

第6部 報 文

目 次

1. 平成10年京都市感染症発生動向調査事業における病原体検査成績 ----- (微生物) ----- 73
2. 平成10年京都市日本脳炎流行予測調査成績 ----- (微生物) ----- 83

Chapter 6 Reports

Contents

1. Isolation of pathogenic agents in the Kyoto City Epidemiological
Surveillance of Infectious Diseases in 1998 ----- (Micr) ---- 73
2. Epidemiological survey of Japanese encephalitis in Kyoto City in 1998 - (Micr) ---- 83

平成10年京都市感染症発生動向調査事業における 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 1998

Abstract : Virological and bacteriological tests were performed using various specimens from patients in the Kyoto City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases in 1998. Of 442 patients, 206 were positive for viral and/or bacterial agents. A total of 133 strains of viruses and 99 strains of bacteria were isolated. Yearly isolation rate of the agents per patient was 46.6%. Influenza viruses were isolated on January, February and April, mainly from the patients with flu-like symptoms, while enteroviruses were isolated from early summer to late fall mainly from the patients with summer flu symptoms, herpangina or aseptic meningitis. Rotaviruses were isolated on April, July and December from the patients with infectious gastroenteritis. Various types of viruses were mostly isolated in the 2 age groups of 1-4 years and 5-9 years. Some mixed infections of bacteria, such as group A *Streptococcus*, and virus, such as influenza virus, were observed.

Key Words : 感染症発生動向調査 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、対象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。

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が、本報告では、平成10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。

なお、本事業は今年度より感染症発生動向調査と事業名称が変更された。

II 材料と方法

1. 検査対象疾病

平成10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、急性咽頭炎、夏かぜ様疾患、扁桃炎、気管支炎・肺炎、ヘルパンギーナ、手足口病、咽頭結膜熱、不明熱、流行性耳下腺炎、リンパ腺炎、感染性髄膜炎、脳・脊髄炎、発疹症、溶血性連鎖球菌感染症、麻疹様疾患、出血性膀胱炎、血小板減少性紫斑病、好中球減少症、流行性

角結膜炎、痙攣、及びその他20疾病の計44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442人から、糞便139検体、咽頭ぬぐい液327検体、髄液73検体、尿75検体、気管分泌液3検体、眼結膜ぬぐい液4検体、血液2検体、皮膚病巣1検体、菌株42検体の計666検体が採取された。

ウイルス検査には菌株を除く全検体を、また、細菌検査にはこれらのうち、患者389人から糞便95検体、咽頭ぬぐい液298検体、髄液15検体、尿45検体、気道分泌液1検体、菌株42検体、計496検体を供した。

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。

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

各月の受付患者数をみると、冬季の1月、2月が50人以上と最多であり、これに次いで12月が多かった。夏季の6～8月も30人以上とやや多い傾向が認められた。これに対し、5月、9月、10月は20～25人と受付患者数が少なかった。月平均受付患者数は36.8人であった。年間の被検患者442人のうち206人(46.6%)から232株の病原微生物を検出した。検出率は4月、6月及び7月が60%以上の高率であり、これに次いで、2月、8月が50%以上、1月、5月、9月及び10月が40%台であった。

被検患者401人中125人から計133株のウイルスを検出した。患者あたりのウイルス検出率は31.2%であった。ウイルス検出率をみると、7月が50%以上と高く、これに次いで1月、2月、4月、6月、8月及び10月が30～40%台であった。

内訳はコクサッキーAが19株、コクサッキーBが12株、エコーが12株、ポリオが2株、ロタが7株、ムンプスが4株、アデノが30株、インフルエンザA(H3N2)(=A香港)型が24株、インフルエンザBが3株、単純ヘルペスが3株、サイトメガロが12株、パラインフルエンザが1株、RSが2株、同定困難ウイルスが2株であった。

検出ウイルスの主な型は、コクサッキーAは19株中10型が8株、16型が4株、5型が3株、6型が2株、2型、8型が各1株であった。コクサッキーBは2型を11株、5型を1株検出した。エコーは11型が8株、18型、30型が各2株ずつ、ポリオは1型、3型が各1株ずつ、アデノは7型、3型が各8株、2型が5株、1型が4株、35型が3株、5型が2株検出された。インフルエンザはA(H3N2)(=A香港)型24株、B型(ワクチン株のB/三重/1/93類似株)3株を検出した。単純ヘルペスは1型のみを3株、パラインフルエンザウイルスは2型を1株検出した。なお、アデノ35型3株のうち2株は同一被検患者から検体採取し、検出したものである。

検出ウイルスの季節推移をみると、インフルエンザA(H3N2)型を1月に5株、2月に19株、B型を4月に3株検出した。ロタは4月に5株、7月、12月に各1株検出した。コクサッキーA 2型、5型、8型、10型、16型は6～10月、6型は11月、12月に検出され、コクサッキーBは6～8月に検出された。エコーは1月に1株の他は、6～11月に検出された。特にエコー11型は、6月から10月に検出された。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夏季を中心に検出される傾向は本年も認められた。アデノは年間にわたって各型が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389人中98人から計99株の病原細菌を検出し、患者あたりの検出率は25.2%であった。

内訳は、主なものではA群溶血性連鎖球菌65株、G群溶血性連鎖球菌6株、病原性大腸菌4株、黄色ブドウ球菌15株であった。

最多検出のA群溶血性連鎖球菌は、11月を除くすべての月に検出された。黄色ブドウ球菌は2月、4月、10月を除く各月に検出された(表1)。

3. 疾病別病原ウイルス検出状況

受付患者数の多かった上位3疾病はインフルエンザ様疾患の93人、夏かぜ様疾患の58人、次いで感染性胃腸炎の50人であった。インフルエンザ様疾患に夏かぜ様疾患、急性上気道炎、気管支炎・肺炎、ヘルパンギーナなどを加えた呼吸器感染症が、本年の受付患者数の約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、手足口病が50%以上の高率であり、感染性髄膜炎、夏かぜ様疾患、気管支炎・肺炎、インフルエンザ様疾患が30%台でこれらに次いでいた。

主な疾病についてウイルス検出状況をみると、インフルエンザ様疾患からインフルエンザA(H3N2)、インフルエンザB、アデノ、サイトメガロ、RS、パラインフルエンザの7種31株、夏かぜ様疾患からコクサッキーA、コクサッキーB、エコー、アデノ、サイトメガロ、インフルエンザBの12種20株、感染性胃腸炎からコクサッキーA、コクサッキーB、ポリオ、アデノ、サイトメガロ、ロタの7種16株、感染性髄膜炎からコクサッキーB、エコー、サイトメガロ、ムンプスの5種15株、急性上気道炎からコクサッキーA、アデノ、ヘルペスの6種6株、ヘルパンギーナからコクサッキーA、コクサッキーB、アデノの6種11株、手足口病からコクサッキーA、インフルエンザA(H3N2)の2種5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、溶連菌感染症からA群溶血性連鎖球菌を39株、インフルエンザ様疾患からA群及びB群溶血性連鎖球菌、黄色ブドウ球菌の3種11株、感染性胃腸炎からA群及びビリダンス溶血性連鎖球菌、クレブシエラ、病原性大腸菌、黄色ブドウ球菌の5種8株、夏かぜ様疾患からはA群及びG群溶血性連鎖球菌、インフルエンザ菌、黄色ブドウ球菌の4種12株を分離した(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264人で最も多く、次いで5～9歳の131人、10～14歳は40人であ

り、15歳以上は7人と少なかった。

病原体検出率を年齢層別にみると、0歳が42.2%、1～4歳が46.0%、5～9歳が52.7%、10～14歳が40.0%、15歳以上が28.6%であった。

ウイルス検出率は0歳が27.4%、1～4歳が34.4%、5～9歳が29.6%、10～14歳が26.3%、15歳以上は28.6%であった。

検出ウイルスの種類は1～4歳が21種69株、5～9歳が17種34株と多く、0歳では10種18株でこれらに次ぎ、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10株、15歳以上は1種2株であった。

エンテロウイルス群は0歳で4種8株、1～4歳で8種

24株、5～9歳で7種13株が検出され、検出率は0歳11.3%、1～4歳12.4%、5～9歳12.0%で同程度であった。

ロタウイルスは1～4歳で5株(2.9%)、0歳で1株(1.6%)、5～9歳で1株(0.9%)検出された。

一方、アデノウイルス群では1～4歳、5～9歳、0歳の順に検出率が高い傾向にあった。サイトメガロウイルスは0～4歳でやや検出率が高かった。インフルエンザA(H3N2)型の検出率は0～4歳2.8%、5～9歳5.6%、10～14歳23.7%、15歳以上28.6%と加齢とともに上昇する傾向にあった。インフルエンザB型は0歳では検出がなく、1～4歳及び5～9歳から検出された(表3)。

表1 月別病原体検出状況(小児科・病院定点分)

平成10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	
検出患者数	57	56	39	32	25	45	30	33	25	20	31	49	442	
糞便	9	14	11	12	3	13	11	13	9	9	11	24	139	
咽頭ぬぐい液	41	50	27	19	14	35	22	26	22	17	26	28	327	
唾液	5	8	7	3	2	9	13	6	7	5	4	4	73	
尿	9	12	10	3	1	8	3	4	4	6	8	7	75	
気管分泌液			1								1	1	3	
喉結膜ぬぐい液								1	2				4	
血液					1	1							2	
皮膚病巣									1				1	
菌株(咽頭由来)	13	4	5	5	5	4						3	39	
菌株(皮膚病巣由来)	1				1								2	
菌株(腫瘍由来)					1								1	
病原体検出患者数	28	31	10	21	12	27	18	17	11	8	8	15	206	
患者あたりの検出率(%)	49.1	55.4	25.6	65.6	48.0	60.0	60.0	51.5	44.0	40.0	25.8	30.6	46.6	
被検患者数	44	52	34	27	18	41	30	33	25	20	31	46	401	
検出患者数	13	22	4	12	4	20	16	12	5	6	6	5	125	
患者あたりの検出率(%)	29.5	42.3	11.8	44.4	22.2	48.8	53.3	36.4	20.0	30.0	19.4	10.9	31.2	
エコー11型						1	5r	1		1v			8	3.4
エコー18型											2		2	0.9
エコー30型	1					1							2	0.9
コクサッキーA2型							1						1	0.4
コクサッキーA5型						2			1				3	1.3
コクサッキーA6型											1	1	2	0.9
コクサッキーA8型							1p						1	0.4
コクサッキーA10型						6mn	1	1s					8	3.4
コクサッキーA16型						2	1	1		1			4	1.7
コクサッキーB2型						4mo		7st					11	4.7
コクサッキーB5型							1						1	0.4
ポリオ1型										1			1	0.4
ポリオ3型				1k									1	0.4
アデノ1型		1h			1	1						1	4	1.7
アデノ2型			1i			1			1	1w		1	5	2.2
アデノ3型					2	1	1	2		1	1x		8	3.4
アデノ5型						1				1			2	0.9
アデノ7型		1		1	1			2					8	3.4
アデノ35型	2c								2			1	3	1.3
単純ヘルペス1型	1a			1L								1	3	1.3
サイトメガロ	3ac	3fh	2j		2				1u	1v			12	5.2
ロタ				5k			1					1	7	3.0
ムンプス			1				3						4	1.7
RS	2b												2	0.9
パラインフルエンザ2型							1				1		1	0.4
インフルエンザA(H3N2)型	5d	19efg											24	10.3
インフルエンザB型				3									3	1.3
同定困難ウイルス						1		1					2	0.9
小計	15	24	4	13	4	21	16	13	5	7	6	5	133	57.3
被検患者数	50	56	36	30	23	40	18	28	21	15	27	45	389	
検出患者数	17	11	8	11	8	9	4	7	7	3	3	10	98	
患者あたりの検出率(%)	34.0	19.6	22.2	36.7	34.8	22.5	22.2	25.0	33.3	20.0	11.1	22.2	25.2	
A群溶血性連鎖球菌	15bd	7g	6	10L	7	5	3qr	2t	3	2		5	65	28.0
B群溶血性連鎖球菌													2	0.9
G群溶血性連鎖球菌			1j			1		1		1w		1	6	2.6
βリダシス溶血性連鎖球菌													1	1.3
クレブシエラ						1		1s				1	3	0.4
病原性大腸菌		1e		1k					1			2	4	1.7
インフルエンザ菌	1				1	2no	2pq	2	2u		3x	1	3	1.3
黄色ブドウ球菌	1		1i										15	6.5
小計	17	11	8	11	8	9	5	7	7	3	3	10	99	42.7
合計	32	35	12	24	12	30	21	20	12	10	9	15	232	100.0

注) a～x: 同一被検者

平成10年 1月～12月

注: a~x: 同一被檢者

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5種14株、1～4歳が6種35株、5～9歳が4種43株、10～14歳が3種7株であった(表3)。

7. 主な疾病と病原体検出状況

1) 本市感染症発生動向調査患者情報によれば、インフルエンザ様疾患は、年始めに急増して第5週にピークを形成した後、急激に減少した。この流行状況に呼応して、主にインフルエンザ様疾患患者から、1～2月の流行盛期にインフルエンザウイルスA(H3N2)型を多数検出した。検出

ウイルスはワクチン株類似であった。更に、流行が終息した4月にインフルエンザウイルスB型を3株検出したが、これらの株もワクチン株類似であった。全国的にも、流行の前半はA(H3N2)型が多数、後半になってB型が少数検出されている。ウイルスはインフルエンザ様疾患患者から多数が検出されたが、そのほかに手足口病からA(H3N2)型が1株、夏かぜ様疾患患者からB型が2株検出された。年末の12月には再びインフルエンザの流行が開始したが、この時期の患者からはウイルスが検出されなかった(Fig. 1)。

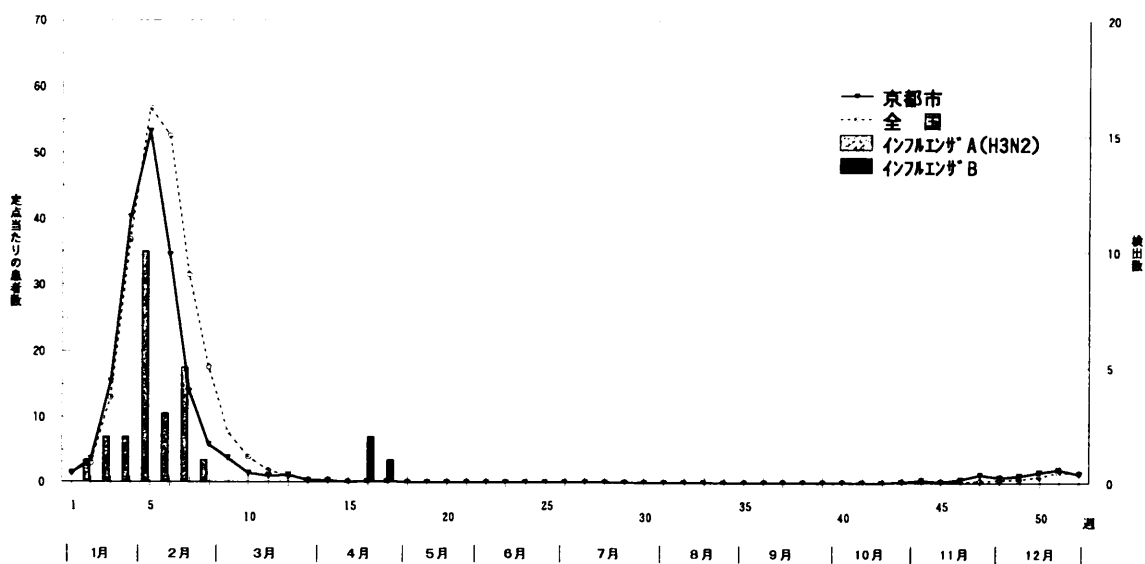


Fig.1. Seasonal prevalence of patients with influenza, and weekly isolation of influenza virus.

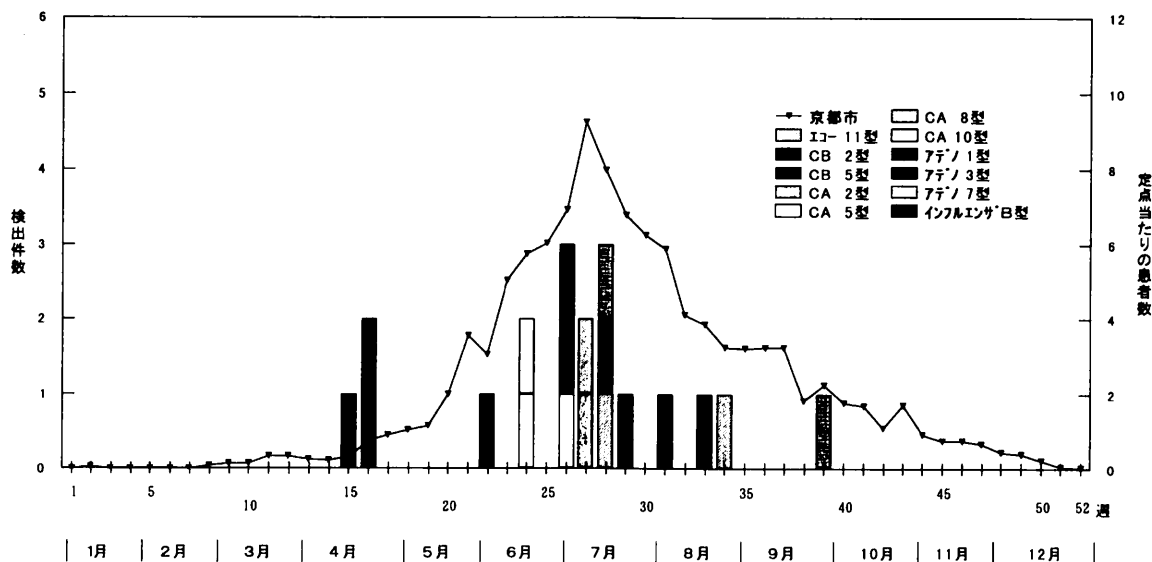


Fig.2. Seasonal prevalence of patients with summer flu, and weekly isolation of viruses from patients with the disease.

表3 年齢層別病原体検出状況（小児科・病院定点）

平成10年 1月～12月

月		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		64	200	131	40	7	442	
検査 材料	糞便	45	57	27	7	3	139	
	咽頭ぬぐい液	43	155	92	32	5	327	
	髄液	26	23	21	2	1	73	
	尿	24	24	17	8	2	75	
	気管分泌液	2				1	3	
	眼結膜ぬぐい液		4				4	
	血液		1		1		2	
	皮膚病巣	1					1	
	菌株(咽頭由来)	1	13	23	2		39	
	菌株(皮膚病巣由来)	1	1				2	
	菌株(膿由来)			1			1	
病原体検出患者数		27	92	69	16	2	206	666
患者あたりの検出率(%)		42.2	46.0	52.7	40.0	28.6	46.6	
ウ	被検患者数	62	186	108	38	7	401	
	検出患者数	17	64	32	10	2	125	
	患者あたりの検出率(%)	27.4	34.4	29.6	26.3	28.6	31.2	
	エコー11型		3v	5r			8	
	エコー18型	2					2	
	エコー30型			2			2	
	コクサッキーA2型		1				1	
	コクサッキーA5型		2	1			3	
	コクサッキーA6型		2				2	
	コクサッキーA8型			1p			1	
イ	コクサッキーA10型	2s	4mn	2			8	3.4 0.9 0.9 0.4 1.3 0.9 0.4 3.4 1.7 4.7 0.4 0.4 1.7 2.2 3.4 1.3 3.4 0.9 1.3 5.2 3.0 1.7 0.9 0.4 10.3 1.3 0.9 28.0 0.9 2.6 0.4 1.3 1.7 1.3 6.5 42.7
	コクサッキーA16型		4				4	
	コクサッキーB2型	3so	7mt	1			11	
	コクサッキーB5型			1			1	
	ポリオ1型	1					1	
	ポリオ3型		1k				1	
	アデノ1型		4h				4	
	アデノ2型	1	3i	1w			5	
	アデノ3型		6	2x			8	
	アデノ5型	1	1		1		3	
ル	アデノ7型		6	2			8	
	アデノ35型			2c			2	
ス	単純ヘルペス1型		2aL	1			3	
	サイトメガロ	3u	7ahjv	2cf			12	
	ロタ	1	5k	1			7	
	ムンプス		1	3			4	
	RS		2b				2	
	パラインフルエンザ2型		1				1	
	インフルエンザA(H3N2)型	2e	5	6fd	9g	2	24	
	インフルエンザB型		2	1			3	
	同定困難ウイルス	2					2	
	小計	18	69	34	10	2	133	
細菌	被検患者数	52	182	112	37	6	389	232
	検出患者数	14	35	42	7	0	98	
	患者あたりの検出率(%)	26.9	19.2	37.5	18.9	0.0	25.2	
	A群溶血性連鎖球菌	3	22bLt	35dq			65	
	B群溶血性連鎖球菌	1			1		2	
	G群溶血性連鎖球菌		2j	3w	1		6	
	ペリダンス溶血性連鎖球菌			1			1	
	クレブシエラ	2s	1				3	
	病原性大腸菌	2e	2k				4	
	インフルエンザ菌		3				3	
菌	黄色ブドウ球菌	6uo	5in	4pqx			15	42.7
	小計	14	35	43	7	0	99	
	合計	32	104	77	17	2	232	

注) a～x: 同一被検者

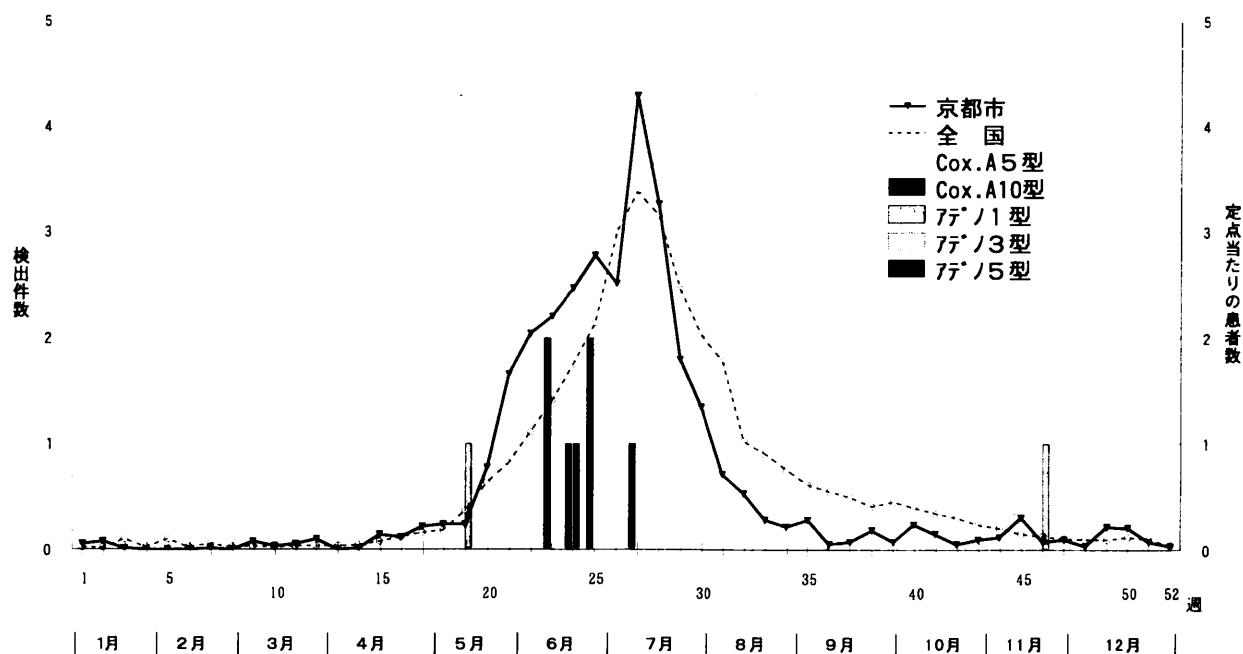


Fig.3. Seasonal prevalence of patients with herpangina, and weekly isolation of coxsackieviruses.

2) 本年の夏かぜ様疾患患者発生数は、4月中旬から上昇し始め、27週（7月）にピークを形成した後下降し続け、11月にはほぼ終息した。長期の流行の間にピークを中心として、コクサッキーA2型、5型、8型、10型、コクサッキーB2型、5型、アデノ1型、3型、7型、及びエコー11型といった多種類のウイルスが検出され、夏かぜ様疾患の起病病原体が多様であることをうかがわせている（Fig. 2）。

3) 本市におけるヘルパンギーナの流行は、今年は第27週（7月）をピークとし5月から8月下旬にわたる流行がみられ、この期間にコクサッキーA5型、10型及びアデノ数型を検出した。特に、コクサッキーA10型の検出が目立ち、本市ではこのウイルスによる小流行があったと思われる。本疾患からの全国的な病原ウイルス検出状況をみても、コクサッキーA2型、4型、10型の報告例が上位を占めている（Fig. 3）。

4) 本市における本年の無菌性髄膜炎の患者発生数は7月にピークとなった。患者からのウイルス検出状況をみると、コクサッキーB2型、エコー11型、30型、及びムンプスが検出された。中でも、エコー11型の比較的長期にわたる検出と、7月のムンプス検出例が自立している（Fig. 4）。

5) 感染性胃腸炎は冬季に流行のピークがあるものの、患者発生は通年にわたっている。腸管出血性大腸菌 O157の

流行は全国的にも下火になり、散発例の発生はあるものの、法定伝染病事例検査もやや少なくなっている。感染症発生動向調査においても、感染性胃腸炎患者は例年と比較して特に多いということにはなかった。ウイルスでは春季にロタ、夏季にはコクサッキーBなどを、細菌では病原性大腸菌、黄色ブドウ球菌などを検出した。病原性大腸菌では O157 毒素産生株は検出されなかった（Fig. 5）。

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、全例が哺乳マウスで検出されたほか、一部はRD-18Sでも検出された。コクサッキーBはFLの他にVeroでも検出されたが、本年は哺乳マウスからの検出例はなかった。エコーは全例がRD-18Sで検出されたが、30型はFLでも1例検出された。アデノは全例FLで検出されたが、一部RD-18S、Veroでも分離された。単純ヘルペスはFL、RD-18S、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(H3N2)型、B型は、すべてMDCKで分離された。ムンプスは全例Veroで検出されたが、一部FLでも検出された。RSは、全例FLとVeroで検出された。パラインフルエンザはVeroで検出された。サイトメガロはPCR法による遺伝子検出であり、培養細胞からは分離されなかった。ロタはすべてEIAにより抗原検出された（表4）。

表4 検出方法別病原ウイルス検出状況

平成10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 マウス	EIA	PCR
	糞便	咽頭 ぬぐい液	髄液	尿	結膜 ぬぐい液		FL	RD-18S	Vero	MDCK			
エコー11型	3	5	3			11		11					
エコー18型	1	1		1		3		3					
エコー30型	1	1	2			4	1	4					
コクサッキーA2型		1				1		1			1		
コクサッキーA5型		3				3		1			3		
コクサッキーA6型		2				2		1			2		
コクサッキーA8型		1				1		1			1		
コクサッキーA10型	2	7		1		10		2			10		
コクサッキーA16型	2	4				6					6		
コクサッキーB2型	6	6	2			14	13		7				
コクサッキーB5型		1				1	1		1				
ポリオ1型		1				1	1						
ポリオ3型	1					1	1						
アデノ1型	1	3				4	4		1				
アデノ2型		5				5	5						
アデノ3型		8				8	8		1				
アデノ5型	1	1				2	2	1	2				
アデノ7型	2	7			2	11	11		1				
アデノ35型				3		3	3	2					
単純ヘルペス1型		3				3	3	3	3		1		
サイトメガロ				12		12							12
ロタ	7					7						7	
ムンプス		1	3			4	2		4				
RS		2				2	2		2				
パラインフルエンザ2型		1				1			1				
インフルエンザA(H3N2)型		24				24				24			
インフルエンザB型		3				3				3			
同定困難ウイルス		1	1			2		2					
小 計	27	92	11	17	2	149	57	32	23	27	24	7	12

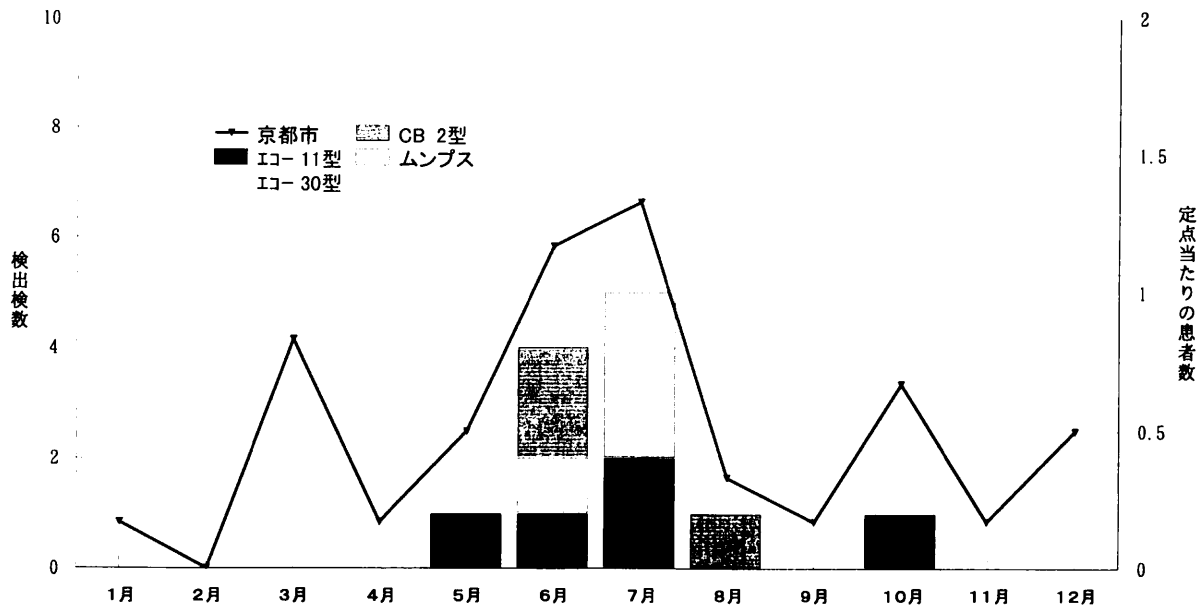


Fig.4. Seasonal prevalence of patients with aseptic meningitis, and monthly isolation of viruses from patients with the disease.

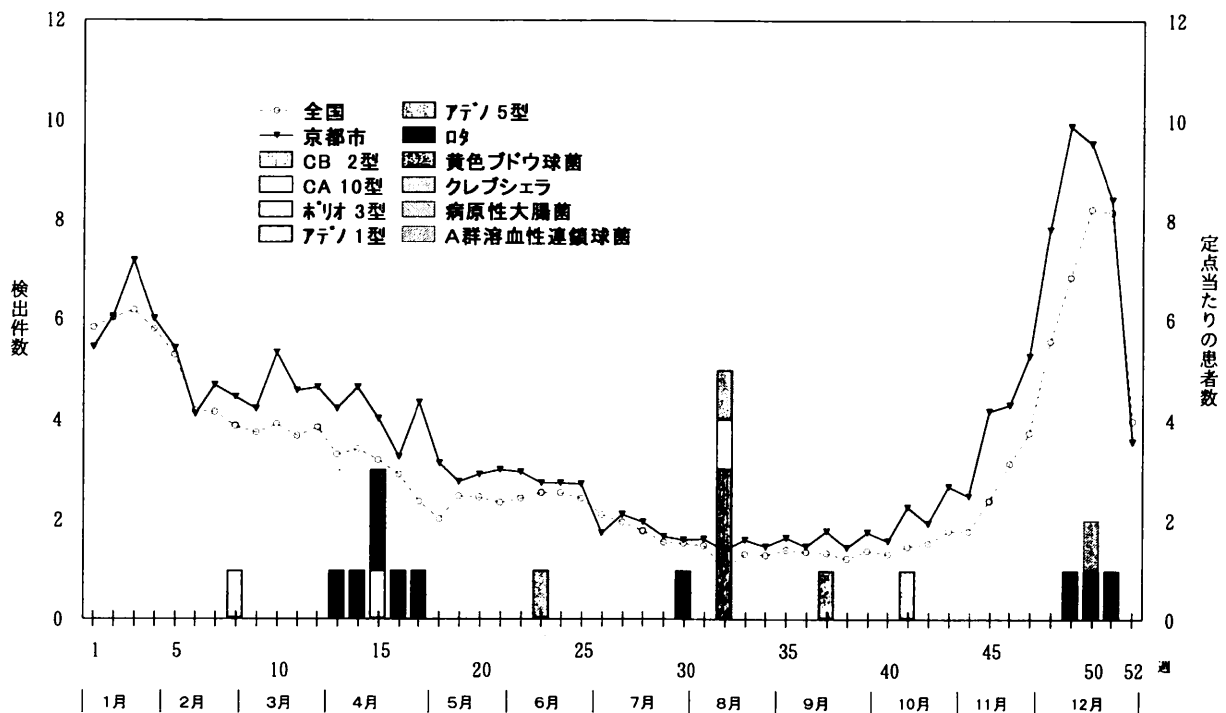


Fig.5. Seasonal prevalence of patients with infectious gastroenteritis, and weekly isolation of viruses from patients with the disease.

Ⅳ 考察

1. 年頭のインフルエンザ流行は、第5週にピークをむかえ、3月までに急減した。1～2月の流行最盛期にインフルエンザウイルスA (H3N2)型を多数検出したが、4月にB型が3株検出された。全国的にも同様の傾向であった²⁾。

インフルエンザワクチンが予防接種法の対象疾病から外れ、ワクチン接種率が極端に低下している現状では、各流行型に対する市民の抗体保有率は低いと考えられ、このような状況下で、インフルエンザウイルスに起因する脳症や、インフルエンザが引き金となる肺炎などの重篤な疾患の発

生が報道され、インフルエンザが危険な病原体であるという認識がようやく一般に定着しつつある。

したがって、インフルエンザ患者発生と流行ウイルス型とを、迅速かつ的確に把握する感染症発生動向調査体制は、インフルエンザの流行を阻止するために、今後ますます重要になる。

2. 本市独自の対象疾患の一つである夏かぜ様疾患は7月をピークとして4月から10月まで長期にわたり流行した。本年も同疾患患者からはコクサッキーA、コクサッキーB、アデノ及びエコーの多種類のウイルスが検出された。主流ウイルスは年ごとに異なり、病原性の高いウイルスの場合は、髄膜炎など重症の疾患に至る可能性もあり、流行時のウイルス学的検索は重要な情報を与える。

3. 本年のヘルパンギーナ患者からはコクサッキーA 5型、A 10型、アデノ1型、3型、5型の5種類が検出された。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。全国の本疾患からの病原体検出状況を見ても、コクサッキーA 10型、A 4型、A 2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が起こったことがうかがえる³⁾。

4. 本年の本市における無菌性髄膜炎の流行は6～7月に急増し、7月をピークとして8月には終息したことが患者情報により示されている。本年の本疾患患者からは合計4種のウイルスが検出されたが、そのうちエコー11型が最も多かった。これら4種類のウイルスは髄液からも検出され、ウイルス検出状況から、複数のウイルスによる流行が夏季を中心に起こったと判断される。

5. 腸管出血性大腸菌 O157の全国的な流行の中で、法定伝染病事例としては大量の検査を実施したが、発生動向調査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かった。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を入手できるよう努めたい。

6. 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る。また、感染症発生動向調査においても、迅速な実験室診断が要請される傾向は年々強まっている。本年は検出率と迅速性の向上をめざして、一部の病原体についてPCR法による病原体遺伝子検出技術を導入した検査を行った。患者あたり病原体検出率は約40%で前年と同程度であったものの、従来法に比べ迅速性が極めて向上した検査もあり、治療や防疫に寄与できると思われる。今後、更に病原体検出率と迅速性を向上させるため、

PCR法をはじめとした技術的検討を推進する必要がある。

V まとめ

1. 被検患者442人中206人(46.6%)から病原体を検出した。ウイルスでは被検患者401人中125人から、コクサッキーA、コクサッキーB、エコー、ポリオ、アデノ、インフルエンザ、RS、パラインフルエンザ、ロタ、ヘルペス、サイトメガロ、同定困難ウイルスの計133株が検出され、検出率は31.2%であった。

細菌では被検患者389人中98人から、病原性大腸菌、A群、B群、G群及びビリダンス溶血性連鎖球菌、クレブシエラ、黄色ブドウ球菌、病原性大腸菌、インフルエンザ菌及び黄色ブドウ球菌の計99株が検出され、検出率は25.2%であった。

2. 疾病別病原体検出率は、疾患の種類により違いがみられた。手足口病、夏かぜ様疾患、ヘルパンギーナ、溶連菌感染症などで50%以上と高く、感染性髄膜炎、気管支炎・肺炎、急性上気道炎、扁桃炎、インフルエンザ様疾患、感染性胃腸炎などがこれらに次いで高かった。

3. ウイルスでは、1月から2月の流行期にインフルエンザ様疾患などからインフルエンザウイルスA(H3N2)型を、4月になって夏かぜ様疾患患者からインフルエンザウイルスB型を検出した。また、4月及び7月に感染性胃腸炎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、感染性髄膜炎などの患者から検出した。特に、夏季のエコー11型、コクサッキーB 2型の流行が目立った。アデノは年を通じて散発的に検出されたが、夏季にやや多い傾向がみられた。

4. 年齢層別のウイルス検出率は各年齢区分とも30%前後で、大きな差はみられなかった。検出ウイルスの種類も1～4歳が21種69株、5～9歳が17種34株、0歳が10種18株と、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、(60)、65-74 (1994)
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報、19(12)、1-2 (1998)
- 3) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報、20(1)、26 (1999)

平成10年京都市日本脳炎流行予測調査成績

微生物部門

Epidemiological survey of Japanese encephalitis in Kyoto City in 1998

Abstract : Epidemiological studies on Japanese encephalitis virus in Kyoto City were carried out in 1998. Number of *Culex tritaeniorhynchus*, a vector mosquito of JE virus, captured with light traps in a pig shed was 287 per trap at most in the summer season. JE virus could not be isolated from the mosquitoes. Positive rates of HI antibody against JE virus in 318 adult inhabitants and 65 children were 53.5% and 32.3%, respectively, showed that the level of the positive rate of HI antibody remains low in recent years.

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

I はじめに

全国の日本脳炎流行予測調査成績を見ると、近年の日本脳炎ウイルス汚染は西日本の広い地域、及び東日本の一部で認められ、年によっては本州北部に至る広範な地域で認められるようになっている。近畿は九州と共に例年汚染開始の早い地域であり、依然として日本脳炎に対する警戒が必要である。

本市が昭和40年代から日本脳炎予防対策の一環として行ってきた、市内全豚に対する日本脳炎ワクチン接種事業はウイルス増幅抑制に貢献してきたが、近年、市域での飼育豚数が減少し、また、夏季の日本脳炎ウイルス汚染が極めて小さくなったことや、媒介蚊幼虫の生息場所である水田の減少などの背景もあり、この事業は平成10年度に廃止された。これに伴い、本年度は飼育豚の抗体調査を取りやめた。しかしながら、市内の日本脳炎汚染を速やかに察知し、市民の日本脳炎感染予防に役立てるため、媒介蚊とウイルスの動向を把握する目的で、以下の調査を継続実施した。

1. 蚊の季節消長調査
2. ウイルス侵襲状況調査
3. 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10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15日から9月16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15日から9月16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。

2. 市民の抗体調査

本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、高齢者、及び小児の3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218名、高齢者は老人施設の入所者100名、小児は病院外来患者65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見ると、いずれの種類も調査期間を通じて採集数が少ない傾向が見られた。

コガタアカイエカは7月下旬と8月中旬～下旬に低いピークがみられるものの、トラップ当たり採集数は最高で8月下旬の287個体であり、シーズンを通じて低密度のまま推移した。しかしながら、総採集数は最近5年間でみると平成8年を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)。

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。

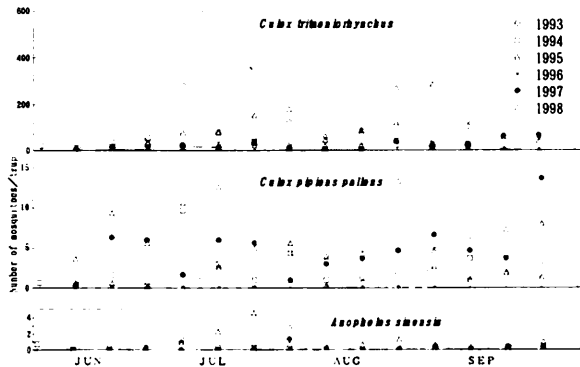


Fig.1 Number of mosquitoes collected with light traps in a pig shed situated in the suburbs of Kyoto City in 1998

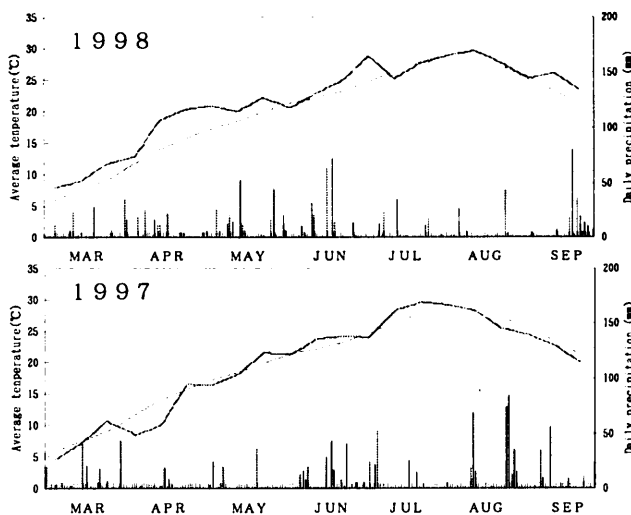


Fig.2 Seasonal changes of temperatures and precipitation in Kyoto City in 1997 and 1998

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.

気温についてみると、本年夏季は6月上旬から高温傾向がみられ、この傾向は大まかには7月から9月まで引き続いた。

一方、降水量は、6月中旬から9月上旬まで概して少なく、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、高温は続いたものの降水不足で推移しており、これが蚊の発生にはマイナス要因として働いた可能性が考えられる。

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稲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。

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、コガタアカイエカは盛夏に至ってもさほど増加せず、低い密度のまま発生が終息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15日から9月16日の毎週1回、計14回採集した吸血蚊718個体、67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)。

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10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15日	56	10	5	0	0.0
		6	1	0	
6月22日	42	10	4	0	0.0
		2	1	0	
6月29日	9	5	1	0	0.0
		4	1	0	
7月6日	28	5	5	0	0.0
		3	1	0	
7月13日	6	3	2	0	0.0
7月21日	105	10	10	0	0.0
		5	1	0	
7月27日	236	50	4	0	0.0
		36	1	0	
8月3日	39	10	3	0	0.0
		9	1	0	
8月10日	24	5	4	0	0.0
		4	1		
8月17日	80	10	8	0	0.0
8月24日	59	10	5	0	0.0
		9	1		
8月31日	8	4	2	0	0.0
9月7日	15	5	3	0	0.0
9月16日	11	6	1	0	0.0
		5	1	0	
計	718	-	67	0	0.0

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6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、前年までの豚の抗体調査成績からみて、野外蚊の密度低下に伴いウイルス保有蚊の密度が検出限界以下になったためと考えるのが妥当であろう。

3. 市民の抗体保有状況

成人、高齢者、及び小児の抗体保有状況をみると、成人は54.6%、高齢者は51.0%で有意差はなく、両者の平均は53.5%であった。一方、小児は32.3%で、かなり低率であった（表2）。

過去の調査結果³⁾によると、高齢者は成人よりも常に高い抗体保有率を示していたが、平成7年以降、両者の間に抗体保有率に差がなく、今回も同様な結果が得られた。これは高齢者が近年ほとんどワクチンを接種しないために抗体保有率が低下する傾向にあるのに対して、成人は小児時にワクチンを接種していることが多く、成人の抗体保有率は一定の水準を保つ傾向にあり、この両者の保有率の推移が今回の結果に影響しているものと思われる。

なお、高齢者の施設別の抗体保有率には差がみられなかった。

表2 成人、高齢者、小児の日本脳炎HI抗体価分布

平成10年度

対 象	施設名	計	抗 体 価							
			<10	10	20	40	80	160	320	640
成 人		218 100.0	99 45.4	69 31.7	26 11.9	15 6.9	9 4.1	— 0.0	— 0.0	— 0.0
高 齢 者	I	50 100.0	24 48.0	9 18.0	10 20.0	6 12.0	1 2.0	— 0.0	— 0.0	— 0.0
	K	50 100.0	25 50.0	8 16.0	9 18.0	6 12.0	1 2.0	1 2.0	— 0.0	— 0.0
	計	100 100.0	49 49.0	17 17.0	19 19.0	12 12.0	2 2.0	1 1.0	— 0.0	— 0.0
小 児		65 100.0	44 67.7	7 10.8	10 15.4	2 3.1	2 3.1	— 0.0	— 0.0	— 0.0

注) 上段は人数を、下段は割合(%)を示す。

Ⅳ まとめ

1. 京都市における平成10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) 以上の調査結果から、平成10年度は本市における日本脳炎ウイルス汚染を検出しなかった。これは、ウイルスの活動がまったくなかったというよりは、夏季にコガタアカイエカの密度が増加せず、その結果、ウイルス保有蚊が極

めて少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54.6%、高齢者は51.0%、小児は32.3%と全般に低く、成人及び高齢者では前年と同程度のレベルであった。

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. Publ. Hlth 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. 61, 89-92 (1995)

第7部 短 報

目 次

1. 異味, 異臭を原因とする食品の苦情事例 ----- (生活衛生) ---- 87
2. 豚のクマリン中毒の1症例について ----- (病理・生活衛生) - 93
3. 牛の肺疾患に関する調査 ----- (病 理) ---- 97
4. 牛枝肉の衛生評価 ----- (病 理) ---- 100
5. ハイブリダイゼーション法によるEHECの検出と単離の試み ----- (調査研究) ---- 105
6. DNA analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* using pulsed-field gel
electrophoresis in 1998 (平成10年度における腸管出血性大腸菌のパルスフィールド・ゲル電気泳動法による遺伝子解析)
----- (調査研究) ---- 109
7. 広沢池におけるアオコの消長 ----- (環 境) ---- 112

Chapter 7 Short notes

Contents

1. Case studies on complaints of unusual smell and taste in food	----- (Food) ---	87
2. A case of coumarin poisoning in swine	----- (Path • Food) -	93
3. Investigation of lung disease in cattle	----- (Path) ---	97
4. Bacterial contamination in cattle carcasses	----- (Path) ---	100
5. Detection of EHEC by using colony hybridization method	----- (Pub) ---	105
6. DNA analysis of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> using pulsed-field gel electrophoresis in 1998	----- (Pub) ---	109
7. Waterbloom of blue-green algae in the Hirosawanoike pond	----- (Envir)---	112

異味, 異臭を原因とする食品の苦情事例

生活衛生部門

Case studies on complaints of unusual smell and taste in food

Key Words : 苦情食品 consumer-dissatisfied foods, 異味異臭 unusual smell and taste, GC/MS gas chromatography-mass spectrometry, ヘッドスペースガスクロマトグラフィー head space gas chromatography, 石油エーテル抽出 petroleum ether extract

I はじめに

平成10年度に保健所から当衛生公害研究所に依頼のあった苦情事例の内, 異味, 異臭を原因とする2例について報告する。

1例目は, 平成10年9月に「市内で購入したウインナーパンを食べたところシンナー臭がし, すぐに吐き出したが, 舌にしびれ感が残った」という事例について, 2例目は, 平成11年2月に「保育園において, 昼に提供された味噌汁を食べた園児より, 味噌汁の具のさつまいもが変な味がする, という訴えがあり, 職員が口に含んで確認したところ石油臭様の異臭を確認した」という事例である。

苦情の発生原因の解明には, 原因物質の同定が必要となる。その際, 苦情者からの訴えの内容は最も有効な情報源となる。官能検査で確認後, それらの情報に基づき原因物質を推定し, 検査項目を決定することになるが, なかなか測定対象を絞り込むことは難しい。そこで, 今後の事例に迅速に対応できるよう, 異味異臭の原因の1つである有機溶剤類について, GC/MSによる測定時の基礎データを収集したので合わせて報告する。

II 苦情事例 その1

—シンナー臭のしたウインナーパンについて—

1. 苦情の概要

苦情者が, 市内コンビニエンスストアで購入したウインナーパンを一口食べたところ, シンナー様臭がしたのですぐに吐き出したが, 舌にしびれ感が残ったため, 病院で診察を受けた。医師は, 症状より食品や毒物による健康被害とは診断しなかったが, 患者が持参したパンにシンナー臭がしたので保健所に届け出た。

当該品は, ソーセージにパン生地を巻き, カラシマヨネーズを塗り焼成されたもので, 合成フィルムで包装されていた。販売店において同一ロットの製品は全部で6個納品されており, 当該品以外の5個はシンナー様臭を確認でき

ず, 異常はなかった。

全ての製品について包装のピンホールの有無を調べたが, 異常を認めなかった。

2. 官能検査

苦情品と同一ロット製品の官能検査をしたところ, 苦情品のみ溶剤臭を認めた。

3. 理化学検査

1) 方法 (ヘッドスペースガスクロマトグラフィー)

試料約5gを30mlバイアルビンに密封し, 50℃水浴中で1時間加熱した後, ヘッドスペースガスをマイクロシリンジで採取しFID-GC, GC-MSの測定試料とした。

2) 検査結果

苦情品のFID-GCのクロマトグラム(図1)からはエタノール, メタノール, メチルエチルケトンのリテンションタイムと一致するピークが得られた。対照品からはエタノールのリテンションタイムと一致するピークが1本だけ得られた。

そこで, 同じヘッドスペースガスをパージ&トラップ装置でGC/MSに導入し分析したところ, メチルエチルケトンが確認できた(図2)。従って, 検査結果は「メチルエチルケトンを検出する」とした。

4. 苦情に対する事後調査結果

苦情品と同一ロットの製品は303個あり, 本件以外の苦情はなかった。

京都府下の所轄保健所が調査したところ, 製造工程においてメチルエチルケトンを含む有機溶剤は, 包装フィルムへの日付印字用インクジェットに使用するインクおよび希釈, 洗浄液があった。しかし, メチルエチルケトンが製造所で付着・混入・移染したという確証は得られなかった。そこで, 危険性を排除するために「包装場に保管されていたインクおよび希釈, 洗浄液を事務所に移し, 必要量以上持ち出さないようにし, インク補充, ノズルヘッド洗浄方法について担当者に周知徹底させる」という自主的対策が講じられた。

Ⅲ 苦情事例 その2

－石油様臭のした味噌汁の具のさつまいもについて－

1. 苦情の概要

市内保育園で、昼食に提供された味噌汁より、「具のさつまいもが変な味がする」という園児の訴えがあった。担任が当該味噌汁を口に含んだところ、かすかに石油臭の様な異臭を感じたので直ちに食事をやめさせた。味噌汁は当日保育園で調理されたもので、同じ味噌汁は1歳から4歳の74名の園児が喫食したが、臭気を感じたのは最初に訴えた園児1名のみであった。異臭のしたさつまいもは、前日に人参、もやし、小松菜、ねぎ、土しょうがとともに1つの段ボール箱に入れ市内食品店より納品されたもので調理人が検品しながら専用の野菜保管ケースに入れ替え、保管庫に他の食品とは別に保管されていた。検品したとき調理人は異常を認めておらず、また、野菜保管ケースに残っていた人参、さつまいもを確認したところ、異臭は感じられなかった。

なお、保育園での暖房はガスセントラルヒーティングで灯油等は置いていなかった。

検査に供した検体は下記のとおりである。

- ① 生のさつまいも（参考品）
- ② さつまいものむいた皮（参考品）
- ③ さつまいものむいた皮（異臭を認めるもの）
- ④ 味噌汁の具のさつまいも（参考品）
- ⑤ 味噌汁（参考品）
- ⑥ 味噌汁の具のさつまいも（異臭を認めるもの）

2. 官能検査

検体番号③、⑥よりかすかな石油臭を認めた。

3. 理化学検査

1) 方法

検体を細切りし20.0g（③については全量12.6g）を三角フラスコに採取し、石油エーテル100mlに浸し、一夜冷蔵庫（10℃以下）に放置した。石油エーテル層を分液ロートに分取し、下層を捨て、少量の硫酸ナトリウムで脱水後、ロートに石英ウールを詰めたものでろ過した。ろ液をKD濃縮装置で10ml程度にし、窒素パーズで5mlに濃縮した。

ガソリン、灯油、軽油を石油エーテルでそれぞれ5mlに調製し、前処理で得られた濃縮液とともにGC/MSで定性分析した。

2) 検査結果

n-アルカンの混合試料をリテンションタイムインデックスとして用いたところ、ガソリンはC-10～C-13、灯油はC-10～C-17、軽油はC-10～C-27…の範囲に櫛状

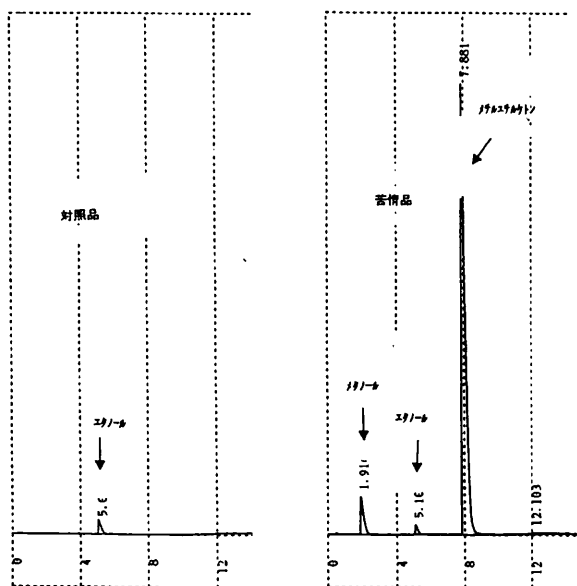


図1 苦情品と対照品のFIDクロマトグラム

測定装置：島津GC7AG (FID)

カラム：GS-Q (0.53mm×30m)

温度：カラム温度100℃(4分) -16°/分-230℃

注入口、検出器温度150℃

キャリアガス：ヘリウム20ml/分

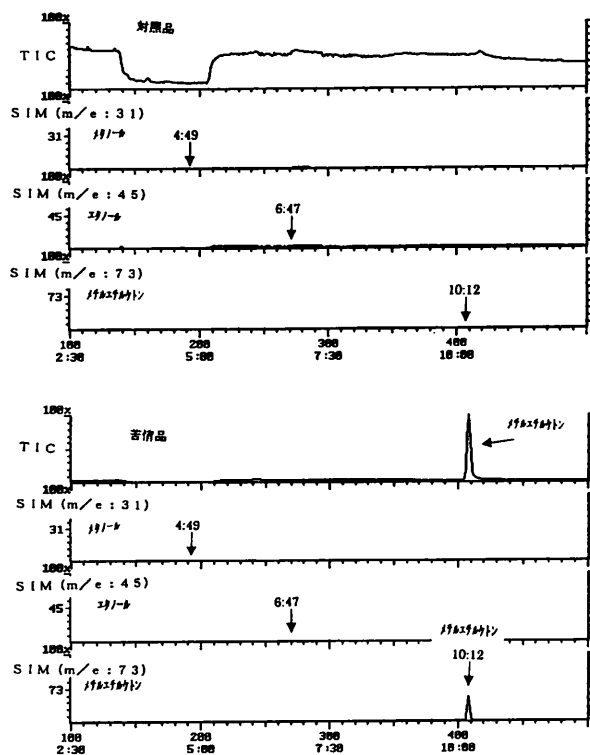


図2 苦情品と対照品のTIC, SIM

測定装置：Finnigan mat magnum (イオントラップ GC/MS)

ALS2016, LSC2000 (Tekmar 製ハートアップ装置)

カラム：DB624 (0.53mm×75m, 膜厚3μm)

カラム温度：0℃(2分) -8°/分-80℃-50°/分-200℃

の規則的なピークが観られた(図3)。

②, ③, ⑥の検体より櫛状の規則的なピークが観られ(図4), いずれも灯油のパターンとよく一致し, それぞれのピークのマススペクトルも灯油のパターンと一致した。また, そのマススペクトルは「メチレンに相当する14質量単位ずつ離れてピーク群が現れ, 各群とも C_nH_{2n+1} イオンが最も強く, 質量が大きくなるにつれて次第に強度を減ずる」というアルカン類の特徴を示した(図5)。そこで, 検出した検体について「灯油に含まれるアルカン類を検出」とした。

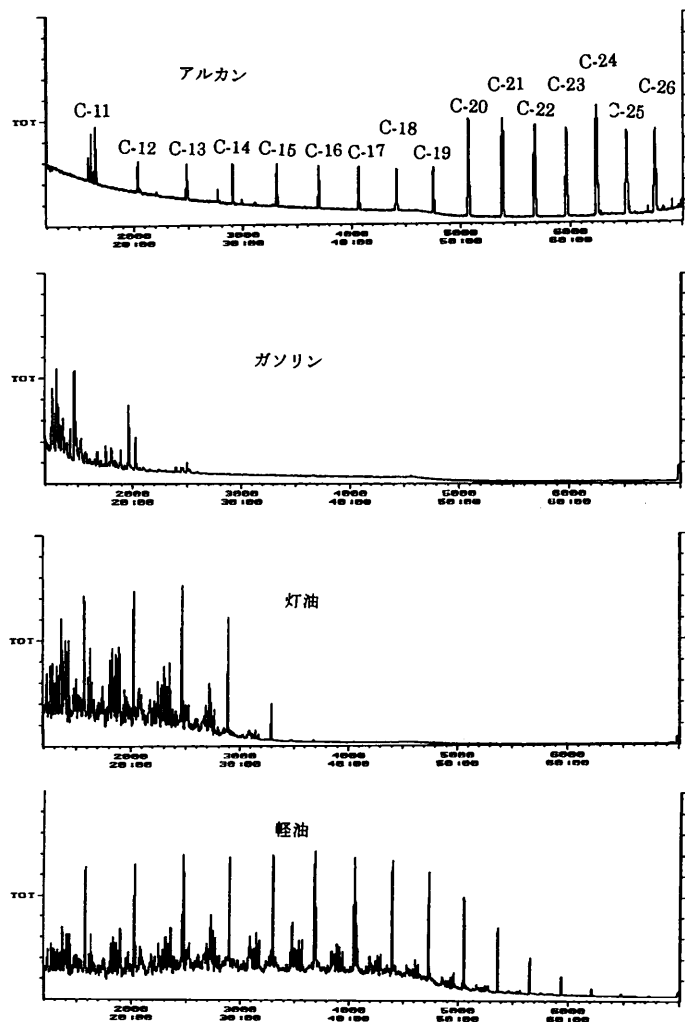


図3 アルカン, ガソリン, 灯油, 軽油のTIC

測定装置: Finnigan mat magnum (イオントラップ GC/MS)
 カラム: DB5MS (0.32mm × 30, 膜厚 0.25 μm)
 温度: カラム 60℃ (3分) - 3°/分 - 270℃ (1分)
 注入口: SPI 60℃ (1分) - 200°/分 - 280℃ (40分)
 MASS 部: CI モード, 50~400ams

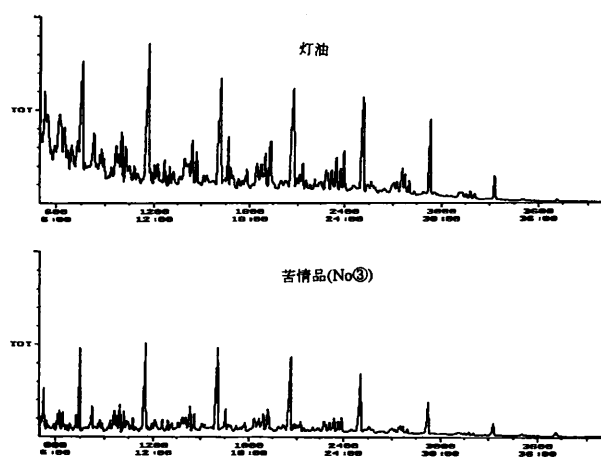


図4 苦情品と灯油のTIC

測定装置: Finnigan mat magnum (イオントラップ GC/MS)
 カラム: DB5MS (0.32mm × 30, 膜厚 0.25 μm)
 温度: カラム 60℃ (3分) - 3°/分 - 270℃ (1分)
 注入口: SPI 60℃ (1分) - 200°/分 - 280℃ (40分)
 MASS 部: EI モード, 30~350ams

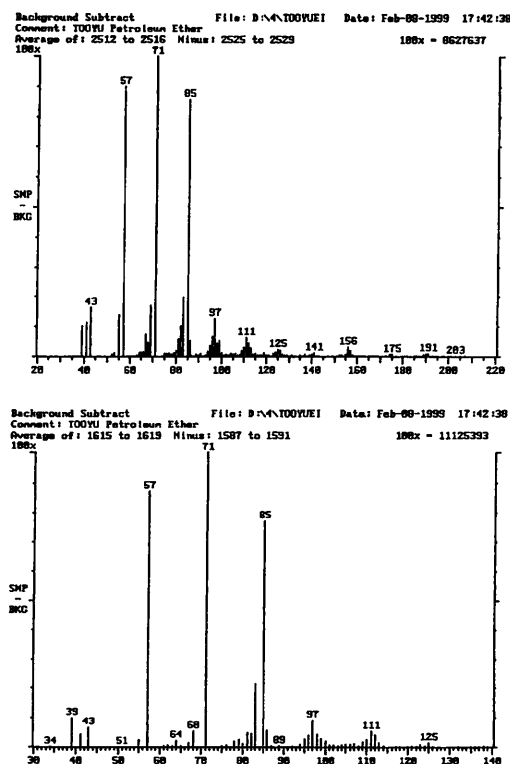


図5 苦情品のマススペクトルの一部

測定条件は図4に同じ

4. 苦情に対する事後調査結果

当該さつまいもは, 1月25日に京都市中央卸売市場第一

市場に5kg段ボール箱入りで66箱入荷したもので, 保育園に納品した食料品店は, 2月3日にその内の6箱を第一市

場内の業者より仕入れた。第一市場より保育園までの流通経路において取り扱いを調査したところ、灯油汚染の可能性は低く、他からの苦情もなかった。

生産地での調査によると、このさつまいもは1月23日生産者宅で洗浄・選別・箱詰めされた後、すべて京都の市場に出荷されたものだが、同日、収穫後未洗浄のさつまいもの入った箱が置かれた作業場で、誤って灯油を床にこぼしたことが判明した。さつまいもは後で洗浄行程があるという安心感より検品がおろそかになり、灯油に接触したさつまいもが市場に出てしまったものと思われる。そこで所轄保健所は、これからは灯油の補給は作業場外で行うこと、灯油に限らず食品用以外のものが付着した可能性のあるものは見た目に異常がなくても市場に出さないよう指導した。

Ⅳ 有機溶剤類のGC/MS測定

1. ヘッドスペース法による測定

苦情事例1のように測定対象が比較的低沸点の化合物の時と、苦情事例2のように高沸点の時では前処理の方法が変わってくる。試料に操作を加えることなく異臭成分そのものを測定できるヘッドスペース法はスクリーニング的に用いることもでき、有効な方法である。場合によってはヘッドスペース法で用いた試料を高沸点成分の測定用に溶媒抽出することも可能である。また、GC/MSによる測定は、たとえ標準物質がなくても未知物質の推定を可能にする情報を与えてくれる。

そこで各種有機溶剤類について、ヘッドスペース法によるGC/MS測定の適用性を調べ、今後の苦情事例における資料とした。

2. 方法

表1に掲げた各種有機溶剤類の混液をスプリット法によりGC/MS測定し、ついで、20mlのバイアルビン（容積26.6ml）に有機溶剤混液を0.5～1μl封入し、50℃1時間加温後、そのヘッドスペースガス1mlをGC/MSに注入し、同条件で測定した。

苦情事例1で用いたのと同じウイナー入りパンを細切したものを1gバイアルビンに秤取し、有機溶剤類を添加した後、50℃1時間加温し、そのヘッドスペースガス1mlをGC/MSに注入し同条件で測定した。

3. 結果

1) 気液（固）平衡状態にする時の温度

ヘッドスペースガスクロマトグラフィーは、試料を密封し、気液（固）平衡状態にした後、気相の一部を採取し、

表1 有機溶剤類一欄

化合物名	Cas-No	分子量
methanol	67-56-1	32.04
n-pentane	109-66-0	72.15
ethanol	64-17-5	46.07
acetone	67-64-1	58.08
1,1-dichloroethylene	75-35-4	96.94
methylacetate	79-20-9	74.08
acetonitrile	75-05-8	41.0
dichloromethane	75-09-2	84.93
n-hexane	110-54-3	86.17
n-propanol	71-23-8	60.1
cis-1,2-dichloroethylene	540-59-0	96.94
ethylacetate	141-78-6	88.1
methyl ethyl ketone	78-93-3	72.1
chloroform	67-66-3	119.38
1,1,1-trichloroethane	71-55-6	133.41
cyclohexane	110-82-7	84.16
2-methylhexane	591-76-4	100.21
carbon tetrachloride	53-23-5	153.82
3-methylhexane	589-34-4	100.2
benzene	71-43-2	78.11
1,2-dichloroethane	107-06-2	98.96
n-heptane	142-82-5	100.2
methyl iso propyl ketone	563-80-4	86.13
n-butanol	71-36-3	74.1
trichloroethylene	79-01-6	131.39
methyl cyclohexane	108-87-2	98.19
bromodichloromethane	75-27-4	163.83
cis-dichloropropane	10061-01-5	110.97
methyl iso butyl ketone	108-10-1	100.16
toluene	108-88-3	92.13
trans-dichloropropane	10061-02-6	110.97
n-octane	540-84-1	114.2
1,1,2-trichloroethane	79-00-5	133.41
tetrachloroethylene	127-18-4	165.83
propionic acid	79-09-4	74.08
dibromochloromethane	124-48-1	208.29
n-butyl acetate	123-86-4	126.5
ethyl benzene	100-41-4	106.16
p-xylene	106-42-3	106.16
m-xylene	108-38-3	106.16
o-xylene	95-47-6	106.16
n-nonane	111-84-2	128.3
bromoform	75-25-2	252.7
n-decane	124-18-5	142.29
n-heptanol	111-70-6	116.2
n-octanol	117-87-5	130.2

GC分析を行う分析法である。

ただ試料が固体の場合、気固平衡状態にするのに時間がかかり、ある一定時間、一定温度で揮発してくる量を平衡に達しないまま測定することになる。また、温度は高いほど感度はよくなるが、60℃にすると気相をガスタイトシリンジで採取する際、水蒸気がシリンジ内に凝縮するおそれがある。

また、スプリット法によるGC/MSへの導入方法は脱水することなくそのまま導入されるため、気相中に水蒸気

が多量に含まれると、水分がMSに導入されることになり分析に支障をきたす恐れがある。そのため気液（固）平衡状態にする時の温度は50℃程度が上限のように思われる。

2) マススペクトルデータへの影響

図6に溶液でGC/MSに注入した時及びバイアルピンに封入しヘッドスペースガスを採取して注入した時（試料に添加した後ヘッドスペースガスを採取して注入した時もほぼ同じなので割愛）のマススペクトルの代表例を示した。

試料のあるなしに関わらずヘッドスペースガスのマススペクトルはほとんど変わらないが、溶液として注入した時と比べM/e 28のピークが大きく出現している。また、相対強度比の順位の入替わりも見られた。

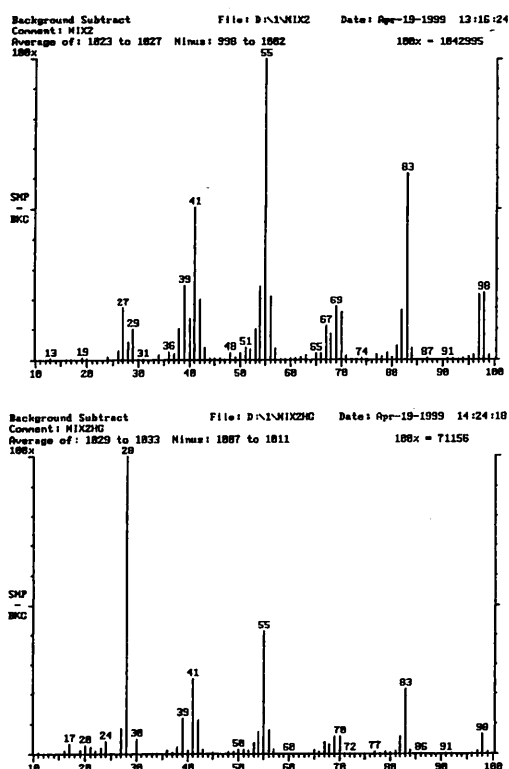


図6 溶液注入時とHG注入時のマススペクトルの比較

測定装置：Finnigan mat magnam(イソトラップ GC/MS)
 カラム：DB624(0.53mm × 75, 膜厚3 μm)
 温度：カラム60℃(3分) -3°/分-150℃-50°/分-250℃
 注入口：split 200℃
 MASS部：EI モード, 10~350ams

GC/MSでの定性は通常、標準物質と試料を測定し、試料中の未知物質のマススペクトルが標準物質のマススペクトルと一致するかを調べる。標準物質が手に入らないときは、あらかじめ作成されたライブラリーにより検索する。その際、マススペクトルデータの質が悪いとライブラリーによる検索は難しい。そこでヘッドスペースガスにより得られたマススペクトルを用いてライブラリーによる同定を

試みたところ、いくつかの化合物を候補としてリストアップしてくるが、正解となる化合物を第1候補に挙げることは少なかった。ヘッドスペース法による異臭成分の測定時に標準物質が入手できない場合、ライブラリーのみにより同定することは難しいことがわかった。

3) PTR I 値を補完的に用いたライブラリー検索

そこで、GCの昇温保持指標等による補完的な情報が必要になってくる。GCの昇温保持指標としてよく用いられているPTR I 値は、一定の昇温条件下でn-アルカンの混合試料を測定し、n-アルカンの炭素数により計算する。PTR I 値は苦情事例2でも用いたが、GC条件やカラムメーカー、長さ、内径、膜厚の違いの影響を受けず、良好な再現性が得られ、GC/MS分析においても有力な検索手段となっている。1), 2), 3), 7)

今回測定した化合物のPTR I 値は表2の通りである。PTR I 値とその化合物の沸点との間には正の相関がみられ、化合物の種類別にみるとほぼ相関係数が1に近い値を示した(図7)。このPTR I 値は未知化合物の構造に関する情報も与えてくれる¹⁾という報告もあり、今後もデータを蓄積していきたい。

4) 試料に添加した時の影響

図8に化合物の沸点と回収率（試料に溶剤を添加して得られたヘッドスペースガスと溶剤のみより得られたヘッドスペースガスの面積比）をプロットしたグラフを掲げた。高沸点になるほど回収率が低下する傾向が見られた。また、アルコール類は低沸点の化合物でも回収率は悪かった。

一般にヘッドスペースガスクロマトグラフィーにおけるピークの大きさは、気相中に存在する被測定成分の蒸気圧に比例する。

$$P_i = P_i^0 \cdot x_i \cdot \gamma_i$$

P_i : 成分iの蒸気圧

P_i^0 : ある温度における成分iの純物質の飽和蒸気圧

x_i : 成分iの液相中のモル分率

γ_i : 活量係数

P_i^0 は一定の温度では成分によって固有の値である。

γ_i は他の溶媒の組成や共存成分によって様々に変化する値である。試料が水溶液の場合、成分が水に溶けやすいと $\gamma_i < 1$ となり、溶けにくいと $\gamma_i > 1$ となる。アルコール類は水に溶けやすいため $\gamma_i < 1$ となり、ピーク面積が小さくなり、回収率も悪くなったものと思われる。

食品をヘッドスペース法で定量しようとするときは、標準添加法を用い、 γ_i の変動を相殺させるのが一般的方法である。しかし被測定成分が高濃度含まれている場合、標準添加法で定量しようとする、添加したものとは無添加のもので組成が変わり活量係数が違ってしまい定量できない

こともある。

また、試料が固体の場合均一に混合することが難しく、気固平衡状態にする時間も長いものが多い。この場合も標準添加法は適用できない。⁴⁾

従って、ヘッドスペース法のGC/MS分析は定量まですることは条件が整わなければ難しいようであるが、スクリーニング的に定性分析をするには非常に有効な方法といえる。

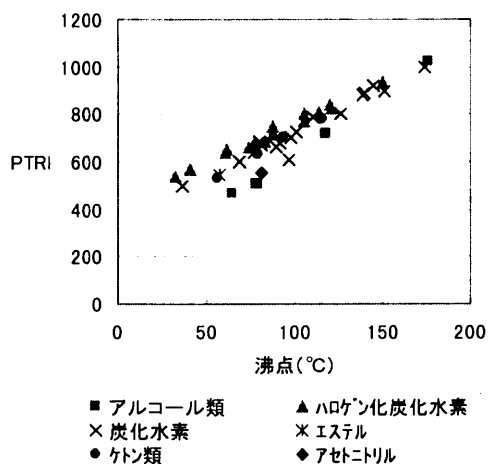


図7 化合物の種類別に見た沸点とPTRI値の関係

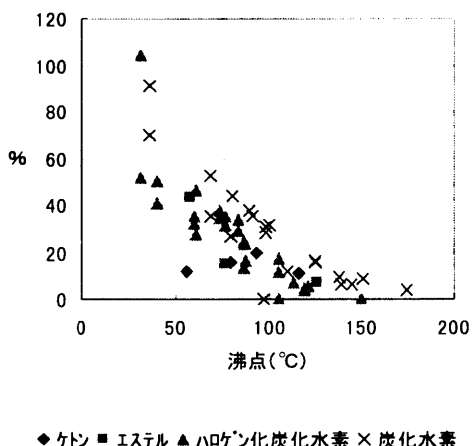


図8 化合物の沸点と回収率

V 参考文献

- 1) 神野透人, 他: 水道協会雑誌, 63(7), 29-37(1994)
- 2) 反町潤, 他: 新潟県衛生公害研究所年報, 11, 75-79 (1995)
- 3) 杉崎三男: 埼玉県公害センター研究報告, 21, 67-76 (1994)
- 4) 長井裕美: 島津評論, 48(3), 297-307(1991)

表2 PTRI測定値

化合物名	PTR I (n=3)	標準偏差
methanol	465	1.28
n-pentane	500	
ethanol	507	8.29
acetone	529	1.73
1,1-dichloroethylene	535	8.15
methylacetate	546	1.30
acetonitrile	551	8.25
dichloromethane	566	9.01
n-hexane	600	
n-propanol	610	3.19
cis-1,2-dichloroethylene	637	5.98
ethylacetate	636	2.62
methyl ethyl ketone	634	2.73
chloroform	652	6.25
1,1,1-trichloroethane	666	6.56
cyclohexane	666	0.38
2-methylhexane	666	1.58
carbon tetrachloride	676	7.15
3-methylhexane	675	2.30
benzene	684	0.17
1,2-dichloroethane	687	6.25
n-heptane	700	
methyl iso propyl ketone	701	0.54
n-buthanol	714	0.80
trichloroethylene	720	5.38
methyl cyclohexane	728	0.52
bromodichloromethane	745	5.72
cis-dichloropropane	770	6.27
methyl iso butyl ketone	778	1.18
toluene	790	0.61
trans-dichloropropane	804	6.88
n-octane	800	
1,1,2-trichloroethane	814	5.56
tetrachloroethylene	825	6.39
propionic acid	822	
dibromochloromethane	839	5.98
n-butyl acetate	838	2.09
ethyl benzene	883	4.51
p-xylene	892	4.24
m-xylene	892	4.24
o-xylene	918	4.42
n-nonane	900	
bromoform	935	6.44
n-decane	1000	
n-heptanol	1019	1.42
n-octanol	1122	

- 5) 西田耕之助, 他: 用水と排水, 37(2), 145-151(1995)
- 6) 有機合成化学協会編: 溶剤ポケットブック, オーム社(1997)
- 7) 環境庁環境保健部保健調査室: GC/MSを用いた環境中の化学物質検索マニュアル-水質・底質編 (1991)

豚のクマリン中毒の1症例について

病 理 部 門
生活衛生部門

A case of coumarin poisoning in swine

Key words : 豚 swine, クマリン coumarin, 中毒 poisoning, クマテトラリル coumatetralyl

I はじめに

クマリンはビタミンK拮抗物質で、肝臓中でのプロトロンビン生成阻害による血液凝固不全症を招く累積毒剤として、昔から豚舎を徘徊するネズミの駆除に使用されている。

今回、クマリン中毒と疑われる豚の症例に遭遇し、病理学的所見及び中毒物質であるクマテトラリルの検出を試みたので、その概要を報告する。

II 材料と方法

1. 材料

1998年11月6日、府内の養豚業者の搬入した15頭中の1頭で、生体検査では特に著変は認められなかった。

2. 検査方法

1) 病理学的検査

主要臓器である肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺臓、胃、腸、

及びリンパ節、皮膚、筋肉について肉眼的検査を実施した後、常法に従い、10%ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検した。

2) 理化学的検査

筋肉、肝臓について、竹島らの方法¹⁾に準じてクマテトラリルの定量を行った。クロロホルム：アセトン(1:1)混液で抽出を行い、シリカゲルカートリッジ (Sep-PakVAC) を用いて精製した後、高速液体クロマトグラフィー (ODS 150×4.6mm) で蛍光検出器 (励起波長310nm, 蛍光波長390nm)により測定した。

III 結果

1. 病理学的検査結果

病理学的検査結果は表1に示したとおりである。

表1 病理学的検査結果

臓 器	肉 眼 所 見	組 織 所 見
肝 臓	実質内に出血を伴う巣状の壊死斑が密発している。	中心静脈付近に巣状に出血と肝細胞の変性、壊死が認められる。小葉間結合組織内にもび慢性的出血を認める。
腎 臓	皮質、髓質及び腎盂に点状～び慢性的の出血斑が散在している。	糸球体や間質、尿管腔内にび慢性的出血を認める。
脾 臓	実質内にび慢性的の出血を認める。	白脾髄周囲の赤脾髄にび慢性的の出血を認める。
心 臓	心外膜下、心内膜及び実質内に出血斑が散在している(図4)。	心膜下組織及び心筋組織にび慢性的の出血を認める(図6)。
肺 臓	実質内に点状～び慢性的の出血斑が散在している。	肺胞の小葉間結合組織にび慢性的の出血が著しく、微細な血管の拡張や細気管支及び肺胞内にも出血が認められる。
胃	漿膜及び粘膜下に点状～び慢性的の出血斑が散在している。	筋層、粘膜下層及び粘膜固有層にび慢性的の出血を認める。
腸	全腸における漿膜及び粘膜下に点状～び慢性的の出血斑が散在している(図3)。	漿膜下や筋層、粘膜下層及び粘膜固有層にび慢性的の出血や巣状の出血病巣が認められる(図5)。
リンパ節	内臓リンパ節及び体幹リンパ節のすべてが腫脹し、暗赤色を呈している。	被膜下の辺縁洞、髓質のリンパ髓やリンパ洞にび慢性的に出血病変が認められる。
皮 膚	全身の皮膚に不整形、斑状の出血病変が密発している(図1)。	皮下組織や皮下脂肪にび慢性的の出血が認められる。
筋 肉	全身の骨格筋に斑状の出血病変を認める(図2)。	筋肉組織の間質結合組織や脂肪組織内にび慢性的の出血が認められる。



図1 全身の皮膚に斑状の出血病変が密発している



図2 皮下脂肪、体幹筋肉に点状～斑状の出血病変が認められる



図3 全腸に斑状の出血病変が散在，リンパ節は腫脹，暗赤色を呈している



図4 心筋実質内に斑状～点状の出血病変が認められる

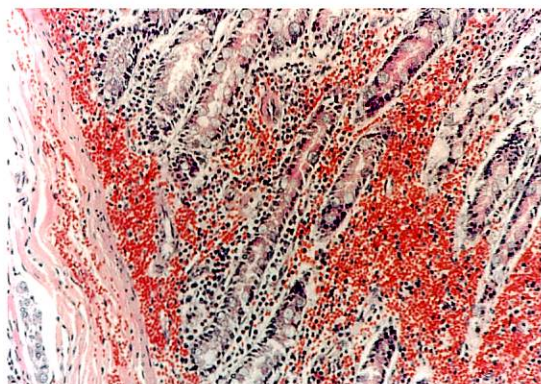


図5 粘膜下層から粘膜固有層にかけてび慢性の出血が認められる

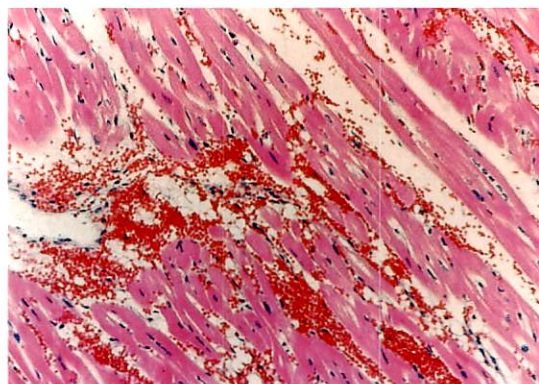


図6 心筋組織内にび慢性の出血が認められる

2. 理化学的検査結果

正常豚の肝臓を対照（図7）として用いた。正常豚肝臓10gにクマテトラリルを0.1 μ g添加したとき（0.01ppm）の回収率は79.7%であった（図8）。

今回の出血傾向を示した豚の肝臓（10%ホルマリンに一時浸漬した後、引き揚げたもの）からは、0.004 μ g/gのクマテトラリルが検出された（図9）。これは、竹島らの報告¹⁾による中毒死した豚の肝臓から検出された量（0.72～

0.83 μ g/g）と比較するとその約0.5%の微量であった。

今回の中毒豚は生体検査では異常が見られず、中毒死した豚に比べると殺そ剤の摂取量が少なかったことによるものか、あるいは病理検査用に一時的にホルマリン浸漬されたため、ホルマリン液にクマテトラリルが一部移行したりあるいはタンパク凝固が起こり定量値に影響を及ぼしたもののかは不明である。なお、筋肉からは検出されなかった（図10）。

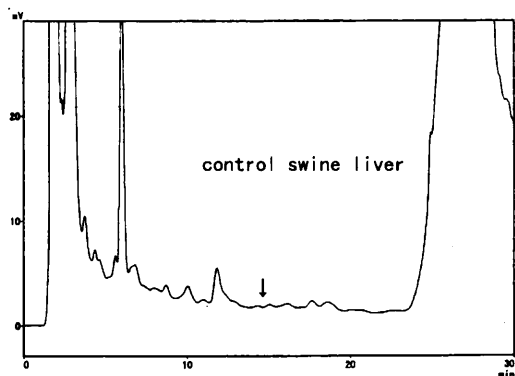


図7 正常豚（対照）肝臓

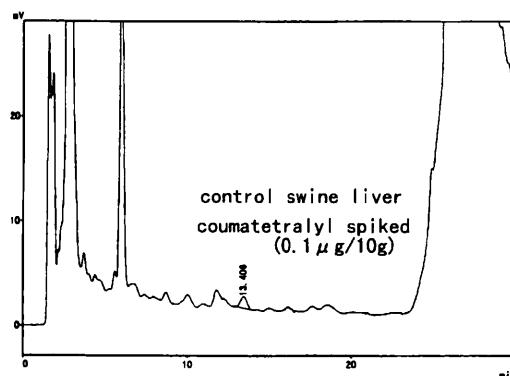


図8 正常豚肝臓に添加（0.01 μ g/g）

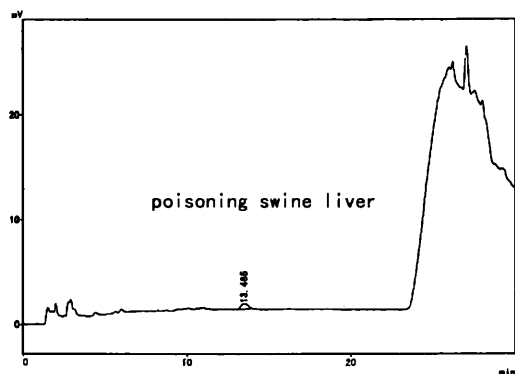


図9 中毒豚肝臓

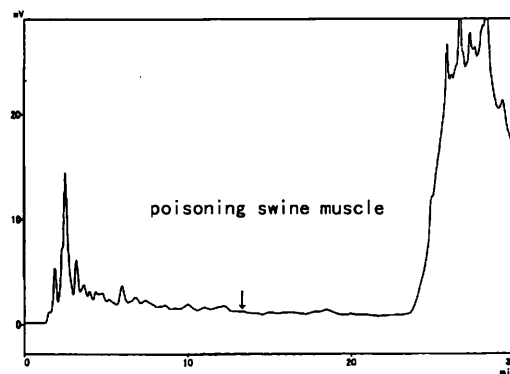


図10 中毒豚筋肉

Ⅳ 総括

全身に出血性病変の認められた豚について病理学的検査、理化学的検査及び殺そ剤の使用状況について聞き取り調査を実施したところ、この出荷者では殺そ剤を使用していること、病変の出現状態や組織所見が殺そ剤中毒に酷似していること、さらに肝臓から殺そ剤の成分であるクマテトラ

リルが検出されたことから、本症例をクマリン中毒と確定した。

家畜におけるクマリン系殺そ剤中毒は、死亡例としての報告はあるものの、と畜検査の途中で発見されるといった報告はほとんどない。本市と畜場においても初めての事例であったため、中毒症と断定できず、検体の採取、検査の方法に苦慮した。今回の事例を教訓に、今後は出荷者にお

ける殺そ剤の使用状況を把握し、中毒の発生予防に努めるとともに、何らかの化学物質の誤飲誤食による中毒の可能性が疑われる場合、病理検査用とは別にホルマリン処理をせず、直ちに冷凍保存した検体（筋肉及び各臓器）が必要となるため、冷凍検体を並行して保存するようにしている。

V 参考文献

- 1) 竹島由美子, 稲垣達也, 石川邦生: 日本獣医師会雑誌, 48(1), 18-20 (1995)

牛の肺疾患に関する調査

病理部門

Investigation of lung disease in cattle

Key words : 牛 cattle, 肺 lung, 肺炎 pneumonia, 胸膜炎 pleuritis

I はじめに

と畜検査において、牛の肺の病変は比較的多く認められるが、牛の肺について統計的に調査した報告は少ない。

今回、牛の肺疾患について平成4年度から平成10年度までのと畜検査データを解析し、併せて肺病変の好発部位及び合併症の調査を実施し、若干の知見を得たので報告する。

II 方法

平成4年度から平成10年度までの7年間に京都市と畜場に搬入された牛72,475頭（表1）について、肺疾患別発生状況及び品種・性別による発生状況を解析した。

表1 年度別及び品種・性別頭数

年度	和去	和牝	F1去	F1牝	乳去	乳牝
4	4,655	4,462	756	758	406	545
5	4,772	4,702	600	735	196	512
6	4,765	4,877	496	900	240	287
7	4,466	4,637	442	743	173	354
8	4,088	4,048	342	646	135	300
9	4,093	3,798	295	489	130	290
10	3,695	3,623	328	551	34	111
合計	30,534	30,147	3,259	4,822	1,314	2,399

なお、と殺性吸入肺については、肺疾患及び廃棄数から除外して解析した。また、肺炎、胸膜炎、及び肺疾患全体については月別発生状況の解析も行った。

さらに、平成10年7月11日から平成10年11月19日の間に搬入された正常牛2,787頭について、左肺を前葉前部、前葉後部及び後葉の3葉に、右肺を前葉前部、前葉後部、中葉、副葉及び後葉の5葉に分類して肺疾患の病変発現部位を調査した。

肺炎及び胸膜炎については、病変の程度を軽度（+）、中度（++）及び重度（+++）に分類した調査も行った。また、同一個体で複数の肺疾患病変が認められた場合は、発現部位の調査ではそれぞれの疾患で計上し、合併症の調査では単一の疾患とは別に計上した。

III 結果及び考察

1. 疾患別発生状況

検査頭数に対する各疾患別の廃棄率は、肺炎1.99%、胸膜炎1.86%、肺気腫0.44%、肺膿瘍0.31%、肝蛭異所寄生0.20%、色素沈着0.07%であった。

肺の廃棄総数に対する各疾患が占める割合を図1に示した。肺炎41%、胸膜炎38%であり、両疾患で廃棄の約8割に達していた。

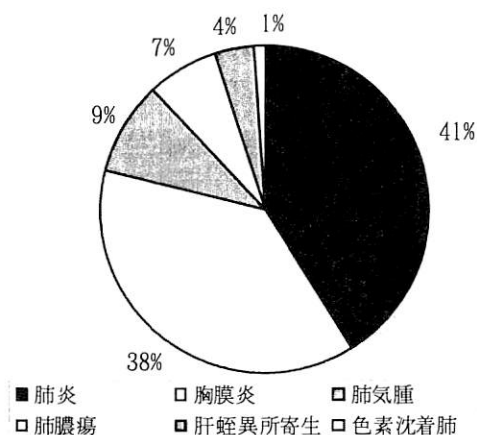


図1 肺の廃棄総数に対する各肺疾患の割合

2. 品種及び性別の肺疾患発生状況

品種及び性別にみた検査頭数に対する廃棄率を図2に示した。

廃棄率は、乳牝が11.17%、乳去が9.66%と著しく高く、その他は和去4.95%、和牝3.97%、F1去5.58%、F1牝5.66%であった。乳用種で肺疾患が多いのは、と畜される際の乳用種の年齢が肉用種よりも高いことや、病畜として搬入される場合が多いことが原因であると考えられる。

疾患別では、肺炎は乳牝で最も高く3.91%であった。胸膜炎は乳去が最も高く3.19%、乳牝が最低の1.2%であった。

肺気腫は乳牝が4.79%と著しく高く、次いで乳去が2.89%であった。肺膿瘍、肝蛭異所寄生、色素沈着では、品種及び性別による著明な差異は認められなかった。

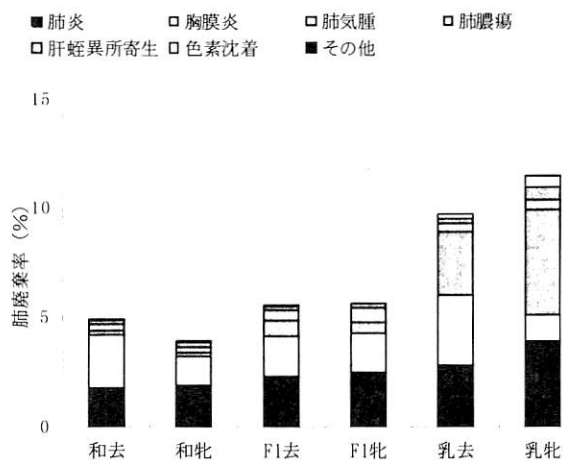


図2 品種及び性別の肺疾患発生状況

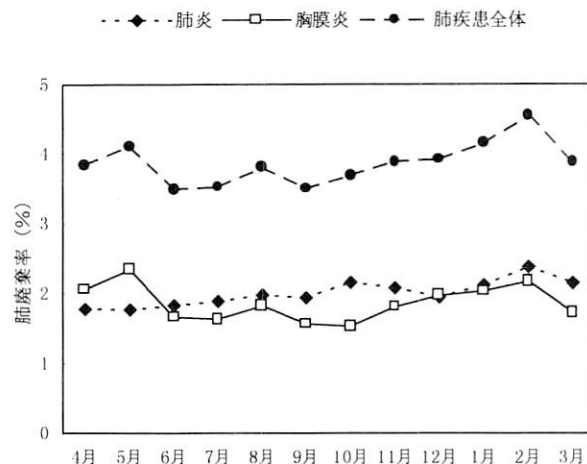


図3 肺疾患の月別発生状況

3. 月別発生状況

肺炎、胸膜炎および肺疾患全体の月別廃棄率を図3に示した。

肺炎で廃棄率が2%より高くなるのは、10月2.16%、11月2.08%、1月2.12%、2月2.38%、3月2.05%であり、秋季から冬季にかけて若干高くなる傾向にあった。

胸膜炎で廃棄率が2%より高くなるのは4月2.06%、5月2.34%、そして1月2.03%、2月2.17%であり、春季と冬季の2峰性のピークが認められた。肺疾患全体でも、春季と冬季に廃棄率が若干高くなる傾向が認められた。

冬季に肺疾患が増加する傾向にあるのは、低温ストレスがかかることによって免疫力が低下し感染が起こり易くなるためであると考えられる。また、春季に肺疾患が増加するのは季節の影響以外に何らかの飼育環境、飼育方法等の影響が現れているものと考えられる。

4. 肺病変の発現部位について

検査した2,787頭に対して、軽度なものを含めて病変が認められた牛は790頭(28.4%)であった。また、片肺あるいは両肺を廃棄した牛は202頭(7.2%)であった。

各肺疾患の肺葉別の発生状況を表2に示した。

肺炎は、右肺前葉前部および右肺前葉後部で高値を示し、左肺についても前葉は後葉に比べて高値であった。胸膜炎は右肺後葉での発現が高値を示し、左肺についても後葉は前葉に比べて高値であった。胸膜炎では軽度の病変を示すものが著しく多い。肺気腫、肺膿瘍、肝蛭異所寄生では後葉が前葉に比べて高い傾向にあった。

表2 肺病変部位が認められた延べ頭数

部位	肺炎				胸膜炎				肺気腫	肺膿瘍	異所寄生	色素沈着	放線菌病
	+	++	+++	合計	+	++	+++	合計					
左肺前葉前部	43	16	32	91	134	55	48	237	7	2	6	2	2
左肺前葉後部	39	15	27	81	134	52	49	235	8	2	3	2	3
左肺後葉	19	25	20	64	221	56	56	333	14	6	43	4	3
右肺前葉前部	66	32	46	144	156	81	76	313	3	2	3	0	2
右肺前葉後部	55	19	42	116	142	77	74	293	3	1	5	1	2
右肺中葉	29	17	22	68	141	65	74	280	3	3	3	0	3
副葉	5	3	8	16	112	49	67	228	3	1	1	0	3
右肺後葉	21	11	14	46	261	76	85	422	15	11	34	3	3

5. 合併症の発生状況

合併症の発生状況を表3に示した。

単一の疾患では胸膜炎が著しく高く442頭（15.86%）に認められ、次いで、肺炎が174頭（6.24%）に認められた。肝蛭異所寄生も46頭（1.65%）に認められた。

同一個体に複数の疾患が認められたのは、95頭（3.40%）であった。その中で最も多く認められたのは肺炎と胸膜炎の併発で54頭（1.94%）であった。次いで、胸膜炎と肝蛭異所寄生の併発が16頭（0.57%）であった。

Ⅳ おわりに

牛の肺疾患の発生には品種、性別、季節的影響、飼育環境及び飼育方法が関与するものと考えられた。また、肺疾患のいくつかには好発部位が存在するものと考えられ、合併症のデータと併せて、この調査結果を生産者へデータ還元するとともに今後のと畜検査の一助として活用していきたい。

表3 単一疾患及び合併症の発生状況

疾患名	頭数
肺炎	174
胸膜炎	442
肺気腫	13
肺膿瘍	11
肝蛭異所寄生	46
色素沈着	7
肺放線菌病	2
肺炎+胸膜炎	54
肺炎+肺気腫	2
肺炎+肺膿瘍	4
肺炎+肝蛭異所寄生	5
胸膜炎+肺気腫	6
胸膜炎+肺膿瘍	3
胸膜炎+肝蛭異所寄生	16
肺炎+胸膜炎+肺膿瘍	1
肺炎+胸膜炎+肝蛭異所寄生	1
胸膜炎+肺気腫+肝蛭異所寄生	3

牛枝肉の衛生評価

病理部門

Bacterial contamination in cattle carcasses

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

I はじめに

平成8年度にと畜場法施行規則、平成9年度に同施行令が改正され、HACCPの導入を視野に入れた衛生管理、設備基準などの見直しが行われ、現在、と畜場法施行以来最も大きな変革期を迎えている。

京都市と畜場では平成9年度、改正後の設備基準に適合した設備変更工事を行い、平成10年3月28日から新施設での試運転を開始し、5月18日から完全実施を行っている。

床面での剥皮作業が頭部切断以降オンライン方式での剥皮となり、また自動剥皮機も導入され作業工程が一新した。

そこで汚染状況を把握するため、枝肉汚染点検表に基づき調査し、併せて仕上げ洗浄後及び各作業工程別枝肉細菌数を検査、と殺解体工程における枝肉汚染要因を明らかにし、今後の改善点及び指導点について検討した。

II 調査方法

1. 枝肉汚染点検

期間：平成10年9月～12月

枝肉、白物(胃腸)、赤物(肝臓、心臓、肺など)汚染点検要領を作成し、これに基づきと畜検査時に調査した。

2. 細菌数

期間：平成10年5月～平成11年3月

検査項目：一般生菌数、大腸菌群数

検体採取部位：仕上げ洗浄後枝肉、冷蔵庫入庫前の尻部及び胸部

作業工程別枝肉：背割り後左枝肉の後肢、尻部、胸部、前肢及び頸部の5カ所

検査方法：厚生省通知による。菌数は実数を計上し、1 cm²当たりの菌数を求めた。

III 作業工程

(平成10年度)

打額→放血(食道結紮)、頭部切断→懸吊→剥皮工程1：前肢、前胸部剥皮→剥皮工程2：左後肢、左腹部(一部)剥皮→剥皮工程3：右後肢、右腹部(一部)剥皮、ライン吊替え

→剥皮工程4：尻、腰部剥皮(肛門結紮)→剥皮工程5：両腹部、両胸部剥皮→剥皮工程6：両頸部剥皮→剥皮工程7：背側を残し剥皮(サイドプラー)→剥皮工程8：完全剥皮(ダウンプラー)→胸割り、白物(胃腸)摘出→赤物(肝臓、心臓、肺等)摘出→尾部切断、背割り→整形→水洗(自動枝肉洗浄機)→冷蔵庫入庫

(平成9年度)

打額→放血→頭部切断→腹側胸、腹部一部剥皮→前後肢剥皮→背側の皮を残し剥皮→懸吊→背腰部剥皮→胸割り→尾部切断→内臓摘出→背割り→水洗→整形→最終洗浄→冷蔵庫入庫

IV 仕上げ洗浄後の枝肉衛生評価

一般生菌数は12月をピークとしたカーブを描いているが、生体検査時にチェックしたヨロイ(体表面に糞尿が付着し乾燥したもの)付着率のカーブも同様の結果となっており生体の汚れが枝肉汚染の大きな原因となっていると考えられる(図1)。

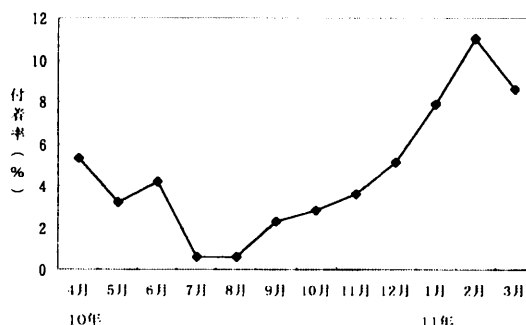


図1 ヨロイ付着率

平成9年度と比較すると、一般生菌数で10³以上のものが62.5%から減少しているものの、ほぼ横ばい状態である。

また、大腸菌群数で10⁶以上のものが53%から51.9%と、ほぼ横ばい状態である。

これは設備面における衛生レベルは向上したが、と殺解体作業工程において旧来からの諸問題がそのまま持ち越さ

表1-1 平成9年度仕上げ洗浄後一般生菌数

菌数	検体数	(%)
$10^4 \sim$	27	(13.0)
$10^3 \sim$	103	(49.5)
$10^2 \sim$	71	(34.1)
$10 \sim$	7	(3.4)
合計	208	(100.0)
平均	4.1×10^3	

表1-2 平成10年度仕上げ洗浄後一般生菌数

菌数	検体数	(%)
$10^5 \sim$	1	(1.2)
$10^4 \sim$	8	(9.9)
$10^3 \sim$	31	(38.3)
$10^2 \sim$	28	(34.6)
$10 \sim$	13	(16.0)
合計	81	(100.0)
平均	5.1×10^3	

表2-1 平成9年度仕上げ洗浄後大腸菌群数

菌数	検体数	(%)
$10^2 \sim$	1	(0.5)
$10 \sim$	27	(13.5)
$10^0 \sim$	78	(39.0)
$10^0 > 0$	70	(35.0)
0	24	(12.0)
合計	200	(100.0)
平均	6.1	

表2-2 平成10年度仕上げ洗浄後大腸菌群数

菌数	検体数	(%)
$10^2 \sim$	1	(1.2)
$10^1 \sim$	8	(9.9)
$10^0 \sim$	33	(40.7)
$10^0 > 0$	33	(40.7)
0	6	(7.4)
合計	81	(100.0)
平均	6.9	

れ、改善されていない結果を反映しているものと思われる
(表1-1, 1-2, 2-1, 2-2)。

V 作業工程別枝肉の衛生評価

1. 剥皮工程 1

前肢の一般生菌数は $7.1 \times 10 \sim 2.9 \times 10^5$ の範囲で、 10^3 以

上が84%あり、また、大腸菌群数も 10^0 以上が66%で、常に高い汚染率を示している(表3-1, 表3-2)。これは、汚染点検をみても毛汚染率が左右で、66.1%, 64.7%で、糞便汚染率も11.8%, 12.9%となっていることから、皮膚表面からの1次、2次汚染が原因であると考えられる(表4)。

表3-1 平成10年度作業工程別一般生菌数

菌数	検体数 (%)				
	前肢	後肢	尻部	胸部	頸部
$10^5 \sim$	2 (4.0)		1 (2.0)	2 (4.0)	
$10^4 \sim$	20 (40.0)	2 (4.0)	5 (10.0)	10 (20.0)	4 (8.0)
$10^3 \sim$	20 (40.0)	7 (14.0)	11 (22.0)	24 (48.0)	5 (10.0)
$10^2 \sim$	7 (14.0)	20 (40.0)	18 (36.0)	13 (26.0)	13 (26.0)
$10 \sim$	1 (2.0)	17 (34.0)	13 (26.0)	0 (0.0)	13 (26.0)
$10^0 >$	0 (0.0)	4 (8.0)	2 (4.0)	1 (2.0)	15 (30.0)
合計	50 (100.0)	50 (100.0)	50 (100.0)	50 (100.0)	50 (100.0)
平均	2.8×10^4	1.3×10^3	5.8×10^3	1.6×10^4	4.6×10^3

表3-2 平成10年度作業工程別大腸菌群数

菌数	検体数 (%)				
	前肢	後肢	尻部	胸部	頸部
$10^2 \sim$	1 (2.0)		1 (2.0)		1 (2.0)
$10^1 \sim$	5 (10.0)	1 (2.0)	7 (14.0)	8 (16.0)	3 (6.0)
$10^0 \sim$	27 (54.0)	11 (22.0)	19 (38.0)	29 (58.0)	7 (14.0)
$10^0 > 0$	15 (30.0)	13 (26.0)	17 (34.0)	11 (22.0)	22 (44.0)
0	2 (4.0)	25 (50.0)	6 (12.0)	2 (4.0)	17 (34.0)
合計	50 (100.0)	50 (100.0)	50 (100.0)	50 (100.0)	50 (100.0)
平均	6.4	1.2	1.3×10	6.3	6.1

表4 平成10年度枝肉汚染点検表

部位		汚染物質	合計	汚染率(%)
前肢～胸部	右	毛	990	64.7
		糞便汚れ	197	12.9
	左	毛	1,011	66.1
		糞便汚れ	180	11.8
頸部	右	毛及び糞便汚れ	53	3.5
		血液	48	3.1
	左	毛及び糞便汚れ	25	1.6
		血液	48	3.1
臀部	右	血液、毛	102	6.7
		糞便	62	4.1
	左	血液、毛	33	2.2
		糞便	18	1.2
尻～後肢	右	毛	164	10.7
		糞便	128	8.4
	左	毛	314	20.5
		糞便	219	14.3
乳房	右	毛	117	7.7
	左	毛	513	33.6
横隔膜～胸骨		胃腸内容物	208	13.6
骨盤腔部		糞便	34	2.2
頸部～背部		血液	81	5.3
体表		鎧	75	4.7
頭数			1,529	

〔汚染要因〕

- 1) 工程1と2の間で、枝肉同士の接触がある。
- 2) 洗浄消毒器の位置が作業場所と少し離れているため、頻繁に使用しにくい。
- 3) この工程で剥皮した遊離断端が垂れ下がり、胸部に比して肩付近が横に張っているため肘部から肩部にかけて接触する。
- 4) 前胸部は静上状態では剥皮遊離断端が接触していないが、枝肉移動時の振動などにより接触する。
- 5) 前肢、胸部は生体時には下部に当たり、打額前の生体洗浄により汚水が下部に流れ、また懸吊後も最下部になるため常に汚染された状態にある。
- 6) 剥皮工程の最初に位置しているため皮膚表面を切開する工程が多く、手指及び器具が汚染され、作業途中の洗浄消毒が不十分なため、枝肉が2次汚染される。
- 7) 去勢牛（雄も含む）の場合、陰茎を腹部から切り離す時、先端の外皮が残存している事が多く、この外皮が枝肉に触れ汚染する。

2. 剥皮工程2, 3, 4

後肢は一般生菌数、大腸菌群数とも検査した5カ所のなかでは比較的汚染の少ない部位であった。尻部は特に大腸菌群数で 10^4 以上が54%と高い汚染を示している。汚染点検をみると（尻から後肢にかけて）毛汚染率が左右で20.5

%, 10.7%, 糞便汚染率は左右で14.3%, 8.4%であった。左右で差があるのは、それぞれ別工程で行われ、右後肢剥皮時にはすでに左後肢が剥皮され、作業中左後肢に触れても汚染が少ないためと思われる。

尾部は汚染点検で、毛汚染率が7.9%であるが、糞便汚染率が18.9%と高く肛門周囲の汚染の高さを示している。肛門結紮を工程4で行っているが、結紮不良のものが30.5%と高くこれが骨盤腔部等の主要汚染原因となっている。

〔汚染要因〕

- 1) 後肢、尻部はヨロイなど生体時汚染が多く、また肛門周辺部は常時糞便汚染されている。
- 2) 打額前生体洗浄で十分汚れが落ちていないため手指及び器具からの2次汚染を引き起こす。
- 3) 尾部肛門側に切開線を皮膚表面から入れているため毛、糞便に汚染される。
- 4) 肛門結紮前に肛門周囲にナイフを入れ、尻部から切り離す時に、直接手指及び器具が汚染され、その後の洗浄消毒が不十分なため、2次汚染を引き起こす。
- 5) 肛門結紮は、肛門にビニール袋を被せ結紮を行うが、肛門部分を完全に被っていないものが多い。

3. 剥皮工程5, 6, 7

〔汚染要因〕

剥皮遊離断端が枝肉に接触する。

4. 剥皮工程8

〔汚染要因〕

1. ダウンプラー2名分に手洗器がなく、消毒槽を手洗器替わりに使用しているため、洗浄消毒共に不十分になっている。
2. 肩部付近まで手で剥皮し、それ以降剥皮機を使用しているため、器具からの2次汚染がある。
3. ダウンプラーで巻き取った皮をシュートに入れ巻き戻す時に、皮が枝肉頸部に接触することがある。
5. 胸割り、白物（胃腸）摘出

汚染点検では、作業員による胃損傷が1.6%、胸割り用小型電動鋸による胃損傷が4.6%、胃摘出時に胸骨によって破れたものが4.2%あり、胃が損傷することにより損傷部分から胃内容物が流出し、胃腸はもとより枝肉胸腔部及び胸腔内の内臓を汚染する。この工程で食道のないものが18.9%あり、これは食道結紮時に気管と食道を切り離していないため、胃摘出時食道を噴門部で切断せざるを得なくなり、結果噴門部分に穴が開き内容物が流出する。

〔汚染要因〕

- 1) 胃腸を損傷することによって内容物が流出し、汚染を広げる。

2) 食道結紮工程での不良が結果的に胃損傷につながる。

表5 平成10年度白物汚染点検表

汚染要因	計	汚染率(%)
白物作業員による第一胃ナイフ傷	22	1.6
第4胃の胸引き鋏による傷	63	4.6
解体時に自然に破れたもの(第1胃と第3胃の間)	57	4.2
食道結紮バンドのないもの	124	9.1
食道がついていないもの	257	18.9
肛門結紮の不良なもの	414	30.5
合計頭数	1,357	

6. 赤物(肝臓、心臓、肺など)摘出

汚染点検で気管に食道が付いているものが19.5%あるが、これは白物摘出時の食道のないものと同じ理由で起こるので、胃噴門部で食道が切断された結果、気管に食道が付いた状態となり、逆流した胃内容物が食道断端から流出し、赤物全体を汚染する。

〔汚染要因〕

食道結紮不良時に食道が気管に付いた状態となり、赤物全体を汚染する。

表6 平成10年度赤物汚染点検表

汚染要因	計	汚染率(%)
食道がついているもの	307	19.5
尾に糞便がついているもの	298	18.9
尾の毛が取れていないもの	124	7.9
合計頭数	1,577	

Ⅵ 今後の改善点及び指導点

1. 入荷時

牛体表面汚れ(特にヨロイ)のチェック、ヨロイの除去及び生体洗浄の徹底をはかる。

2. 係留中

1) ほとんどがと殺前日搬入されるため、係留中に出た糞便などを洗浄する。

2) と殺直前の生体洗浄の徹底(特に肛門周辺)をはかる。

3. 打額、頭部切断

1) 食道結紮の熟練及び徹底をはかる。

2) 個体によって食道結紮が、現行使用している結紮器では困難な場合があるので、その時の対応を考える必要がある。

4. 剥皮工程1

1) 剥皮1刀目、最小限度切開した後器具を洗浄消毒し、その後皮膚を内側から外側に向けて切開する。

2) 手指及び器具が外皮に触れ汚染された時にはその都度

洗浄消毒を行う。

3) 工程1と2の間で枝肉に接触するので、工程2の進行具合を確認して作業を行う。

4) 去勢牛の場合、陰茎先端外皮を必ず除去する。

5) 剥皮遊離断端が枝肉(肘部から肩部付近)に接触するため、剥皮した皮膚が反転した状態で以後の工程へ進める工夫はないか。

6) 洗浄消毒器を使用しやすい位置に、あるいは作業場所を検討する。

5. 剥皮工程2

1) 剥皮1刀目、最小限度切開した後器具を洗浄消毒し、その後皮膚を内側から外側に向けて切開する。

2) 手指及び器具が外皮に触れ汚染された時にはその都度洗浄消毒を行う。

3) 剥皮は枝肉上部から下部へ行い、剥皮断端が枝肉に接触しないようにする。

6. 剥皮工程3

1) 剥皮1刀目、最小限度切開した後器具を洗浄消毒し、その後皮膚を内側から外側に向けて切開する。

2) 手指及び器具が外皮に触れ汚染された時にはその都度洗浄消毒を行う。

3) 剥皮は枝肉上部から下部へ行い、剥皮断端が枝肉に接触しないようにする。

7. 剥皮工程4

1) 剥皮1刀目、最小限度切開した後器具を洗浄消毒し、その後皮膚を内側から外側に向けて切開する。

2) 手指及び器具が外皮に触れ汚染された時にはその都度洗浄消毒を行う。

3) 尾部肛門側に切開線を入れる時も、最小限度切開した後手指及び器具を洗浄消毒し、ナイフを内側から外側に向けて切る。

4) 肛門結紮時、他部位への汚染を避けるため外皮及び肛門周辺に触れた時には、その都度洗浄消毒し、ビニール袋を確実に肛門に被せ結紮を行う。

8. 剥皮工程5, 6

1) 枝肉左右毎の手指及び器具の洗浄消毒の徹底をはかる。

2) 剥皮遊離断端が枝肉に接触しないようにする。

9. 剥皮工程7

1) 手指及び器具が外皮に触れた時にはその都度洗浄消毒を行う。

2) 剥皮遊離断端が枝肉に接触しないようにする。

10. 剥皮工程8

1) 剥皮機の使用時、皮膚をつかんで巻き取り機にかけるため、手指の洗浄徹底をはかる。

- 2) 作業員2名分の手洗器を設置する。
- 3) 巻き取った皮をシュートに入れ巻き戻す時、スピード調節を適切に行うか、枝肉移動時に行う。

11. 胸割り、白物（胃腸）摘出

- 1) 胸割用小型電動鋸の1頭毎の洗浄消毒を徹底する。
- 2) 胸割り時、鋸を胸腔に入れ過ぎないように、適切な位置で実施する。
- 3) 摘出時、ナイフで胃腸を傷付けない。
- 4) 胃の摘出時、胃自体の重みで裂けることがあり、また胸骨によって損傷することがあるのでこの対策を考える。
- 5) 食道結紮不良時の対策を検討する。
- 6) 膿瘍がある場合の処置を検討する。

12. 赤物（肝臓、心臓、肺など）摘出

- 1) 食道結紮不良時の対策を検討する。
- 2) 膿瘍がある場合の処置を検討する。

13. 背割り

- 1) 尾部用シュートの洗浄消毒の徹底をはかる。
- 2) 背割りする時、鋸を奥まで入れ過ぎ（特に頸部付近）ると手元ホルダーが枝肉に接触し、鋸屑等が枝肉に付着するため、鋸を入れ過ぎないようにする。

14. 整形

枝肉の汚染部（毛、糞便等で汚染された部分）をトリミング（除去）する。

年度と比較すると、一般生菌数で 10^3 以上の比率が62.5%から49.4%と減少しているものの、ほぼ横バイ状態である（表1-1, 1-2参照）。これは設備面における衛生レベルは向上したものの、と殺解体作業工程において旧来からの問題がそのまま持ち越され、改善されていない結果を反映しているものと思われる。

作業工程別に菌数をみると前肢、胸部の汚染が高く、次いで尻部、後肢、頸部となっている。特に前肢及び胸部は、それぞれ平均値で 10^4 以上であり、また、一般生菌数 10^3 以上が84%、72%あり大腸菌群数 10^3 以上も66%、74%で非常に高い汚染度となっている（表3-1, 3-2参照）。

前肢は剥皮した遊離断端が、肩から肘部に付着し汚染を広げている。また剥皮工程の最初に行われているが、剥皮は上部から下部へ（後肢から頸部方向）が基本であり、作業工程の見直しを含めて考慮する必要がある。胸部も腹部とともに比較的早い段階で正中線に沿って切開剥皮されるため、前肢と同様に、剥皮遊離断端面が枝肉に接触する可能性が高い。

また、尻部は最も汚染されていると考えられている肛門周囲の処理を含み、そのために汚染度が高くなっている。

京都市と畜場において、枝肉の衛生レベルは平成9年度とほとんど大差なく、ソフト面において立ち遅れている現状にある。今後 HACCP による衛生管理の実現にむけ、手指及び器具の洗浄消毒の徹底等基本的な衛生管理ポイントを遵守させることから始め、日頃の衛生教育を通じて各作業員の衛生意識の向上を計らなければならない。

VII まとめ

衛生的評価の基準として、仕上げ洗浄後の菌数を平成9

ハイブリダイゼーション法による EHEC の検出と単離の試み

調査研究部門

Detection of EHEC by using colony hybridization method

Key words : コロニーハイブリダイゼーション colony hybridization, 腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *E. coli*

I はじめに

1996年、岡山県での大規模な O157による集団食中毒事件の発生以来、O157などによる腸管出血性大腸菌(EHEC)による集団あるいは散発の食中毒事例が毎年、各地で報告されている。

京都市においても例外ではなく、1996年死者1名を出した O157による食中毒事件以後、毎年40～80件前後の EHEC 患者あるいは保菌者が発見されている^{1, 2)}。

EHEC は溶血性腎炎など重篤な症状を引き起こす場合も多くみられ、また、他の食中毒菌と異なり数十個の菌の感染によっても発症するとされており、感染の広がりを阻止し、一人でも患者を減らすには迅速な原因菌の分離、同定が必要とされる。

EHEC による感染を確認するには、菌の分離、同定及びベロ毒素の検出が不可欠である。菌の分離には O157がソルビット非・遅分解性であることや、O26, O111がβ-グルクロニダーゼ陽性であることを利用した数種の確認培地が市販され、多くの検査機関で汎用されている。一方、ベロ毒素の検出には高感度な PCR 法が広く用いられているが、PCR 陽性にも関わらず菌を分離することが難しい例が見られる。原因としては、PCR により死菌のベロ毒素を検出している場合や、菌数が極めて少なく菌を拾い損なう場合が考えられる。そこで、今回、普通寒天培地上で培養した菌からコロニーハイブリダイゼーションにより verotoxin(VT)遺伝子を確認し、菌を単離する方法を検討したので報告する。

II 方法

1. コロニープレートの作成方法

菌株としては、腸管出血性大腸菌 O157, VT1, 2型を有する菌と、健康人の便から採取した糞便性大腸菌を使用した。これらの大腸菌を EC 液体培地を用い37℃で一晩培養した後、種々の段階希釈を行い、糞便性大腸菌と O157を混合して普通寒天平板培地または DHL 平板培地上に撒き、37℃で一晩培養しコロニーを形成させた。

2. プローブの作成

PCR DIG プローブ合成キット(Boehringer Mannheim)を用い、ジゴキシゲニン(DIG)ラベルプローブを作成した。

プローブ作成用の template としては、当所に保存されている腸管出血性大腸菌のうち、VT 1, 2型を有する菌株から熱抽出法で DNA を回収、腸管出血性大腸菌用 primer set 及び PCR 試薬 set(Takara)を用いて、得られた PCR 産物を使用した(VT 1型, 349bp; VT 2型, 404bp)。プローブ作成に当たっては、これらの PCR 産物を10倍希釈したものを template として使用した。

template は5 μ lを用い、全量50 μ lの反応系で上記プローブ合成キット添付マニュアルに準じて PCR DIG プローブを合成した。なお、プローブ作成用のプライマーとしては、上記の Takara 製のものを使用した。PCR 反応条件としては、まず denaturation 94℃, 10秒, annealing 45℃(VT 1型), 48℃(VT 2型), 30秒, extension 72℃, 2分で10cycle の DNA 増幅を行った後、extension の時間を 1 cycle 毎に20秒延長する様に設定した DNA の増幅を20cycle 行った。

増幅後、電気泳動によりバンドを観察し、DIG 標識 PCR 産物が DIG の取り込みのため見かけの分子量が大きくなることを確認した (Fig. 1.)。

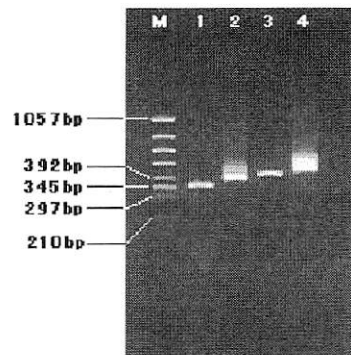


Fig.1. Verotoxin-probes before and after DIG-labeling.

PCR products of verotoxin gene were used as probes.
M: size marker (Hinc II), Lane1: VT1 (349bp),
Lane2: DIG-labeled VT1, Lane3: VT2 (404bp),
Lane4: DIG-labeled VT2.

3. コロニーハイブリダイゼーション

1) 前処理

普通寒天培地上のコロニーの上に、ナイロン膜(Magna Lift; MSI)を置き、コロニーを膜上にトランスファーした。20分間乾燥した後、0.5N NaOH, 1.5M NaCl 1 mlで20分間溶菌してDNAを膜上に固定した。DNA固定膜は中和液(1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH7.4) 1 ml中に2分間浸して中和、更に、2×SSC 20mlを用いて5分間振とうする操作を2回繰り返した後、DNA固定膜をハイブリパック(コスモ・バイオ)に移し、3×SSC, 0.1% SDS 20mlで68℃、1～3時間振とうして、細胞破片を除去した。

2) ハイブリダイゼーション

DNA固定ナイロン膜を新たなハイブリパックに移し、あらかじめ加温しておいた、ハイブリダイゼーション液(DIGEasy Hyb; Boehringer Mannheim) 20mlを用い、42℃で30分間振とうし、プレハイブリダイゼーションを行った後、液をDIG標識プローブ含有ハイブリダイゼーション液1.75ml (VT1, 2型用プローブ各1.3μl含む)に換え、42℃で3～16時間振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。なお、プローブは10分間の煮沸処理後、急冷し一本鎖DNAに変性したものを使用した。ハイブリダイゼーション後、2×SSC, 0.1% SDSで室温にて5分間2回、0.1×SSC, 0.1% SDSで55℃にて15分間2回、振とうの洗浄を行い、余分なプローブを除去した。

4. 検出方法

DIG発光検出キット(Boehringer Mannheim)を用い、化学発光によるシグナルの検出を添付のマニュアルに準じて行った。

すなわち、まず上記のように処理したDNA固定膜を洗浄バッファー(0.1M マレイン酸, 0.15M NaCl, pH7.5, 0.3% (w/v) Tween20)で5分間振とうしながら洗浄した後、洗浄バッファーを捨て、バッファー2(1%ブロッキング試薬, 0.1M マレイン酸, 0.15M NaCl, pH7.5) 100mlを新たに加え、30分間振とうしてブロッキングを行った。DNA固定膜を新たなハイブリパックに移し、標識抗体液(抗DIG AP, Fabフラグメント75mU/ml バッファー2) 20mlで30分間インキュベートした。この標識抗体結合DNA膜は洗浄液100mlで15分間2回洗浄し、未反応の標識抗体を除去した後、検出バッファー(0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH9.5) 20mlで5分間平衡化した。この後、1mlのCSPD溶液(CSPDを検出バッファーで100倍希釈)を固定膜に滴下し、5分間室温に放置した後、Whatman 3 MM 濾紙を用いて余分なCSPD溶液を取り、メンブレンをハイブリパックに密閉した。37℃で10分間インキュベートした後、X線フ

ィルム(フジ RX-U)で1晩感光し、化学発光によるシグナルを検出した。

5. PCRによる確認

ハイブリダイゼーション後、シグナルが認められたものについて、該当する位置にあるコロニーを釣菌し、PCR(上記Takara kitを使用)によりVT遺伝子を有する大腸菌であるかを確認した。

Ⅲ 結果及び考察

最初に、コロニープレートの作成にあたって、普通寒天平板培地とDHL平板培地を用い、検出結果の検討を行った。DHL培地を使用した場合、コロニーの膜へのトランスファーがうまくいかず、検出結果に影響を及ぼすことが確認された。したがって、以降の実験結果においては、普通寒天培地を使用した。

まず、糞便性大腸菌、数1,000個、O157、数10個の条件下でコロニーハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、数10個のシグナルが認められたが、その中からシグナルの特に強いコロニー8個を任意に選び、PCRによりverotoxin遺伝子の確認を行った。Fig. 2に得られた結果を示す。6/8 (PCR陽性/ハイブリダイゼーション陽性)という結果が得られた。同様の条件下で実験を繰り返したがハイブリダイゼーションとPCRの結果の一致率は50～75%に留まった。

この様にハイブリダイゼーションとPCRの結果の不一致を認めた原因としては、プレートに数千個オーダーの菌を撒いた場合、プレート一面に小さな菌集落が生じ、ハイブリダイゼーションによるシグナルと菌集落との位置関係の特定が難しく、目的とするコロニーを回収する事が出来なかったことに起因するものと考えられた。

そこで、プレートに撒く菌数を千個以下に設定し、糞便性大腸菌約500個、O157数個の条件で実験を試みた。一つのプレート上に、O157数が1～2個となるように調製した条件下での結果をFig. 3に示す。ハイブリダイゼーション後、2個のシグナルが確認され、これらについてPCRを行ったところ、2/2 (PCR陽性/ハイブリダイゼーション陽性)という結果が得られた。同様の条件下で、O157数を5～10個に調製した場合においても、ハイブリダイゼーションとPCRの結果は良く一致し、満足の出来る結果となった。

なお、プレートに千個以下の菌を撒いた場合でもハイブリダイゼーションの結果とPCRの結果が一致しない事例があったが、コロニーの取り直し又はリプロービングした

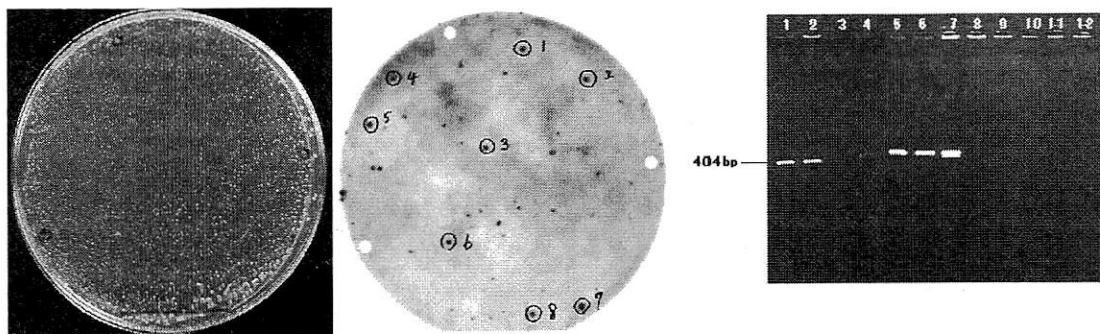


Fig 2. Colony formation, hybridization and PCR of the signal-matched colonies.

A few thousands of fecal coliforms were seeded with 10-100 of O157 on the surface of an agar plate.

Lane 1 to 8:PCR results from the signal-matched colonies.

Lane 9 to 12:PCR results from the colonies having no matched signal.

The signal matched colonies were confirmed to be PCR positive except for two colonies.

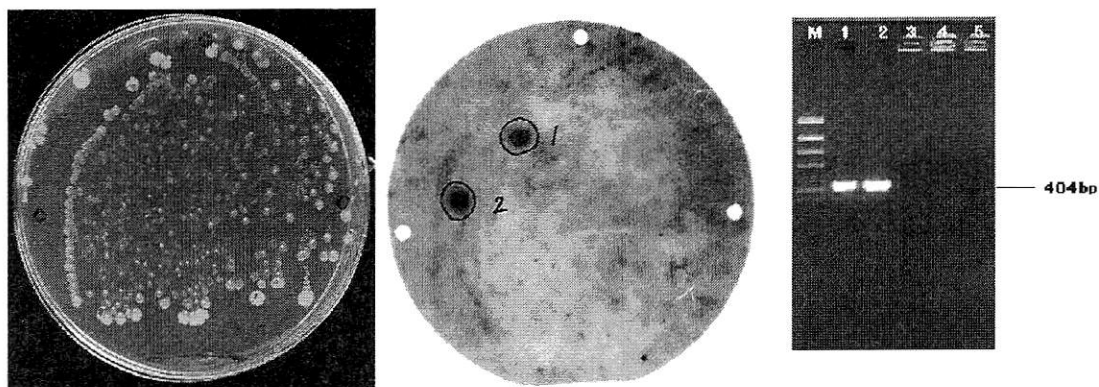


Fig 3. Colony formation, hybridization and PCR of the signal-matched colonies.

Approximately 500 of fecal coliforms were seeded with a few of O157 on the surface of an agar plate.

Lane 1 to 2:PCR results from the signal-matched colonies.

Lane 3 to 5:PCR results from the colonies having no matched signal.

The signal-matched colonies were confirmed to be PCR positive.

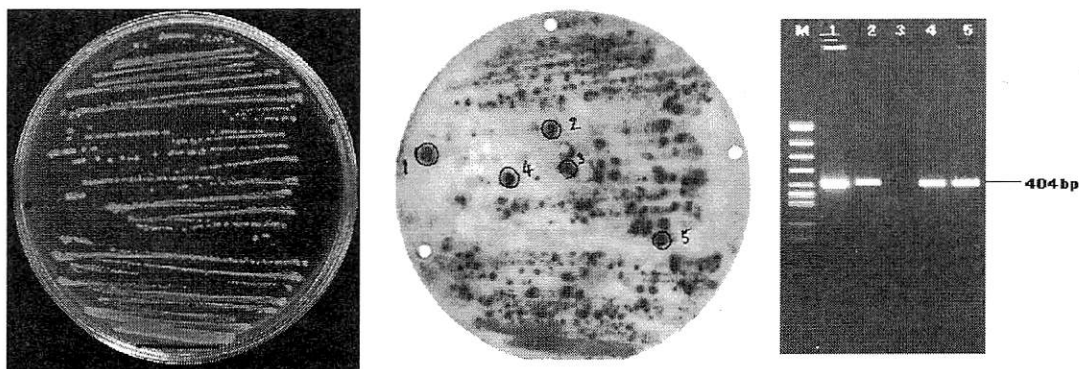


Fig 4. Colony formation, hybridization and PCR of the signal-matched colonies.

A 1mm loopful of condensed fecal coliforms pellet (contained O157 with a ratio of 1/100) was streaked on an agar plate.

Five of the isolated colonies, which matched with hybridization-signal, were confirmed to be PCR-positive except for one.

However, another colony was found to be present under the PCR-negative colony and it was PCR-positive.

後、再度ハイブリダイゼーションを行ったところ、全ての例でハイブリダイゼーションと PCR の結果は一致した。

また、Fig. 2, 3の実験では、同時にハイブリダイゼーション陰性のコロニーについて PCR を行ったが、すべて陰性となった。

次に、糞便性大腸菌 100: O157 1となる様に菌液を調製し、これを普通寒天平板培地に塗抹して平板分離培養したものについて、ハイブリダイゼーションを試みた。Fig. 4に結果を示す。多数のシグナルを認めたが、その中からコロニーが単離し、シグナルの位置と一致するコロニーを5個選び出し PCR を行ったところ、4/5 (PCR 陽性/ハイブリダイゼーション陽性)という結果が得られた。PCR で陽性を得られなかったコロニーについては、その下部に別のコロニーを認めたので、このコロニーを釣菌し、再度 PCR を行ったところ、陽性の結果を得ることが出来た。

今回の結果からプレート上の菌集落が過密でない場合はハイブリダイゼーションによるシグナルから O157コロニーを効率良く判別し、単離出来る事が明らかになった。

一般に、ハイブリダイゼーションによるシグナルを検出するためには出来る限りバックグラウンドを抑える様に実験条件を設定するが、今回のようにシグナルの位置から菌

を釣菌したい場合はある程度バックグラウンドを残す様に実験条件を設定する必要がある。このために、紛らわしいスポットが生じ易いので注意する必要がある。今後、検出条件を更に検討したい。しかし、ハイブリダイゼーションによって数百個の糞便性大腸菌から1個の O157を選び出すことが可能であり、今後、PCR 陽性にも関わらず O157を単離出来ない場合にこのハイブリダイゼーション法を応用する事により効率的に O157を単離する事が可能になると考えられる。

今回使用した菌株は、O157であったが、使用したプローブは、VT 遺伝子検出用であり、他の血清型の腸管出血性大腸菌にも使用可能である。また、プローブの設計を変えることにより、他の菌種にも応用が出来るため、今後、色々な方面で利用出来る有用な方法であると思われる。

IV 参考文献

- 1) 京都市衛生公害研究所 調査研究部門, 同研究所年報, No. 63, 122-124(1997)
- 2) 京都市衛生公害研究所 調査研究部門, 同研究所年報, No. 64, 114-115(1998)

DNA analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* using pulsed-field gel electrophoresis in 1998

Division of Public Health Study

平成10年度における腸管出血性大腸菌のパルスフィールド・ゲル電気泳動法による遺伝子解析

Abstract : The outbreak of enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC) infection is a major threat in public health. An EHEC O157:H7 is recognized as an agent causing hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. In 1998, we examined samples from 44 cases(20 males and 24 females) of EHEC infection in Kyoto City; they consisted of 27 strains of O157:H7, 13 of O26:H11, and 4 of O111:NM. The isolates were mostly from sporadic cases, but included 7 family clusters. The age of these 44 cases ranged from 8 months to 82 years old, in which 21 cases were infants under 5 years old. It was reported that all patients fully recovered and none died.

We report here the results of verotoxin determination, RAPD analysis and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) study for the molecular typing of these isolated pathogens.

Key Words : EHEC(Enterohemorrhagic *E. coli*), PFGE(Pulsed-field gel electrophoresis)

I Introduction

Since the outbreak in 1996, we encountered only sporadic cases EHEC (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, O157) infectious disease in Kyoto over the past two years; however, the EHEC O157 outbreak remains as a major public health threat and concern. It is assumed that large outbreak is spread by intercommunity "person-to-person contact" with family pairs. To prevent the spread of disease, it is necessary to keep in mind a sanitary control of food-born products at all seasons. We report here the results of study about the spread pattern of EHEC infection from the types of isolated EHEC in 1998 in Kyoto City.

II Methods

Bacterial strains: A total of 44 EHEC isolates(27 strains of *E. coli* O157:H7, 13 strains of *E. coli* O26: H11, and 4 strains of *E. coli* O111:NM) were obtained at the Division of Clinical Chemistry, and of Bacteriology and Microbiology, in Kyoto City Institute of Health and Environmental Sciences.

Analysis by PFGE : The PFGE technique of contour clamped homogenous electric field (CHEF-III) electrophoresis was performed as previously described¹⁾. PCR analysis of the VT genes (VT1 and VT2) and typing by RAPD method were undertaken as previously reported¹⁾.

III Results

Monthly occurrence of EHEC infection: A peak in July was due to clusters of familial infections(3 males, 6 females)(Fig. 1). It was also noted that 21 of the 44 isolates were obtained from familial infection cases occurred from July to December.

Clinical profiles: Approximately half of the EHEC cases (47. 7%) were seen in young children under age 5. Another

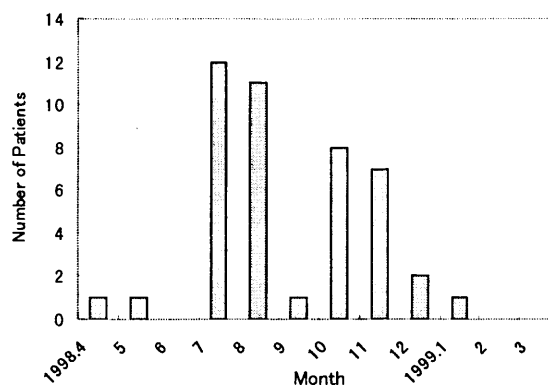


Fig. 1 Monthly occurrence of EHEC infection

Table 1 Clinical profiles

Age	Male	Female	Total (%)
0-5	13	8	21 (47.7)
6-11	1	2	3 (6.8)
12-18	0	0	0 (0.0)
19-50	4	8	12 (27.3)
51-80	2	5	7 (15.9)
81-90	0	1	1 (2.3)

peak was noted at the age range of 19-50 years with 27.3% (Table1). No significant difference was present between males and females. No mortality was reported.

Detection of verotoxin(VT) genes: Twenty-four were positive for both VT1 and VT2, 14 for VT1 alone, and the remaining 6 for VT2 alone. Twenty-two of 27 EHEC O157 were positive for both VT1 and VT2, while all 13 isolates of O26 were positive for VT1 alone and all 4 isolates of O111

were positive for both types of verotoxins.

PCR-RAPD results:All O26 isolates showed Type A1, while O157 revealed type II (some were variants), and O111 disclosed B1 type.

PFGE results:Three intra-familial episodes were due to O26, all of which showed the same pattern of A 008. Four

intra-familial episodes were due to O157, of which 2 showed the same pattern of K 043. In the above episodes, all PFGE pattern of the related isolates were the same. On the other hand, one intra-familial episode due to O111 showed a slightly different pattern B001 and B002 (Table 2).

Table 2 Epidemiological data for EHEC isolates from patients in 1998

Patient No.	Age (yr)	Sex ※1	Serotype	PCR VT-type	PCR RAPD-type	PFGE ※2 geno-type	Remarks
1	2	F	O157	VT 1&2	II	K 031	
2	23	F	O26	VT 1	A 1	A 007	
3	2	M	O26	VT 1	A 1	A 008	
4	1	M	O26	VT 1	A 1	A 008	
5	2	F	O26	VT 1	A 1	A 008	Related to No. 4
6	4	M	O26	VT 1	A 1	A 008	
7	2	F	O26	VT 1	A 1	A 008	Related to No. 6
8	1	M	O26	VT 1	A 1	A 008	
9	53	F	O26	VT 1	A 1	A 008	Related to No. 4, 5, 11
10	30	F	O26	VT 1	A 1	A 008	Related to No. 6, 7
11	7	F	O26	VT 1	A 1	A 008	Related to No. 4, 5, 9
12	40	M	O26	VT 1	A 1	A 008	Related to No. 8
13	6	F	O157	VT 1&2	II	K 032	
14	79	F	O157	VT 1&2	II	K 032	
15	70	F	O157	VT 2	II	K 033	
16	3	M	O157	VT 2	II j	K 034	
17	3	F	O157	VT 1	II	K 035	
18	3	M	O157	VT 2	II	K 036	
19	2	F	O157	VT 1&2	II	K 037	
20	39	M	O157	VT 2	II i	K 038	
21	1	M	O26	VT 1	A 1	A 009	
22	30	M	O157	VT 2	II	K 036	Related to No. 18
23	31	F	O157	VT 1&2	II	K 037	Related to No. 19
24	(0. 7)	M	O157	VT 1&2	II	K 037	Related to No. 19
25	27	M	O157	VT 1&2	II m	K 039	
26	27	F	O157	VT 1&2	II m	K 039	
27	20	F	O157	VT 1&2	II	K 042	
28	10	M	O157	VT 1&2	II	K 042	
29	4	M	O157	VT 1&2	II	K 042	
30	1	F	O157	VT 1&2	II	K 043	Related to No. 31
31	4	M	O157	VT 1&2	II	K 043	Related to No. 30
32	4	F	O157	VT 1&2	II	K 043	
33	4	M	O157	VT 1&2	II	K 043	Related to No. 35
34	67	F	O26	VT 1	A 1	A 006	
35	36	F	O157	VT 1&2	II	K 043	Related to No. 33
36	4	M	O157	VT 1&2	II	K 043	
37	25	F	O157	VT 1&2	II	K 044	
38	47	F	O157	VT 1&2	II	K 045	
39	2	M	O111	VT 1&2	B 1	B 001	Related to No. 40, 41
40	65	F	O111	VT 1&2	B 1	B 001	Related to No. 39
41	67	M	O111	VT 1&2	B 1	B 002	Related to No. 39
42	3	F	O157	VT 1&2	II	K 046	
43	52	M	O111	VT 1&2	B 1	B 001	
44	82	F	O157	VT 2	II	K 017	

※ 1 : M, male ; F, female.

※ 2 : K, O157 ; A, O26 ; B, O111

IV Discussion

In 1996 and 1997, the major PFGE pattern of EHEC were designated as (I a, I, I) and II a, II b²⁾; however, these patterns were not detected in 1998 in Kyoto City. As shown in Table 2, we found that PFGE subtypings were found to be

compatible in each episode of intra-familial EHEC infections. Although EHEC strains may be changing rapidly, determination of PFGE pattern is useful for the purpose of epidemiological investigation. However, there remains a problem in the PFGE analysis, because of newly emerging

types of EHEC, which makes the interpretation of pattern comparison difficult.

V References

- 1) Division of Public Health Study in Kyoto City Institute of Health and Environmental Sciences: Annual Report 63, 122-124(1997)
- 2) Division of Public Health Study in Kyoto City Institute of Health and Environmental Sciences: Annual Report 64, 114-115(1998)

VI 要旨

1996年の腸管出血性大腸菌 O157の集団感染事例から2年が経過した。

その後も毎年、全国各地で、集団、散発例の報告が見られる。京都市の腸管出血性大腸菌 O157などの感染事例は、1996年度40件、1997年度77件、1998年度44件となっており、依然、食中毒と同様に散発的発生が見られる。幸いにして、本年度は死者を出していないが、今後とも、季節を度外視した継続的な食品の衛生管理が望まれる。

今回、昨年に続き、京都市内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 (13株)、O111 (4株)、O157 (27株) の44株について、パルスフィールド・ゲル電気泳動法による遺伝子解析を行った。

1. 試験菌株：菌株は、当研究所、臨床部門、微生物部門にて分離同定された菌株 O26 (13株)、O111 (4株)、

O157 (27株) の合計44株を使用した。

2. PFGE 検査：PFGE 検査法は、前回報告したとおりである（文献1）。

制限酵素は、O157、O26、O111とも Xba I を使用した。

3. 月別発生状況：4、5、6月の発生総数2名から始まり、7月12名、8月11名の発生ピークを経て減少し、翌年2～3月は、EHECの発生は見られなかった。

4. 性別・年齢別分布：0～5歳児の感染事例は、男児13名、女児8名の合計21名、全体の47.7%の割合を占めた。

5. ペロ毒素(VT)の検出：ペロ毒素の検出は、PCR法にて VT1並びに VT2の検出を行った。PCR-RAPD 型別（国立感染研法）と PFGE 型別の総合成績は、表2に示すとおりである。環境分離株3例、食品分離株3例からの腸管出血性大腸菌の検査結果については、本稿には記載していない。

1996年の福岡県、広島県及び堺市の集団感染事例に見られた、PFGE の(1a, I, I)型は、本市においても1997年には8例見られたが、1998年度は一例も検出されなかった。

今年度は、散発事例、特に家族内感染が多く、PFGE で、典型的なパターンを示す型は少なく、新しいパターンの菌型が分類された。

今後、更に新しい型を示す菌の分離が予想され、型別には、全国的な統一された検査法の一考を要する段階となってきたように思われる。

広沢池におけるアオコの消長

環境部門

Waterbloom of Blue-green algae in the Hirosawanoike pond

Key words : アオコ waterbloom, 藍藻 blue-green algae, クロロフィル a chlorophyll-a, 窒素 nitrogen, リン phosphorus

I はじめに

広沢池は京都市の北嵯峨に位置する面積14ha, 水深1.5mの池で, 嵯峨野の景観形成上重要な池である。しかし, 鯉の養殖がおこなわれ多量の餌が投入されるため, 富栄養化が進み, 毎年のようにアオコが発生して景観を損なったり悪臭を発生して問題となっている。

当部門では, 1998年から広沢池のアオコ発生の実態を明らかにする目的で, 夏期を中心に水質測定とプランクトン相の観察をおこない, アオコ形成プランクトンの消長とその要因を検討した。

なお, 同じ嵯峨地区にあるがアオコが発生しない大沢池と, 以前に釣り堀として利用されたためにアオコが発生が続いてきた小倉池についても, 比較検討した。

II 調査方法

1. 採水間隔

広沢池については, 5月20日～7月28日は2～4週, 7月29日～8月24日は2～5日, 8月25日～10月26日は1～

2週の間隔で採水した。大沢池と小倉池の採水は全期間を通じて, 原則として2週に1回とした。

2. 採水地点・時刻

広沢池は中央部の表層水と低層水, 西岸の表層水及び東西からの2流入水を, 大沢池は西岸表層水, 小倉池は中央部表層水と1流入水を, 午後2時～3時の間に採水した。

3. 調査項目

気温及び水温, pH, 導電率, 溶存酸素濃度, COD, 総窒素及び総りん濃度, 主要プランクトン密度, クロロフィル a 濃度, 主要イオン濃度

III 調査結果と考察

1. アオコ関連プランクトンの消長と各指標項目の変動

調査を開始した5月20日の広沢池では, 各プランクトン数及びクロロフィル a 濃度は低値であるが, 池の南西隅にアオコの残留を認めた。このことは, 調査開始以前に既にアオコが発生したことを意味し, 今後の調査開始時期設定に考慮が必要なことを示唆している。

表1 3つの池の表層水の水質指標(6月～10月の間, 10回の測定値の平均)

項目 (単位)	広沢池中央	大沢池西岸	小倉池中央
pH	9.08	8.52	8.88
総窒素 (mg/l)	2.475	0.857	1.157
総りん (mg/l)	0.37	0.18	0.12
COD (mg/l)	16.0	6.5	10.5
導電率 (μ S/cm)	123.3	93.1	56.5
Cl ⁻ (mg/l)	6.44	4.31	3.43
SO ₄ ²⁻ (mg/l)	10.74	9.19	2.99
Na ⁺ (mg/l)	3.56	4.08	2.66
K ⁺ (mg/l)	2.30	0.98	0.87
Mg ²⁺ (mg/l)	1.92	2.09	1.58
Ca ²⁺ (mg/l)	9.36	9.13	3.58

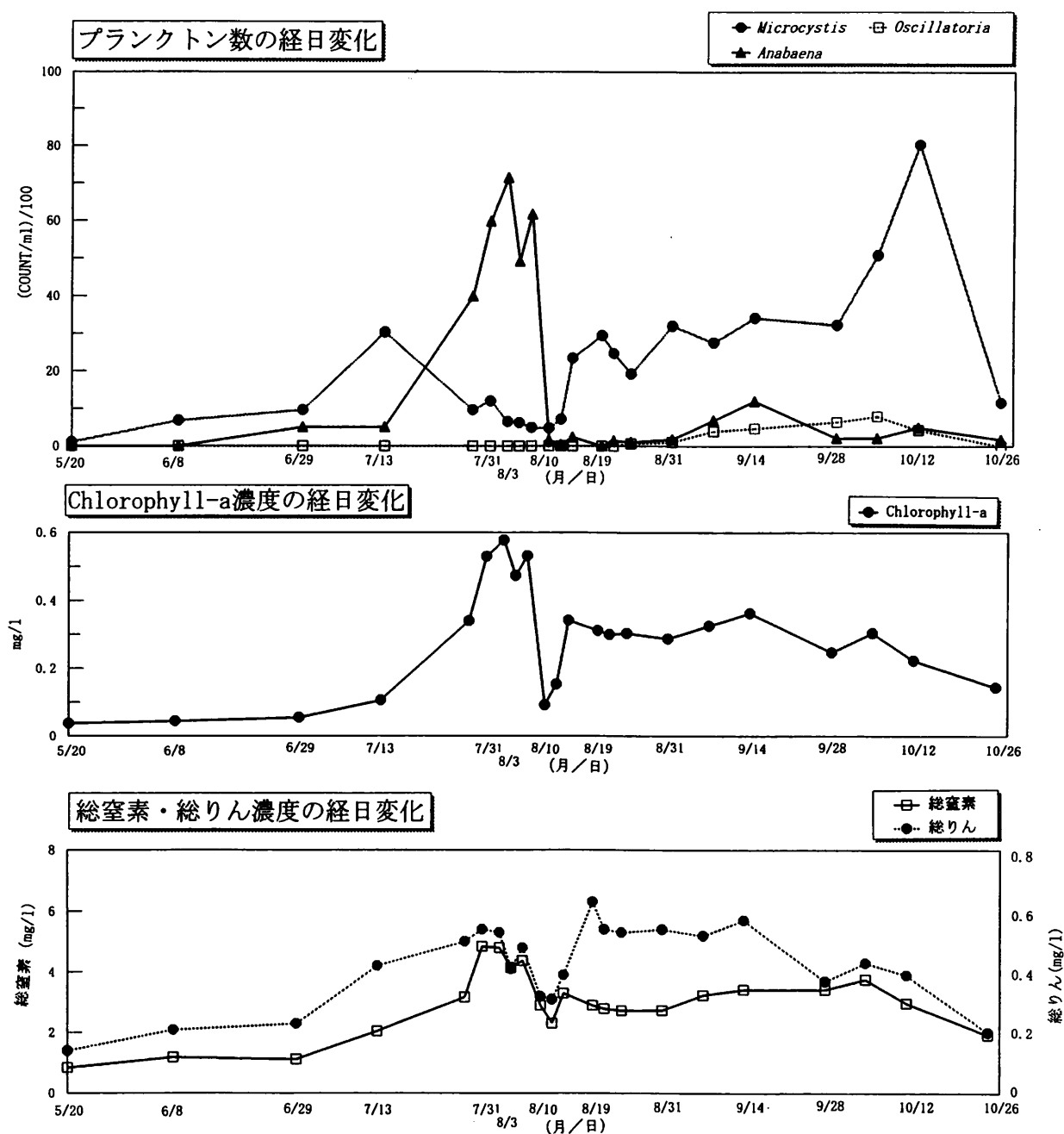


図1 広沢池表層水のアオコ関連プランクトン数、クロロフィルa、総窒素、総りん濃度の経日変化

図1に広沢池中央部表層水中の *Microcystis* 属、*Anabaena* 属及び *Oscillatoria* 属の個体数とクロロフィルa、総窒素及び総りんの濃度の経日変化を示す。6月中は緑藻と珪藻を主とするプランクトン相で推移し、7月中旬になって *Microcystis* 属が一時的に増加したが、アオコの発生は認めなかった。7月末に水温が30℃を越えると大量のアオコが発生し、*Anabaena* 属の個体数とクロロフィルa濃度が急上昇した。この状態は約10日間持続したが、8月10日には *Anabaena* 属とクロロフィルaが急減してアオコも消滅した。その後、一旦減少した *Microcystis* 属の個体数

が増加して、長期間にわたって高いレベルを維持したが、アオコの発生は少なく、9月以降の *Anabaena* 属の復活と *Oscillatoria* 属の出現に伴ってアオコも増強した。10月になると、*Microcystis* 属が急増したが、アオコの状態に顕著な変化は見られず、10月下旬の豪雨によりアオコは終息した。

以上の経過より、今回の調査期間に関しては、広沢池のアオコ発生には *Microcystis* 属よりも *Anabaena* 属と *Oscillatoria* 属の寄与が大きいと考えられる。

他方、総窒素と総りんに関しては、総窒素が7月末のアオコ発生時に急上昇しているのに対し、総りんは

Microcystis 属の復活期にも高い値を示している。しかし、今回は溶存態ではなく、プランクトンも含む非濾過の試料で測定したため、プランクトン中の窒素・リンの影響を強く受けている可能性が高く、溶存態の測定が必要と思われる。

大沢池では6～7月に珪藻類と緑藻の *Scenedesmus* 属の増加を、小倉池では8月末に広沢池とは別種の *Anabaena* 属、7月と9月に珪藻類と *Scenedesmus* 属の増加を認めたが、いずれの池においてもアオコの発生は見られなかった。

2. 池の水質比較とアオコ発生状況

アオコが発生した広沢池と発生しなかった大沢池・小倉池の表層の水質に関する項目の測定値の平均値を表1に示す。総窒素、総りん及びカリウムイオン濃度が広沢池で高く、他の2池に比して富栄養化がすすみ、アオコ発生の条件が揃っているものと思われる。

なお、各種イオン濃度の変動とアオコ関連プランクトンの消長との間には、密接な関係は見られなかった。

IV まとめ

1. 嵯峨地区にある広沢池、大沢池及び小倉池について、各種水質指標、プランクトン相の変化とアオコ発生との関連を調査した。
2. 広沢池では7月末から8月初旬に *Anabaena* 属の増殖によるアオコが大発生し、その後一時消失したが、再び持続的な発生が10月中旬まで続いた。後半のアオコ発生には、*Anabaena* 属、*Oscillatoria* 属及び *Microcystis* 属の3者が関与していると考えられる。
3. 大沢池と小倉池ではアオコの発生は見られなかった。
4. 広沢池では他の池に比して、総窒素、総りん及びカリウムイオンの濃度が高かった。

京都市衛生公害研究所年報
第 65 号

発行日	平成 11 年 9 月 1 日
編集 発行	京都市衛生公害研究所 〒604-8845 京都市中京区壬生東高田町1-2 ☎ (075) 312-4941
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。)