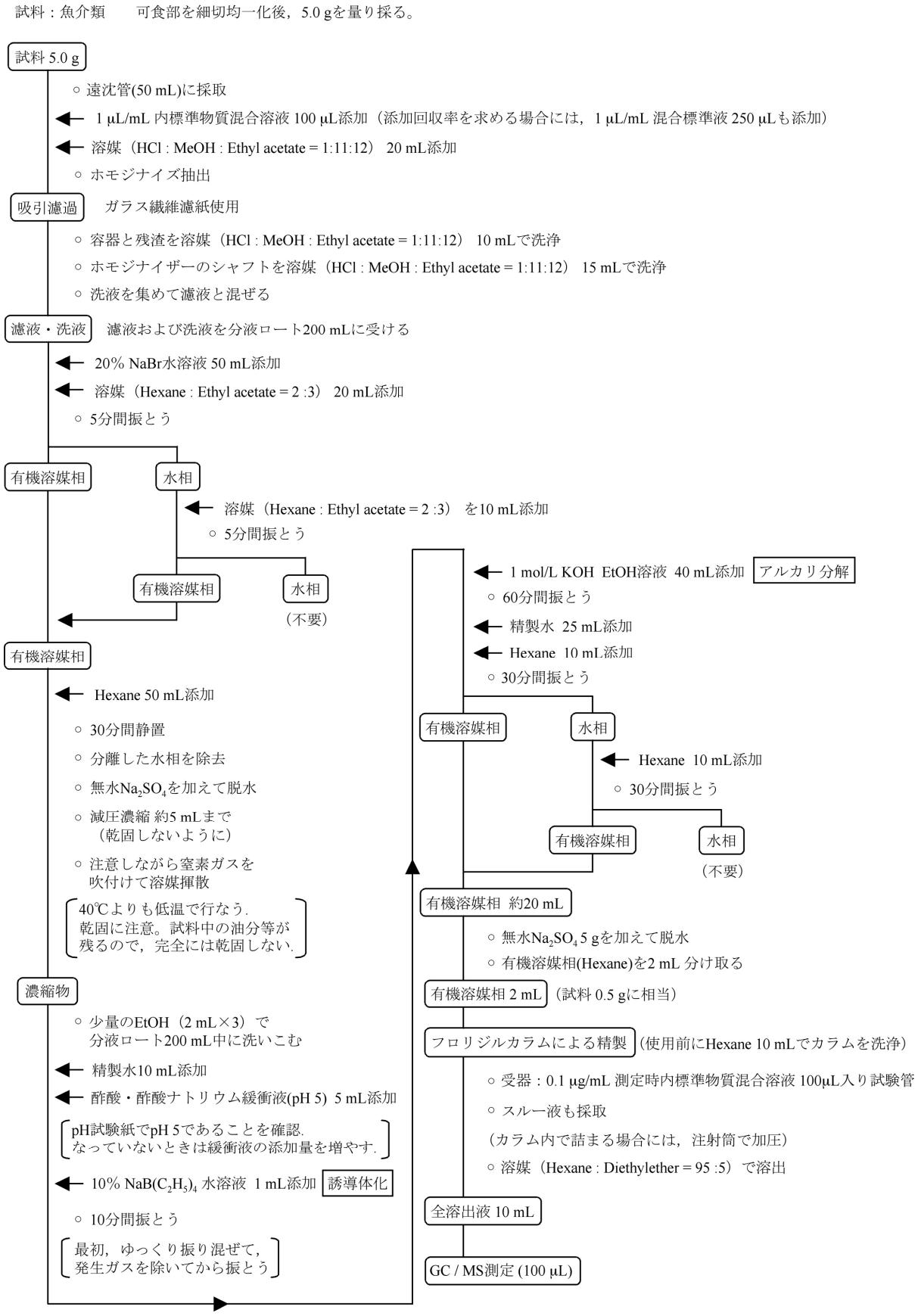


図５．有機スズ化合物分析における試料前処理

表２．測定結果

	濃度（μg/g）			
	MBT	DBT	MPT	DPT
メダイ	0.005	－	－	－
マトウダイ	0.007	－	－	－
カンパチ	－	－	－	－
タルイカ	0.013	－	－	－
サワラ	0.005	－	－	－
まぐろ	0.004	－	－	－
かつお	0.003	－	－	－
サバ	0.003	－	－	－

検出下限0.002μg/g　　－：不検出（＜0.002μg/g）

告第32号（海上保安庁海洋情報部2006））.よって，海中に存在している有機スズが魚介類中に生物濃縮という形で蓄積された結果が現れたものと考えられる.

ただし，ほとんどの測定値は検出下限付近の値であった.有機スズ化合物は，ガラス器具等に吸着する特性があるため，前処理等に用いる器具は念入りに洗浄する必要がある.しかし，洗浄後もわずかに検出されることがあるということが報告されている[9,11].今回，ガラス器具に付着している有機スズ化合物を極力除去するために，前処理に用いたガラス器具はすべて1 mol/L 塩酸を含むエタノール，精製水，アセトンで洗浄した.その他の器具は，精製水とアセトンで洗浄した.しかし，前処理の操作が長いことと使用するガラス器具の数が多いことから，わずかに残っていたものが検出された可能性もある.

ただし，タルイカのように検出下限値から離れた値の場合には，明らかに魚の中に存在している有機スズ化合物が検出されたと考えられる.

海水中に存在する有機スズ化合物は，主に生物付着防汚剤として船舶や漁網用の塗料に混ぜられたものに由来するものと推測される．有機スズ化合物を含む塗料は，藻類，フジツボやプランクトン，その他の海洋生物の付着と増殖を防止する効果を有することから，1970年代に世界中おいて使用量が増加した.しかし，その後，防汚対象外の生物にまで影響を及ぼすことが判明した.フランスでは，カキ養殖等の水産業が壊滅状態となった事例も報告されている[1].そのため，1980年代から1990年代にかけて多くの国では有機スズ化合物の使用を規制することになった.

今回，検出されたのはMBTである.しかし，船舶や漁網用の塗料に使用されたのは主にTBTの方であり，MBTが塗料として使用された例は，とても少なかったと考えられる.したがって，このMBTはTBTの分解に由来するものと推測される.

表３．添加回収率

MBT	DBT	MPT	DPT
103%	97%	114%	96%

TBTの分解は，炭素―スズ結合の開裂による〔1,2〕.この分解の過程には，物理化学的なもの（加水分解や光分解）と生物学的なもの（微生物による分解や生物による代謝）がある.TBTは環境中において，順次ブチル基を失い，最終的に無機スズとなる.今回，検出されたこのMBTも，海中等でTBTが分解された後，魚介類中に取り込まれたもの，もしくは魚介類中での分解の結果，生成されたものと考えられる.

2　添加回収率

MBT，DBT，MPT，DPTの添加回収率を表3に示す.いずれも約95～115%の範囲内にあり，良好であった.サロゲート物質を用いた内部標準法を適用したことによって，分析操作の変動を補正することができたためと考えられる.

ま　と　め

大量注入方式ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS with large volume injection）を用いた有機スズ化合物の分析法を開発，魚介類中の有機スズ化合物を測定した.その結果，微量ではあるが魚介類に由来すると推測されるMBTを検出した.

謝　　辞

分析法の開発にあたり，貴重な助言をしてくださった齊藤 行雄 氏（JA全農とやま）に深く感謝いたします.

参考文献

1．中西 準子，堀口 文男："詳細リスク評価書シリーズ8「トリブチルスズ」"，（平成18年），（丸善株式会社）
2．国際簡潔評価文書　No. 14 トリブチルスズオキシド（2005）国立医薬品食品　衛生研究所　安全情報部
3．海洋汚染調査報告第32号（海上保安庁海洋情報部

2006）
4．Y. Saito, S. Kodama, A. Matsunaga
J. AOAC Int. 87, 1356 (2004)
5．衛生試験法・注解2005, 432-434,（2005），（金原出版）
6．岩村幸美，門上希和夫，陣矢大助，棚田京子：分析化学，49，523
7．大橋正孝，陰地義樹，田中 健，玉置守人，奈良県衛生研究所年報，第34号，p41
8．山辺真一，武 志保，肥塚加奈江，今中雅章，（2005）岡山県環境保健センター年報，29，117
9．菅谷京子，中澤芳子，北林雪枝，廣田久美子，石原島栄二，大森牧子，世取山守，栃木県保健環境センター年報，第8号
10. 飯島正雄，星野庸二：衛生化学，44,371（1998）
11. 要調査項目等調査マニュアル（水質,底質，水生生物），（平成14年）（環境省　水環境部企画課）

中高齢者の身体活動量，体力が骨代謝指標および超音波骨量指標に及ぼす影響

堀井裕子　　中崎美峰子　　田中朋子　　明神三枝子[1]

Influence of Daily Physical Activity and Physical Fitness on the Bone Metabolic Indices and the Quantitative Ultrasound Parameters at Calcaneus in Middle-aged and Elderly Subjects

Yuko HORII, Mineko NAKAZAKI, Tomoko TANAKA and Mieko MYOJIN[1]

要 旨　身体活動と骨代謝との関連を明らかにするために，健康な中高齢者について身体活動量（歩数，速歩時間）および体力を測定し，骨代謝指標，超音波骨量指標（SOS，BUA，Stiffness）に及ぼす影響を検討した．

その結果，身体活動量では，女性の歩数が超音波伝搬速度SOSと正の相関を示し，さらに速歩時間がSOSと正の，骨吸収指標の尿中ピリジノリン（PYD），デオキシピリジノリン（DPD）と負の傾向を示した．体力については，体力得点と年齢には負の相関があり，その影響を考慮しても，体力得点は男女ともにSOSと正の，PYDと負の関連があり，女性ではDPDとも負の関連が認められた．

さらに，歩数，速歩時間が少ない群と多い群の2群に分けて比較したところ，歩数の多い群はSOSが高く，筋力（握力，上体起こし）の成績が良い傾向を示し，速歩時間が多い群ではPYD，DPDが低値を，SOSは高値を示し，筋力（握力，上体起こし），歩行能力（10m障害物歩行，6分間歩行）の成績が良い傾向を示した．

以上のことから，中高齢者では身体活動量（歩数，速歩時間）が多いことは高い筋力と骨量を維持し，さらに強度が中以上の活動（速歩時間）が多いと筋力に加えて歩行能力が高く，骨代謝では骨吸収の亢進を抑えるように働くと推測された．

身体活動・運動は生活習慣病や骨粗鬆症，肥満に対して予防効果があるといわれ，健康づくりのために広く推奨されている．身体活動・運動の効果についてはスポーツ活動を中心とした運動についての報告が多いが，運動以外の日常の生活活動も中等度の身体活動であれば生活習慣病の予防効果があるとされている．前報では[1]，加速度計を用いて身体活動量を測定し，骨量（Stiffness）および骨代謝指標との関連を検討したが，関連はみられなかった．今回はさらに超音波骨量指標のSOS，BUAを測定し，身体活動との関連を検討するとともに，体力と骨量，骨代謝指標との関連についても検討した．

対象および方法

対象は射水市主催のパワーアップ貯筋教室いみず1期生，いみず2期生のうち調査に同意した者で，調査人数は，1期生は45人（男性9人，女性36人），2期生は98人（男性12人，女性86人）である．パワーアップ貯筋教室は，おおむね60才以上の医師から運動制限をうけていない人を対象に，個人の体力にあわせて週1回，1時間の運動（ストレッチ，筋力トレーニング，エアロバイクなど）を1年間実施する教室である．対象者のうち骨量に影響するような服用歴のあるもの，術後閉経者，測定データに欠損があるものを除き，男性18名，女性78名について解析を行った．対象者には事前に本調査についての説明を文書により行い承諾書を得た．なお，本調査は富山県衛生研究所の倫理審査委員会の承認を受けた．

調査項目は身体計測，身体活動量測定，体力測定，骨量測定，骨代謝指標測定｛骨形成指標の血中骨型アルカリフォスファターゼ（BAP），骨吸収指標の尿中ピリジノリン(PYD)，デオキシピリジノリン（DPD)｝，生活習慣に関する自記式アンケート（病気治療の有無，運動習慣など）である．身体活動量は加速度計（Lifecorder ＥＸ）を用いて起床時から就寝時までの

1．射水市小杉保健センター

歩数と活動強度（0-9の10段階）を約14日間測定し，期間中の歩数，強度が中以上（4以上）の活動時間（速歩時間：分）の平均値を求めた．体力測定は，文部科学省の新体力テスト6項目（握力，上体起こし，長座体前屈，開眼片足立ち，10m 障害物歩行，6分間歩行）を実施し，体力得点を求めた．骨量は超音波法（A-1000 InSight：GE Medical Systems）で右足の踵骨を測定し，超音波骨量指標として超音波伝搬速度（SOS：m/sec），超音波減衰係数（BUA：ｄB/MHz），およびそれらから算出される Stiffnessの3つを骨量の指標とした．調査は教室開始から約1ヵ月後に実施した．

解析に際して PYD，DPD については対数変換した値を用い，幾何平均値，幾何標準偏差を求めた．

結　　果

表1，2に対象者の身体計測値，身体活動量，体力テスト結果（表1）骨代謝指標，骨量測定値（表2）を示す．対象者の身体活動量は，歩数は男性が平均8,895歩，女性が9,575歩，速歩時間は男性28.9分，女性28.1分であり，有意差はないものの歩数は女性が，速歩時間は男性が多かった．活動強度が弱から強（ライフコーダ強度1-9）までのすべての活動時間は男性93.7分，女性101.1分であり，身体活動に占める強度が中以上の活動は男性のほうがやや多かった（男性29.5%，女性27.4%，有意差なし）．

身体活動量と年齢，体格との相関を検討したところ（表3），年齢との関連はなく，体格では女性で速歩時

表１．対象者の体格，身体活動量，体力テスト値

		男性（N＝18）				女性（N＝78）			
		平均値	標準偏差	最小値	最大値	平均値	標準偏差	最小値	最大値
年齢		67.3	5.3	61.0	80.0	63.0	4.5	54.0	80.0
身長	cm	166.4	5.0	156.0	174.8	151.4	6.1	125.5	167.4
体重	kg	62.7	6.9	49.4	76.6	54.2	7.5	40.0	75.4
BMI	kg/㎡	22.6	1.9	19.7	26.5	23.7	3.4	18.7	34.4
身体活動量									
平均歩数	歩	8895.3	2209.9	3974	14038	9575.4	2464.9	5883	15755
速歩時間	分	28.9	15.0	4.9	60.8	28.1	13.9	4.7	63.5
活動時間	分	93.7	21.6	43.6	141.0	101.1	25.5	62.3	162.5
体力テスト									
握力	kg	36.2	6.3	26	50	24.4	3.5	16	33
上体起こし	cm	12.5	5.8	0	22	8.3	5.2	0	24
長座体前屈	cm	33.1	10.1	8	51	40.6	8.7	13	59
開眼片足立ち	秒	56.3	45.4	5	120	85.5	38.8	7	120
10m障害物歩行	m	6.5	1.1	4.3	8.8	6.6	0.8	5.0	8.8
６分間歩行	m	575.8	64.6	450	690	570.7	42.0	460	695
体力得点		36.1	7.4	22	47	41.0	5.6	28	53

表２．対象者の骨代謝指標値および骨量

		男性（N＝18）				女性（N＝78）			
		平均値	標準偏差	最小値	最大値	平均値	標準偏差	最小値	最大値
BAP	U/L	143.9	40.6	89	252	172.4	64.4	75	415
PYD#	nmol/mmolCr	16.3	1.3	11.8	26.2	24.7	1.3	12.3	44.9
DPD#	nmol/mmolCr	3.0	1.3	2.0	5.2	5.7	1.4	2.2	11.5
Stiffness		79.5	13.3	60	114	68.8	10.6	46	95
SOS	m/sec	1518.6	25.7	1476	1582	1513.3	21.3	1465	1567
BUA	dB/MHz	111.6	10.2	100	137	97.7	10.3	79	121

＃　幾何平均値，幾何標準偏差

表３．身体活動と年齢，体格，骨代謝指標および骨量との相関係数

	男性（Ｎ＝18）		女性(N=78)	
	歩数	速歩時間	歩数	速歩時間
年齢	-0.312	-0.370	-0.040	0.081
身長	0.157	0.291	-0.137	-0.216+
体重	0.229	0.249	-0.027	-0.091
BMI	0.204	0.133	0.053	0.040
骨代謝指標				
BAP	-0.089	-0.159	-0.006	-0.074
PYD	-0.291	-0.238	-0.117	-0.226*
DPD	-0.240	-0.222	-0.140	-0.249*
骨量				
Stiffness	0.174	0.255	0.155	0.052
SOS	0.157	0.198	0.331**	0.252*
BUA	0.174	0.288	-0.043	-0.136

＋ p＜0.1，＊ p＜0.05，＊＊ p＜0.01

表４．体力と年齢，体格，骨代謝指標および骨量との相関係数

	握力	上体起こし	長座体前屈	開眼片足立ち	10m障害物歩行	６分間歩行	体力得点
男性 年齢	-0.399	-0.596 **	-0.025	-0.321	0.438 +	-0.645 **	-0.600 **
(N=18) 身長	0.280	-0.020	-0.606 **	-0.004	-0.307	0.084	-0.006
体重	0.569 *	0.137	-0.178	0.049	-0.238	0.153	0.211
BMI	0.563 *	0.209	0.210	0.088	-0.105	0.146	0.301
骨代謝指標							
BAP	-0.028	-0.214	-0.291	-0.011	0.353	-0.465 +	-0.341
PYD	-0.292	-0.633 **	0.028	-0.254	0.319	-0.517 *	-0.562 *
DPD	-0.234	-0.656 **	-0.047	-0.239	0.445 +	-0.657 **	-0.593 **
骨量							
Stiffness	0.237	0.467 +	0.202	0.622 **	-0.089	0.233	0.463 +
SOS	0.189	0.514 *	0.269	0.601 **	-0.039	0.261	0.474 *
BUA	0.262	0.368	0.111	0.579 *	-0.131	0.180	0.403 +
女性 年齢	-0.227 *	-0.075	-0.022	-0.414 ***	0.147	-0.161	-0.259 *
(N=78) 身長	0.294 **	-0.057	0.100	0.241 *	0.010	0.226 *	0.178
体重	0.310 **	-0.222 +	-0.118	-0.061	-0.091	-0.122	-0.068
BMI	0.136	-0.184	-0.164	-0.203 +	-0.097	-0.243 *	-0.165
骨代謝指標							
BAP	-0.034	-0.005	0.088	0.107	0.220 +	-0.013	-0.036
PYD	-0.153	-0.267 *	-0.063	0.116	0.167	-0.154	-0.251 *
DPD	-0.230 *	-0.249 *	-0.115	0.162	0.220 +	-0.190 +	-0.289 *
骨量							
Stiffness	0.420 ***	0.091	-0.164	0.015	-0.293 **	0.228 *	0.188 +
SOS	0.396 ***	0.265 *	-0.154	0.007	-0.341 **	0.216 +	0.280 *
BUA	0.311 **	-0.087	-0.123	0.017	-0.161	0.168	0.051

＋ p＜0.1，＊ p＜0.05，＊＊ p＜0.01，＊＊＊ p＜0.001

間と身長に負の傾向がみられたのみであった．身体活動量と骨代謝指標，骨量とは女性において速歩時間がPYD,DPDと負の相関を示し，さらに歩数，速歩時間はSOSと正の相関を示した．

体力と年齢，体格，骨代謝指標，骨量との相関係数を表4に示した．体力得点との関連をみると，年齢は男女ともに負の相関を示した．さらに体力得点はPYD，DPDと負の，SOSと正の有意な相関を示し，Stiffnessとも正の傾向がみられた．男女ともに有意な関連がみられたPYD，DPD，SOSを目的変数に，体力得点と年齢を説明変数にして重回帰分析を行った結果，男性では体力得点とPYDに負の，SOSに正の関連が，女性ではPYD，DPDに負の，SOSに正の関連が認められた．

さらに，身体活動量と骨代謝に関連がみられた女性について，歩数，速歩時間の分布から同数の集団になるように，歩数，速歩時間が少ない群（L群　歩数：9,000歩未満，平均7,562歩，速歩時間：27.5分未満，平均17.3分）と多い群（H群　歩数：9,000歩以上，平均11,589歩，速歩時間：27.5分以上，平均38.9分）の2群に分け，骨代謝指標のPYD，DPD，骨量指標のSOS，体力テスト成績を比較した（図1，表5）．その結果，歩数のH群はL群に比べてSOSが高く，体力項目では握力，上体起こしの成績が良い傾向を示した．速歩時間ではH群はPYD，DPDが低値を，SOSは高値を示し，体力項目の握力，上体起こし，10m障害物歩行，6分間歩行の成績が良い傾向を示した．

考　　察

歩数計を使った身体活動量の調査は国民健康・栄養調査で実施されており，平成16年度の調査結果では60歳代男性が7,434歩，女性が6,421歩と報告されている[2]．この値に比べると今回の調査結果では男女ともにかなり歩数が多い集団であった．今回の対象者は運動教室参加者であるため，もともと運動に対して意欲の高いものであったことや，運動教室に参加し活動量が増えている可能性がある．

身体活動量と骨代謝との関連について前報［１］では，歩数，速歩時間と骨代謝指標に関連はみられなかった．YAMAZAKIらは，骨量が低下している中高齢女性について週4回以上のウォーキングを実施したと

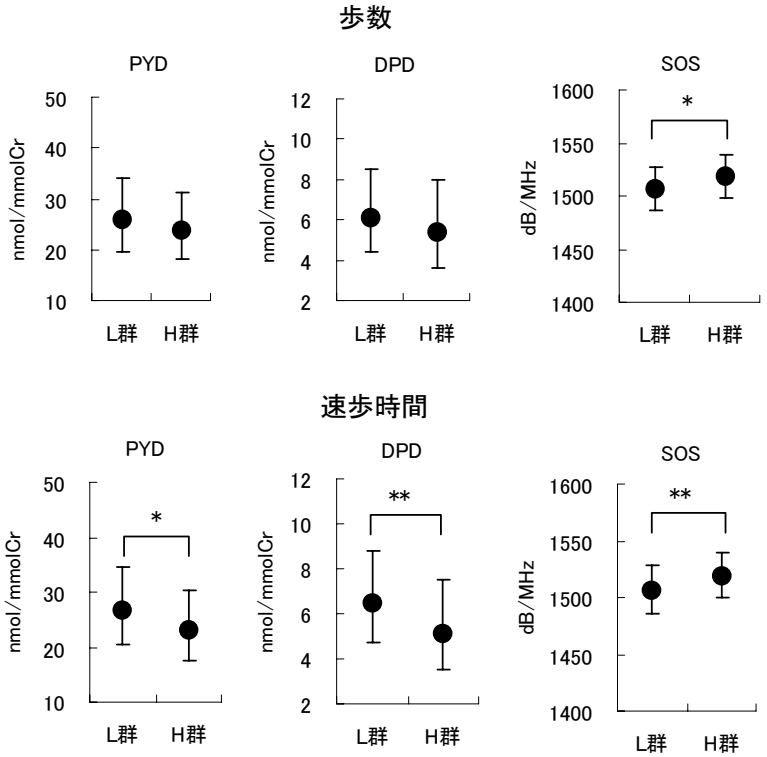


図１．歩数，速歩時間Ｌ群，Ｈ群のPYD，DPD，SOSの比較（女性）

＊ p＜0.05，＊＊ p＜0.01
歩数Ｌ群　9000歩未満，Ｈ群　9000歩以上
速歩時間Ｌ群　27.5分未満，Ｈ群　27.5分以上

表５．歩数，速歩時間Ｌ群，Ｈ群における体力テスト成績の比較（女性）

		歩数					速歩時間				
		Ｌ群	(N=39)	Ｈ群	（Ｎ＝39）		Ｌ群	（Ｎ＝39）	Ｈ群	（Ｎ＝39）	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
握力	kg	23.7	3.7	25.1	3.1	＋	23.7	3.7	25.1	3.1	＋
上体起こし	cm	7.1	4.9	9.5	5.2	＊	7.3	4.7	9.4	5.5	＋
長座体前屈	cm	39.6	10.1	41.6	7.0		39.1	9.8	42.2	7.3	
開眼片足立ち	秒	90.6	37.6	80.3	39.8		92.8	36.2	78.2	40.4	＋
10m障害物歩行	m	6.7	0.8	6.5	0.9		6.8	0.8	6.4	0.8	＊
６分間歩行	m	566.8	39.4	574.6	44.7		561.5	41.0	579.9	41.5	＋
体力得点		39.9	5.9	42.0	5.2		39.7	5.8	42.2	5.3	＋

＋ p＜0.1，＊ p＜0.05

ころ，3ヵ月後には尿中の骨吸収指標が低下したと報告しており［3］，今回の結果では，歩数と関連はみられなかったものの，強度が中以上の活動の指標となる速歩時間と骨吸収指標は負相関を示し，速歩時間が多い群で骨吸収指標（PYD，DPD）が低値を示した．骨吸収指標が高値であるとその後骨量が低下すること，骨量とは独立して骨折リスクが高まることが報告されており［4］，強度が中以上の活動が多いと骨吸収の亢進が抑制され，骨折の予防につながることが示唆された．

身体活動と骨量については，運動は骨量低下の予防に効果があるといわれている［5］．今回の結果では歩数，速歩時間が多いものでSOSが高値を示したが，前報［1］と同様にStiffnessとは関連がみられなかった．我々が使用している超音波法骨量測定装置は骨量指標としてSOS，BUAを測定し，それらからStiffnessを計算する．これらの指標については，SOSは骨の密度を，BUAは骨梁の分布状態を表すといわれており，SOSとStiffnessで運動の影響の表れ方に違いがあるのかもしれない．一方でSOS，BUA，Stiffnessの骨量指標はいずれの指標も骨折リスクを予測し，低下すると骨折率が上昇することが報告されており［6］，身体活動量が多いことは高い骨量（SOS）を維持し，骨折予防に有効に働くと考えられた．また，先に骨吸収指標は速歩時間としか関連がみられなかったのに対し，SOSは歩数，速歩時間の両者と関連がみられた．歩数には強度が弱い活動から強い活動まで全てが含まれ，弱い活動が多くても歩数が多い場合もある．このことから，SOSには強度が中以上の活動（速歩時間）だけではなく，強度が弱い活動も影響する可能性が示唆され，さらに強度が弱い活動と骨量との関連について検討する必要があると思われる．

体力と骨量については握力と関連があると報告されている［7］．握力は筋力の指標であり,今回の結果を体力テストの各項目についてみると（表4），男性は上体起こし，女性では握力，上体起こしの筋力指標とSOSに正相関があった．さらに男性では開眼片足立ち，女性では10m障害物歩行や6分間歩行とも関連があり，バランス機能や歩行能力とも関連すると考えられた．体力と身体活動量については，一般に身体活動量が多い人の体力は高いが，体力を高めるための運動強度には下限があり，日常生活の低い強度の身体活動量が多くても体力が高いとは限らないと述べられている[8]．身体活動量と体力得点との相関係数を求めたところ，男性の歩数 r=0.524（p<0.05），速歩時間 r=0.425　（P<0.1），女性の歩数 r=0.238　（P<0.1），速歩時間 r=0.160　（p=0.163）であり，身体活動量が多いもので体力が高い傾向がみられた．また，歩数，速歩時間を少ない群と多い群に分け比較したところ，歩数で分けた場合には歩数が多い群で筋力（握力，上体起こし）が高かったが，速歩時間で分けた場合には，速歩時間が多い群で筋力（握力，上体起こし）に加え歩行能力（10m障害物歩行，6分間歩行）も高く，強度が中以上の活動が多いもので，より体力が高いことが示された．

以上のことから，中高齢者では身体活動量（歩数，速歩時間）が多いことは高い筋力と骨量を維持し，さらに強度が中以上の活動（速歩時間）が多いと筋力に加えて歩行能力が高く，また骨代謝では骨吸収の亢進を抑え，骨量減少や骨折の予防により効果的に働くことが示唆された．

謝　　辞：本調査の実施にあたり，ご協力いただいたパワーアップいみず貯筋教室参加者のみなさん，射水市小杉保健センター，新湊保健センターの関係各位に対し，心から感謝いたします．

文　　献

１．堀井裕子，中崎美峰子，田中朋子，長瀬博文，明神三枝子，澁谷直美，大浦栄次(2006)．富山衛研年報，30，120-123.

２．厚生労働省(2006)．平成16年度国民健康・栄養調査報告（健康栄養情報研究会編），p180，第一出版

３．S.Yamazaki，S.Ichimura，J.Iwamoto，T.Takeda，Y.Toyama（2004）．J Bone Miner Metab，22，500-508.

４．吉村典子(2007).CLINICAL CALCIUM，17，1049-1056.

５．吉村典子(2003)．日本衛生学雑誌，58，328－337.

６．萩野　浩(2007).CLINICAL CALCIUM，17，1042-1047.

７．梶田悦子，伊木雅之，飛田芳江，三田村純枝，日下幸則，緒方　昭，寺本路夫，土田千賀，山本和高，石井　靖(1995).日衛誌，50，893-900　.

８．厚生労働省(2006)．健康づくりのための運動指針2006＜エクササイズガイド2006＞，運動所要量・運動指針の策定検討会

長期間記録型歩数計を用いた健康教室参加女性の体重，腹囲の変化について

田中朋子　　堀井裕子　　澁谷直美[1]　　大浦栄次[1]

Changes in weight and waist circumference of women in health-up program used the steps meter

Tomoko TANAKA,Yuko HORII,Naomi SHIBUYA[1] and Eiji OURA[1]

要 旨　3ヶ月間の地域健康教室に参加した50歳以上の女性を対象に歩行状況とBMI減少量、腹囲減少量との関連を調査したところ、歩数、速歩時間と負の関連を示し、歩数11000歩以上、速歩時間40分以上ではそれ未満よりBMI、腹囲の減少が大きいことがわかった。

このことから中高年女性の減量には速歩時間のみならず歩数の確保が有効と考えられた

我々は，これまで肥満男性を対象とし，長期間記録型歩数計（ライフコーダ）を用い歩数，はや歩き（速歩）と体重減少の関係を調査してきた．その結果，速歩の増加が体重減少に有効であること[1]，ライフコーダの打ち出しをみることが励みになったことがわかった[2]．一方，女性についても閉経期以降は肥満しやすいことから，同年代について体重減少に有効な運動プログラムを提示することは有意義であると考えられる．そこで，「内臓肥満が気になる方のための健康教室」と題した3ヵ月間の教室に参加した50歳以上の女性について運動状況と体重および腹囲の変化との関連を検討した．

対象および方法

3ヶ月間の教室参加者のうち初回時，終了時の身体計測（体重，腹囲を自己計測）が実施できた51歳から74歳までの女性37名を対象とした．教室内容は月に1～2回の運動や食事に関する講義と開始時，終了時のアンケートおよび期間内のライフコーダの装着である．ライフコーダによる歩行状況の打ち出しは教室参加時にデータをコンピュータに取り込み，1週間以内に本人に郵送した．

結　　果

全対象者の身体状況の変化を表1に示した．体重は58.8±7.2kgから57.4±7.0kg に，BMIは，24.8±2.1から24.2±2.2に，腹囲は89.7±7.5cmから86.7±8.1cmに終了時には有意に減少していた（$p<0.001$）．

3ヶ月間の歩行状況を表2に示した．開始時から初回打ち出し時まで（開始2週間）とそれ以降（後半2.5ヶ月）に分け比較したが，両者に有意な変化は見られなかった．そこで，以降の解析には全期間の平均値を用いた．全期間の歩数の平均値は10500±2381歩／日，速歩時間は30.7±16.5分／日であった．

歩数，速歩の時間（分）とBMI変化量（終了時－開始時），腹囲変化量(終了時－開始時)との関連を表3に示した．歩数，速歩時間と体格変化には関連が認められた．そこで，歩数，速歩時間それぞれを少群，普通群，多群の3グループに分け期間内の体格変化を比較したところ歩数多群（11000歩以上），速歩多群（40分以上）のBMI，腹囲は少群，普通群より有意に減少していた（図1）．

食習慣について開始時のアンケートにより問題ありと回答したものは"野菜不足"7名（19%），"油分の取りすぎ"14名（38%），"インスタント食品が多い"1名（3%），"その他"14名(38%)であった（図2）．また，終了時にそれぞれについて努力したと解答した者はそれぞれ12名(32%)，18名(49%)，2名(5%)，7名(19%)であった．しかし，それらと身体状況の変化との間には関連はみられなかった．

ライフコーダについては終了時にアンケートを実施したところ（図3），多くの人が"毎日歩数を確認"，"郵送された打ち出しが楽しみ"，"それをはげみにしていた"と回答していた（各々36人，27人，33人）．

1．富山県農村医学研究所

表 1．身体状況の変化(n＝37)

	開始時				終了時				
	平均値	S.D.	Max	Min	平均値	S.D.	Max	Min	
年齢(歳)	60.5	5.6	74	51	—	—	—	—	
身長(cm)	153.7	5.2	164	143	—	—	—	—	
体重(kg)	58.8	7.2	77	45.7	57.4	7.0	77.4	44.0	***
BMI	24.8	2.1	30.6	20.4	24.2	2.2	29.4	19.7	***
腹囲(cm)	89.7	7.5	102	76	86.7	8.1	102	70	***

***: p<0.001開始時と終了時の平均値 paired t-test

表 2．期間中の歩行状態

	開始2週間		後半2.5ヶ月		全期間	
	平均値	S.D.	平均値	S.D.	平均値	S.D.
歩数/日	10540	2830	10520	2530	10500	2381
速歩時間(分)	30.8	17.8	31.8	16.9	30.7	16.5

表 3．歩行状況と身体状況変化との関連

	体重変化	BMI変化	腹囲変化
歩数	−0.312 ◇	−0.332 *	−0.340 *
速歩時間	−0.310 ◇	−0.323 *	−0.240

*:p<0.05,◇:p<0.1

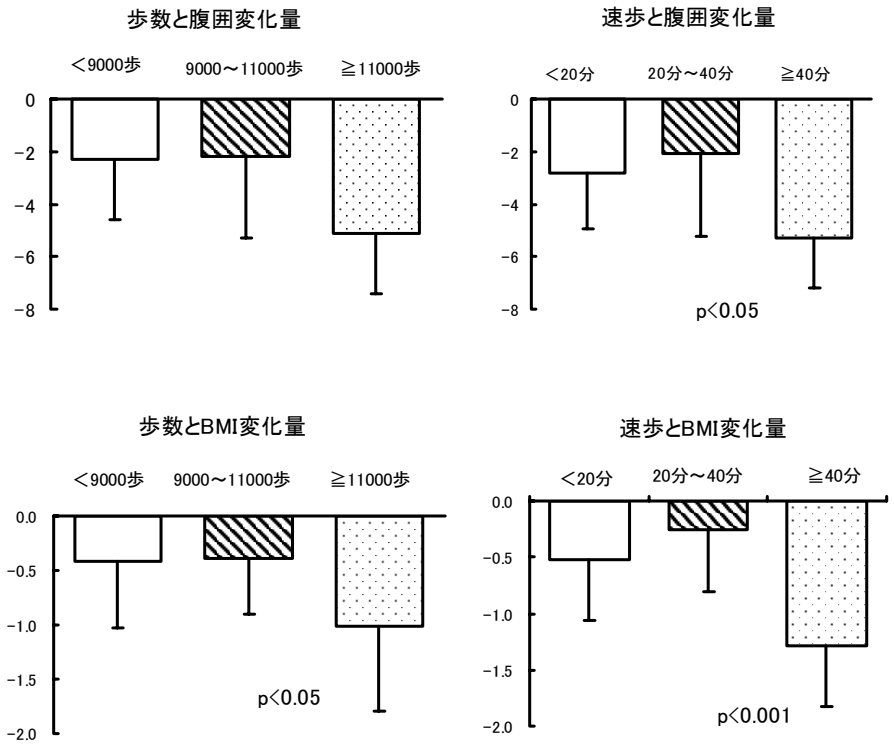


図 1．歩数，速歩時間と身体状況の変化

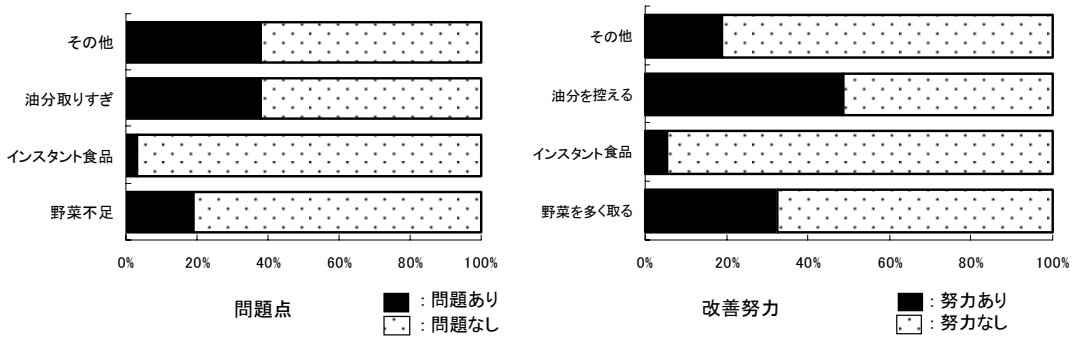


図２．食習慣に関するアンケート結果

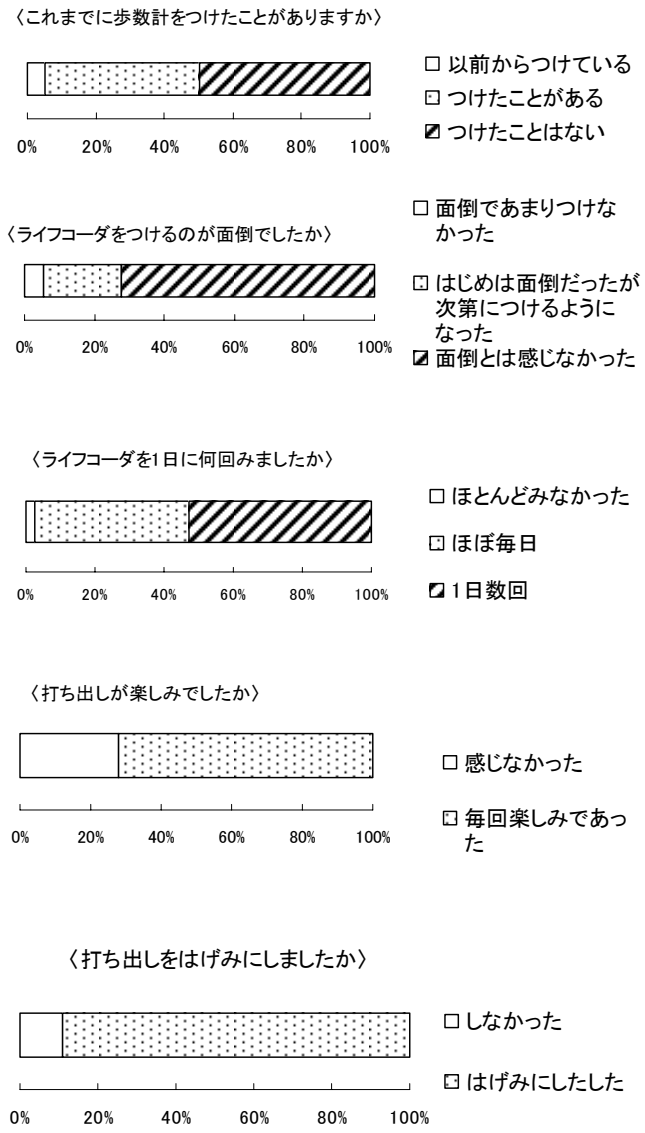


図３．ライフコーダに関するアンケート結果

考　　察

今回の3ヶ月の健康教室での体重，BMI，腹囲は全体として大きく減少していた．特に，腹囲については開始時の平均値が89.7cm であり，平成20年度から始まる特定検診の基準値90cm とほぼ同じであったが，期間中に3cm の減少を認めた．我々はこれまで腹囲について検討したことはないが，日本人についてのいくつかの調査では，3cm の減少は種々のメタボリックシンドロームの改善目標として有用であるとしている[3,4]．今後，腹囲の減少と生化学指標との関連についても検討していきたいと考えている．

運動量との関連について，運動量として歩数，速歩時間について検討した．これまでの肥満男性についての調査では，開始時に比し期間内の歩数，速歩時間が有意に増加したが，体重減少につながっていたのは速歩時間の増加であった[１]．今回は開始前の運動量は把握できていないため，開始時からの2週間（最初の打ち出し郵送まで）とそれ以降で歩数，速歩時間を比較したが，違いは認められなかった．そこで，全期間の平均を用いて解析したところ，歩数は，先の肥満男性の調査の平均値8991±3083歩に比べ多かったが($p<0.05$)，速歩時間に違いは認められなかった．さらに，肥満男性では速歩時間の増加が体重減少に有効であったが，中高年女性では，速歩時間だけでなく，歩数の多いもので体重減少，腹囲の減少が認められた．今回は調査開始前の運動量の把握ができていないので，両者を直接比較することはできないが，少なくとも中高年女性の体重減少や腹囲の減少には速歩にこだわらず歩数を増やすことが有効と思われた．

その他の要因として，食習慣についての問題点，改善点について検討した．問題点についてのアンケート結果から，今回の対象者は食事についての問題意識は比較的低いと思われた．さらに，努力したと回答した者でも必ずしも体重減少や，腹囲の減少につながっていなかった．

一方，対象者の多くがライフコーダの打ち出しを楽しみにし，また，励みにしていたことが期間中の運動量維持につながり，その結果，体重，腹囲の減少をもたらしたのではないかと推察された．

文　　献

１．田中朋子，堀井裕子，長瀬博文，荒谷哲雄，大下喜子，山上孝司(2006)．富山衛研年報，29，149-151.

２．堀井裕子，田中朋子，長瀬博文，荒 ct 谷哲雄，大下喜子，山上孝司(2006)．富山衛研年報，29，198-200.

３．村本あき子，津下一代(2007)．肥満研究，13，60-67.

４．Miyatake N,Matsumoto S,Fujii M,Numata

富山県における平成19年度のウイルスおよびリケッチア検出状況

岩井雅恵　　堀元栄詞　　小原真弓　　長谷川澄代
中村一哉　　倉田　毅　　滝澤剛則

Viruses Detected from Specimens of Patients
in Toyama Prefecture in the Fiscal Year 2007

Masae IWAI, Eiji HORIMOTO, Mayumi OBARA, Sumiyo HASEGAWA,
Kazuya NAKAMURA, Takeshi KURATA, Takenori TAKIZAWA

富山県衛生研究所ウイルス部では，感染症発生動向調査や行政依頼検査，一般依頼検査など，種々の目的によって検査を行っている．ここでは，平成19年度に検出されたウイルスおよびリケッチアの検査の概要を報告する．検査は，検体の種類や状態に応じて，常法に従い実施した．

平成19年4月から平成20年3月までに受け付けた被検者は延べ859例，検体別では便497，咽頭拭い液80，鼻腔拭い液292，喀痰1，髄液8，痂皮1，尿5，血液10，吐物4の計898であった．また，食中毒事例に関連した食材12件についても検査を行った．被検者859例中520例からウイルスあるいはリケッチアが検出された．

以上の成績を疾患別，患者別に表1に示し，若干の解説を加えた．

インフルエンザおよび上気道疾患：県内の定点医療機関を受診した患者350症例（咽頭拭い液65，鼻腔拭い液292）について，検査を行った．

昨シーズン（平成18/19）終期の4月～5月に，8症例からAH1型インフルエンザウイルスが，35症例からAH3型インフルエンザウイルスが，36症例からB型インフルエンザウイルスがそれぞれ検出された．

今シーズン（平成19/20）は，平成19年10月～平成20年3月に，144症例からAH1型インフルエンザウイルスが，85症例からAH3型インフルエンザウイルスがそれぞれ検出された．また，平成20年2月～3月には，19症例からB型インフルエンザウイルスが検出された．AH1型は県内全域で検出されたが，AH3型およびB型は主に砺波地区で検出された．

肺炎：2月に1症例（便1，咽頭拭い液1，喀痰1，血液1，尿1）の検査を行ったが，ウイルスは検出されなかった．

咽頭炎：11月に2症例（咽頭拭い液2）の検査を行ったところ，2例ともコクサッキーウイルスA10型が検出された．

脳炎・脳症：5，10，3月に計5症例（便2，咽頭拭い液3，髄液4，血液2，尿2）の検査を行ったところ，10月の1症例の髄液から単純ヘルペスウイルス1型が検出された。

四肢麻痺：6月に1症例（便1，咽頭拭い液1，髄液1，血液1）の検査を行ったが，ウイルスは検出されなかった．

無菌性髄膜炎：10，11月に計3症例（髄液3）の検査を行ったが，ウイルスは検出されなかった．

感染性胃腸炎：集団発生事例では，食中毒および有症苦情事例を含む33事例（延べ415症例，糞便413，吐物4）について検査を行ったところ，21事例の176症例からノロウイルスGenogroup II（NVGII）が検出された．月別では，平成19年4月に3事例，5月に2事例，6月に2事例，7月に1事例，8月に2事例，10月に1事例，12月に11事例，平成20年1月に8事例，2月に2事例，3月に1事例それぞれ発生した．集団発生は，特に12月から1月にかけて多かった．NVGIIが検出された21事例のうち，20事例がNVGIIによる集団発生と判断され，さらに11事例においては，無症状者からもNVGIIが検出された．

小児科定点医療機関からは，平成19年4，5，10，12月，平成20年3月に計11症例（糞便12）の散発例の検査依頼があった．これらのうち，12月の2症例からNVGIIが検出された．また，サポウイルスが3月の1症例から，A群ロタウイルスが4月および5月のそれぞれ2症例から，アストロウイルスが5月の1症例からそれぞれ検出された．

手足口病：6月および7月に，計4症例（便4，咽頭拭い液4）の検査を行った．これらのうち，6月の3症例からコクサッキーウイルスA16型が，7月の1症例からコクサッキーウイルスB2型がそれぞれ検出された．7月の症例では，保育園のクラスで同様の症状を呈す

表1. 平成19年4月～平成20年3月 疾患別、月別ウイルスおよびリケッチア検出状況

	検出病原体	平成19年									平成20年			
		4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
インフルエンザ	（被検者数）	75	14				1	2	48	59	67	50	34	350
及び上気道疾患	AH1型インフルエンザ	5	3					1	11	20	60	43	9	152
	AH3型インフルエンザ	29	6					1	35	38	5	1	5	120
	B 型インフルエンザ	33	3									5	14	55
肺炎	（被検者数）											1		1
	-													0
咽頭炎	（被検者数）								2					2
	コクサッキーA10型								2					2
脳炎・脳症	（被検者数）		2					2					1	5
	単純ヘルペス１型							1						1
四肢麻痺	（被検者数）				1									1
	-													0
無菌性髄膜炎	（被検者数）		1					1	2					3
	-													0
感染性胃腸炎	（延べ被検者数）	15	28	19	8	10		9		162	144	16	4	415
（集団発生事例）	NVGII	1	6							99	62	4	4	176
感染性胃腸炎	（被検者数）									3			2	11
（散発例）	NVGII									2				2
	サポ												1	14
	A 群ロタ	2	2											42
	アストロウイルス		1											11
手足口病	（被検者数）				3	1								4
	コクサッキー A16型				3									3
	コクサッキー B 2 型					1								1
劇症肝炎	（被検者数）		1											1
	単純ヘルペス１型		1											1
ツツガムシ病	（被検者数）							1						1
	-													0
心筋炎	（被検者数）		1											1
	-													0
マラリアまたはデング熱疑い	（被検者数）	1												1
	-													0
無症状	（被検者数）						10				51			61
（ポリオ流行予測調査）	パレコ1型						1							1
症例合計	（被検者数）	93	49	20	11	11	11	16	52	224	262	68	42	859
	病原体検出者数	70	22		3	1	1	3	48	159	127	53	33	520
食材	（検体数）									12				12
	NVGII									1				1

：無症状の施設関係者および利用者を含む.
NVGII：ノロウイルス Genogroup II

る患児が同時期に多発し，1名の男児からコクサッキーウイルス B2型が検出されたため，このウイルスによる集団発生事例と推測された.

劇症肝炎：5月に，0歳の新生児1症例（便1，咽頭拭い液1，尿1）の検査を行ったところ，すべての検査材料から単純ヘルペスウイルス1型が検出された.

麻しん：2月および3月に，計2症例（咽頭拭い液2，血液1）の検査を行ったが，麻しんウイルスは検出されなかった.

ツツガムシ病：10月に1症例（血液2，痂皮1）の検査を行ったが，ツツガムシ病リケッチアは検出されず，また，血清中のリケッチアに対する抗体価の上昇もみられなかった.

心筋炎：5月の1症例（便1，咽頭拭い液1，血液1，尿1）からは，ウイルスは検出されなかった.

マラリアまたはデング熱疑い：4月の1症例（血液1）からは，ウイルスは検出されなかった.

無症状：ポリオ流行予測調査事業により，0～6歳までの健康な乳幼児の糞便を対象にウイルス検査を行った．9月および1月に計61名の検査を行ったが，ポリオウイルスは検出されなかった．9月に1名からパレコウイルス1型が検出された.

食材・ふきとり検査：12月の食中毒事例に関連して，計12検体の食材についてウイルス検査を行ったところ，食材1検体（鱒寿司の鱒）から NV GII が検出された.

ウイルス分離検査は結果が判明するまでに時間がかかりますが，今後の感染症の発生動向を知るうえで貴重な資料となります．ご多忙の中でご理解，ご協力をいただいた多くの医療機関および防疫機関の関係各位に深く御礼申し上げます.

富山県における2007年の病原微生物検出情報

木全恵子　　金谷潤一　　嶋　智子　　清水美和子
磯部順子　　倉田　毅　　綿引正則

Detection of Pathogenic Bacteria in Toyama Prefecture in 2007

Keiko KIMATA, Junichi KANATANI, Tomoko SHIMA, Miwako SHIMIZU,
Junko ISOBE, Takeshi KURATA and Masanori WATAHIKI

我々は県内10か所の公立病院検査室，4か所の富山県厚生センター，富山市保健所，衛生研究所を定点として病原細菌の検出情報を収集している．2007年1月から12月までの検出情報を検出材料別及び菌種別に集計し，表に示した．厚生センター，富山市保健所，衛生研究所で検出された病原細菌は，ほとんどが糞便材料由来であった．また，公立病院検査室で分離された黄色ブドウ球菌については，メチシリン耐性ブドウ球菌（MRSA）の割合を本文中に示した．

表中の○で囲んだ数字は食中毒，家族内発生などの同一フォーカス由来の分離株が含まれることを示している．また，（　）内の数字は海外旅行者数の再掲である．

【糞便】分離株総数は1,295株で前年比78.8%と減少した．そのうち最も多かったのは大腸菌579株であるが，前年比77.8%と減少していた．腸管出血性大腸菌（EHEC/VTEC）は80株で，その内訳は血清型O157が76株，O26が4株であった．本年はEHECによる集団感染事例が6件，家族内感染事例が9件であった．次に多かったのは黄色ブドウ球菌367株（そのうちMRSAは54.8%）であり，前年比69.2%であった．カンピロバクターは263株で前年比105%とやや増加した．サルモネラは27株で，前年比87.1%と減少していた．腸炎ビブリオは，27株で前年比169%と増加していた．

【穿刺液】分離株総数279株，前年比115%で，黄色ブドウ球菌（MRSAは43.4%），コアグラーゼ陰性ブドウ球菌，嫌気性菌などが多く分離された．

【髄液】分離株総数14株，前年比82.4%で，肺炎球菌，黄色ブドウ球菌（全てMRSA），インフルエンザ菌が分離された．

【血液】分離株総数1101株，前年比112%で，コアグラーゼ陰性ブドウ球菌，大腸菌，黄色ブドウ球菌（MRSAは47.4%）が多く分離された．また，3類感染症として，パラチフスAが海外渡航歴のない患者から1株分離された．

【咽頭および鼻咽喉】分離株総数1,951株，前年比89.0%で，インフルエンザ菌，肺炎球菌，A群溶連菌が多く分離された．

【喀痰、気管吸引液および下気道】分離株総数5,299株，前年比94.1%で，分離株数が最も多い検査材料であった．黄色ブドウ球菌（MRSAは64.8%），緑膿菌が特に多く，肺炎桿菌，肺炎球菌，インフルエンザ菌なども多く分離された．

【尿】分離株総数4,955株，前年比95.2%であった．大腸菌，腸球菌，緑膿菌，コアグラーゼ陰性ブドウ球菌が特に多かったが，黄色ブドウ球菌（MRSAは56.3%），肺炎桿菌なども多かった．

【陰部尿道頸管擦過（分泌）物】分離株総数1，688株，前年比99.2%で，*Candida albicans*が特に多く，その他にB群溶連菌などが分離された．なお，*Chlamydia trachomatis*は抗原検出による報告である．

謝　　辞

県内10か所の公立病院と4か所の富山県厚生センター，富山市保健所の検査担当各位に感謝致します．

平成20年12月１日

月別・筋種別の病原微生物検出状況(2007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 04		1			2		1	1					5
Salmonella 07		1				1		3					5
Salmonella 08						1	2	1	1				5
Salmonella 09		1	1	1			1	2	1		1		8
Salmonella その他	1	1			1					1			4
Salmonella 群不明													
Yersinia enterocolitica	1				1	1		1					4
Y. pseudotuberculosis													
Vibrio cholerae 01													
Vibrio cholerae 0139													
Vibrio cholerae 01,139以外													
Vibrio parahaemolyticus								(25)	1	1			27
Vibrio fluvialis													
Vibrio mimicus													
Aeromonas			3	1			3	4	5	1	5	2	24
Plesiomonas shigelloides						1							1
Campylobacter	15	9	12	12	26	22	21	51	38	22	25	10	263
Staphylococcus aureus	41	26	35	30	29	35	38	31	35	23	18	26	367
Clostridium perfringens						1					1		2
Clostridium botulinum													
Bacillus cereus							1						1
Entamoeba histolytica													
*Escherichia coli*組織侵入性			1		1	1	1	1		2		1	8
*Escherichia coli*毒素原性			1	1			4	2	2	1		2	13
*Escherichia coli*病原大腸菌	19	32	35	35	26	25	23	27	26	18	37	41	344
*Escherichia coli*EHEC/VTEC				(2)		(15)	(11)	(24)	(20)	(6)	1	1	80
*Escherichia coli*その他,不明	(10)	5	7	12	3	15	13	15	8	15	16	15	134
Shigella													
合　　計	87	76	95	94	89	118	119	188	137	90	104	98	1295

注：（　）内は海外旅行者分再掲、○で囲んだ数字は同一フォーカスからの分離株を含む。

２）分離材料：穿刺液（胸水、腹水、関節液など）

Escherichia coli	1	2	3	2	3	4	3	7	1	4	4	3	37
Klebsiella pneumoniae		2	1	1	1	3	5	2	3	2	4	2	26
Haemophilus influenzae													
Neisseria meningitidis													
Pseudomonas aeruginosa	1	1		3	1	1	2	1	4	3	1	1	19
Mycobacterium spp.					1								1
Staphylococcus aureus	2	1	5	10	13	7	9	13	8	5	8	2	83
Staphylococcus ｺｱｸﾞﾗｰｾﾞ陰性	3	4	3	8	7	5	5	6	3	8	6	6	64
Streptococcus pneumoniae											1	1	2
Anaerobes	4	8	3	2	1	8	1	8	5	3	2	2	47
Mycoplasma pneumoniae													
合　　計	11	18	15	26	27	28	25	37	24	25	26	17	279

３）分離材料：髄液

菌種・群・型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Escherichia coli							1						1
Hae ophilus influenzae	1						1						2
Neisseria eningitidis													
Listeria monocytogenes								1					1
Staphylococcus aureus	2				1								3
Streptococcus, B													
Streptococcus pneu oniae		2	1	1			2			1			7
合　　計	3	2	1	1	1	0	4	1	0	1	0	0	14

４）分離材料：血液

Escherichia coli	26	21	23	32	27	20	36	22	25	25	19	25	301
Sal onella Typhi													
Sal onella Paratyphi A						1							1
Sal onella pp.		1		1	1								3
Hae ophilus influenzae	1		1				1					1	4
Neisseria eningitidis													
Pseudomonas aeruginosa	7	5	2	4	1	3	4	5	2	3	3	5	44
Staphylococcus aureus	23	26	24	14	20	21	22	21	19	18	16	25	249
Staphylococcus ｺｱｸﾞﾗｰｾﾞ陰性	26	29	35	34	31	55	35	47	36	24	24	24	400
Streptococcus, B	2	1	1	3	1	1	3	2	1	1		3	19
Streptococcus pneu oniae	5	2	9	2	9	5	2	1		9	3	2	49
Anaerobes	5	2	2	4	1	1	2	3	5	4		2	31
合　　計	95	87	97	94	91	107	105	101	88	84	65	87	1101

５）分離材料：咽頭および鼻咽喉からの材料

Bordetella pertussis													
Hae ophilus influenzae	85	66	79	91	130	104	61	43	24	37	68	80	868
Neisseria eningitidis													
Streptococcus, A	25	35	74	45	66	41	18	16	6	7	18	23	374
Streptococcus pneu oniae	76	41	47	73	98	89	61	20	22	51	74	57	709
C. diphtheriae								5					
合　　計	186	142	200	209	294	234	140	84	52	95	160	160	1951

６）分離材料：喀痰、気管吸引液および下気道の材料

Mycobacterium tuberculosis	1	4		5	2	2	3	4	2	3	5	7	38
Klebsiella pneumoniae	60	76	60	47	62	55	72	88	75	85	74	85	839
Hae ophilus influenzae	41	28	42	25	43	46	25	24	15	21	21	23	354
Legionella pneumophila													
Pseudomonas aeruginosa	94	67	79	45	78	69	80	100	91	85	71	68	927
Staphylococcus aureus	260	200	243	177	186	211	200	190	172	160	165	177	2341
Streptococcus, A	3	2			3	2		2	2	2	2	3	21
Streptococcus, B	23	41	35	18	21	16	21	19	11	13	20	26	264
Streptococcus pneu oniae	52	34	50	47	58	52	41	28	23	37	45	47	514
Anaerobes	1												1
Mycoplasma pneumoniae													
合　　計	535	452	509	364	453	453	442	455	391	406	403	436	5299

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	191	174	176	154	150	168	179	198	163	179	148	136	2016
Enterobacter spp.	17	8	9	12	8	14	19	16	12	18	12	16	161
Klebsiella pneumoniae	37	24	14	25	20	29	32	45	53	43	31	27	380
Acinetobacter spp.		4		3	4		7	6	7	2	5	1	39
Pseudomonas aeruginosa	49	36	35	41	33	34	50	62	42	50	48	41	521
Staphylococcus aureus	27	30	31	30	32	18	24	34	18	31	27	23	325
Staphylococcus ｺｱｸﾞﾗｰｾﾞ陰性	38	46	49	30	38	41	56	51	40	47	44	37	517
Enterococcus spp.	77	71	65	73	71	61	53	71	69	64	66	49	790
Candida albicans	14	16	22	12	13	24	19	21	15	22	19	9	206
合　　計	450	409	401	380	369	389	439	504	419	456	400	339	4955

８）分離材料：陰部尿道頸管擦過（分泌）物

Neisseria gonorrhoeae	7	1	1		3	2	5	4	4	1	2	3	33
Streptococcus, B	48	48	40	66	53	59	58	67	45	75	53	48	660
Clamydia trachomatis	4	3	5	1	3	7	2	5	6	4	1	3	44
Ureaplasma													
Candida albicans	75	68	65	77	83	90	108	104	81	82	58	60	951
Trichomonas vaginalis													
合　　計	134	120	111	144	142	158	173	180	136	162	114	114	1688

Staphylococcus aureus

		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
糞便	MRSA	25	16	20	18	14	24	25	16	15	12	8	8	201
	MSSA	16	10	15	12	15	11	13	15	20	11	10	18	166
	未検査													
	件数	41	26	35	30	29	35	38	31	35	23	18	26	367
穿刺液	MRSA	1		3	1	7	4	3	6	6		4	1	36
	MSSA	1	1	2	9	6	3	6	7	2	5	4	1	47
	未検査													
	件数	2	1	5	10	13	7	9	13	8	5	8	2	83
髄液	MRSA	2				1								3
	MSSA													
	未検査													
	件数	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3
血液	MRSA	15	15	11	4	4	8	14	8	10	8	9	12	118
	MSSA	8	11	13	10	16	13	8	13	9	10	7	13	131
	未検査													
	件数	23	26	24	14	20	21	22	21	19	18	16	25	249
呼吸器	MRSA	178	152	162	119	130	147	127	114	104	90	86	107	1516
	MSSA	82	48	81	58	56	64	73	76	68	70	79	70	825
	未検査													
	件数	260	200	243	177	186	211	200	190	172	160	165	177	2341
尿	MRSA	14	16	22	19	22	8	9	18	11	17	16	11	183
	MSSA	13	14	9	11	10	10	15	16	7	14	11	12	142
	未検査													
	件数	27	30	31	30	32	18	24	34	18	31	27	23	325
その他	MRSA													
	MSSA													
	未検査													
	件数													

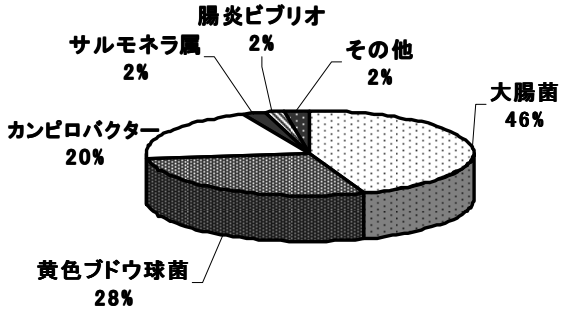


図１．糞便由来

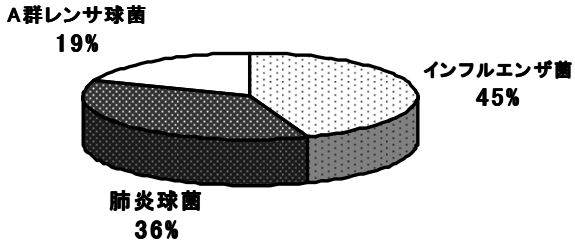


図５．咽頭及び鼻咽頭由来

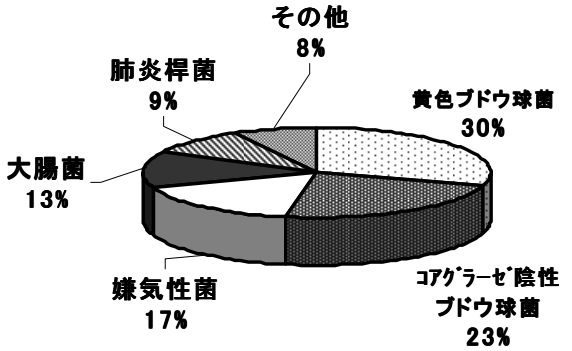


図２．穿刺液由来

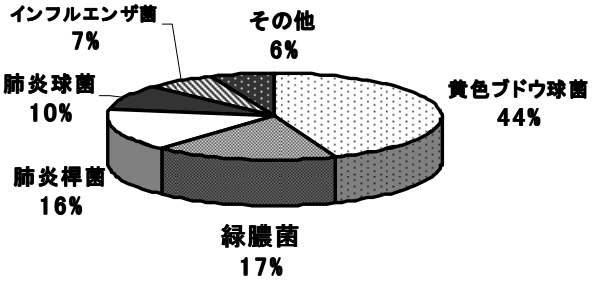


図６．喀痰，気管吸引液及び下気道由来

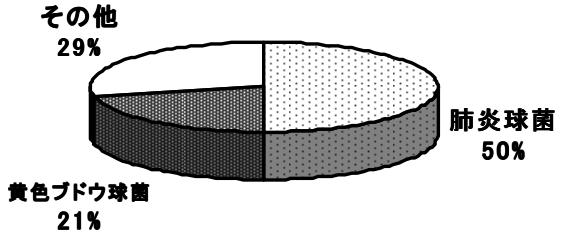


図３．髄液由来

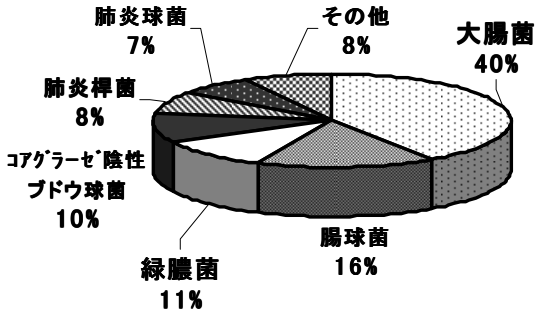


図７．尿由来

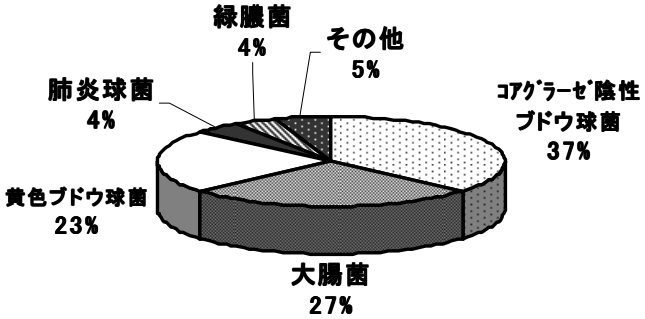


図４．血液由来

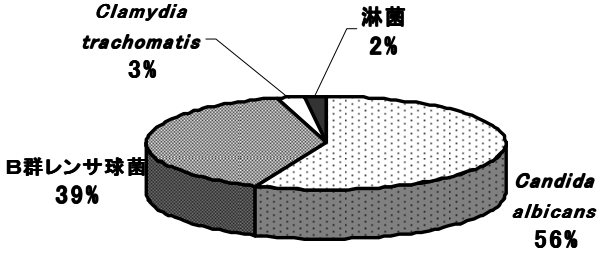


図８．陰部尿道頸管擦過(分泌)物由来

平成20年12月１日

漁港における腸炎ビブリオ調査(2007年)

嶋　智子　　磯部順子　　木全恵子　　清水美和子　　金谷潤一　　倉田　毅
綿引正則　　平田清久[1]

Vibrio parahaemolyticus Surveillance at Fishing Ports in Toyama Prefecture

Tomoko SHIMA, Junko ISOBE, Keiko KIMATA, Miwako SHIMIZU,
Junichi KANATANI, Takeshi KURATA, Masanori WATAHIKI
and Kiyohisa HIRATA[1]

2007年の全国の食中毒発生状況[1]によると，腸炎ビブリオは，病因物質別の発生件数ではカンピロバクター，ノロウイルス，サルモネラ属菌，自然毒，ぶどう球菌に次いで第6位，患者数ではノロウイルス，サルモネラ属菌，ウェルシュ菌，カンピロバクターに次いで第5位であった．

富山県厚生部では，夏期に多く発生する腸炎ビブリオ食中毒防止のため，飲食店等に対する衛生指導に加え，富山湾における腸炎ビブリオの汚染実態調査を実施している．富山県衛生研究所では，1979年から1995年までは市販魚介類の腸炎ビブリオ調査を実施し，1996年からは「Vp（腸炎ビブリオ）マリン実態調査」として，県内漁港の海水，海泥中の腸炎ビブリオの実態調査を行い，県民への食中毒注意報発令や効率的な監視指導のための基礎資料としている．

ここでは2007年の調査結果を報告する．

材料と方法

１．調査定点

Fig. 1に示す富山県内の主要5漁港（生地，魚津，四方，新湊および氷見）の海水について調査した．各漁港では併設市場前を検体採取場所とした．

２．調査期間

調査は6～9月の隔週月2回，10月および11月の月1回，計10回実施した．

３．検体採取

表層と底層の海水を採取した．前者は柄杓で，後者はハイロート採水器で水深2m付近を採取した．検体は県厚生センターと富山市保健所が採取し，採取後4時間以内に検査した．

４．腸炎ビブリオ数の測定

食塩ポリミキシンブイヨン培地を用いたMPN3本法で測定した [2]．

５．海水の塩分濃度の測定

赤沼式比重計を用いて測定した [3]．

６．*tdh* 遺伝子の検出

既報 [4]に従った．

７．海水からのTDH産生性腸炎ビブリオの分離

既報 [5] に従い，*tdh* 遺伝子が検出された検体について，血清型O3：K6 を対象とし，K6免疫磁気ビーズ処理 [6]を行って菌の分離を試みた．

結　　果

１．漁港海水中の腸炎ビブリオ菌数の月別変動

6～11月の漁港海水中の腸炎ビブリオ菌数は，<3～7.5×10^2／100mlであった（Table 1）．菌数は8月下旬から増加し始めたが，本年は，毎年菌数が最も多くなる8～9月においても，半数近くの定点で海水100ml

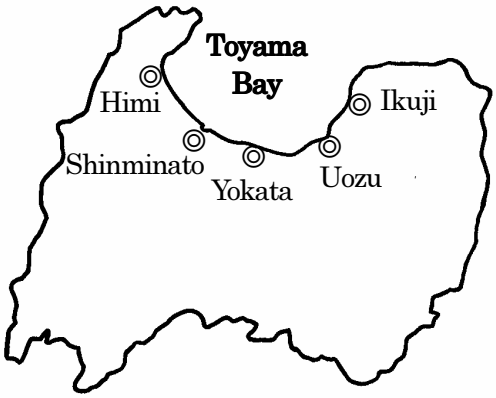


Fig. 1. Location of fishing ports for sampling in Toyama Prefecture

１．生活衛生課

Table 1. The number of *V. parahaemolyticus*, water temperature (WT) and salinity in seawater of fishing ports

Fishing Port		Date									
		6 / 4	6 / 18	7 / 3	7 / 23	8 / 6	8 / 20	9 / 3	9 / 10	10 / 1	11 / 5
Ikuji	V.p [Surface]	< 3 *	3.0	7.0	6.0	3.0	7.5×10^{1}	1.5×10^{1}	6.0	2.8×10^{1}	9.0
	WT (℃)	19.2	19.5	18.0	17.8	21.8	23.6	21.3	20.1	18.4	16.0
	Salinity (‰)	8.0	9.3	8.7	9.4	9.3	7.5	8.8	8.7	7.9	10.2
	V. p [Bottom]	< 3	4.0	7.0	3.0	1.5×10^{1}	2.4×10^{2}	7.0	1.1×10^{1}	1.5×10^{1}	9.3×10^{1}
	WT (℃)	18.1	20.4	21.2	21.7	25.0	28.1	25.7	24.8	23.6	21.5
	Salinity (‰)	32.5	34.3	33.0	32.6	32.0	30.9	30.2	31.6	31.3	34.3
Uozu	V.p [Surface]	< 3	< 3	< 3	< 3	2.9×10^{1}	2.1×10^{1}	9.3×10^{1}	9.0	< 3	4.0
	WT (℃)	19.4	21.2	19.4	19.8	26.2	26.8	24.4	24.1	19.2	18.0
	Salinity (‰)	25.0	24.9	18.9	13.7	24.7	11.0	12.6	23.5	9.5	18.0
	V. p [Bottom]	4.0	< 3	4.3×10^{1}	9.0	1.5×10^{1}	6.0	9.0	7.5×10^{2}	4.3×10^{1}	9.0
	WT (℃)	18.3	21.1	21.0	22.0	25.8	28.7	25.9	25.4	24.4	22.0
	Salinity (‰)	32.2	35.7	32.4	34.1	32.4	30.6	29.2	31.6	33.0	34.1
Shin-minato	V.p [Surface]	< 3	4.3×10^{1}	1.5×10^{1}	2.8×10^{1}	< 3	9.0	2.8×10^{1}	9.0	1.6×10^{1}	4.3×10^{1}
	WT (℃)	20.0	22.0	20.0	24.0	25.0	28.0	25.0	24.0	27.0	19.0
	Salinity (‰)	25.0	20.4	12.5	14.1	33.5	31.1	27.1	26.8	33.3	31.1
	V. p [Bottom]	9.0	1.4×10^{1}	6.0	7.0	3.0	9.0	9.3×10^{1}	7.0	1.5×10^{2}	4.3×10^{1}
	WT (℃)	17.0	21.0	20.0	23.0	23.0	28.0	26.0	25.0	27.0	15.0
	Salinity (‰)	34.9	32.2	31.9	34.1	35.0	34.8	32.4	33.1	34.5	34.3
Himi	V.p [Surface]	4.0	< 3	3.0	4.0	< 3	4.0	7.0	9.0	9.3×10^{1}	2.3×10^{1}
	WT (℃)	20.0	22.0	21.0	24.0	26.0	29.0	26.0	26.0	27.0	17.0
	Salinity (‰)	34.7	30.7	26.5	34.4	33.9	34.4	32.7	34.2	34.6	34.5
	V. p [Bottom]	4.0	2.1×10^{1}	< 3	< 3	< 3	1.6×10^{1}	7.0	7.5×10^{1}	2.3×10^{1}	2.3×10^{1}
	WT (℃)	19.0	21.0	21.0	24.0	23.0	29.0	27.0	26.0	27.0	19.0
	Salinity (‰)	35.6	31.6	29.6	34.9	35.4	35.1	32.9	33.9	34.1	34.1
Yokata	V.p [Surface]	< 3	1.1×10^{1}	1.1×10^{1}	2.0×10^{1}	3.0	7.0	2.3×10^{1}	9.0	9.0	2.3×10^{1}
	WT (℃)	21.6	23.5	25.0	24.0	27.0	31.5	28.0	26.5	24.0	20.0
	Salinity (‰)	27.1	26.7	20.3	25.9	33.6	34.5	28.0	29.6	34.5	34.5
	V. p [Bottom]	< 3	7.0	4.0	3.0	< 3	4.0	3.0	9.3×10^{1}	< 3	4.3×10^{1}
	WT (℃)	20.0	23.5	25.0	24.2	26.0	30.5	28.0	27.0	25.0	21.0
	Salinity (‰)	35.3	32.5	31.6	32.9	34.9	34.2	33.6	33.2	33.9	34.4

* No. of V.p (*V. parahaemolyticus*) in 100 ml of seawater by MPN method

** Not examined.

あたりの菌数は10以下であった．

２．漁港海水からの *tdh* 遺伝子検出と TDH 産生性腸炎ビブリオ O3:K6の分離状況

漁港海水からの *tdh* 遺伝子と TDH 産生性腸炎ビブリオ O3：K6の検出状況を Table 2に示した．*tdh* 遺伝子は8月上旬から11月にかけて，海水100検体中8件から検出された．漁港海水中の *tdh* 遺伝子については2000年から調査を実施しているが，2007年は最も低い検出率であった．*tdh* 遺伝子陽性であった8検体について K6免疫磁気ビーズ処理を行ったが，TDH 産生性腸炎ビブリオ O3:K6は分離されなかった．

考　　察

2007年，富山湾漁港海水中の腸炎ビブリオ数は，例年に比べて非常に少なかった．また，*tdh* 遺伝子検出率は8%と低く，TDH 産生性腸炎ビブリオ O3:K6も分離されなかった．

腸炎ビブリオによる食中毒は，海水中に増殖した本菌の付着した魚介類やその二次汚染によりしばしば発生するが，適切な処理や取扱いにより予防可能である．しかし，海水中の腸炎ビブリオ数が少なくても，本菌の増殖速度は他の菌と比べ非常に速いため，発育至適

Table 2. Detection of *tdh* gene and TDH+ *V. parahaemolyticus* O3:K6 in seawater of fishing ports

Fishing Port		Date										Total
		6/4	6/18	7/3	7/23	8/6	8/20	9/3	9/10	10/1	11/5	
Ikuji	*tdh*	0 / 2*	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 20
	TDH+ O3:K6	N.E**	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E
Uozu	*tdh*	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 20
	TDH+ O3:K6	N.E	N.E	N.E	N.E	0 / 1	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	0 / 1
Shin-minato	*tdh*	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 2	1 / 2	0 / 2	1 / 2	1 / 2	2 / 2	6 / 20
	TDH+ O3:K6	N.E	N.E	N.E	N.E	0 / 1	0 / 1	N.E	0 / 1	0 / 1	0 / 2	0 / 6
Himi	*tdh*	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	1 / 20
	TDH+ O3:K6	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	0 / 1	N.E	N.E	N.E	N.E	0 / 1
Yokata	*tdh*	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 20
	TDH+ O3:K6	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E
Total	*tdh*	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	2 / 10	2 / 10	0 / 10	1 / 10	1 / 10	2 / 10	8 / 100
	TDH+ O3:K6	N.E	N.E	N.E	N.E	0 / 2	0 / 2	N.E	0 / 1	0 / 1	0 / 2	0 / 8

* No. of positive / No. of samples examined ** Not examined.

Table 3. Relation between No. of *V. parahaemolyticus* and *tdh* gene in seawater of fishing ports

Fishing Port	No. of *V. parahaemolyticus* (/100mL)				
	0～9	10～99	100～	Total	
Ikuji	0 / 12*	0 / 7	0 / 1	0 / 20	(0 %)
Uozu	0 / 13	1 / 6	0 / 1	1 / 20	(5 %)
Shinminato	3 / 10	3 / 9	0 / 1	6 / 20	(30 %)
Himi	0 / 13	1 / 7	0 / 0	1 / 20	(5 %)
Yokata	0 / 13	0 / 7	0 / 0	0 / 20	(0 %)
Total	3 / 61 (5 %)	5 / 36 (14 %)	0 / 3 (0 %)	8 / 100	(8 %)

*No. of *tdh* gene-positive / No. of sample

条件では急激に増殖し食中毒の原因となる可能性がある．

近年は，紫外線殺菌海水装置が市場に導入され，衛生状態が良好になっていることから，海水中の腸炎ビブリオの実態だけでは，食中毒発生の指標にはならなくなってきていると思われる．今後は，海から水揚げされ魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態についても調査を行いたいと考えている．

謝　　辞

本調査の検体採取は，富山県生活衛生課で作成された計画に基づき，県内各厚生センター及び富山市保健所職員により行われました．これらの方々に深謝いたします．

文　　献

1．厚生労働省 HP：食中毒に関する情報 http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-2

2．細呂木志保，田中大祐，平田清久，磯部順子，刑部陽宅，城石将幸，長沢憲嗣 (1997)．富山衛研年報，20，184-186

3．小久保清治 (1969)．海洋生物学，恒星社厚生閣 水産学全集11，200 - 202

4．細呂木志保，磯部順子，田中大祐，清水美和子，香取幸治，刑部陽宅，永井美之，竹内　崇 (2002).

富山衛研年報，25，179 -182
5．刑部陽宅，細呂木志保，嶋　智子，田中大祐，木全恵子，香取幸治，磯部順子，綿引正則，永井美之 (2004). 富山衛研年報，27，129 - 137
6．刑部陽宅，細呂木志保，磯部順子，田中大祐，北村敬 (2000). 日食微誌，17，5-10

平成20年12月１日

富山県内で分離された溶血レンサ球菌の血清型と薬剤感受性（2007年）

嶋　智子　清水美和子　金谷潤一　木全恵子　磯部順子　綿引正則
林　喜代志[1]　加藤陽子[2]　中村政雄[2]　遠藤美代子[3]

Serotypes of Clinical Hemolytic Streptococcal Isolates in Toyama Prefecture (2007)

Tomoko SHIMA, Miwako SHIMIZU, Junichi KANATANI, Keiko KIMATA,
Junko ISOBE, Masanori WATAHIKI, Kiyoshi HAYASHI[1], Yoko KATO[2],
Masao NAKAMURA[2] and Miyoko ENDO[3]

Ａ群溶血レンサ球菌（溶連菌）は，咽頭炎，膿痂疹など様々な感染症の起因菌となり，感染症法では，本菌による咽頭炎が小児科定点報告の5類感染症に位置づけられている．さらに近年，本菌による重篤な劇症型溶血レンサ球菌感染症や食品を介した集団発生も報告されている[1]．また，Ｂ群溶連菌は，新生児の敗血症や髄膜炎の原因となる．

2007年の富山県におけるＡ群溶連菌咽頭炎患者報告数は，年間5,790人（199.66人/定点）であった[2]．前年比160％とかなり増加していた．ここでは，2007年に富山県内で患者から分離された溶連菌について，血清型を調査した結果を報告する．

材料と方法

分離菌株：

2007年に富山県内2か所の公立病院で患者から分離された溶連菌（Ａ群52株およびＢ群40株，計92株）について，Ａ群のＴ型別およびＢ群の型別を実施した．Ａ群のＴ型別およびＢ群の型別は，それぞれの型別用抗血清（デンカ生研）を用いてスライド凝集反応にて行った．

薬剤感受性試験：

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薬剤について，MIC-2000を用いた微量液体希釈法で測定した．測定は東京都健康安全研究センターにて行った．また，MIC値16μg/ml以上を示すものを耐性菌とした．

結果と考察

１．Ａ群溶連菌のＴ型別

2007年に分離されたＡ群52株のＴ型別結果をTable 1およびFig. 1に示した．分離率が高いＴ型は，順にT1型（16株，30.8％），T4型（13株，25.0％），TB3264型（5株，9.6％），T11型（4株，7.7％），T12型（3株，5.8％）であった．昨年と比較して，T1型，T4型，TB3264型が増加し，T11型，T25型，T12型，T28型が減少していた．T1型は2006年に引き続き分離率が高く，T1型とT4型で55.8％と調査株の半数以上を占めた．

２．Ｂ群溶連菌の型別

2007年に分離されたＢ群40株の型別結果をTable 2およびFig. 2に示した．分離率が高い型は，順にⅥ（NT6）型（11株，27.5％），Ｉｂ型（9株，22.5％），Ⅴ型（9株，22.5％），Ｉａ型（4株，10.0％）であった．Ⅵ型の分離率が最も高く，この傾向は1996年以来続いている．次に分離率が高かったのはＩｂ型で，Ⅵ型およびＩｂ型で調査株の50.0％を占めた．

３．溶連菌の薬剤感受性

2007年に分離された溶連菌のうち47株（Ａ群35株，Ｂ群12株）について実施した薬剤感受性試験の結果をTable 3に，またその薬剤感受性パターンをTable 4に示した．

Ａ群溶連菌35株では，TCに対して31.4％（T4型9株，Ｔ型別不能2株），EMに対して28.6％（T1型10株），CAMに対して8.6％（T1型3株）が耐性であった．とくに，T4型は10株中9株がTC耐性，T1型は13株中10株がEM耐性であった．昨年と比較して，EM，CAMなどのマクロライド系薬剤に対する耐性菌が増

１．富山県立中央病院　２．富山市民病院
３．東京都健康安全研究センター

Table 1. Monthly Distribution of T Serotypes of Clinical Group A Hemolytic *Streptococci* in 2007

T type	No. of Isolates												Total	
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	No.	%
T-1		4	3	3	3	3							16	30.8
T-2													0	0.0
T-3						1	1						2	3.8
T-4	1		1	1		4	2	1		1	2		13	25.0
T-6													0	0.0
T-8													0	0.0
T-9													0	0.0
T-11	2			1								1	4	7.7
T-12					1			1				1	3	5.8
T-13													0	0.0
T-18													0	0.0
T-22													0	0.0
T-23													0	0.0
T-25													0	0.0
T-28					1								1	1.9
T-B3264				1		2	1	1					5	9.6
T-Imp.19													0	0.0
T-5/27/44			1										1	1.9
T-14/49								1		1			2	3.8
Untypable	2		1		1					1			5	9.6
Total	5	4	6	6	6	10	4	4	0	3	2	2	52	100.0

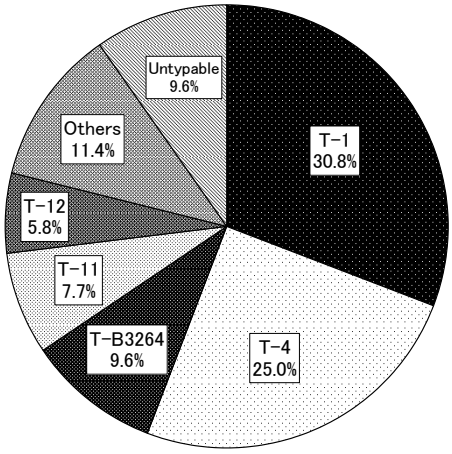


Fig 1. Proportion of T Serotypes of Clinical Group A Hemolytic *Streptococci* in 2007

Table 2. Monthly Distribution of Serotypes of Clinical Group B Hemolytic *Streptococci* in 2007

Type	No. of Isolates												Total	
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	No.	%
Ⅰa	1		1	1			1						4	10.0
Ⅰb	2	1		1						2	3		9	22.5
Ⅱ	1		1										2	5.0
Ⅲ										1			1	2.5
Ⅳ													0	0.0
Ⅴ	2		1	1	1	1		2		1			9	22.5
Ⅵ	2	1		1		1	1				4	1	11	27.5
Ⅶ													0	0.0
Ⅷ		1		1				1					3	7.5
Untypable											1		1	2.5
Total	8	3	3	5	1	2	2	3	0	4	8	1	40	100.0

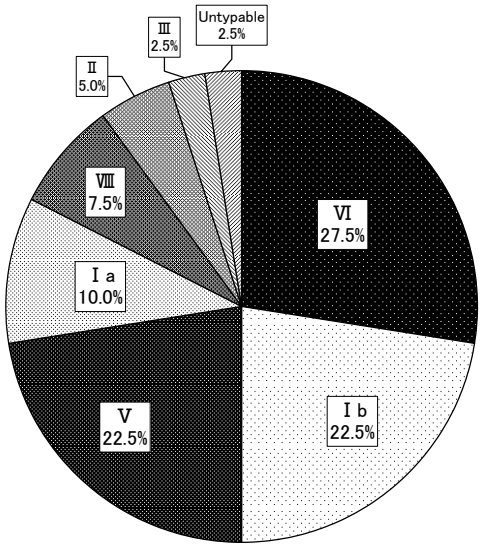


Fig 2. Proportion of Serotypes of Clinical Group B Hemolytic *Streptococci* in 2007

Table 3. Antibiotic Susceptibilities of Clinical Hemolytic *Streptococci* in 2007

Group	MIC (μg/ml)	Antibiotics								
		ABPC	CFDN	CEX	CDTR	TC	CP	EM	CAM	LCM
A	>64									
	64					3				
	32					8				
	16							10	3	
	8							5	11	
	4						6	2	1	
	2						29		2	
	1									
	0.5			29		3				3
	0.25			6		20				28
	0.12					1		1		4
	0.06							17	14	
	0.03	24							4	
	0.015	11								
	0.008		32		27					
	≦0.004		3		8					

Group	MIC (μg/ml)	Antibiotics								
		ABPC	CFDN	CEX	CDTR	TC	CP	EM	CAM	LCM
B	>64							1		1
	64					2				
	32					2				
	16								1*	
	8									
	4			1			1			
	2			11			11			
	1									
	0.5					1				8
	0.25					7				3
	0.12	10						3	2	
	0.06	2						6	9	
	0.03		10		6			2**		
	0.015		2		6					
	0.0075									

* ＞16 μg/ml
** ≦0.03 μg/ml

Table 4. Antibiotic Resistance Patterns of Clinical Hemolytic *Streptococci* in 2007

Resistance pattern	No. of strains (%)	
	Group A	Group B
EM, CAM, LCM		1(8.3)
EM, CAM	3(8.6)	
TC	11(31.4)	4(33.3)
EM	7(20.0)	
Susceptible	14(40.0)	7(58.3)
Total	35(100.0)	12(100.0)

加している傾向がみられた．B群溶連菌12株では，TCに対して33.3%（V型2株，Ⅰa型1株，型別不能1株），EM，CAMおよびLCMに対して8.3%（Ⅰb型1株）が耐性を示した．

薬剤感受性パターンでみると，A群溶連菌ではTC単剤耐性菌が31.4%（11株），EM単剤耐性菌が20.0%（7株），EMおよびCAM耐性菌が8.6%（3株）であった．B群溶連菌では，TC単剤耐性菌が33.3%（4株）EM，CAMおよびLCM耐性菌が8.3%（1株）であった．

文　　献

1．国立感染症研究所編（2004）．病原微生物検出情報，25巻10号，252-253

2．富山県衛生研究所編集・発行（2008）.富山県感染症発生動向調査事業報告書（平成19年），p21

平成20年12月１日

富山県内での腸管出血性大腸菌感染症発生状況 (2007)

木全恵子　嶋　智子　清水美和子　金谷潤一　磯部順子　倉田　毅　綿引正則

The enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections detected in Toyama Prefecture, 2007

Keiko KIMATA, Tomoko SHIMA, Miwako SHIMIZU, Junichi KANATANI,
Junko ISOBE, Takeshi KURATA and Masanori WATAHIKI

2007年1月から12月までに富山県において発生した腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は38事例であり，感染者は81名であった．その内訳はO157による感染症が35事例（感染者77名）,O26による感染症が3事例（感染者4名）であった（表1）．以下にこれらの感染事例についてその概要,疫学的解析結果を報告する．

2007年におけるEHEC感染症発生状況：2007年の富山県におけるEHEC感染症は38事例，感染者数は81名であり,前年（31事例，117名）に比べ,事例数は1.2倍に微増したが，感染者数では前年比 69.2%と大きく減少した.感染症の発生形態は集団感染が6事例,家族内感染が9事例であった（表1）．各感染事例数及び感染者数の月別動向は図1に示す通りであり，6月から9月間に発生が集中していた．6月には集団感染が１事例（感染者6名），家族内感染が3事例発生した．7月には散発が9事例，家族内感染が1事例と多発した(年間感染事例数の26%)．8月に集団感染2事例（感染者はそれぞれ21名と3名），家族内感染が1事例報告された．9月に集団感染2事例（感染者はそれぞれ2名，3名），家族内感染2事例発生した．

感染者の症状別内訳は有症者56名，無症状病原体保有者25名であった．有症者のうちHUSが2名，死亡が1名であった(なお，菌株を分離できなかったHUS患者の血清よりO157抗体が陽性となった1名も 有症者に含む）．

感染者全体における有症者の割合は69.1%であったが，その割合は年齢層によって大きな差があった．各年齢層に占める有症者の割合は，0歳～10歳代では80.7%，20歳代では78.9%であったが，30歳代及び50歳代ではそれぞれ40.0%，54.5%と低かった(図2).

感染者の年齢層は20歳代が全体の23.5%，次いで10歳代が22.0%，50歳代が13.6%を占めた．性別では感染者全体における男女比は男性51.9%，女性48.1%であったが，20歳未満では男性の割合が73%，20歳以上では女性の割合が58%と年齢別でその比は異なっていた (図3).

分離株の病原因子：2007年1月から12月までに富山県で発生したEHEC感染者から分離された株について，病原因子遺伝子の確認を行った．解析の対象は散発事例由来株及び集団発生事例・家族内感染事例の代表株である．これらの菌株の血清型の内訳はO157が35株，O26が3株であった．病原因子遺伝子の確認については既報［1］に従い，CVD432，*eaeA*，*aggR*，ベロ毒素遺伝子 *stx1* (VT1遺伝子)，*stx2* (VT2遺伝子)，*invE*，*elt* (LT遺伝子)，*esth* (STh遺伝子)，*estp* (STp遺伝子)，*bfp*，EAF，*astA* についてマルチプレックスPCRによる検索を行った．その結果，分離株はすべて接着性病原因子遺伝子 *eaeA* を保有していた．また、各事例におけるベロ毒素遺伝子の保有状況は表1のとおりであった．毒素型では *stx1*・*stx2*保有株が26株，*stx2*保有株が10株，*stx1*保有株が3株であり，*stx1*・*stx2*保有株が全体の67%を占めた．なお,事例No. 35由来の分離株については同一患者より *stx1*・*stx2*遺伝子保有型と *stx2*遺伝子保有型の２つのベロ毒素遺伝子保有型の分離株が単離された．

eaeA，*stx1*，*stx2*以外の上記病原因子遺伝子は今回の分離株は全て陰性であった．

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）によるDNA解析：2007年1月から12月までに富山県で発生したEHEC感染症38事例について分離菌株のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行った．PFGEは制限酵素 *Xba*Iを用いた標準化プロトコールに基づいて行った［2］．得られたPFGEパターンの解析は解析ソフトFingerPrinting II(Bio-Rad)を用いて行った．FingerPrinting IIによるデンドログラム解析にはUPGMA法とDice係数を用いて行い,トレランス値は1.2%とした．

得られた2007年の富山県における分離株のPFGEにおける酵素特異的切断パターンとデンドログラム解

表１．2007年における腸管出血性大腸菌感染症発生状況

事例No.	発生時期	感染者数（人）	発生態様	血清型	ベロ毒素遺伝子	
					stx1	*stx2*
1	2007.4	3	集団感染	O157:H7	＋	＋
2	2007.6	2	家族内感染	O157:HNM	＋	＋
3	2007.6	3	家族内感染	O157:H7	－	＋
4	2007.6	6	食中毒	O157:H7	＋	＋
5	2007.6	1	散発	O157:H7	－	＋
6	2007.6	1	散発	O157:H7	＋	＋
7	2007.6	2	家族内感染	O26:H11	＋	－
8	2007.7	1	散発	O157:H7	－	＋
9	2007.7	1	散発	O157:H7	－	＋
10	2007.7	1	散発	O157:H7	＋	＋
11	2007.7	1	散発	O157:H7	＋	＋
12	2007.7	1	散発	O26:H11	＋	－
13	2007.7	1	散発	O157:H7	＋	＋
14	2007.7	2	家族内感染	O157:H7	＋	＋
15	2007.7	1	散発	O157:H7	－	＋
16	2007.7	1	散発	O157:H7	＋	＋
17	2007.7	1	散発	O157:H7	＋	＋
18	2007.8	1	散発	O26:H11	＋	－
19	2007.8	1	散発	O157:H7	＋	＋
20	2007. 8～9	21	食中毒	O157:H7	＋	＋
21	2007.8	1	散発	O157:H7	＋	＋
22	2007.8	1	散発	O157:H7	＋	＋
23	2007.8	1	散発	O157:H7	＋	＋
24	2007.8	2	家族内感染	O157:H7	＋	＋
25	2007.8	3	集団感染	O157:H7	＋	＋
26	2007.9	2	家族内感染	O157:H7	＋	＋
27	2007.9	2	集団感染	O157:H7	＋	＋
28	2007.9	1	散発	O157:H7	＋	＋
29	2007.9	1	散発	O157:H7	＋	＋
30	2007.9	2	家族内感染	O157:H7	＋	＋
31	2007.9	1	散発	O157:H7	＋	＋
32	2007.9	3	集団感染	O157:H7	－	＋
33	2007.9	1	散発	O157:H7	＋	＋
34	2007.10	2	家族内感染	O157:H7	－	＋
35*	2007.10	1	散発	O157:H7	＋	＋
				O157:H7	－	＋
36	2007.10	3	家族内感染	O157:H7	＋	＋
37	2007.11	1	散発	O157:H7	－	＋
38	2007.12	1	散発	O157:H7	－	＋
O157 35件（77名）,O26 3件（4名）　計　38件（81名）						

＊事例35ではベロ毒素遺伝子保有状況の異なるパターンの2種類の菌株が分離された.

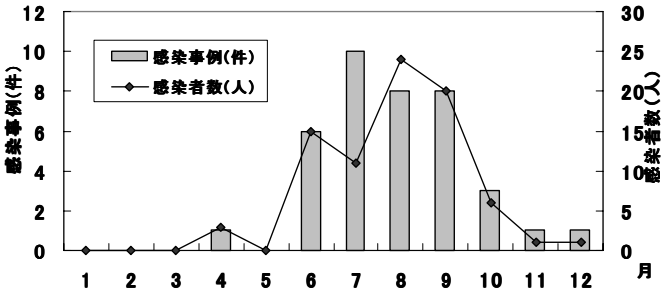


図１．腸管出血性大腸菌感染症月別発生動向

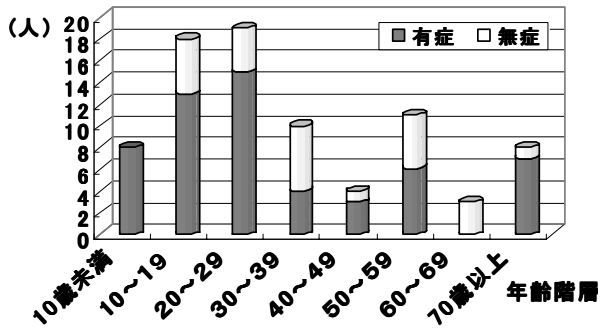


図２．感染者の各年齢層における有症者・無症者数
（n=81，P＜0.05）

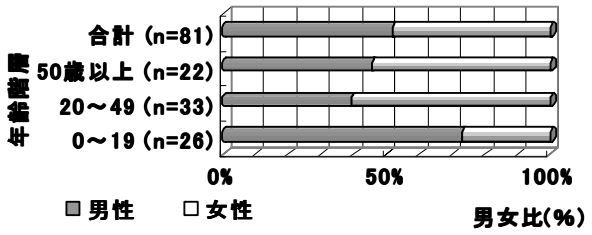


図３．感染者の各年齢層に占める男女比
（n=81，P＜0.05）

析を図4に示した．2007年に富山県で分離されたO157 *stx1*・*stx2*型による感染26事例ではPFGEによる酵素特異的切断パターンは14パターンに分岐した（図4Ａ）．O157 *stx1*・*stx2*型のPFGEパターンは90%以上の相同性を示すグループⅠ，グループⅡ，グループⅢに分岐した．また，O157*stx2*型による感染9事例では7パターン，O26による感染3事例では3パターンに分岐した（図4Ｂ，図4Ｃ）．このうち，同一患者よりO157 *stx1*・*stx2*型とO157*stx2*型が単離された事例No.35由来の分離株についてはPFGEによるパターンは一致していた（図4　レーン3，20）．

発生態様：2007年に富山県で発生したEHEC感染事例について概要を述べる．

1) 散発事例及び家族内感染事例

2007年において富山県で発生した家族内感染は9事例，散発は23事例であった．このうち6月に報告された家族内感染事例では，感染者が全員無症状病原体保

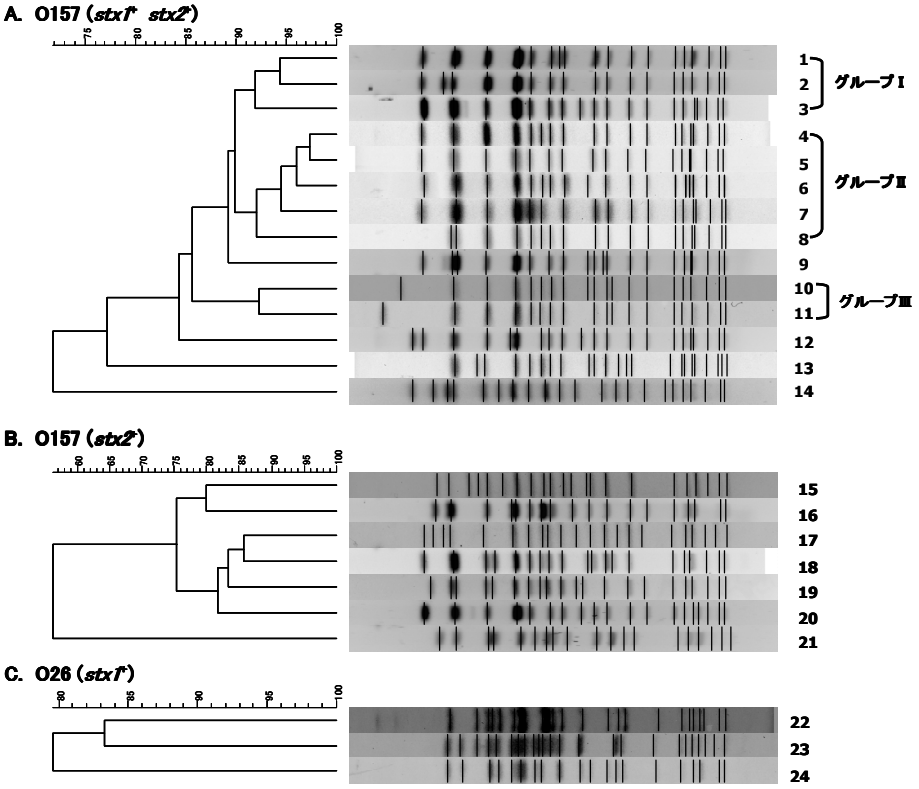


図４．2007年に富山県より分離された腸管出血性大腸菌の主な PFGE パターンとデンドログラムのクラスター解析（グループⅠからⅢはクラスター解析により90％以上の相同性を示したグループである.）

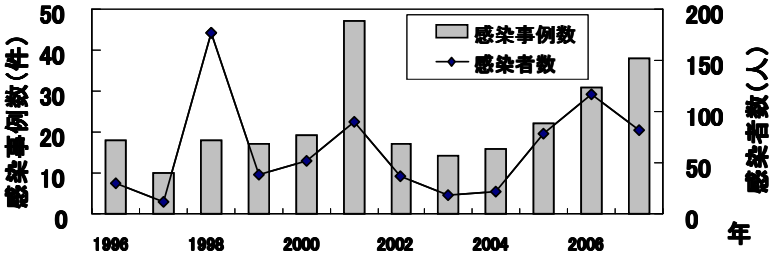


図５．腸管出血性大腸菌感染症発生年次推移

有者であった (表1 事例 No.7). この事例では感染者数は2名であり，初発患者の探知は定期検便であった.

7月には散発が9事例，家族内感染が1事例と多発した(表1 事例 No.8～No.17). PFGE 解析の結果，7月に多発した事例のうち，散発4事例と家族内感染1事例を含む5事例の分離株の PFGE パターンが2つのパターンに集積した（このうち1パターンは6月中旬発生した事例由来株とも一致した). しかし，これらの PFGE パターンが一致した事例間における患者の喫食等に共通性はなかった.

2)集団発生事例

2007年において富山県で発生した集団感染は6事例でそのうち2事例は焼肉店を原因施設とする食中毒事例であった(表1 事例 No.4，No.20). 以下にその概略を述べる.

事例 No.4：2007年6月10日に3名のグループが A 飲食店を利用した. そのうち1名が14日より腹痛，下痢症状を呈し，医療機関を受診した. 検便より O157 *stx1*・*stx2*型が検出されたため，18日に O157感染症の届出が提出された. 疫学調査を行った結果， 6月9

日から12日にかけて同A飲食店を利用した17名が腹痛，下痢症状を呈していることが判明した．さらに検便調査により5名のO157感染，4名のカンピロバクター感染が確認された（O157，カンピロバクターの重複感染者1名を含む）．これらの感染者から分離されたO157，カンピロバクター菌株について， PFGEによる解析を行った結果，それぞれ同一クローンであることが判明した．本事例はO157およびカンピロバクターが病因物質であると判明した．O157感染者3名，カンピロバクター感染者3名，O157，カンピロバクターの重複感染者1名はレバ刺しを喫食しており，O157及びカンピロバクターにより汚染された牛レバーの喫食または2次汚染された食品の喫食による感染と推測された．しかし，牛レバーについて残品がなかったため，調査できなかった．管轄厚生センターはA飲食店に対して営業停止処分，生肉提供の自粛，手洗い消毒設備の整備と調理従事者への手洗い消毒の徹底と衛生教育を実施した．

事例No.20：2007年8月24日に医療機関より腹痛，下痢症状を呈した患者からO157 *stx1*・*stx2*型が検出された旨感染症発生届が提出された．疫学調査の結果，患者は8月18日にB飲食店を利用しており，8月18日から24日までに同飲食店を利用した17グループのうち19名が腹痛，下痢症状を呈していることが判明した．検便より，喫食者21名よりO157 *stx1*・*stx2*型が検出された（有症者11名，無症状保菌者10名）．また，B飲食店の食材のうち，焼き肉用のレバー，テッチャン（牛大腸），ミスジ，牛ヒレよりO157が検出され，O157による食品の2次汚染が推測された．感染者，食材から分離されたO157のPFGE解析の結果，これらの菌株は同一パターンを示した．このB飲食店は上述した事例No.4と同一店であった．管轄厚生センターはB飲食店に対して長期の営業停止処分を行い食肉の衛生的取扱い法，施設設備等衛生管理体制の確保について指導，確認を行った．また，これらの事例を受けて本県では焼肉店，食肉販売業者（約1240店）に対し，緊急点検を行った． 同時に消費者，飲食店，食肉販売店に対し，パンフレット等で食中毒への注意喚起を行った．

考　　察

2007年の全国におけるEHEC感染症届出件数は4606件であり，1999年に感染症発生動向調査が開始されて以来，最多となった［3］．富山県においても2007年のEHEC感染発生状況は38事例，感染者81名であり，1996年以降において感染事例数は2番目に，感染者数は4番目に多かった（図5）．人口10万対発生数を見ると,富山県は7.36であり，全国平均(3.60)に比べると2倍強と多かった．さらに石川県（11.26），福井県（5.90）と,北陸地方は全国的に発生数の多い地域の1つであった．

本年の感染事例に関してPFGEパターンの解析では県内で同一のPFGEパターンもしくはそれらと相同性の高いパターンが県内の広域・長期にわたり検出され,このPFGEパターンを示す分離株は流行株であると考えられた．これらの流行株は3つのPFGEパターンに集約されており，この3つのPFGEパターンは全国10県以上からも検出されていた［3］．このように，都道府県を越えて同一あるいは近縁な流行株が断続的に検出されており，食品の流通が広域化，迅速化することによる感染源の拡大や分散が懸念される．

今後はこのような事例が速やかに報告・還元されるとともに，diffuse outbreak等の発生に備えた対策が必要になると考えられる．

謝　　辞

本稿を終えるにあたり， 国立感染症研究所パルスネット寺嶋淳先生並びに関係機関の方々のご協力に深く感謝致します。

文　　献

1．Keiko Kimata, Tomoko Shima, Miwako Shimizu, Daisuke Tanaka, Junko Isobe, Yotaku Gyobu, Masanori Watahiki, and Yoshiyuki Nagai (2005). Microbiol.Immunol., 49, 485-492.
2．Watanabe, H., Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S. and Tamura, K. (2002) J. Jpn. Assoc. Infect. Dis., 76, 842-848 .
3．寺嶋淳，泉谷秀昌，伊豫田淳，三戸部治郎，石原朋子，渡辺治雄（2008）病原微生物検出情報，29，117―120.

平成20年12月１日

平成19年度富山県食品衛生検査の精度管理調査
－微生物学的検査－

磯部順子　清水美和子　嶋　智子　木全恵子　綿引正則　前多隆志

Quality Control of the Bacterial Testing of Food for Good Laboratory Practice in Toyama Prefecture（2007）

Junko ISOBE, Miwako SHIMIZU, Tomoko SHIMA, Keiko KIMATA, Masanori WATAHIKI and Takashi MAEDA

富山県食品衛生検査業務管理要綱[1]に基づき，平成11年から県内の食品衛生検査機関に対して検査水準の維持，向上を目的として微生物学的精度管理調査を実施している．平成19年度の微生物学的検査の精度管理調査項目は，牛乳中に添加した細菌数の測定及び食品の腸管出血性大腸菌検査とした．検査用試料は，当研究所で調製，各検査機関に配布し，各々の検査結果の報告を受けて集計と評価を行ったので報告する．

材料及び方法

(1)　参加機関

新川厚生センター，中部厚生センター，高岡厚生センター，砺波厚生センター，食肉検査所，富山市保健所および衛生研究所

(2)調査日程

平成20年2月4日～2月22日

(3) 配布試料

①枯草菌を加えた牛乳　10 ml［菌数測定］：菌数が100～1,000cfu/ml となるよう市販品「枯草菌6633'栄研'」を調製し、牛乳(常温保存可)に添加した。なお、牛乳原液の生菌数は 0 cfu/mlであった。

②模擬食品　A～C　各50 g［腸管出血性大腸菌O157検出］：EHECO157培養液を希釈し、40cfu/50g となるよう、細分化した豆腐に添加し、良く攪拌した。豆腐は予備検査で該菌が検出されないことを確認した。

添加した菌株は次のとおりである。

試料名	添加細菌
模擬食品A	O157:H7
模擬食品B	未接種
模擬食品C	O157未接種 O111（VT1＋）

(4) 検査方法

①菌数測定：各機関の検査実施標準作業書（SOP）に準拠して行うこととする。

②EHECO157検出：食安監発第1102004号「食品からの EHECO157、O26の検査法」に準拠し、行うこととする。

(5) 解析方法

①牛乳中細菌数の測定値の集計

各機関の2回の測定値について、実測値(D)とその平均の測定値(E)の両方で解析した。解析は標準偏差(SD)、　変動係数（CV）、Z-スコアを活用して行った。

②模擬食品中の EHECO157検出結果の解析方法

各機関の EHECO157の検体別検出状況を、検査に使用した培地とともに比較した。

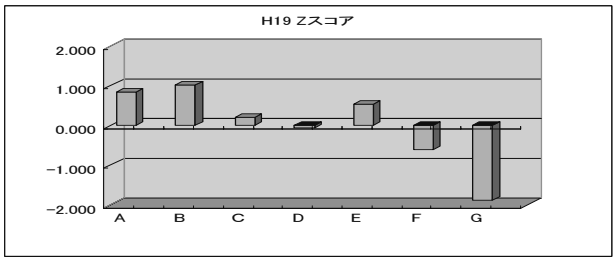
集計と評価

(1) 牛乳の細菌数測定

各機関の成績は表1に示した。報告された測定値 E（各機関の実測値2回を平均した値）の平均は7.98×10^4cfu/ml、最大値8.75×10^4cfu/ml、最小値6.65×10^4cfu/ml、であった。標準偏差(SD)7,228(log10表記0.041)となり、各機関の結果は平均値±2×SD の範囲内であった。変動係数(CV)は9.059（log 表記0.90）ときわめて良好であった。一方、測定値のばらつき度合を評価するため、Z スコアを算出した。Z スコアは別名「標準測度」と呼ばれ、「Z＝(測定値－測定値平均)/測定値標準偏差」の計算式で求められ、その絶対値によって各機関の測定値の評価をおこなうことができる。判断基準は｜Z｜≦ 2 のとき「良好」、2 <｜Z｜< 3 のとき「改善が必要かどうかの検討必要」、3 ≦｜Z｜のとき「改善措置を要する」となっている。今回の調査において、機関 G のスコアが1.891とやや高かったが、

全機関のＺスコアはいずれも2未満で、測定は「良好」と判断された。

さらに、各機関の実測値 D(2回)で解析すると、平均は7.98×104cfu/ml、標準偏差(SD)7,660となり、各機関の結果は平均値±2×SD の範囲内であった。変動係数(CV)は0.84(log 対数計算)ときわめて良好であった。また、Ｚスコアは機関Ｇの1回を除き、いずれも2未満で、測定値のばらつき度合いは良好と判断された。しかし、機関Ｇについては2回の測定値のうち1回のＺスコアが－2.276で、「改善が必要かどうかの検討が必要」と評価する。この測定値のばらつきの原因については不明であるが、その原因のひとつとして、担当者の経験年数が0年(10か月)であることから、経験不足による操作のばらつきである可能性が考えられよう。担当者の結果が安定するよう、対策を講じるべきである。



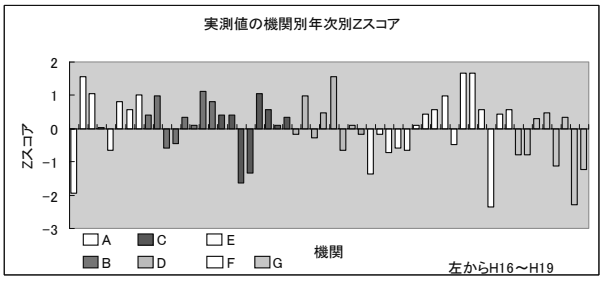


表１．平成19年度富山県食品衛生精度管理調査結果

機関名	牛乳の生菌数	log	偏差	Zスコア	模擬食品O157検出 検体名	結果
A	8.60×10^4	4.93	0.034	0.834	食品A	**陽　性**
					食品B	陰　性
					食品C	陰　性
B	8.75×10^4	4.94	0.042	1.017	食品A	**陽　性**
					食品B	陰　性
					食品C	陰　性
C	8.10×10^4	4.91	0.008	0.199	食品A	**陽　性**
					食品B	陰　性
					食品C	陰　性
D	7.90×10^4	4.90	−0.003	−0.066	食品A	**陽　性**
					食品B	陰　性
					食品C	陰　性
E	8.35×10^4	4.92	0.021	0.521	食品A	**陽　性**
					食品B	陰　性
					食品C	陰　性
F	7.5×10^4	4.88	−0.025	−0.616	食品A	**陽　性**
					食品B	陰　性
					食品C	陰　性
G	6.65×10^4	4.82	−0.077	−1.891	食品A	**陽　性**
					食品B	陰　性
					食品C	陰　性
平均値(X)	7.98×10^4	4.90				
標準偏差(S)		0.041				
C.V.(変動係数)		0.84				

(2) 模擬食品中の EHEC O157の検出

各機関の成績は表１に示した。すべての機関で試料 A から EHEC O157を分離した。試料 C については、すべての機関が EHEC O157陰性、O111検出と回答した。また、分離された菌株の VT 遺伝子について、すべての機関がその毒素型は A では VT1,2、C では VT1であると回答した。機関 G を除き、「PCRO157one shot PCR Typing kit」を使用し、あらかじめ試薬に添加されている内部コントロールの確認もされていた。それ以外の PCR 試薬を使用した場合には、内部コントロールに EC3が使用されていた。DNA 抽出は、機関 G がアルカリ熱抽出法、他の機関は Prepman 法で実施され、いずれの方法でも DNA は良好に抽出されていた。

最終的にすべての機関で、試料 A から EHEC　O157を、試料 C から EHEC　O111を検出、試料 B は EHEC 陰性であると判断した。

次に試料別に成績を比較した。

食品 A：EHEC　O157：H7 (VT1,2)が模擬食品に40 cfu/50g となるよう接種してあった。添加量は少ないが、一晩培養で PCR の下限値を超える菌数になるはずである。すべての機関で EHEC　O157を分離した。

食品 B：大腸菌は接種されていなかった。すべての機関で未検出であった。

食品 C：EHEC O111(VT1)が模擬食品に31cfu/50 g となるよう接種してあった。すべての機関で菌を分離できた。O111の場合、この培養条件で検出限界まで増菌しない場合があることが指摘されているが、今回は PCR、培養いずれの方法でも検出が可能であった。

考　　察

EHEC O157の検出については、昨年度、新しい通知法(平成18年11月2日食安監発第1102004号)の検査を実施している。しかし、PCR 阻害の影響を受けた検体もあり、PCR を検査に導入するメリットを実感できない結果であった。その後、衛生研究所で検討し、内部標準を導入することでその検査結果の信頼性を確保する方法を SOP に盛り込んだ。そして今回は SOP と PCR の迅速性の確認のため、ふたたび精度管理項目を EHEC とした。内部標準を併用することで、試料からの持ち込みによる PCR 阻害を確認できることから PCR 陰性の結果をもって腸管出血性大腸菌陰性と判断できることが確認できた。

文　　献

１．富山県厚生部長通知，薬食1,229号，平成10年12月16日

キャピラリー電気泳動による植物エストロゲン，８－プレニルナリンゲニンの光学異性体分析法

小玉修嗣　　健名智子　　山下智富　　高柳信孝

Enantioseparation of 8-prenylnaringenin, a phytoestrogen, by hydroxypropyl-γ-cyclodectrin-modified micellar electrokinetic chromatography

Shuji KODAMA, Mikiya OHTO, Tomoko KEMMEI, Eriko NAKAYAMA, Tomohisa YAMASHITA, Tatsuya MURAMOTO, Nobutaka TAKAYANAGI

近年，ビール中の生理活性物質が注目されている．ビールの原料であるホップには様々な生理活性物質があり，その一つであるキサントフモール（XN）は発ガン抑制作用を示すことが明らかになっている[1]．ビール醸造中に，XN の大部分は環化によりイソキサントフモール（IX）に変換され，キラル化合物となる（図１）．

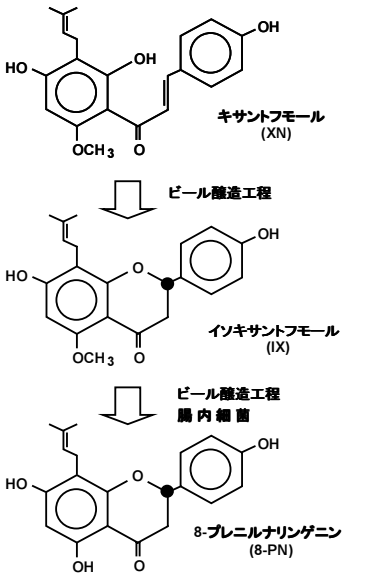


図1. 8-プレニルナリンゲニンの生成過程
●：不斉炭素原子

我々はビール中の IX をキャピラリー電気泳動法で分析したところ，いずれのビールでもラセミ体であることを見いだした．また、片方の IX 光学異性体を加熱処理すると，容易にラセミ化することを報告した[2]．IX の生理活性としては弱いエストロゲン作用が報告されている[3]．一方，8-プレニルナリンゲニン（8-PN）は植物最強のエストロゲン活性を有することが知られている[4]．8-PN はビール醸造工程で微量生成する他[5]，腸内細菌により IX の脱 O-メチル化により生成する[6]．8-PN もキラル化合物ではあるが，光学異性体間でのエストロゲン活性の差異については未だ報告されていない．そこで，ビール中に微量存在する8-PN の光学異性体比を明らかにすることを最終目標として，今回は，8-PN の光学異性体分析法の確立を目的とした．

材料及び方法

(1)　試薬

ドデシル硫酸ナトリウム（電気泳動用）は Bio-Rad 社製，IX は Alexis Biochemicals 社製，8-PN とヒドロキシプロピル-g-シクロデキストリン（HP-γ-CD）は Sigma 社製，その他の試薬は和光純薬製を用いた．

(2) 分析法

アジレントテクノロジー製のキャピラリー電気泳動システムで分析した。ジーエルサイエンス製スルホン化キャピラリー（FunCap-CE Type S, 50㎜i.d. 有効長 56 cm）を用いた。泳動緩衝液はHP-γ-CD及びSDS を含むリン酸緩衝液を用いた。印加電圧は＋20 kV、キャピラリー温度は20℃とし、210 nm の吸光度を測定した。

結果及び考察

ビール中の IX の光学異性体分析で用いた方法[2]に従って，8-PN の分析を行った（図２）．

その結果，IX とともに8-PN も光学異性体分析できることがわかった．8-PN のピーク高さは IX のそれとほぼ同じであった．ビール中の8-PN 濃度は，IX

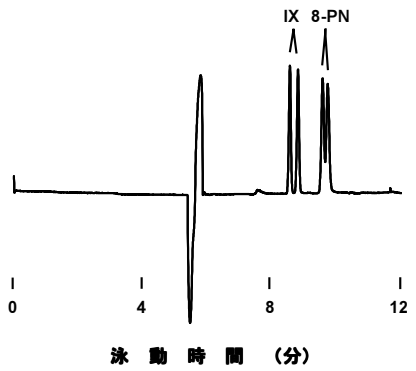


図2. IX 及び 8-PN のエレクトロフェログラム

濃度の1/10～1/100と低いことが報告されている[5]. したがって，ビール中の8-PN 光学異性体分析するためには，前処理段階における濃縮操作が必要となる. 今後，前処理操作法を検討し，ビール中の8-PN 光学異性体比を明らかにする予定である。また，肝臓ミクロソーム画分の代謝酵素（CYP1A2）により IX から 8-PN への脱 O-メチル化も報告されており[7]，酵素的に生成する8-PN の光学異性体比を明らかにする予定である.

1. Gerhauser, C., Alt, A.,Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauft, J., Neumanm, I., Scherf, H.R., Frank, N., Bartsch, H., Becker, H. (2002) Mol. Cancer Ther., 1, 959-969.
2. Kodama, S., Yamamoto, A., Sato, A., Suzuki, K., Yamashita, T., Kemmei, T., Taga, A., Hayakawa, K. (2007) J. Agric. Food Chem., 55, 6547-6552.
3. Bertl, E., Becker, H., Eicher, T., Herhaus, C., Kapadia, G., Bartsch, H., Gerhauser, C. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun., 325, 287-295.
4. Bovee, T.F., Helsdingen, R.J., Rietjens, I.M., Keijer, J., Hoogenboom, R.L. (2004) J. steroid. Biochem. Mol. Biol., 91, 99-109.
5. Stevens, J.F., Miranda, C.L., Buhler, d.R., Deizner, M.L. (1998) J. Am. Soc. Brew. Chem.., 56, 136-145.
6. Possemiers, S., Heyerick, A., Robbens, V., De Keukeleire, D., Verstraete, W. (2005) J. agric. Food. Chem., 53, 6281-6288.
7. Guo, J., Nikolic, D., Chadwick, L.R., Pauli, G.F., van Breemen, R.B. (2006) Drug metab. Dispos., 34, 1152-1159

氷見・高岡地区温泉の湧出量、泉温及び成分の経年変化

村元達也　　小玉修嗣　　健名智子　　高柳信孝

Variation of Water Discharge, Temperature and Chemical Components of Mineral Springs in Himi and Takaoka Areas

Tatsuya MURAMOTO, Syuji KODAMA, Tomoko KENMEI
and Nobutaka TAKAYANAGI

氷見・高岡地区には平成19年度現在で36の源泉があり，県内外から多くの観光客が集まっているが，そのうち16の源泉がせまい海岸地域に密集している[1]．それらの源泉は海岸に近いために起こる塩水化や，隣接する温泉との相互影響，温泉自体の枯渇などの問題が懸念されている．そのため，平成7年度より温泉資源の保護を目的とした基礎調査が，実施されている．調査開始後10年を経過した時点でその間の経年変化を報告したが[2]，その後の3年間の調査結果および前回の報告で調査機関が短いため除かれていた源泉を加えて，経年変化を報告する．

調 査 方 法

1．調査対象
　氷見市　14源泉
　高岡市　1源泉（調査年数の短い1源泉を除く）
2．調査内容
　①　現地調査
　　採水と泉温，湧出量の測定（測定できない場合は源泉管理者等から聞き取り）
　②　温泉成分調査
　　pH 値，ナトリウムイオン(Na)，カリウムイオン(K)，マグネシウムイオン(Mg)，カルシウムイオン(Ca)，塩化物イオン(Cl)，硫酸イオン(SO_4)，及び炭酸水素イオン(HCO_3)

結果と考察

泉質はほとんどの源泉がナトリウム-塩化物泉であり，源泉 o がナトリウム-塩化物・炭酸水素塩泉，源泉 n が泉質なし（メタケイ酸で温泉に該当）となっている[3]．これらは調査開始時から変わっていない．泉質以外の調査結果について，表1に平均値（AV），標準偏差値（SD）及び変動係数（CV（%））で示した．

湧出量については，CV（%）が平均で36.4%と大きくなっているが，15源泉のうち湧出量の比較的小さい4源泉は自然湧出で，他の11源泉は動力揚水となっている．ただし，源泉 o は構造上の理由で測定不能であり，他にも破損などの理由で測定できなかった年がある．経年変化の散布図から相関係数を求め，増減傾向を見ると，源泉 c，d，h（図１）に減少傾向が，源泉 g，n（図２）に増加傾向が認められた．ただし，源泉 g については平成18年度に使用されておらず，湧出量は測定不能であった．

泉温は現地調査において標準温度計で測定しているが，その変動は小さく，CV（%）が平均で6.7%であった．湧出量と同様に経年変化から増減傾向を調べたところ，源泉 d，j（図3）に減少傾向が認められた．このうち，源泉 d は湧出量と泉温の両方で減少傾向が見られ，その相関係数は図4で示すように r=0.8454と正の相関があることから，揚水中の熱損失による温度低下と考えられる．

ただし，最近3年間の調査結果ではそのような傾向が見られておらず，今後もその推移を見ていく必要があると言える．

それぞれの源泉の成分について見ると，源泉 a（図5）に関しては全体的に CV（%）が高く，HCO_3 と H_2SiO_3 以外の全ての成分濃度がゆるやかに上昇している．また，pH がゆるやかに落ちていることから水素イオン濃度も上昇していることが分かる．同じ傾向が源泉 e（図6）にも見られるが，場所が離れているために相互影響は考えにくく，SO_4 も検出されていないため SO_4 の存在量が多い海水の影響も考えられない．そのため，周囲の地下水量の減少など，地下水による影響を受けにくくなったなどが原因として考えられる．

源泉 g の CV（%）も非常に大きい値となっているが，調査年数が5年と他の源泉より短いことと，平成18年度に全ての成分濃度が極端な上昇を見せたことが

表１．源泉の成分分析結果

源泉		湧出量	泉温	Na	K	Mg	Ca	Cl	HCO_3	SO_4
		L/m.	℃	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
a	AV	168	51.6	2883.8	30.8	8.5	376.5	5129.9	67.5	
	SD	72	5.0	318.4	10.5	7.1	70.8	656.1	29.5	
	CV (%)	43	9.6	11.0	34.0	83.8	18.8	12.8	43.7	
b	AV	146	54.9	2579.8	20.9	1.0	286.0	4478.4	38.0	
	SD	51	3.4	31.8	1.7	0.5	12.3	61.3	3.6	
	CV (%)	35	6.2	1.2	8.0	49.7	4.3	1.4	9.5	
c	AV	80	54.8	2739.1	23.3	4.1	256.2	4700.0	44.6	
	SD	34	1.8	42.9	1.8	0.5	11.4	108.6	2.1	
	CV (%)	43	3.3	1.6	7.6	11.9	4.4	2.3	4.8	
d	AV	130	54.6	3318.0	30.8	4.9	381.7	5825.5	53.3	
	SD	21	1.9	107.2	0.8	0.2	18.4	29.7	2.9	
	CV (%)	16	3.6	3.2	2.6	4.8	4.8	0.5	5.4	
e	AV	128	51.8	4182.8	42.0	17.1	515.8	7479.7	68.5	
	SD	106	3.1	579.1	11.1	14.0	29.8	1018.9	20.6	
	CV (%)	83	6.0	13.8	26.4	81.9	5.8	13.6	30.1	
f	AV	92	33.5	9656.3	120.5	91.0	279.8	15414.0	821.0	
	SD	24	6.8	717.5	17.2	13.1	40.8	1335.8	259.1	
	CV (%)	26	20.3	7.4	14.2	14.4	14.6	8.7	31.6	
g	AV	80	33.0	1267.4	13.5	9.5	32.9	1915.5	269.4	15.6
	SD	17	1.0	1519.5	9.7	10.5	38.7	2501.8	41.5	3.7
	CV (%)	22	3.0	119.9	71.6	109.7	117.5	130.6	15.4	23.5
h	AV	77	36.4	9279.8	26.4	23.1	1984.8	17918.9	29.7	
	SD	48	4.0	78.9	3.5	3.6	66.7	163.0	3.7	
	CV (%)	62	10.9	0.8	13.4	15.7	3.4	0.9	12.5	
i	AV	36	48.3	471.8	4.2	0.2	8.6	582.8	174.8	47.9
	SD	15	2.4	8.8	1.9	0.0	0.2	13.8	3.7	1.8
	CV (%)	43	5.0	1.9	44.2	26.8	2.3	2.4	2.1	3.7
j	AV	155	42.6	1396.5	13.0	1.6	33.2	1948.6	249.0	158.0
	SD	80	2.0	57.9	5.0	0.2	2.0	82.5	21.5	16.3
	CV (%)	52	4.7	4.1	38.3	12.1	6.2	4.2	8.6	10.3
k	AV	85	34.5	1520.5	103.1	31.3	69.0	2466.5	361.2	
	SD	21	1.6	200.9	13.9	6.4	15.7	359.8	17.8	
	CV (%)	25	4.7	13.2	13.5	20.5	22.8	14.6	4.9	
l	AV	1	15.3	2459.6	46.3	43.2	40.7	3789.2	456.3	
	SD	0	1.0	141.0	4.5	2.6	3.1	240.4	18.2	
	CV (%)	37	6.6	5.7	9.7	6.1	7.6	6.3	4.0	
m	AV	21	42.4	6671.2	54.9	69.4	604.5	11610.9	128.1	
	SD	10	4.6	68.9	7.8	2.3	26.2	119.9	4.6	
	CV (%)	47	10.8	1.0	14.1	3.4	4.3	1.0	3.6	
n	AV	15	21.4	12.7	5.3	4.7	7.2	11.8	65.8	8.0
	SD	2	1.7	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4	4.8	0.5
	CV (%)	16	8.0	3.6	3.5	5.1	5.5	3.8	7.2	6.5
o	AV	不明	24.2	993.0	63.3	8.6	17.8	1082.0	1076.7	
	SD	不明	1.1	29.4	2.0	0.2	1.1	39.4	24.0	
	CV (%)	不明	4.6	3.0	3.1	2.9	6.3	3.6	2.2	

注）源泉 g が n=5，h が n=11，o が n=3 であるが，それ以外は n=13 での値である．

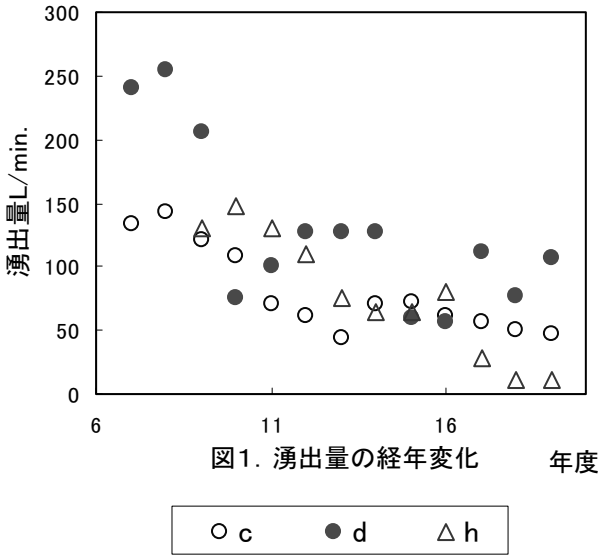


図1. 湧出量の経年変化

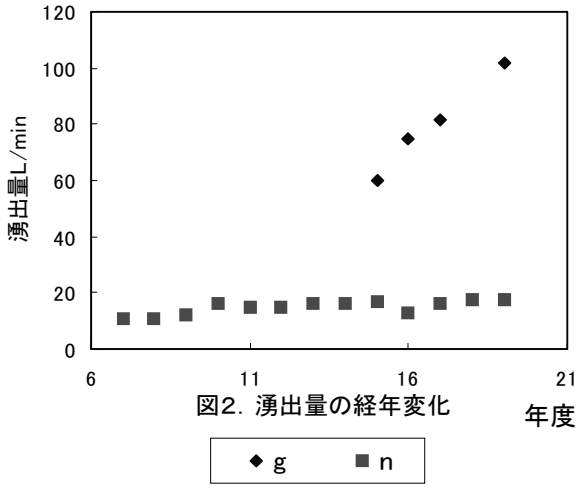


図2. 湧出量の経年変化

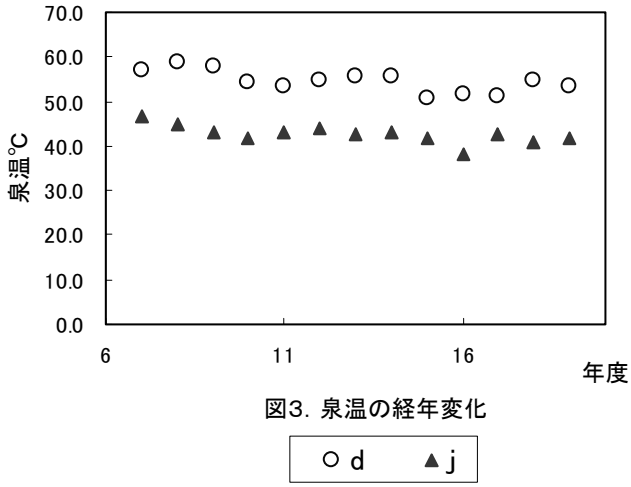


図3. 泉温の経年変化

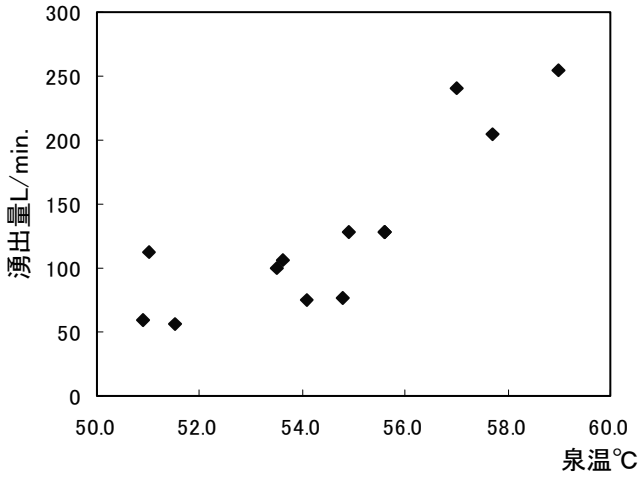


図4. 源泉dにおける泉温と湧出量の関係

表２．源泉ｇの成分分析結果の経年変化

	Na	K	Mg	Ca	Cl	HCO_3	泉温	pH	湧出量	SO_4
H15	425	8.03	3.92	12	547.6	247.1	31.4	8.28	60	18.3
H16	614	9.16	5.01	17.1	841.2	253.2	33.3	8.2	75	18.2
H17	656	10.1	5.23	17.4	892.6	253.2	33	8.16	81.7	16.9
H18	3980	30.7	28.2	102	6383	343.4	34.1	7.65		9.5
H19	662	9.45	5.27	16.1	913	250	33.4	8.11	101.6	14.9
av	1267.4	13.5	9.5	32.9	1915.5	269.4	33.0	8.1	80.0	15.6
sd	1519.5	9.7	10.5	38.7	2501.8	41.5	1.0	0.2	17.3	3.7
cv	119.9	71.6	109.7	117.5	130.6	15.4	3.0	3.1	21.7	23.5

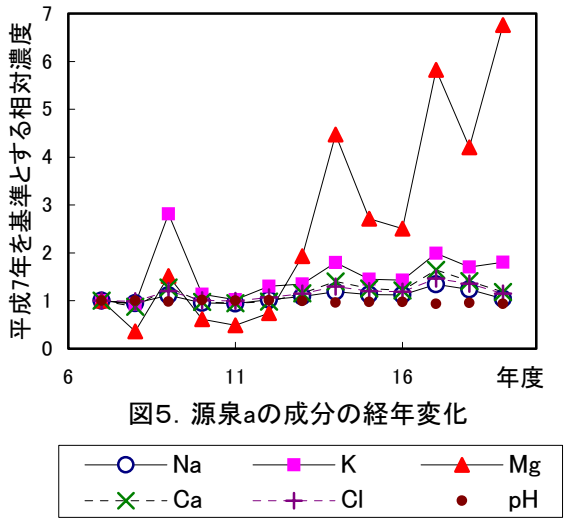


図5. 源泉aの成分の経年変化

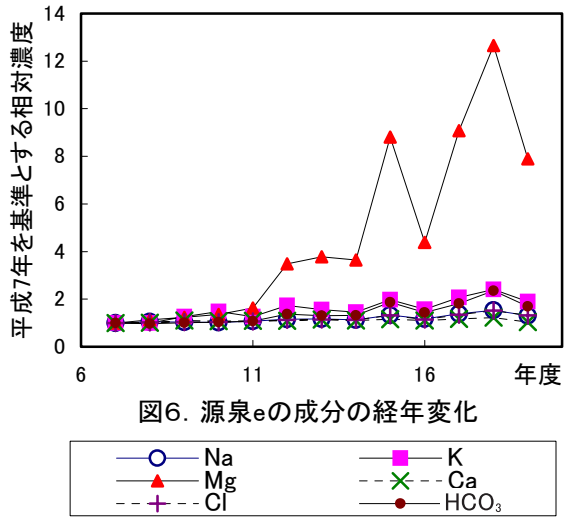


図6. 源泉eの成分の経年変化

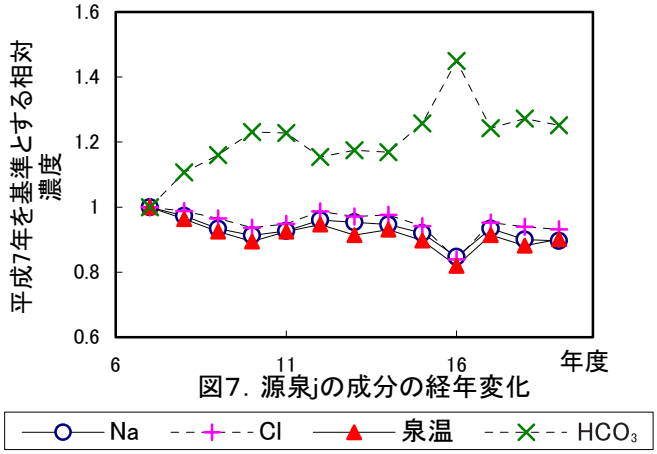


図7. 源泉jの成分の経年変化

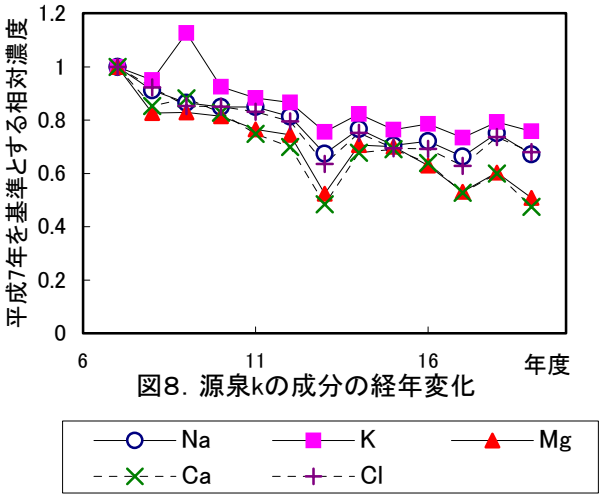


図8. 源泉kの成分の経年変化

原因である．これは，この年のみ施設が使われていなかったために湧出量が測定不能なほどに少なくなり，浅所での地下水の混入が少なかったために起きた現象であると考えられる．源泉 g の経年変化を表2に示す．

源泉 j（図7）では Na，Cl，泉温に減少傾向が見られ，特に平成16年度にはいずれの値も最低値を記録するなど，それぞれに正の相関がある．逆に HCO_3 には増加傾向が見られ，問題の平成16年度には特別高い値を示すなど，Na，Cl，泉温とは負の相関が見られる．このことから，もともとナトリウム-塩化物高温泉である源泉 j に，HCO_3 濃度の高い低温の地下水が混入していることが考えられる．この結果，泉温による分類が高温泉から温泉になるまでに泉温は低下している．また，源泉 k（図8）では HCO_3 を除くすべての成分濃度に減少傾向が見られため，浅所において成分濃度の低い地下水が混入しているものと考えられる．

以上の結果を見ると，現在は懸念されているような問題は起こっていないものの，泉温や溶存物質濃度など微細な変化が見られるため，今後も調査を続けていく必要性が感じられた．

文　　献

1．富山県厚生部食品生活衛生課（平成20年）．富山県の温泉，p20
2．高柳信孝，健名智子（2005），富山県衛生研究所年報，28，168-171
3．環境自然環境局（平成14年）．鉱泉分析法指針（改定），p1

平成19年度富山県内食品衛生（理化学）検査機関の精度管理調査について
－寒天中のソルビン酸－

大戸幹也　中山恵理子　山下智富　村元達也
高柳信孝　前多隆志

Quality Control of the Physicochemical Testing of Food for Good Laboratory Practice in Toyama Prefecture - Sorbic Acid in Agar -

Mikiya OHTO, Eriko NAKAYAMA, Tomohisa YAMASITA, Tatsuya MURAMOTO, Nobutaka TAKAYANAGI and Takashi MAEDA

本県では，富山県食品衛生検査業務管理要綱[1]に基づき，平成11年度から県内の公立食品衛生検査機関に対して検査水準の維持，向上を目的とした精度管理調査を実施している[2-9]．今年度は，昨年度に引き続き，寒天中のソルビン酸（SOA）の定量試験について調査を実施した．寒天にSOAを添加した試料を作製後，食品衛生検査機関に配布し，含有量等の報告を求め，当所で測定値を集計して解析と評価を行った．この結果について報告する．

調査方法

(1) 参加機関および実施期間：富山県内の公立食品衛生検査機関5箇所が参加して，平成20年2月4日～2月22日（測定期間:平成20年2月4日～2月15日）に実施した．
(2) 調査試料および調査項目: 寒天中のSOA.
(3) 調査試料の作製及び保管方法: SOA（和光純薬工業製，特級）1gを正確に量り取り，アセトニトリルに溶解して正確に10㎎/ml溶液を調製した．次に和光純薬工業製の寒天粉末（特級）15.0gに精製水985mlを加え，SOA10㎎/ml 溶液を正確に2ml添加した．撹拌しながら寒天を徐々に加熱（98℃，1分）して溶解後，加熱を止め，温時5個の配布試料容器（200mlガラス製容器）に各約180gずつ取り分け，徐々に室温まで冷却して固まるのを待ち，密栓して冷蔵庫（庫内温度10℃）に保管した．なお，試料中のSOA添加濃度は，調製後の重量が996.8gであったことから0.02006g/㎏（0.02g/0.9968㎏）とした．
(4) 調査試料の均一性の確認：各配布試料から無作為に二箇所ずつ，合計10箇所からそれぞれ約2ｇを正確に採取し，精製水を加えて加熱し寒天を溶解後，室温まで冷却し，これに精製水を加えて正確に40mlに定容して，メンブランフィルター(ポアサイズ0.45μm)でろ過後それぞれのSOA含有量を高速液体クロマトグラフで測定した．

HPLC測定条件については，分析カラム：野村化学製Develosil Packed Column ODS-UG-5，内径4.6㎜×長さ250㎜，粒径5μm，ガードカラム：Merck製LiChrospher100 RP-18，内径4㎜×長さ4㎜，粒径5μm，検出波長：200-600nm（D2ランプ），定量波長：260nm，その他の条件は，松永らの方法[10]に準拠した．

10箇所の定量値は，0.01970g/㎏から0.02137g/㎏の範囲にあり，その平均と標準偏差は，それぞれ0.02056±0.0005694g/㎏（変動係数2.770%）であった．なお，最大値と最小値については，有意水準5%でスミルノフ・グラブス検定したところ，最小値0.01970 g/㎏と最大値0.02137g/㎏は，それぞれいずれも外れ値と言えず，配布試料は全て均一と考えられた．
(5) 測定方法及び検査結果の処理：検査機関のSOA測定方法は，それぞれの機関の検査実施標準作業書（検査SOP）に従うものとし，各検査機関の評価は，5回併行測定した値及びその検査経過記録書を基に行った．

結果と考察

保存料は，食品添加物を代表する成分の一つであり，非常に多くの食品に添加されている．食品衛生検査を実施する機関では，保存料の検査は不可欠であり，常に検査精度の維持，向上に努める必要がある．今年度も昨年に引き続き寒天中のSOA試験を実施した．ただし，添加濃度は昨年の1/2のレベルで実施した．

Table 1に全機関の集計結果をまとめて示したが，検査機関数は5機関で，検査機関の測定平均値の最大値は0.01970g/㎏，最小値は0.01782g/㎏，その平均値

Table 1. Analytical Results of SOA

Laboratory	Concentration (g/kg)	CV (%)	Range (g/kg)
No.1	0.01782	3.54	0.0015
No.2	0.01814	2.66	0.0012
No.3	0.01902	2.08	0.0011
No.4	0.01922	1.00	0.0005
No.5	0.01970	1.39	0.0007
Max	0.01970	3.54	0.0015
Min	0.01782	1.00	0.0005
Average	0.01878	2.13	0.00100
SD	0.000779	―	―
CV（%）	4.15	―	―

（全機関平均値）±標準偏差($\bar{x}$±SD)は，0.01878±0.000779g/kg であった．最大値と最小値の開きは小さく，また機関間の変動係数（CV）も4.15%で小さい値であった．各機関での併行測定における機関内変動係数は，No.1機関の3.54%が最も大きいが，すべて5%以内であり小さかった．なお，定量結果と合わせて提出されたチャート類のチェックを行ったところ，検量線については，全ての機関の検量線の相関係数（r^2）は0.999以上であり，かつ全てがほぼ原点を通る良好な直線性が得られていた．標準および試験溶液の SOA ピークのクロマトグラムの形状も良く，適正に定量処理されていた．次に，各検査機関の測定値を基に$\overline{\chi}$-R管理図[11,12]とZスコアの順位を作成し，これらをそれぞれ Fig.1と Fig.2に示した．$\bar{x}$管理図の管理限界範囲については，厚生労働省が求めている添加回収率の範囲（精度管理の一般のガイドライン[13]：添加回収率70～120%）を基に設定して管理図を作製し，R管理図については，JIS 法に従って作製したところ，全ての機関の値は，管理限界範囲に入っており，全検査機関の管理状態が良好である結果が示された．

昨年度の精度管理調査では，$\bar{x}$管理図において，5箇所の検査機関のうち一箇所の検査機関の$\bar{x}$値が下部管理限界値（LCL）を下回っていた．そのため異常値の原因を調査したところ，試験操作の中でのホモジナイズ抽出処理に問題があったことが判明した．対策を講じて再検査を行ったところ，良好な値が得られた．異常値を検出した場合は，試験操作以外の試薬類や機械器具類の点検を初めとして，普段あまり検討されない標準作業書の妥当性，検査室内環境等のチェックまで検証する場合も生じ，検査室内総点検となって負担が非常に大きい．しかし，問題点の洗い出しや検討を行なうことで，その検査に関する知識や習熟度は増し，技能向上が大きく向上すると考えられる．試料中の SOA 添加濃度を仮定真値とし，誤差率を，誤差率＝(機関平均値―仮定真値)/仮定真値×100, とした場合，今年度のこの検査機関の結果は，-1.79%であった．他の4機関の誤差率は、-4.19%～-11.2%であり，5機関の中で最も真値に近い良好な値であった．またこの機関の機関内の変動係数は1.39%であり，5機関の中で二番目に小さい値であった．5箇所の検査機関の担当者の経験年数の平均が7.2年であったことを考えると，試験経験年数が2年にも関わらず，技能が大きく向上して良好な検査結果が得られたことは，本点を裏付けているものと考えられる．今後この機関は，回収率不良の原因とその対策について検査実施標準作業書に加筆する等し、担当者が変わっても検査精度を高く維持できるように努めるべきと考えられた．

精度管理調査を繰り返し実施することで，検査担当者の技能の向上を確認できた．本調査は，検査上の不良点の発掘に役立ち，更に担当者自身が携わる他の衛生検査業務にも活用され，施設全体の検査業務の技術向上にも大きく貢献して行くものと考えられる．精度管理調査は，検査室の検査能力の維持，向上のために，

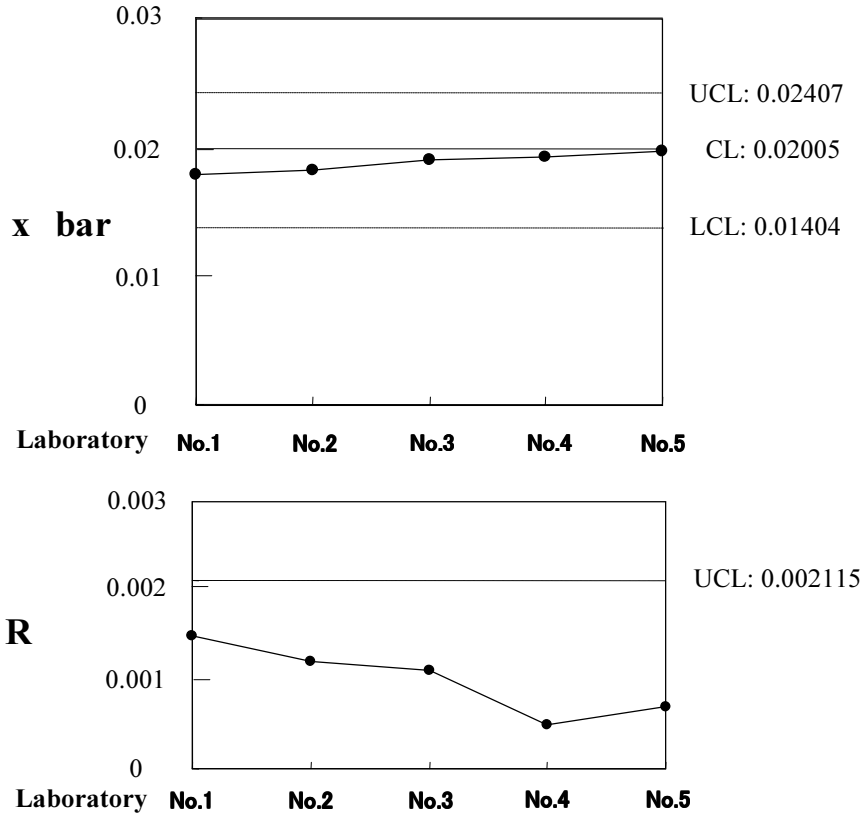


Fig 1． x bar-R Control Chart of SOA

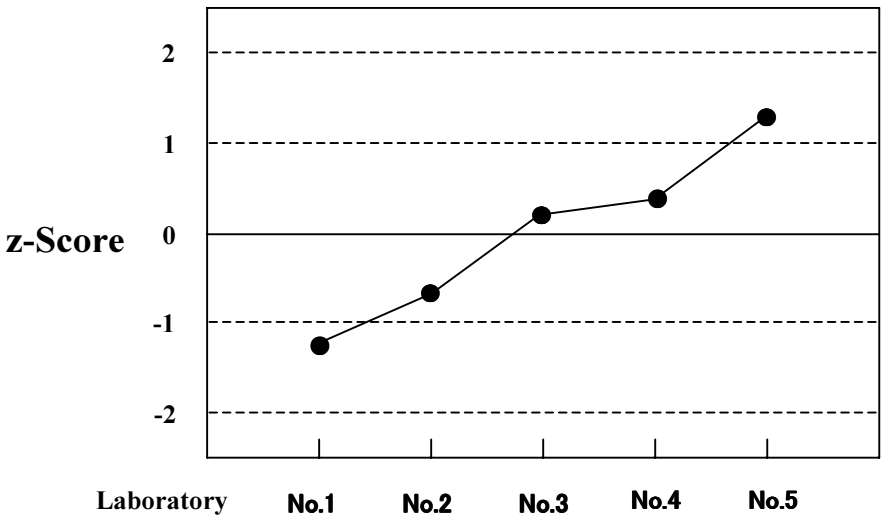


Fig 2． z-Score of SOA

表２．昨年度と今年度の検量線の比較

1）検量線の傾き

検査機関	検量線の傾き A		傾きの増加または減少率
	H18年度(A_{18})	H19 年度(A_{19})	($A_{19}-A_{18}$／A_{18})×100 (%)
No. 1	2.383×10^5	2.387×10^5	0.17
No. 2	2.426×10^5	2.422×10^5	− 0.16
No. 3	2.641×10^5	2.545×10^5	− 3.63
No. 4	2.281×10^5	2.276×10^5	− 0.21
No. 5	298.7	302.5	1.27
最大値			1.27
最小値			− 3.63

2）検量線の相関係数

検査機関	検量線の相関係数 r^2	
	H18年度(r^2_{18})	H19 年度(r^2_{19})
No. 1	1.000	1.000
No. 2	1.000	1.000
No. 3	0.9998	0.9998
No. 4	0.9999	0.9999
No. 5	0.9998	0.9997
最大値	1.000	1.000
最小値	0.9998	0.9997

非常に重要であると考えられた.

文　　献

１．富山県厚生部長通知，薬食第1,229号．平成10年12月16日

２．大戸幹也，松永明信，尾崎一郎（2000）.富山衛研年報，23，175-177.

３．大戸幹也，松永明信，尾崎一郎（2001）.富山衛研年報，24，191-194.

４．齊藤行雄，大戸幹也，松永明信，尾崎一郎（2002）.富山衛研年報，25，189-193.

５．大戸幹也，齊藤行雄，松永明信，坂森寛治（2003）.富山衛研年報，26，179-182.

６．齊藤行雄，大戸幹也，松永明信，坂森寛治（2004）.富山衛研年報，27，163-166.

７．大戸幹也，齊藤行雄，坂森寛治（2005）．富山衛研年報，28，177-180.

８．中山恵理子，大戸幹也，齊藤行雄，松澤孝信（2006）．富山衛研年報，29，195-197.

９．大戸幹也，中山恵理子，齊藤行雄，高柳信孝，松澤孝信（2007）．富山衛研年報，30，168-171.

10. 松永明信，山本 敦，牧野正雄（1985）．衛生化学，31，269-273.

11. 日本水道協会(2001)．上水試験法解説編．P19―29.

12. 日本規格協会(1994)．JIS Z　9021

13. 厚生省生活衛生局食品保健課長通知，衛食第117号．平成9年4月1日

平成19年度水道水質検査の精度管理事業について

健名智子　　大戸幹也　　村元達也　　高柳信孝

On the External Quality Control of the Quantification of Iron and Chloride ion in Water

Tomoko KEMMEI, Mikiya OHTO, Tatsuya MURAMOTO and Nobutaka TAKAYANAGI

富山県水道水質検査精度管理実施要領に基づく精度管理事業は，富山県内の水道水等の水質検査を行う機関の参加により平成8年度から継続して実施されており，当所は配布試料の作成，参加機関から報告されたデータの集計及び解析を担当している．平成19年度は鉄及びその化合物および塩化物イオンについて実施された．今回，その結果をまとめたので報告する．

調 査 方 法

（1）試料の配布年月日：平成20年2月7日

（2）参加機関：富山県内の水道水等の水質検査を行う24機関で，その内訳は水道事業体1機関，水道用水供給事業体2機関，水道法第20条に規定する登録検査機関15機関，厚生ｾﾝﾀｰ・保健所5機関及び当所である．

（3）検査項目：鉄及びその化合物，塩化物イオン

（4）配布試料：鉄及びその化合物測定用検体は平成20年1月28日に採水した自然水（湧水：鉄濃度0.01mg/L未満）に市販鉄標準液(和光純薬製 Fe 1000)を＋0.12mg/Lとなるよう添加して調製した30L(１Lにつき有害金属測定用硝酸を10ml含む)を酸洗浄済1L角型ポリ瓶に小分けしたものである．小分けした試料26本について，あらかじめ鉄濃度を測定したところ，そのビン間変動係数は1.2%であった．配布に際し，鉄及びその化合物の濃度範囲は，0.03～0.30mg/Lであると明示した．塩化物イオン測定用検体は自然水(湧水)を平成20年1月28日に250mL角型ポリ瓶に採取したもので，採取した試料29本について，あらかじめ塩化物イオン濃度を測定したところ，そのビン間変動係数は0.4%であった．配布に際し，塩化物イオンの濃度範囲は，1.0～30.0mg/Lであると明示した．

（5）　検査方法及び検査結果：検査は当該検査項目の検査担当者が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回の併行測定値を報告することとし，その平均値を各機関の測定値として解析を行った．

結果および考察

(1) 鉄及びその化合物

鉄及びその化合物については，参加24機関のうち2機関が2通りの測定方法により参加したことから26機関として統計処理を行った．26機関のうちフレームレス原子吸光光度法を用いた機関は4機関，フレーム原子吸光光度法を用いた機関は5機関，ICP/AES法を用いた機関は10機関，ICP/MS法を用いた機関は7機関であった．

各機関から小数点以下2桁まで報告された5回の併行測定値より，平均値を小数点以下3桁まで求め各機関の測定値とした．表1に測定値の小さいものから順に示した．全機関の測定値の平均値±標準偏差は0.123±0.010mg/Lで，室間変動係数は7.9%と10%を下回った．Grubbsの異常値検定(危険率5%)の結果，Z機関の測定値が棄却された．各機関内での併行測定における室内変動係数は0.0～4.8%とすべて10%未満で，機関内のばらつきは小さかった．

棄却されたZ機関を除く25機関の測定値の平均値±標準偏差は0.121±0.006mg/Lであった．この値をもとに鉄のx bar-R管理図を図1に示した．Z機関以外の機関の測定値が平均値±2標準偏差の範囲（0.109～0.134mg/L）内に収まった．R管理図において9機関がUCL（0.008mg/L：上方管理限界）を超えたが，その範囲はすべて0.01mg/Lであった（測定値は小数点以下2桁）．鉄におけるzスコアの順位を図2に示した．Z機関以外の機関の｜z｜は2未満で「満足」と評価された．

参加各機関はフレームレス原子吸光光度法，フレーム原子吸光光度法，ICP/AES法，ICP/MS法の4種類のいずれか，または複数の測定方法を用いていた．測定方法ごとの測定値の平均値±標準偏差を求めた(Z機関は除いて統計処理を行った)が，測定方法間に有意な差はなかった．

鉄の検量線の範囲は測定方法，希釈・濃縮の有無により異なっていたが全機関が検量線の範囲内で定量を

表１．鉄及びその化合物の測定値

検査機関	測定値：x bar (mg/L)	変動係数 (%)	回収率 (=測定値/平均値)	測定方法
A	0.110	0.0	0.91	ICP-AES法
B	0.110	0.0	0.91	ICP-MS法
C	0.110	0.0	0.91	フレームレス原子吸光光度法
D	0.114	4.8	0.94	ICP-MS法
E	0.120	0.0	0.99	ICP-MS法
F	0.120	0.0	0.99	ICP-MS法
G	0.120	0.0	0.99	ICP-AES法
H	0.120	0.0	0.99	フレーム原子吸光光度法
I	0.120	0.0	0.99	ICP-AES法
J	0.120	0.0	0.99	ICP-MS法
K	0.120	0.0	0.99	ICP-AES法
L	0.120	0.0	0.99	ICP-AES法
M	0.120	0.0	0.99	ICP-AES法
N	0.120	0.0	0.99	ICP-AES法
O	0.120	0.0	0.99	ICP-AES法
P	0.122	3.7	1.01	ICP-AES法
Q	0.122	3.7	1.01	フレーム原子吸光光度法
R	0.122	3.7	1.01	フレーム原子吸光光度法
S	0.124	4.4	1.02	ICP-AES法
T	0.126	4.3	1.04	ICP-MS法
U	0.126	4.3	1.04	フレーム原子吸光光度法
V	0.130	0.0	1.07	ICP-MS法
W	0.130	0.0	1.07	フレーム原子吸光光度法
X	0.132	3.4	1.09	フレームレス原子吸光光度法
Y	0.132	3.4	1.09	フレームレス原子吸光光度法
Z	0.160	0.0	1.32	フレームレス原子吸光光度法
測定機関数	25	25	25	
最大値(mg/L)	0.132	4.8	1.09	
最小値(mg/L)	0.110	0.0	0.91	
平均値：X (mg/L)	0.121	1.43	1.000	
標準偏差：SD (mg/L)	0.006	1.97	0.050	
変動係数(%)	5.0	——	5.0	

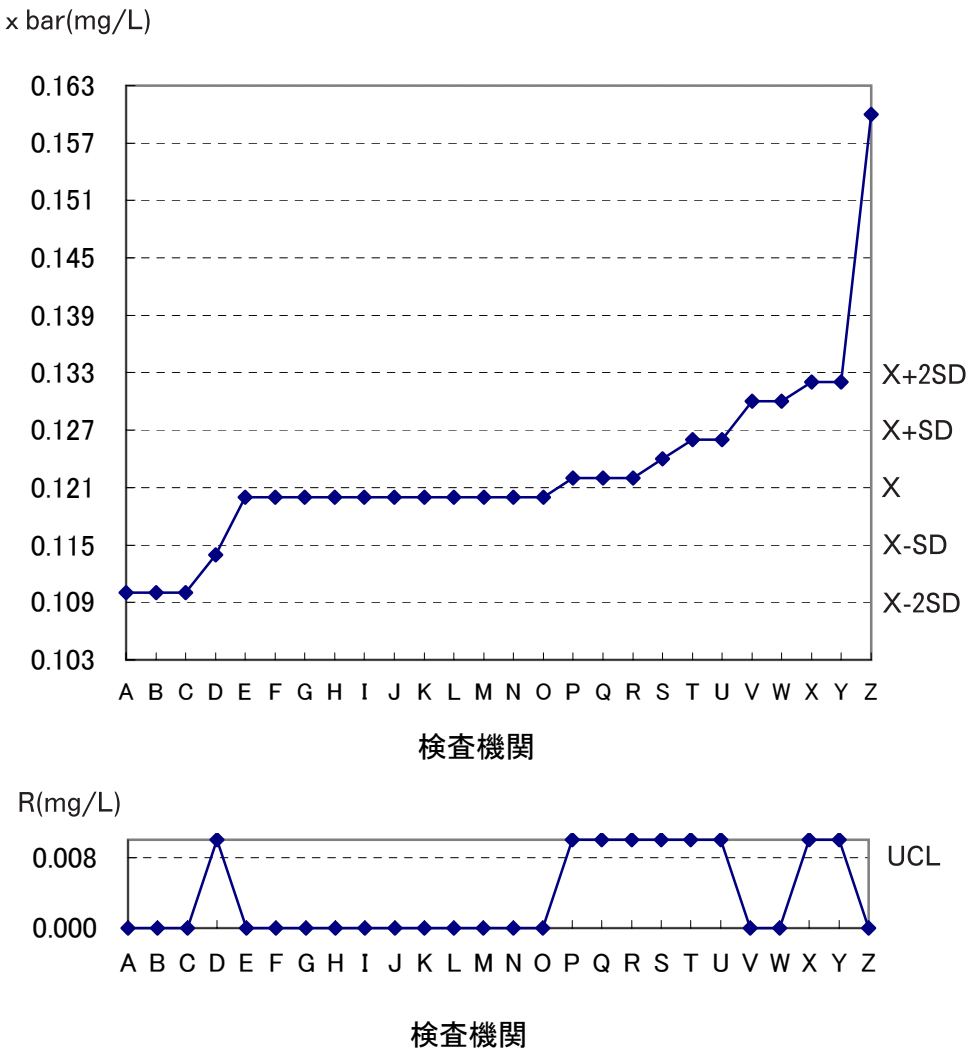


図１．鉄及びその化合物の x bar-R 管理図

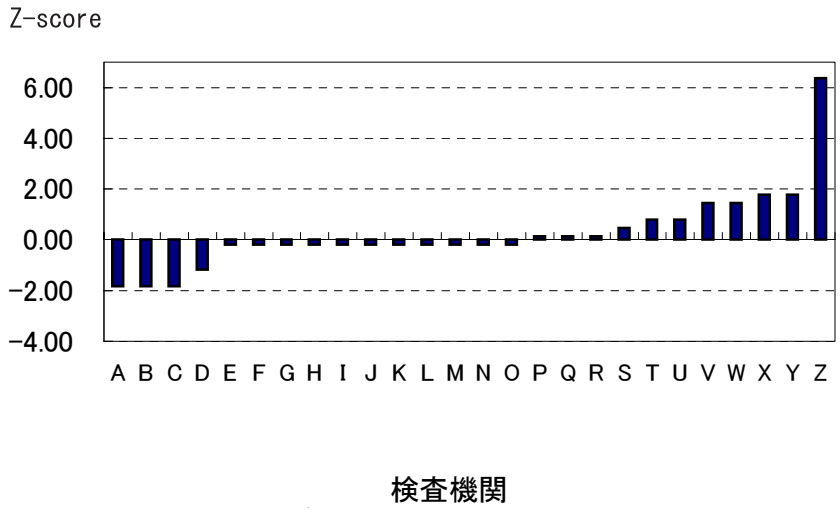


図２．鉄及びその化合物 z-スコアの順位

表 2．塩化物イオンの測定値

検査機関	測定値: x bar (mg/L)	変動係数 (%)	回収率 (=測定値/平均値)
a	12.86	1.2	0.95
b	12.98	0.3	0.96
c	13.30	1.7	0.98
d	13.30	0.0	0.98
e	13.32	0.3	0.98
f	13.44	0.4	0.99
g	13.50	0.0	0.99
h	13.50	0.0	0.99
i	13.50	0.0	0.99
j	13.52	0.6	1.00
k	13.56	0.4	1.00
l	13.56	0.8	1.00
m	13.56	0.4	1.00
n	13.58	0.3	1.00
o	13.68	0.3	1.01
p	13.70	0.0	1.01
q	13.72	0.6	1.01
r	13.76	0.4	1.01
s	13.76	0.7	1.01
t	13.80	0.0	1.02
u	13.82	0.6	1.02
v	13.90	0.0	1.02
w	14.00	0.0	1.03
x	14.18	5.9	1.04
測定機関数	24	24	24
最大値(mg/L)	14.18	5.9	1.04
最小値(mg/L)	12.86	0.0	0.95
平均値: X (mg/L)	13.58	0.63	1.000
標準偏差: SD (mg/L)	0.30	1.19	0.022
変動係数(%)	2.2	——	2.2

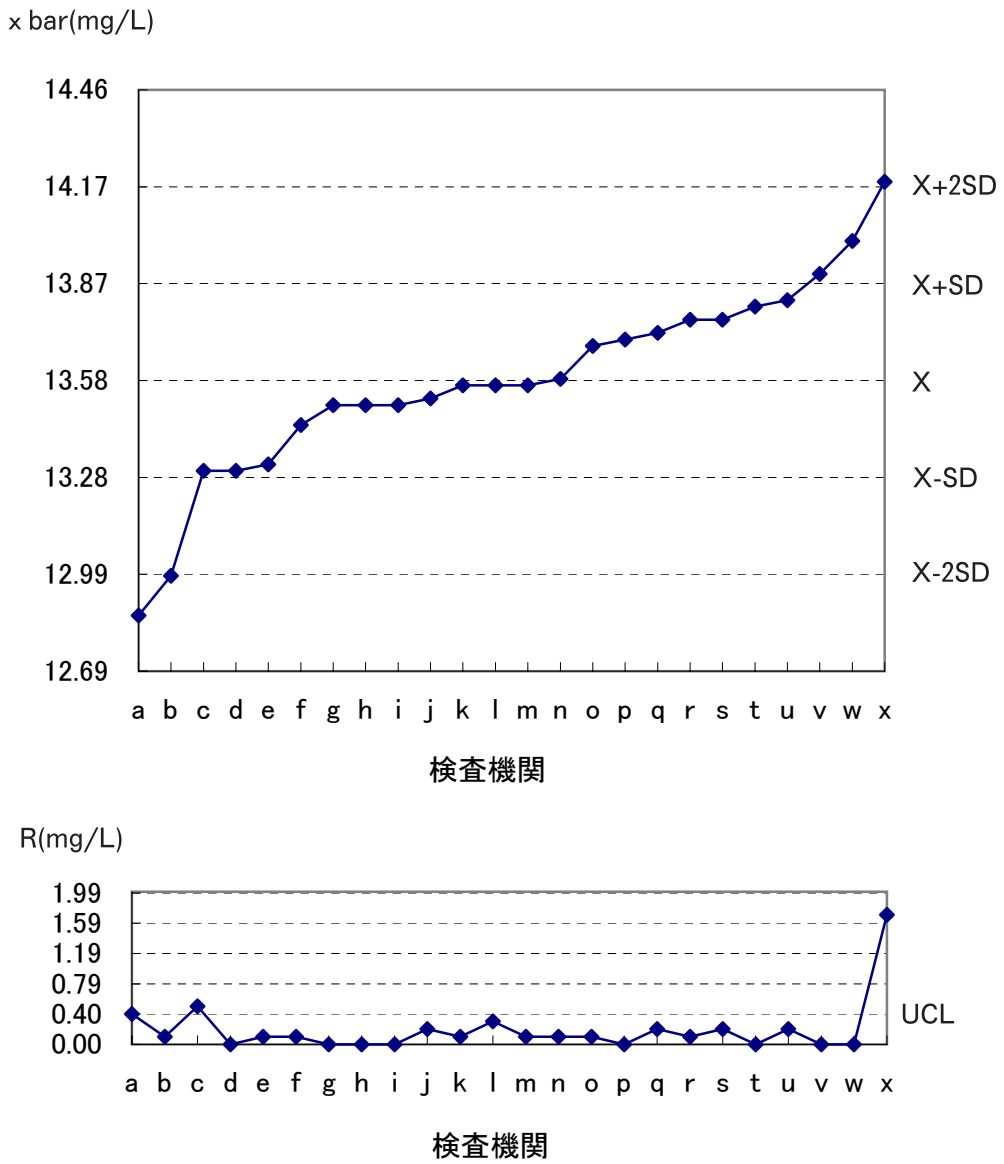


図３．塩化物イオンの x bar-R 管理図

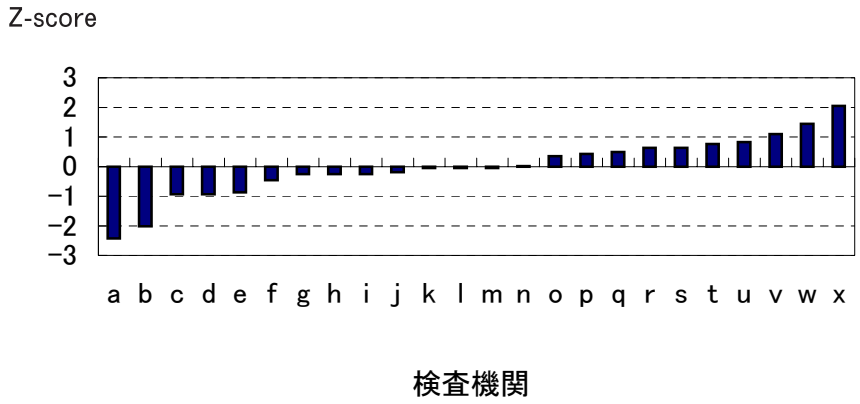


図２．塩化物イオンの z-スコアの順位

行っていた．特にフレームレス原子吸光光度法で測定している機関では5〜10倍に希釈して測定している機関がほとんどで，その検量線の範囲も0.01〜0.03,0.05 mg/L と狭く，ブランクの影響を大きく受けることが予想された．棄却されたＺ機関もフレームレス原子吸光光度法により測定しており，前処理も含め，細心の注意が必要と考えられる．

告示[1]で指定された鉄及びその化合物を測定する4測定方法の前処理には，すべて加熱する工程が含まれている．また，上水試験方法[2]においても加熱溶解操作は必要と記載されている．今回，前処理として加熱処理を行っている20機関の平均値±標準偏差は0.123±0.005mg/Ｌ，行っていない5機関の平均値±標準偏差は0.115±0.006mg/Ｌで，両者には有意な差がみられた(危険率5%，Ｚ機関は除いて統計処理を行った)．今回のようなマトリックスを含む自然水に標準液を添加して調製した試料では，加熱処理の有無により測定値に違いが見られることが分った．

ICP/AES 法，ICP/MS 法を用いた全機関が内部標準法により定量を行っていたが，内部標準物質の種類や添加方法はさまざまであった．特に添加法についてはオンラインで自動的に添加される機種を使用している機関が8機関，前処理の段階で添加している機関が9機関であった．後者のうちの1機関はオンラインで自動的に添加される機種を使用しているが，検水に直接添加する方法を用いていた．その理由として，ペリスタリックポンプの脈動ムラが無視できない誤差を生むことと，内標の直接添加にあたりマイクロピペットで迅速かつ正確に添加操作ができることをあげていた．

(2) 塩化物イオン

塩化物イオンの精度管理には参加全24機関が分析方法として IC 法を用いていた．

塩化物イオンについて各機関から小数点以下1桁まで報告された5回の併行測定値より，平均値を小数点以下2桁まで求め各機関の測定値とした．表2に測定値の小さいものから順に示した．全機関の測定値の平均値±標準偏差は13.58±0.30mg/L であり，室間変動係数は2.2%と10%を下回っていた．Grubbs の異常値検定(危険率5%)の結果，棄却される測定値はなかった．各機関内での併行測定における室内変動係数は，0.0〜5.9%とすべて10%未満であり，機関内・機関間のばらつきはともに小さかった．

塩化物イオンの x bar-R 管理図を図3に示す．検査機関 a,b,x の3機関以外の機関の測定値が平均値±2標準偏差の範囲内（12.99〜14.16mg/L）に収まった．検査機関 c,x が R 管理図において UCL（0.40mg/L：上方管理限界）を超えた．塩化物イオンにおける z スコアの順位を図4に示した．検査機関 a,b,x 以外の機関の｜ z ｜は2未満で「満足」と評価された．測定値の平均値13.58mg/Ｌを真の値と仮定した場合の回収率が0.9〜1.1である範囲（12.22〜14.93mg/L）をはずれた機関はなかった．

今回の精度管理においてはダイオネックス社の IC 装置を使用している機関が12機関，島津製作所8機関，横河2機関，日立・東亜 DKK 各1機関であり，ほとんどの機関が IC 装置と同一メーカーのカラムを使用していた．今回の塩化物イオンの報告値に分析機器・分析カラム・使用溶離液等による違いはみられなかった．

文　　献

１．厚生労働省告示第261号 (2003). 平成15年7月22日.
２．日本水道協会(2001).上水試験方法. p297-298.

尿中アルキルリン酸濃度の日内変動

中崎美峰子　　新村哲夫

Intraday Variance of Urinary Alkylphosphates Levels

Mineko NAKAZAKI，Tetsuo SHIMMURA

尿中成分の濃度を評価する際に，24時間の蓄尿を行って1日の平均濃度を求めることは容易ではない．一般的に，部分尿で代用する場合は早朝第一尿が用いられ，尿の薄さを補正する手段として，目的成分の濃度をクレアチニン比で表す場合が多い．

尿サンプルを収集する場合，必ずしも早朝尿が得られないこともあることから，早朝尿とそれ以外の随時尿では，アルキルリン酸やクレアチニン濃度にどのような違いがあるのかを明らかにすることを目的に，検討を行った．

対象および方法

調査依頼に同意の得られた成人男女5名を対象とし，早朝尿，午前の随時尿1回，午後の随時尿1回として，1日3回の採尿を5日間実施した．

測定項目は，ジメチルリン酸(DMP)，ジメチルチオリン酸(DMTP)，ジエチルリン酸(DEP)，ジエチルチオリン酸(DETP)の4種のアルキルリン酸とクレアチニンである．アルキルリン酸の分析は既報[1]と同様にFPD-GCにより行った．

DMPとDMTPを合わせてジメチル型アルキルリン酸(DMDAP)，DEPとDETPを合わせてジエチル型アルキルリン酸(DEDAP)とした．

結果および考察

対象者5名の尿中アルキルリン酸濃度測定結果を，実測値とクレアチニン補正値で図1に示した．

すべての対象者でDMDAPの方がDEDAPに比べて濃度レベルが高かった．ただし，対象者Eでは，第3日の早朝尿のDEDAP濃度が第2日午後の約80倍の高濃度を示してその後漸減し，クレアチニン補正値でも同様の変化を示したことから，ジエチルリン酸型の有機リン化合物曝露があったと推測された．

実測値をみると，1日の中で10倍以上の濃度差を示した例があり，変動幅は対象者によって異なっていた．対象者A，対象者Bでは，早朝尿中の濃度が高く午前の随時尿では低いという傾向がみられたが，クレアチニン補正値では変動幅が小さくなり，一定の傾向はみられなくなった．そのほかの対象者では，1日の変動幅はクレアチニン補正によってほとんど変化しなかった．

補正の有無で変動幅が小さくなったもの，ほとんど変わらなかったものがあったことから，各対象者について採尿時間ごとの尿中クレアチニン濃度を比較したところ(表1)，対象者AおよびBで有意差が認められた($p<0.01$，$p<0.05$)．対象者Aは午前の随時尿の濃度が低く，対象者Bは午前と午後の随時尿の濃度が低かったが，これは尿中アルキルリン酸濃度の傾向と一致していた．また，対象者Cは午後の随時尿のクレアチニン濃度が低い傾向にあったが，対象者D，Eは採尿時間によってクレアチニン濃度に違いはみられなかった．

アルキルリン酸の尿中濃度は，1日の中での変動幅に個人差がみられた．尿の濃度補正としてクレアチニン比でみると変動幅が小さくなったことから，実測値の変動は尿の濃さ薄さを反映していると考えられた．

Kisselら[2]は，就学前の幼児を対象とした尿中アルキルリン酸の調査で，随時尿の中では，早朝尿が1日の平均濃度の推定に最も適していると報告している．今回の調査では，採尿のタイミングによって濃度のばらつきが大きい場合でも，クレアチニン補正によって早朝尿とそれ以外の随時尿との差が小さくなった．ただし，クレアチニン濃度が極端に低い"薄い尿"の場合は，補正によって見かけの高濃度となる可能性があるので，注意が必要であると考えられた．

尿中アルキルリン酸濃度の1日の変動幅には個人差がみられ，早朝尿が他の随時尿に比べて濃度が高い傾向を示す例があった．クレアチニン補正によって濃度の変動幅は小さくなり，早朝尿とそれ以外の随時尿との差が小さくなることがわかった．

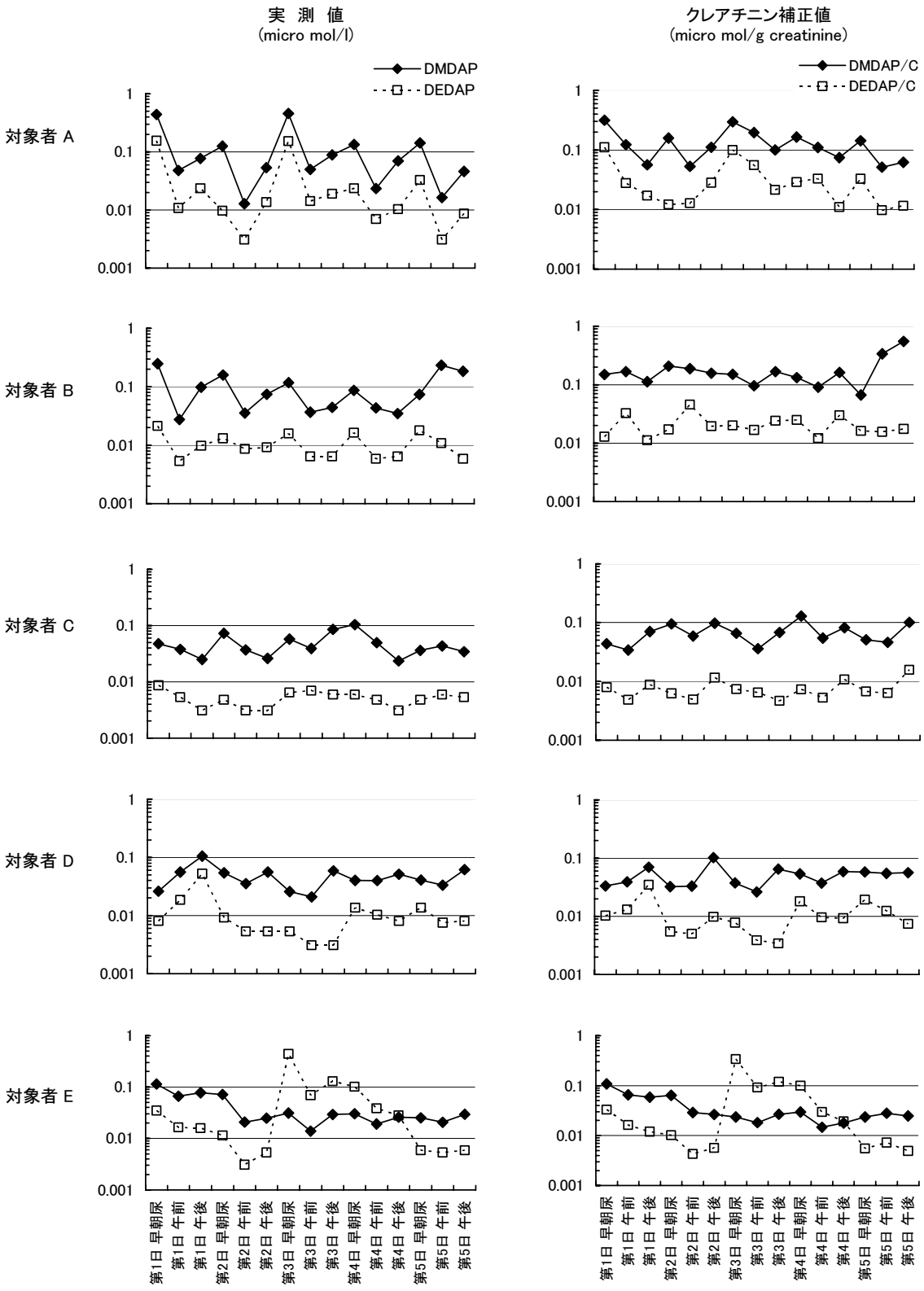


図1 対象者別 尿中アルキルリン酸濃度の推移

表1　採尿時別尿中クレアチニン濃度（5日間の平均値±標準偏差）

(mg/dl)

	早朝尿	午前	午後	各群の比較（一元配置分散分析）
対象者 A	110.9 ± 34.1	28.3 ± 7.1	88.5 ± 32.5	p<0.01
対象者 B	99.6 ± 40.9	38.2 ± 21.9	43.2 ± 26.3	p<0.05
対象者 C	84.9 ± 14.5	93.0 ± 19.0	50.1 ± 42.6	p<0.1
対象者 D	91.9 ± 42.4	99.4 ± 31.0	98.3 ± 34.9	
対象者 E	111.4 ± 11.7	90.5 ± 25.1	119.8 ± 19.9	

文　　献

1．中崎美峰子，新村哲夫，荒谷哲雄（2005）．富山衛研年報，28，134-137.

2．Kissel JC, Curl CL, Kedan G, Lu C, Griffith W, Barr DB, Needham LL, Fenske RA J (2005). Expo Anal Environ Epidemiol Mar;15(2):164-171.

平成20年12月１日

海洋深層水を用いた温冷交代手足浴による皮膚温度および血流量の変化

新村哲夫　　胡　莉珍[1]　　三井　博[2]　　鏡森定信[1]

Changes of Skin Temperature and Blood Flow by Warm-Cool Bath of Hand and Foot Using Deep Sea Water

Tetsuo SHIMMURA, Lizhen HU[1], Hiroshi MITSUI[2] and Sadanobu KAGAMIMORI[1]

これまでに海洋深層水を用いた全身の温浴には，温まりやすく，さめにくい温熱効果があることを報告してきた [1，2]．近年，温水に足など一部を浸す部分浴によって全身浴と同様な効果が得られることが報告されている[3-5]．また，温水と冷水を交互に浴びるクナイップ法によって自律神経系を刺激して体が温まることが経験的に報告されている[6]．最近，海洋深層水の体験施設に足浴施設が設置され，一般客に利用されているが，その効果は科学的に明らかにされていない．そこで，海洋深層水の温浴と冷水に交互に手足を浸す交代浴によって，皮膚温度と血流量がどのように変化するか実験を行ったので報告する．

対象および方法

調査対象としたのは20歳代の健康な女性9名である．

実験に用いた水は，富山湾海洋深層水（滑川アクアポケット）および水道水である．ポリバケツ（直径30 cm，高さ30c）にそれぞれ20L 用意した．サーモヒーターで42℃と20℃に設定した．対照として水道水を42℃と20℃に設定したものを用いた．

交代浴の方法は，右手または右足を海洋深層水（42℃）に3分間浸した後，水道水（20℃）に20秒間浸し，次に再び海洋深層水（42℃）に3分間浸し，水道水（20℃）に20秒間浸した．右手は肘まで，右足は膝下まで漬けた．対照は，水道水（42℃）と水道水（20℃）を用いて同様に行った．実験室の室温は22℃とした．

効果の判定のため，皮膚温度と血流量の測定を行った．皮膚温度の測定には，サーモグラフ Neo Thermo TVS-610（Avi 社製）を用いた．皮膚血流量は，レーザードプラー血流画像化装置 PeriScanPIM3-R (Perimed 社製) を用いて測定した．測定は，温浴前，温浴直後タオルで水分を拭った後，15分後，30分後，45分後に行った．手浴の場合は浸した右手および浸さない左手の両方を測定した．足浴の場合は両足について検討した．

対象者は平日の午後，日を変えて，海洋深層水の温水と水道水の温水を用いた温冷交代浴を行った．足浴については5名が実施し，手浴は4名が行った．その結果について検討した．

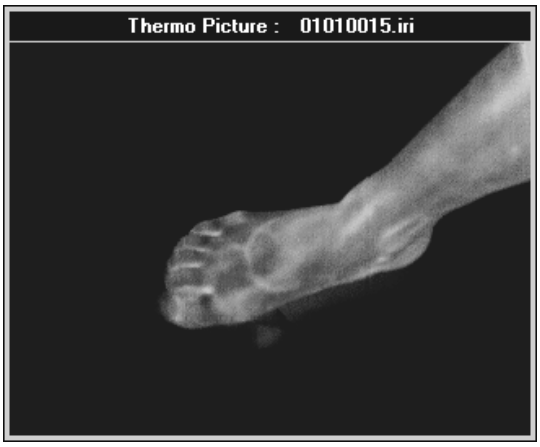
結果および考察

図1は，深層水を用いて温冷交代足浴を行ったときの皮膚温度の測定結果の一例である．足浴前から足浴後45分までのサーモグラムを示した．足浴直後は直前に冷水に浸していたことから皮膚温度は若干低値を示したが，15分後，30分後には高値となり，45分後にも足浴前よりも高かった．5名の対象者の推移について，水道水による温冷交代足浴と比較したものが図2である．図は足浴前からの温度差について，平均値で表した．深層水足浴は，水道水浴に比べ有意差はみられないものの，30分後および45分後に高い値を示した．図3は，交代浴をしなかった左足の皮膚温度の推移をみたものである．水道水足浴の場合は時間の経過とともに皮膚温度の低下傾向がみられたが，深層水ではそのような傾向はみられず，足浴前の皮膚温度を維持した．

図4は，血流画像化装置（以下血流計と略す）を用いて深層水の温冷交代足浴による右足の皮膚血流量の変化をみた一例である．親指を ROI（Region of Interest）として，皮膚血流量の平均値を求めた．図5は，足浴前の皮膚血流量を1として足浴後の増加率の推移について，平均値（5名）を図示したものである．深層水の温冷交代足浴によって，足浴前の1.5〜2.5倍の血流量の増加がみられ，水道水の温冷交代足浴（約1.5倍の増加）に比べ有意な違いがみられた（$p<0.05$）．特に交代浴直後と15分後に有意な違いがみられた（いずれも $p<0.05$）．図6は，交代浴をしなかった左足の

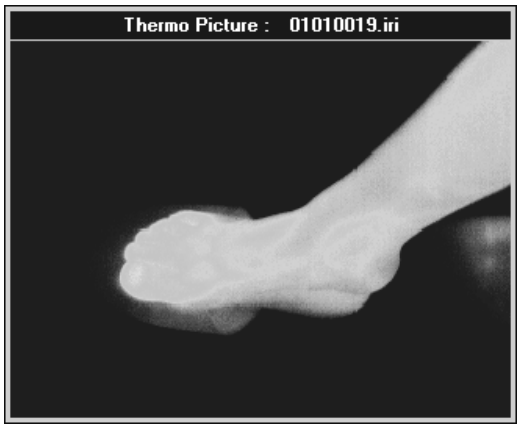
１．富山大学大学院医学薬学研究部保健医学教室　　２．大同製薬株式会社

A 海洋深層水の温冷交代足浴前

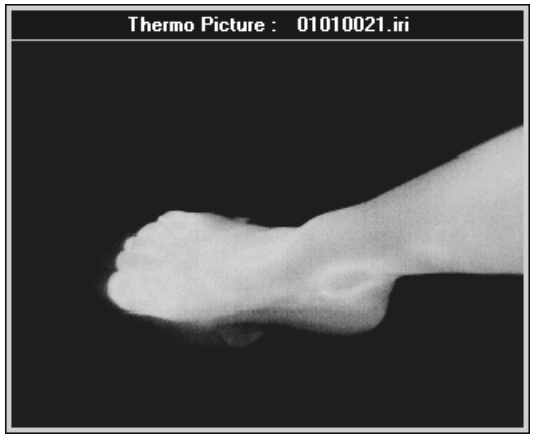


B 海洋深層水の温冷交代足浴直後

C 海洋深層水の温冷交代足浴 15 分後



D 海洋深層水の温冷交代足浴 30 分後



E 海洋深層水の温冷交代足浴 45 分後

図 1. 海洋深層水の温冷交代足浴による皮膚温度の変化
（サーモグラフによる測定）

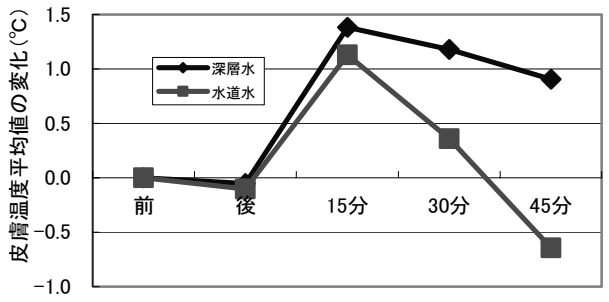


図 2．温冷交代足浴による右足の皮膚温度の変化

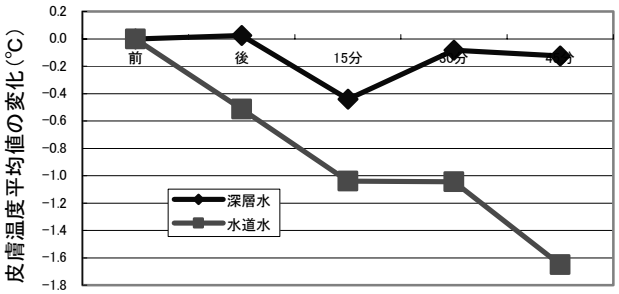
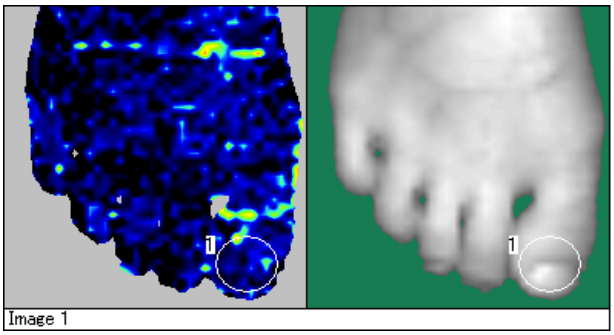


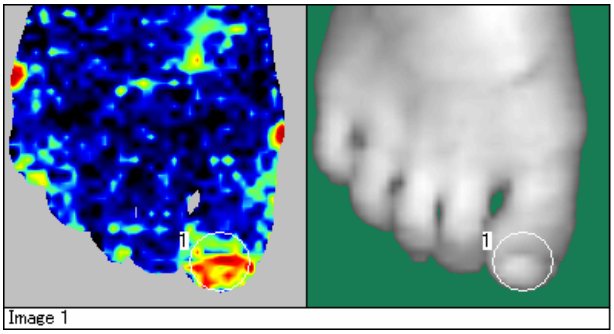
図 3．温冷交代足浴による左足の皮膚温度の変化

血流量の変化をみたものである．左足では，深層水と水道水の交代浴の間に有意な違いはみられなかったが，いずれも足浴前に比べて約1.5倍以上の血流の増加がみられ，交代浴を行った足だけでなく別の足や全身の血流量の増加が期待できることがわかった．

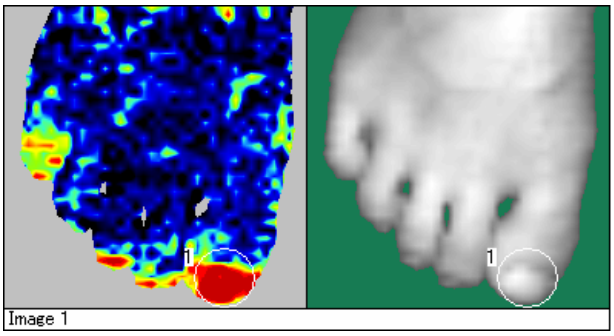
図7および図8は，温冷交代足浴と同様に温冷交代手浴について，皮膚温度の測定を行った4名の結果を示したものである．交代浴を行った右手についてみると（図7），深層水浴は，水道水浴に比べて交代浴後に皮膚温度が高い傾向がみられた（$p<0.1$）．交代浴直後は，直前に冷水に浸しているので温浴前より低い温度であるが，深層水浴の場合は，水道水浴に比べて有意に高い温度を示した（$p<0.05$）．交代浴を行わなかった左手については，深層水および水道水の交代浴の間に有意な違いはみられなかったが，深層水は交代浴15分後および30分後に高い傾向がみられ，水道水は交代浴前に比べ低くなる傾向がみられた（図8）．図9および図10は，温冷交代手浴による皮膚血流量の測定結果を示したものである．人差し指を ROI として血流量の平均値を求めた．図9が右手の，図10が左手の血流量の変化を示した．いずれも，深層水と水道水の交代浴間に有意な違いはみられなかったが，深層水の方が水道水に比べ血流量が増加する傾向がみられた．



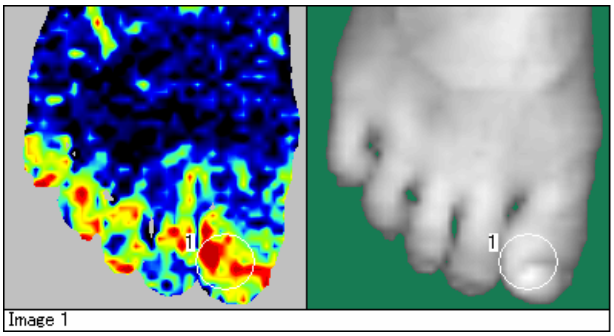
A 海洋深層水の温冷交代足浴前



B 海洋深層水の温冷交代足浴直後



C 海洋深層水の温冷交代足浴 15 分後



D 海洋深層水の温冷交代足浴 30 分後

図 4. 海洋深層水の温冷交代足浴による皮膚血流量の変化（血流画像化装置による測定）

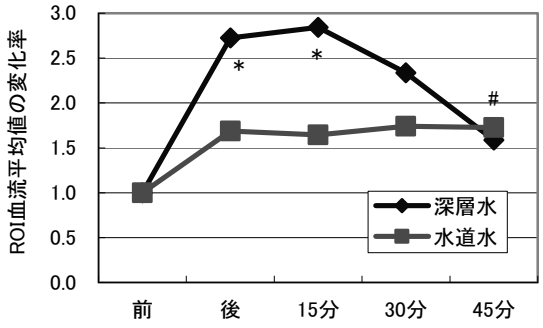


図 5. 温冷交代足浴による右足の血流量の変化

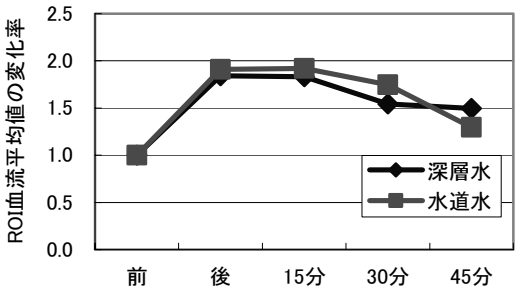


図 6. 温冷交代足浴による左足の血流量の変化

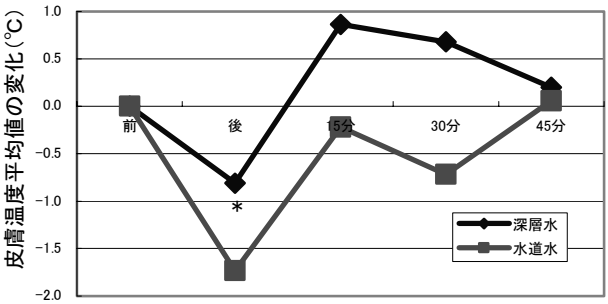


図 7. 温冷交代手浴による右手の皮膚温度の変化

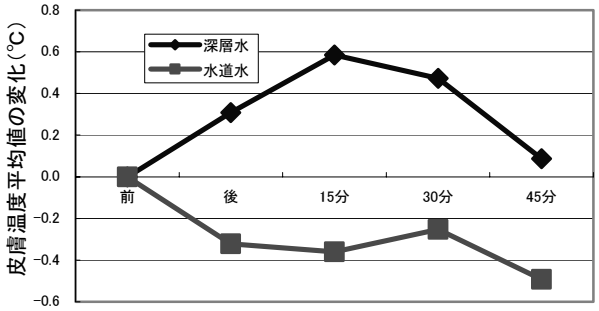


図 8. 温冷交代手浴による左手の皮膚温度の変化

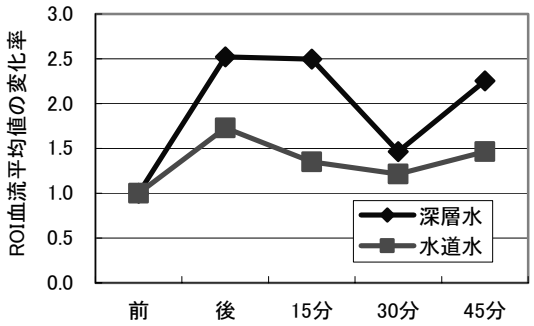


図 9. 温冷交代手浴による右手の血流量の変化

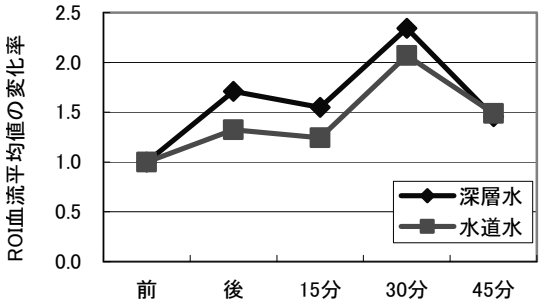


図 10. 温冷交代手浴による左手の血流量の変化

今回は海洋深層水を用いた温冷交代浴の効果をみるため，水道水の温冷交代浴との比較を行ったが，温冷交代浴の効果について検討するため，対象数は少ないが（2～3人）予備的に単なる水道水や深層水の温浴との比較を行った．その結果，皮膚温度の検討では，温冷交代浴では最後に冷水に浸すので水道水，深層水のいずれの手足浴においても交代浴の方が低い皮膚温度を示した．温浴しなかった左足，左手についても同様に交代浴の方が皮膚温度については低い傾向を示した．一方，皮膚血流量については，水道水を用いた足の交代浴では変わらなかったが，深層水の手足浴および水道水の手浴において，温冷交代浴の方が単なる温浴よりも血流量の増加がみられた．この場合は交代浴をしなかった左足，左手においても同様な傾向がみられた．

今回は，温浴の時間が3分間を2回繰り返す短時間の手足の交代浴実験であったにもかかわらず，血流量の増加がみられた．許らは淡水の足浴実験で快適に感じる時間を42℃で10分，40℃で15分，38℃で20から25分と述べているが[4]，深層水を用いた温冷交代浴ではそれよりも短時間で血流量が増加し体が温まり1時間程度持続することが分かった．海洋深層水体験施設の

利用者が実際に行う手足の交代浴で効果が得られるものと考えられた.

ま と め

海洋深層水を用いた温冷交代手足浴の効果をみるため，水道水の温冷交代浴との比較を行った.

海洋深層水の温冷交代手足浴は，水道水浴に比べて，皮膚温度および血流量とも高い傾向を示し，足浴には有意な血流量の増加がみられた.

海洋深層水を用いた温冷交代手足浴には，全身の血流量を増加させることが期待された.

謝　　辞

本研究は，平成19年度の富山大学医学部社会医学実習のテーマとして実施された．実験に協力してくれた学生諸君に感謝します.

文　　献

１．鏡森定信，王紅兵，アリナセルモアデリ，張淼，関根道和，堀井裕子，新村哲夫，西野治身，大村栄：洋深層水温浴効果の心理・生理学的指標による検討，日本温泉気候物理医学会雑誌，65（2），73－82．2002

２．新村哲夫，張淼，堀井裕子，長瀬博文，荒谷哲雄，王紅兵，アリナセルモアデリ，アレックスガイナ，関根道和，鏡森定信：海洋深層水温浴のリラックス作用および睡眠への影響に関する研究―深夜勤務明け後の朝の入浴についての検討―，日本温泉気候物理医学雑誌，67(3)，155-164，　2004.

３．許鳳浩，上馬場和夫，田川美貴，吉岡りか子，荒井哲也，二本松守，村椿良治：部分浴や部分マッサージによる生体の変化－足浴や足裏刺激による生理学的・生化学的変化，富山伝統医学研究，1，28-42，2000.

４．許鳳浩，上馬場和夫，廣田侑耶，田川美貴，吉岡りか子：足浴による生理的変化とその温度依存性，富山伝統医学研究，2，37-45，2001.

５．美和千尋，杉村公也，白石成明，田中紀行，川村陽一，出口晃，鈴村恵理：足浴が高齢者の鼓膜温，発汗量，血圧，心拍数に及ぼす影響，日本温泉気候物理医学会雑誌，70(2)，84-88，2007.

６．Nasermoaddel A, Kagamimori S:Balneotherapy in Medecine: A review, Environ Health Prev Med 10, 171-179, 2005.

(1) 誌　上　発　表

［原　　著］

1）ガラクトース血症マス・スクリーニングのための HemogloBind™を用いるボイトラー試験の定量化

米田　豊，九曜雅子

日本マス・スクリーニング学会誌，17(3)，53 - 58，2007

ガラクトース血症の定性試験法であるボイトラー試験を定量化する目的で，ろ紙血液からの溶出液に HemogloBind™を加えてヘモグロビンを沈殿させ，上清にボイトラー試液を加えて，一定時間の蛍光強度変化を測定する方法を検討した．また，沈殿したヘモグロビンを再溶解し，同時にヘモグロビンの定量を行うことで，血液ろ紙1枚を用いて，単位ヘモグロビン濃度当たりの酵素活性指標を測定できた．

2）Rate Assay による乾燥濾紙血液中の Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase(G6PD)活性定量法の検討

九曜雅子，米田　豊

日本マス・スクリーニング学会誌，17(3)，43 - 52，2007

G6PD 異常症は，新生児マス・スクリーニングでガラクトース血症 I 型（Gal-1-P Uridyltransferase 活性異常）の検査法であるボイトラー法の異常により発見される疾患である．富山県で患者が発見されたことを契機に，疾患の鑑別を目的として，乾燥濾紙血液を使用し，反応速度を測定することで酵素活性を定量する Rate assay による G6PD 活性の簡易定量法を検討した．その結果,約1時間で G6PD 活性を定量することが可能となり,ボイトラー法で異常が認められた場合には,早期に Gal-1-P Uridyltransferase 活性異常と鑑別することができるようになった．

3）Effect of Methyl Substitution on the Antioxidative Property and Genotoxicity of Resveratrol

Kiyoshi Fukuhara*, Ikuo Nakanishi *, Atsuko Matsuoka *, Tomohiro Matsumura*, Sachiko Honda, Mikiko Hayashi, Toshihiko Ozawa*, Naoki Miyata,O Shinichi Saito*, Nobuo Ikota*and Haruhiro Okuda*

Chem.Res.Toxicol. 21,282-287, 2008

Resveratrol (trans-3,42,5-trihydroxystilbene) is a natural phytoalexin with various biological activities including inhibition of lipid peroxidation and free radical scavenging properties. In addition to its beneficial effects, resveratrol also has significant genotoxicity that leads to a high frequency of chromosome aberration together with micronucleus and sister chromatid exchanges. To enhance the radical scavenging activities and to reduce the genotoxicity of resveratrol, we designed 42-methyl resveratrol analogues where a methyl group was introduced at the ortho position relative to the 42-hydroxy group, which is responsible for both antioxidative activities and genotoxicity of resveratrol. These

synthesized methyl analogues of resveratrol showed increased antioxidative activities against galvinoxyl radical as an oxyl radical species.

Furthermore, the methyl analogues also surprisingly showed reduced in vitro genotoxicities, suggesting that methyl substitution may improve resveratrol efficacy.

４）A pilot study of the antioxidative activity of resveratrol and its analogue in a 6-month feeding test in young adult mice

Atsuko Matsuoka *, Y. Kodama*, Kiyoshi Fukuhara*, Sachiko Honda, Mikiko Hayashi , K. Sai*, M. Hasebe*, Y. Fujiwara*

Food Chem. Tox. 46,1125-1130,2008

Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, has free-radical scavenging activity and we found that it induces chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in vitro. We synthesized its analogue 4-hydroxy-trans-stilbene (4-OH) and found that it has the same in vitro clastogenic activities as resveratrol, suggesting that the 40 hydroxy group of resveratrol is responsible for the effect. We fed resveratrol and 4-OH to young adult ICR mice at 0, 0.2, 2, or 20 ppm in their standard powder diet for 6 months and investigated the antioxidative effects. Half of each group was given 3000 ppm potassium bromate (KBrO3) in water for the last week to cause oxidative damage. Body weight gain tended to increase in males at 0.2 ppm resveratrol or 4-OH, and in females at 2 ppm 4-OH. Micronucleus (MN) analysis in bone marrow erythrocytes showed that the KBrO3 tendency to induce MN was not prevented by the dietary resveratrol or 4-OH, which themselves did not induce MN under the present conditions. In this pilot study, resveratrol and 4-OH showed no obvious effect, either beneficial or adverse, at doses that are feasible in daily life for humans.

５）日本において鳥類の巣・ペリットおよび肉食哺乳類の糞から発生したヒロズコガ（鱗翅目，ヒロズコガ科）

那須義次*，村濱史郎*，坂井　誠*，山内健生

昆蟲ニューシリーズ，10(4): 89-97. 2007

2002年から2006年にかけて，日本各地の鳥類の巣・ペリットおよび哺乳類の糞を調査し，ヒロズコガ科ヒロズコガ亜科に属する4種の蛾の発生を確認した．イガが島根県出雲市と大阪府河内長野市のツバメの巣，ウスグロイガが大阪府寝屋川市のハイタカのペリット，マエモンクロヒロズコガが愛媛県宇和島市のシジュウカラの巣，長野県飯綱町のノスリのペリット，小笠原諸島父島のイエネコの糞および鹿児島県奄美大島のイエネコかイヌの糞，アトキヒロズコガが和歌山県橋本市の雑木林に設置したハイタカのペリットを用いたトラップから羽化した．本報告は，日本においてシジュウカラの巣，鳥類のペリットおよび肉食哺乳類の糞から発生した蛾の初めての記録となった．幼虫はいずれも巣・ペリットおよび糞中のケラチン源（羽毛，毛など）を摂食していると考えられた．今回の調査結果と文献記録から市街地に造られたスズメ，コシアカツバメ，ツバメとカワラバトの巣が毛糸や毛織物害虫のイガの野外における重要な発生源であり，こられの巣からイガが家屋内に侵入することが推測された．

6）Weight of the climbing larva of the firefly *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae) and its relationship to size, weight, and sex of the adult

Setsuo Moriya*, Takeo Yamauchi & Nobukazu Nakagoshi*

Ent. Rev. Japan, 62(1): 127-134. 2007

In 2006, climbing larvae of the Genji firefly *Luciola cruciata* were captured in fields near Kure City in Hiroshima Prefecture, and their weights were measured. The larvae were subsequently incubated until pupation and adult emergence. Several months later, we determined the sexes of newly emerged adults and measured their weights and body lengths. Female adults developed from larvae weighing more than 0.250 g, whereas male adults developed from larvae weighing less than 0.150 g. Therefore, the sexes of climbing larvae can be determined solely on the basis of larval weight. The proportion of lighter climbing larvae increased as the season progressed. There is a positive correlation between larval and adult weights. During pupation, weight decreased to less than half the original larval weight. The adult female is 1.2 times as long as the adult male in average.

7）Evaluation of a two-dose administration of live oral poliovirus vaccine for wild and virulent vaccine-derived poliovirus type 1, 2, 3 strains in Japan.

Iwai M, Takizawa T, Nakayama T*, Matsuura K*, Yoshida H*, Hasegawa S, Obara M, Horimoto E, Kurata T, Horie H*.

Scand. J. Infect. Dis, 40 (3), 247-253, 2008

We evaluated the efficacy of Japan's vaccination policy, a 2-dose administration of live oral poliovirus vaccine (OPV) against wild and virulent vaccine-derived poliovirus (VDPV) type 1, 2, 3 strains, by investigating the neutralizing antibody titers of residents in Toyama Prefecture, Japan. Seropositivities against the virulent type 1 and 2 strains were more than 90%, but the values against the virulent type 3 strains were approximately 60%. Also, while geometric mean antibody titers against virulent type 1 and 2 strains were more than 180, those against the virulent type 3 strains were 58-59, and 9-12, in particular, at 10 to 19 y of age. A booster dose of the vaccine for the type 3 virus is recommended for adolescents. However, high herd immunity against type 1, 2 and 3 viruses has been maintained for these 22 y, although the seropositivity against type 3 virus was always lower than other types. Our results suggest that Japan's vaccination policy might be enough to prevent an epidemic of poliomyelitis caused by wild and virulent VDPV type 1, 2, 3 strains, even though the titers against type 3 viruses were the lowest.

8）長期ノロウイルス排泄中に認められた遺伝子変化

小原真弓，長谷川澄代，中村一哉，岩井雅恵，堀元栄詞，滝澤剛則，倉田　毅，齊藤尚仁，大江　浩

病原微生物検出情報，28(10)，288-289，2007

９）保育所で発生した腸管出血性大腸菌 O157による集団感染事例について-富山県

木全恵子，嶋智子，清水美和子，磯部順子，綿引正則，倉田毅，新村信久，泉和子，松村美智代，野嶋直樹，齊藤尚仁，大江浩

病原微生物検出情報, 28 (5), 139, 2007

2006年8月28日17時20分，県内医療機関より，下痢，腹痛，発熱の症状を呈した患者（保育園児）が多数発生しているとの報告が管轄厚生センターに届けられた。また，同日17時30分，管内のＡ市所在のＢ保育所からも同様の届出が出された。管轄厚生センターは直ちに当該保育所の調査を開始し，患児の状況を医療機関に確認した。その結果，患児に下痢，腹痛，血便，発熱等の症状が確認され，腸管出血性大腸菌の集団感染が疑われた。このため，28日夜から，患児らの検便を実施した。翌29日，医療機関から腸管出血性大腸菌 O157（VT1 VT2, 以下 O157）感染症の発生届があるとともに，前日実施した検便結果から O157が疑われた。

10）High speed and reproducible analysis of nitrosoamines by capillary electrophoresis with a sulfonated capillary

Atsushi Taga*, Tomoko Nishi*, Yoshitaka Honda*, Atsushi Sato*, Hiroyuki Terashima*, Kentaro Suzuki*, Shuji Kodama, Keito Boki*

J. Oleo Sci., 56, 429-434, 2007

Recently environmental control is regarded as important for good human health conditions, and toxic substances, including carcinogens and endocrine disruptors should be eliminated from our living environment. Hence easy quantitative methods are expected for a high level of environmental control. Our previous paper describes an easy quantitative analysis of nitrosoamines (NAs) by capillary electrophoresis with an untreated fused silica capillary installed in an ordinary apparatus. In this paper, utilizing a novel type capillary column having sulfonated inner wall was investigated for improvements of separation performance and reproducibility. A sulfonated capillary causes fast and stabile electroosmotic flow because its inner wall is strongly negative charged. On a performance comparison of a sulfonated capillary with an untreated fused silica, analysis time reduction of c.a. forty percent was achieved, and relative standard deviations of migration times and peak responses were less than one third. In addition sample concentrations giving detection and quantitation limits were also reduced to a half.

11）Usefulness of catechins and caffeine profiles to determine growing areas of green tea leaves of a single variety, Yabukita, in Japan

Shuji Kodama, Yuji Ito*, Hirofumi Nagase, Tomohisa Yamashita, Tomoko Kemmei, Atsushi Yamamoto*, Kazuichi Hayakawa*

J. Health Sci., 53, 491-495, 2007

Yabukita green tea leaves in Shizuoka, Kagoshima and Mie areas in Japan were analyzed for catechins and caffeine using 6-O-a-D-glucosyl-b-cyclodextrin-modified micellar electrokinetic

chromatography. Caffeine and seven catechins ((-)-catechin, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-catechin gallate, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin gallate), but not (+)-epicatechin, were detected in all extracts. Linear discriminant analysis was applied to differentiate green tea samples according to their geographical origins. As a result, all samples were correctly classified, which represented a recognition ability of 100 %. These results suggest that catechins and caffeine profiles of Yabukita green tea leaves could be useful to determine their growing areas in Japan.

12) Enantioseparation of isoxanthohumol in beer by hydroxypropyl-g-cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography

Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto*, Atsushi Sato*, § Kentaro Suzuki*, Tomohisa Yamashita, Tomoko Kemmei, Atsushi Taga*, Kazuichi Hayakawa*

J. Agric. Food Chem., 55, 6547-6552, 2007

Chiral resolution of isoxanthohumol (IX) in beer samples was performed by hydroxypropyl-g-cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. The optimum running conditions were found to be 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 45 mM hydroxypropyl-g-cyclodextrin and 100 mM sodium dodecyl sulfate with an effective voltage of +20 kV at 20° C using direct detection at 210, 295 and 370 nm. IX was detected in 12 beer samples and the total levels of (+)- and (-)-IX ranged from 0.15 to 1.4 mg/L. But the amount of xanthohumol (XN) was below the detection limit (0.017 mg/L). Each level of (-)-IX was almost the same as that of (+)-IX, suggesting that IX was a racemic mixture in these beer samples. The racemization of IX in beer could be attributed to the production of a racemic mixture from XN during boiling and to the fact that IX enantiomers were easily interconverted.

13) Determination of sequestering agents in cosmetics and synthetic detergents by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection

Tomoko Kemmei, Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto*, Yoshinori Inoue*, Kazuichi Hayakawa*

J. Chromatogr. A, 1171, 63-68, 2007

Using a fast reversible reaction of aminopolycarboxylic acids (APCAs) into Fe(II)-APCA complexes in the presence of Fe(II) ions, seven kinds of APCAs [nitrilotriacetate (NTA), N-(2-hydroxyethyl) ethylenediamine-triacetate (HEDTA), ethylenediamine-tetraacetate (EDTA), 1,3-propanediamine-tetraacetate (PDTA), diethylenetriamine-pentaacetate (DTPA), 1,2-diaminopropane-tetraacetate (MeEDTA), and O,O'-bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-tetraacetate (GEDTA)] in cosmetics and synthetic detergents were separated on two reversed-phase C30 columns connected in series and detected with ultraviolet detection. Simple pretreatment, consisted of thousand times dilution of samples and addition of 100 ml of the Fe(II) solution containing 10 mM Fe(II) chloride and 0.5 M sulfuric acid to 10 ml diluted samples, permitted the determination of APCAs in cosmetics and synthetic detergents at concentration level of 0.1 mM, except 0.3 mM for GEDTA. APCAs except GEDTA could be detected at concentration level of 0.03 mM and GEDTA could be detected at concentration level of 0.09 mM.

Good recoveries (95-110 %) were obtained for each APCA by the standard addition method on two diluted samples with high accuracy (RSD 0.2-9.1 %). Three APCAs (EDTA, HEDTA and NTA) were detected in various concentrations in cosmetics and synthetic detergents and the other APCAs were not detected in any of the samples. This method requires no tedious pretreatment and takes only 15 min for one analysis, so it is useful for determination of APCAs.

14) Simultaneous chiral resolution of monosaccharides as 8-aminonaphtalene-1,3,6-trisufonate derivatives by ligand exchange capillary electrophoresis using borate as a central ion of the chiral selector

Shuji Kodama, Sen-ichi Aizawa*, Atsushi Taga*, Tomohisa Yamashita, Tomoko Kemmei, Atsushi Yamamoto*, Kazuichi Hayakawa*

Electrophoresis, 28, 3930-3933, 2007

Six reducing monosaccharides (mannose, galactose, fucose, glucose, xylose, and arabinose) were derivatized with 8-aminonaphtalene-1,3,6-trisufonate (ANTS). Based on the chiral ligand exchange principle using borate as a central ion of the chiral selector and (S)-3-amino-1,2-propanediol (SAP) as a chiral selector ligand, all of the six ANTS-monosaccharides were simultaneously enantioseparated using absorbance at 245 nm for detection.. The optimum conditions for both high resolution and moderately short migration time consisted of 200 mM SAP-200 mM borate buffer (pH 9.2) containing 10% acetonitrile as a background electrolyte at 30° C with an applied voltage of +30 kV. It was revealed that the proposed chiral ligand exchange capillary electrophoresis using the SAP-borate system was applicable to enantioseparation of not only diols but also polyols.

15) Utilization of nanometre-order diameter columns inside porous anodic alumina for chromatography chip system

Tomohisa Yamashita, Shuji Kodama, Mikiya Ohto, Eriko Nakayama, Tomoko Kemmei, Tatsuya Muramoto, Akira Yamaguchi*, Norio Teramae*, Nobutaka Takayanagi

Chem. Lett., 37, 18-19, 2008

Porous anodic alumina (PAA) membranes were used as a nanometer-order diameter column for chromatography chip with acetonitrile-water mobile phase using gradient elution. In a chromatogram, 9-anthracenemethanol (AM), 9-anthracenecarboxylic acid (AC), and dansyl-glycine (DG) showed different retention times, indicating that PAA membranes are applicable to stationary phase for chromatography chip.

16) An optical rotary detector for high-performance liquid chromatography using polarization modulation

Atsushi Yamamoto*, Mio Kawai*, Mitsunori Sakamoto*, Shuji, Kodama, Kazuichi Hayakawa*

Anal. Sci., 24, 361-354, 2008

A sensitive and variable-wavelength optical rotary (OR) detector for high-performance liquid chromatography is presented. This design is entirely different from that of conventional OR detector consisting of a crossed polarizer pair. By placing a polarizing prism and a retardation plate into a commercial circular dichroism (CD) detector, the OR signal was obtained. The Mueller matrix approach was used to prove the principle of the OR signal appearance. Sugars and 4-androstene-3,17-dione were chosen as test compounds. The limit of detection was below 0.5 mg of injected sucrose at 260 nm, which was superior to that obtained with a conventional OR detector. For 4-androstene-3,17-dione, which is CD active, and shows a large anomalous OR dispersion curve, our detector gave a large OR signal with approximately half the intensity of the CD signal at 340 nm.

17）　中国新疆の百歳以上老人数と平均余命の日本（沖縄・長野）との比較

賈漢沙比提*，鏡森定信*，王　紅兵*，胡莉珍*，新村哲夫

民族衛生，73(4)，153－162，2007

As the aging society is developing all over the world quickly; the problems related to health and longevity become important and persistent. The purpose of this study was to compare the demographical status between senior citizens in Xinjiang, China and in Okinawa and Nagano, Japan, where are well-known as longevity areas, and nature and culture are extremely different.

We used Japanese national census for 1985-2000 and Chinese national census for 1982-2000. Chi-square test and life expectancy of survival analysis were performed to compare the proportion of 65 years or more and the centenarian people per 100,000 and life expectancy between China (Xinjiang) and Japan (Okinawa, Nagano).

The following results were obtained:

1) The proportions of the centenarian people in Xinjiang in 1982 were more than those in Japan in 1985 for both men and women. In 2000, the proportions of centenarian people in Xinjiang were more in men, and less in women (except for the figure based on population aged 65 years or more) compared to those in Japan.
2) In Xinjiang, 2000, the proportion of centenarian people became greater; and men were still dominant to women, but the life expectancy for each age group was shorter in men than those in women. In Japan, both proportion of centenarian people and life expectancy were more in women than those in men.
3) In 2000, the life expectancy of 0-79 years old men in Nagano was 0.1-7.7 years longer than that in Xinjiang for each year group, but the >=80 years old men was 1.3-2.5 years shorter in Nagano than that in Xinjiang. The life expectancy of 0-89 years old women was 0.5-12.5 years longer in Okinawa than in Xinjiang for each year group, and that of >=90 years old women was inversed with 0.8-1.2 years between the two.

18）　飲用型カプセル深部体温計からみた日常的生活行動―運動，温浴および睡眠を中心に―

鏡森定信*，Alexandru Gaina*，王　紅兵*，新村哲夫，関根道和*，立瀬剛志*，宮地正典*

日温気物医誌，70(4)，227－237，2007

In recent times, an ingestible capsule sensor for the measurement of core body temperature has become available. This equipment was used to measure the relationship between core body temperature and daily living activities such as eating, exercise and bathing etc.

The main findings were as followings:

1. With respect to daily living activities, the core body temperature during bathing showed higher values in comparison with eating and light-grade exercise etc.
2. For the same-grade of exercise (HRmax60%) either in an environmentally controlled room at either constant temperature (25℃)and humidity (50%) or in water (36℃; 50%humidity), the core body temperature showed almost identical changes for peak value and the rise and fall ever time.
3. Atypical work at midnight was associated with a continuous decrease in core body temperature.
4. Atypical sleep in the daytime was associated with a continuous decrease in core body temperature.
5. For daily living activities inducing an increase in core body temperature, the correlation coefficient between core body temperature and heart beats/min was 0.87($p<0.01$).

19）口腔乾燥に対する海洋深層水成分を含む口腔保湿液の有用性

中村和美*，新村哲夫，土岐隆広*，信田幸雄*，荒谷哲雄*，藤井侃*

医学と薬学，56(4)，531－537，2006

海洋深層水成分を配合した口腔内保湿液（噴霧液Ａ）の口腔乾燥に対する有用性評価を，本研究の目的とした．口腔乾燥者31名を対象に，噴霧液Ａを噴霧したのち唾液を採取した。採取した唾液の pH は中性に近く，唾液分倍量はナチュラルミネラルウオーター噴霧後より多く，市販の口腔内保湿液（噴霧液Ｂ）と同等であった．唾旅中のナトリウムイオン濃度はストレスマーカーの１つとして知られているが，噴霧液Ａ噴霧後の唾旅中のナトリウムイオン濃度は変わらず，噴霧によるストレスはないものと考えられた．唾旅中の分泌型免疫グロブリンＡ（s-IgA）濃度は免疫学的防御マーカーの1つとされており，噴霧液Ｂ噴霧後の唾液中 s-IgA 濃度は低値を示したが，噴霧談Ａはナチュラルミネラルウオーターと変わらず，口腔内の免疫学的防御機能を保持するものと思われた．これらの結果より，噴霧液Ａの口腔乾燥に対する有用性が示唆された．

［著書・総説・解説］

１）キャピラリー電気泳動　－より良い再現性を求めて－

小玉修嗣

ぶんせき（日本分析化学会編），2008年，No.1，pp32-33.

2）海洋深層水を利用したタラソテラピーと微量元素

新村哲夫

Biomed. Res. Trace Elements, 18(4), 328－335, 2007

Deep sea water experience facility "THALASSOPIA" was opened in 1998 in Namerikawa City, Toyama Prefecture. There were no scientific reports on thalathotherapy using deep sea water which is rich in elemental contents and clean. In order to clarify effects of deep sea water bathing on relaxation and sleep, comparison examinations were carried out with empty bath, tap water bath and bath of surface sea water in subjects of daytime duty persons and night duty persons using physiological and psychological index. It was indicated that there was hyperemia effect in deep sea water bathing which is easy to warm and is difficult to coo1. Deep sea water bathing showed better subjective sleep latency for sleep questionnaire and significantly better vigor status for mood questionnaire among 4 kinds of bathing.

Equipments which concentrated deep sea water of about 3.4% salinity using reverse osmosis membrane to about 15% salinity and to about 30% salinity by evaporation were developed. It was reported that floating bath was possible using the concentrated water as well as "Dead Sea". To study relaxation effects by floating bath during 15 minutes in the concentrated water of about 30% salinity, participated persons in "Namerikawa deep sea water fair 2003" were examined. By floating bath using the concentrated water, it was indicated that mental refresh effect and relaxation effect of muscles were obtained.

Penetration through skin of elements of concentrated deep sea water was examined using skins of infantile pigs similar to human skin. It was found that infantile pig skin induced experimental inflammation contained much sodium, potassium and magnesium after concentrated deep sea bathing by measuring secondary ion mass spectrogram. It is wanted to study on the relation between skin penetration of elements and anti-allergy, anti-inflammatory effects.

［報　　告］

1）検査機関が中心となって実施したブラインドサンプルによる外部精度管理導入に向けての取り組み－富山県の場合－

分担研究者：原田正平*，研究協力者：九曜雅子，二谷　武*，吉田丈俊*，今村博明*，副田善勝*，佐竹紳一郎*，鈴木恵美子*，渡辺倫子*，前田昌子*，成瀬　浩*，平原史樹*，加藤忠明*，松井　陽*

厚生労働科学研究費補助金：子ども家庭総合研究事業「タンデムマス等の新技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究」 平成19年度　総括・分担研究報告書 P127-129

新生児マススクリーニングにおいて真の精度管理を行うために有効であるブラインドサンプルによる外部精度管理の本県での導入方法について報告した.

2）甲殻類（ウオノエ類）

研究協力者：山内健生

深海動物相の解明と海洋生態系保護に関する基礎研究（第四期）　東北太平洋岸における深海動物相の解明と海洋汚染の調査研究（平成17-20年度）―平成18年度調査研究報告―, p. 70. 2007.

深海魚に寄生するウオノエの調査を行なった。

３）Changes in insect assemblages with conversion from old-growth evergreen broadleaf forests to Cryptomeria japonica plantations on Yakushima Island, Japan.

研究協力者：山内健生

Sustainability and biodiversity assessment on forest utilization options. x + 528 pp. Research Institute for Humanity and Nature. pp. 152-158. 2008.

原生的自然林とスギ植林における飛翔昆虫相を比較した。

４）感染症患者情報と病原体情報の評価について（非流行期におけるインフルエンザサーベイランス）

分担研究者：倉田毅，協力研究者：堀元栄詞

厚生労働科学研究費補助金：新興・再興感染症研究事業；効果的な感染症サーベイランスの評価並びに改良に関する研究　平成19年度総括・分担研究報告書

非流行期における新型インフルエンザの発生が危惧されていることから，富山県において非流行期（9〜11月）におけるインフルエンザサーベイランスを行った.

５）地方衛生研究所の疫学機能強化に関する研究

分担研究者：前田秀雄*，協力研究者：岸本剛*，加藤政彦*，森田幸雄*，鈴木智之*，堀元栄詞，小野塚大介*，神谷信之*，阿保満*

厚生労働科学研究費補助金：健康安全・危機管理対策総合研究事業；地域における健康危機に対応するための地方衛生研究所機能強化に関する研究　平成19年度総括・分担研究報告書

地域健康危機に対応するために今後の地方衛生研究所に必須である疫学機能のあり方及び推進強化する具体的方策を，PRECEDE-PROCEED Model を用いた事例解析により検討した.

６）環境水サーベイランスによるポリオウイルス伝播の監視

研究協力者：岩井雅恵

厚生労働科学研究費補助金：新興・再興感染症研究事業；ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討　平成19年度総括・分担報告書　p27-34

不顕性感染を含めた地域住民のポリオウイルス感染状況を把握することを目的に，ヒトの感染源調査とあわせて，下水流入水のポリオウイルス分離を行なった．また，フィルター吸着溶出法を用いて水中のウイルスを濃縮する場合のウイルス回収条件を検討し，ウイルス検出方法の効率化を試みた.

7）富山県における蚊の発生調査（2003～2007年）とウイルス浸淫状況

分担研究者：滝澤剛則，協力研究者：小原真弓，山内健生，渡辺　護*，長谷川澄代，倉田毅

厚生労働科学研究費補助金：新興・再興感染症研究事業；ウエストナイルウイルス侵入に備えての診断，予防対策への基盤的研究　平成19年度総括・分担報告書

蚊媒介性感染症対策として，現在の状態を把握するため，蚊の発生状況とウイルス保有状況，野生動物における抗体保有状況を調査した.

8）富山県における蚊の発生調査とウイルス浸淫状況

分担研究者：滝澤剛則，協力研究者：小原真弓，山内健生，渡辺　護，長谷川澄代，倉田毅

厚生労働科学研究費補助金：新興・再興感染症研究事業；ウエストナイルウイルス侵入に備えての診断，予防対策への基盤的研究　平成17～19年度分担研究総合報告書

蚊媒介性感染症対策として，現在の状態を把握するため，蚊の発生状況とウイルス保有状況，幼虫の発生源，野生動物における抗体保有状況を調査した.

9）富山県におけるつつが虫病に関する調査とマダニ類調査及び東海北陸地域のリケッチア感染症について

分担研究者：倉田毅，協力研究者：小原真弓，山内健生，渡辺護*，品川保弘，中村一哉，堀元栄詞，長谷川澄代，岩井雅恵，滝澤剛則

厚生労働科学研究費補助金：新興・再興感染症研究事業；リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築　平成19年度総括・分担研究報告書

富山県内で流行しているつつが虫病及び日本紅斑熱について把握することを目的に，野生げっ歯類とツツガムシ，マダニ類の調査を行った．また，東海北陸ブロック内におけるつつが虫病および日本紅斑熱の状況を把握するため，疫学情報および検査体制を調査した.

10）平成19年度の富山県におけるノロウイルスの浸淫状況調査

主任研究者：西尾　治，協力研究者：小原真弓，岩井雅恵，中村一哉，堀元栄詞，長谷川澄代，倉田　毅，滝澤剛則

平成19年度内閣府食品健康影響評価技術研究：輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究；生食用カキに起因するノロウイルスリスク評価に関する研究　平成19年度協力研究者報告書

富山県におけるノロウイルス浸淫状況を知るために，県内で発生したウイルス性胃腸炎事例，県内で採取された岩ガキ，および流入下水からノロウイルス遺伝子を検出し，それらを遺伝学的に比較検討し県内のノロウイルスの侵淫状況を網羅的に調査した。

11) 下水流入水からのノロウイルス検出と隣接海域のイワガキ汚染の状況

分担研究者：田中智之，研究協力者：滝澤剛則，中村一哉，小原真弓，長谷川澄代，岩井雅恵，堀元栄詞，倉田　毅

厚生科学研究費補助金：食品の安心・安全確保推進研究事業；ウイルス性食中毒の予防に関する研究　平成19年度協力研究者報告書

富山県西部地域の下水処理場の流入水を材料に環境中のノロウイルスの変遷や進化様式を時系列に調査した。

12）自然界における動物由来感染症病原体の浸淫状況の把握

分担執筆(ウイルス部，がん研究部)，富山県厚生部

平成19年度動物由来感染症予防体制整備事業結果報告書，2007

平成13年度から，野生動物が関連する動物由来感染症の発生監視体制の確立を目的に，野生げっ歯類をモデル動物として調査を行っている．19年度にはつつが虫病及び腎症候性出血熱の浸淫調査を行った．さらに，国内に侵入が懸念されるウエストナイル熱等を含む蚊媒介性感染症対策として，平成15年度から，県内における蚊の調査を開始している．平成19年度は蚊の成虫調査及びウイルス保有調査，野生動物における抗体保有調査を行った．

13）インフルエンザウイルス分離用宿主の検討に関する研究

分担研究者：滝澤剛則，協力研究者：中村一哉，堀元栄詞，岩井雅恵，小原真弓，長谷川澄代，倉田毅

厚生労働科学研究費補助金：新興・再興感染症研究事業；新型インフルエンザへの事前準備と大流行発生時の緊急対応計画に関する研究　平成19年度　総括・分担研究報告書，平成17－19年度　総合研究報告書

新型インフルエンザウイルスがヒト消化管にも感染する可能性を考え，消化管由来細胞でのインフルエンザウイルスの増殖様式を検討した。

14) 浴用水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討および衛生管理事例

分担研究者：遠藤卓郎，緒方喜久代，中嶋　洋，研究協力者：泉山信司，磯部順子，佐々木美江，山口誠一

厚生科学研究費補助金　地域健康危機管理研究事業
「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」
主任研究者：倉　文明，平成19年度総括・分担報告書，ｐ77-105

平成19年度は，昨年度回収率がよくなかった遺伝子検査法によるレジオネラ属菌の定量性について，抽出方法の検討を試みた。今年度取り入れたカラム法は，方法が煩雑であることから，施設によりその回収率に大きなばらつきが生じた。当所では，提案した Chelex 法がよい回収率であった。

15）食品を対象とした腸炎ビブリオ検査方法に関する研究
分担研究者：甲斐明美，荒川英二，協力研究者：八柳　潤，金子誠二，杉山寛治，磯部順子，緒方喜久代，

尾畑浩魅，小西典子，下島優香子

厚生科学研究費補助金　食品の安心・安全確保推進研究事業
「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」
主任研究者：宮原美智子，平成19年度総括・分担研究報告書，

食品検査における腸炎ビブリオの検査法を標準化するため，現在通知されている方法について，検討をおこなった。培養温度，培養時間，塩分濃度，培地等の詳細な項目につき，各研究機関でデータ取りを行い，最適な方法を提案した。

16）地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的，疫学的調査解析機能の強化に関する研究

分担研究者：倉田　毅，協力研究者：綿引正則，磯部順子，八柳　潤*，白木　豊*，鈴木匡弘

厚生科学研究費補助金　新興・再興感染症研究事業「薬剤耐性菌等に関する研究」
主任研究者：荒川宜親，平成19年度総括・分担研究報告書

平成18年度に実施した地方衛生研究所（地研）における薬剤耐性菌検査の実態調査に関するアンケート結果に基づき，平成19年7月6日に，衛生微生物協議会　第28回研究会で開催された薬剤耐性菌シンポジウムにおいて報告し，議論した。これらのアンケート結果及びシンポジウムの議論については，アンケート調査報告書を作成し，全国の地研に還元した。

17）東海・北陸地方9地方衛生研究所及び衛生試験所によるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いた腸管出血性大腸菌 O157の精度管理と PCR 型別法（IS printing system ver2）の検討

主任研究者：寺嶋淳*，
分担研究者：松本昌門*，研究協力者：鈴木匡弘*，児玉洋江*，白木豊*，田中保知*，木全恵子，
奥村貴代子*，藪谷充孝*，,石畝　史*，岩出義人*

厚生労働科学研究費補助金　新興・再興感染症研究事業「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」平成19年度総括・分担研究報告書，p80-100

平成19年度東海・北陸ブロック研究班活動として，ブロック内9地研による腸管出血性大腸菌 O157を用いた PFGE 精度管理に参加した．また，O157 30株について IS printing system ver2の試行を行った．その結果5株の IS printing system ver2のパターンが一致したが，4株の O157 IS printing system ver2のパターンでは非特異バンドが検出された．このような予測されない大きさの PCR 産物が検出された場合のサブタイピング上での取り扱いと解釈は注意が必要であると考えられる．

(2)　特 別 講 演 等

1）深層海水を利用したタラソテラピーと微量元素
第18回日本微量元素学会シンポジウム講演
新村哲夫
平19.7.5〜6，福井市

平成20年12月１日

２）海洋深層水および濃縮水を利用した健康増進について
平成19年度厚生労働省循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業,「日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究」班講演
新村哲夫
平19.10.28，滋賀県彦根市

(3) 学 会 発 表 等

１）南大東島における鳥マラリア媒介蚊の季節消長
松井　晋*，津田良夫*，斉藤篤思*，赤谷加奈*，山内健生，佐藤雪太*，高木昌興*，村田浩一*
第59回日本衛生動物学会大会　平19.4.4，　大阪市

２）富山県におけるインフルエンザ流行状況について　(2006/07年シーズン)
堀元栄詞，中村一哉，小原真弓，岩井雅恵，長谷川澄代，滝澤剛則，倉田毅
第21回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム，平19.5.13～15，　神奈川県

３）富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況（2004年～2006年）
小原真弓，渡辺護*，長谷川澄代，岩井雅恵，堀元栄詞，滝澤剛則，倉田毅
第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会，平19.5.18～19，白山市

４）広島県・瀬戸内海島嶼・愛媛県宇和島市のマダニ相
山内健生，島津幸枝*，田原研司*，藤田博己*
第15回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー，平19.5.27，　宮崎市

５）濃縮海洋深層水のスキンケア利用に関する皮膚科学的研究
新村哲夫
平成19年度深層水利用研究（非水産分野）担当者会議，平19.5.29，富山市

６）過去4シーズンにおけるインフルエンザワクチン接種前後の抗体価の変動について
堀元栄詞，小原真弓，岩井雅恵，長谷川澄代，滝澤剛則，倉田毅
第48回日本臨床ウイルス学会，平19.6.2～3，　富山市

７）下水流入水中のノロウイルス
岩井雅恵，小原真弓，長谷川澄代，堀元栄詞，滝澤剛則，倉田毅
第48回日本臨床ウイルス学会，平19.6.2～3，　富山市

８）平成18年度に富山県で発生したウイルス性胃腸炎の集団発生の特徴について
長谷川澄代，小原真弓，岩井雅恵，堀元栄詞，滝澤剛則，倉田毅
第48回日本臨床ウイルス学会，平19.6.2～3，富山市

９）ノロウイルスの長期排出でウイルス遺伝子に変化がみられた一例
小原真弓，長谷川澄代，岩井雅恵，堀元栄詞，滝澤剛則，倉田毅
第48回日本臨床ウイルス学会，平19.6.2～3，富山市

10）富山県における環境水サーベイランスの疫学的意義
滝澤剛則
第48回日本臨床ウイルス学会　シンポジウムII「環境水系の感染症」，平19.6.2〜3，富山市

11）中国•四国地域におけるリケッチア症（つつが虫病•日本紅斑熱）の発生状況と疫学的特徴
田原研司*，保科　健*，高尾信一*，島津幸枝*，葛谷光隆*，藤井理津志*，松本尚美*，近藤玲子*，大瀬戸光明*，山本保男*，千屋誠造*，山内健生，山本正悟*，片山　丘*，古屋由美子*，新井　智*，川端寛樹*，安藤秀二*，高野　愛*，藤田博巳*，矢野泰弘*，高田伸弘*
衛生微生物協議会第28回研究会，平19.7.5〜6，　岡山市

12）仔豚皮膚における濃縮海洋深層水成分の皮膚浸透性
新村哲夫，吉田淑子*，岡部素典*，胡莉珍*，孫迎春*，廣瀬富雄*，三井　博，鏡森定信*
第18回日本微量元素学会，平19.7.5〜6，福井市

13）漁港海水における腸炎ビブリオ実態調査（富山県厚生部Vpマリン実態調査事業）について
嶋　智子，磯部順子，木全恵子，清水美和子，綿引正則
第39回東海北陸ブロック食品衛生監視員研修会，平19.8.31，富山市

14）スクリーニング外部精度管理システムへのブラインドサンプル導入の検討
鈴木恵美子*，渡辺倫子*，前田昌子*，望月孝一*，山上祐次*，安片恭子*，田崎隆二*，九曜雅子，園山京子*，平原史樹*，原田正平*，加藤忠明*，松井　陽*
第34回日本マス・スクリーニング学会，平19.9.8〜9，千葉市

15）染色体検査で発見された脆弱X症候群の1例
林美貴子，本田幸子，本間一正*
第52回日本人類遺伝学会，平19.9.13〜15，東京都新宿区

16）照葉樹原生林とスギ人工林におけるアブ科，ツリアブ科，ハナアブ科群集の比較
山内健生
日本昆虫学会第67回大会，平19.9.15，神戸市

17）ケラチン食ヒロズコガ（鱗翅目，ヒロズコガ科）の野外での発生例
那須義次*，村濱史郎*，坂井　誠*，山内健生
日本昆虫学会第67回大会，平19.9.17，神戸市

18）緑茶カテキン類含量に基づく産地判別分析の可能性
小玉修嗣，伊藤勇二*，長瀬博文，山下智富，健名智子，高柳信孝，多賀敦，山本敦*，早川和一*
日本分析化学会第56年会，平19.9.19〜21，徳島市

19）HPLCを用いた化粧品及び合成洗剤中金属イオン封鎖剤の一斉分析
健名智子，小玉修嗣，山本敦*，井上嘉則*，早川和一*
日本分析化学会第56年会，平19.9.19〜21，徳島市

20）東北地方中部のマダニ相とマダニ保有リケッチア検査
藤田博己*・高田伸弘*・川端寛樹*・田原研司*・高野　愛*・山内健生・川森文彦*
第54回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会，平19.9.21，仙台市

平成20年12月１日

21）食肉のサルモネラ検査における選択培地の検討
磯部順子，清水美和子，嶋　智子，木全恵子，綿引正則，倉田　毅
第28回日本食品微生物学会学術総会，平19.9.26～27,東京都品川区

22）食品からの腸管出血性大腸菌検査法における PCR 法の検討
清水美和子，磯部順子，木全恵子，嶋　智子，綿引正則，倉田　毅
第28回日本食品微生物学会学術総会，平19.9.26～27,東京都品川区

23）海洋深層水繰返し温浴による成分の皮膚浸透と抗炎症性に関する仔豚実験
新村哲夫，三井　博，吉田淑子*，岡部素典*，古市恵津子*，鏡森定信*，胡莉珍*，アレックスガイナ*，孫迎春*，廣瀬富雄*
第11回海洋深層水利用学会全国大会海洋深層水2007知床らうす大会，平19.10.4～5，北海道羅臼町.

24）健康教室参加者の運動状況とアディポネクチンの変動
田中朋子
平成19年度地方衛生研究所全国協議会東海北陸支部環境保健部会，平19.10.4～5，金沢市

25）加速度計を用いて測定した健康教室参加者の身体活動量について
堀井裕子
平成19年度地方衛生研究所全国協議会東海北陸支部環境保健部会，平19.10.4～5，金沢市

26）Fluoride levels in various tea-based beverages of Japan and in Chinese tea infusions
Shimmura T, Nakazaki M, Horii Y, Nagase H, Mitsui H*, Kagamimori S*
27th Conference of the International Society for Fluoride Research, 2007.10.9～12, Beijing, China

27）Fluoride Exposure Cause Accelerated Bone Resorption in Inner Mongolian Young Women?
Shimmura T, Zhang M*, Bi LF*, Nishino H*, Nakazaki M, Horii Y, Nagase H, Su XL*, Kajita E*, Jia G*, Wang H*, Kagamimori S*
27th Conference of the International Society for Fluoride Research, 2007.10.9～12, Beijing, China

28）漁港海水における腸炎ビブリオ実態調査（富山県厚生部 Vp マリン実態調査事業）について
嶋　智子，磯部順子，木全恵子，清水美和子，綿引正則
平成19年度全国食品衛生監視員研修会，平19.10.18～19，東京都中央区

29）イヨシロオビアブの駆除依頼とその対応
渡辺　護*，山内健生
第59回日本衛生動物学会東日本支部大会，平19.10.20，東京

30）富山県の平野部における感染症媒介蚊の生息調査（2003～2007年）
山内健生，小原真弓，長谷川澄代，堀元栄詞，岩井雅恵，林美貴子，米田　豊，安藤秀二*，堀田　和*，城石将幸*，出村尚子*，松浦涼子*，廣瀬　修*，渡辺　護*
第62回日本衛生動物学会西日本支部大会，平19.10.21，大津市

31）平成18年度の東海北陸地区におけるノロウイルスの検出状況について
柴田伸一郎*，小原真弓，長谷川澄代，大矢英紀*，尾西一*，東方美保*，青木聡*，猿渡正子*，田中保和*，中野陽子*，杉山明*，小林慎一*，皆川洋子*
第55回日本ウイルス学会，平19.10.21～23，札幌市

32）ヒト大腸がん由来 Caco-2細胞でのインフルエンザウイルス感染様式の検討
滝澤剛則，堀元栄詞，岩井雅恵，小原真弓，長谷川澄代，中村一哉，倉田毅
第55回日本ウイルス学会，平19.10.21～23，札幌市

33）長時間記録型歩数計を用いた自主的な運動の継続性と行動変容ステージとの関連
長瀬博文，大下喜子*，田中朋子，堀井裕子
第66回日本公衆衛生学会，平19.10.24～26　松山市

34）自主的な運動の継続性と長時間記録型歩数計による情報活用との関連
大下喜子*，長瀬博文，田中朋子，堀井裕子
第66回日本公衆衛生学会，平19.10.24～26　松山市

35）肥満男性におけるインスリン抵抗性遺伝子 FABP2
田中朋子，堀井裕子，長瀬博文，大下喜子*，山上孝司*
第66回日本公衆衛生学会，平19.10.24～26，松山市

36）運動教室参加者の身体活動量と骨量および歩行能力との関連
堀井裕子，中崎美峰子，田中朋子，長瀬博文
第66回日本公衆衛生学会，平19.10.24～26，松山市

37）有機リン系農薬の曝露指標としての尿中アルキルリン酸について
中崎美峰子
第40回北陸信越薬剤師学術大会，平19.11.3～4，新潟市

38）キャピラリー電気泳動法によるニコチン類の光学異性体分析
小玉修嗣，森川敦詞*，中込和哉*，山本敦*，多賀敦，佐藤睦*，鈴木健太郎*，山下智富，健名智子，高柳信孝
第18回クロマトグラフィー科学会議，平19.11.8～9，函館市

39）中国内モンゴルと日本の若年有経女性における尿中骨吸収マーカーと骨量
新村哲夫，張淼*，堀井裕子，中崎美峰子，長瀬博文，畢力夫*，梶田悦子*，王紅兵*，鏡森定信*
第72回日本民族衛生学会総会，平19.11.8～9，高岡市

40）1998年度以降に富山県衛生研究所で同定した食品混入昆虫
山内健生，渡辺　護*
第35会北陸公衆衛生学会，平19.11.22，富山市

41）富山県における過去8シーズンのインフルエンザ流行状況について
堀元栄詞，中村一哉，小原真弓，岩井雅恵，長谷川澄代，滝澤剛則，倉田毅
第35回北陸公衆衛生学会，平19.11.22，富山県

42）管内における結核予防可能例の検討（第 3 報）
廣島恭子*，田中寿美代*，高田美智子*，相川義之*，前波和子*，石川　宏*，島田潤子*，長瀬博文，北本佳代子*，最上福美子*，垣内孝子*
第35回北陸公衆衛生学会，平19.11.22，富山市

平成20年12月１日

43）炭酸泉と濃縮海洋深層水の足浴による温熱効果に関する研究―末梢血流の変化による検討
新村哲夫，胡莉珍*，孫迎春*，鏡森定信*，碓井靖夫*，堀内誠*
第12回人工炭酸泉研究会，平19.11.30，東京都

44）均衡転座保因者と流産胎児の核型についての一考察
林美貴子，本田幸子，斎藤滋*
第28回北陸先天異常研究会，平19.12.1，金沢市

45）タバコにおけるニコチン・アルカロイド類の光学異性体分析
小玉修嗣，森川敦詞*，中込和哉*，山本敦*，多賀敦，佐藤睦*，鈴木健太郎*，山下智富，健名智子，高柳信孝
第24回イオンクロマトグラフィー討論会，平19.12.5～6，春日井市

46）固相抽出－HPLC 法を用いた河川水中金属イオン封鎖剤の一斉分析
健名智子，小玉修嗣，山本敦*，井上嘉則*，早川和一*
第24回イオンクロマトグラフィー討論会，平19.12.5～6，春日井市

47）均衡転座由来の染色体異常が疑われた流産胎児の1例について
林美貴子，本田幸子，斎藤滋*
第18回富山県母子医療研究会，平20.1.25，富山市

48）富山県における新生児マス・スクリーニングの成果と問題点
九曜雅子，米田豊
第18回富山県母子医療研究会，平20.1.25，富山市

49）富山県におけるインフルエンザサーベイランスについて
堀元栄詞，中村一哉，小原真弓，岩井雅恵，長谷川澄代，滝澤剛則，倉田毅
第21回公衆衛生情報研究協議会　平20.1.30～2.1，埼玉県

50）富山県における平成19年度のウイルス性胃腸炎患者からのノロウイルス検出状況
長谷川澄代，小原真弓，中村一哉，岩井雅恵，堀元栄詞，滝澤剛則
平成19年度東海北陸支部微生物部会，平20.3.6～7，名古屋市

51）原虫検査の事例報告
清水美和子
平成19年度地方衛生研究所全国協議会　東海北陸支部微生物部会，平20.3.6～7，名古屋市

52）富山県における平成19年度の食中毒発生状況と腸管系病原細菌検出情報
金谷潤一
平成19年度地方衛生研究所全国協議会　東海北陸支部微生物部会，平20.3.6～7，名古屋市

53）富山県における EHEC 感染症発生状況（2007年）および生レバー喫食調査
磯部順子
平成19年度地方衛生研究所全国協議会　東海北陸支部微生物部会，平20.3.6～7，名古屋市

54）溶血レンサ球菌レファレンス事業報告
清水美和子，嶋　智子
平成19年度地方衛生研究所全国協議会　東海北陸支部微生物部会，平20.3.6～7，名古屋市

55）富山県における Stx2低産生性腸管出血性大腸菌感染症発生状況について
木全恵子，磯部順子，清水美和子，嶋智子，金谷潤一，綿引正則，倉田毅
第12回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム，平20.3.7～8，東京都港区

56）有機リン系農薬代謝物検出状況と生活環境要因
中崎美峰子，大浦栄次*
第25回富山県農村医学研究及び健康福祉活動発表集会，平20.3.8，高岡市

57）長期間記録型歩数計を用いた健康教室参加女性の体重減少
田中朋子，堀井裕子，大浦栄次*，澁谷直美*
第25回富山県農村医学研究及び健康福祉活動発表集会，平20.3.8，高岡市

58）タバコ及びその煙中におけるニコチン・アルカロイド類の光学異性体分析
小玉修嗣，森川敦詞*，中込和哉*，山本敦*，多賀敦，佐藤睦*，鈴木健太郎*，山下智富，健名智子，高柳信孝
日本薬学会第128年会，平20.3.26～28，横浜市

59）HPLC を用いた河川水中金属イオン封鎖剤の一斉分析
健名智子，小玉修嗣，山本敦*，井上嘉則*，早川和一*
日本薬学会第128年会，平20.3.26～28，横浜市

60）陽極酸化アルミナ薄膜の液体クロマトグラフィーチップ用ナノカラムとしての利用
山下智富，小玉修嗣，大戸幹也，中山恵理子，健名智子，村元達也，寺前紀夫*，山口央*，高柳信孝
日本化学会第88春季年会，平20.3.26～30，東京都

61）中国内モンゴル自治区フッ素汚染地域女性における骨吸収亢進に関する調査研究(1)－尿中フッ素濃度と骨吸収マーカーについて－
新村哲夫，海栄*，堀井裕子，中崎美峰子，長瀬博文，桑守豊美*，森田明美*，王紅兵*，胡莉珍*，孫迎春*，蘇秀蘭*，常虹*，畢力夫*，鏡森定信*
第78回日本衛生学会総会，平20.3.28～31，熊本市

(4) 受 賞，学 位 授 与，資 格 取 得 等

１）称号授与

新村　哲夫

平成19年８月６日，中国内蒙古医学院から名誉教授の称号を授与された。

(5) 知 的 所 有 権

発明の名称	特許権者・出願人	発　明　者	番　　号
病原細菌，腸管出血性大腸菌およびレジオネラ菌の型別を検査する方法	富　　山　　県	綿引正則，永井美之	特許第4113961号

富 山 県 衛 生 研 究 所 年 報

平成19年度（2007）第31号

2008年12月１日

発 行 富 山 県 衛 生 研 究 所

〒939-0363

富山県射水市中太閤山17－１

電 話 （0766）56－5506㈹

ＦＡＸ （0766）56－7326

印 刷 株式会社スカラファクトリー

富山市住吉町１－５－18

電 話 （076）424－1755㈹