

第6部 報 文

目 次

1. 平成8年京都市結核・感染症サーベイランス事業における病原体 検査成績	(微生物)	65
2. 平成8年日本脳炎流行予測調査及び日本脳炎ウイルス増幅 抑制効果調査成績	(微生物)	74
3. ウイルス遺伝子検出例からみた乳幼児のサイトメガロウイルス感染状況	(微生物)	78
4. 牛の血液検査における基礎調査	(病 理)	82
5. 病畜牛における血液生化学検査について	(病 理)	93
6. 親水性ソリッドゲル使用下での微小酸素電極先端部の形と拡散電流の関係	(調査研究)	96
7. 沢の池誕生以前の周辺水域の水質及び植生に関する予備的な調査について	(環 境)	102
8. 京都市の河川上流域の水質について	(環 境)	108

Chapter 6 Reports

Contents

1. Isolation of pathogenic agents in the Kyoto City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases in 1996	(Micr)	65
2. Epidemiological survey of Japanese encephalitis (JE) with reference to the effect of JE vaccine to swine in Kyoto City in 1996	(Micr)	74
3. Human cytomegalovirus DNA detection by PCR from urine of infant and child patients in the Infectious Disease Surveillance in Kyoto City	(Micr)	78
4. The fundamental investigation of blood biochemical examination in cattle	(Path)	82
5. The blood biochemical examination in fall sick cattle	(Path)	93
6. Application of hydrophilic solid gel to the sensor of an oxygen micro-electrode tip	(Pub)	96
7. Preliminary study on water quality and vegetation of the aquatic area around Pond Sawanoike in the period before the birth of the pond	(Envir)	102
8. Water quality in the upper reaches of the rivers in Kyoto City	(Envir)	108

平成8年京都市結核・感染症サーベイランス事業における 病原体検査成績

微生物部門

Isolation of pathogenic agents in the Kyoto City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases in 1996

Abstract: Virological and bacteriological tests were performed using various specimens from patients in the Kyoto City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases in 1996. Of 220 patients, 88 were positive for viral and/or bacterial agents. A total of 58 strains of viruses and 33 strains of bacteria were isolated. Yearly isolation rate of the agents per patient was 40.0%. Influenza viruses were isolated from January to February and December, mainly from the patients with symptoms of influenza, while enteroviruses were isolated from early summer to late fall mainly from the patients with symptoms of summer flu, herpangina or aseptic meningitis. Rotaviruses were isolated from February to June from the patients with infectious gastroenteritis or infantile vomiting and diarrhea. Various types of viruses were mostly isolated in the two age groups of 1-4 years-old and 5-9 years-old. Some mixed infections of bacteria, such as *Streptococcus pyogenes*, and virus, such as influenza virus were observed.

Key Words: 感染症サーベイランス infectious disease surveillance, エンテロウイルス enterovirus, インフルエンザウイルス influenza virus, 病原細菌 pathogenic bacteria, ロタウイルス rotavirus

I はじめに

京都市は昭和57年度から京都市感染症サーベイランス事業を行っている。当所では本事業のうち、流行疾病の病原体検索を行い、検査情報の作成と還元を行うとともに、各種疾病と検出病原体との関連について解析を行っている。

なお、昭和62年度より本事業に性行為感染症(STD)サーベイランスが加えられた。本報告では、平成8年1月から12月までに実施した小児科検査定点及び病院検査定点の検査成績について述べる。

II 材料と方法

1. 検査対象疾病

平成8年1月から12月までに病原体検査を行った疾病は感染性胃腸炎、乳児嘔吐下痢症、インフルエンザ様疾患、急性上気道炎、喉頭炎、扁桃炎、気管支炎・肺炎、夏かぜ様疾患、異型肺炎、クループ、ヘルパンギーナ、手足口病、咽頭結膜熱、感染性髄膜炎、脳・脊髄炎、口内炎、発疹症、溶血性連鎖球菌感染症、リンパ節炎、膀胱炎、胸膜炎、発熱、及びその他14疾病の計36疾病であった。

2. 検査材料

検査材料は、市内3か所の検査医療定点（小児科定点・病院定点）の協力により採取されたもので、患者220人から糞便64検体、咽頭ぬぐい液158検体、髄液50検体、尿41検体、膈分泌物1検体、皮膚病巣2検体、血液3検体、膈分泌物1検体、菌株（糞便由来）15検体の計335検体が採取された。

3. 検査方法

1) ウイルス検査

検査材料の前処理、検査方法、検出ウイルスの同定は前報¹⁾どおりである。また、サイトメガロウイルスは、尿検体を用い、PCR法によりウイルス遺伝子を検出することで同定した。

2) 細菌検査

病原細菌の分離、同定は前報¹⁾どおりで行った。

III 成績

1. 月別病原ウイルス検出状況

各月の被検患者数をみると、冬季の1月及び12月と夏季の6月～8月に20人以上であり、特に7月は34人で最多で

あった。その他の月は8～16人で、月平均18.3人であった。病原体検出率は1月、7月が60%以上の高率であった。このうちウイルス検出率をみると、1月が55.0%と最も高率で、4月、7月、9月、12月が30～40%台であった。被検患者220人中58人から、計58株のウイルスを検出した。患者あたりの検出率は26.4%であった。

内訳はコクサッキーAが11株、コクサッキーBが7株、エコーが1株、エンテロ71型が1株、ロタが3株、アデノが7株、インフルエンザA(H1N1)(=Aソ連型)が13株、インフルエンザA(H3N2)(=A香港型)が8株、単純ヘルペスが2株、サイトメガロが4株、RSが1株であった。検出ウイルスの主な型は、コクサッキーAは11株中10型が5株、6型が3株、2型、4型、5型が各1株であり、コクサッキーBは4型のみを7株検出した。エコーは6型が1株検出され、アデノは5型、型別不明が各2株、1型、2型、6型が各1株検出された。単純ヘルペスは1型のみを2株検出した。検出ウイルスの季節推移をみると、1月～2月及び12月はインフルエンザが主流で、1月～2月にはインフルエンザA(H1N1)型、12月にはA(H3N2)型を検出した。ロタは2月、4月、6月に各1株検出された。7月にはコクサッキーA 2型、6型、10型が検出され、6月、7月にはコクサッキーB 4型が検出された。コクサッキーA群、コクサッキーB群、エコー群などのエンテロウイルスが5月～9月に集中して検出される傾向が本年もみられた。アデノは4月～9月に散発的に検出された(表1)。

2. 月別病原細菌検出状況

被検患者135人中33人から計33株の病原細菌を検出し、患者あたりの検出率は24.4%であった。

内訳は、主なものでは病原性大腸菌17株、黄色ブドウ球菌8株、A群溶血性連鎖球菌が6株等であった。

最多検出の病原性大腸菌は菌株として搬入されたものも含むが、7月を中心に6月から10月に、A群溶血性連鎖球菌は1月、2月、5月、6月、12月に検出され、黄色ブドウ球菌は4月、5月、6月及び7月に検出された(表1)。

3. 疾病別病原ウイルス検出状況

被検患者数の多かった上位3疾病は感染性胃腸炎の40人、次いでインフルエンザ様疾患の34人、感染性髄膜炎の31人であった。急性上気道炎、夏かぜ様疾患、気管支炎・肺炎、ヘルパンギーナ等を加えた呼吸器感染症が本年の総被検患者数の約40%を占めた。主な疾病別のウイルス検出率はヘルパンギーナ、インフルエンザ様疾患、リンパ節炎等が50%以上の高率であり、乳児嘔吐下痢症、溶連菌感染症、異型肺炎、急性上気道炎は20～30%台であった。

主な疾病について同定済みウイルスの検出状況をみると、

夏かぜ様疾患からコクサッキーA、コクサッキーB、アデノの3種5株、インフルエンザ様疾患からインフルエンザA(H1N1)、インフルエンザA(H3N2)、コクサッキーA、RSの4種20株、ヘルパンギーナからコクサッキーA、コクサッキーBの2種8株、感染性髄膜炎からコクサッキーA、コクサッキーB、エコー、アデノ、インフルエンザA(H1N1)、サイトメガロの6種6株、感染性胃腸炎からロタ、アデノの2種4株を分離した。乳児嘔吐下痢症からはロタ1株を分離した(表2)。

4. 疾病別病原細菌検出状況

主な疾病からの病原細菌検出状況をみると、感染性胃腸炎からEHEC O157 H7 毒素(+) 3株を含む病原性大腸菌16株を、インフルエンザ様疾患からA群溶血性連鎖球菌2株、急性上気道炎からG群溶血性連鎖球菌を、気管支炎・肺炎、クループ、発疹症、及び感染性髄膜炎から黄色ブドウ球菌を分離した(表2)。

5. 年齢層別病原ウイルス検出状況

被検患者の年齢層別分布をみると、0～4歳が120人で最も多く、次いで5～9歳の69人であり、10～14歳及び15歳以上は各々21人、10人と少なかった。

病原体検出状況を年齢層別にみると、患者あたりの検出率は0歳が21.4%、1～4歳が48.7%、5～9歳が37.7%、10～14歳が38.1%、15歳以上が70.0%であった。

ウイルス検出率は0歳が11.9%、1～4歳が38.5%、5～9歳が26.1%、10～14歳が23.8%、15歳以上からは0%であった。

検出ウイルスの種類は1～4歳が15種30株で最も多く、次いで5～9歳が9種18株、0歳では4種5株で、比較的低年齢層から多様なウイルスが検出された。10～14歳は2種5株であった。

エンテロウイルス群は1～4歳及び5～9歳から多数検出された。一方、アデノウイルス群は1～4歳の低年齢層から多く検出された。また、ロタウイルスも1～4歳から検出された。サイトメガロウイルスは1～4歳でやや多く検出された。インフルエンザA(H1N1)、インフルエンザA(H3N2)は加齢とともに検出数が増える傾向にあった。なお、インフルエンザA(H1N1)では本年も0歳からの検出例がみられた(表3)。

6. 年齢層別病原細菌検出状況

検出病原細菌の種類は0歳が1種4株、1～4歳が5種10株、5～9歳が3種9株、10～14歳が2種3株、15歳以上が1種7株であった(表3)。

表1 月別病原体検出状況（小児科・病院定点）

平成8年1月～12月

月		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計		病源体検出比率 (%)	
受付患者数		20	16	8	12	12	27	34	26	11	13	15	26	220			
検査材料	糞便	3	5	2	2	5	7	9	12	3	6	6	4	64	335		
	咽頭ぬぐい液	19	13	6	8	6	19	21	15	7	11	11	22	158			
	髄液	5	1	1	4	1	7	7	8	4	3	5	4	50			
	尿	2	—	—	1	1	4	5	9	2	4	7	6	41			
	腔分泌物	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1			
	皮膚病巣	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	2			
	血液	—	—	—	—	1	1	—	1	—	—	—	—	3			
	臍分泌物	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1			
菌株（糞便由来）		—	—	—	—	—	—	7	6	1	1	—	—	15			
病原体検出患者数		12	6	0	5	5	8	24	10	5	1	1	11	88			
患者あたりの検出率（%）		60.0	37.5	0.0	41.7	41.7	29.6	70.6	38.5	45.5	7.7	6.7	42.3	40.0			
ウイルス	被検患者数	20	16	8	12	11	26	26	20	10	12	15	26	202			
	検出患者数	11	4	0	5	1	4	13	5	4	0	1	10	58			
	患者あたりの検出率（%）		55.0	25.0	0.0	41.7	9.1	15.4	50.0	25.0	40.0	0.0	6.7	38.5	28.7		
	コクサッキーA2型		—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1			1.1
	コクサッキーA4型		—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1			1.1
	コクサッキーA5型		—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1			1.1
	コクサッキーA6型		—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	3			3.3
	コクサッキーA10型		—	—	—	—	1	—	2	1	1	—	—	5			5.5
	コクサッキーB4型		—	—	—	—	—	2	5	—	—	—	—	7			7.7
	エコー6型		—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1			1.1
	エンテロ71型		—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1			1.1
	アデノ1型		—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1			1.1
	アデノ2型		—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1		1.1	
	アデノ5型		—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	2		2.2	
	アデノ6型		—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1		1.1	
	アデノ型別不明		—	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—	2		2.2	
	単純ヘルペス1型		—	1	—	1c	—	—	—	—	—	—	—	2		2.2	
	サイトメガロ		—	—	—	—	—	—	1	1	1	—	—	1	4		4.4
	ロタ		—	1	—	1	—	1	—	—	—	—	—	3		3.3	
	インフルエンザA(H1N1)型		11ab	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13		14.3	
	インフルエンザA(H3N2)型		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	8		8.8	
	RS		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1		1.1	
	小計		11	4	0	5	1	4	13	5	4	0	1	10	58		63.7
細菌	被検患者数	20	16	8	9	11	22	31	13	1	3	0	1	135			
	検出患者数	3	2	0	1	4	4	11	5	1	1	0	1	33			
	患者あたりの検出率（%）		15.0	12.5	0.0	11.1	36.4	18.2	35.5	38.5	100.0	33.3	0.0	100.0	24.4		
	A群溶血性連鎖球菌		1a	2	—	—	1	1	—	—	—	—	1	6		6.6	
	G群溶血性連鎖球菌		1b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1		1.1	
	緑膿菌		1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1		1.1	
	黄色ブドウ球菌		—	—	—	1c	3	2	2	—	—	—	—	8		8.8	
	病原性大腸菌(O157,毒素+)		—	—	—	—	—	—	2	1	—	—	—	3		3.3	
	病原性大腸菌(O157,毒素-)		—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2		2.2	
	病原性大腸菌(EPECなど)		—	—	—	—	—	1	5	4	1	1	—	12		13.2	
	小計		3	2	0	1	4	4	11	5	1	1	0	1	33		36.3
合 計		14	6	0	6	5	8	24	10	5	1	1	11	91		100.0	

a～c：同一被検者

表2 疾病別病原体検出状況（小児科・病院定点）

平成8年1月～12月

8

疾 病 名		感染性胃腸炎	乳児嘔吐下痢症	インフルエンザ様疾患	急性上気道炎	喉頭炎	扁桃炎	気管支炎・肺炎	異型肺炎	クループ	手足口病	夏かぜ様疾患	ヘルパンギーナ	咽頭結膜熱	発疹症	感染性髄膜炎	脳・脊髄炎	口内炎	不明熱	溶連菌感染症	リンパ節炎	膀胱炎	胸膜炎	その他	計	病原体検出比率 (%)
受付患者数		40	3	34	4	1	3	7	4	4	1	21	8	2	10	31	4	1	6	14	2	2	1	17	220	
検 査 材 料	糞便	20	3	—	—	—	—	5	1	—	—	4	1	—	2	17	2	—	4	—	2	—	—	3	64	335
	咽頭ぬぐい液	12	2	34	4	1	3	7	3	4	1	20	8	2	6	18	3	1	5	14	2	—	1	7	158	
	髄液	2	—	—	1	—	—	—	—	—	—	4	1	—	1	29	2	—	3	—	—	—	—	7	50	
	尿	3	1	—	—	—	—	4	2	—	—	1	1	—	2	12	1	—	3	—	2	2	—	7	41	
	腔分泌物	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	
	皮膚病巣	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	
	血液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3	
	膿分泌物	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
菌株（糞便由来）		14	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15	88
病原体検出患者数		23	2	21	1	1	0	1	1	1	0	6	8	0	2	9	0	1	1	6	2	1	1	0	88	
患者あたりの検出率（%）		57.5	66.7	61.8	25.0	100.0	0.0	14.3	25.0	25.0	0.0	28.6	100.0	0.0	20.0	29.0	0.0	100.0	16.7	42.9	100.0	50.0	100.0	0.0	40.0	202
被検患者数		24	2	34	4	1	3	7	4	4	1	21	8	2	9	31	4	1	6	14	2	2	1	17	202	
検出患者数		4	1	20	1	1	0	0	1	0	0	5	8	0	1	6	0	1	1	4	2	1	1	0	58	28.7
患者あたりの検出率（%）		16.7	50.0	58.8	25.0	100.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	23.8	100.0	0.0	11.1	19.4	0.0	100.0	16.7	28.6	100.0	50.0	100.0	0.0	28.7	
ウ イ ル	コクサッキーA 2型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	1.1
	コクサッキーA 4型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1.1
	コクサッキーA 5型	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1.1
	コクサッキーA 6型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3.3
	コクサッキーA 10型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	5	5.5
	コクサッキーB 4型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	2	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	7	7.7
	エコー6型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1.1
	エンテロ71型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	1.1
	アデノ1型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	1.1
	アデノ2型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	1.1
ス	アデノ5型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	2	2.2
	アデノ6型	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1.1
	アデノ型別不明	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2.2
	単純ヘルペス1型	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1c	—	—	1	—	—	—	—	—	—	2	2.2
	サイトメガロ	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	1	—	—	4	4.4
	ロタ	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3.3
	インフルエンザA(H1N1)型	—	—	11a	1b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	13	14.3
	インフルエンザA(H3N2)型	—	—	7	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	8.8
	RS	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1.1
	小 計	4	1	20	1	1	0	0	1	0	0	5	8	0	1	6	0	1	1	4	2	1	1	0	58	63.7
細 菌	被検患者数	38	2	19	2	1	3	5	1	2	0	16	7	2	7	8	2	1	4	11	1	0	0	3	135	6.6
	検出患者数	19	1	2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	2	3	0	0	0	2	0	0	0	0	33	
	患者あたりの検出率（%）	50.0	50.0	10.5	50.0	0.0	0.0	20.0	0.0	50.0	0.0	6.3	0.0	0.0	28.6	37.5	0.0	0.0	0.0	18.2	0.0	0.0	0.0	0.0	24.4	
	A群溶血性連鎖球菌	1	—	2a	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	6	
	G群溶血性連鎖球菌	—	—	—	1b	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
	緑膿菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	
	黄色ブドウ球菌	2	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	2c	2	—	—	—	—	—	—	—	—	8	
	病原性大腸菌(O157、毒素+)	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	
	病原性大腸菌(O157、毒素-)	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
	病原性大腸菌(EPECなど)	11	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	
小 計		19	1	2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	2	3	0	0	0	2	0	0	0	0	33	36.3
合 計		23	2	22	2	1	0	1	1	1	0	6	8	0	3	9	0	1	1	6	2	1	1	0	91	100.0

a～c：同一被検者

表3 年齢層別病原体検出状況（小児科・病院定点）

平成8年1月～12月

No.63 (1997)

京都市衛公研年報

69

年齢(歳)		0歳	1～4歳	5～9歳	10～14歳	15歳以上	計	病原体検出比率 (%)
受付患者数		42	78	69	21	10	220	
検査材料	糞便	22	24	12	4	2	64	
	咽頭ぬぐい液	29	61	48	18	2	158	
	髄液	18	18	12	2	—	50	
	尿	14	12	10	3	2	41	
	腔分泌物	—	—	1	—	—	1	
	皮膚病巣	1	1	—	—	—	2	
	血液	2	—	1	—	—	3	
	臍分泌物	1	—	—	—	—	1	
	菌株（糞便由来）	1	4	3	—	7	15	
病原体検出患者数		9	38	26	8	7	88	
患者あたりの検出率（%）		21.4	48.7	37.7	38.1	70.0	40.0	
被検患者数		40	74	64	21	3	202	
検出患者数		5	30	18	5	0	58	
患者あたりの検出率（%）		12.5	40.5	28.1	23.8	0.0	28.7	
ウイルス	コクサッキーA2型	—	—	1	—	—	1	1.1
	コクサッキーA4型	—	1	—	—	—	1	1.1
	コクサッキーA5型	—	—	1	—	—	1	1.1
	コクサッキーA6型	—	2	1	—	—	3	3.3
	コクサッキーA10型	2	1	2	—	—	5	5.5
	コクサッキーB4型	1	5	1	—	—	7	7.7
	エコー6型	—	1	—	—	—	1	1.1
	エンテロ71型	—	—	1	—	—	1	1.1
	アデノ1型	—	1	—	—	—	1	1.1
	アデノ2型	—	1	—	—	—	1	1.1
	アデノ5型	—	2	—	—	—	2	2.2
	アデノ6型	1	—	—	—	—	1	1.1
	アデノ型別不明	—	1	—	1	—	2	2.2
	単純ヘルペス1型	—	2c	—	—	—	2	2.2
	サイトメガロ	—	3	1	—	—	4	4.4
	ロタ	—	3	—	—	—	3	3.3
	インフルエンザA(H1N1)型	1	4b	8a	—	—	13	14.3
	インフルエンザA(H3N2)型	—	2	2	4	—	8	8.8
	RS	—	1	—	—	—	1	1.1
	小計	5	30	18	5	0	58	63.7
細菌	被検患者数	15	58	44	11	7	135	
	検出患者数	4	10	9	3	7	33	
	患者あたりの検出率（%）	26.7	17.2	20.5	27.3	100.0	24.4	
	A群溶血性連鎖球菌	—	1	3a	2	—	6	6.6
	G群溶血性連鎖球菌	—	1b	—	—	—	1	1.1
	緑膿菌	—	1	—	—	—	1	1.1
	黄色ブドウ球菌	4	3c	1	—	—	8	8.8
	病原性大腸菌(O157,毒素+)	—	—	3	—	—	3	3.3
	病原性大腸菌(O157,毒素-)	—	1	—	—	1	2	2.2
	病原性大腸菌(EPECなど)	—	3	2	1	6	12	13.2
	小計	4	10	9	3	7	33	36.3
計		9	40	27	8	7	91	100.0

a～c：同一被検者

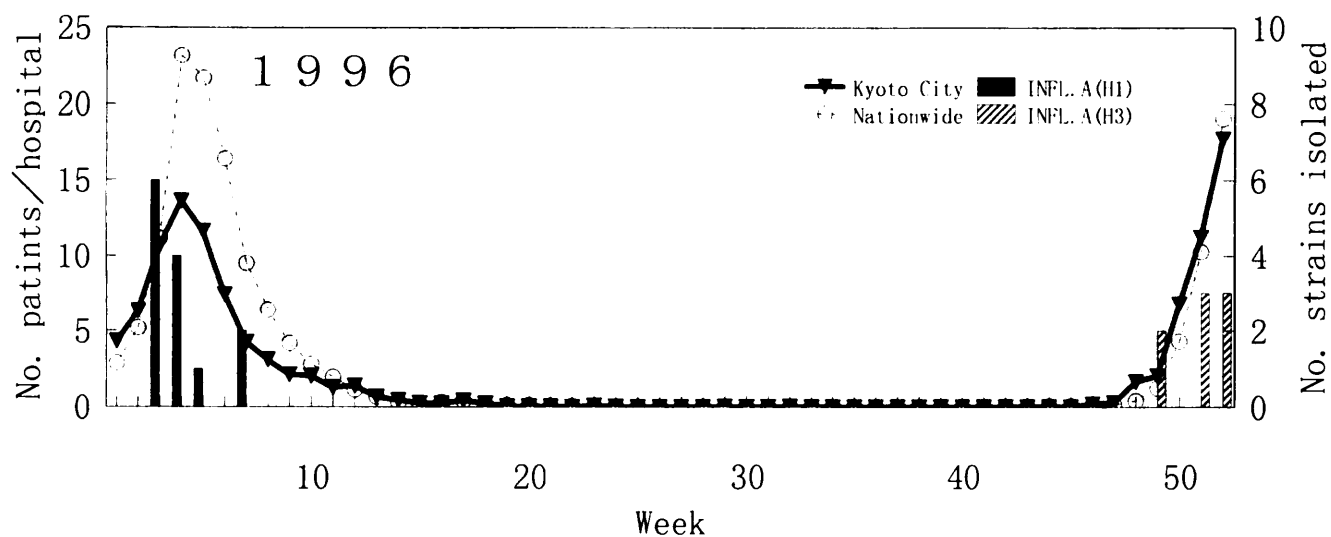


Fig. 1. Seasonal prevalence of patients with influenza, and weekly isolation of influenza virus.

7. 主な疾病と病原体検出状況

1) 本市感染症サーベイランス患者情報によれば、インフルエンザ様疾患は1月初頭から患者発生数が増加し、1月下旬にピークに達した後急激に減少し、3月中にはほぼ終息した。この流行状況に呼応して1月～2月の患者からウイルスが検出された。ウイルス型はA(H1N1)型のみであった。また、年末の12月には再びインフルエンザの流行が起こり、この時期の患者からはもっぱらインフルエンザA(H3N2)型が検出された。いずれの流行においても、インフルエンザウイルスはインフルエンザ様疾患、急性上気道炎等の患者から検出され、インフルエンザ様疾患患者発生状況とインフルエンザウイルス検出状況とは平行していた (Fig. 1)。

2) 本市におけるヘルパンギーナの流行は、今年は28週(7月)をピークとして5月から9月に起こり、流行の規模は前年を大きく上回った。この時期の本疾患患者からはコクサッキーA6型、コクサッキーA10型、コクサッキーB4型が検出された (Fig. 2)。

3) 本市における今年の無菌性髄膜炎の患者発生数は5月から上昇し、8月にピークとなった。この時期を含めた年間の本疾患患者からの検出ウイルスを見ると、コクサッキーA群、コクサッキーB群、エコー群、アデノ群、サイトメガロ及びインフルエンザBと多様であり、特にアデノ及びエコー各1件は患者髄液から検出された (Fig. 3)。

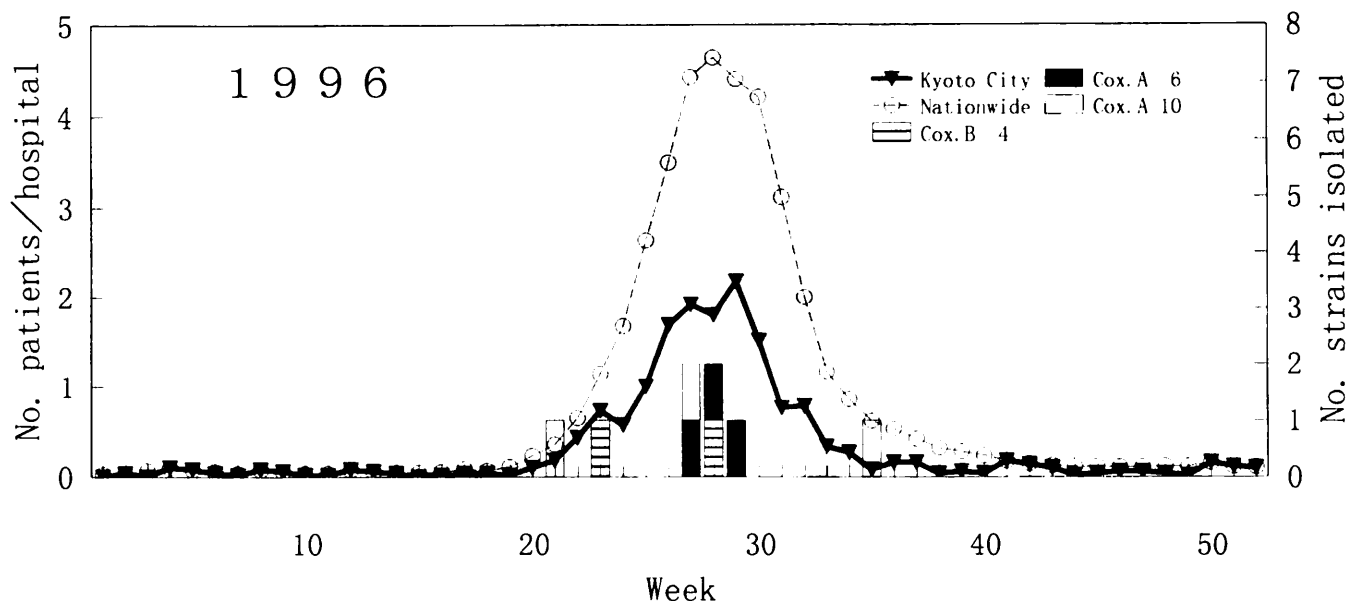


Fig. 2. Seasonal prevalence of patients with herpangina, and monthly isolation of coxsackieviruses.

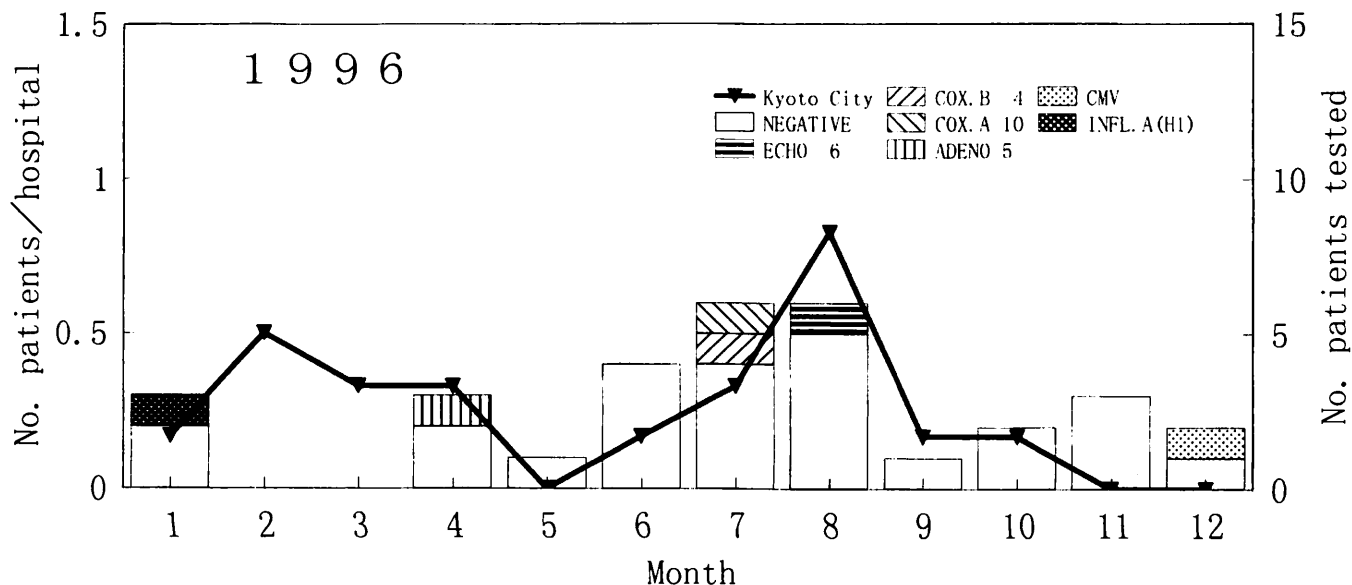


Fig.3. Seasonal prevalence of patients with aseptic meningitis, and monthly isolation of viruses from patients with the disease.

8. 検体別・検出方法別病原ウイルス検出状況

コクサッキーAは、哺乳マウスで全例が検出されたほか、RD-18Sでも約半数が検出された。コクサッキーBはFL、Veroのほか、一部は哺乳マウスでも分離された。エコーはRD-18Sで検出されたほか、一部Veroでも分離された。アデノはFLでの検出例が多かったが、一部WI-38、Veroで分離された。単純ヘルペスはFL、RD-18S、WI-38、Veroのほか、一部は哺乳マウスでも分離された。

インフルエンザA(H1N1)型、A(H3N2)型は、すべてMDCKで分離された。

サイトメガロはPCR法により同定され、培養細胞からは分離されなかった(表4)。

IV 考 察

1. 年頭のインフルエンザは前シーズンの大流行と比較すると小規模で、流行期間も比較的短期間で終息した。これがA(H1N1)型のみにより引き起こされた結果であることはウイルス検査成績から明らかである。また、年末の流行はA(H3N2)型によって引き起こされたと考えられるが、全国的にも同様の傾向で推移した²⁾。今後もこのような主要な型による流行形態をとる可能性はあるが、インフルエンザワクチンが法定接種対象から外れ、ワクチン接種率が低下している現状では、流行型に対する市民の抗体保有率は低いと考えられ、大流行になる恐れもある。また、まったく新しい型のインフルエンザウイルスが近々出現するとも予想されている。したがって、インフルエンザの流行を迅速かつ的確に把握するためのサーベイランス体制は、今後ますます重要になるとと思われる。

2. 本年のヘルパンギーナ患者からはコクサッキーA6型、A10型、B4型の3型が検出された。これらの検出状況と本市におけるヘルパンギーナ患者発生状況とはよく符合しており、本市ではこれら複数のウイルスによる流行があったと思われる。

全国的な本疾患からの病原体検出状況を見てもコクサッキーA10型、A6型、A4型、A2型、コクサッキーB4型の報告例が上位を占め、本市同様、複数のウイルスによる流行であったことがうかがえる³⁾。

3. 本年の本市における無菌性髄膜炎の流行は夏季をピークとして起こったことが患者情報により示されている。本年の本疾病罹患患者からは合計5種のウイルスが検出されたが、そのうち2種2例は髄液から検出され、これらのウイルスがそれぞれ髄膜炎を引き起こしたと考えられる。近年、特定のエンテロウイルスによる全国的な髄膜炎流行の例は少ないものの、数種の異なるウイルスによって起こされる比較的小さい範囲の流行は夏季を中心に、例年のように起こっているとされる⁴⁾。この様な流行の病原体を実験室診断により特定することは今後も重要になるとと思われる。

4. 腸管出血性大腸菌O157の全国的な流行の中で、伝染病事例としては大量の検査を実施したが、サーベイランスとしては下痢症患者は例年と比較して特に多いことはなく、分離菌株の血清型及び毒素産生性の判別のために搬入された菌株から、3株のO157 H7 毒素(+)株を確認したが、便からはEPECを検出したのみである。

病原性大腸菌検査の重要性を考慮するならば、今後、より多くの下痢症患者検体が入手できるよう努めたい。

5. 今年、今年患者あたり病原体検出率は40.0%であり、前年

表4 検出方法別病原ウイルス検出状況

平成8年1月～12月

検出ウイルス	検 体 の 種 類							検出 株数	培 養 細 胞					哺乳		
	糞便	咽頭 ぬぐい液	髄液	尿	膿 分泌物	皮膚病巣	血液		F L	RD-18S	WI-38	Vero	MDCK*	E I A	P C R	
																マウス
コクサッキー A 2 型	—	1	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	—
コクサッキー A 4 型	—	1	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	—
コクサッキー A 5 型	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—
コクサッキー A 6 型	—	3	—	—	—	—	—	3	—	1	—	—	—	3	—	—
コクサッキー A10型	2	4	—	—	—	—	—	6	—	4	—	—	—	6	—	—
コクサッキー B 4 型	1	6	1	—	—	—	—	8	8	—	—	5	—	3	—	—
エコー 6 型	—	—	1	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—
エンテロ 71 型	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—
アデノ 1 型	—	1	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—
アデノ 2 型	—	1	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—
アデノ 5 型	—	1	1	—	—	—	—	2	2	—	—	1	—	—	—	—
アデノ 6 型	1	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	1	—	—	—	—
アデノ型別不明	1	1	—	—	—	—	—	2	2	—	1	—	—	—	—	—
単純ヘルペス 1 型	—	1	—	—	—	1	—	2	2	2	2	1	—	2	—	—
サイトメガロ	—	—	—	4	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	4
ロタ	3	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	3	—
インフルエンザ A (H1N1) 型	—	13	—	—	—	—	—	13	—	—	—	—	13	—	—	—
インフルエンザ A (H3N2) 型	—	8	—	—	—	—	—	8	—	—	—	—	8	—	—	—
R S	—	1	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—
合計	9	43	3	4	0	1	0	60	17	10	4	10	21	17	3	4

*：1月～4月，11月～12月に使用

と同程度であった。培養細胞法などによるウイルス検査体制はほぼ確立されているが、これらの方法では検出感度の低いウイルスや検出困難なウイルスもあり、本年も過半数の患者からは病原体を検出しなかった。本年は検出率を向上させるため、一部の病原体について PCR による遺伝子検出技術を導入して検査を行った。このような手法を含め、今後検出率を向上させるための技術的検討を推進する必要がある。

V ま と め

1. 被検患者220人中88人から、ウイルスではコクサッキーA、コクサッキーB、エコー、エンテロ71、アデノ、インフルエンザ、RS、ロタ、ヘルペス、サイトメガロの計58株（患者あたり検出率28.7%）が検出され、細菌では被検患者135人中33人から、病原性大腸菌、A群及びG群溶血性連鎖球菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌計33株が検出され、患者あたり検出率は24.4%であった。

2. 疾病別病原体検出率は、疾患の種類によりウイルスと細菌では差がみられた。細菌では感染性胃腸炎、乳児嘔吐下痢症の検出率が高く、ウイルスではヘルパンギーナ、リンパ節炎、インフルエンザ様疾患等が50%以上の高率であ

った。

3. ウイルスでは、1月～2月及び、年末の12月にはインフルエンザ様疾患等からインフルエンザウイルスを、また、2月、4月、6月に感染性胃腸炎と乳児嘔吐下痢症患者からロタウイルスを検出した。夏季から秋季にかけコクサッキーA群、コクサッキーB群、エコー群を主としたエンテロウイルスを、ヘルパンギーナ、夏かぜ様疾患、感染性髄膜炎等の患者から検出した。

4. 年齢層別のウイルス検出率は1～4歳、5～9歳、10～14歳、0歳の順で高く、15歳以上は0%であった。検出ウイルスの種類は1～4歳が15種30株で最も多く、次いで5～9歳が9種18株で、比較的低年齢層から多様なウイルスが検出された。

VI 文 献

- 1) 京都市衛生公害研究所微生物部門：同研究所年報、(62)、67-74 (1996)
- 2) 木村三生夫：臨床とウイルス 25(1)、61-75 (1997)
- 3) 国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報、17(9)：1-2(1996)
- 4) 板垣朝夫、他：日本医事新報 (3751)：47-50 (1996)

平成8年日本脳炎流行予測調査及び日本脳炎ウイルス増幅抑制効果調査成績

微生物部門

Epidemiological survey of Japanese encephalitis (JE) with reference to the effect of JE vaccine to swine in Kyoto City in 1996

Abstract: Epidemiological studies on Japanese encephalitis virus in Kyoto City were carried out in 1996. The number of *Culex tritaeniorhynchus*, a vector mosquito of JE virus, captured with light traps in a pig shed was 134 per trap at most in the summer season. JE virus could not be isolated from the mosquitoes. The swine reared in the pig shed were confirmed to have acquired HI antibody with vaccination conducted prior to the epidemic season. HI antibody titers in most of the swine did not rise significantly after the summer season, not indicating the traces of natural infection of JE virus in the city. A survey on HI antibody against JE virus in 315 adult inhabitants showed that the positive rate of HI antibody was 64.4%.

Key Words: 日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus, コガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus*, 日本脳炎ワクチン Japanese encephalitis vaccine, HI 抗体 HI antibody

I はじめに

全国の日本脳炎に関する調査成績をみると、ここ数年の日本脳炎ウイルス汚染は西日本偏在型から再び東日本へも拡大し、広範囲の地域で認められるようになってきている。更に、近畿は九州と共に汚染開始が最も早いことから、依然として警戒が必要である。

京都市は日本脳炎予防対策の一環として、市内で飼育されている全豚に対するワクチン接種を実施している。そこで、ワクチン接種による日本脳炎ウイルスの増幅抑制効果を検討するとともに、蚊とウイルスの動向を的確に把握して流行形態の変化を速やかに察知することを目的に、以下の調査を実施した。

1. 蚊の季節消長調査
2. ウイルス侵襲状況調査
3. 豚に対するワクチン接種によるウイルス増幅抑制効果の調査
4. 市民の抗体保有状況調査

II 調査方法

1. 野外調査

1) 調査地

昭和40年以来、市南部鴨川下流域の養豚場の多い地域で各種野外調査を継続実施しており、平成8年についてもここを調査地に選定した。調査地の概要は前報¹⁾のとおりである。

2) 蚊の消長調査

媒介蚊であるコガタアカイエカの季節消長を6月10日から9月9日まで、前報¹⁾の方法により調査した。

3) 豚舎内採集吸血蚊のウイルス感染率調査

豚集団のウイルス感染状況及び感染豚から吸血した蚊の感染状況を把握するため、6月10日から9月9日まで、前報¹⁾の方法により、吸血コガタアカイエカを採集、飼育し、ウイルス分離を行い、野外蚊のウイルス感染率を推定した。

4) 飼育豚の抗体調査

本年も7月上旬に調査地域の飼育豚に日本脳炎ワクチン(m株)が接種されたので、ワクチン接種による豚集団の免疫獲得状況と、その後の自然感染の推移をみるため、MY豚舎の飼育豚について抗体検査を行った。なお、MY豚舎は前年までの調査豚舎の西方約300mにある。この豚舎では、ワクチン接種を7月1日に、追加接種を7月26日に実施している。そこで、接種前の6月25日から接種後約3か月の10月8日まで、前報¹⁾の方法により採血し、抗体価を測定した。

2. 市民の抗体調査

本市市民の日本脳炎に対する抗体保有状況を把握する目的で、成人及び高齢者の2年齢層を対象に、HI抗体価の測定を行った。成人は保健所の母親教室参加者217名であり、高齢者は老人施設の入所者98名である。

抗体価測定方法は前報¹⁾のとおりである。

Ⅲ 調査成績及び考察

1. 蚊の季節消長

豚舎内ライト・トラップ採集蚊の6月中旬から9月中旬までの季節消長をみると、いずれの種類も調査期間を通じて採集蚊数が少ない傾向がみられた。

コガタアカイエカは7月下旬と8月下旬に低いピークがみられるものの、最高でも7月下旬のトラップあたり134個体であり、シーズンを通じて低密度のまま推移した。総採集数は、最近5年間で見ると、平成6年をやや上回り最も多かった。

アカイエカとシナハマダラカも、調査期間を通じて極めて採集数が少なく、いずれも目立ったピークを形成しないまま終息した (Fig.1)。

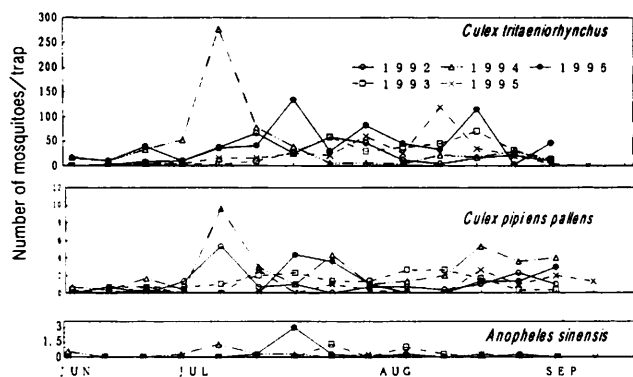


Fig.1 Number of mosquitoes collected with light traps in a pig shed situated in the suburbs of Kyoto City in 1996

本年の蚊の発生に影響を及ぼしたと思われる要因のうち、気温と降水量の季節変動を Fig.2に示した。気温についてみると、本年夏季は6月中・下旬及び、7月中旬から8月中旬まで高温傾向であったが、8月下旬以降は平年より低くなった。一方、降水量は、7月中旬から8月中旬まで少なく、乾燥傾向で推移しているのが目立っている。したがって、蚊の増殖期である7月から8月にかけて高温は続いたものの、降水不足で推移したことが、蚊の発生にマイナス要因として働いたと思われる。

蚊の発生数は、気象要因のほかに多様な人為的環境要因によっても影響を受けることが知られている²⁾。本市農林統計資料によれば、伏見区及び南区の水稻作付面積は過去数年間にさほど減少していないが、野外調査地から鴨川を隔てた南側の水田は地下鉄施設の完成に伴い大幅に減少しており、更に、鴨川河川敷の整備により、蚊成虫の休止場所となる雑草地も減少している。

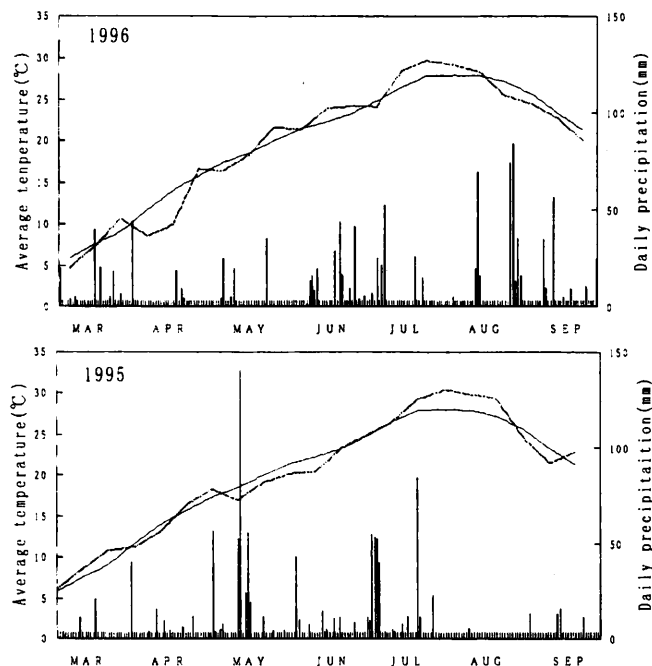


Fig.2 Seasonal changes of temperatures and precipitation in Kyoto City in 1995 and 1996

Bold and thin lines indicate the average temperatures of every 10 days in each year and those in the normal year, respectively. Vertical bars show the daily precipitation. Meteorological data were supplied by the Kyoto Local Meteorological Observatory.

したがって、主としてこれら人為的变化に伴う蚊発生環境の減少と気象要因とが複合して作用した結果、蚊の発生は盛夏に至っても増加せず、低調のまま推移したものと思われる。

2. 豚舎内採集吸血蚊のウイルス感染率

6月10日から9月9日の毎週1回、計14回に採集した吸血蚊457個体、62プールについて、ウイルス分離を試みた結果、全期間を通じて日本脳炎ウイルスを検出しなかった (表1)。

豚舎内採集吸血蚊から日本脳炎ウイルスを全く検出しなかった年は平成5年以来4年連続となった。これには、調査期間を通じて蚊の密度が低かったことのほか、豚へのワクチン接種も奏功したものと思われる。

表1 豚舎内採集吸血コガタアカイエカからの
日本脳炎ウイルス分離状況

平成8年度

採集月日	供試蚊数	プール サイズ	供試 プール数	陽性 プール数	ウイルス 感染率(%)
6月10日	14	5	2	-	-
		4	1	-	-
6月17日	12	5	2	-	-
		2	1	-	-
6月24日	108	10	10	-	-
		8	1	-	-
7月1日	9	5	1	-	-
		4	1	-	-
7月8日	81	10	7	-	-
		11	1	-	-
7月15日	7	4	1	-	-
		3	1	-	-
7月22日	16	5	2	-	-
		6	1	-	-
7月29日	11	5	1	-	-
		6	1	-	-
8月5日	39	5	7	-	-
		4	1	-	-
8月12日	67	10	6	-	-
		7	1	-	-
8月19日	5	5	1	-	-
8月26日	64	10	6	-	-
		4	1	-	-
9月2日	3	3	1	-	-
9月9日	21	5	3	-	-
		6	1	-	-
計	457	-	62	-	-

3. 飼育豚の抗体

MY豚舎飼育豚のワクチン接種による免疫抗体獲得とその後の自然感染状況をみると、ワクチン接種前は検査に供した20頭のうちほとんどの豚が抗体陰性であった。接種後約1か月で多くの豚が10～80倍の抗体を保有しており、ワクチン抗体が獲得されていた。しかしながら、これ以降9月及び10月に至っても多数の豚はワクチン抗体のレベルのままであり、自然感染によると思われる抗体上昇は認められなかった。京都府内は9月中旬に日本脳炎汚染地域となっているものの、京都市においては豚に自然感染を起こさせるに十分なウイルス感染蚊の発生がなかったものと思われる(表2)。

表2 飼育豚の日本脳炎HI抗体価推移

平成8年度

採血 月日	ワクチン 接種前後 の日数	検体 数	抗 体 価							
			<10	10	20	40	80	160	320	640≤
6月25日	6日前	20	18	2	-	-	-	-	-	-
7月16日	15日後	22	12	1	3	4	2	-	-	-
8月6日	36日後	20	5	3	5	7	-	-	-	-
8月27日	57日後	20	1	5	7	6	1	-	-	-
9月17日	78日後	20	2	7	8	2	1	-	-	-
10月8日	99日後	20	5	-	11	3	1	-	-	-

表3 成人と高齢者の日本脳炎HI抗体価分布

平成8年度

対 象	施設名	計	抗 体 価							
			<10	10	20	40	80	160	320	640
成 人		217	76	32	63	26	11	6	3	-
		100.0	35.0	14.7	29.0	12.0	5.1	2.8	1.4	0.0
高 齢 者	T	47	18	3	12	2	10	2	-	-
	%	100.0	38.3	6.4	25.5	4.3	21.3	4.3	0.0	0.0
	A	51	18	10	14	6	2	1	-	-
	%	100.0	35.3	19.6	27.5	11.8	3.9	2.0	0.0	0.0
計			36	13	26	8	12	3	-	-
%			36.7	13.3	26.5	8.2	12.2	3.1	0.0	0.0

注) 上段は人数を、下段は割合(%)を示す

4. 市民の抗体保有状況

成人及び高齢者の抗体保有状況をみると、成人は65.0%、高齢者は63.3%であり、成人、高齢者ともに比較的良好な抗体保有状況であると言える（表3）。

過去の調査では高齢者が成人よりも高い抗体保有率を示していたが、前年の調査結果は、両者間に抗体保有率には差がないものの、保有抗体価は高齢者が高い値に分布する傾向を示した³⁾。しかし、今年の成績は両者の間に抗体保有率並びに抗体価分布にも差がないという結果であった。また、施設間の抗体保有率にも差がみられなかった。

Ⅳ まとめ

1. 京都市における平成8年度の日本脳炎調査成績を要約すると以下のとおりである。

1) MY豚舎においてライト・トラップ採集により調査したコガタアカイエカの季節消長は、総採集数はここ5年間で最も多かったものの、全般に低レベルで推移した。

2) MY豚舎内でライト・トラップにより採集した吸血蚊からは、全期間を通じて日本脳炎ウイルスが検出されなかった。

3) MY豚舎飼育豚のHI抗体調査の結果、ワクチン接種により豚は抗体を獲得したことが認められた。その後自然感染による抗体上昇はみられず、大多数においてはワクチン抗体のレベルで推移した。

4) 以上の調査結果からみて、平成8年度の本市における日本脳炎ウイルス汚染は極めて小規模であったと思われる。これは、夏季に野外のコガタアカイエカの密度が増加せず、その結果、豚の自然感染もほとんど起こらなかったためと思われる。

2. 市民の日本脳炎ウイルスHI抗体保有率をみると、成人は65.0%、高齢者は63.3%、平均すれば64.4%と良好であり、前年の成績と同様なレベルにあった。

V 文 献

- 1) 京都市衛生公害研究所 微生物部門：同研究所年報，No.60, 75-78 (1994)
- 2) Reisen, W., et al. : Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 7, 61-71 (1976)
- 3) 京都市衛生公害研究所 微生物部門：同研究所年報，No.60, 75-78 (1996)

ウイルス遺伝子検出例からみた乳幼児のサイトメガロウイルス感染状況

微生物部門

Human cytomegalovirus DNA detection by PCR from urine of infant and child patients
in the Infectious Disease Surveillance in Kyoto City

Abstract: Human cytomegalovirus (CMV)-DNA detection by polymerase chain reaction (PCR) was carried out on 114 urine samples of infant and child patients during 1992-1996 in the Infectious Disease Surveillance in Kyoto City. A rapid and sensitive PCR system was designed with the pretreatment using polyethylene glycol 6000. It was confirmed that inhibitors in urine against PCR could well be removed by the system. Sensitivity of CMV-DNA detection was measured to be 10^6 TCID₅₀/0.1ml. Of 114 patients, 16 (14.0%) were positive for CMV-DNA. Positive patients ranged from 0- to 8-years-old, but relatively higher positive rates were observed in the patients of 1- to 2-years-old. Various clinical symptoms were reported in the positive cases: hepatitis and pneumonia were conspicuous among them, indicating that some cases actually had CMV-associated disease.

Key Words: ヒトサイトメガロウイルス human cytomegalovirus, PCR polymerase chain reaction, サイトメガロウイルス感染症 CMV-associated disease, 肺炎 pneumonia, 肝炎 hepatitis

I はじめに

感染症サーベイランス事業では様々な乳幼児疾患について病原体検査を行う場合が多いが、その中にヒトサイトメガロウイルス(CMV)感染症が疑われる場合も含まれている。新生児、免疫不全患者等のCMV感染症は劇症化する場合もあるが、有効な化学療法があるため、迅速な実験室診断が治療に役立つ場合もある。

CMVは尿中にも排出されることが知られている。そこで我々は、PCRによるCMV遺伝子DNA検出システムを作成したうえ、検体採取の容易な尿を材料としてCMV-DNA検索を行い、乳幼児におけるCMV感染症の把握を試みた。

II 材料と方法

1. 材料

1992年～1996年に京都市感染症サーベイランス事業で採取された0～16歳の尿検体114件を用いた (Table 1)。

Table 1で明らかなように、0～4歳が約70%、5～9歳が約20%であり、10歳未満が約90%を占めていた。また、これらの年齢層では、被検者に男女差はみられなかった。

2. 方法

1) 検体の前処理

尿中にはPCR阻害物質が含まれている場合があり、結

Table 1 Age composition of the patients for detecting CMV-DNA in urine

年齢階級 (歳)	被検患者数		
	男	女	計 (%)
0-4	40	39	79 (69.3)
0	25	19	44 (38.6)
1	6	8	14 (12.3)
2	2	4	6 (5.3)
3	5	3	8 (7.0)
4	2	5	7 (6.1)
5-9	11	12	23 (20.2)
10-14	6	2	8 (7.0)
15-19	4	0	4 (3.5)
計	61	53	114 (100.0)

果的に偽の陰性が生じる可能性がある。我々は阻害物質を除去するための前処理法として、Yamaguchi et al.¹⁾のポリエチレングリコール (PEG) 処理法を改良して前処理を実施し、テンプレートを作製した。即ち、本法では使用検体量を原法の4倍の200 μ lとし、PEG6000による核酸沈澱時間を原法の半分の3時間とした (Fig.1)。

尿中のPCR阻害作用をチェックするため、CMV添加

系列 (10^2 TCID₅₀/0.1mlのウイルス液を尿検体に10 μ l 添加したもの)を同一検体について作製し、ウイルス無添加系列と同時に前処理を行ってテンプレートを作製した。

なお、 10^1 TCID₅₀/0.1mlのウイルス液及びCMV非感染WI-38細胞を同様に前処理したものを、それぞれ陽性及び陰性コントロールのテンプレートとした。

- 尿検体
- 凍結・融解
 - 3,000rpm, 10分遠心
 - 上清200 μ lをマイクロチューブに分取
 - 94℃, 10分加熱
 - 20%ポリエチレングリコール6000を200 μ l添加
 - 2M NaClを100 μ l添加
 - ボルテックスミキサーで混和
 - 4℃, 3時間インキュベーション
 - 15,000rpm, 30分遠心
 - 上清をできるだけ除去
 - 6,400rpm, 3分遠心
 - 上清をできるだけ除去
 - 蒸留水50 μ lを加え、混和
- PCR テンプレートとして使用

Fig.1 Pretreatment for extracting CMV-DNA from urine samples

2) PCR

CMV-PCR用プライマーは、母坪ら²⁾が設計したCMV遺伝子DNA検出用プライマー対(TaKaRa)を用いた。このプライマーはセンス、アンチセンスそれぞれ20マで、235kbpのCMVゲノムのUs配列内にあるHind IIIのV領域に設定されている。このプライマー対を用いたPCRにより、305bpの特異性の高いDNAフラグメントが増幅される。

作製したテンプレートと、プライマー及びPCR試薬キット(TaKaRa)を用いて反応溶液を調製し、サーマルサイクラー(理工化学)によりPCRを実施した。PCRは94℃12分のincubationを1サイクル行っただけ、94℃2.5分のdenaturation, 55℃3分のannealing, 72℃3分のextensionを40サイクル実施し、最後に72℃7分のfinal extension 1サイクルを行った。

得られたPCR産物の10 μ lを3%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線下で305bpの特異バンドの出現を観察することによりCMV遺伝子DNAを確認した。

3) PCR検出限界の検討

このPCRシステムによるCMV-DNAの検出限界をみるため、標準株AD-169株で $10^2 \sim 10^{-3}$ TCID₅₀/0.1mlの6段階のウイルス液を調製し、PCRを実施した。

Ⅲ 成績

1. PCR検出感度

$10^2 \sim 10^{-3}$ TCID₅₀/0.1mlの6段階のウイルス濃度でPCRを行った結果をFig.2に示す。Fig.2のレーン1はDNAサイズマーカー(ϕ X174 Hae III digest), レーン2~7は各濃度のウイルス, レーン8は陰性コントロールである。その結果, $10^2 \sim 10^0$ TCID₅₀/0.1mlのウイルス濃度でのみDNAバンドが検出された。したがって, このシステムでのCMV-DNA検出限界は 10^0 TCID₅₀/0.1mlとなる。

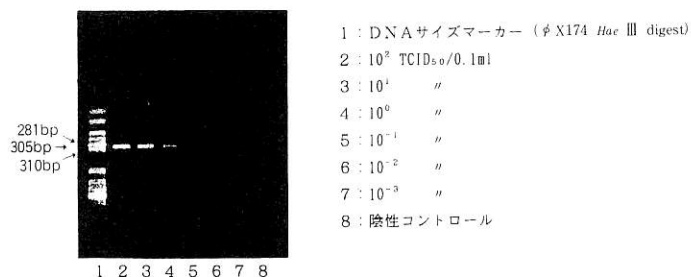


Fig.2 Sensitivity of the CMV-DNA PCR

2. PCR阻害物質の除去効果

PCRによる患者検体のCMV-DNA陽性例及び陰性例をFig.3に示す。Fig.3のレーン3, 4及び5, 6はそれぞれ同一検体で、偶数レーンはCMV添加系列である。CMV添加系列のPCRでDNAバンドが検出されなかった場合、尿のPCR阻害物質が除去されなかったと判断され、判定保留となるが、Fig.3の2検体でPCR阻害作用はみられず、

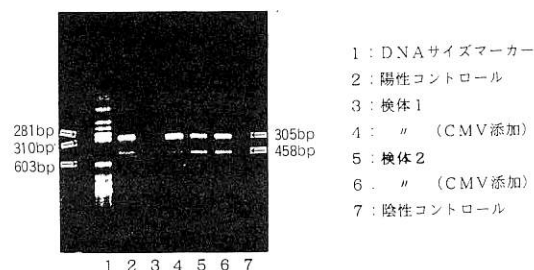


Fig.3 CMV-DNA positive and negative patterns by PCR

検体1は陰性、検体2は陽性と明瞭に判定された。全検体についてこの検討を行った結果、判定保留となった例はみられなかった。したがって、PEGによるPCR阻害物質の除去は良好であることが認められた。

なお、Fig.3の泳動パターンにみられるように、目的とする305bpのバンド以外に458bpのバンドが形成される場合がみられた。

3. 各年齢層におけるCMV-DNA検出状況

被検者114件中16件(14.0%)がCMV-DNA陽性であった(Table 2)。内訳は、0歳が44名中5名(11.4%)、1歳が14名中7名(50.0%)、2歳が6名中3名(50.0%)、5歳以上が23名中1名(4.4%)陽性であった。

Table 2 CMV-DNA positive patients in each age class

年齢階級	検出患者/被検患者 (%)
0-4	15/79 (19.0)
0	5/44 (11.4)
1	7/14 (50.0)
2	3/6 (50.0)
5-9	1/23 (4.4)
>10	0/12 (0.0)
計	16/114 (14.0)

Table 3 Diagnoses or symptoms in the CMV-DNA positive patients

臨床診断名あるいは臨床症状	年齢(歳)				
	0	1	2	8	計
肝炎(CMV肝炎含む)	1	3			4
肺炎(異型肺炎, 巨細胞肺炎含む)		1	2		3
クルーズ	1				1
ライ症候群	1				1
感染性髄膜炎		1			1
夏かせ様疾患	1				1
上気道炎			1		1
不明熱	1				1
膀胱炎			1		1
リンパ節腫脹		1			1
痙攣		1			1
計	5	7	3	1	16

4. CMV-DNA陽性患者とその疾患

陽性者の臨床診断名あるいは臨床症状は11種類に及んでいた(Table 3)。これらのうち、肝炎、肺炎の頻度がそれぞれ4例及び3例と高く、その中にはCMV肝炎患者2名とCMV-IgM抗体陽性の肺炎患者1名が含まれていた。他の疾患については各1名であった。

IV 考察

1. PCRテンプレートを作製するための前処理法として、オーソドックスなフェノール-クロロホルム法を始め多種類が考案されているが^{3,4)}、迅速検査を目ざす場合は操作が簡便で短時間で実施できる前処理法の採用が要請される。ただし、尿検体のようにPCR阻害物質のある場合は、これを除去できる方法でなければならない。今回、全検体でPCR阻害物質の除去に成功し、判定保留例がみられなかったことから、PEGによる前処理はこの目的に十分応える方法と思われる。

2. PCRによる増幅DNAパターンに、目的の305bpのバンドの他、458bpのバンドが検出される場合がみられた。これはゲノムの153bp上流にプライマーと80%のホモロジーを持つ配列があるためのミスプライミング産物とされる。しかしながら、このバンドの特異性も高く、判定上まったく問題のないことが示されている²⁾。

3. CMV-DNA陽性率は1,2歳で50%と高率であった。この数値は、これら年齢層の、多くは初感染と思われる感染発症例を選択的に検出した結果ではないかと思われるが、被検者数が少数であったため、更に例数を増やした上で各年齢層における陽性率を検討する必要がある。

4. CMVは健常者の尿からも検出されることがあり²⁾、また、CMV保有率は小児でも60%台⁵⁾と言われていることから、今回検出されたCMVがすべて当該疾患を引き起こしたとは考えられない。しかしながら肝炎と肺炎が他に比べて目立っており、これとPCRの結果を併せると、CMV感染症診断基準⁶⁾に拠ってこれらはCMV感染症と判定される。更に、この中に含まれているCMV肝炎患者やCMV-IgM抗体陽性患者がPCR診断によってもCMV-DNA陽性と判定されたことから、尿を検体としたPCRでCMV-DNAを捕捉することによって、乳幼児のCMV感染症を確実に実験室診断できたと考えられる。

今後は、このシステムで更に例数を増やすことにより、各年齢層におけるCMV感染症の実態を捉える必要がある。

V まとめ

1. 1992～1996年に京都市感染症サーベイランスで採取された乳幼児の尿検体114件を用いて、PCRによりヒトサイトメガロウイルス(CMV)-DNA 検出を行った。
2. 前処理にはポリエチレングリコール(PEG)6000を用い、同一患者検体について CMV 添加系列をも同時に処理することにより、尿中の PCR 阻害物質の除去効果を評価した。その結果、PEG 処理により PCR 阻害物質が良好に除去されることが認められた。
3. PCR による CMV-DNA の検出限界は 10^0 TCID₅₀/0.1mlであった。
4. 被検者114名中16名(14.0%)がCMV-DNA 陽性であった。内訳は、0歳が5名、1歳が7名、2歳が3名、8歳が1名であり、1,2歳の陽性率が高かった。陽性者の疾患は11疾患に及んでいたが、肝炎(CMV 肝炎を含む)、肺炎が目立ち、明らかな CMV 感染症例も認められた。

VI 文献

- 1) Yamaguchi, Y., et al. : J. Virol. Methods 37, 209-218 (1992)
- 2) 母坪智行, 他: 蛋白質・核酸・酵素 35(17), 98-104 (1990)
- 3) 武元良整, 他: 移植 27(6), 745-751 (1992)
- 4) Demmler, G. J., et al. : J. Infect. Dis. 158(6), 1177-1184 (1988)
- 5) 千葉峻三: 臨床と微生物 18(2): 37-41 (1991)
- 6) 南嶋洋一: 今日の移植 6(5): 495-499 (1993)

牛の血液生化学検査における基礎調査

病理部門

The fundamental investigation of blood biochemical examination in cattle

Abstract: We investigated blood biochemistry in healthy cattle which were slaughtered in the Kyoto City Slaughter House to determine normal ranges with use of the drychemistry system "SPOTCHEM SP4110". In this study, data provide a correlation between blood letting before and after stunning in terms of 16 items examined. Data also provide a correlation between blood letting after stunning and remaining blood in the carcass except for some items examined. The remaining blood should not be used because of hemolysis as time passes after stunning.

Key Words: 牛 cattle, 血液生化学検査 blood biochemical examination, 基準範囲 normal range, 放血 blood letting after stunning, 枝肉残血 remaining blood, 溶血 hemolysis

I. はじめに

食肉衛生検査において、血液生化学的検査は疾病診断や病性判定に重要な役割をはたしている。当所には数年前、ドライケミストリーによる簡易検査装置が導入され、検査を実施しているが、当所の健康牛の血液生化学的検査値は牛のおかれている環境や検査方法等の違いにより成書に記載されている正常値とは少し異なるように思われたので、当所における健康牛の基準値の設定を試みた。また、血液検査をするための基礎調査として、血液の採取方法（採血、放血、枝肉残血）の違いによる性状への影響及び溶血による性状への影響をあわせて調べたので報告する。

II. 材料及び方法

1. 健康牛の基準範囲の設定

と畜検査において異常を認めなかった牛の放血を採取し、溶血を認めなかった血清を検体とした。それをドライケミストリーの検査装置スポットケム SP-4110 により総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), 尿素窒素 (BUN), 尿酸 (UA), クレアチニン (CRE), 中性脂肪 (TG), 総コレステロール (T-Chol), 総ビリルビン (T-Bil), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT), アルカリ性フォスファターゼ (ALP), 乳酸脱水素酵素 (LDH), クレアチンホスフォキナーゼ (CPK), カルシウム (Ca), グルコース (Glu), γ-グルタミルトランスベータチダーゼ (GGT), アミラーゼ (AMY) の17項目について測定した。

各項目の測定値が正規分布または対数正規分布している

かを正規確率紙により確認した。測定結果より平均値 (MEAN), 標準偏差 (SD), $MEAN \pm 3SD$ を算出し, $MEAN \pm 3SD$ からはずれるデータがなくなるまでデータの削除を繰り返し母集団とした。母集団から $MEAN \pm 1.96SD$ (95%) 範囲を求め、当所の健康牛の基準範囲とした。

2. 検査材料の検討

当所では、病畜として搬入された牛はすべて採血又は放血を採取し、検体としている。また、正常畜として一般と室で解体時に異常を発見した場合、解体後、冷蔵庫において枝肉残血を採取している。

そこで、採血と放血及び放血と枝肉残血で血液生化学的性状に差異はないか検討した。

採血と放血の比較は、同じ病畜の採血と放血を採取し、両者とも溶血していないものを対象とし前記17項目について検査した。次に、放血と枝肉残血の比較は、正常と室で解体した牛の放血時の血液と解体後、約3時間経過した冷蔵庫に保管されている枝肉からの残血を採取し、両者とも溶血していないものを検体として検査した。その結果をもとに採血と放血、放血と枝肉残血の相関関係及び平均値の差の検定を行い比較検討した。

3. 溶血の影響

試料に供した血液の一部を超音波発生機により強制的に溶血させ、ヘモグロビン量が5.1g/dl程度になるよう調整し、この溶血血清を同じ血液の溶血していない血清に段階的に混和し、測定値の変化を17項目について調べた。なお検査は5検体について行った。その結果をもとに、非溶血血清に対する乖離度を次式より求め、各検査項目の溶血による

影響を調べた。

$$\text{乖離度 (\%)} = \frac{\text{溶血血清の測定値}}{\text{非溶血血清の測定値}} \times 100 - 100$$

Ⅲ. 結果及び考察

1. 健康牛の基準範囲の設定

スポットケムによる当所の健康牛の基準範囲を Table 1 に示した。GOT, CPK, ALP 及び GGT は対数正規分布を示したので上限の設定のみとなった。UA, TG は機械の測定下限域値が各々50件中43件 (1 mg/dl未満), 50件中45件 (25mg/dl未満) と多かったので基準範囲は設定できなかった。GPT は2峰性の度数分布を示したため, 基準範囲の設定はしなかった。GPT, UA 及び TG は件数を増して検討する必要がある。

文献値と比較すると TP, Alb, BUN, CRE, LDH, Glu, GGT など基準範囲に乖離が認められるが, これは, 採血した牛のおかれている環境, 測定方法, 並びに件数の違いなどによるものと思われる。より正確な基準範囲を定めるには件数を増やす必要があると思われるが, 当所の測定機器を用いた健康牛の基準範囲は Table 1 を採用して問題ないと考える。

2. 検査材料の検討

(1) 採血方法による溶血血清の出現頻度

採血, 放血及び枝肉残血の溶血血清の出現頻度は Table 2 に示した。溶血度を-, +, 2+, 3+の4段階にわけ, 全く溶血のなかったものを-, 弱い溶血を認めたものを+, 中程度の溶血を認めたものを2+, 強い溶血を認めたものを3+とした。溶血血清の出現頻度は, 採血で2.7%, 放血で16.1%, 枝肉残血で88.5%となった。この結果より枝肉残血から溶血のない血清を採取することはかなり困難であると考え。溶血のない血清を得るには, と殺後の経過時間ができるだけ短い血液を利用することが有効である。

(2) 採血と放血の相関

採血及び放血の両者とも溶血していなかった検体30件について, 各項目の検査値をもとに相関グラフを Fig. 1, 2 に示した。両者間の平均値の差の検定, 相関係数, 回帰式及び寄与率を求めたものを Table 3 に示した。なお, n が30未満の項目は測定下限域値の検体を削除したためである。TG については測定下限域値 (25mg/dl未満) の検体が多かったため検討ができなかった。

放血は全ての項目において採血との間に強い相関関係が認められ, 寄与率も高かった。採血と放血の平均値がほぼ等しかったのは TP, Alb, BUN, T-Cho, T-Bil, GOT,

Table 1 The normal range of healthy cattle
(A blank space is no record)

Item	Unit	n	Normal range	Literature ¹⁾
TP	g/dl	47	7.2~9.4	6.7~7.5
Alb	g/dl	49	4.1~5.2	3.0~3.6
A/G比		48	0.83~1.71	0.84~0.94
BUN	mg/dl	48	13~22	20~30
CRE	mg/dl	47	1.5~2.4	0.8~1.8
T-Cho	mg/dl	48	68~189	80~120
T-Bil	mg/dl	47	0.2~0.5	0.01~0.5
GOT	IU/l	47	<102	78~132
LDH	IU/l	48	1,589~3,182	692~1,445
ALP	IU/l	50	<121	25~93
CPK	IU/l	47	<769	
Ca	mg/dl	47	9.3~11.7	9.7~12.4
Glu	mg/dl	49	63~136	45~75
GGT	IU/l	46	<83	6.1~17.4
AMY	IU/l	48	239~638	

Table 2 Appearance rate of hemolysis on blood letting
before stunning, after stunning and remaining blood

Hemolysis	Before stunning(n)	After stunning(n)	Remaining blood(n)
-	36	146	20
+	1	28	57
2+	0	0	60
3+	0	0	37
Appearance rate	2.7%	16.1%	88.5%

GPT, LDH, Ca, UA の10項目であった。これらは放血と採血で検査値に差はないと考えてよい。採血と放血の平均値に差を認めたのは CRE, ALP, CPK, Glu, GGT, AMY の6項目であった。これらは回帰式により放血時の値を採血時の値に変換することが可能である。以上の結果より放血は採血と同様, 有効な検査材料と考えられる。

(3) 放血と枝肉残血の相関

放血及び枝肉残血の両者が溶血していなかった検体20件について, 各項目の検査値をもとに相関グラフを Fig. 3, 4 に示した。両者間の平均値の差の検定, 相関係数, 回帰式及び寄与率を求めたものを Table 4 に示した。なお, n が20未満の項目は両者とも測定下限域値の検体やはずれ値 (標準偏差が±2.5を越え寄与率に影響を与えていた値) を削除したためである。TG については, 放血で測定下限域値 (25mg/dl未満) が19件あり, また枝肉残血では32~240mg/dlとバラツキが大きいので両者間には相関が認められなかった。また, UA についても相関は認められなかった。放血と枝肉残血の平均値がほぼ等しく強い相関を認

Table 3 Correlation between blood letting before stunning and after

Item	n	T-test	Correlation coefficient	Regression line (Y:before stunning,X:after stunning)	Proportion
TP	30		0.97	$Y=1.08X-0.53$	0.94
Alb	30		0.98	$Y=1.02X-0.08$	0.97
BUN	30		0.99	$Y=1.02X-0.84$	0.99
CRE	30	*	1.0	$Y=0.90X+0.12$	0.99
T-Chol	23		0.99	$Y=0.99X+1.50$	0.98
T-Bil	30		0.99	$Y=0.96X+0.05$	0.97
GOT	30		1.0	$Y=1.02X-0.04(\text{Log})$	0.99
GPT	30		0.99	$Y=1.01X-0.01(\text{Log})$	0.98
LDH	30		0.99	$Y=1.00X+52.0$	0.97
ALP	27	*	0.98	$Y=0.95X+0.12(\text{Log})$	0.96
CPK	30	**	0.99	$Y=1.05X-0.22(\text{Log})$	0.99
Ca	29		0.93	$Y=0.91X+0.83$	0.87
Glu	30	**	0.98	$Y=0.81X+10.8$	0.95
GGT	30	**	0.99	$Y=0.95X+0.10(\text{Log})$	0.99
AMY	30	*	0.97	$Y=0.86X+29.7$	0.95
UA	30		0.99	$Y=0.72X+0.37$	0.98

Table 4 Correlation between blood letting after stunning and remaining blood

Item	n	T-test	Correlation coefficient	Regression line (Y:after stunning,X:remaining blood)	Proportion
TP	20	**	0.87	$Y=0.98X+2.91$	0.77
Alb	19	**	0.96	$Y=1.24X+0.53$	0.92
BUN	19	**	0.96	$Y=0.68X+2.10$	0.93
CRE	20		0.90	$Y=1.27X-0.45$	0.80
T-Chol	19	**	0.98	$Y=1.40X-0.47$	0.96
T-Bil	20	**	0.81	$Y=1.70X-0.08$	0.66
GOT	19	**	0.92	$Y=0.82X+0.45(\text{Log})$	0.85
GPT	17	**	0.83	$Y=0.92X+0.22(\text{Log})$	0.69
LDH	20		0.56	$Y=0.43X+1.531$	0.31
ALP	17	**	0.96	$Y=1.02X+0.09(\text{Log})$	0.92
CPK	20	**	0.45	$Y=0.34X+1.60(\text{Log})$	0.2
Ca	19		0.91	$Y=0.87X+1.49$	0.82
Glu	19	**	0.68	$Y=0.84X+60.9$	0.46
GGT	19	**	0.97	$Y=0.94X+0.28(\text{Log})$	0.94
AMY	19	**	0.96	$Y=2.35X-14.2$	0.92

めたものはCRE, Caであった。LDHは、放血と枝肉残血の平均値がほぼ等しく、弱い相関を認めた。しかし、枝肉残血で高値を示した2件を除くと、平均値は等しくなくなるが、相関係数は0.94($P<0.01$)、寄与率0.88と強い相関を認めるようになった。今回の結果は高値を示した原因が不明のため、強い相関を認めたとは言えない。放血と枝肉残血の平均値に差を認め、強い相関を認めたのはTP, Alb, BUN, T-Chol, GOT, ALP, GGT, AMYであった。また、弱い相関を認めたのはT-Bil, GPT, CPK, Gluであった。

以上の結果より、枝肉残血はCRE, Ca, TP, Alb, BUN, T-Chol, GOT, ALP, GGT, AMYの10項目において有効な検査材料と考えられる。

3) 溶血の影響

各検査項目の溶血度と乖離度の関係をFig. 5, 6に示した。乖離度-6~6%を溶血の影響がなかったものとした。

肉眼的な溶血度は、肉眼的に溶血が認められなかったものを(-)とし、少し橙色を呈しているものを(±), 軽度の溶血が認められたものを(+), 中程度の溶血を(2+), 強度の溶血を(3+)とした。肉眼的溶血の程度により分類した溶血の影響及び乖離度をTable 5に示した。

強度の溶血でも溶血の影響が認められなかったのはAlb及びT-Cholであった。強度の溶血で溶血の影響が認められたのはBUNであった。中程度の溶血ではCPK, Glu, CRE, 軽度の溶血ではLDH, 微弱な溶血ではTP, Ca, GGT,

AMY の高濃度のものであった。また、溶血の影響の大きいものとして、肉眼的に溶血を認めないにもかかわらず溶血の影響を認めたのは T-Bil, GOT, GPT, ALP, AMY の低濃度のものであった。その中で正誤差を示したのは、T-Bil, ALP, AMY の低濃度のもの、負誤差を示したのは、GOT, GPT であった。UA は溶血により値が上昇傾向を示すことは確かであるが、非溶血血清や弱い溶血の血清で測定下限域値 ($< 1 \text{ mg/dl}$) を示したので乖離度は不正確である。AMY は、非溶血血清が低濃度 ($< 300 \text{ IU/l}$) を

示した場合と高濃度 ($\geq 300 \text{ IU/l}$) を示した場合で溶血の影響が異なる傾向を示した。TG は全ての溶血血清で測定下限域値 ($< 25 \text{ mg/dl}$) を示したので検討不能であった。

以上の結果より、Alb, T-Cho, BUN, CPK, Glu, CRE 等は溶血の影響をあまり受けないので溶血した血清でも測定可能と考える。また、T-Bil, GOT, GPT, ALP, AMY 等は肉眼的に溶血していない血清でも溶血の影響があるので、枝肉残血などの溶血しやすい血清を使用した場合、検査結果について信頼性が乏しいと考える。

Table 5 Influence of hemolysis

Upper; ○ : No influence, - : Negative error, + : Positive error
Under; Deviation(%)

Item	Influence of hemolysis					A remarks column
	(-)	(±)	(+)	(2+)	(3+)	
TP	○ -1~ 6	+	+	+	+	
Alb	○ -7~ 9	○	○	○	○	
BUN	○ -6~ 0	○	○	○	-	
CRE	○ -10~ 7	○	○	-	-	
T-Cho	○ -4~ 5	○	○	○	○	
T-Bil	+	+	+	+	+	
GOT	-	-	-	-	-	
GPT	-	-	-	-	-	We made a limit value(<10) 10 in the hemolytic degree (+),(2+),(3+)
LDH	○ -4~ 4	○	-	-	-	
ALP	+	+	+	+	+	
CPK	○ -4~ 2	○	○	-	-	
Ca	○ -8~ 5	+	+	+	+	
Glu	○ -2~ 5	○	○	+	+	
UA	+	+	+	+	+	We made a limit value(<1) 1 in the hemolytic degree (-),(±),(+)
GGT	○ -5~ 5	+	+	+	+	
AMY	+	+	+	+	+	under 300IU/l on no hemolytic serum
	○ -4 ~ 0	-	-	-	-	over 300IU/l on no hemolytic serum

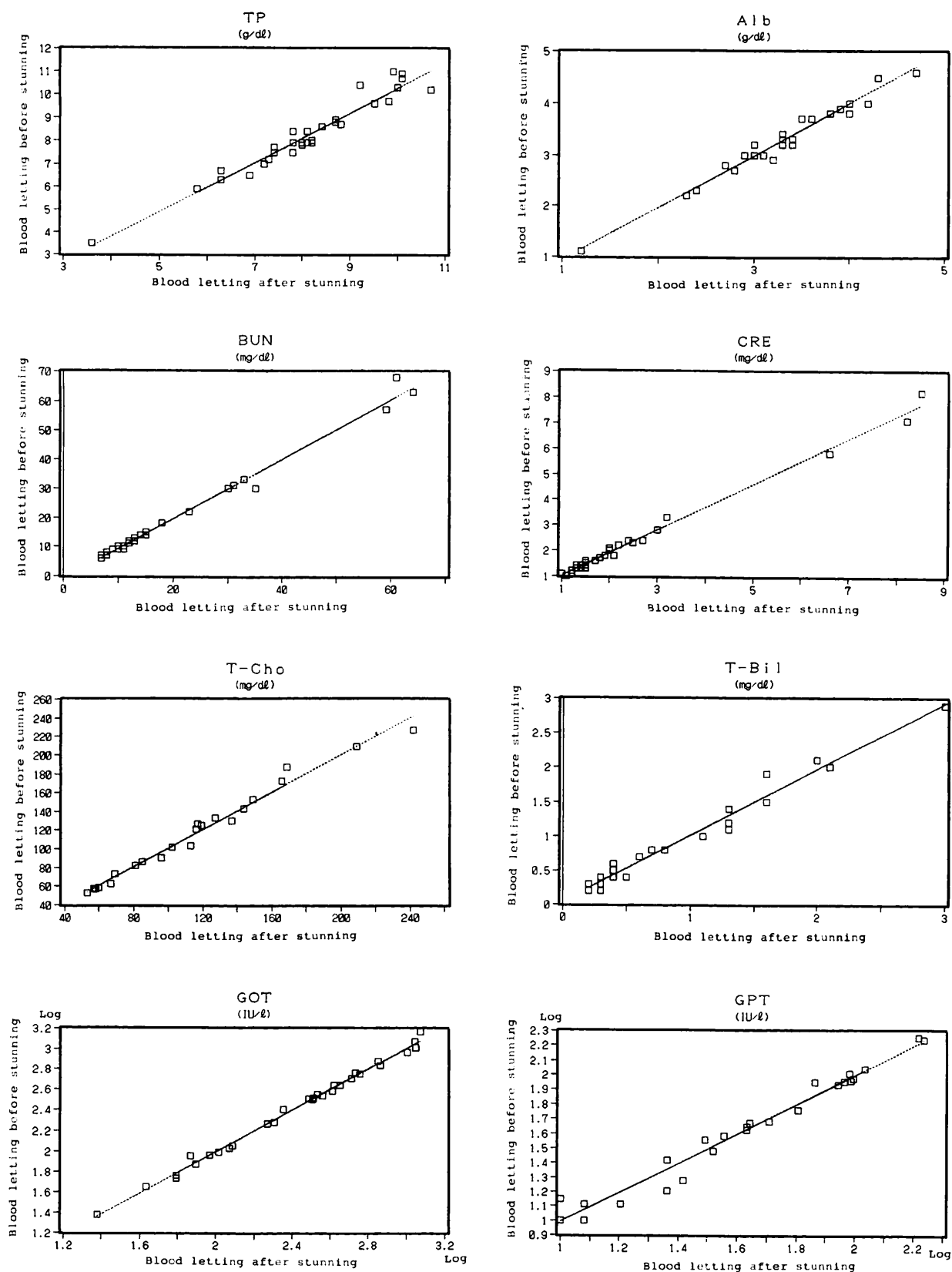


Fig1. Correlation between blood letting before stunning and after on biochemical examination

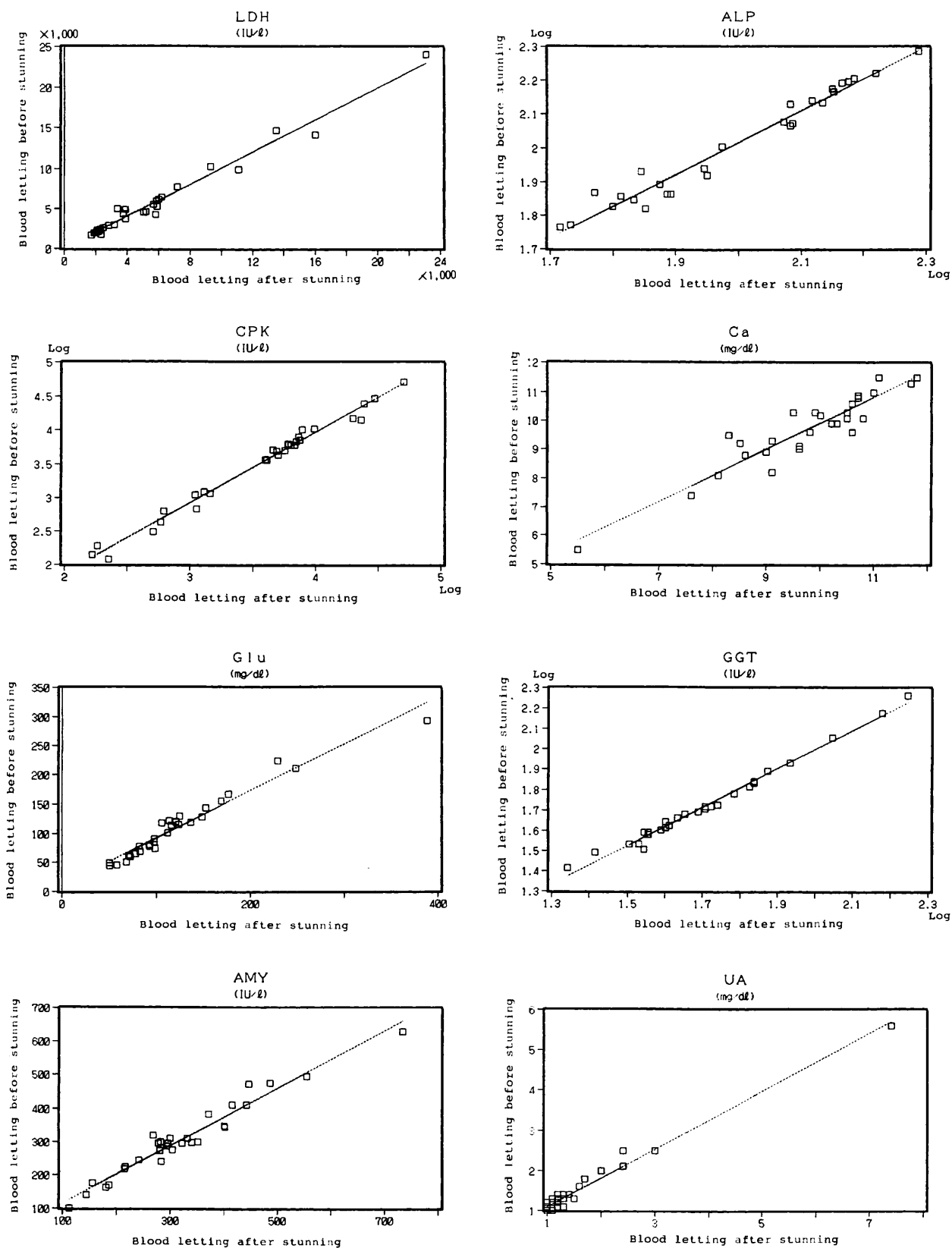


Fig2. Correlation between blood letting before stunning and after on biochemical examination

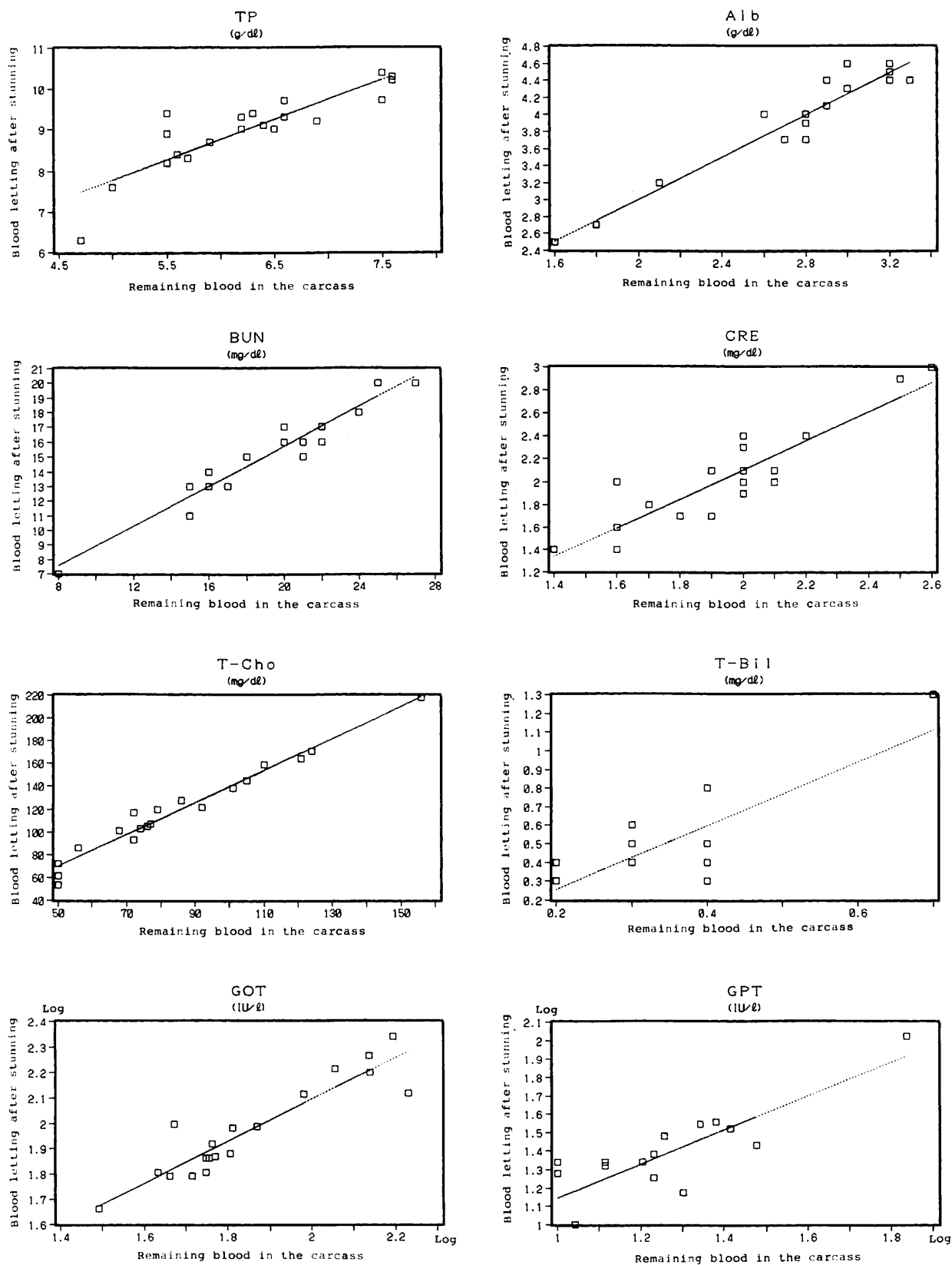


Fig3. Correlation between blood letting after stunning and remaining blood in the carcass on biochemical examination.

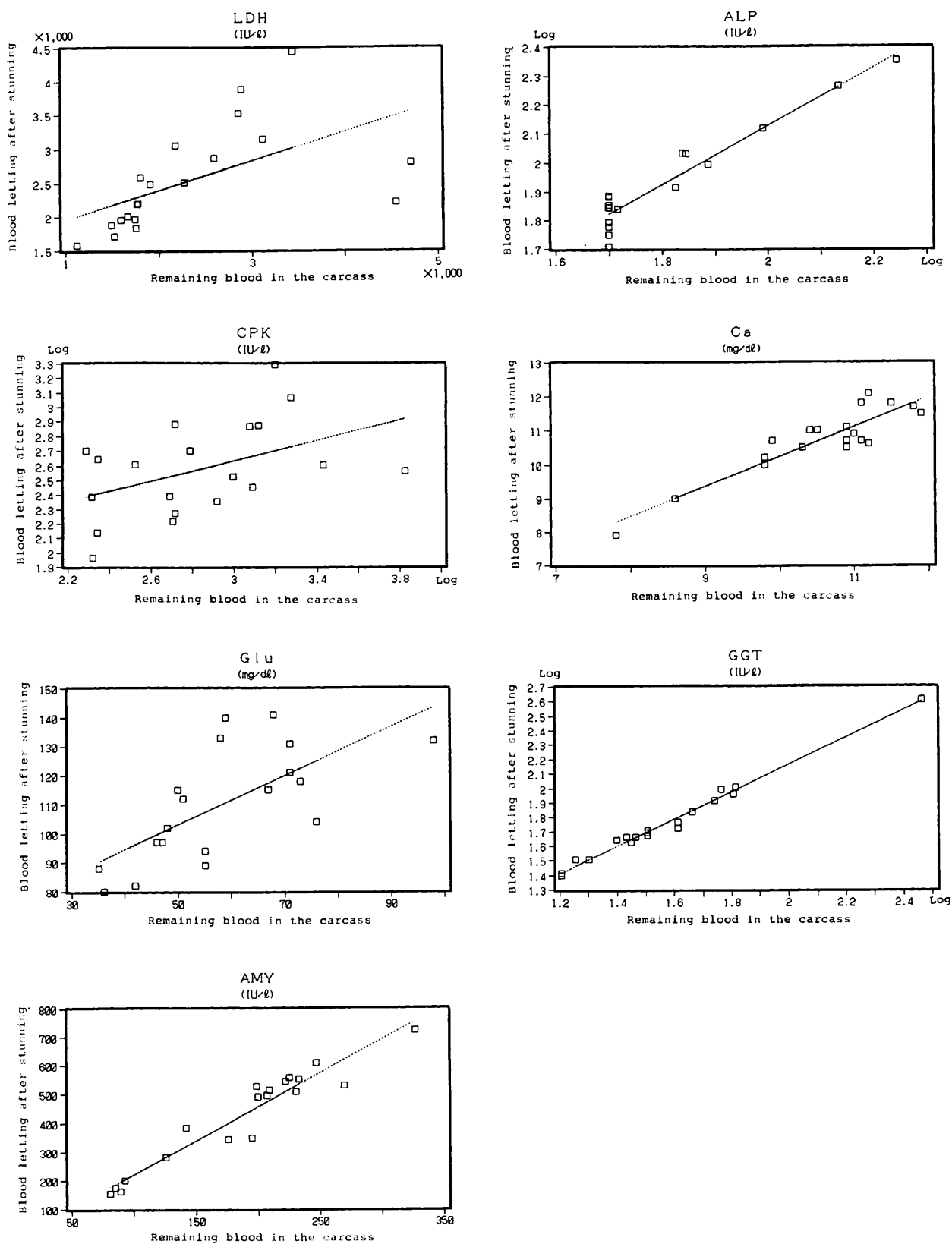


Fig4. Correlation between blood letting after stunning and remaining blood in the carcass on biochemical examination.

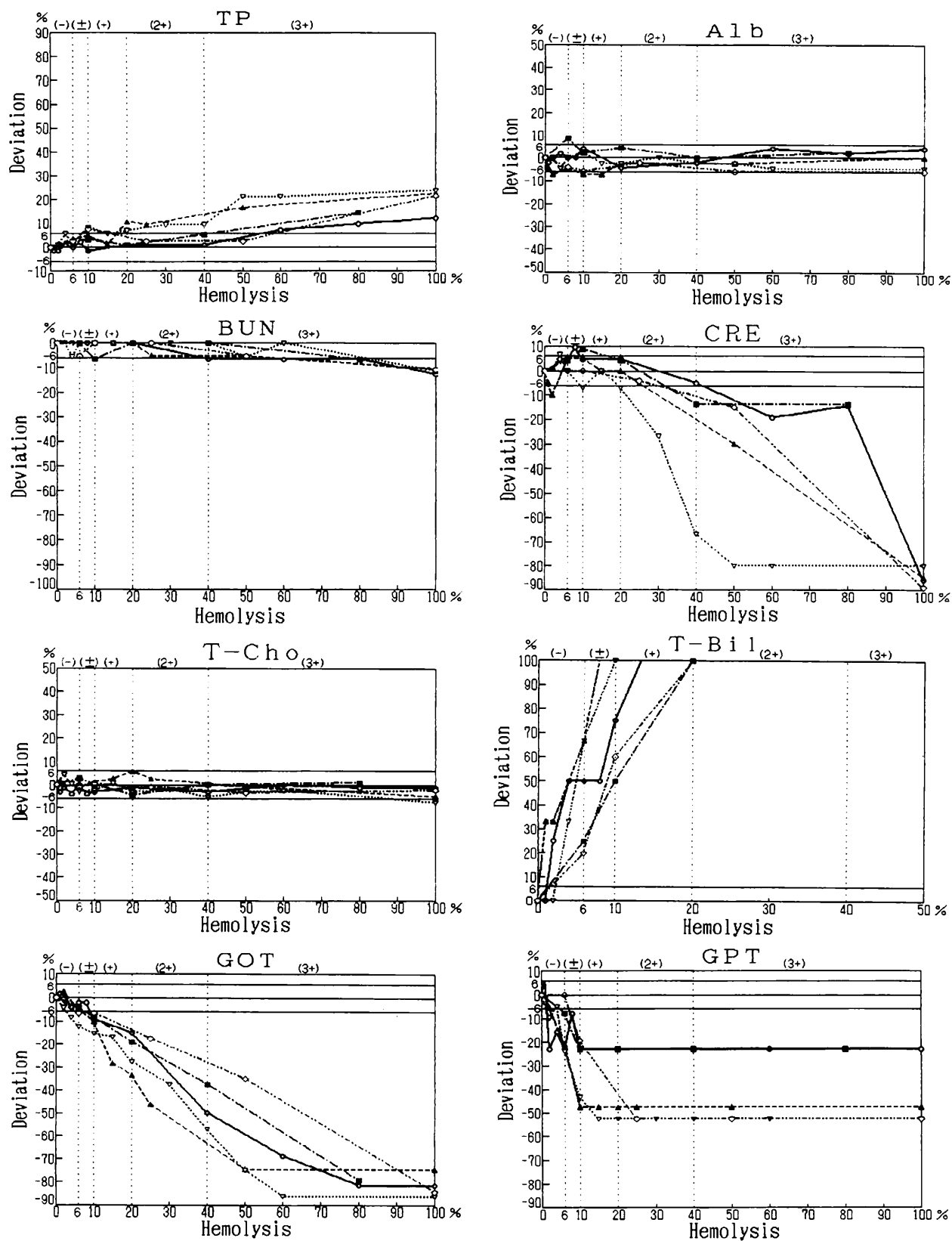


Fig5. The influence of hemolysis on blood biochemical examination.

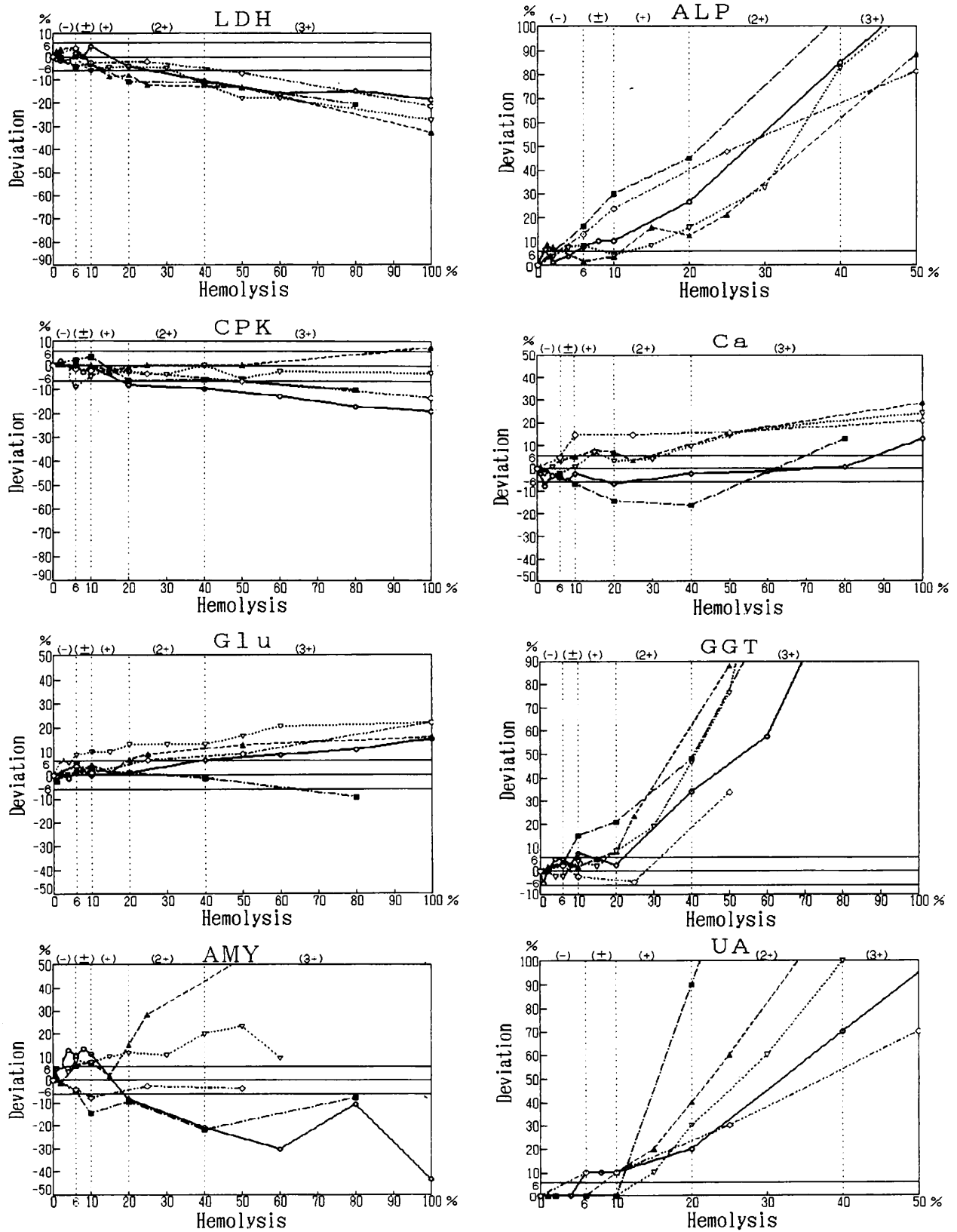


Fig6. The influence of hemolysis on blood biochemical examination.

Table 6 The normal range of healthy cattle and condition of blood

○ : Useful, △ : A little useful, × : Useless,
(↑):Going up with hemolysis, (↓):Going down with hemolysis

Item	Unit	Normal range	Blood letting after stunning	Remaining blood	Hemolytic serum
TP	g/dl	7.2~9.4	○	○	× (↑)
Alb	g/dl	4.1~5.2	○	○	○
A/G比		0.83~1.71			
BUN	mg/dl	13~22	○	○	○(less than middle)
CRE	mg/dl	1.5~2.4	○	○	○(less than light)
T-Chol	mg/dl	68~189	○	○	○
T-Bil	mg/dl	0.2~0.5	○	△	× (↑)
GOT	IU/l	<102	○	○	× (↓)
GPT	IU/l		○	△	× (↓)
LDH	IU/l	1,589~3,182	○	△	○(less than slight)
ALP	IU/l	<121	○	○	× (↑)
CPK	IU/l	<769	○	△	○(less than light)
Ca	mg/dl	9.3~11.7	○	○	× (↑)
Glucose	mg/dl	63~136	○	△	○(less than light)
UA	mg/dl		○	×	× (↑)
TG	mg/dl			×	
GGT	IU/l	<83	○	○	× (↑)
AMY	IU/l	239~638	○	○	× (↑ < 300, ↓ ≥ 300)

Ⅳ まとめ

1. 今回調査した結果をまとめたものを Table 6 に示した。当所の健康牛の血液生化学的性状の基準範囲は Table 6 のとおりとする。
2. 生体より採血ができればよいのだが、諸条件により困難な場合が多い。そこで血液を採取する場合、と殺後の経過時間のできるだけ短いものを溶血させないように慎重に複数の試験管に採取し、溶血のない検体を使用するのがよい。

3. 時間の経過した枝肉残血や溶血した血清を使用する場合 Table 6 の使用要件を参考に検査値を検討する必要がある。

4. 今後、これら諸条件を参考に、病畜等の血液生化学的診断に役立てていきたいと考える。

V 文献

- 1) 獣医臨床生化学 (第四版)

病畜牛における血液生化学検査について

病理部門

The blood biochemical examination in fall sick cattle

Abstract: The drychemistry system "SPOTCHEM SP4110" was found to be useful for blood biochemical examination, when very little amounts of serum are available, in fall sick cattle. It can be used to examine TP, Alb, GOT, GPT, ALP, T-Bil, CPK, T-Cho, TG, Glu, UA, BUN and CRE, of which TP, GOT, GPT, LDH, T-Bil, CPK, BUN and CRE should be essentially tested for passing an inspection.

Key Words: 病畜牛 fall sick cattle, 血液生化学検査 blood biochemical examination

I はじめに

病畜牛の診断には血液生化学検査が有効な手段の一つである。当所にはドライケミストリーによる簡易検査装置が設置されているが、これにより病畜の血液検査を実施するにあたり、疾病の診断や病勢の判定にどの検査項目が有効なのか、また、この機器の測定範囲内での異常値の判定は適正であるのかどうか検討したので報告する。

II 材料と方法

検査材料は平成6年4月～平成9年1月の間、病畜として検査した牛の血液148件を対象に、ドライケミストリーの検査装置スポットケム SP-4110により総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), 尿素窒素 (BUN), 尿酸 (UA), クレアチニン (CRE), 中性脂肪 (TG), 総コレステロール (T-Cho), 総ビリルビン (T-Bil), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT), アルカリ性ホスファターゼ (ALP), 乳酸脱水素酵素 (LDH), クレアチンホスフォキナーゼ (CPK), カルシウム (Ca), グルコース (Glu), ヨーグルタミルトランスペプチダーゼ (GGT), アミラーゼ (AMY) の17項目について測定した。また、当所の健康牛の血清100件についてスポットケムの製造元、京都第一科学において基準範囲が設定されたものを Table 1 に示した。この基準範囲からはずれるものを異常値とし、疾病の分類別に異常値の発生状況を調査検討した。

III 結果及び考察

1. 機器の測定範囲と検査値の関係

TG を除いたすべての項目において、健康牛の基準範囲は機器の測定範囲内に納まった。TG は健康牛の基準範囲

Table 1 The normal range in healthy cattle
Calculate method: Parametric

Item	Unit	Normal range
TP	g/dl	6.3~9.6
Alb	g/dl	3.1~5.0
A/G 比		0.77~1.34
GOT	IU/l	<161
GPT	IU/l	<41
GGT	IU/l	<85
ALP	IU/l	<84
LDH	IU/l	1,536~3,479
T-Bil	mg/dl	0.2~0.6
CPK	IU/l	<1,663
T-Cho	mg/dl	61~181
TG	mg/dl	<25
Glu	mg/dl	55~131
UA	mg/dl	1.0~1.3
BUN	mg/dl	11~22
CRE	mg/dl	1.2~2.4
AMY	IU/l	184~628
Ca	mg/dl	7.9~11.8

が測定下限域値(<25mg/dl)を示したが、機器の測定範囲は25~500mg/dlであった。このことから異常値の判定に機器の測定範囲による影響はなかった。機器の測定範囲と病畜の検査結果の最小値、最大値を Table 2 に示した。機器の測定上限域値を越えた検査項目は TP, GOT, GGT, LDH, CPK であった。これらは血清を蒸留水により希釈することによって得た値に希釈倍数を乗じることで最終的な検査値を求めた。特に GOT, LDH, CPK は4~34倍の希釈が必要であった。測定下限域値を示した項目は GPT, GGT, ALP, T-Bil, T-Cho, TG, Glu, UA, BUN であった。特に GPT (24%), T-Cho (27%), TG (81%), UA (24%) は測定下限域値を示すものが多かった。

Table 2 Maximum and minimum value in sick cattle and limits of measurement on "SPOTKEM"

Item	Unit	Limits of measurement	Minimum	Maximum
TP	g/dl	2~11	3.8	16
Alb	g/dl	1~6	1.2	4.6
GOT	IU/l	10~1,000	21	3,540
GPT	IU/l	10~1,000	<10	436
GGT	IU/l	10~1,500	<10	1,698
ALP	IU/l	50~1,500	<50	287
LDH	IU/l	100~4,000	755	32,244
T-Bil	mg/dl	0.2~25	<0.2	2.9
CPK	IU/l	50~2,000	58	66,960
T-Chol	mg/dl	50~400	<50	340
TG	mg/dl	25~500	<25	348
Glu	mg/dl	20~450	<20	430
UA	mg/dl	1~20	<1	8
BUN	mg/dl	5~100	<5	76
CRE	mg/dl	0.3~40	0.4	11.6
AMY	IU/l	10~800	42	779
Ca	mg/dl	3~20	4.9	13.2

Table 3 Incidence rate of abnormal values

Item	Incidence rate(%) n=148		
	Low	Normal	High
TP	18.2	64.2	17.6
Alb	43.9	56.1	0.0
A/G比	62.2	33.1	4.7
GOT	0.0	39.2	60.8
GPT	0.0	60.8	39.2
GGT	0.0	87.2	12.8
ALP	0.0	60.8	39.2
LDH	11.5	37.1	51.4
T-Bil	6.8	50.6	42.6
CPK	0.0	35.1	64.9
T-Chol	40.5	56.1	3.4
TG	0.0	81.1	18.9
Glu	14.2	72.3	13.5
UA	24.3	34.5	41.2
BUN	31.1	45.9	23.0
CRE	10.1	65.5	24.3
AMY	23.6	73.0	3.4
Ca	5.4	90.5	4.1

2. 検査項目別の異常値の発生状況

検査項目別に、基準範囲より低いものを低値、高いものを高値とし、検査件数に占める割合を Table 3 に示した。

GOT, LDH, CPK 及び UA は高値を示した件数が、A/G 比は低値を示した件数が多かった。

3. 疾病別の検査値の傾向

(1) 検査対象になった病畜を疾病別に分類し、各検査項目別に低値、基準範囲、高値の発症率の有意差を χ^2 検定した。そして、その傾向を Table 4 に示した。

GGT, ALP, AMY, Ca 等ではどの疾病においても発症率に有意差を認めなかった。

運動器系疾病では、筋肉の損傷等の指標とされている GOT, GPT, LDH, CPK¹⁾ が高値を示し、これらが有効な検査項目であることがわかった。また、繁殖器系疾病では運動器系と同様に GOT, GPT, LDH が高値を示したが、CPK は高値を示さなかった。このことより CPK は運動器系疾病に特異的な指標と考えられる。

Table 4 Changes in blood biochemical examinations by diseases

Abnormally high levels (▲) and low levels (▽) are indicated.

Disease (n)		TP	Alb	A/G比	GOT	GPT	LDH	T-Bil	CPK	T-Chol	TG	Glu	UA	BUN	CRE
Recomotorium	Fracture, Dislocation(21)				▲	▲	▲		▲						
	Arthritis(30)													▽	▽
	Myositis(27)				▲	▲	▲		▲						
Urinary organs	Uremia, Nephritis, Cystitis, etc.(40)														▲
Digestive organs	Gastritis, Enteritis, etc.(24)														▲
Genital organs	Mastitis, Endometritis, etc.(45)				▲	▲	▲								
Metabolic disease	Hepatitis, Fatty liver, etc.(74)							▲		▽					
	Fat necrosis(12)												▲		
	Heat stroke(2)												▲		
	Icterus(9)							▲		▽					▲
Circulatory disease	Edema(22)	▽	▽	▽			▽			▽	▲	▽	▲		

泌尿器系疾病では CRE が高値を示したが、尿毒症の診断に CRE が参考になると考える。

肝臓の疾病では、T-Bil が高値、T-Cho が低値を示した。これらは、肝臓の実質障害、機能低下を示唆するものである。黄疸においても、T-Bil、T-Cho が異常値を示し、黄疸の病勢診断にも有効と考える。

水腫では TP、Alb、A / G 比、LDH、T-Cho、Glu が低値を示し、TG、UA が高値を示した。この結果は、以前当所で調査した水腫の血液生化学的性状の低アルブミン、低コレステロール血症と一致した²⁾。水腫の診断にはこれらの項目が有効である。

(2) 検査した病畜の牛を、起立していた牛と起立不能牛及び分娩性起立不能牛³⁾に分類し、各検査項目別に低値、基準範囲、高値の起立不能の発生率を比較し、有意差検定を行ったものを Table 5 に示した。

Table 5 Changes in blood biochemical examination in downer cow syndrome and parturient paresis
Abnormally high levels (▲) and the low levels (▽) are indicated.

Disease (n)	GOT	GPT	ALP	LDH	T-Bil	CPK	BUN
Downer cow syndrome(69)	▲		▲				▲
Parturient paresis(43)	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▽

起立不能牛の GOT 及び CPK、分娩性起立不能牛の GOT、GPT、LDH、CPK は、運動器系疾病の検査値の傾向と一致し、起立不能の原因は筋肉の損傷等の運動器系疾病であることを示唆している。分娩性起立不能牛において T-Bil が高値を示しているのは妊娠によるサフラン肝の影響と思われる。

4. 廃棄した牛における異常値の発生状況と検査値の傾向

(1) 枝肉廃棄となった牛の検査項目別検査値を、低値、基準範囲、高値に分類し、それぞれの廃棄件数に占める割合を Table 6 に示した。

BUN、A / G 比は低値を示したものが多かった。GOT、GPT、LDH、T-Bil、CPK は高値を示したものが多かった。(2) 血液検査した牛を廃棄したものと合格したものに分け、各検査項目別に低値、基準範囲、高値の廃棄率を比較し有意差検定した結果、TP、GOT、CPK が高値を示すもの及び BUN、CRE が低値を示すものに廃棄となる傾向を認めた。

Table 6 Incidence of abnormal values in the cattle not passed inspection

Item	Incidence rate(%) n=50		
	Low	Normal	High
TP	6	64	30
Alb	46	54	0
A / G 比	74	26	0
GOT	0	16	84
GPT	0	48	52
GGT	0	88	12
ALP	0	52	48
LDH	0	36	64
T-Bil	2	46	52
CPK	0	12	88
T-Cho	42	56	2
TG	0	92	8
Glu	8	78	14
UA	0	62	38
BUN	50	38	12
CRE	20	72	8
AMY	24	76	0
Ca	4	92	4

IV まとめ

1. 当所に持ち込まれる病畜牛の血液生化学検査にドライケミストリーによる検査装置スポットケム SP-4110 は、簡便性及び測定範囲の面からも有効な検査装置である。
2. 病畜の血液生化学的診断には TP、Alb、GOT、GPT、ALP、LDH、T-Bil、CPK、T-Cho、TG、Glu、UA、BUN、CRE の 14 項目が有効であるが、疾病により参考となる検査項目に違いがあり、病畜に共通する検査項目は見つからなかった。また、TP、GOT、GPT、LDH、T-Bil、CPK、BUN、CRE の 8 項目は枝肉の可否と関係があり、可否の指標になる。
3. 各疾病の指標となるこれら検査項目は、病畜の診断に参考となる。
4. 今後、各疾病の指標となる検査項目を基に病勢の判定を行い、枝肉可否の判断の一助となるようにしていきたい。

V 文 献

- 1) 友田勇：臨床血液生化学検査，153(1987)
- 2) 京都市衛生公害研究所 病理部門：同研究所年報 No60，79～84(1994)
- 3) 内藤善久：牛の代謝性疾患，129～161(1990)

親水性ソリッドゲル使用下での微小酸素電極先端部の形と拡散電流の関係

調査研究部門

Application of hydrophilic solid gel to the sensor of an oxygen micro-electrode tip

Abstract: The effect of hydrophilic solid gel on the diffusion current from an oxygen micro-electrode was studied using a medium containing 2.6mM Ca ion under the application of -0.6V DC . The electrode was a platinum wire $200\text{ }\mu\text{m}$ in diameter coated with urethane resin for insulation. Six electrode tips with flat, hyperbolic, hemispheric, conic, parabolic and ellipsoidal shapes were inserted into the polyethylene tube $200\text{ }\mu\text{m}$ in I. D. and $500\text{ }\mu\text{m}$ in O. D. to make the recess ca $50\text{ }\mu\text{m}$ in length. The hydrophilic solid gel containing electrolytes was placed into the recess and irradiated with ultraviolet light for 30 min. With the flat type tip, the rate of current generated at 10% was lower than at 45% and 95% oxygen gas concentrations. Thus, the calibration line of the current against the oxygen gas increased with the oxygen gas level. With the hyperbolic type tip, the calibration line passed through the 3 values of current at 10, 45 and 95% oxygen gas. With the other 4 electrode tips, the calibration line through the origin linearly passed only the 2 current values at 10% and 45%, but the line extrapolated passed through a lower point than the current value at 95% oxygen gas. In conclusion, the hyperbolic shape of the electrode tip containing hydrophilic solid gel was useful to obtain a preferable calibration curve of the current against the oxygen gas concentration.

Key Words: 微小酸素電極 oxygen micro-electrode, 白金線電極 platinum wire electrode, 親水性ソリッドゲル hydrophilic solid gel, 電極先端の形状 shape of electrode tip, 酸素拡散電流の安定化 stabilization of oxygen diffusion current

I 緒 言

生体の代謝機能はブドウ糖から生産されたアデノシン三リン酸(ATP)を分解利用して営まれるが、この時、多量の酸素が消費される。これら生体の組織酸素分圧を測るには、微細な針型酸素電極を組織に挿入することが必要である⁵⁾。しかし、酸素拡散電流が生じて流れ始めると、組織液中のカルシウムなどの2価イオンが酸素電極の反応面に沈着する。すると酸素拡散電流の発生が抑制される(劣化現象)。著者は数年来、この劣化現象を起こさせないようにするべく、その解決法についての研究を続けている。

1992年には、通常の直流通電に代えて、陰陽の矩形波状の交番電流を通電印加した場合の結果を報告した^{1,6)}。この報告を皮切りとして、以下の如く研究を進めた。

1993年には、電極先端のテフロン被膜の性状と拡散電流の発生の関係を研究し、報告した^{2,7)}。

1994年には、実験前に微量電流を酸素電極に通電することで、電極の抵抗値が安定することを報告した(通電処

置)^{3,8)}。

1995年には、酸素電極の先端のセンサー部の形状が酸素拡散電流に及ぼす影響について研究した。半球体型の酸素拡散電流は拡散型を、また、円錐型は収斂型を示した^{4,9)}。

ここまでの研究により、電極先端のテフロン被膜を別の材質にする以外に、劣化現象は解決されないことに気付いた。

1996年には、親水性ソリッドゲルを、電極被膜の代わりに使用した結果を報告した。先端にポリエチレンチューブを挿入して recess (凹み) を作り、そこへソリッドゲルを充填した。ここで recess の長さを、 $200\text{ }\mu\text{m}$ 、 $250\text{ }\mu\text{m}$ 及び $300\text{ }\mu\text{m}$ とした。その結果、recess の長さが長いと、酸素濃度—拡散電流の校正曲線は拡散型を示し、短いと直線性を示した¹⁰⁾。この研究において求めているのは、校正線が直線性を示す微小酸素電極である。今回の研究では、親水性ソリッドゲルを使用しながら、電極先端の形状を変えた場合の、酸素拡散電流に対する効果を検索した。

Ⅱ 方 法

1. ニードル型微小酸素電極の形状

ウレタン樹脂被覆の白金線(直径 $200\mu\text{m}$)の先端の形状を、半球体型、半楕円体型、放物面体型、円錐体型、双曲面体型及び平面型の六種類とした。これら白金線の酸素電極の先端に、ポリエチレンチューブ(外形 0.5 、内径 0.2mm)をキャップ状に挿入した。次に、このチューブを切断して、長さ約 $50\mu\text{m}$ の recess (へこみ)を作った。この管空の内部を、少量の電解液を含む親水性ソリッドゲルで充填した。これを紫外線で30分間にわたって照射し、ゲルを凝固させた。

2. 通電処置

作成直後における電極の電気抵抗は無限大であるが、電解液に浸しておくると急速に抵抗値は減少し、浸水させて2～3時間後には、 $1\text{M}\Omega$ 以下になる。次に、酸素電極を陰極として、 0.15V の低電圧通電を約10時間、 Ca イオンを含まない電解液中で行った。すると電極抵抗値は、初期値の $2/3$ から半分に低下した。対極には白金線(直径 1mm)を用いて陽極とした。

3. 酸素拡散電流の測定

1) 印加電圧と校正ガス

酸素拡散電流の測定は、酸素電極を陰極、銀—塩化銀電極棒(直径 1mm)を陽極として、両電極間に 0.6V 直流を通電印加した。使用した校正ガス中の酸素ガスの組成成分は、10%、45%、95%であり、これに5%炭酸ガスと残りは窒素ガスの成分とした。

2) 培 液

拡散電流測定用の培液は、 2.6mM の Ca イオンを含む通常のクレブス・リンゲル液を使用した。この培液は約 80ml の測定用実験槽に入れ、拡散電流の測定中は常時スターラーで攪拌し、液温は 37°C に保った。

3) 酸素拡散電流の測定

酸素拡散電流の電氣的シグナルは、ペンレコーダーの記録紙上に描記した。電極の先端の形状は、実験の前後に実体顕微鏡下で観察し、写真撮影を行った。使用した倍率は40倍、または63倍である。電極抵抗は、微小電極抵抗計 MZZ-1100 (日本光電)を用いて計測した。

Ⅲ 結 果

1. 半球体型電極

まず、半球体型白金線電極を留置している実験槽に95%窒素ガスを送風して、酸素拡散電流を求めるための基線を描かせた。次に、このガスに代えて10%酸素ガスを送風すると、酸素拡散電流が発生し始めた (Fig.1A)。この場合、

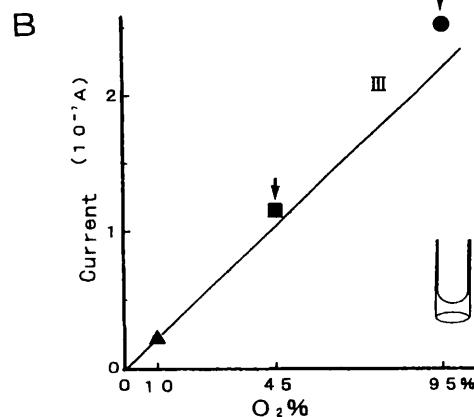
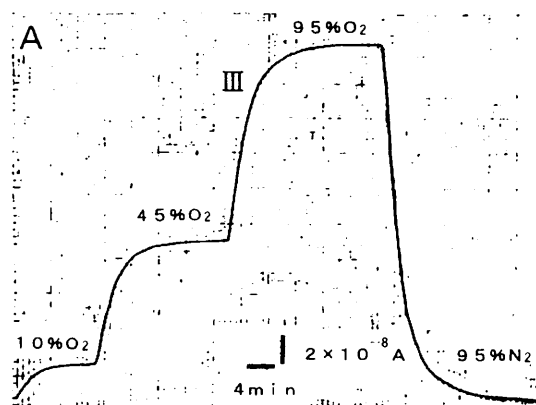


Fig.1 Oxygen diffusion current and calibration curve of hemispheric type oxygen micro-electrode

A: The oxygen diffusion current was obtained under a flow of 10%, 45% and 95% oxygen gas. Roman numeral III indicates the third trial of serial experiments. Current disruption elicited by electrode aging was not observed in this case.

B: Calibration curve of oxygen diffusion current against oxygen gas concentration was drawn. Symbols $\triangle$, $\square$, $\bullet$ indicate the current values at 10, 45 and 95% oxygen gas. The current value at 95% was located over the line drawn between the origin and the value obtained at 10% oxygen gas (extrapolated calibration line).

$2.4 \times 10^{-8}\text{A}$ の電流値のレベルで一定していた。次に、45%酸素ガスを送風すると拡散電流は増加し始め、ほぼ4.7倍の $11.3 \times 10^{-8}\text{A}$ の電流が発生した。しかし、電流値はプラトーにならずに時間の経過と共に微増し続けた。95%酸素ガスを送風すると $2.54 \times 10^{-7}\text{A}$ の電流が発生した。これは10%酸素ガス送風下で発生した電流値のほぼ10.6倍である。

しかし、この場合も電流値は安定したプラトーにはならず、に微増し続けた。次に95%窒素ガスを送風すると、電流の発生は急速に抑制された後、ゆっくりと基線に近づいていった。

次に、縦軸に電流を、横軸に酸素ガス濃度を取り、酸素拡散電流発生に伴う電極の較正曲線を描いた (Fig.1B)。まず、原点と10%酸素ガス送風下で得られた電流値とを直線で結んだ (外挿法的較正直線)。次に、45%と95%酸素ガス送風時の電流値をプロットすると (二つの矢印)、前述の直線よりも上になった。このことは、酸素ガス濃度が高くなるほど、予想より大きな電流値の発生していることを意味している。挿入図は半球体型電極の模式図である。なお、Fig.1の中に示されたローマ数字「Ⅲ」は、連続して8回行われた実験の内の3回目の実験結果であることを示している。

2. 半楕円体型電極と放物面体型電極

この両電極による電流発生状況は、半楕円体型では95%酸素ガス下で 3.08×10^{-7} A、放物面体型では 2.25×10^{-7} Aの電流の発生となった。これは、95%酸素ガス送風時に発生する電流値が、次項に述べる双曲面体型の電極よりも大きい点で、半球体型電極に似ている。その上、ここには示されていないが、これら両電極共に、95%酸素ガス送風下における電流発生の様子は、プラトーを保ち得なくて、半球体型と同じように漸増傾向を示した。

3. 双曲面体型電極

双曲面体型電極を挿入している実験槽に、窒素ガスに代わって10%酸素ガスを送風した。すると、 2.0×10^{-8} Aの電流が生じた (Fig.2A)。このガスに代えて、45%酸素ガスを送風すると 8.9×10^{-8} Aの電流が発生した。このとき、約26分間の長きにわたって電流値は安定なレベルを保っていた。次に、95%酸素ガスに代えて送風すると、 1.91×10^{-7} Aの電流が生じた。このとき、約20分間にわたってほぼ安定なレベルを保っていた。しかし、95%窒素ガスを送風すると、電流の発生は急速に抑制され、やがて基線へゆっくりと接近した。

Fig.2B には、この電極による酸素拡散電流発生の較正曲線を示した。外挿法的較正直線を描き、その線上に45%と95%酸素ガス送風時の電流値をプロットした (二つの矢印)。すると、この場合、この二点はほぼ直線上に乗った。図の中に示した「Ⅲ」は、8回の実験の内の3回目の実験データであることを示している。なお、挿入の模式図は双曲面体型電極を示している。

4. 円錐体型電極と平面電極

これらの電極により発生する電流は95%酸素ガス送風時

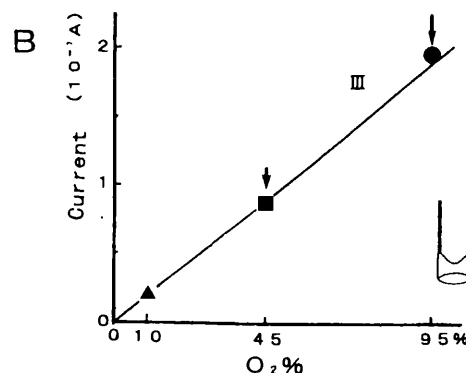
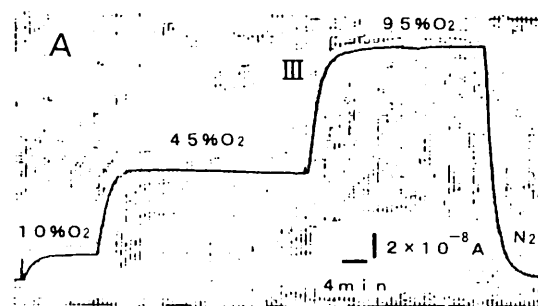


Fig.2 Oxygen diffusion current and calibration curve of hyperbolic type oxygen micro-electrode

A: Oxygen diffusion current was obtained under a flow of 10%, 45% and 95% oxygen gas. The plateau levels at 45 and 95% oxygen gas were kept stable during the gas flows in this case.

B: Calibration curve of oxygen diffusion current against oxygen gas concentration was drawn. Symbols $\blacktriangle$, $\blacksquare$, $\bullet$ were nearly located on the extrapolated calibration line.

に、円錐体では 2.05×10^{-7} A、平面電極では 1.78×10^{-7} Aとなっていた。この両者に共通する特徴は、発生する電流量は前述の球体型の電極に比べて、少ないことである。このときの電流値の推移は、半球面体型や半楕円体型のプラトーでは漸増傾向に推移するのに比べ、より安定しており、強いて比較すれば、双曲面体型電極のプラトーの推移の経過に似ていた。

5. 高酸素ガス濃度下での電流増強現象

テフロンなどの疎水性被膜に代わって親水性ソリッドゲルを針型電極先端に recess を作って充填した場合、劣化現象の発生は見られなくなった。しかし、高酸素ガス濃度下で発生する拡散電流の値は、外挿法的較正直線から予想される値よりも大きくなった。ここではこれを、電流増強現象と呼ぶことにする。

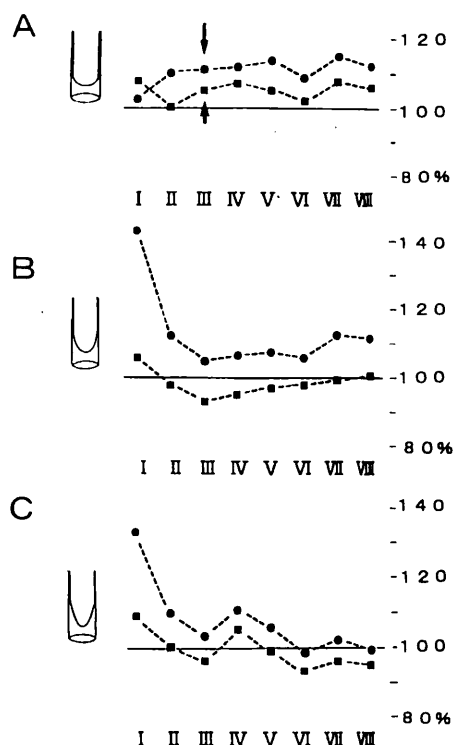


Fig.3 Relative values of oxygen diffusion current at 45% (■) and 95% (●) oxygen gas concentrations

Relative percentage values of oxygen diffusion current were obtained by continuous trials in 8 repeated experiments.

Hemispheric (A), ellipsoidal (B) and parabolic (C) shapes of electrode tips were tried. The value at 95% oxygen gas was enhanced and over the 100% line in these 3 cases.

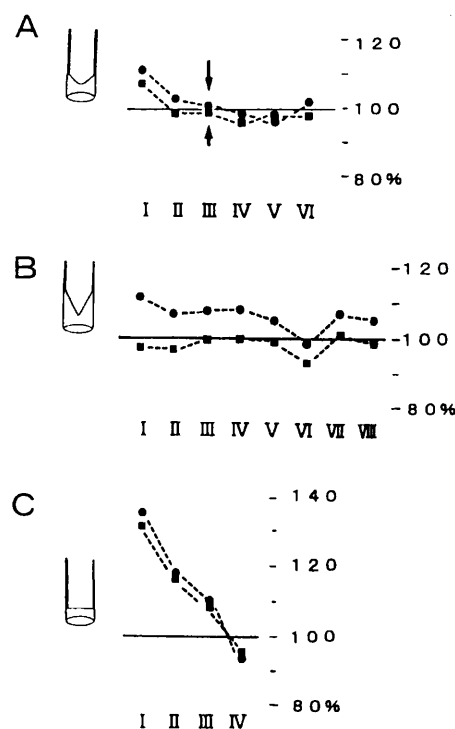


Fig. 4 Relative values of oxygen diffusion current at 45% (■) and 95% (●) oxygen gas concentration

Relative percentage values of oxygen diffusion current were obtained by continuous trials in 4 to 8 repeated experiments. Hyperbolic (A), conic (B) and flat (C) shapes of electrode tips were tried. In case A, the values at 45 and 95% oxygen gases were almost located on the 100% line. In case C, values were unstable during experiments.

Fig.3には半球体型、半楕円体型および放物面体型の電極を用いて、8回の実験を試行した時の結果を示した。

前述の外挿法的校正直線から予想される45%と95%酸素ガス時の電流値を100%基準値とし、この値を用いて、45% (■)と95% (●)酸素ガスの送風下で実験的に得られた実測値を割った値をパーセントで表示した。これは Fig.4の場合も同じである。次に、各電極における特徴を述べる。

半球体型電極 (Fig.3A) では、45%酸素ガス送風時の電流の相対値 (100.3~107.7%) は、総体的に95%酸素ガスの送風時の電流の相対値 (102.5~115%) よりも小さい。3回目の試行 (Ⅲ) の矢印は、Fig. 1 に示したデータである。

半楕円体型電極 (Fig.3B) では、第1回目の試行時には、直線から大きく変位しているが、第2回目以降の45%酸素ガス送風時の電流の相対値 (92.6~100.7%) は、総体的に100%値より小さい。95%酸素ガス送風時の電流の相対値 (106.2~112.7%) は、すべて100%値よりも大きい。

放物面体型電極 (Fig.3C) では、やはり第1回目の試行時には、直線から予想される値から大きく変位している。第2回目以降の試行では、45%酸素ガスの送風時に得られる電流の相対値 (93.4~105.37%) は、100%値を挟んで分布している。95%酸素ガスの送風時の電流の相対値 (93.4~105.3%) も、100%値を挟んで分布している。

Fig. 4には双曲面体型、円錐体型および平面型の電極を用いて、それぞれ6回、8回及び4回の実験を連続試行した時の結果を示した。

双曲面体型電極 (Fig.4A) では、45%酸素ガスの送風時の電流の相対値 (96.0~107.5%) は、初回を除く5回の試行において、総体的に100%値に近い。95%酸素ガス送風時の電流の相対値 (97.5~111.4%) は、6種類の電極の中で、初回の値を除くと、最も100%値に近い。3回目の試行 (Ⅲ) の矢印は、Fig.2に示したデータである。

円錐体型電極 (Fig.4B) では、45%酸素ガス送風時の電流の相対値 (92.6~100.6%) は総体的に100%値に近い。

しかし、95%酸素ガス送風時の電流の相対値(98.4~111.5%)は6回目の値を除くと、すべて100%値を5~10%ほど超えていた。

平面型電極(Fig.4C)では、記録される電流値は実験の試行毎に大きく変動している。45%酸素ガス送風時の電流の相対値(95~133.4%)は、試行毎に大きく変動した。同じく、95%酸素ガス送風時の電流の相対値(93~135.4%)も、同じように試行毎に大きく変動している。これは、拡散電流の様子からみると、不安定な電極である。

IV 考 察

1. 電流値の大きさの差

先端の形状の異なる電極ごとに、発生する電流値の大きさに差が生じた。例えば、電極先端が半球体型の電極では、双曲や平面型に比べて電流値は大きくなった。すなわち、半球体型の電極では95%酸素ガスの送風下では、 2.54×10^{-7} Aとなるが、平面型では、 1.78×10^{-7} Aとなっている。これは電極先端の化学反応面積の違いによると考えられる。そこで、電極先端の露出面の大きさを計算式から検討してみると、半球体型では $2\pi r^2$ 、平面型では πr^2 となる。即ち、半球体型は平面型の2倍の大きさとなる。しかし、ここでは平面型は半球体型の約70%の大きさの電流値となっている。面積計算の公式から予想できる、二分の一にはなっていない。この原因としては、半球体型が正確に半球体になっていなくて現実には面積が少し小さい、半球体面に均等に酸素が拡散していない、あるいは親水性ソリッドゲルの酸素拡散係数が非常に小さい、などといったことが考えられる。

2. 電流値の安定性

今回の親水性ソリッドゲルを使用した実験では、95%酸素ガス送風下でも安定した電流が記録された。これは電極の反応面を覆う親水性ソリッドゲルが、培液中のCaイオンの電極への拡散を防いでいるためと考えられる。従来型被膜の電極では、酸素拡散電流の発生によりOH⁻イオンが生じ、これとCaイオンが結合して電極表面に水酸化カルシウムとして沈着し、その結果、電流の発生は抑制される。これは劣化現象として知られている。今回開発された電極には、このような劣化現象の発生は観察されなかった。

3. 電流増強現象

Fig.3及びFig.4から判ることは、数回の実験の連続試行下において、高濃度酸素ガス下においても、一番安定な電流の発生状態を示したのは双曲面体型電極であった。しかし、特に、半球体型、およびそれに近い球形状の電極で

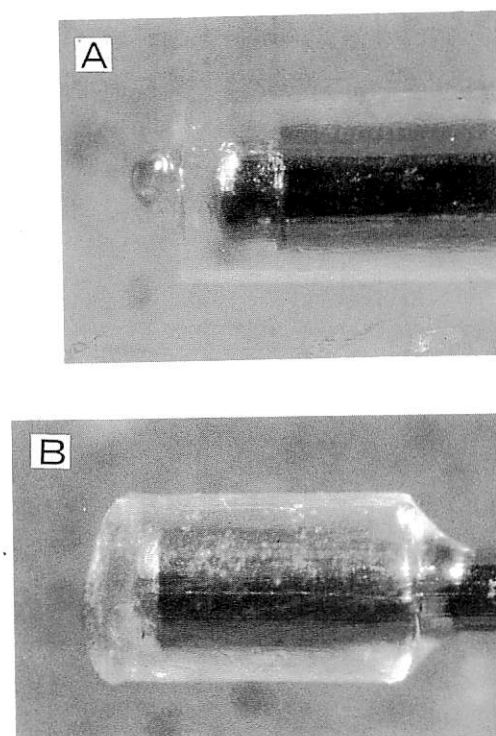


Fig.5 Photographs of electrode tips after experiments

A: Hemispheric electrode tip was made with a recessed polyethylene tube. Hydrophilic solid gel containing electrolytes was placed in the recess and partially protruded from the tip. The platinum wire was 200 μ m in diameter.

B: Hyperbolic electrode tip was made with a recessed tube. Hydrophilic solid gel did not protrude from the tip in this case.

は、95%酸素ガスの送風下で予想より大きな電流の発生する増強現象が認められた。この機構は、どのように解釈したらよいのだろうか。

Fig.5には、実験後の半球体型(A)と双曲面体型(B)の電極先端の写真を示した。ここで注目すべきことは、半球体型電極の先端は、ポリエチレンチューブに挿入されているが、親水性ソリッドゲルが吸水により膨潤して突出している。一方、双曲面体型電極の先端には、親水性ソリッドゲルの膨潤とその突出部はほとんど認められておらず、わずかに盛り上がっているだけである。これは即ち、この膨潤して突出した部分が、高濃度酸素ガスの通風下で、酸素ガスの拡散を長引かせているのではないかと考えられる。この長期にわたる酸素の拡散が、高濃度酸素ガス送風下での電流増強現象を招来しているのだろう。事実、ソリッドゲルを充填したrecessの長い場合では、短い場合に比べて、電流の増強現象が観察されていた¹⁰⁾。

V 結 論

1. 親水性ソリッドゲル電極では、従来の疎水性被膜に比べて、酸素拡散電流の劣化現象は発生しない。
2. 電極先端の形状は、半球体や平面型に比して、双曲面体型が安定した拡散電流を発生する。
3. 半球面体では、高濃度酸素ガスの送風下で、電流増強現象が起こりやすい。

VI 参考文献

- 1) Fujii, T., : Jpn. J. Physiol., 42, S 293 (1992)
- 2) Fujii, T., : Jpn. J. Physiol., 43, S 337 (1993)
- 3) Fujii, T., : Jpn. J. Physiol., 44, S 300 (1994)
- 4) Fujii, T., : Jpn. J. Physiol., 45, S 270 (1995)
- 5) Fujii, T. et al. : Pflügers Arch., 393, 83-87 (1982)
- 6) 京都市衛生公害研究所調査研究部門：同研究所年報 No.58, 177-180 (1992)
- 7) 京都市衛生公害研究所調査研究部門：同研究所年報 No.59, 125-128 (1993)
- 8) 京都市衛生公害研究所調査研究部門：同研究所年報 No.60, 131-134 (1994)
- 9) 京都市衛生公害研究所調査研究部門：同研究所年報 No.61, 115-119 (1995)
- 10) 京都市衛生公害研究所調査研究部門：同研究所年報 No.62, 90-94 (1996)

沢の池誕生以前の周辺水域の水質および植生に関する予備的な調査について

環境部門

Preliminary study on water quality and vegetation of the aquatic area around the pond Sawanoike in the period before the birth of the pond

Abstract : The sediment core including the peat layer accumulated in the period before the birth of a pond Sawanoike was obtained from the deepest point of the pond. Analyses of pollen and diatoms were performed with observation of seeds and Bryophyte for the core. *Cyperaceae*, *Gramineae* and acidophilous species of diatoms dominated in the period corresponds to the lowest part of the core. This shows that the wetland with acidic condition is considered to have spread in this area. The wetland changed progressively to the aquatic area having more deep water depth and less acidic condition. Growth of various water plants such as *Nymphaea*, *Brasenia* and *Potamogeton* were confirmed. Water inflow from the watershed having soils developed on chert of Mesozoic Era should be one of the factors which have promoted oligotrophic and acidic condition of this aquatic area.

Key Word : 沢の池 Sawanoike, 珪藻 diatom, 花粉 pollen, 種実類 seeds, 蘚苔類 Bryophyte, 植生 vegetation

I はじめに

京都市北部の山間部にある沢の池について、これまで水質及び藻類についてのモニタリングを実施してきた¹⁾²⁾。また、その酸性度の変遷について堆積物コアの各種の分析結果から推定を行ってきた³⁾。調査の結果から沢の池の低いpH、アルカリ度が酸性雨の影響を受けた結果による可能性があることは否定できないが、同時にこの水域及び集水域の地理学的、地質学的、そして植生上の特質も、沢の池の水質及び生物相を規定する要因として注目される。京都市域には、厚い泥炭層、浮島、氷河期の遺存生物の存在により天然記念物に指定されている深泥が池があるが、その生態学的な特性を育んできた要因と共通する要因が、沢の池一帯の自然環境にもあるのではないかと考えられる。

本調査では、沢の池が誕生する以前の堆積層を含むコアについて、有機物含有量、珪藻類種組成、花粉、種実類の分析、蘚苔類遺体の観察を行い、過去の沢の池の最深部付近の水域環境および集水域の植生を推定し、市民にとっても貴重な環境遺産である沢の池についての科学的な理解を深め、その環境の保全に資することを目的とした。

II 方法

1. コアサンプリング

サンプリングは池の北部にある最深部で平成7年2月に実施した。この地点は池の誕生以来百数十年間にわたり堆積した泥の層が厚く、現在我々が使用しているコアサンプラー（アクリル製、内径5.5cm、押し込み式）では池の誕生以前の堆積層を含むコアの採取は困難である。そこで上部に泥抜き穴を設けた内径2cm、長さ40cmのステンレスパイプを押し込むことにより、池の誕生前の層を含む35cmの長さのコアを得た。このコアは池の堆積物の表層からの連続したコアでない点で変則的な試料であるが、本テーマについて予備的な知見を得る目的においては有効に活用できる試料である。コアは1cmの間隔で切断し、各フラクションを分析に供した。

2. 分析

各フラクションの水分含量は105℃、3hr.の処理による結果から、また有機物含量はさらに550℃、6hr.の処理による強熱減量から求めた。

珪藻分析は試料を南雲⁴⁾の方法に基づき前処理をした後、1000倍の倍率で検鏡して行った。種の同定は、Krammer, K. & H. Lange-Bertalot⁵⁾, Creve-Euler, A.⁶⁾らの方法に基づいた。花粉分析はアルカリ処理、フッ化水素処理、アセトリシス処理を含む常法で行い、グリセリンゼラチンで封入した試料について400倍の倍率で検鏡して行った。種

の同定は中村の資料⁷⁾に基づいて行った。

種実類及び蘚苔類は、堆積物から直接実体顕微鏡で検鏡下で拾い上げ、種実類については石川の図鑑⁸⁾に基づいて同定を行い、蘚苔類は、ガムクロラルに封入し検鏡試料とした。

沢の池誕生以前に生育した植物との比較のために、現在の沢の池にみられる水生植物、湿地性植物について観察を行い、概略の分布状況を把握した。

Ⅲ 結果および考察

1. コア性状および有機物含有量

Fig. 1 に、得られたコアの性状、水分および有機物含量を示した。このコアの最上部は珪藻の種組成から推定して、以前に報告した³⁾コアの37cm 付近に相当すると考えられる。その最上部から約12cm までは明るい褐色のシルト層であり（以下A層）、有機物含有量も10%程度である。その下部には約5cm の厚さで、コーヒー色の層（B層）が続き、有機物含有量も増大する。この層もシルト主体であるが植物遺体も次第に多く含まれるようになる。さらに18cm よ

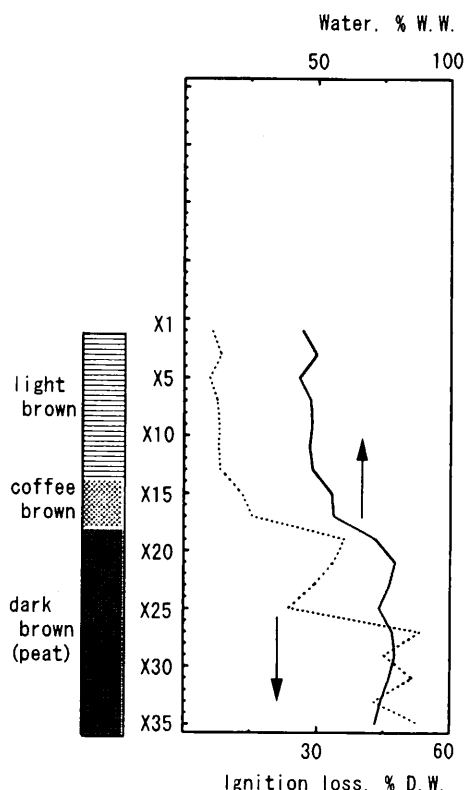


Fig.1 Profile of water content and ignition loss of the core from Sawanoike with schematic reproduction

り下部は植物遺体が中心の泥炭層（C層）であり、有機物含有量はその上部と比べて非常に多くなる（約30%から60%）。Xナンバーは今回調査したコアの上端部からの深さを示す。これらのプロファイルから、このコアの18cmより下部の約17cmの厚さの層が沢の池誕生前の層であると考えられる。しかし25cm付近では有機物含有量が比較的低いこともあり、C層の堆積環境も一様ではなかったと考えられる。

2. 珪藻分析

Fig. 2 に珪藻の分析結果を示した。図の最上部のカラム（深さ2cm）は、1995年に採取した堆積物コアの2cmの深さ（1990年頃の堆積層）におけるそれぞれの珪藻の出現頻度である。

A層からB層にかけては *Melosira arentii* が優占出現するが、これは既報と同様の結果である。これらの層で *Anomoneoneis brachysira* の出現頻度が下方に向けて次第に減少すること、*Cymbella* sp. (既報³⁾ では *Gomphonema* sp.) が次第に多くなり、B層の下部でこの種の最高出現頻度に達する点も同様の傾向である。

次にC層では、コアの深さによる珪藻種組成の変動が非常に大きいことが注目される。優占出現した種はこの層の上部から、*Aulacoseira distans*, *Synedra nana*, *Eunotia incisa* の順に入れ替わった。また *Asterionella ralfsii*, *Nitzschia* sp. などが特定の深さでのみ多く出現した。

沢の池の誕生以前に堆積した層であるならば、水域環境の変動は比較的少なく、珪藻の種組成の変動も小さいものと予想したのであるが、この結果からは堆積速度がかなり小さかった可能性も考えられる。いずれにしてもC層に相当する年代を通じて、水域の水深や堆積環境にはかなりの変動があったことが推定される。コアの最下端から29cm以下の層では、*Eunotia incisa* が優占出現し、*Anomoneoneis seriata* v. *acuta* も比較的多く出現した。これらは植物や泥に付着して生活し、かつ酸性の水域を好む種であり、水域環境は腐植酸性の湿地帯であったことが示唆される。一方、21cmから25cm付近に出現する *Aulacoseira distans* と *Asterionella ralfsii* は浮遊性の種であることから、25cm以下の層はより深い水深を有する水域環境であったと考えられる。なお、*Aulacoseira distans* のなかでも、出現した珪藻の多くは中性付近の池沼でもよく出現するバリエーションの種類である。また、*Synedra nana* についても、これまで生態学的な報告例が少ないが、それほど酸性度の強くない水域に出現するとされている⁹⁾ 種である。C層の上部も泥炭層であることを考慮すれば、やはり一定の酸性の状況であったといえようが、下部と比べてより中性に近

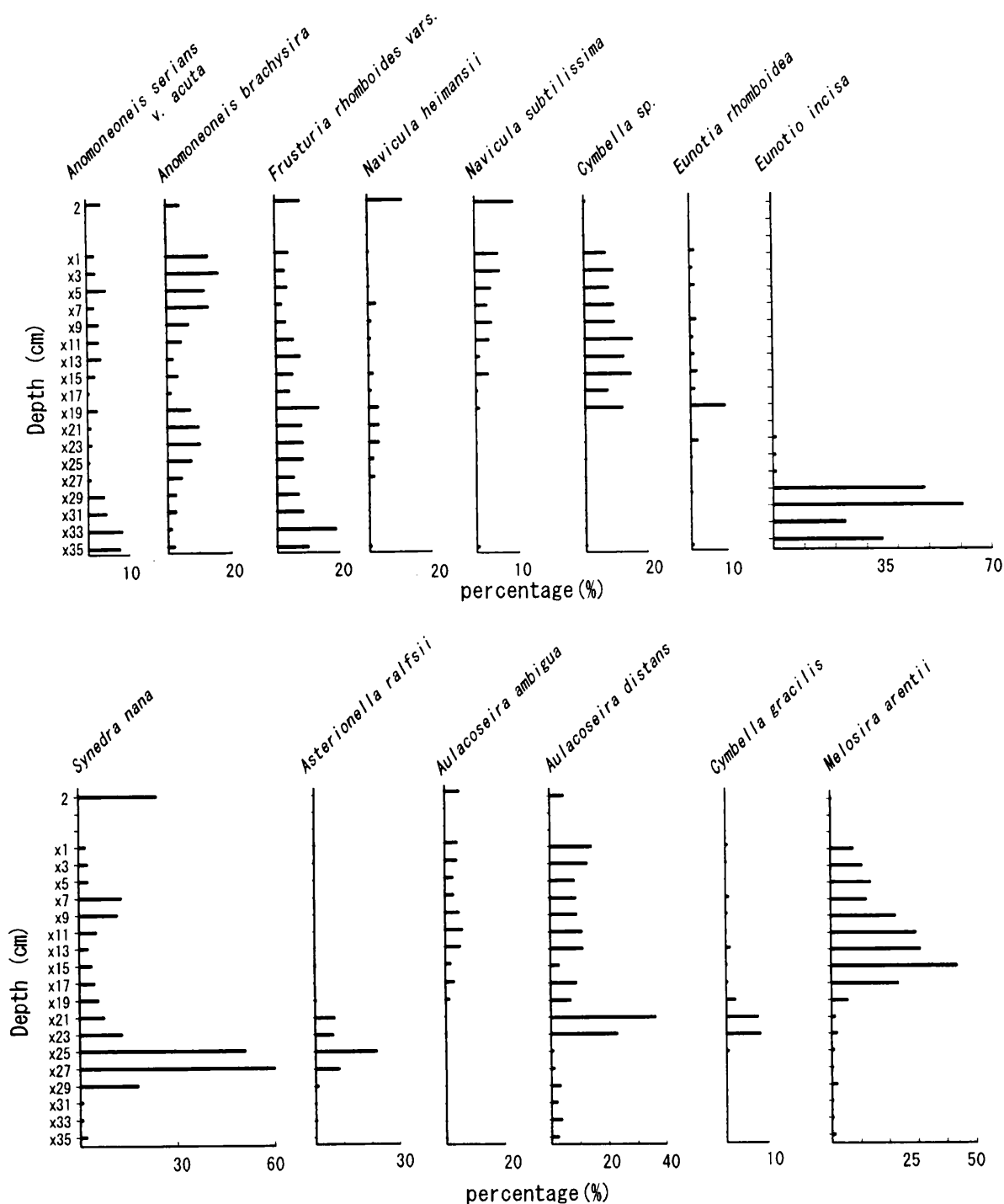


Fig.2 Profiles of selected diatom taxa in the core from Sawanoike

く、より深い水深を有する水域環境であったと考えられる。

3. 種実類および藓苔類遺体

採取できたサンプル量が少ないため、堆積物から見いだされた種実類の種類数、個体数は少なかった。しかしその

出現傾向の概略は記述することができる。17cmより浅い層では種実類は認められないが、18cmから約24cmまでの層からはヒツジグサ、ヒルムシロ属など水生植物の種実が見いだされた。一方、26cmより深い層からは各種カヤツリグサ科（カヤツリグサ属、ハリイ属）、エゾシロネ、ミ

ゾソバそしてホシクサ属など湿地性の植物の種実が見いだされた。C層におけるこの出現傾向の変化の特徴は、変化した深さについては厳密には一致しないが、C層の上部が一定の水深を有する水域環境に、そしてその下部の層はより浅い水深である湿地帯の環境に相当することを示す点で、上記の珪藻の分析結果と符合する。

蘚苔類遺体も18cmの深さから最下端まで、すなわちC層のみに認められた。その一つは、アオモリカギハイゴケでC層全体から見いだされた。特に19cmから24cmおよび28cmから30cmの部分に多く、植物遺体のかなりの部分がこの種で占められていた。本種は池の岸付近、水田の側などで、しばしば沈水状態で生育するといわれる。

ミズゴケ類もC層に存在し、24cm以下の層に多い傾向であったが、アオモリカギハイゴケと比べその量は少なかった。種名としては、オオミズゴケ、ホソバミズゴケが同定されたが、不明種も含まれていた。

4. 花粉分析

Fig.3に花粉分析の結果を示した。珪藻の場合と異なり、コアの18cmより下層(C層)についてのみの分析結果を示した。各種花粉についての1990年頃の出現比率(図の2cmの深さのカラム)とC層のそれとは、非常に異なることが明瞭である。マツ属、スギ属など高木類の花粉の比率が特に26cmより下層では激減し、イネ科、カヤツリグサ属など草本類の花粉は大きく増大した。シソ科の花粉も28cm以下の層で出現するが、これはその種実が見いだされたエゾシロネの花粉と考えられる。

20cmから22cmの部分には、ヒルムシロ属、ヒツジグサ属(それぞれ種実も出現)およびジュンサイ属の花粉が比較的多く出現した。また、シダ類のものと思われる一条溝型の胞子が26cmから30cmの深さに非常に多く出現したが、その種名は確認できていない。

池の誕生前の堆積層で草本類の花粉が非常に多く出現する結果から、当時の集水域が裸地化していたと結論することは単純にはできない。計数個体数が少ないので正確ではないが、裸地化した場合に多くみられるゼンマイの胞子数はそれほど多くはなかった。当時の水域は面積も非常に狭く、広い湿地帯がその周囲に広がり、したがって堆積した花粉は必然的に水域近傍の草本類のものが多くなる。しかし、高木類のなかでも、コナラ亜属などと比べてもマツ属の花粉の減少幅は非常に大きいことから、少なくとも集水域の山林の林相は現在のそれとはかなり異なるものであったと考えられる。

5. 現在の沢の池に生育する水生植物(湿地性の植物も含む)

Fig.4に平成7年度に調査した、沢の池における水生植物および湿地性植物の分布を示した。浮葉性の水生植物としてはヒツジグサおよびフトヒルムシロが西岸南部の湧水が湧出する地点の付近に生育している。またホソバミズヒキモが池の南部の水面を中心にして広く分布していたが、この年度以降にはほとんどその出現は見られなくなっている。

最も広範囲に分布して生育している種は、堆積物からその花粉や種実が多く見いだされるカヤツリグサ科の湿地性植物であった。なかでもヒメホタルイは沿岸付近から約1m程度の水深の地点までの広い範囲に分布していた。ハリイもヒメホタルイよりは浅い地点に点在しており、クログワイはヒツジグサやフトヒルムシロの近くに生育していた。アブノメ(ゴマノハグサ科)も水際近くに認められた。

すでに述べた沢の池の誕生以前の堆積層に認められた植物は、ここに示した現在分布している植物と共通の科や属の種類の植物が多いが、それ以外にジュンサイ属、コウホネ属、ミズゴケなどの蘚苔類、さらに池の中央部付近で採取した別の泥炭層からは、タヌキモ科、モウセンゴケ科の花粉も見いだされており、より多様性のある植物相を有する貧栄養の湿地帯であったと判断される。

同じく京都市の北部にある深泥が池は、厚い泥炭層、浮島、氷河期由来の遺存植物の存在により天然記念物に指定されている。沢の池の泥炭層の下層部にも *Eunotia* sp., *Frusturia* sp.などの珪藻類が多く認められ、かつミズゴケ類も見られる水域であったことは、高層湿原の生態系とも一部の共通点を有する湿原の環境であったと考えられる。両池沼でこのような自然環境が形成されてきたことの要因のひとつとして、京都市北部山地に多いチャートを母岩とする土壌の特質が重要ではないかと考えることができる。この土壌の集水域から流出する貧栄養の水に涵養された水域環境の中で、上記の植物層の生育や泥炭層の発達が両池沼において持続したものと考えられる。

この調査では使用したコアラーも小さく、コア採取も不完全なものであり、かつ花粉、種実類の同定範囲も限定されており、あくまで予備的なものである。どの程度の深さの泥炭層が堆積しているかにもよるが、京都市域に残された貴重な自然環境遺産の保全に資するためにも、沢の池誕生以前のこの地点の湿地環境についての調査研究は意義があると考えられる。

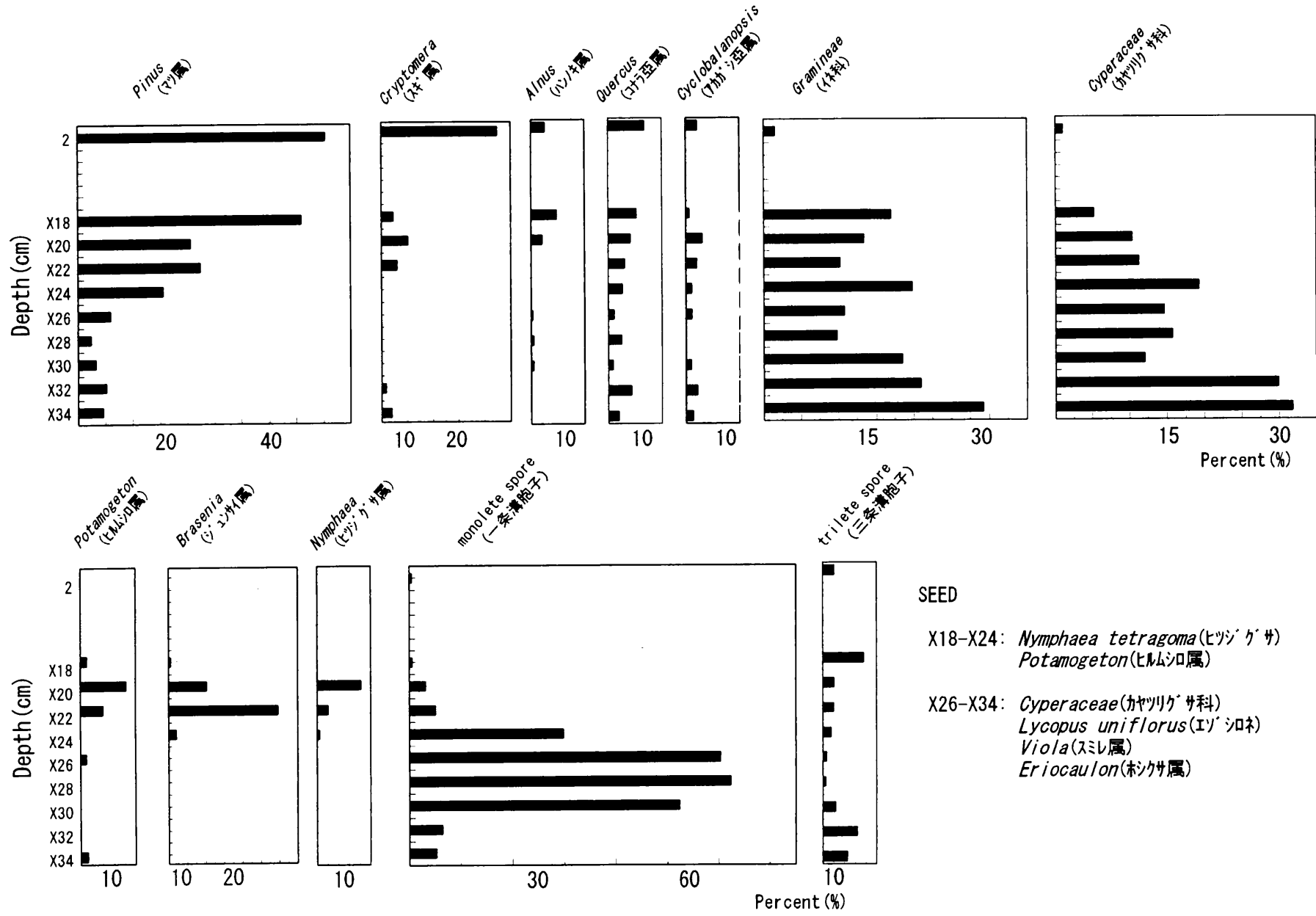


Fig.3 Profile of pollen diagram in the core from Sawanoike

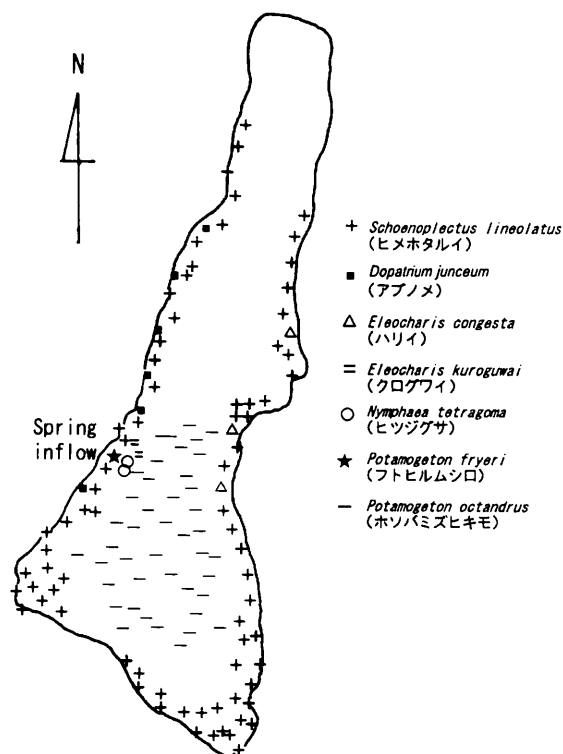


Fig.4 Distribution of aquatic plants in Sawanoike in 1994

IV まとめ

1. 沢の池は京都市北部の比較的広い谷間をせき止めて造成された池であるが、今回の調査の結果から、池の誕生前の時代においても、規模は小さいものの各種の水生植物や湿地性の植物が生育し泥炭層が堆積する、貧栄養の水域が存在することが確認された。

2. 花粉分析、珪藻分析、植物遺体の観察結果から、泥炭層の下部に相当する年代は貧栄養で酸性の水質のもと、カヤツリグサ科の植物などが生育する水深の浅い湿地帯であったと推定される。その上部の泥炭層堆積の時代は、より深い水深を有する水域に各種の浮葉性の植物などが生育し

ており、現在の沢の池には見られないジュンサイ属の植物も存在した。泥炭層の多くの部分には、貧栄養の水域に生育するミズゴケ類（複数の種類）の遺体も認められた。

3. 花粉分析の結果から、集水域の山林にはマツ属は少なかったと推定されるが、未同定の孢子も多く、当時の山林が裸地化していたかどうかの判断は難しい。

4. 堆積層から読みとられた上記の特質には、深泥が池の場合と同じく、京都市北部に多く分布するチャートを母岩とする土壌の特質が影響していると考えられる。

花粉分析、種実類の同定について、それぞれ高原光氏（京都府立大学）、南木睦彦氏（流通科学大学）の指導をいただいたことを感謝します。

また、蘚苔類の同定は、秋山弘之氏（兵庫県立人と自然の博物館）のご協力を得ました。

V 参考文献

- 1) 京都市衛生公害研究所環境部門：同研究所年報，62,95-99,(1996)
- 2) 京都市衛生公害研究所環境部門：同研究所年報，60,125-130,(1994)
- 3) 京都市衛生公害研究所環境部門：同研究所年報，60,116-124,(1994)
- 4) Nagumo, T., : Jpn. J. Diatomol., 10, 88,(1995)
- 5) Krammer, K. & H. Lange-Bertalot, Süßwasserflora von Mitteleuropa: Bacillariophyceae, (1986-1991)
- 6) Cleve-Euler, A., Die Diatomeen von Sweden und Finnland, (1951-1956)
- 7) Nakamura, J., : Diagnostic character of pollen grains of Japan, Osaka Museum of Natural History, Osaka, Part1-2,(1980)
- 8) 石川茂雄：原色日本植物種子図鑑，石川茂雄図鑑刊行委員会，(1994)
- 9) Dixit, S. S., et al. : J. Paleolim., 8, 27-47,(1993)

京都市の河川上流域の水質について

環境部門

Water quality in the upper reaches of the rivers in Kyoto City

Abstract: Chemical compounds in water in the upper reaches of the rivers in Kyoto were measured in order to estimate the influence of human activities. A few chemical compounds from pollution were detected in almost sampling points. In several points, the source of pollution was presumed to be generated from drainage of sightseeing visitors.

Key words: 河川水 river water, 生活排水 household sewage

I はじめに

京都市は北部を中心に山地が広がっており、その面積は約409km²と市域の約3分の2を占めている。この北山と東部及び西部の山々に囲まれた南部の盆地に市街地が形成されている。京都市の公共下水道は昭和5年から着手され、現在までに市街化区域のほぼ全域に整備されてきている。

しかし、自然豊かな山間部の地域は公共下水道の計画がなく、河川の良い水質を確保するために合併浄化槽の設置の促進を図るなど、生活排水対策を推進している。

河川の常時監視地点は、主として市街地とその下流を中心として設定されており、河川上流域では経常的な水質測定は実施されていない。

今回、河川上流域の水質を把握し、生活排水の河川の水質への影響をみるため、上流域にある集落の下流地点で水質調査を実施した。

II 調査方法

1. 調査地点

京都市の河川上流域の合計26地点について実施した。

その内訳は安曇川水系2地点、淀川水系24地点である。

図1に、河川水の採取地点を示した。また、各地点の河川名と上流域にある集落名及びそのおおよその人口を平成7年国勢調査結果¹⁾から算出し、表1に示した。

2. 調査期間

調査は1996年9月から11月にかけて各1回、比較的天候が安定していて河川が通常の流況と考えられる日の日中に採水した。

3. 調査方法

測定項目と分析方法を表2に示した。なお、陽イオンと陰イオンについてはメンブランフィルター(孔径0.45μm)

を用いてろ過後、測定を行った。

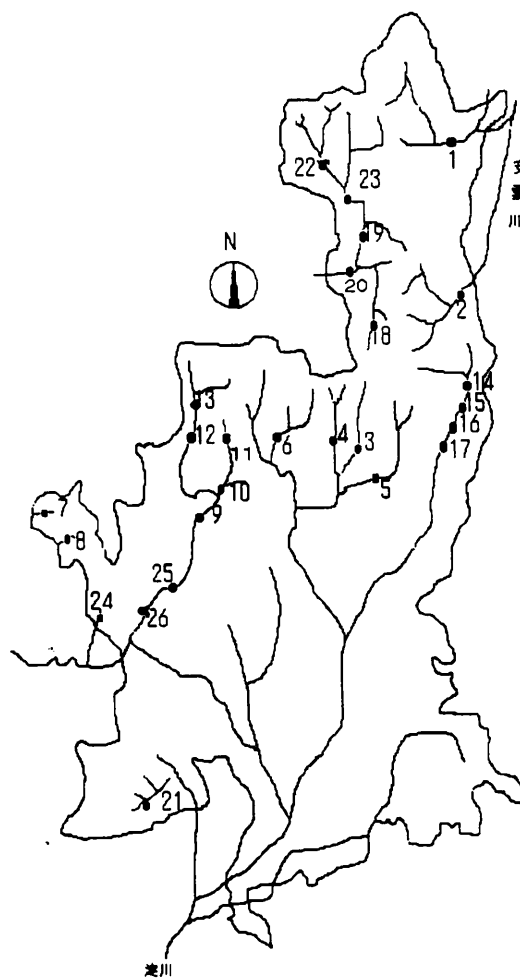


図1 河川水の採水地点

表1 採水地点の河川名とその上流域にある集落名および人口

番号	河川名	集落名	流域の人口(人)
1	久多川	久多	99
2	百井川	百井	69
3	鞍馬川	鞍馬	581
4	貴船川	貴船	128
5	静原川	静原	658
6	中津川	雲ヶ畑	112
7	三俣川	越畑	122
8	七谷川	樺原	69
9	清滝川	中川	416
10	杉坂川	杉坂	109
11	真弓川	真弓	70
12	清滝川	小野郷	299
13		大森	210
14		大原古知平	241
15	高野川		831
16		大原	712
17			767
18	別所川	花背別所	164
19	上桂川	大布施	73
20			104
21	小塩川	小塩	308
22			53
23	上桂川	広河原	42
24	水尾川	水尾	171
25	清滝川	高雄	296
26		清滝	82

表2 測定項目と分析方法

調査項目	分析方法
pH, BOD, COD, SS, 溶存酸素 電気伝導度, 全りん 蒸発残留物質	JIS K 0102 の方法
全窒素	全窒素分析計による方法
Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , NH ₄ ⁺	イオンクロマトグラフによる方法

Ⅲ 調査結果と考察

1. pHは図2に示すように、中性よりややアルカリ性に寄った値となっていた。

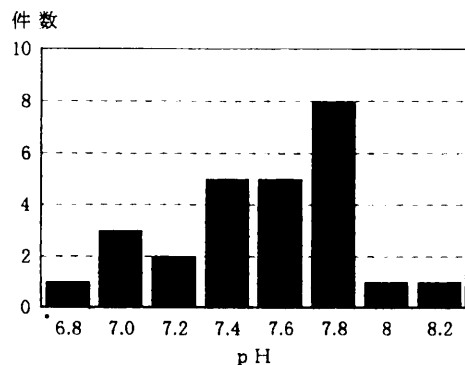


図2 pHのヒストグラム
(x軸の値7.0は6.9 < x ≤ 7.0の階級を示す)

2. COD, 電気伝導度, 全窒素, 全りんの濃度のヒストグラムを図3に示し、高い値を示した地点については、その地点番号をそれぞれ棒グラフの上部に示した。高い値を示したのは、地点16, 地点21, 地点26であり、他の地点はおおむね良好な水質であった。また、SSも2検体を除き、他はすべて5以下であった。

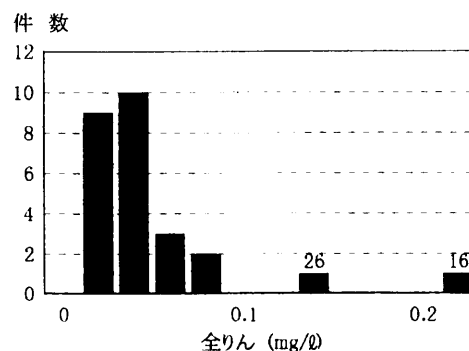
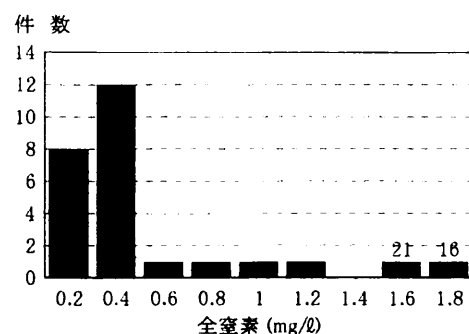
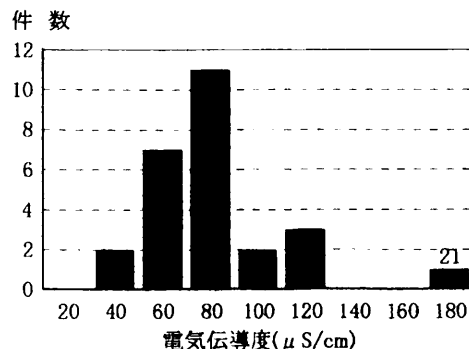
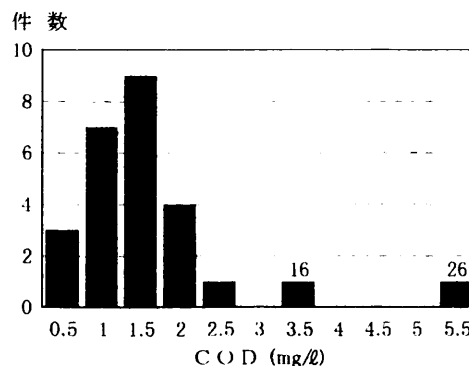


図3 COD, 電気伝導度, 全窒素, 全りんのヒストグラム
(x軸の階級値は図2と同じである)

3. 溶存酸素の飽和率は図4のようになり、溶存酸素はその水温においてほぼ飽和されていると考えられる。

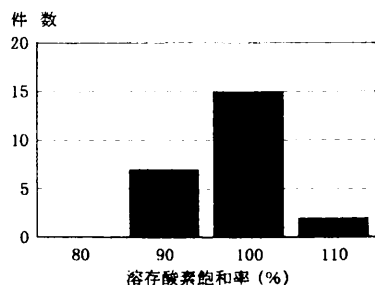


図4 溶存酸素の飽和率 (X軸の階級値は図2と同じである)

4. BODは2検体を除き、すべて1未満の清浄な水質であった。BODとCODの関係は図5のようになり、比例関係が認められた。

$$(BOD) \approx 0.5 \times (COD)$$

ただし、本調査のような場合には、BODを定量的に用いることは精度的にやや無理があると考えられる。

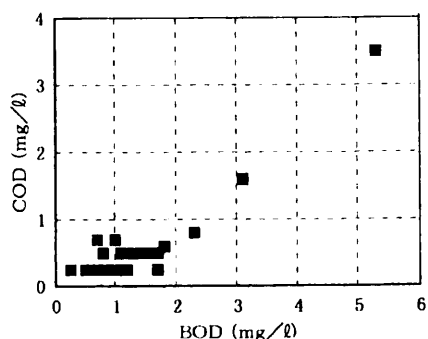


図5 BODとCODの関係 (但し0.5未満の値は0.25としてプロットした)

5. 蒸発残留物質は河川水中の含有成分の総量を表しており、電気伝導度との関係は図6のようになり、両者の間に

$$(\text{蒸発残留物質}) \approx 0.7 \times (\text{電気伝導度})$$

の関係が成立していた。これは総含有成分に対するイオンの割合がほぼ一定であることを示している。

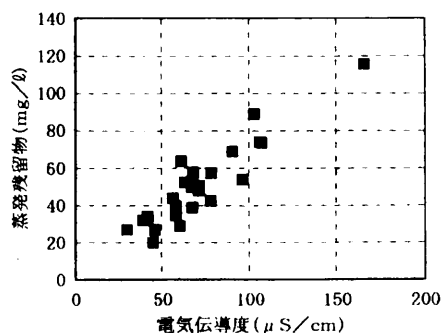


図6 蒸発残留物と電気伝導度の関係

6. 全窒素と硝酸性窒素の間には図7のような関係があり、生活排水の影響が認められる地点16を除くと、全窒素の約83%が硝酸態であった。

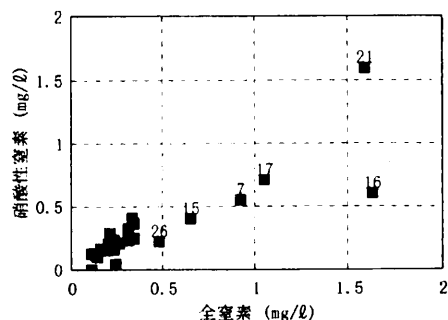


図7 全窒素と硝酸性窒素の関係 (プロット上の番号は地点番号を示す)

7. 溶存陽イオンおよび陰イオンの平均濃度を図8に示した。陽イオンでは、 Ca^{2+} 、 Na^{+} の濃度が比較的高く、 K^{+} の濃度は低かった。また、陰イオンでは、 HCO_3^{-} が最も濃度が高く、 NO_3^{-} の濃度は低かった。

なお、 HCO_3^{-} の濃度は、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NH_4^{+} の陽イオン当量濃度の和から Cl^{-} 、 SO_4^{2-} 、 NO_2^{-} 、 NO_3^{-} の陰イオン当量濃度の和を差し引いて求めた。

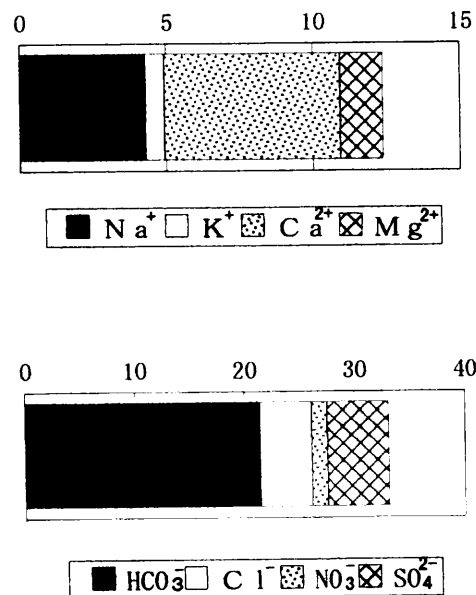


図8 陽イオンと陰イオンの平均濃度 (単位: mg/L)

8. 表3に京都市の河川水の源流域の水質の平均値²⁾と今回の水質検査結果の平均値を示した。同一河川での調査ではないため、正確な比較は出来ないが、両者の値は非常に

似ており、集落の生活排水の河川水への影響は少ないと考えられる。また、併せて図9の散布図に示したように、 Ca^{2+} — Mg^{2+} — HCO_3^- 間の相関が高く、集落の下流地点であっても、その水質は源流の水質に近い特徴²⁾を持っていた。

表3 川水の源流域の水質平均値 (n=16) と集落の下流地点の水質平均値の比較

測定項目 (単位)	源流域	集落の下流
pH	7.0	7.5
溶存酸素 (mg/l)	9.8	9.5
電気伝導度 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	69	71
蒸発残留物質 (mg/l)	51	51
Cl^- (mg/l)	3.3	4.7
SO_4^{2-} (mg/l)	6.1	5.7
NO_3^- (mg/l)	0.99	1.4
Na^+ (mg/l)	4.5	4.3
K^+ (mg/l)	0.8	0.7
Ca^{2+} (mg/l)	6.3	6.0
Mg^{2+} (mg/l)	1.5	1.5

9. 各河川別に生活排水の影響を見るため、図10に高野川、静原川、鞍馬川、貴船川、祖父谷川、岩屋川、清滝川の7河川の源流の水質³⁾と今回の水質検査結果の比較図を示した。溶存酸素を除くと、集落下流では源流の水質の各項目の値がやや高い傾向にあり、特に高野川の地点16と清滝川の地点26では顕著な生活排水の影響が認められた。

このような現象には、表1の人口の違いのみでなく、河川流量の大小や自浄作用、農林、畜産業の影響などいろいろな要因が関係していると思われる。さらに、顕著な影響が認められた地点16と地点26は、大原及び高雄、清滝という有名な観光地の下流であることから、観光に関連した排水の影響が大きいと考えられた。

Ⅳ まとめ

京都市の公共下水道は、現在までに市街化区域のほぼ全域に整備されてきているが、自然豊かな山間部の地域は公共下水道の計画がなく、河川の良好な水質を確保するための対策を推進している。

今回、上流域にある集落の生活排水の河川水への水質影響をみるため、水質調査を実施した。

上流域の水質は概ね源流の水質に近い清浄な水質であっ

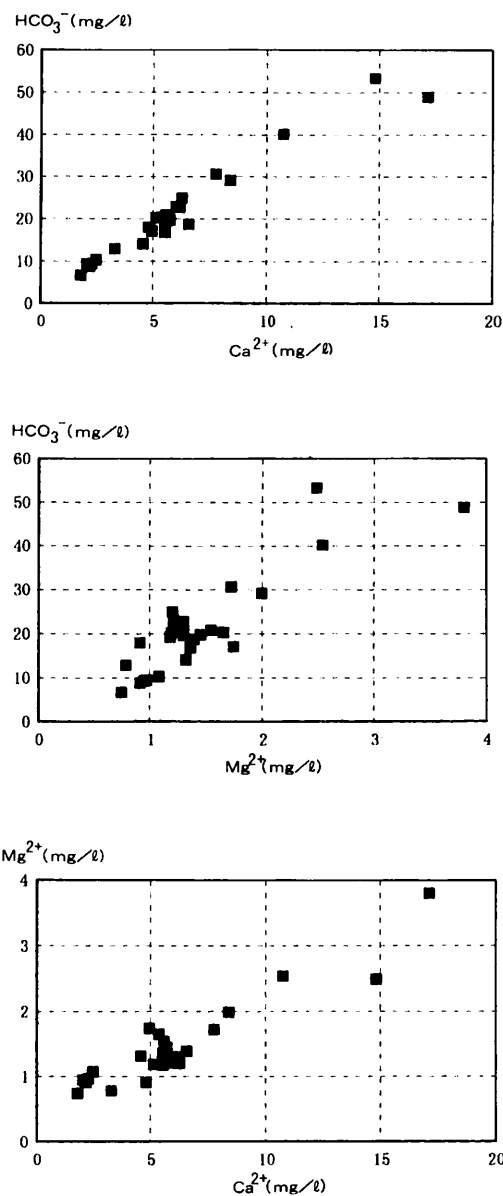


図9 Ca^{2+} — Mg^{2+} — HCO_3^- の散布図

た。しかし、観光地の下流である一部の地点では、観光に関連した生活排水によると考えられる影響が顕著に認められた。

Ⅴ 文献

- 1) 京都市企画調整局：「京都市の町別人口」(平成7年国勢調査)
- 2) 京都市衛研年報，No.55，89—96 (1989)
- 3) 京都市公害センター年報，No.5，67—74 (1984)

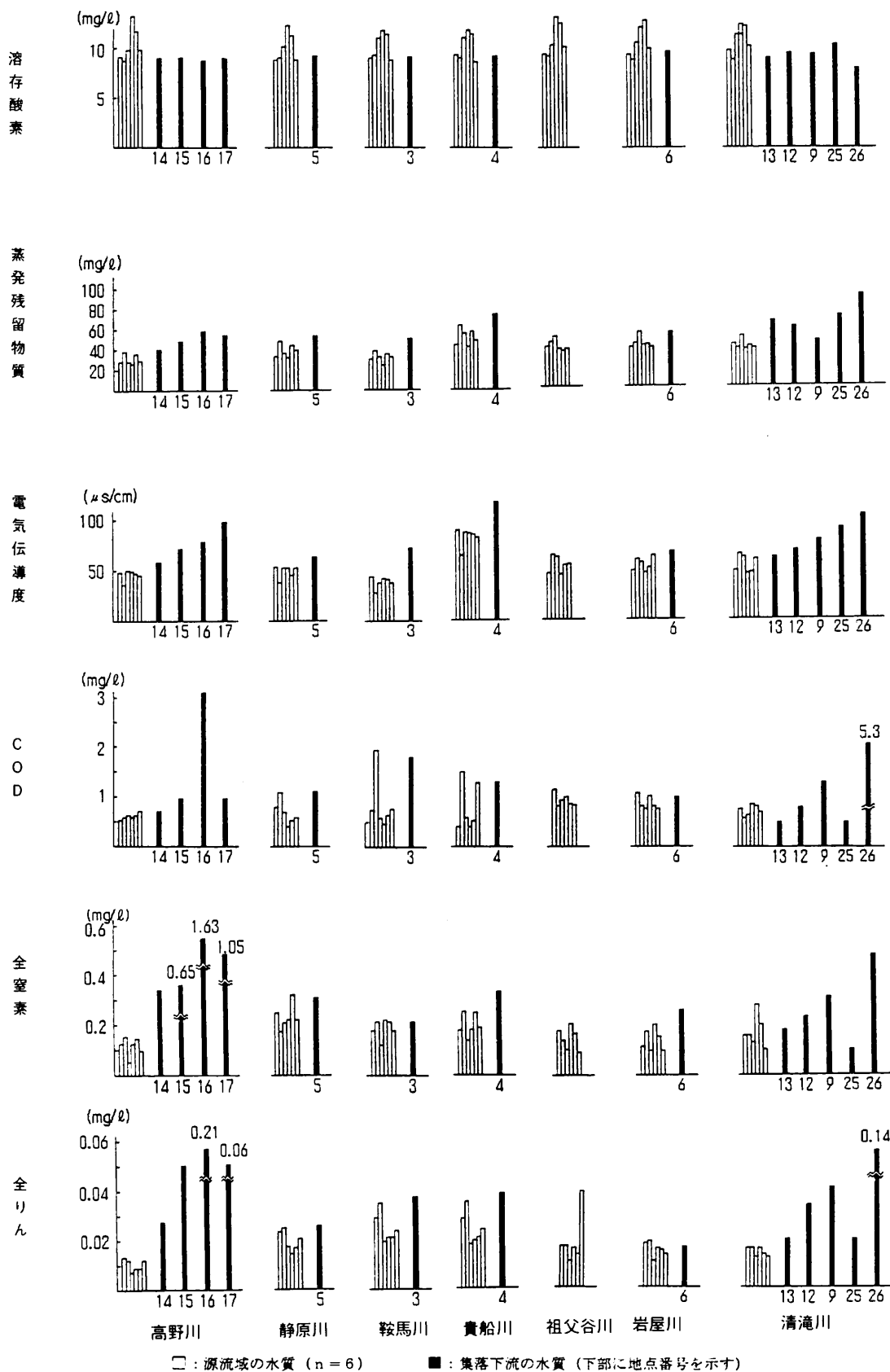


図10 源流域の水質と集落下流の水質

(高い測定値については、棒グラフの上部にその数値を示した。)

第 7 部 短 報

目 次

1. 市販食品中の放射能測定結果について (生活衛生) 113
2. 1996年度に当所で検出した病原性大腸菌について (臨 床) 115
3. 京都市と畜場における衛生対策について (病 理) 117
4. 牛枝肉の細菌汚染検査について (病 理) 120
5. パルスフィールドゲル電気泳動法による腸管出血性大腸菌 O 157 の
遺伝子解析 (調査研究) 122

Chapter 7 Short notes

Contents

1. Determination of cesium-134 and cesium-137 in commercial foods	(Food)	113
2. Strains of <i>Escherichia coli</i> detected in Kyoto City in the summer of 1996	(Clin)	115
3. Sanitarization in the slaughterhouse of Kyoto City	(Path)	117
4. Bacterial contamination in carcasses of the cattle	(Path)	120
5. DNA fingerprinting of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157 by pulse field gradient gel electrophoresis	(Pub)	122

市販食品中の放射能測定結果について

生活衛生部門

Determination of cesium-134 and cesium-137 in commercial foods

Key Words: 放射能汚染 radioactive contamination, セシウム-134 cesium-134, セシウム-137 cesium-137, ゲルマニウム半導体検出器付γ線スペクトロメーター gamma ray spectrometer by germanium detector, 輸入食品 imported foods

I はじめに

昭和61年4月、旧ソ連のチェルノブイリ原子力発電所の事故により、ヨーロッパを中心に広い地域が放射能で汚染された。このため昭和61年11月に、輸入食品中のセシウム-134とセシウム-137の放射濃度を1kg当たり370Bqとする暫定限度が定められた。このうちセシウム-137は、核分裂生成物の中で半減期が長いもの(約30年)に属し、長期にわたる汚染を調べる際に最も重要な放射性核種である。

京都市においては、市販食品の放射能汚染を監視するために、平成3年10月に放射能測定装置を導入し、同年11月から輸入食品を中心に市内に流通する食品の放射能検査を実施しており、今回これまでに測定した結果を報告する。

II 方法

1. 期間 平成3年11月～平成8年10月

2. 対象食品 京都市中央卸売市場及び市内を流通する食品

3. 装置 放射能測定装置：ゲルマニウム半導体検出器付γ線スペクトロメーター（キャンベラ社）及びスペクトル解析装置（東洋テクニカ社のPC/GAMMA）

4. 測定方法 細切均一化した試料を1ℓのマリネリ容器に、または試料が1kgに満たないものについては必要に応じ濃縮などの前処理を行い100mlのU-8容器に入れ、1Bq/kgまでは十分に測定できるように6～84時間放射能測定装置で測定しデータを解析定量した。

III 結果

1. 平成3年11月から平成8年10月までに、輸入品（原産地が国外のものを含む）271件、国内品165件の436件について放射能検査を行った。このうち輸入品20件、国内品28件からセシウム-137を1Bq/kg以上検出したが、全て暫定限度の1/10以下であった。

2. 食品別の測定結果を表1に示した。きのこと類を除けば、検出したのは、魚介類（鮭、鯛）4件、果実（パパイヤ）2件、乳製品（チーズ）1件、乳幼児食品（スキムミルク）1件、香辛料（キャラウェイ）1件で、全て5Bq/kg以下であった。

3. きのこと類の測定結果については表2に示した。検出率は生椎茸63%、干椎茸97%、松茸83%と高率であったが、他のきのこ6種（えのきだけ、しめじ、なめこ、マッシュルーム他）については検出しなかった。干椎茸は乾燥製品（水分約10%）のため生椎茸（水分約91%）に比べ高い値であるが、全て暫定限度の1/10以下であり、生椎茸に換算すると生椎茸と同じレベルであった。なお、干椎茸の輸入品は全て中国産であり、国内品のものと比較すると濃度が約1/10であり、地域によりセシウム量に差があった。本来、きのこ類はセシウムを取り込みやすいと言われており、椎茸については、ほだ木が過去から受けてきた放射能の影響を反映していると推測される。

4. 生産地域別の測定結果を表3に示した。このうちヨーロッパ地域については13か国の食品を測定したが、検出したのはデンマーク産のチーズ1件、ノルウェー産の鮭3件であり、いずれも暫定限度の1/100以下であった。アジア地域及び日本の検出件数が多いのは、きのこと類によるものである。なお、国内品で検出したもののうち、きのこと類以外はいずれも5Bq/kg以下であった。

5. 平成5年4月に、旧ソ連が放射性廃棄物を極東海域に海洋投棄していたことが明らかになり、その影響を調べるために、同年5月及び11月に日本海及び北海道周辺海域で獲れた魚介類20件を測定したが、全てセシウムは検出しなかった。

6. 平成7年9月から、フランスがムルロア環礁などで核実験を行ったため、平成8年4月に南太平洋産魚介類4件を測定したがセシウムは検出しなかった。

表 1 食品別放射能測定結果

食品の種類	輸入品	国内品
	検出件数/測定件数	検出件数/測定件数
きのこ類	14 / 21	25 / 40
魚介類及び海藻類	3 / 45	1 / 68
果実及びその加工品	2 / 69	—
野菜	0 / 16	0 / 25
肉類	0 / 25	—
穀物及びその加工品	0 / 29	—
乳製品	1 / 21	—
乳幼児食品	—	1 / 23
香辛料	0 / 10	1 / 9
ワイン	0 / 8	—
ナッツ類	0 / 12	—
その他の加工食品	0 / 15	—
合 計	20 / 271	28 / 165

表 3 生産地域別放射能測定結果

生産地域名	検出件数/測定件数	検出食品目
ヨーロッパ	4 / 78	鮭, チーズ
北アメリカ	3 / 63	松茸, パパイア
南アメリカ	1 / 10	松茸
中近東	0 / 3	
アフリカ	0 / 1	
オセアニア	0 / 32	
アジア	12 / 84	生椎茸, 松茸
日本	28 / 165	生・干椎茸, 鯛 スミミツ, キャウイ

Ⅳ まとめ

平成3年から平成8年にかけて、436件の市販食品について放射能の測定を行った。そのうち48件からセシウム-137を検出したが、全て暫定限度の1/10以下であった。そしてその大半はきのこ類であり、きのこ類以外は全て5 Bq/kg以下であった。

チェルノブイリの事故発生からすでに10年が経過しており、今回の測定結果からはその影響は減少しているように思われる。しかし国内外の原子力関連の事故による放射能汚染については、国民の不安及び関心は強く、今後も市販食品の安全確保のため調査を継続していく必要があると思われる。

表 2 きのこと類の放射能測定結果

種類	測定 件数	濃度別件数 (項目の単位: Bq/kg)						平均値 (Bq/kg)
		不検出	～5	～10	～20	～30	～40	
生椎茸 (輸入品)	2	2						<1
(国内品)	6	1	4	1				2.4
干椎茸 (輸入品)	10	1	9					1.5
(国内品)	20	0	2	2	9	4	3	17.6
松 茸 (輸入品)	6	1	3	2				3.3
その他(6種) (輸入品)	3	3						<1
(国内品)	14	14						<1

1996年度に当所で検出した病原性大腸菌について

臨床部門

Strains of *Escherichia coli* detected in Kyoto City in the summer of 1996

Key words: 病原性大腸菌 *Escherichia coli*, 腸管出血性大腸菌 EHEC, 腸管病原性大腸菌 EPEC, O157

I はじめに

平成8年の夏、突然西日本から流行が始まった腸管出血性大腸菌O157はまたたく間に全国へと広がり、京都市でも死者が出るというショッキングな事態となった。対策本部設置に伴い、検査要請も増大した。その際、糞便から検出した病原性大腸菌について報告する。

II 期間及び対象

平成8年7月17日から8月31日までに腸管出血性大腸菌感染の疑いがあるとして、医師より保健所に届出があった患者及びその家族の糞便1,494検体を対象とした。また、その結果を過去5年間に当所で検出した病原性大腸菌と比較検討した。

III 結 果

1. 検出状況

病原性大腸菌の検出率は7.70%であり、検出されたもののうち20.0%がEHEC, 80.0%がEPECであった(表-1)。

血清型別では、O1が38例と最も多く、次いでO157 27例、O18 8例、O125 6例と続く。

その他では、O26, O20, O128等食中毒菌検査時にしばしば検出される型がみられた(図-1)。

なお、初発患者発生から終息宣言までに39件のO157を検出した。

2. 症状

医師から届出があった時点で保健所により聞取調査が行われた結果、症状が有った者45名(39.1%)、症状が無かった者66名(57.4%)、不明4名(3.5%)であった。

血清型別で症状の有無をみると、O157, O25, O26で症状有りの割合が高く、逆に検出率が高かったO1, O18では症状有りの割合が23.7%, 25.0%と低かった(図-2)。

有症者の症状別割合を図-3に示す。下痢・腹痛が48.9%で最も高く、次いで下痢・腹痛・発熱の22.2%であった。

表-1 病原性大腸菌検出状況

平成8年7月17日～8月31日

検査件数	検出件数(%)	
1,494	EHEC	EPEC
	115(7.70)	
	23(1.54)	92(6.16)

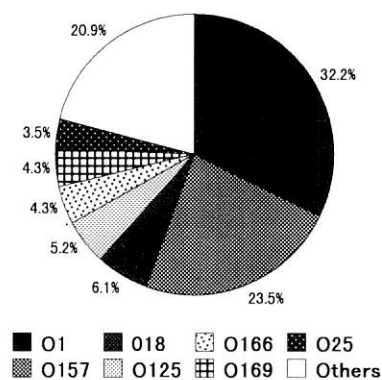


図-1 血清型別検出状況(1996年度)

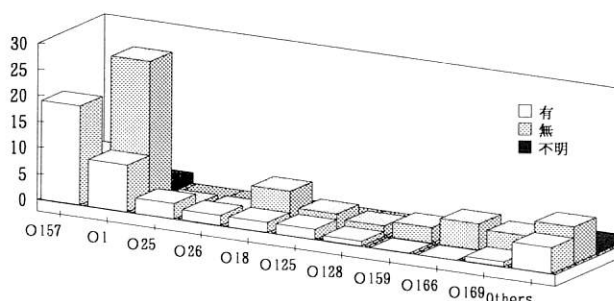


図-2 血清型別症状有無(%) (1996年度)

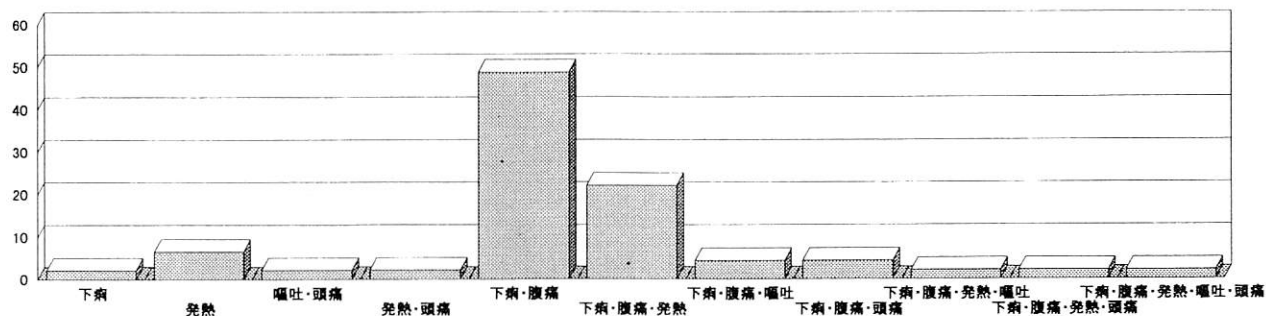


図-3 症状別割合 (%) (1996年度)

症状(複数回答)からみると下痢が88.9%、腹痛86.7%、発熱37.8%と続き、O157を検出した人は症状の数が多い傾向がみられた。

O157を検出した人のうち症状があった者70.4%、無い者29.6%で、毒素を検出したにもかかわらず症状が無い者4名(14.8%)もみられ、健康保菌者と流行との関係が懸念される(表-2)。

表-2 検出したO157の毒素型 (1996年度)

	VT1(+)/VT2(+)	VT1(-)/VT2(+)	VT1(-)/VT2(-)	計
症状有	15	3	1	19
症状無	4	0	4	8
計	19	3	5	27

3. 食中毒関連調査での検出率の経年変化

平成3年度から8年12月までの食中毒関連調査で糞便から検出された病原性大腸菌の検出率は10%前後で推移している。

7年度の食中毒関連調査での検出率(19.0%)が高いのは病原性大腸菌を原因とする食中毒が2件発生したことによるものと思われる(図-4)。

血清型O1, O18, O25について平成3年度からの推移をみたとき、O18は年々減少傾向を示した。7年度にO25が高い割合であったのは、O25を原因とする食中毒事例があったためである。本年のO157に関わる調査も含めた結果(4~12月)では、O1が高く、O25が低い傾向を示した(図-5)。

IV 考 察

病原性大腸菌は起因菌としてあまり重要視されていなかったが、平成9年になっても冬期にもかかわらず全国的にO157による患者発生がみられ、今回のO157事例での経験からも、今後とも動向をみていく必要があると思われる。

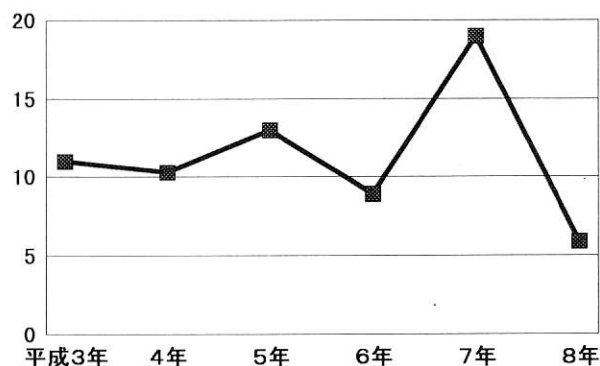


図-4 病原性大腸菌検出状況 (%) (過去6年間)

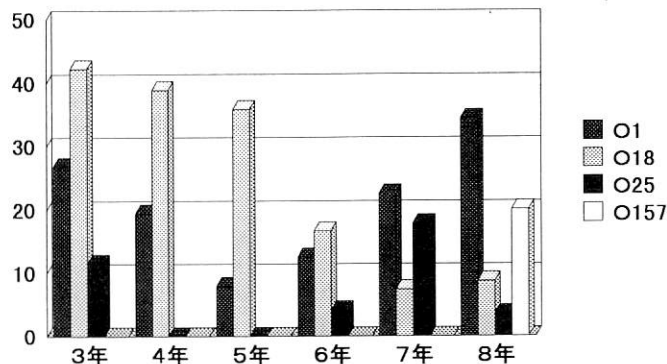


図-5 O1, O18, O25, O157検出率 (%) (過去6年間)

京都市と畜場における衛生対策について

病理部門

Sanitarization in the slaughterhouse of Kyoto City

Key Words: 牛枝肉 cattle carcass, 腸管出血性大腸菌 O157 VTEC O157, 危害分析重要管理点 hazard analysis critical control point

I はじめに

平成8年5月に岡山県で発生した腸管出血性大腸菌 O157 (以後 VTEC O157) 食中毒は、その後全国的に散発例として発生し、7月に大阪府堺市において大規模集団発生例をみるに至り、また京都市においても成人男性の死亡例が報告された。

VTEC O157は食品又は飲料水中に100個程度含まれているだけでも大腸粘膜へ接着、増殖し、出血性腸炎を起こし溶血性尿毒症症候群を続発することが知られている。

本菌の感染源としては欧米では牛から高頻度に分離され、アメリカ、カナダ及びイギリスの集団事例でも原因食品としてハンバーガー (牛挽肉)、ローストビーフ等の畜牛製品が多くあげられ、牛が最重要視されている。

食肉の生産現場であると畜場の衛生管理について、従来の特定疾病排除の考え方に加え、微生物汚染防止の重要性が検討されてきたが、これを契機にと畜場法施行規則の改正がなされ、微生物制御にも配慮し、HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point 危害分析重要管理点) の考え方を導入した新しい衛生管理基準が設定された。

そこで平成8年度に京都市と畜場で行った VTEC O157 実態調査及び衛生対策についてまとめたので報告する。

II VTEC O157実態調査

平成8年7月22日全食検協第26号「腸管出血性大腸菌(病原性大腸菌 O157) に係る食肉等の実態調査について」に基づいて検査した。

検査材料は、表1のとおりである。

表中の自主検査とは、平成8年7月26日衛乳第182号「と畜場及び食肉処理場の衛生管理について」の通知により、病理部門が検査することとなったもので EIA キット (VIP、バイオコントロール社) で判定した。

堺市関連調査は7月に発生した堺市 O157 食中毒事件のもので、京都市と畜場で解体した牛肉が給食食材として流通していたとのことで、施設等について検査したものである。

なお、今年度は VTEC O157 食中毒とともに、サルモネラ菌による食中毒も多発していることから、12月に直腸内容物100頭分についてサルモネラ菌も併せて検査を行ったが、すべて陰性であった。

表1 VTEC O157検査状況

検査材料	検体数
直腸内容物	213
牛	175
豚	38
ふきとり	63
牛枝肉	50
胸	30
骨盤腔	10
脇	10
牛肝臓	12
豚カット肉	1
堺市関連調査	14
検査台等	5
作業床、溝	4
枝肉洗浄水	3
水 (井水)	2
自主検査 (ふきとり)	91
牛枝肉	32
牛肝臓	30
牛カット肉	29
合計	381

III 衛生対策

1. と畜場整備計画

現在、平成9年度着工完成、平成10年度当初から新施設で作業開始予定の牛と室整備計画があり、平成8年度予算化に向け、平成7年度から施設設備基準について、平成6年6月23日衛乳第97号「と畜場の施設及び設備に関するガイドラインについて」に基づき協議検討してきた。

平成8年12月25日と畜場法施行規則の改正が行われ、と畜場の設置者又は管理者並びにと畜業者らが講ずべき衛生管理基準が見直され、これには施設整備を伴うが、「と畜場の施設及び設備に関するガイドラインについて」を基本にしているため、大幅な計画変更はなかった。

ただし、牛けい留場については、次期計画で行う予定であったが、繰り上げて今回整備されることになった。

主要な改造点

- 1) と室のドライシステム化
- 2) と体の処理ラインについて放血からのオンレール方式の採用
- 3) 汚染解体区画と清浄解体区画の分離
- 4) 自動剥皮機の導入
- 5) 83℃以上の消毒設備の導入
- 6) 内臓摘出時、胃腸と他の臓器を分離して別レーンで搬送する方式への変更
- 7) 内臓処理室(1階)への胃腸以外の臓器搬送用シュートの廃止

2. 場内衛生指導

7月当初から京都食肉市場(株)、京都副生物卸協同組合、京都食肉臓器小売商協同組合等の場内各業者に対し衛生指導を行ってきたが、さらに平成8年7月26日衛乳第182号「と畜場及び食肉処理場の衛生管理について」通知後は、これに基づいて引き続き衛生指導を行った。8月に講習会を場内各業者を対象に2回実施し、また各関係者に検便を実施させた。7月22日「京都市O157緊急対策本部」が設置されたのを受けて、京都市中央卸売市場第2市場長を本部長とし、場内各関係者を統合した「京都市中央卸売市場O157対策本部」が設置され、この中で衛生対策について協議がなされた。その後12月に「京都市O157緊急対策本部」が解散されることになったが、と畜場の衛生管理の重要性和と畜場法施行規則改正への対応等により、「食肉安全向上委員会」と名称を変え、衛生管理について引き続き話し合うことになった。

と殺解体工程に関しては、平成8年7月26日衛乳第182号「と畜場及び食肉処理場の衛生管理について」に基づき、また12月に改正されたと畜場法施行規則に基づき指導を行った。

主な指導改善内容

- 1) 生体時の尻部の消毒
- 2) 食道、直腸結紮
- 3) 胃腸と他の内臓を別レーンで搬送するように
- 4) と殺解体従事者に当面軍手を1日1双使用すること

できるだけ速やかに軍手の使用を止め素手かゴム手袋等を使用すること

- 5) と殺解体従事者に手指、刀の洗浄消毒の実施(消毒薬配布)
- 6) 内臓取扱者及び場内食肉処理場従事者に手指、刀の洗浄消毒の実施(消毒薬配布)
- 7) 内臓搬送用シュートの定期的な洗浄消毒の実施
- 8) 各施設設備の定期的な洗浄消毒の実施
(病理部門において週1回消毒実施)
- 9) 尾が皮とともにシュートで搬送されていたので、尾をビニール袋に入れるように
- 10) 牛ノッキング弁手前にシャワー設置
- 11) 床面での剥皮からオンレールの間の枝肉接触防止対策としてランディングの改善(平成9年4月から)

IV 今後の衛生対策

平成5年度厚生科学研究「食肉及び食鳥肉の病原微生物・有害物質等汚染制御に関する調査研究」によると、対米輸出食肉認定と畜場3カ所とその他のと畜場11カ所を対象に、牛の枝肉(胸部、腹部、頸部及び胸腔部)の生菌数、大腸菌群数の比較が行われ、対米輸出食肉認定と畜場では生菌数が平均 4×10 個/cm²、大腸菌群数が平均1個/cm²であったのに対し、その他のと畜場の生菌数は平均 9×10^2 個/cm²、大腸菌群数が平均3個/cm²で、対米輸出食肉認定と畜場の方が微生物制御に優れているという結果になっている。

そこで、牛のと殺解体工程でのと体が微生物汚染を受けるポイントが明らかにされ、

1. 搬入及びけい留時の糞便等による生体汚染
2. 処理工程での胸、腹部の一部剥皮
3. 全剥皮
4. 内臓摘出時の腸管損傷等

が、最も高い重要管理点であると判定された。

今年度、厚生省内に設置された「食肉の汚染実態に関する調査研究班」が食肉のVTEC O157汚染実態調査を実施し、11月にその結果及び汚染防止対策について中間報告がなされた。これによると、牛糞便については4,185頭中58頭(1.4%)から、牛枝肉については2,534頭中7頭(0.3%)からVTEC O157が検出され、と殺解体を行う際には牛が保菌しているという前提に立っての作業管理が必要で、また食肉への汚染はと殺解体作業中腸管内容及び外皮等から枝肉への汚染に起因することが明らかとなり、衛生的なと殺解体工程の徹底を計る上でHACCPシステムによる手法を含んだ自主衛生管理体制の確立が必要であるとして

いる。

京都市と畜場における枝肉の微生物汚染状況は、平成7年度調査では、生菌数が胸部平均 2.8×10^4 個/cm²、腰部平均 4.6×10^3 個/cm²、大腸菌群数は胸部平均 1.1×10^6 個/cm²、腰部平均 1.0×10^6 個/cm²であり、と殺解体作業上見直すべき点が存在し、改善の余地が残されているのが実状である。

今年度7月以降衛生指導による改善を行い、作業管理の衛生的取扱いについての向上に努力してきたが、さらに微生物コントロールをより確実なものとし、食肉の衛生水準を向上し、安全な食肉を提供するためには、施設設備等のハード面での衛生要件の改善とともに、従事者の衛生意識の向上や取扱いに関するマニュアルの作成等ソフト面での充実が必要不可欠である。

改正されたと畜場法施行規則にも HACCP の考え方が導入されており、次に掲げた基本的な CCP（重要管理点）に具体的な肉付け作業を行い、マニュアル化した自主衛生管理体制の確立を早期に計る必要がある。

生体搬入、けい留

体表の汚れ	これが剥皮作業等により枝肉を汚染する
けい留施設	定期的な洗浄消毒、破損箇所の修繕、整備

と殺、放血、剥皮

体表の汚れ	枝肉汚染の原因になる
不適切な放血作業	消化管からの汚染原因
と体の接触	接触することで汚染拡大
と室の床、壁面の汚れ	水の使用による飛散及び微生物の残存
ナイフの汚れ	体表、消化管内容物による汚染の拡大
従事者の手指の汚れ	軍手の使用を止め、ゴム手袋等か素手による作業を行い、1工程1頭毎の消毒
食道結紮	胃内容物の逆流防止（現行結紮部位に問題あり）
直腸結紮	直腸からの汚染防止（結紮すると同時に肛門周囲の汚れが枝肉を汚染しない工夫が必要）
剥皮時の開腹をできるだけ小さく	消化管脱落防止
内臓摘出	消化管を傷つけることによる内容物からの汚染
床、壁面の汚れ	水の使用による飛散及び微生物の残存
ナイフの汚れ	体表、消化管内容物による汚染の拡大
従事者の手指の汚れ	軍手の使用を止め、ゴム手袋等か素手による作業を行い、1工程1頭毎の消毒

背割り

ノコによる汚染	1頭毎の消毒
床、壁面の汚れ	水の使用による飛散及び微生物の残存
ナイフの汚れ	体表、消化管内容物による汚染の拡大
従事者の手指の汚れ	軍手の使用を止め、ゴム手袋等か素手による作業を行い、1工程1頭毎の消毒

枝肉洗浄

洗浄水の跳ね返りによる再汚染防止	
床、壁面の汚れ	水の使用による飛散及び微生物の残存
ナイフの汚れ	体表、消化管内容物による汚染の拡大
従事者の手指の汚れ	軍手の使用を止め、ゴム手袋等か素手による作業を行い、1工程1頭毎の消毒
洗浄は整形後の最終工程で	

整形

枝肉の接触	接触することで汚染拡大
汚染部位のトリミング	汚染部位を切除することにより汚染拡大防止
床、壁面の汚れ	水の使用による飛散及び微生物の残存
ナイフの汚れ	体表、消化管内容物による汚染の拡大
従事者の手指の汚れ	軍手の使用を止め、ゴム手袋等か素手による作業を行い、1工程1頭毎の消毒

牛枝肉の細菌汚染検査について

病理部門

Bacterial contamination in carcasses of the cattle

Key Words: 牛 cattle, 枝肉 carcass, 細菌汚染 bacterial contamination

I はじめに

O157が社会問題となり、食肉の微生物汚染制御が注目され、より衛生的な食肉の供給が重要になってきているなか、HACCPの導入に向けたと畜場施行規則の改正により、本市と畜場の場内施設・設備の改善計画が進められているが、体表汚物や消化管内容物による枝肉の汚染をはじめ、作業工程における微生物汚染が問題となり、本市と畜場においても食道・肛門結紮の実施や衛生意識の向上を図っている。牛の解体処理過程において、本施設における枝肉の細菌汚染状況を把握し、場内施設・設備の改善及び衛生指導に向けた資料作成のために検査を実施した。

II 調査方法

1. 調査期間 平成8年9月～9年1月

2. 検査項目 一般生菌数、大腸菌群数

3. 検体の採取部位と採取方法

〈作業工程〉

打額→ 放血 → 頭部切り離し→ 胸・腹部一部剥皮
→ 前後肢剥皮 → 懸吊 → 背部剥皮 → 胸割
→ 尾部切り離し → 内臓摘出 → 背割り → 水洗
→ 整形・枝肉検査 → 最終洗浄 → 冷蔵庫入庫

検体は懸吊後背部剥皮前の牛枝肉及び最終洗浄後冷蔵庫入庫直前の牛枝肉を対象とし、検査1回当たり5頭の採取

を計4回実施し、合計20頭についてふきとり検査を行った。また、関連調査として、胸部剥皮直後の牛枝肉5頭についてもふきとり検査を実施した。

採取方法は滅菌ガーゼタンポンで胸部の枝肉表面100cm²をふきとり、その細菌数を求めた。

4. 検査方法

一般生菌数は標準寒天培地を、大腸菌群数についてはデソキシコーレート寒天培地を用い、混釈培養法により定量測定した。

III 結果

一般生菌数は懸吊後の枝肉では100cm²あたり $9.2 \times 10^4 \sim 7.5 \times 10^6$ 個で平均値は 1.6×10^6 個であった。冷蔵庫入庫直前の枝肉では $3.5 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^6$ 個で平均値は 2.0×10^5 個であった。

大腸菌群数は懸吊後の枝肉では100cm²あたり $2.0 \times 10 \sim 1.9 \times 10^4$ 個、冷蔵庫入庫直前の枝肉では $0 \sim 9.5 \times 10^3$ 個であった。各々の平均値は 1.8×10^3 個及び 1.7×10^2 個であった。

また、皮剥ぎ直後5検体の一般生菌数の平均は 8.4×10^4 個で、大腸菌群数の平均は 3.0×10^3 個であった。

これら細菌汚染状況を表1に示し、その分布を表2、表3に示した。

表1. 牛枝肉における細菌汚染状況

個/100cm²

		最大値	最小値	平均値
一般生菌数	胸部剥皮懸吊後 (n=20)	7.5×10^6	9.2×10^4	1.6×10^6
	冷蔵庫入庫直前 (n=20)	2.0×10^6	3.5×10^3	2.0×10^5
	胸部剥皮直後 (n=5)	3.0×10^5	3.6×10^2	8.4×10^4
大腸菌群数	胸部剥皮懸吊後 (n=20)	1.9×10^4	2.0×10	1.8×10^3
	冷蔵庫入庫直前 (n=20)	9.5×10^3	0	1.7×10^2
	胸部剥皮直後 (n=5)	1.4×10^4	4.0×10	3.0×10^3

表 2. 牛枝肉における細菌分布状況 一般生菌数 個/100cm²

オーダー	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6 \leq$
胸部剥皮懸吊後 (n=20)			1	9	10
冷蔵庫入庫直前 (n=20)		3	12	4	1
胸部剥皮直後 (n= 5)	1	2	1	1	

表 3. 牛枝肉における細菌分布状況 大腸菌群数 個/100cm²

オーダー	$<10^1$	$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$
胸部剥皮懸吊後 (n=20)		4	11	4	1
冷蔵庫入庫直前 (n=20)	1	12	7		
胸部剥皮直後 (n= 5)		2	2		1

Ⅳ 考 察

解体処理工程からみた細菌汚染状況は懸吊後と冷蔵庫入庫直前を比較すると一般生菌数、大腸菌群数いずれも冷蔵庫入庫直前は1オーダー減少した。しかしながら、懸吊後の牛枝肉でかなりの汚染がみられることから、どの時点で汚染されているかを調べるため、まず皮剥ぎ直後のふきとりを行った。この時点で個体によりかなりの細菌汚染が確認された。打額から放血し、作業員による剥皮が行われるが、正中を切開する時にナイフと正中中部が汚染され、さらに作業員の作業がランダムに行われ、正中切開の人、皮剥ぎの人が牛一頭毎に異なることによる汚染の拡散が考えられる。また同一時に実施した5頭の個体差が大きいことから、手指及びナイフ等による局所的な汚染が考えられる。また、懸吊されてからは枝肉間の接触による相互汚染が起こりえる状況下にあるため、細菌汚染の増加がみられる。枝肉の最終洗浄は加圧ピストルによって行われているが、この方法によりいくらかの細菌を水で洗い流すことができる反面、枝肉全体に菌を拡散させ、細菌汚染を拡大させることになる。

平成7年の全国食肉検査所協議会の「と畜場における枝肉の細菌汚染実態調査報告」によると枝肉洗浄後、冷蔵庫に搬入される前の牛枝肉の胸部の細菌数の平均値は 6.8×10^5 個/100cm² (中央値 7.3×10^4 個)であり、大腸菌群数の平均値は 6.9×10^3 個/100cm² (中央値<100個)であった。それに関連した平成7年の本市の調査結果 (n=70) では一般生菌数は 2.8×10^6 個、大腸菌群数は 1.1×10^3 個であった。今回の調査では、一般生菌数、大腸菌群数のいずれもその平均値をやや下回った。

牛の解体処理過程において、本施設における枝肉の細菌

汚染実態は、平成7年度の調査に比べ、いくらかは改善している。これはやはり昨夏のO157による食中毒事件等による食肉衛生意識の高まりや作業工程における食道・肛門結紮の導入の結果によるものと思われる。しかし、解体の初期の段階での細菌汚染がみられることを受け止めねばならない。胸部剥皮直後の汚染が最終的な枝肉の微生物制御に影響するので、生体の糞便・塵埃等の体表汚染や手指及びナイフによる汚染を防止していくことがかなり重要である。

微生物汚染に対する衛生意識の高揚ならびに HACCP の導入に向けた省令の改正に対応した本市と畜場の場内施設、設備の改善計画に向けて、現時点では、剥皮及び内臓摘出時の枝肉の汚染防止、獣毛や消化管内容物等の汚染に対する枝肉の徹底したトリミングの実施、一頭毎の手指や器具の消毒及び洗浄の実施、作業員の衛生教育などにより、微生物汚染を最小限に抑えるように努めていかなければならない。また、出荷者に対し体表を洗浄した清潔な家畜を搬入するよう指導、生体時の体表の入念な洗浄の実施等の作業方法の再検討、衛生管理マニュアルを作成し、微生物汚染制御に対する意識を高めていくことが必要である。

パルスフィールドゲル電気泳動法による腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子解析

調査研究部門

DNA fingerprinting of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 by Pulsed-field gradient gel electrophoresis

Key Words: 腸管出血性大腸菌 O157 enterohemorrhagic *E. coli* O157, パルスフィールドゲル電気泳動 PFGE

I はじめに

平成8年5月下旬に起きた岡山県邑久町における腸管出血性大腸菌 O157 による集団食中毒事件以来、大阪府堺市の患者5,000名を上回る食中毒事件を初めとして、全国各地で O157 による食中毒が相次いで発生した。京都市においても例外ではなく、同年7月中旬に O157 を検出して以来、12月末に至るまでに39件にのぼる事例が報告されている。この腸管出血性大腸菌 O157 の感染力は非常に強く、一般の食中毒菌では10万～100万個以上を摂取しないと発症しないと言われているのに対し、O157 ではわずか100～1,000個の少数摂取でも発症すると考えられている。また、症状も一般に重篤で、HUS を併発して死に至る場合もあり、公衆衛生上、特に注意を要する病原菌であり、新たな患者の発生、あるいは二次感染を防ぐため、感染ルート及び感染源の解明が必要である。しかし O157 の場合、感染から発症までの潜伏期間は4～8日と長く、このことが感染ルートあるいは感染源特定のための大きな障害となっている。

近年、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法の発達により、遺伝子パターンの解析が比較的容易にできるようになり、O157、MRSA等の疫学的調査に応用されるようになってきた^{1)～5)}。そこで平成8年7月から12月にかけて京都市内で分離された O157 菌株を用いて、PFGE 法による遺伝子解析を行い、各事例間の関連性を検討した。

II 実験方法

1. 検体

平成8年7月から同年12月までに当衛生公害研究所臨床部門、微生物部門で分離し、保存されている O157 菌株計36株を用いて遺伝子解析を行った。

2. Pulsed-field gradient gel electrophoresis (PFGE)法

国立感染症研究所(感染研)の方法に準じて行った。即ち、普通寒天培地(栄研化学)上で培養した菌株を白金耳で適当

量取り、蒸留水(和光純薬、遺伝子工学研究用)200 μ lに懸濁した(610nm, OD=2)。この菌懸濁液に溶解した1%寒天(ローメルト・アガロース, Bio-Rad)200 μ lを加え、攪拌後、プラグ・モルド(Bio-Rad)に入れ、氷上で30分放置して固まらせた。このプラグを0.1%リゾチム(和光純薬、生化学用)含有0.5M EDTA (pH8.0; 和光純薬、遺伝子工学研究用)1ml中に入れ、37℃で4時間以上反応させ細胞壁を破壊した。その後、リゾチム・EDTA溶液を捨て、0.1%プロテイナーゼK(和光純薬、生化学用)、1%ラウロリルサルコシン(Sigma)含有0.5M EDTA (pH8.0)1mlを加え、50℃で一晩反応させ、蛋白を分解した。反応後プラグを取り出し、半分に分断し、その一片を1mM PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride; Sigma)を含むTE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0; 和光純薬、生化学用)1ml中に入れ、穏やかに攪拌しながら50℃で30分間処理した。この操作を更に一回行いプロテイナーゼを失活させた後、TE 1mlに換え氷上で30分間振とうした。その後TEを捨て、酵素反応緩衝液(75mM NaCl M-buffer: Takara M-bufferにNaClを添加)0.2mlを加え、氷上で30分間振とうした後、制限酵素含有M-buffer (Xba-I, 30units; Takara)0.2mlに換え、37℃で一晩反応させた。反応後、酵素液を0.5 $\times$ TBE (10 $\times$ TBE: 蒸留水1 ℓ 中Tris108g, 硼酸(関東化学、特級)55g, 0.5M EDTA (pH8.0)40mlを含む)1mlに換え、パルスフィールドゲル電気泳動用ゲル(1g Pulsed field certified agarose (Bio-Rad)/100ml 0.5 $\times$ TBE)にセットするまで4℃で保存した。パルスフィールドゲル電気泳動装置としてはBio-Rad社のCHEF-DR IIIを使用した。泳動条件は温度10℃、6 V/cm、4～8秒(ramp)11時間、8～50秒(ramp)9時間に設定した。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド液(0.2 μ g/ml)に40～60分間入れ染色した。なお、DNAサイズマーカーとしてはメラダー(Bio-Rad)を用いた。

Ⅲ 実験結果

PFGE の遺伝子パターンは感染研の分類法によった。即ち、切断した DNA 断片の大きさに応じて 0～100Kb (ブロック 1)、100～350Kb (ブロック 2) 及び 350Kb 以上 (ブロック 3) の 3 ブロックに分け、各ブロック別に遺伝子パターンを分類した。

Fig. 1 は感染研から送付された O157 標準菌株の PFGE パターンを示す。Y2 は広島県の集団食中毒患者から分離した菌株で、分類型は Ia (ブロック 1)、I (ブロック 2)、I (ブロック 3) である。Y9 は神奈川県内の集団食中毒患者からの菌株で、分類型は Va, V, Ⅲである。Y18 は岐阜市の集団食中毒患者からの菌株で、Ib, I, I である。Y23 は岡山県邑久町の集団食中毒患者からの菌株で、Ic, I, I である。Y120 は三浦市のレバサシから分離した菌株で、Va, V, Ⅲである。Y212 は大阪府堺市の集団食中毒患者からの菌株で、Ⅱa, Ⅱb, I である。

Fig. 2 は京都市内で分離された O157 の PFGE パターンの一例を示す。No. 1～4, No. 6～9, No. 14, 20 は Ⅱa, Ⅱb, I 型の堺市型であった。また No. 5, 12 については感染研では Ⅱh, Ⅱb, Ia 型に分類しているが、我々の結果でもブロック 1、ブロック 3 に堺市型との相違を認め、Ⅱh, Ⅱb, Ia に分類した。No. 16 については感染研では堺市型に分類されたが、我々の検査結果ではブロック 1 に Ⅱa 型のバンドに加えて更に 2 本のバンドを認めたため、Ⅱa', Ⅱb, I 型に分類した。

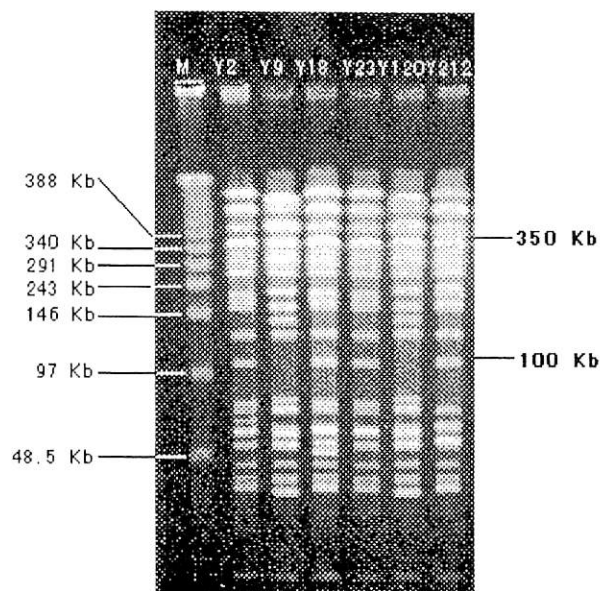


Fig 1. PFGE fingerprints of *E. coli* O157 strains supplied by National Institute of Infectious Diseases.

M: Size marker, Y2: Isolate from Hiroshima Prefecture, Y9: Isolate from Kanagawa Prefecture, Y18: Isolate from Gifu Prefecture, Y23: Isolate from Okayama Prefecture, Y120: Isolate from Miura City, Y212: Isolate from Sakai City.

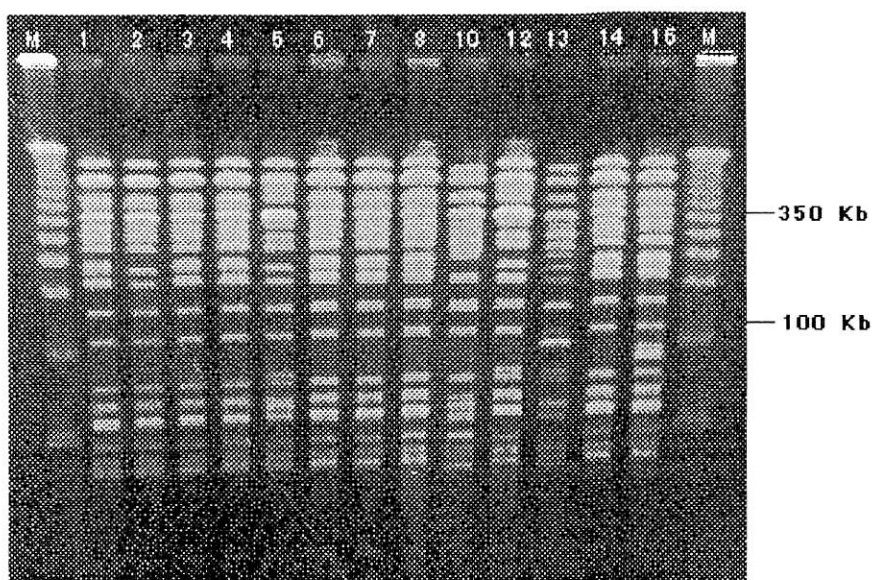


Fig 2. PFGE fingerprints of the O157 isolates in Kyoto City.

M: Size marker. The number from 1 to 16 represents sample numbers.

Ⅳ 考 察

平成8年、京都市で7月中旬から7月下旬にかけて分離されたO157は主として堺市で分離されたものと同一遺伝子タイプのO157であり、8月下旬から9月下旬にかけて散発的に発生した事例の原因菌は6月中旬に広島県で発生した集団食中毒事件と同じ遺伝子型のO157であることが判明した。しかし、京都市内で確認されたO157の遺伝子型は14種にのぼり、既に自然界には多くの遺伝子型の異なるO157が存在していることが推定できる。また、この事実から、検出されたO157について PFGE による遺伝子解析の結果が一致した場合、感染源に何らかの関連性があるか、あるいは同じ菌種による二次感染の可能性があることを示

唆する。したがって、感染源あるいは感染経路の疫学的調査に、PFGE による遺伝子解析は大変有用と考えられる。

Ⅴ 参考文献

- 1) Ichiyama S., et al. : J. Clin. Microbiol. 29,2690-2695 (1991)
- 2) Mitsuda T., et al. : Eur. Pediatr. 155,200-204 (1996)
- 3) 諸岡達也 他：感染症学雑誌, 70(1),17-10(1996)
- 4) 竹田多恵 他：日本細菌雑誌, 51(4), 1037-1042 (1996)
- 5) J. Meng et al. : J. Med. Microbiol. 42,258-263(1995)

京都市衛生公害研究所年報
第 63 号

発行日 平成 9 年 9 月 1 日

編集 京都市衛生公害研究所

発行 〒604 京都市中京区壬生東高田町1-2

☎ (075) 312-4941

FAX (075) 311-3232

印刷所 サンケイデザイン株式会社

☎ (075) 441-9125

(この年報の本文用紙は、再生紙を使用しています。)