

第6部 報文

目 次

1. 平成12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)	--	79
2. 平成12年京都市日本脳炎流行予測調査成績	-----	(微生物)	--	90
3. 京都市と畜場に搬入されたヨーネ病牛について	-----	(病理)	--	93
4. 伝染性単核球症における Real-time PCR を使用した Epstein-Barr virus (EBV) の定量的解析	-----	(調査研究)	--	98
5. 京都市における酸性雨調査	-----	(環境)	--	103

Chapter 6 Reports

Contents

1 . Isolation of pathogenic agents in the Kyoto City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases in 2000	(Micr)	--	79
2 . Epidemiological survey of Japanese encephalitis in Kyoto City in 2000	(Micr)	--	90
3 . Johne's disease in cattles delivered to the Kyoto City Slaughter House	(Path)	--	93
4 . Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV) in infectious mononucleosis using Real-Time PCR	(Pub)	--	98
5 . Monitoring Results of Acid Rain in Kyoto City	(Envir)	--	103

平成12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

黒田晃生¹, 田中法郎¹, 福味節子¹, 宇野典子¹, 梅垣康弘¹, 平野隆¹, 唐牛良明¹

Isolation of pathogenic agents in the Kyoto City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases in 2000

Akio KURODA, Norio TANAKA, Setsuko FUKUMI, Noriko UNO,
Yasuhiro UMEGAKI, Takashi HIRANO, Yoshiaki KAROJI

Abstract : Virological and bacteriological tests were performed using various specimens from patients in the Kyoto City Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases in 2000. Of 430 patients, 179 were positive for viral and/or bacterial agents. A total of 126 strains of viruses and 71 strains of bacteria were isolated. Yearly isolation rate of the agents per patient was 41.6%. Influenza viruses were isolated from January to March, 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. Adenovirus type 2 was isolated from January to May, while adenovirus type 3 was isolated from November to December, mainly from the patients with flu-like symptom. Various types of viruses were mostly isolated in the 2 age groups of 0-4 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, アデノウイルス adenovirus

I はじめに

京都市は昭和57年度から京都市感染症発生動向調査事業を行っている。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感染症(STD)発生動向調査が加えられた。本報告では、平成12年1月から12月までに実施したインフルエンザ定点、小児科定点、基幹定点の検査定点についての検査成績を述べる。

II 材料と方法

1. 検査対象感染症

平成12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、扁桃炎、気管支炎・肺炎、異

型肺炎、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、溶血性連鎖球菌感染症、麻疹様疾患、百日せき様疾患、出血性膀胱炎、けいれん、意識障害、尿路感染症及びその他5疾病の計29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（インフルエンザ、小児科、基幹定点）の協力により採取されたもので、患者430人から糞便94検体、咽頭ぬぐい液380検体、髄液69検体、尿39検体、気管分泌液2検体、眼結膜ぬぐい液2検体、歯肉ぬぐい液2検体、水疱内容物1検体、菌株（咽頭由来）1検体の計590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395人から糞便74検体、咽頭ぬぐい液356検体、髄液15検体、尿27検体、眼結膜ぬぐい液1検体、歯肉ぬぐい液2検体、水疱内容物1検体、菌株1検体の計477検体を供した。

¹ 京都市衛生公害研究所 微生物部門

3. 検査方法

1) ウイルス検査

検査材料の前処理は、糞便についてはイーグルMEM培地5mlを加え10%乳剤とし、遠心分離後その上清をマイクロフィルターでろ過した。咽頭ぬぐい液などはイーグルMEM培地3mlを加えて遠心後ろ過した。

このようにして得られた試料を各種の培養細胞に接種して培養を行い、ウイルスによる細胞変性効果を顕微鏡下で観察した。培養細胞としてFL（ヒト羊膜由来）、RD-18S（ヒト胎児横紋筋腫由来）、Vero（アフリカミドリザル腎由来）を用いた。また、同試料を1～2日齢のddY系は乳マウスの脳内及び皮下に接種し、発症の有無を観察した。インフルエンザの分離にはMDCK細胞（イヌ腎由来）を通常用いた。

検出したウイルスの同定は中和反応、補体結合反応、赤血球凝集抑制反応及び蛍光抗体法のうち適切な方法を用いた。乳児嘔吐下痢症、感染性胃腸炎など胃腸炎症状を伴った患者の糞便については、酵素免疫法（EIA）によりロタウイルス、腸管系アデノウイルス（40/41型）の抗原検出を行った。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

糞便からの病原細菌は、検査を分離培地に直接塗抹し分離した。使用した培地は、マンニット食塩卵培地（黄色ブドウ球菌）、SS寒天培地（サルモネラ、赤痢菌）、ドリガルスキー改良培地（その他の腸内細菌）である。咽頭ぬぐい液からの病原細菌の分離は、肺炎球菌、インフルエンザ菌はチョコレート寒天培地への直接塗抹から、溶血性連鎖球菌はSEB培地で増菌後、血液寒天平板培地で、肺炎マイコプラズマの分離はPPL0二層培地を用いて行った。尿、髄液からの細菌は検体を遠心分離して得られた沈渣を血液寒天培地、チョコレート寒天培地に塗抹し分離した。

分離された菌は生化学的性状検査などにより同定後、血清学的検査、生物学的検査を行った。

また、毒素原性大腸菌、腸管出血性大腸菌の毒素遺伝子及び腸管侵入性大腸菌の病原因子遺伝子の検出はPCR法によった。

Ⅲ 成績

1. 月別病原体検出状況（病原ウイルス、病原細菌）

各月の受付患者数をみると、冬季の1月、2月、11月が40人以上で、特に、1月は52人で最多であった。4月、5月、6月、7月、8月、12月は30人以上であり、3月、9

月、10月は23～27人で、月平均受付患者数は35.8人であった。年間の被検患者430人のうち179人（41.6%）から197株の病原微生物を検出した。検出率は1月～3月が50%以上の高率であり、これに次いで6月～8月、10月、12月が40%以上、5月、9月、11月が30%台で、4月のみ20%台であった。

ウイルス検査では、被検患者429人中125人から計126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29.1%であった。ウイルス検出率をみると、1月が50%以上と年間で最も高く、これに次いで2月は40%台、3月～9月及び12月が20～30%台、10月、11月は10%台であった。

内訳はコクサッキーAが21株、コクサッキーBが3株、エコーが15株、ポリオが1株、エンテロウイルス71型が3株、ロタが1株、アデノが33株、インフルエンザA（H1N1）型（＝Aソ連型）が28株、インフルエンザA（H3N2）型（＝A香港型）が13株、単純ヘルペスが6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21株中4型が4株、5型、8型が各3株、6型が1株、9型が2株、10型が8株であった。コクサッキーBは3型を1株、5型を2株検出した。エコーは3型が5株、6型、9型が各1株、17型が3株、18型が2株、25型3株、ポリオは2型が1株、アデノは1型が6株、2型が14株、3型が9株、5型が2株、31型、40/41型が各1株検出された。インフルエンザはA（H1N1）型（＝Aソ連型）を28株、A（H3N2）型（＝A香港型）を13株検出した。単純ヘルペスは1型のみを6株検出した。

検出ウイルスの季節推移をみると、インフルエンザA（H3N2）型は1月に10株、2月に1株、3月には2株検出した。一方、A（H1N1）型は1月に13株、2月に15株検出した。ロタは5月に1株検出された。コクサッキーA 4型、9型、10型は4～9月に、5型、6型、8型は8月～12月に検出され、コクサッキーBは7月、9月に検出された。エコーは複数の型が6月～10月に検出されたが、3型は1月にも検出された。6型は1月のみの検出であった。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9月、10月を除く各月に複数の型が検出された。特に、1月～5月に2型、11月～12月に3型の検出が目立った（表1）。

病原細菌検査では、被検患者395人中64人から計71株の病原細菌を検出し、患者あたりの検出率は16.2%であった。

内訳は、主なものではA群溶血性連鎖球菌32株、G群溶血性連鎖球菌6株、黄色ブドウ球菌17株、肺炎球菌が7株

平成12年 1月～12月

表1 月別病原体検出状況（インフルエンザ定点、小児科定点、基幹定点分）

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	病原体検出比率 (%)
受付患者数	52	50	24	34	38	30	39	32	23	27	45	36	430	
検 査 料	12	7	1	6	11	8	10	6	4	5	15	9	94	590
糞便	49	49	24	29	33	26	32	27	20	26	36	29	380	
咽頭ぬぐい液	13	3	1	5	4	6	10	5	5	5	7	5	69	
髄液	3	3	1	2	7	4	2	3	2	4	3	5	39	
尿				1	1								2	
眼結膜ぬぐい液					2								2	
気管分泌液					1	1							2	
歯肉ぬぐい液													2	
水疱内容物								1					1	
菌株(咽頭由来)		1											1	
病原体検出患者数	28	25	12	10	14	12	16	13	8	12	14	15	179	41.6
患者あたりの検出率 (%)	53.8	50.0	50.0	29.4	36.8	40.0	41.0	40.6	34.8	44.4	31.1	41.7	41.6	
被検患者数	52	49	24	34	38	30	39	32	23	27	45	36	429	29.1
検出患者数	27	20	6	7	9	8	10	10	7	3	7	11	125	
患者あたりの検出率 (%)	51.9	40.8	25.0	20.6	23.7	26.7	25.6	31.3	30.4	11.1	15.6	30.6	29.1	2.5
エコー3型	1						2 i		2 L				5	
エコー6型	1												1	0.5
エコー9型									1				1	0.5
エコー17型						2		1 k					3	1.5
エコー18型							1	1					2	1.0
エコー25型								2		1			3	1.5
コクサッキーA4型							2	1	1				4	2.0
コクサッキーA5型								1				2	3	1.5
コクサッキーA6型											1		1	0.5
コクサッキーA8型									1	1	1		3	1.5
コクサッキーA9型						1		1					2	1.0
コクサッキーA10型				1		2	2	2	1				8	4.1
コクサッキーB3型									1 L				1	0.5
コクサッキーB5型							1 j		1				2	1.0
ポリオ2型				1									1	0.5
エンテロウイルス71型						2	1						3	1.5
アデノ1型			1		1	1					2	1	6	3.0
アデノ2型	1 a	3 d	2	4	4 h								14	7.1
アデノ3型								1			2	6	9	4.6
アデノ5型		1			1								2	1.0
アデノ31型												1	1	0.5
アデノ40/41型							1						1	0.5
単純ヘルペス1型			1 g	1	1					1	1	1	6	3.0
ロタ					1								1	0.5
同定困難ウイルス	1				1								2	1.0
インフルエンザA (H1N1) 型	13 c	15 e											28	14.2
インフルエンザA (H3N2) 型	10 b	1	2										13	6.6
小 計	27	20	6	7	9	8	10	10	8	3	7	11	126	64.0
被検患者数	49	50	23	29	30	28	31	30	20	27	44	34	395	16.2
検出患者数	4	7	7	3	6	4	8	4	1	9	7	4	64	
患者あたりの検出率 (%)	8.2	14.0	30.4	10.3	20.0	14.3	25.8	13.3	5.0	33.3	15.9	11.8	16.2	16.2
A群溶血性連鎖球菌	2 c	3	5	2	1	3	3	2		6 n	3 p	2	32	
B群溶血性連鎖球菌			1 e										1	0.5
C群溶血性連鎖球菌	1 b										1		2	1.0
G群溶血性連鎖球菌		1 d			2		1 j		1		1 o		6	3.0
病原性大腸菌					1	1							2	1.0
インフルエンザ菌										1 m	2 p		3	1.5
黄色ブドウ球菌		2 f	1 g	1	1 h		3 i j	2 k		3 m n	2 o	2	17	8.6
肺炎球菌	2 a b		1		1		2			1			7	3.6
プロテウス ミラリス		1 f											1	0.5
小 計	5	8	7	3	6	4	9	4	1	11	9	4	71	36.0
合 計	32	28	13	10	15	12	19	14	9	14	16	15	197	100.0

注) a～p: 同一被検者

であった。

最多検出のA群溶血性連鎖球菌は、9月を除くすべての月に検出された。黄色ブドウ球菌は1月、6月、9月を除く月に検出された(表1)。

2. 感染症別病原体検出状況(病原ウイルス, 病原細菌)

受付患者数の多かった上位3感染症はインフルエンザ様疾患の107人, 夏かぜ様疾患の65人, 次いで感染性胃腸炎の36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60%を占めた。

主な感染症別のウイルス検出率は, インフルエンザ様疾患, 扁桃炎が40%以上の高率であり, ヘルパンギーナ, 手足口病, 咽頭結膜熱, 百日せき様疾患が30%以上, そして感染性髄膜炎, 夏かぜ様疾患, 感染性胃腸炎(乳児嘔吐下痢症を含む), 急性上気道炎が20%以上でこれに次いでいた。

主な感染症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A(H1N1), アデノ, エコー, 単純ヘルペス, 同定困難ウイルスの9種49株, 夏かぜ様疾患からコクサッキーA, エコー, コクサッキーB, アデノ, インフルエンザA(H1N1)の13種18株, 感染性胃腸炎からポリオ, アデノ, ロタ, インフルエンザA(H1N1), 同定困難ウイルスの7種8株, ヘルパンギーナからコクサッキーA, 単純ヘルペスの6種13株, 感染性髄膜炎からコクサッキーA, エコー, アデノの6種7株, 扁桃炎からアデノ, コクサッキーA, インフルエンザA(H3N2), インフルエンザA(H1N1)の4種7株, 手足口病からエンテロウイルス71型, エコーの3種5株を分離した(表2)。

また, 主な感染症からの病原細菌検出状況をみると, 夏かぜ様疾患からA群溶血性連鎖球菌, 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15株, ヘルパンギーナからA群及びC群溶血性連鎖球菌, 黄色ブドウ球菌の3種10株, 溶連菌感染症からA群溶血性連鎖球菌, 黄色ブドウ球菌の2種8株, インフルエンザ様疾患からA群, B群及びG群溶血性連鎖球菌, 黄色ブドウ球菌の4種7株, 急性上気道炎からA群及びG群溶血性連鎖球菌, 黄色ブドウ球菌, 肺炎球菌の4種7株, 扁桃炎からA群及びC群溶血性連鎖球菌, 黄色ブドウ球菌, 肺炎球菌の4種6株を分離した(表2)。

3. 年齢階級別病原体検出状況(病原ウイルス, 病原細菌)

被検患者の年齢階級別分布をみると, 0～4歳が276人で最も多く, 次いで5～9歳の111人, 10～14歳は33人であり, 15歳以上は10人と少なかった。

病原体検出率を年齢階級別にみると, 0歳が32.9%, 1～4歳が45.3%, 5～9歳が44.1%, 10～14歳が39.4%, 15歳以上が10.0%であった。

ウイルス検出率は, 0歳が24.7%, 1～4歳が35.0%, 5～9歳が24.5%, 10～14歳が24.2%, 15歳以上は10.0%であった。

検出ウイルスの種類は, 0歳が10種18株, 1～4歳が19種72株, 5～9歳が14種27株と多く, 10～14歳では5種8株で, 比較的低年齢層から多様なウイルスが検出された。15歳以上は1種1株であった。

エンテロウイルス群は0歳で6種10株, 1～4歳が10種23株, 5～9歳が7種8株検出され, 検出率は0歳(13.7%), 1～4歳(11.3%), 5～9歳(7.3%), 10～14歳(6.1%)で, 0歳で最も高かった。ロタウイルスは1～4歳が1株(0.5%)のみ検出された。一方, アデノウイルス群では1～4歳, 0歳, 5～9歳の順に検出率が高い傾向にあった。インフルエンザA(H3N2)の検出率は0～4歳(4.3%), 5～9歳(0.9%)で加齢とともに下降する傾向にあった。インフルエンザA(H1N1)は0～4歳(4.3%), 5～9歳(10.9%), 10～14歳(12.1%)で加齢とともに上昇する傾向にあった。0歳, 15歳以上の検出はなかった(表3)。

また, 細菌検出率は, 0歳が12.9%, 1～4歳が13.0%, 5～9歳が24.5%, 10～14歳が21.2%, 15歳以上は0%であった。

検出病原細菌の種類は0歳が5種10株, 1～4歳が8種26株, 5～9歳が6種27株, 10～14歳が4種8株, 15歳以上での検出はなかった(表3)。

4. 主な感染症と病原体検出状況(病原ウイルス, 病原細菌)

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4週にピークを形成した後, 急速に減少し3月下旬には終息した。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, 1～3月の流行盛期にインフルエンザウイルスA(H1N1)型を28株, A(H3N2)型を13株検出した。検出ウイルスはワクチン類似株であった。両者はほぼ同時期に検出されており, 患者発生動向のピークと呼応していた。

全国的にも, 流行は第5週をピークとしたシャープな一峰性を示し, インフルエンザA(H1N1)型, A(H3N2)型が同時期に重複して検出されている。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, A(H1N1)型はそのほかに扁桃炎, 夏かぜ様疾患, 溶連菌感染症から各2株, 感染性胃腸炎から1株検出され, A(H3N2)型は扁桃炎, けいれんから各1株検出された。年末からの流行は見

平成12年 1月～12月

表2 感染症別病原体検出状況（インフルエンザ定点，小児科定点，基幹定点分）

検査材料	疾病名	病原体検出率 (%)																								計	病原体検出比率 (%)
		他	その他	尿路感染症	意識障害	けいれん	出血性膀胱炎	百日せき様疾患	麻疹様疾患	溶血性毒血症	不明熱	口内炎	脳・脊髄炎	感染性髄膜炎	発疹症	咽頭結膜熱	ヘルパンギーナ	重かぜ様疾患	手足口病	異型肺炎	気管支炎・肺炎	扁桃炎	急性咽頭炎	急性上気道炎	インフルエンザ様疾患		
検査材料	受付患者数	36	2	107	20	14	17	16	2	14	65	33	10	4	29	7	7	7	15	3	3	6	6	1	1	5	430
	黄便	30	1	5	3																						94
	咽頭ぬぐい液	7		107	19	14	17	16	1	13	65	33	10	3	25	5	5	5	14	3	3	4	4	1	1	2	380
	唾液		1	6	3																						69
	尿			2	3																						39
	咽結膜ぬぐい液																										2
	気管分泌物																										2
	膈内ぬぐい液																										2
	水疱内容物																										1
	菌株(咽頭由来)																										1
病原体検出患者数		11	1	53	8	2	10	4	0	5	31	23	5	1	10	0	1	1	8	1	1	0	1	1	0	1	179
患者あたりの検出率 (%)		30.6	50.0	49.5	40.0	14.3	58.8	25.0	0.0	35.7	47.7	69.7	50.0	25.0	34.5	0.0	14.3	14.3	53.3	33.3	33.3	0.0	16.7	100.0	100.0	0.0	41.6
ウイ	検出患者数	36	2	107	20	14	17	16	2	14	65	33	10	4	29	7	7	7	14	3	3	6	6	1	1	5	429
	患者あたりの検出率 (%)	22.2	50.0	45.8	20.0	7.1	41.2	12.5	0.0	35.7	26.2	39.4	30.0	0.0	24.1	0.0	14.3	14.3	14.3	0.0	33.3	0.0	16.7	100.0	100.0	0.0	29.1
	エコー3型																										5
	エコー6型																										1
	エコー9型																										1
	エコー17型																										3
	エコー18型																										2
	エコー25型																										3
	コクサッキーA4型																										4
	コクサッキーA5型																										3
イ	コクサッキーA6型																										1
	コクサッキーA8型																										3
	コクサッキーA9型																										2
	コクサッキーA10型																										8
	コクサッキーB3型																										1
	コクサッキーB5型																										2
	ポリオ2型																										1
	エンテロウイルス71型																										3
	アデノ1型																										6
	アデノ2型																										14
ス	アデノ3型																										9
	アデノ5型																										2
	アデノ31型																										1
	アデノ40/41型																										1
	単純ヘルペス1型																										6
	ロタ																										1
	同定困難ウイルス																										2
	インフルエンザA(H1N1)型																										28
	インフルエンザA(H3N2)型																										13
	小計	8	1	49	4	1	7	2	0	5	18	13	3	0	7	0	1	1	2	0	1	0	1	1	1	0	126
検出患者数	36	1	106	17	14	16	15	1	13	65	32	10	3	14	2	7	5	15	3	3	6	6	1	1	3	395	
患者あたりの検出率 (%)	8.3	0.0	6.6	35.3	7.1	31.3	13.3	0.0	0.0	21.5	31.3	30.0	33.3	21.4	0.0	0.0	20.0	46.7	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.2	
細菌	A群溶血性連鎖球菌																										32
	B群溶血性連鎖球菌																										1
	C群溶血性連鎖球菌																										2
	G群溶血性連鎖球菌																										6
	病原性大腸菌																										2
菌	インフルエンザ菌																										3
	黄色ブドウ球菌																										17
	肺炎球菌																										7
	プロテウス ミラリス																										1
	小計	3	0	7	7	1	6	2	0	0	15	10	4	1	4	0	0	1	8	2	0	0	0	0	0	0	71
合計	11	1	58	11	2	13	4	0	5	33	23	7	1	11	0	1	2	10	2	1	0	1	1	1	0	197	

注) a～p:同一被検者

表3 年齢階級別病原体検出状況(インフルエンザ定点, 小児科定点, 基幹定点分)

平成12年 1 月~12 月

年齢		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		73	203	111	33	10	430	
検 査 材 料	糞便	29	35	23	4	3	94	590
	咽頭ぬぐい液	66	183	95	29	7	380	
	髄液	24	25	17	2	1	69	
	尿	11	14	9	2	3	39	
	眼結膜ぬぐい液	1	1				2	
	気管分泌液		1	1			2	
	歯肉ぬぐい液		1	1			2	
	水泡内容物	1					1	
	菌株(咽頭由来)			1			1	
	病原体検出患者数	24	92	49	13	1	179	
患者あたりの検出率(%)		32.9	45.3	44.1	39.4	10.0	41.6	
ウ イ ル ス	被検患者数	73	203	110	33	10	429	2.5 0.5 0.5 1.5 1.0 1.5 2.0 1.5 0.5 1.5 1.0 4.1 0.5 1.0 0.5 1.5 3.0 7.1 4.6 1.0 0.5 0.5 3.0 0.5 1.0 14.2 6.6 64.0
	検出患者数	18	71	27	8	1	125	
	患者あたりの検出率(%)	24.7	35.0	24.5	24.2	10.0	29.1	
	エコー3型	2	3 i L				5	
	エコー6型			1			1	
	エコー9型			1			1	
	エコー17型	3 k					3	
	エコー18型	2					2	
	エコー25型	1	1	1			3	
	コクサッキーA4型		3	1			4	
	コクサッキーA5型		3				3	
	コクサッキーA6型		1				1	
	コクサッキーA8型		2	1			3	
	コクサッキーA9型			1	1		2	
	コクサッキーA10型	1	5	2			8	
	コクサッキーB3型		1 L				1	
	コクサッキーB5型		1		1 j		2	
	ポリオ2型	1					1	
	エンテロウイルス71型		3				3	
	アデノ1型	2	4				6	
	アデノ2型	4 a	8 d h	1	1		14	
	アデノ3型		7	2			9	
	アデノ5型		1	1			2	
	アデノ31型	1					1	
	アデノ40/41型		1				1	
	単純ヘルペス1型		4 g	1	1		6	
	ロタ		1				1	
	同定困難ウイルス			1		1	2	
	インフルエンザA(H1N1)型		12	12 c	4 e		28	
	インフルエンザA(H3N2)型	1	11	1 b			13	
	小 計	18	72	27	8	1	126	
細 菌	被検患者数	62	193	98	33	9	395	16.2 0.5 1.0 3.0 1.0 1.5 8.6 3.6 0.5 36.0
	検出患者数	8	25	24	7	0	64	
	患者あたりの検出率(%)	12.9	13.0	24.5	21.2	0.0	16.2	
	A群溶血性連鎖球菌	1	7	21 c n p	3		32	
	B群溶血性連鎖球菌				1 e		1	
	C群溶血性連鎖球菌		1	1 b			2	
	G群溶血性連鎖球菌	2 o	1 d	1	2 j		6	
	病原性大腸菌		2				2	
	インフルエンザ菌	1 m	1	1 p			3	
	黄色ブドウ球菌	5 k m o	9 f g h i	1 n	2 j		17	
	肺炎球菌	1 a	4	2 b			7	
	プロテウス ミラビリス		1 f				1	
	小 計	10	26	27	8	0	71	
	合 計	28	98	54	16	1	197	

注) a ~ p : 同一被検者

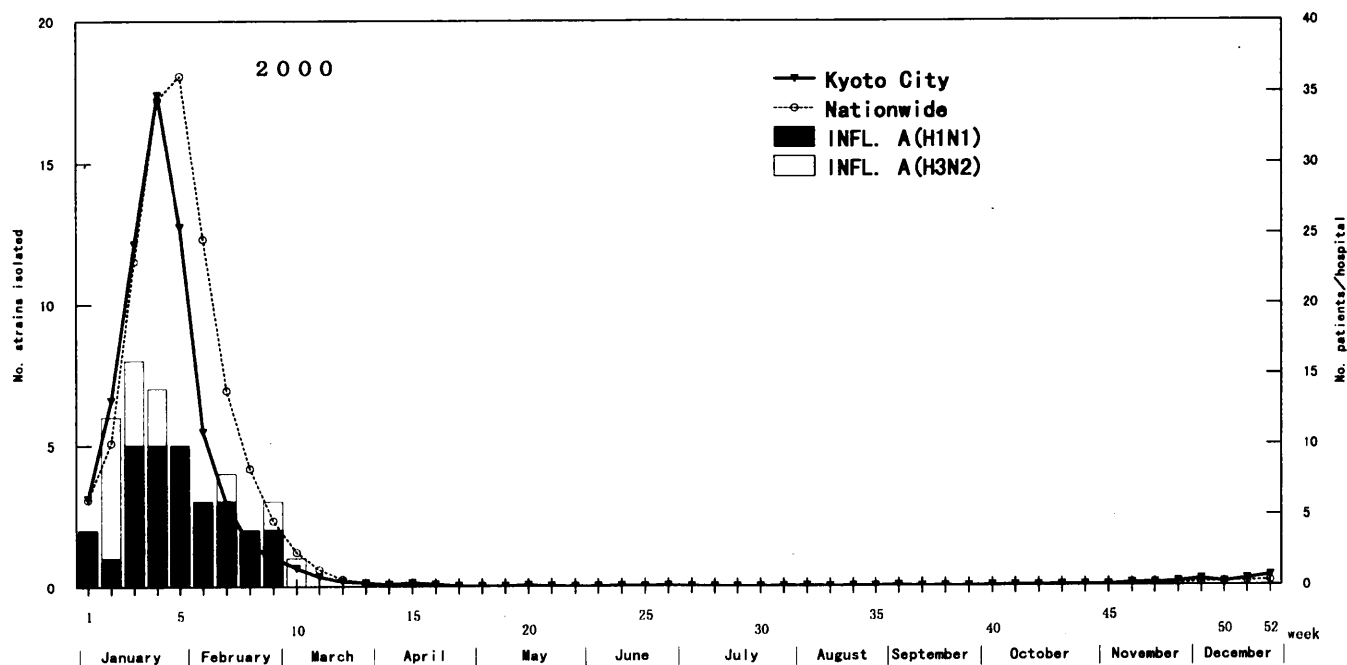


Fig.1. Seasonal prevalence of patients with influenza, and weekly isolation of influenza virus.

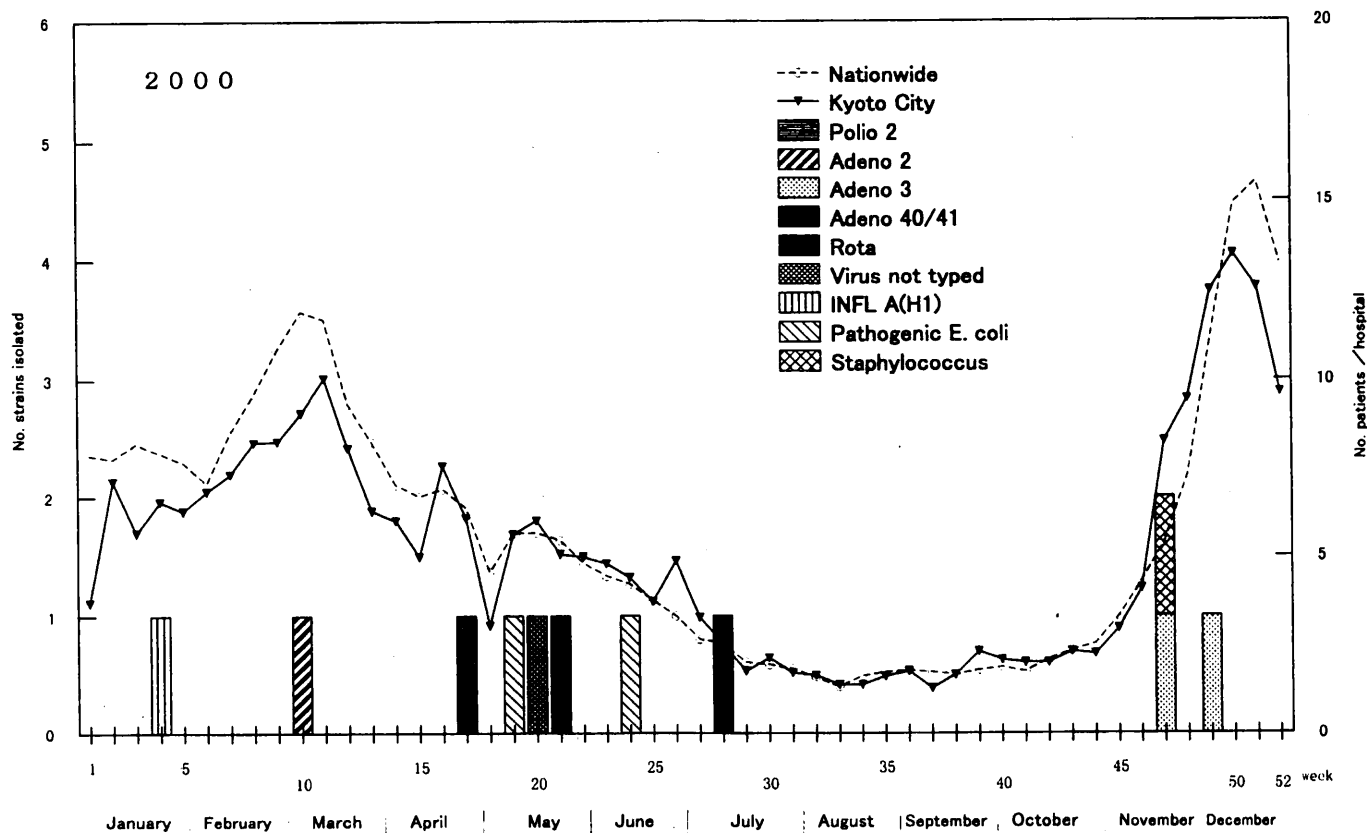


Fig.2 Seasonal prevalence of patients with infectious gastroenteritis, and weekly isolation of viruses from patients with the disease.

られなかった (Fig. 1)。

2) 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。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とはなかった。ウイルスでは春季にポリオ2型、ロタ、夏季にはアデノ40/41型、冬季にはアデノ3型を糞便より検出している。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、ペロ毒素産生株が1株検出された (Fig. 2)。

3) 本市におけるヘルパンギーナの流行は、今年は第28週 (7月) をピークとし5月から11月の長期にわたる流行がみられ、この期間にコクサッキーA4型、5型、6型、8型、10型及び単純ヘルペス1型を検出した。本年は検出数が少なく目立った傾向はみられなかったが、本疾患からの全国的な病原ウイルス検出状況をみると、コクサッキーA10型、4型、6型の報告例が上位を占めていた^{1) 2)} (Fig. 3)。

4) 本市における本年の無菌性髄膜炎患者からのウイルス検出状況をみると、エコー6型、9型、17型、25型、コクサッキーA9型及びアデノ2型が検出された。中でも、エコー6型 (1月)、9型 (9月)、17型 (6月)、コクサッキーA9型 (8月) は患者髄液からウイルスが検出され

ている (Fig. 4)。

5) 夏かぜ様疾患患者における病原体の検出は、エコー3型、18型、25型、コクサッキーA4型、5型、8型、10型、コクサッキーB3型、5型、アデノ1型、2型、5型及びインフルエンザウイルスA (H1N1) 型といった多種類のウイルスが検出され、夏かぜ様疾患の起原病原体が多様であることをうかがわせている (Fig. 5)。

5. 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群は、9型を除く全例がほ乳マウスで検出されたほか、一部は RD-18S でも検出された。9型は RD-18S で検出された。コクサッキーB群は FL の他に Vero やほ乳マウスからも一部検出された。エコーは全例が RD-18S で検出されたが、一部 Vero でも検出された。ポリオは FL, RD-18S, Vero で分離され、エンテロウイルス71型は RD-18S, Vero で分離された。アデノは40/41型を除き全例 FL で検出されたが、一部 RD-18S, Vero でも分離された。アデノ40/41型は FL で分離され、EIA により同定された。単純ヘルペスは FL, RD-18S, Vero で分離された。インフルエンザA (H1N1) 型、A (H3N2) 型は、すべて MDCK で分離された。ロタは EIA により抗原検出された (表4)。

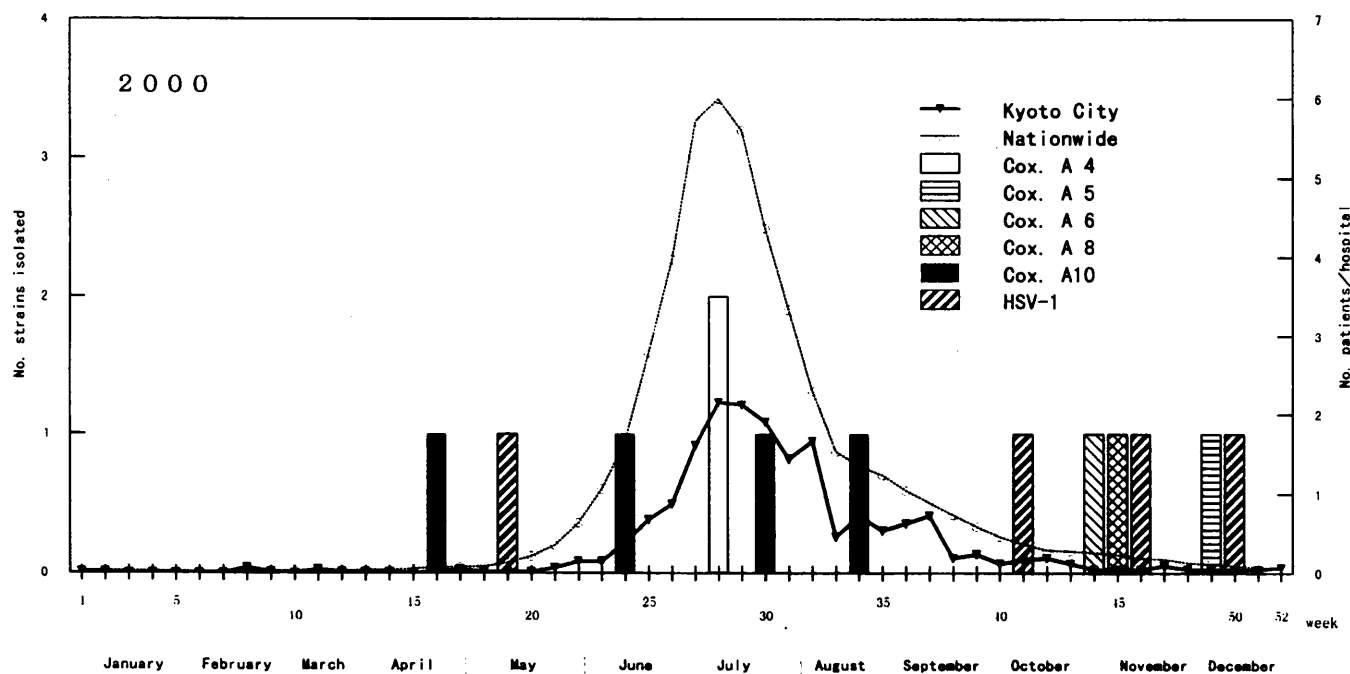


Fig.3 Seasonal prevalence of patients with herpangina, and weekly isolation of viruses from patients with the disease.

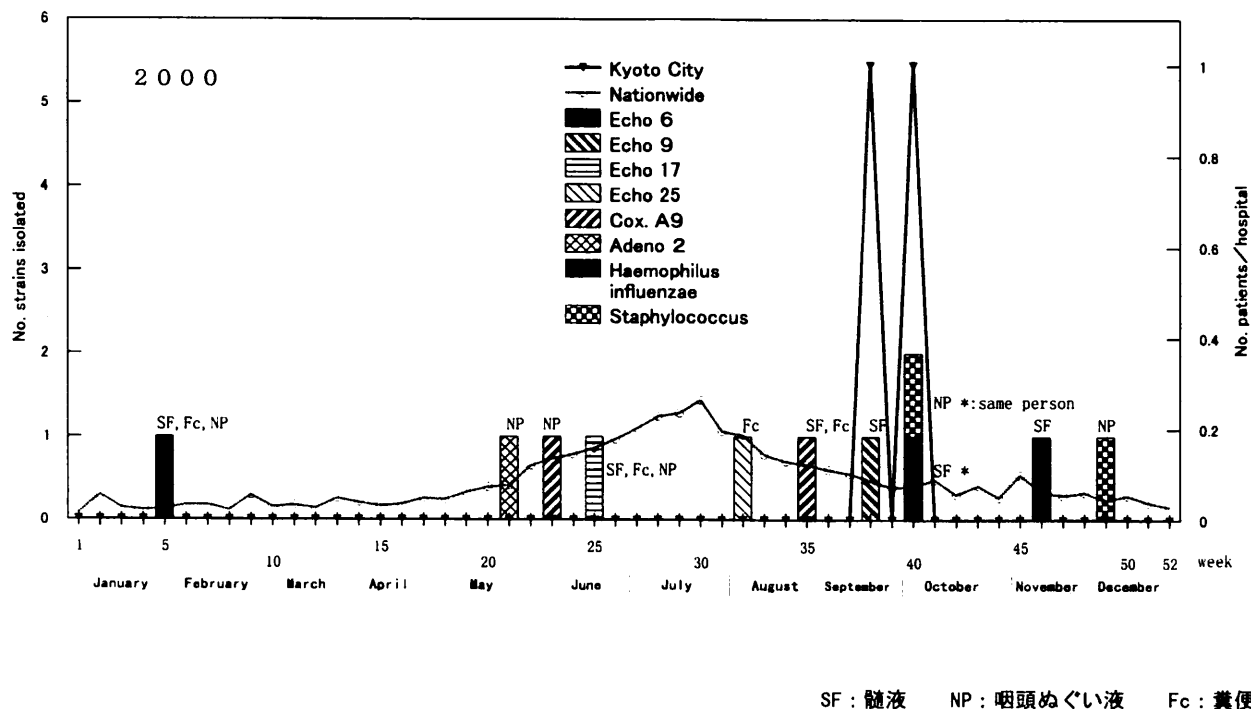


Fig.4 Seasonal prevalence of patients with aseptic meningitis, and weekly isolation of viruses from patients with the disease.

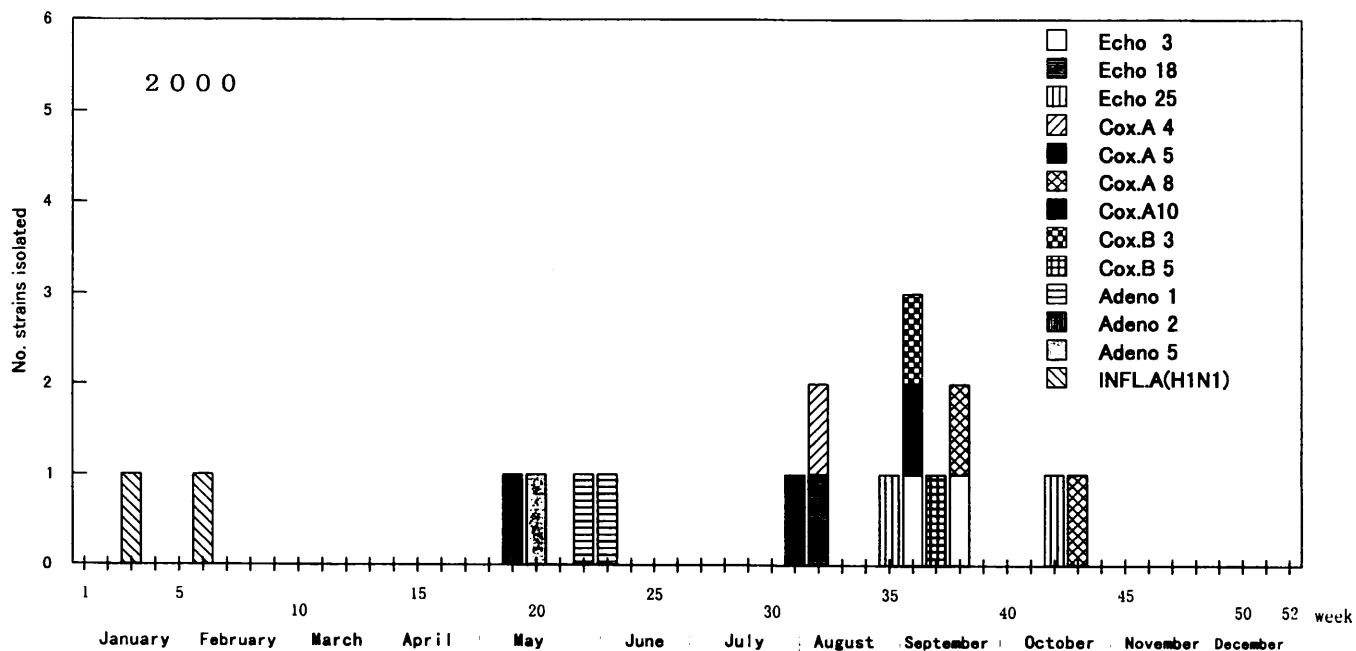


Fig.5 Seasonal prevalence of patients with summer flu, and weekly isolation of viruses from patients with the disease.

表 4 検出方法別病原ウイルス検出状況（インフルエンザ定点、小児科定点、基幹定点分）

平成12年1月～12月

検出ウイルス	検体の種類			検出 株数	培 養 細 胞				ほ乳	
	糞便	咽頭 ぬぐい液	髄液		FL	RD-18S	Vero	MDCK	マウス	EIA
エコー3型	1	5		6		6				
エコー6型	1	1	1	3		3				
エコー9型			1	1		1				
エコー17型	2	2	1	5		5				
エコー18型		2		2		2	1			
エコー25型	1	2		3		3				
コクサッキーA4型		4		4		3			4	
コクサッキーA5型		3		3					3	
コクサッキーA6型		1		1					1	
コクサッキーA8型		3		3					3	
コクサッキーA9型	1	1	1	3		3	1			
コクサッキーA10型		8		8		7			8	
コクサッキーB3型		1		1	1		1			
コクサッキーB5型		2		2	2		2		1	
ポリオ2型	1			1	1	1	1			
エンテロウイルス71型		3		3		1	3			
アデノ1型	2	5		7	7					
アデノ2型	1	13		14	14		1			
アデノ3型	2	7		9	9		4			
アデノ5型		2		2	2	1	1			
アデノ31型	1			1	1					
アデノ40/41型	1			1	1					
単純ヘルペス1型		6		6	4	4	5			
ロタ	1			1						1
同定困難ウイルス	1	1		2		1	2			
インフルエンザA(H1N1)型		28		28				28		
インフルエンザA(H3N2)型		13		13				13		
小 計	16	113	4	133	42	41	22	41	20	1

IV 考察

1. 本市感染症発生動向調査患者情報によれば、年頭のインフルエンザの流行は、第4週にピークを形成した後、急速に減少し、終息した。1～3月の流行盛期にインフルエンザウイルスA(H1N1)型、A(H3N2)型を多数検出した。全国も同様であった。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。更に、新型インフルエンザウイルスの出現に対する危惧は、香港におけるA(H5N1)型の出現とヒトへの感染（死亡例を含む）により現実となった感がある。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. 腸管出血性大腸菌O157等の流行は全国的に減少傾向にあり、感染症発生動向調査においても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。

3. 本年のヘルパンギーナ患者からはコクサッキーA4型, 5型, 6型, 8型, 10型及び単純ヘルペス1型の6種類が検出された。全国の本疾患からの病原体検出状況を見ると, コクサッキーA10型, 4型, 6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の起こったことがうかがえる。

4. 本年の本市における感染性髄膜炎患者からは合計6種のウイルスと2種の細菌が検出された。そのうち1月にエコー6型, 6月にエコー17型, 8月にコクサッキーA9型, 9月にエコー9型, 10月, 11月にインフルエンザ菌が患者髄液からも検出された。病原体検出が主に6月～11月に見られることから, 感染性髄膜炎は散発的に複数の病原体により夏季を中心に起こったと判断される。

5. 夏かぜ様疾患患者における病原体の検出は, エコー, コクサッキーA, コクサッキーB, アデノ及びインフルエンザといった多種類のウイルスが検出された。主流ウイルスは年毎に異なり, 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治療や予防に重要な情報を与える。

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42%で前年と同程度であったものの, 従来法に比べ極めて迅速性の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。したがって, 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更に推進する必要がある。

V まとめ

1. 被検患者430人中179人(41.6%)から病原体を検出した。ウイルスでは被検患者429人中125人から, エコー, コクサッキーA, コクサッキーB, ポリオ, エンテロウイルス71, アデノ, インフルエンザ, ロタ, 単純ヘルペス, 同定困難株の計126株が検出され, 検出率は29.1%であった。

細菌では被検患者395人中64人から, 病原性大腸菌, A群・B群・C群及びG群溶血性連鎖球菌, 黄色ブドウ球菌, インフルエンザ菌, 肺炎球菌等9種71株が検出され, 検出率は16.2%であった。

2. 感染症別病原体検出率は, 感染症の種類により違いがみられた。溶連菌感染症, ヘルパンギーナ, 扁桃炎, 咽頭結膜熱などで50%以上と高く, インフルエンザ様疾患, 感染性髄膜炎, 急性上気道炎, 感染性胃腸炎(乳児嘔吐下痢症を含む), 夏かぜ様疾患などがこれらに次いで高かった。

3. ウイルスでは, 1月～3月の流行期にインフルエンザ様疾患等からインフルエンザウイルスA(H1N1)型及びA(H3N2)型を検出した。また, 夏季～秋季にコクサッキー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～秋季のコクサッキーA10型の流行が目立った。アデノは, ほぼ年間を通じて検出されたが, 1月～5月に2型, 11月～12月に3型の検出が目立った。

4. 年齢階級別のウイルス検出率は1～4歳が30%台, 0歳, 5～9歳, 10～14歳の年齢区分で20%台で, 15歳以上は10%程度であった。検出ウイルスの種類は1～4歳が19種72株, 5～9歳が14種27株, 0歳が10種18株と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) 木村三生夫: 臨床とウイルス 29(1), 31-47 (2001)
- 2) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, 22(1):19 (2001)

平成12年京都市日本脳炎流行予測調査成績

田中法郎¹, 大西修¹, 西村洋二¹, 宇野典子¹, 梅垣康弘¹, 唐牛良明¹

Epidemiological survey of Japanese encephalitis in Kyoto City in 2000

Norio TANAKA, Osamu ONISHI, Yoji NISHIMURA,
Noriko UNO, Yasuhiro UMEGAKI, Yoshiaki KAROJI

Abstract : Epidemiological studies on Japanese encephalitis virus in Kyoto City were carried out in 2000. Number of *Culex tritaeniorhynchus*, a vector mosquito of JE virus, captured with light traps in a pig shed was 104 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 328 adult inhabitants and 109 children were 62.8% and 34.9% respectively, showed that the level of the positive rate of HI antibody remains low in recent years especially in children.

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

全国の日本脳炎に関する調査成績を見ると、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囲の地域で認められるようになってきている。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。

本市における取組としては、昭和40年代から日本脳炎予防対策の一環として、市内全豚に対する日本脳炎ワクチン接種事業を行ってきたが、これについては、夏季のウイルス増幅抑制に貢献してきたことが認められている。しかしながら、近年、市域における飼育豚数が減少し、また、夏季の日本脳炎ウイルス汚染がきわめて小さくなったことや、水田の減少などの背景もあり、この事業を平成9年度で終了した。これに伴い、平成10年度以降飼育豚の抗体調査も取り止めている。以上のような状況ではあるが、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を予防する必要があるため、今年度も媒介蚊とウイルスの動向を把握する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

II 調査方法

1. 野外調査

1) 調査地

昭和40年以来、京都市南部の鴨川流域にある養豚場で各種野外調査を実施してきたが、当該養豚場が区画整理事業に伴い廃業となったため、平成12年度については、調査地を京都市伏見区竹田中川原町〇養豚場に変更した。同養豚場は、概ね南側を名神高速道路、西側は国道24号線、北側は竹田出橋通などの主要幹線道路に囲まれている。

また、付近の北西部に畑地が点在するものの水田は少ない。

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12日から9月12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12日から9月12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

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235名、高

¹ 京都市衛生公害研究所 微生物部門

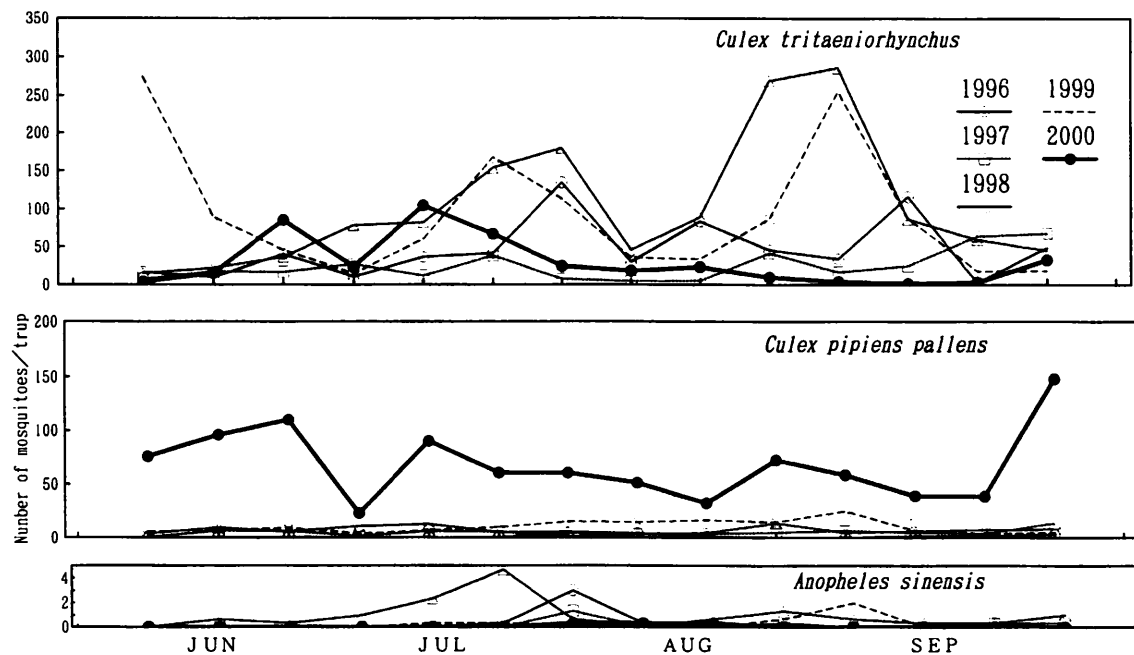


Fig.1 Number of mosquitoes collected with light traps in a pig shed situated in the suburbs of Kyoto City in 2000

齢者は老人施設の入所者93名、小児は病院外来患者109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月中旬までの各種の季節消長は次のようである。

コガタアカイエカ(*Culex tritaeniorhynchus*)は6月下旬と7月中旬に低いピークが見られるものの、トラップ当り採集数は、最高で7月中旬の104個体であり、シーズンを通して低密度のまま推移した。

アカイエカ(*Culex pipiens pallens*)は、例年に比較して多数採集された。

シナハマダラカ(*Anopheles sinensis*)は、調査期間を通して極めて採集数が少なく、目立ったピークを形成しないまま終息した(Fig. 1)。

2. 豚舎内採集吸血蚊のウイルス感染率

6月12日から9月12日までの毎週1回、計14回採集した吸血蚊472個体、54プールについてウイルス分離を試みたが、全期間を通じて日本脳炎ウイルスを検出できなかった(表1)。

豚舎内採集蚊から日本脳炎ウイルスを全く検出しなくなった年は、平成5年以降8年間連続となった。

これは、調査期間を通じて蚊の密度が低かったことのほ

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12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12日	4	4	1	0	0.0
6月19日	33	5	6	0	0.0
6月26日	123	10	11	0	0.0
7月3日	27	5	4	0	0.0
7月10日	56	10	5	0	0.0
7月17日	30	10	3	0	0.0
7月24日	41	20	1	0	0.0
7月31日	12	6	2	0	0.0
8月7日	60	10	6	0	0.0
8月14日	4	4	1	0	0.0
8月21日	21	10	1	0	0.0
8月28日	4	4	1	0	0.0
9月4日	2	2	1	0	0.0
9月11日	55	11	5	0	0.0
計	472	-	54	0	0.0

表2 成人、高齢者、小児の日本脳炎HI抗体価分布

平成12年度

対 象	施設名	計	<10	10	抗 体 価 20 40	80	160	320	640≤
成 人		235 100.0	86 36.6	80 34.0	34 14.5	29 12.3	6 2.6	0 0.0	0 0.0
高 齢 者	K	45 100.0	17 37.8	10 22.2	8 17.8	9 20.0	1 2.2	0 0.0	0 0.0
	A	48 100.0	19 39.6	6 12.5	15 31.3	6 12.5	1 2.1	0 0.0	0 0.0
	計	93 100.0	36 38.7	16 17.2	23 24.7	15 16.1	2 2.2	0 0.0	0 0.0
小 児	計	109 100.0	71 65.1	15 13.8	13 11.9	7 6.4	2 1.8	1 0.9	0 0.0

注) 上段は人数を、下段は割合(%)を示す

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

各年齢層の抗体価分布状況を表2に示した。

成人の10倍以上の抗体保有者は149名(63.4%)で、10倍をモードに10倍～80倍まで分布していた。抗体価10倍未満の抗体非保有者は86名(36.6%)であった。

高齢者の10倍以上抗体保有者は57名(61.3%)で、20倍をモードに10倍～320倍に分布していた。抗体非保有者は36名(38.7%)であった。

成人、高齢者ともに抗体保有率は60%以上であり、良好と言える。

これに対し、小児の10倍以上抗体保有者は10倍をモードに10倍～160倍に分布するものの、抗体保有率は34.9%で、成人及び高齢者に比べ低かった。

過去には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²⁾、平成7年以降、両者間の抗体保有率に差はなくなっている。今回も同様な結果が得られた。これは近年、高齢者がほとんどワクチンを接種せず抗体保有率が低下する傾向にあるのに対し、成人は小児期にワクチンを接種している場合が多いため抗体保有率が一定の水準を保つ傾向にあり、その結果、両者の保有率が同程度になっているものと思われる。

一方、日本脳炎ワクチン接種が義務接種から勧奨接種に改正されて以来、小児のワクチン接種率が低下し、その結果、小児の抗体保有率は低下していると思われる。

なお、高齢者の施設別の抗体保有率には有意差が見られなかった。

日本脳炎は日本では近年低流行が続いているが、依然として東南アジア諸国では時々大きな流行が報告されている。

交通機関の発達による国際交流の迅速化、頻繁化に伴い、輸入感染症として日本脳炎が国内に侵入し、流行する可能性もある。さらに、地球温暖化による日本脳炎の国内再流行すら危惧されている。したがって、今後とも日本脳炎に対し監視を続けていく必要があると思われる。

IV まとめ

京都市における平成12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. O豚舎内において、ライト・トラップにより採集調査したコガタアカイエカの季節消長は、全般に低いレベルで推移した。
2. O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. 以上の調査の結果、平成12年度は本市において日本脳炎ウイルスを検出しなかった。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、夏季に野外のコガタアカイエカの密度が増加せず、その結果、ウイルス保有蚊も極めて少なかったためと思われる。
4. 市民の日本脳炎ウイルスHI抗体保有率をみると、成人、高齢者の抗体保有率は60%台と良好であったが、これに比べ小児の抗体保有率は34.9%とやや低い成績が得られた。

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) 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)

京都市と畜場に搬入されたヨーネ病牛について

池 隆雄¹, 力身 寛¹, 野波正浩¹, 藤井三郎¹

Johne's disease in cattles delivered to the Kyoto City Slaughter House

Takao IKE, Satoru RIKIMI, Masahiro NONAMI, Saburo FUJII

Abstract : Johne's disease is infectious among domestic animals, and that develops chronic diarrhea and emaciation, which is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In the Kyoto City Slaughter House, 9 cattles were diagnosed as Johne's disease when delivered. We found hypertrophy of ileum mucosa, edema of serous membrane and tumefaction of mesenteric lymph nodes in these cattles. We also found granulomatous inflammation in ileal mucous epithelium, lamina propria mucosae and lymph nodes in HE staining and acid-fast bacterium in the epithelioid cells and giant cells in Ziehl-Neelsen staining by microscopic examinations.

Key words : ヨーネ病 Johne's disease, 肉芽腫性炎 granulomatous inflammation, 類上皮細胞 epithelioid cell, 巨細胞 giant cell, 抗酸菌 acid-fast bacterium, 慢性下痢 chronic diarrhea

I はじめに

ヨーネ病は *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* の腸管感染により、慢性の下痢と消瘦をきたす家畜法定伝染病の一つである。

近年、北海道を中心として全国的に発生が拡大し問題となっている¹⁾。と畜場においてもヨーネ病と診断された牛が搬入されたり、と畜検査の時点でヨーネ病の疑える事例が報告されている。

京都市と畜場においても平成11年7月から平成12年12月にかけて京都府家畜保健衛生所でヨーネ病と診断された牛が9頭搬入された。今回、これら9頭を解体し若干の知見を得たのでその概要について報告する。

II 材料及び方法

1. 症例

京都府家畜保健衛生所でヨーネ病と診断され、搬入された牛9頭。概要は表1のとおりである。

2. 病理学的検査

剖検後、異常の認められた腸及び腸間膜リンパ節を10%ホルマリン液で固定しパラフィン包埋後、薄切しHE染色及びZiehl-Neelsenの抗酸菌染色を施し²⁾鏡検した。

3. 細菌学的検査

平成12年4月28日と平成12年6月9日に搬入された6頭について、0.6%ヘキサデシルピリジニウムクロライド液で処理した牛の腸内容物をマイコバクチン添加ハロルド培地を用いて37℃で培養した。

III 結果

1. 病理学的検査結果

1) 肉眼検査結果

内臓及び枝肉の肉眼検査結果は表2のとおりである。

2) 組織検査結果

組織検査結果は表3のとおりである。

2. 細菌学的検査結果

症例3, 4の2頭においてヨーネ菌のコロニーの形成が認められた(図6)。

IV 考察

今回、ヨーネ病と診断され搬入された9頭について病理学的検査を実施した。その結果、回腸粘膜の皺壁状(わらじ状)の肥厚(図1)や漿膜面の水腫、腸間膜リンパ節の腫脹などヨーネ病特有の所見が認められた。また、組織所見でも回腸の粘膜上皮及び固有層やリンパ節内に類上皮細胞や巨細胞の集簇による肉芽腫様病変(図2, 4)、小腸

¹ 京都市衛生公害研究所 病理部門

表1 搬入時における状況

搬入年月日	症例	品種	性別	年齢	臨床所見	家畜保健衛生所における検査結果	
						ELISA法	菌分離（糞便）
H. 11. 7. 23	1	ホルスタイン	牝	4才	消瘦（-）下痢便	陽性	-
H. 11. 7. 23	2	ホルスタイン	牝	4才	消瘦（-）下痢便	陽性	-
H. 12. 4. 28	3	ホルスタイン	牝	3才	消瘦（-）下痢便	-	（+）
H. 12. 4. 28	4	ホルスタイン	牝	4才	消瘦（+）下痢便	-	（+）
H. 12. 6. 9	5	ホルスタイン	牝	4才	消瘦（-）下痢便	-	（+）
H. 12. 6. 9	6	ホルスタイン	牝	3才	消瘦（-）下痢便	陽性	（-）
H. 12. 6. 9	7	ホルスタイン	牝	7才	消瘦（-）下痢便	陽性	（-）
H. 12. 6. 9	8	ホルスタイン	牝	9ヶ月齢	消瘦（-）下痢便	-	（+）
H. 12. 12. 22	9	ホルスタイン	牝	7才	消瘦（-）下痢便	-	（+）

表2 肉眼所見

症例	内臓の肉眼所見			枝肉の肉眼所見	行政措置
	腸	腸間膜リンパ節	その他		
1	小腸，空回腸は弛緩し漿膜面に水腫を認める。空回腸の粘膜は肥厚し皺壁が顕著となりわらじ状を呈している。	腫脹を認める	特に異常を認めない	異常を認めない	内臓を全部廃棄 枝肉は合格
2	小腸，空回腸は弛緩し漿膜面に水腫を認める。空回腸の粘膜は肥厚し皺壁が顕著となりわらじ状を呈している。	腫脹を認める	特に異常を認めない	異常を認めない	内臓を全部廃棄 枝肉は合格
3	小腸，空回腸は弛緩し太くなっている。粘膜は肥厚し皺壁が顕著となりわらじ状を呈している。一部に出血を認める。	腫脹を認める	特に異常を認めない	異常を認めない	内臓を全部廃棄 枝肉は合格
4	小腸，空回腸は弛緩し漿膜面に水腫を認める。空回腸の粘膜は肥厚し皺壁が顕著となりわらじ状を呈している。	腫脹を認める	第四胃粘膜面に水腫，下顎部に浮腫を認める	異常を認めない	内臓及び 枝肉の全部を廃棄
5	小腸，空回腸は弛緩し粘膜面はやや肥厚し皺壁が認められ，わらじ状の様相を呈している。	著変を認めない	特に異常を認めない	異常を認めない	内臓を全部廃棄 枝肉は合格
6	小腸，空回腸は弛緩し粘膜面はやや肥厚し皺壁が認められ，わらじ状の様相を呈している。	著変を認めない	特に異常を認めない	異常を認めない	内臓を全部廃棄 枝肉は合格
7	小腸，空回腸は弛緩し粘膜面はやや肥厚発赤し皺壁が認められ，わらじ状の様相を呈している。	著変を認めない	肝腫瘍を認める 妊娠している	異常を認めない	内臓を全部廃棄 枝肉は合格
8	小腸，空回腸は弛緩し一部に水腫を認める。粘膜面はやや肥厚し皺壁が認められ，わらじ状の様相を呈している。	腫脹を認める	特に異常を認めない	異常を認めない	内臓を全部廃棄 枝肉は合格
9	小腸，空回腸は弛緩し粘膜面はやや肥厚し皺壁が認められ，わらじ状を呈している。一部に出血を認める。	腫脹を認める	特に異常を認めない	異常を認めない	内臓を全部廃棄 枝肉は合格

表 3 腸及び腸間膜リンパ節の病理組織所見

症例	腸の病理組織所見	腸間膜リンパ節の病理組織所見	Ziehl-Neelsen染色
1	粘膜固有層及び粘膜下織において類上皮細胞や多核巨細胞の集積による肉芽腫性炎が認められる。	辺縁洞からリンパ節皮質に多核巨細胞と類上皮細胞からなる肉芽腫性炎が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している多核巨細胞や類上皮細胞の細胞質内に菌塊を認める。
2	粘膜固有層に類上皮細胞の集積による肉芽腫性炎が認められる。巨細胞の浸潤は認められない。	辺縁洞からリンパ節皮質に類上皮細胞の浸潤が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している類上皮細胞内に菌塊は認められない。
3	粘膜は著しく肥厚し固有層及び粘膜下織に類上皮細胞や多核巨細胞の集積による肉芽腫性炎が認められる。	辺縁洞からリンパ節皮質に多核巨細胞と類上皮細胞からなる肉芽腫性炎が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している多核巨細胞や類上皮細胞の細胞質内に多数の菌塊を認める。
4	粘膜は著しく肥厚し粘膜下織には水腫が認められる。固有層には類上皮細胞の集積が著しく多核巨細胞も少ないが認められる。	辺縁洞からリンパ節皮質に多核巨細胞と類上皮細胞からなる肉芽腫性炎が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している多核巨細胞や類上皮細胞の細胞質内に多数の菌塊を認める。
5	粘膜固有層に類上皮細胞の集積による肉芽腫性炎が認められる。巨細胞の浸潤は認められない。	辺縁洞からリンパ節皮質に類上皮細胞の浸潤が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している類上皮細胞の一部に菌塊が認められる。
6	粘膜固有層に類上皮細胞の集積による肉芽腫性炎が認められる。巨細胞の浸潤は認められない。	辺縁洞からリンパ節皮質に類上皮細胞の浸潤が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している類上皮細胞の一部に菌塊が認められる。
7	粘膜固有層に類上皮細胞の集積による肉芽腫性炎が認められる。巨細胞の浸潤は認められない。	辺縁洞からリンパ節皮質に類上皮細胞の浸潤が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している類上皮細胞の一部に菌塊が認められる。
8	粘膜固有層に類上皮細胞の集積による肉芽腫性炎が認められる。巨細胞の浸潤は認められない。	辺縁洞からリンパ節皮質に類上皮細胞の浸潤が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している類上皮細胞の一部に菌塊が認められる。
9	粘膜固有層に類上皮細胞の集積による肉芽腫性炎が認められる。巨細胞の浸潤も認められる。	辺縁洞からリンパ節皮質に多核巨細胞と類上皮細胞からなる肉芽腫性炎が認められる。	腸及びリンパ節に浸潤している類上皮細胞内に菌塊は認められない。

の水腫（図3）が認められ、Ziehl-Neelsen 染色により類上皮細胞や巨細胞の細胞質内に抗酸菌が認められた（図5）。

ヨーネ病と診断された際は、生体検査時に全身症状を呈しているものはと殺禁止、解体前の検査時で全身に所見の見られるものは解体禁止、解体時及び解体後の検査時で全身に所見の見られるものは全部廃棄、病変が腸の一部に限局されているものは腸及び腸間膜の廃棄の処置を講ずればよいと畜場法に規定されている。したがって、搬入された9頭の内、下顎部及び第四胃に浮腫の認められた症例4については全身症状を呈しているものとして全部廃棄とし、残りの8頭については病変が腸に限局されていたので内臓全部を廃棄し、枝肉は合格するという行政処置を行なった。しかし、家畜伝染病予防法により法令殺処分となる病畜をと畜場に搬入し解体することについては「疾病の排除」というと畜場法的主旨及び安全な食肉の提供を目的とする食品衛生法に反すると思われる。

ヨーネ病はワクチンによる感染予防や抗生物質による治療が困難で、病牛の摘発と淘汰が唯一の防疫方法である。また全国的サーベイランス対象疾病とされ、近年摘発数が増加している^{3), 4)}。よって今後もヨーネ病と診断された牛が搬入されたり、と畜検査の途中にヨーネ病を疑える事例に遭遇する可能性がある。また、ヨーネ菌は可視コロニー形成に相当時間がかかり（2～4ヵ月）、細菌学的検査により行政処置を行なうことは不可能なので病理学的診断はヨーネ病の場合特に有効であると思われる。今回の検査結果を今後のヨーネ病の診断に役立てていきたい。

V まとめ

今回、ヨーネ病と診断されて京都市と畜場に搬入された牛9頭を解体した。その結果、肉眼検査では回腸粘膜の皺壁状（わらじ状）の肥厚や漿膜面の水腫、腸間膜リンパ節の腫脹などヨーネ病特有の所見が認められた。また、組織検査でも回腸の粘膜上皮及び固有層やリンパ節内に

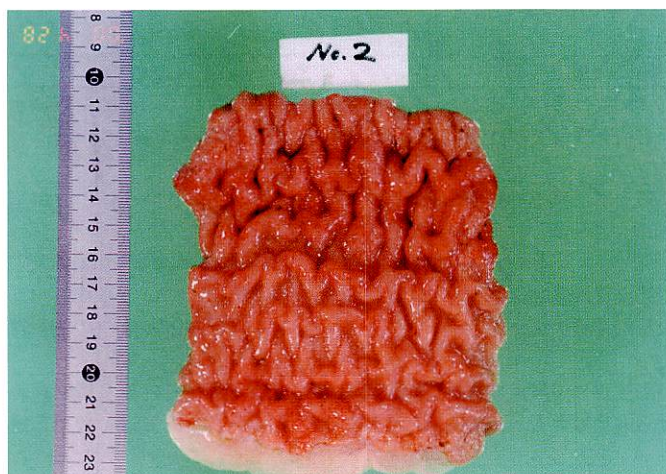


図1 小腸粘膜面，ワラジ状に肥厚し点状出血も認められる

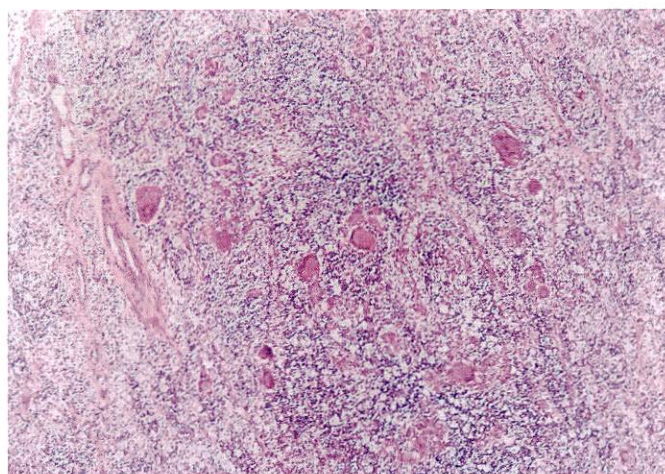


図4 腸間膜リンパ節，類上皮細胞や巨細胞の集簇による肉芽腫性炎が認められる

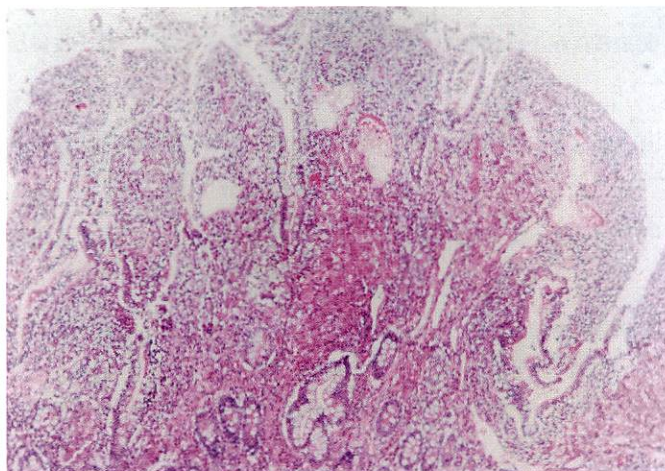


図2 小腸粘膜固有層に類上皮細胞や多核巨細胞の集簇による肉芽腫性炎が認められる

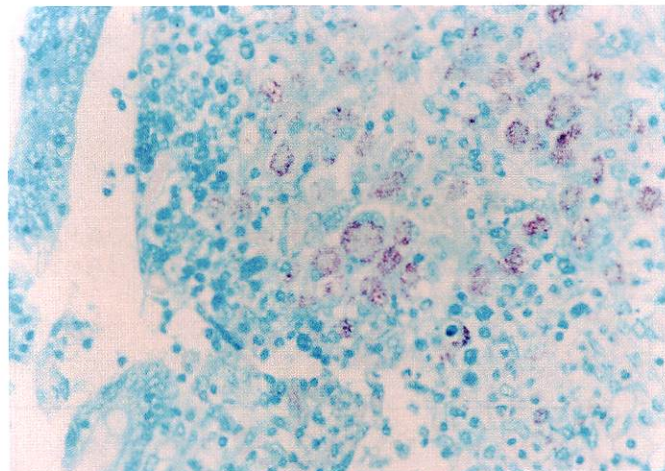


図5 小腸粘膜固有層に増殖した類上皮細胞内の多数のヨ－ネ菌が認められる (Ziehl-Neelsen染色)

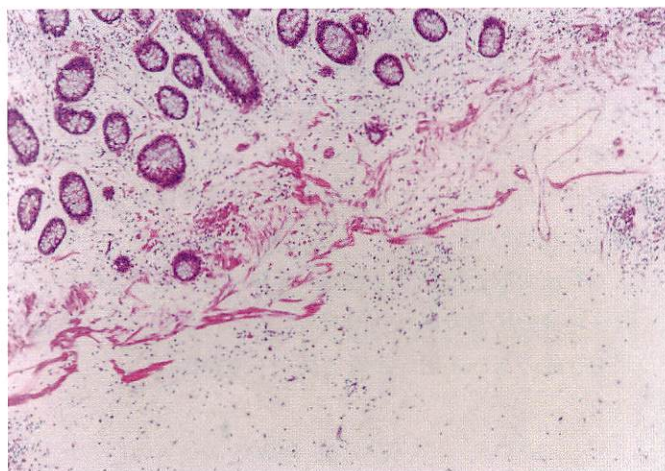


図3 小腸に水腫が認められる



図6 ハロルド斜面培地上にヨ－ネ菌のコロニーが認められる

類上皮細胞や巨細胞の集積による肉芽腫様病変、Ziehl-Neelsen 染色により類上皮細胞や巨細胞の細胞質内に抗酸菌が認められた。これらを踏まえ、と畜場法に基づいて1頭を全部廃棄、8頭の内臓全部を廃棄し枝肉については合格するという行政処置を行なった。

VI 文献

- 1) 下川裕美子, 他: 臨床獣医, 17 (2), 46-49 (1999)
- 2) 月刊 MEDICAL TECHNOLOGY 別冊: 染色法のすべて (第1版), 81-84, 医歯薬出版, 東京 (1993)
- 3) 農林弘済会: 家畜衛生週報, 2555, 169-170 (1999)
- 4) 農林弘済会: 家畜衛生週報, 2609, 203 (2000)

伝染性単核球症における Real-time PCR を使用した Epstein-Barr virus(EBV)の定量的解析

寺村知子¹, 藪内秀雄²

Quantitative analysis of Epstein-Barr virus(EBV) in infectious mononucleosis using Real-Time PCR

Tomoko TERAMURA, Hideo YABUUCHI

Abstract : We investigated EBV genome copy number in plasma or serum (cell-free) or mononuclear cell (MNC) in 25 patients with infectious mononucleosis (IM) and in 10 cord blood, in 10 healthy carriers for control. EBV genome was detectable in 12 of 21 samples derived from cell-free DNA and in 6 of 7 samples derived from MNC DNA. The median EBV genome copy number in patients with IM was 66(range:n.d.~2,200)copies/ml in cell-free DNA and 420(range:n.d.~2,845)copies/ μ g DNA in MNC DNA. On the other hand, no EBV genome was detected in controls. We followed the changes of EBV genome in 3 IM patients until convalescent phase. EBV genome became undetectable at convalescent phase in all of cell-free DNA and 2 of 3 MNC DNA. These results suggest that quantitative PCR is useful to diagnose EBV associated IM and to evaluate disease activity.

Key words : Epstein-Barr virus (EBV), 定量 PCR real-time PCR

I はじめに

EBV は1964年に Epstein と Barr らがバーキットリンパ腫の材料から発見したウイルスでヘルペス属に属し, 172 kb の直鎖状二本鎖 DNA のウイルスゲノムを持つ。EBV 感染は唾液を介して起こり, 口腔内の上皮細胞でウイルスが増殖した後, 末梢血 B リンパ球に感染するものと考えられている。感染した B リンパ球は, CD 8 陽性 T リンパ球によって一部排除されるが, ごく少数のウイルスはこの免疫機構をすり抜け, B リンパ球中に潜伏持続感染している。EBV 感染の診断には, 従来からウイルス抗体価を使用しているが, 迅速性を考慮して近年では PCR 法も使用されつつある。PCR 法は非常に感度が高いため EBV のように潜伏持続感染するウイルスを標的とした場合, その結果の解釈は難しく, 臨床経過をモニターするという意味では問題があった。しかし, 近年定量 PCR が改良され, 迅速, 簡単, 再現性のある Real-Time PCR が開発された。

そこで, 定量 PCR (Real-Time PCR) を使用して, 伝染性単核球症 (Infectious mononucleosis : IM) 患者の血清また

は血漿及び血球中の EBV ゲノムコピー数を定量したのでその結果を報告する。

II 材料および方法

1. sample

1997年4月から2001年3月までに京都市で血清学的及び臨床的に¹⁾伝染性単核球症(IM)と診断された患者25名を対象とした。患者は0歳から15歳の小児で, 男児14名, 女児11名であった。sample は発症時の血清または血漿を使用した。対象患者のうち7名の単核球も定量解析に使用した。

対象患者のうち6名については, 3名が血清および血漿で, 残りの3名が末梢血単核球での経過観察が可能であった。

コントロールとして, 血清学的に EBV 既感染である成人血漿10検体と単核球6検体および新生児臍帯血血漿10検体を使用した。

2. 血清および単核球分離

全血を3,000rpm, 10分遠心分離し, 血清を得た。

単核球および血漿は, 全血を buffy coat に重層し, 1,500rpm, 30分遠心後, 上層を血漿, 中間層を単核球と

¹ 京都市衛生公害研究所 調査研究部門

² 京都市衛生公害研究所 次長事務取扱

Table 1 Sequence of Primer and Probe

Primer

upstream:5'-CGGAAGCCCTCTGGACTTC-3'

downstream:5'-CCCTGTTTATCCGATGGAATG-3'

Probe

5'-TGTACACGCACGAGAAATGCGCC-3'

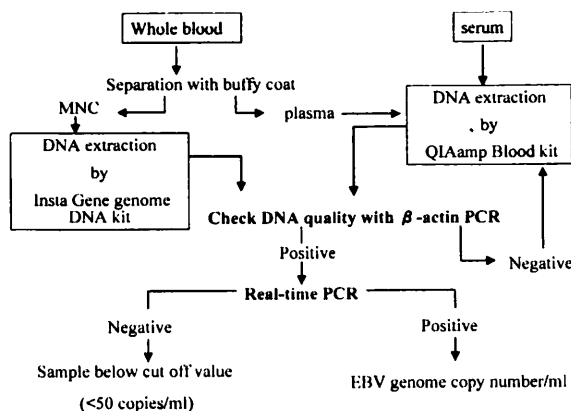


Fig 1 Flow chart for EBV genome copy number determination in whole blood and serum

して分離した。

3. DNA 抽出 1—単核球から DNA 抽出—

Insta Gene Genomic DNA kit (BIO-RAD, Hercules, California) を使用して DNA を抽出し、適当量の精製水で溶解後、分光光度計で DNA 量を測定した。

4. DNA 抽出 2—血清および血漿から DNA 抽出—

凍結保存 (-20℃) してあった血清または血漿 200 μl ~ 1,000 μl を 0.45 μm の Filter に通し、QIAamp Blood kit (QIAGEN, Hilden, German) を使用し、Blood and Body Fluid Spin Protocol に従って、DNA を抽出し、50 μl の精製水に溶解した。

単核球中 DNA (mononuclear cell DNA : MNC DNA) 及び血漿中 DNA (cell-free DNA : C-F DNA) は、β-actin PCR を行いバンドが確認できた sample のみを定量 PCR に使用した。(Fig 1)

5. Real-Time PCR

定量 PCR は、蛍光ラベルされた probe を PCR 反応系に加える事によって、PCR の全過程を可視的にモニターする事ができるという原理に基づいている²⁾。

今回、定量 PCR は Kimura らの方法に基づいた³⁾。使用した primer は、GenBank sequence database (accession number V01555) から得られた EBV の DNA polymerase にコードされている BALF5 領域に作成し、Probe をこの内部に設定した。それぞれのシークエンスは、table 1 に示す。定量 PCR には、全量が 50 μl となるように、5 ~ 10 μl の template と 40 ~ 45 μl の反応液を加えた。反応液は 25 μl の universal master mix (Applied-Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用し、0.25 μM の primer と 0.1 μM の probe を添加し、精製水で 40 ~ 45 μl となるように調整した。

それぞれの検体につき 3 検体ずつ用意し、平均値を定量値として表した。

定量 PCR は、Gene Amp 5700 sequence Detector System (PE Applied-Bio systems) を使用し、95℃、10 分の後、95℃、15 秒と 62℃、1 分を 45 サイクル行った。

6. 定量解析

全 PCR 過程が終了した後、モニター上で PCR product が、指数関数的に増加しはじめた所を threshold limit とし、それぞれの sample につき threshold cycle がコンピュータによって算出され、さらに standard curve にそれぞれの sample の threshold cycle がプロットされ、genome コピー数が自動的に計算された。(Sequence Detector version 1.3, PE Applied Bio-systems)

7. standard curve 作成

BALF5-PCR product を PCR2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に挿入し、大腸菌に transform し、大量培養を行った後、SV Minipreps (Promega, madison, WI, USA) を使用して plasmid DNA を抽出した。抽出した plasmid DNA は、分光光度計を使用して DNA 量を測定し、その値から含まれる分子量を算出し、段階希釈した。この希釈系列を standard curve に使用した。

8. 感度および再現性

この実験系の感度は C-F DNA では 50 copies/ml であった。MNC DNA については、1 copy/μl DNA から検出可能であった。

再現性を評価するために intraassay および interassay をそれぞれ 5 回行ったところ、平均 coefficient variation は 7.8% であった。

9. 統計解析

Statview J 4.02 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA) を使用し、血漿中ゲノムコピー数と血清中ゲノムコピー数間の相関係数には、pearson's correlation test を使用した。

EBV genome copy number

copies/ml or copies/ μ gDNA

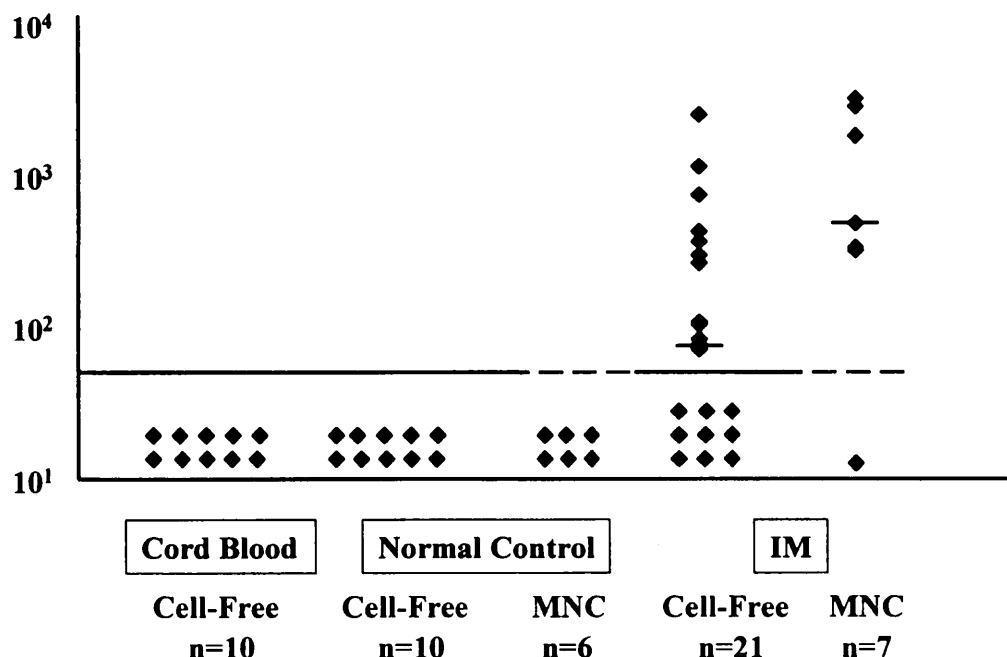


Fig 2 Comparison of cell-free and MNC EBV genome copy number at the time of diagnosis in IM compared with controls. The detection limit in this study was 50 copy/ml for cell-free DNA, 1 copy/ μ l DNA for MNC DNA. The median values were 66 copies/ml in cell-free DNA, and 420 copies/ μ g DNA. Y axis shows EBV genome copy number (cell-free:copies/ml, MNC:copies/ μ g DNA)

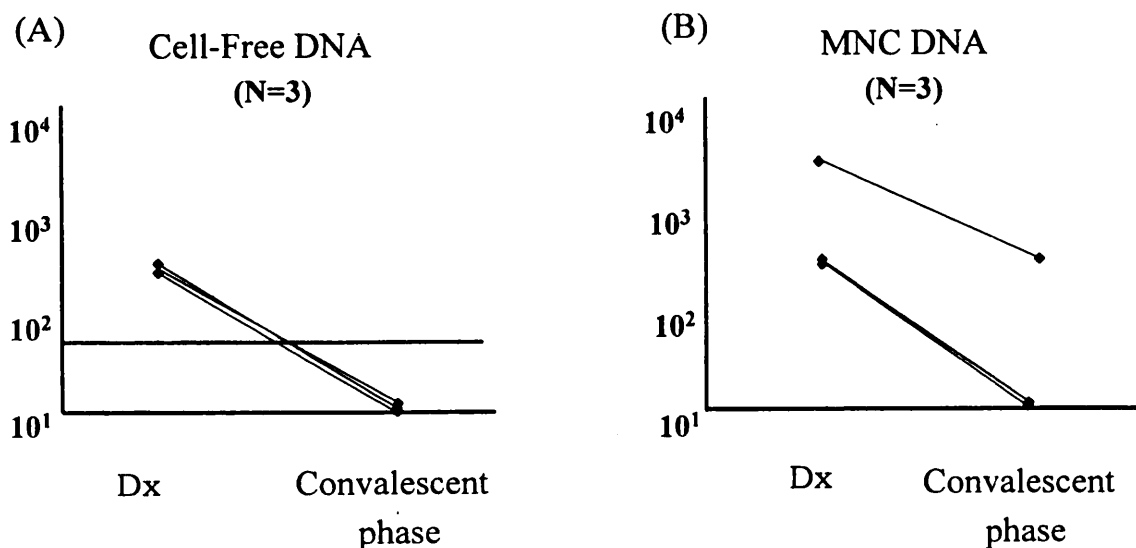


Fig 3 Changes in cell-free (A) and MNC (B) EBV genome copy number in 3 patients with IM at the diagnosis (Dx) and convalescent phase within 1 month from Dx. Y axis shows EBV genome copy number (copies/ml:A, copies/ μ g DNA:B)

III 結果

1. 血清中と血漿中ゲノムコピー数の相関性

健康成人から血清と血漿を採取し、それぞれに同じ量の

ウイルスゲノムを混入後定量した結果、血清と血漿の間に相関を認めた。(correlation coefficient 0.967, $p = 0.0039$)

2. IM 発症時およびコントロール C-F, MNC DNA 中の

EBV ゲノムコピー数の定量

コントロールの、臍帯血血漿10検体および EBV 既感染の健康成人血漿10検体、血球6検体中の DNA からは、EBV ゲノムは検出されなかった。(Fig 2)

一方、伝染性単核球症(IM)発症時の C-F DNA からは、12/21(57%)に、MNC DNA からは、6/7(86%)に EBV ゲノムが検出された。

EBV ゲノムコピー数の中央値は C-F DNA で、66 copies/ml (range: not detect ~2200copies/ml) で、MNC DNA の中央値は420copies/ μ g DNA (range: not detect ~2845copies/ μ g DNA) であった。(Fig 2)

3. 伝染性単核球症(IM)患者臨床経過中の EBV ゲノムコピー数の変化

6名の患者(3名:C-F DNA, 3名:MNC DNA)での経過観察が可能であった。

それぞれの患者からは、2 point 以上で EBV ゲノムコピーの定量を行った。

C-F DNA では、症状回復期には、全例 EBV ゲノムコピー数は、検出感度以下であったのに対し(Fig3A), MNC DNA では、3例中1例に症状が消失したにも関わらず EBV ゲノムが検出されていた。(Fig3B)

IV 考察

Kimura ら³⁾は、9名の伝染性単核球症(IM)患者 MNC DNA 中の EBV ゲノムコピー数を定量し、その中央値は $10^{2.2}$ copies/ μ g DNA であったと報告している。今回の我々の結果も、IM 患者の MNC DNA の中央値は、 $10^{2.6}$ copies/ μ g DNA とほぼ同じ結果であった。コントロールの sample では、EBV ゲノムが検出されなかったのに対し、IM 患者の C-F DNA や MNC DNA からは、高率に(C-F DNA:57%, MNC DNA:86%)検出されており定量 PCR は特異性の高い解析方法であると考えられた。

また Kimura ら³⁾は、伝染性単核球症(IM)患者1例について C-F DNA と MNC DNA の両方で、EBV ゲノムコピー数をモニターしたところ、C-F DNA および MNC DNA 中の EBV ゲノムは、発症から20日経っても定量されていたが30日を過ぎると、どちらの sample からも検出されなかったと報告している。我々の結果では、伝染性単核球症(IM)の患者は、C-F DNA で follow した3名すべて、症状回復期(発症後7日~30日以内)には EBV ゲノムを確認できなかった。一方、MNC DNA で follow した3例では、1例で症状回復期である発症7日目の sample 中にも EBV ゲノムが検出され、その EBV ゲノムコピー数は発症時よ

り明らかに減少していた。

EBV 感染症のスクリーニングおよび経過観察に、C-F DNA を使用すべきか MNC DNA を使用すべきかは意見の別れるところである。C-F DNA の抽出は、sample によっては困難であり、少量の DNA しか抽出できないため、DNA を保存できないことが多い。また、ウイルス感染症の場合、viremia の状態は、通常1週間以内であり、sample 採取のタイミングによっては、ウイルスゲノムを検出できない事もある。しかし、C-F DNA で EBV が検出された場合は、EBV 感染と病態との関連を強く疑って良いと思われた。

一方、MNC DNA の抽出は容易であり、通常保存可能な DNA 量が抽出できる。

しかし、EBV 感染症の場合、自験例に示したように、症状が消失していても血球中に EBV が検出可能である症例もあることから、EBV 感染症の病態の把握には、C-F DNA の方が鋭敏に病態を反映しているのではないかと考えられた。

近年の報告⁴⁻⁹⁾でも、様々な EBV 関連疾患において、C-F DNA 中の EBV ゲノムコピーの定量は、病態を鋭敏に反映しており、早期診断と病態のモニターに有効であったとするものがあり、今回の結果と合致するものであった。

一方、伝染性単核球症(IM)の重篤な合併症である血球貪食症候群¹⁰⁾は、過剰なサイトカインの産生^{11, 12)}によって引き起こされる致死的な病態である。今回調査した伝染性単核球症(IM)患者では、血球貪食症候群の合併は認めなかったが、今後は、C-F DNA 中の EBV ゲノムのモニターから重篤な合併症の有無を、早期に診断する可能性について検討していきたい。

V まとめ

1. 伝染性単核球症(IM)25名の C-F または MNC DNA 中の EBV ゲノムコピー数を定量解析した。
2. 臍帯血血漿および EBV 既感染成人の血清、血漿および血球中には、EBV ゲノムは検出されなかったのに対し、伝染性単核球症(IM)患者では C-F DNA 12/21例(57%)に、MNC DNA では6/7例(86%)に検出可能であった。
3. 伝染性単核球症(IM)患者6名(3名:MNC DNA, 3名:C-F DNA)の EBV ゲノムコピー数を追跡調査したところ、症状回復期には C-F DNA では3/3で、MNC DNA では2/3で EBV ゲノムは検出感度以下であった。
4. 血清および血漿中の EBV ゲノムの定量 PCR は、EBV 感染症の早期診断および経過観察に有効であると考

えられた。

VI 参考文献

- 1) Sumaya, C.V., and Ench, Y. Epstein-Barr Virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics*, 75, 1011-1019 (1985)
- 2) Heid, C.A., Stevens J., Livak, K.J., Williams, P.M. Real Time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994 (1996)
- 3) Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T., and Morishima, T. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 37, 132-136 (1999)
- 4) Gan, Y.J., Sullivan, J.L., and Sixbey, J.W., Detection of cell-free Epstein-Barr virus DNA in serum during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 170, 436-439 (1994)
- 5) Yamamoto, M., Kimura, H., Hironaka, T., Hirai, K., Hasegawa, S., Kuzushima, K., Shibata, M., and Morishima, T. Detection and quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Clin Microbiol* 33, 1765-1768 (1995)
- 6) Mutirangura, A., Pornthanakasem, W., Theamboonlers, A., Sriuranpong, V., Lertsanguansinchi, P., Yenrudi, S., Voravud, N., Supiyaphun, P., and Poovorawan, Y. Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 4, 665-669 (1998)
- 7) Lo, Y.M., Chan, L.Y., Lo, K.W., Leung, S.F., Zhang, J., Chan, A.T.C., Lee, J.C.K., Hjelm, N.M., Johnson, P.J., and Huang, D.J. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 59, 1188-1191 (1999)
- 8) Lei KIK, Chan LYS, Chan WY, Johnson PJ, Lo YMD. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 2000; 111: 239-246 (2000)
- 9) Fontan, J., Bassignot, A., Mougin, C., Cahn, J.Y., and Lab. M. Detection of Epstein-Barr virus DNA in serum of transplanted patients: a new diagnostic guide for lymphoproliferative diseases [letter]. *Leukemia*, 12, 772 (1998)
- 10) Imashuku S, Tabata Y, Teramura T, Hibi S. Treatment strategies for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH). *Leuk Lymphoma* 39: 37-49 (2000)
- 11) Imashuku, S., Hibi, S., Tabata, Y., Sako, M., Sekine, Y., Hirayama, K., Sakazaki, H., Maeda, N., Kito, H., Shichino, H., and Mugishima, H., Biomarker and morphological characteristics of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Med Pediatr Oncol*. 31, 131-137 (1998)
- 12) Imashuku, S., Hibi, S., Fujiwara, F., Ikushima, S., and Todo, S., Haemophagocytic lymphohistiocytosis, interferon-gamma-naemia and Epstein-Barr virus involvement. *Br J Haematol*, 88, 656-658 (1994)

京都市における酸性雨調査

山本暁人¹, 松本正義¹, 友膳幸典¹, 三輪真理子¹, 橋本和平¹

Monitoring Results of Acid Rain in Kyoto City

Akito YAMAMOTO, Masayoshi MATSUMOTO, Yukinori YUZEN, Mariko MIWA, Kazuhei HASHIMOTO

Abstract : Monitoring of the acid deposition at one urban site in Kyoto city was carried out from April 1993 to March 2000. The results are summarized as follows:

(1) The volume-weighted annual pH value ranged from 4.80 to 5.18, and showed the tendency to gradual increase.

(2) SO_4^{2-} ion was the main component with 23.0% of the total soluble ions. NH_4^+ and H^+ ions also accounted for major components. The total ionic components, either positive or negative, consisted of above 70% non-sea salt components.

(3) Both acidifying components and neutralizing ones decreased in concentration during the study period.

(4) During the study period, the levels of rain pH in Kyoto city were comparable to the national averages, although the deposition amounts of nss-SO_4^{2-} , NO_3^- , and NH_4^+ ions, were higher.

Key words : 酸性雨 acid rain, 湿性降下物 wet deposition, 湿性/乾性分別採取装置 wet/dry sampler

I はじめに

酸性雨問題は広域的な環境汚染問題の一つとして注目を集めている。また、酸性雨問題は「雨」だけの問題ではなく、酸性化への原因物質の発生から、それらが沈着して生態系などへ影響を及ぼすまでのすべての過程について解明していく必要がある。

その一つとして、京都市では、雨水の酸性化の状況を長期的に把握することを目的とし、昭和58年度から市内1地点にて常時測定を行っている。これまでの調査結果は、平成4年度まで本研究所の年報^{1)~6)}にて報告されている。

本報では、平成5年度から平成11年度までの7年間の降水試料により、本市における酸性雨の状況及びその原因物質などについて検討を行った。

なお、平成12年度の試料については特異的な自然現象によるpHへの影響が考えられるため、別途検討することとした。

II 調査方法

1. 調査期間

1993年4月(平成5年度)から2000年3月(平成11年度)までの7年間。

2. 試料採取場所

京都市衛生公害研究所(中京区壬生東高田町)。大阪湾から北東へ約45km, 若狭湾から南へ約50kmに位置している。市街地中西部の準工業地域に位置する5階建ての屋上。

3. 採取方法

一降雨毎に採取したものを、メンブランフィルター(0.45 μm)でろ過し試料とした。なお、試料は降水量0.5mm以上の降水を対象とした。また、平成5年度のデータについては、分析精度管理などにより分析室内汚染が推測されるため、pH及び導電率(以下ECと表す)についてのみ採用し、イオン成分は参考値とした。

4. 採取装置

感雨器を備えた雨水自動式採取装置(小笠原R-200)に、ポリエチレン製の円筒型乾性降下物採取器を取り付けるなどの改良を加えた湿性/乾性分別採取装置であり、図1のとおりである。

5. 分析方法

分析項目と方法は、環境庁酸性雨等調査マニュアル⁷⁾に従った。pHをガラス電極法、ECを伝導率計、8種のイオン(SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- , NH_4^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+)をイオンク

¹ 京都市衛生公害研究所 環境部門

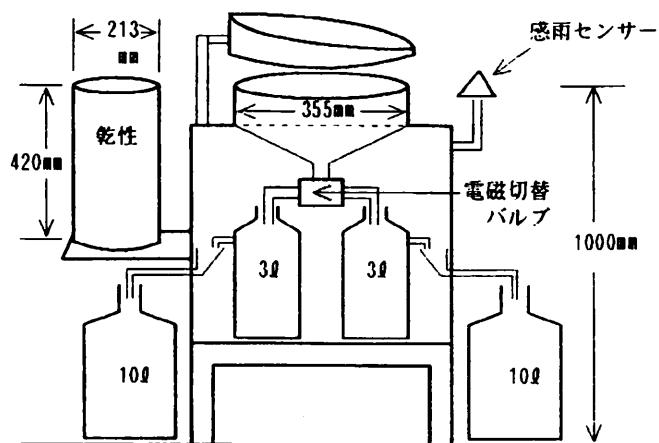


図1 湿性/乾性分別採取装置

ロマトグラフ法にて測定した。なお、降水データ中の pH と EC 及び濃度($\mu\text{eq/L}$)についての年平均値は、降水量で重み付けした加重平均で算出した。

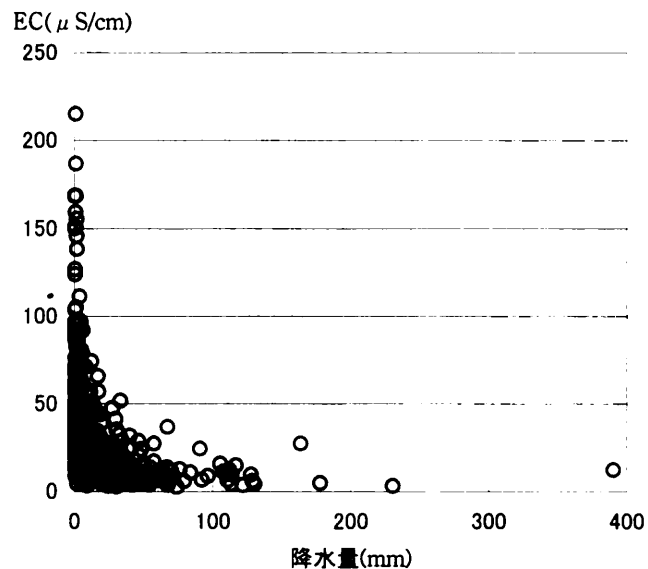


図2 降水量とEC

Ⅲ 結果と考察

1. 降水量

表1に示すように、採取試料数は7年間で592検体で、年平均84.6検体である。年間降水量は、平成6年度を除けば、ほぼ一定の値を示している。また、採取量を検討するため京都地方気象台(衛生公害研究所から北へ約2km)のデータ⁸⁾と比較した。採取量はほぼ一致し正確な採取ができたと考えられる。

次に、図2に降水量とECの関係を示した。降水量が10~50mm程度の範囲では、ECは様々な値を示したが、一般的に、降水量が多くなるとECは低い値を示し、降水量が少なくなるとECは高い値を示す傾向にあった。

2. pH

図3にpHの経年変化を示した。pHは、やや緩やかな上昇傾向(4.80~5.18)を示している。また、最大pHは年によりばらつきを見せている(6.01~7.12)が、最低pHはほぼ一定の値(3.58~3.92)を示し、横ばい状態である。

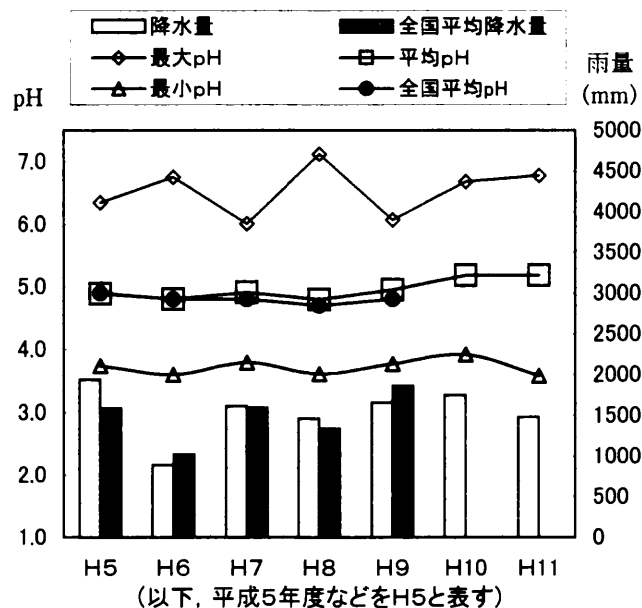


図3 pHと降水量の推移

表1 降水試料数及び年間降水量

	平成5年度	平成6年度	平成7年度	平成8年度	平成9年度	平成10年度	平成11年度	平均
試料数	96	73	75	80	84	85	99	84.6
降水量 衛生公害研究所 (mm)	1936.6	891.2	1614.3	1461.3	1660.6	1748.7	1482.6	1542.2
京都地方気象台	1904.0	870.5	1468.0	1420.5	1667.0	1816.5	1534.0	1525.8
採取割合(%)	101.7	102.4	110.0	102.9	99.6	96.3	96.7	101.4

※採取割合は気象台を分母とした衛生公害研究所の採取割合を百分率で算出したものである

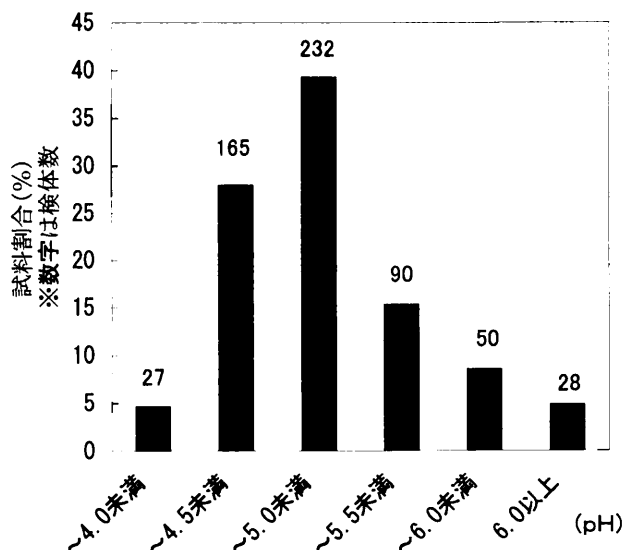


図4 pHの頻度分布

次に、pH の頻度分布を図4に示した。pH4.5以上5.0未満が一番多く、全試料の39.2%であった。なお、特にpH4.0未満の試料は27個(全体の4.6%)であった。

図5には降水量とpHの関係を示した。降水量が20mm以下の時、pHは低pHから高pHまで様々な値を示すが、降水量が多くなると、pH5.0付近に収束する傾向にあった。

また、pHとECの関係を示した図6では、高pH域ではECが低くなり、低pH域ではECが高くなる傾向を示した。

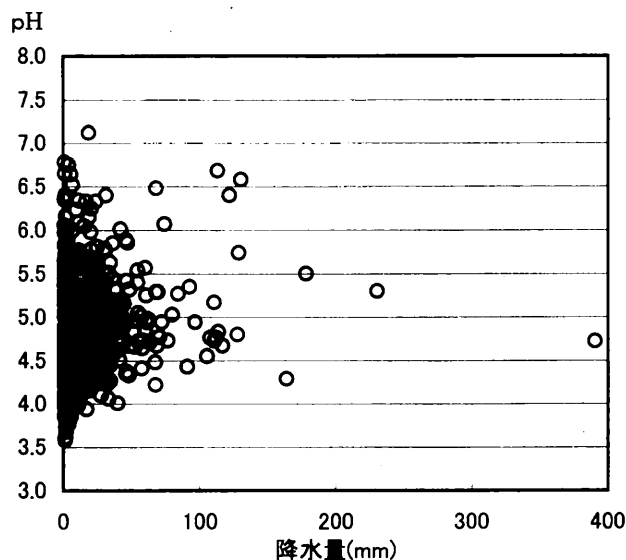


図5 降水量とpH

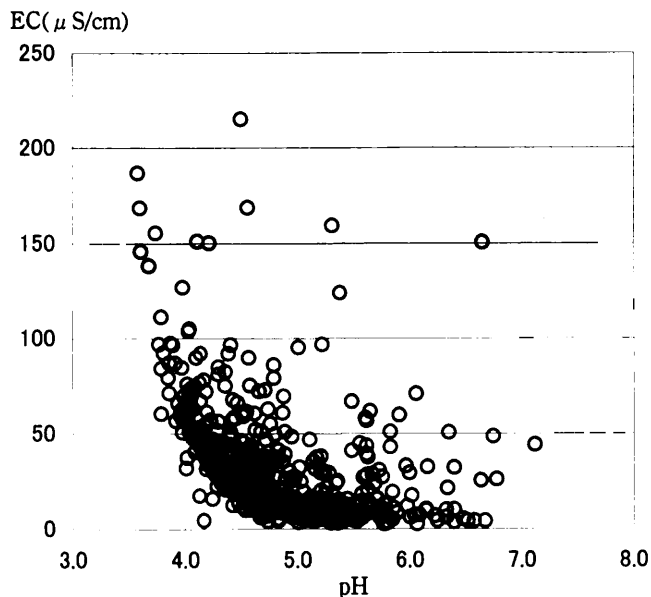


図6 pHとEC

3. 可溶性成分

1) 海塩起源成分

降水中のイオン成分の中には、特に SO_4^{2-} や Ca^{2+} など、海塩の寄与が大きいものがある。そこで Na^+ は全て海塩起源であると仮定し、降水中に含まれているこれらの海塩に由来する成分割合を Na^+ を基準として海水中の Na^+ に対する比率から算出した。そして、各成分の全体から海塩由来 (seasalt, ss-) の部分を差し引いた残りを非海塩由来 (non-seasalt, nss-) とみなす⁹⁾¹⁰⁾。そこで、同一物質中の非

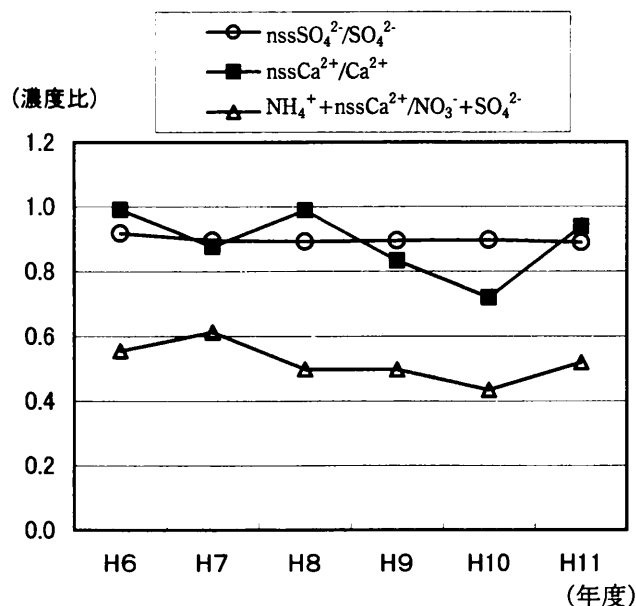


図7 非海洋性成分比

海塩由来のものを nss-SO_4^{2-} と nss-Ca^{2+} などと示した。図7には、 SO_4^{2-} と Ca^{2+} の各イオン中の nss-SO_4^{2-} と nss-Ca^{2+} の割合を示した。いずれも、非海塩由来の成分が多い(0.72～0.99)ことが示唆された。 SO_4^{2-} 中に占める nss-SO_4^{2-} の割合は、経年変化がほとんどないのに対し、 Ca^{2+} 中に占める nss-Ca^{2+} の割合は年によってばらつきが大きかった。また、中和成分に対する酸性成分の濃度比は、ほぼ横ばい状態であった。

2) 組成

表2には可溶性成分の年平均濃度を示し、図8に可溶性成分を陽イオン(total cation; TC)と陰イオン(total anion; TA)に分類し、6年間の平均当量濃度($\mu\text{eq/L}$)の割合をイオン組成図で示した。全イオン中最も濃度の高い成分は SO_4^{2-} (31.3 $\mu\text{eq/L}$) で、次いで NH_4^+ (22.7 $\mu\text{eq/L}$) であった。以下濃度の高い順に、 $\text{H}^+ > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+$ であった。また、非海塩が占める割合は、陽イオン70.4%、陰イオン71.1%であった。各組成イオンの半分以上が非海塩由来であることが示唆された。

3) 酸性成分と中和成分

降水の pH は酸とアルカリの性質とその濃度のバランス

によって決まる。pH の低下に関係する主な陰イオンは SO_4^{2-} と NO_3^- である。一方、酸を中和し pH を高くするのは、 NH_4^+ と Ca^{2+} である。そして、これらはイオンとして保存されると考えられている⁹⁾。そこで、前者はまとめて酸性成分(acidifying components)、後者はまとめて中和成分(neutralizing components)と呼ばれている。

(1) 酸性成分

図9に酸性成分の経年変化を示した。酸性成分の全体量は、緩やかに減少している。 nss-SO_4^{2-} (24.9～34.0 $\mu\text{eq/L}$) と NO_3^- (17.5～24.9 $\mu\text{eq/L}$) とともに著しい変化はみられず、それぞれほぼ同程度の割合で推移している。 nss-SO_4^{2-} と NO_3^- の割合は $\text{nss-SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^-$ で nss-SO_4^{2-} の方が pH 低下への寄与が大きいことが示唆された。

(2) 中和成分

図10に中和成分の経年変化を示した。中和成分全体としては、緩やかに減少している。 nss-Ca^{2+} は年により変化(1.2～7.1 $\mu\text{eq/L}$)があり、一定の傾向はつかめない。また NH_4^+ は、平成7年度(27.7 $\mu\text{eq/L}$)を最高に減少傾向にある。 NH_4^+ と nss-Ca^{2+} の割合は $\text{NH}_4^+ > \text{nss-Ca}^{2+}$ で、中和成分としては、 NH_4^+ の寄与が多いことが示唆された。

表2 降水成分の年平均濃度

	pH	EC $\mu\text{S/cm}$	NO_3^- $\mu\text{eq/L}$	SO_4^{2-} $\mu\text{eq/L}$	Cl^- $\mu\text{eq/L}$	H^+ $\mu\text{eq/L}$	NH_4^+ $\mu\text{eq/L}$	Ca^{2+} $\mu\text{eq/L}$	K^+ $\mu\text{eq/L}$	Mg^{2+} $\mu\text{eq/L}$	Na^+ $\mu\text{eq/L}$	nss-SO_4^{2-} $\mu\text{eq/L}$	nss-Ca^{2+} $\mu\text{eq/L}$
平成5年度	4.89	12.8	(12.7)	(23.8)	(13.5)	(17.3)	(28.6)	(2.04)	(0.96)	(2.8)	(7.7)	(22.8)	(1.7)
平成6年度	4.80	18.3	24.9	30.6	18.0	25.3	27.0	3.8	1.4	3.7	10.1	28.0	3.8
平成7年度	4.91	17.4	18.1	33.3	25.9	19.9	27.7	4.3	1.3	6.5	14.0	29.8	3.7
平成8年度	4.80	20.7	23.1	38.2	22.3	27.0	25.6	5.0	1.1	4.8	16.4	34.0	4.9
平成9年度	4.95	15.4	17.5	29.1	16.7	19.2	20.8	2.8	0.8	3.1	12.2	26.0	2.3
平成10年度	5.18	13.0	20.6	28.6	16.9	14.9	20.2	1.6	2.4	3.0	11.8	25.6	1.2
平成11年度	5.18	13.1	17.8	28.0	15.8	19.0	16.6	7.6	1.7	2.5	12.4	24.9	7.1

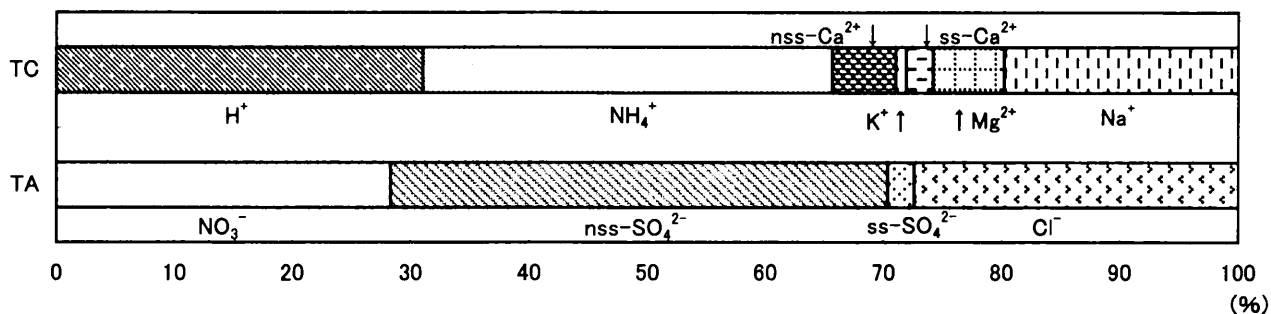


図8 イオン組成図

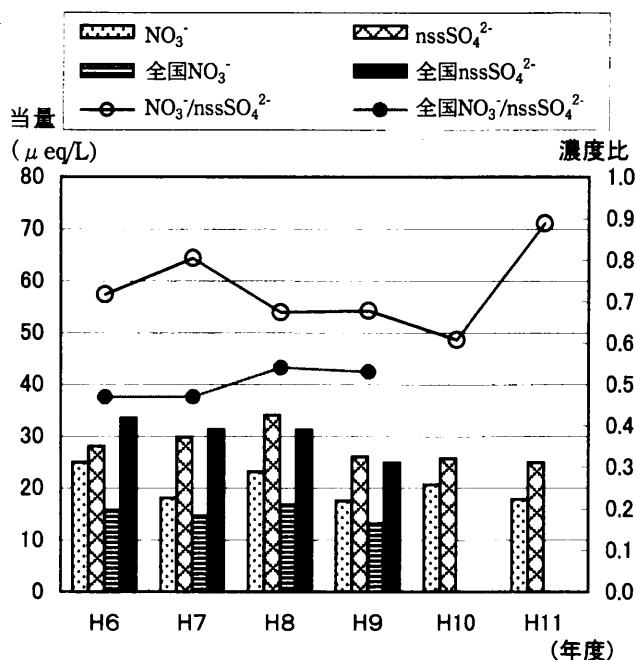


図9 酸性成分の経年変化

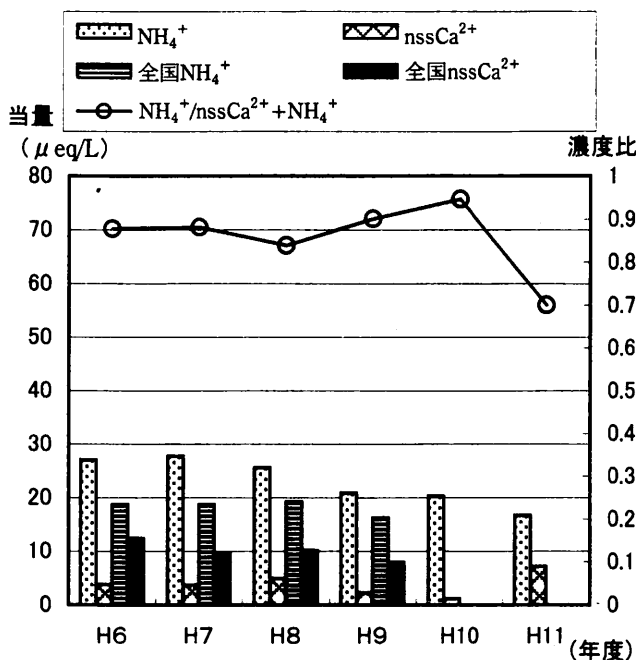


図10 中和成分の経年変化

4. 降下量

酸性雨問題を考えるにあたって、酸性物質がどれだけ地上に沈着するかという降下量もまた重要な指標となる。降下量を把握していくとき、降水による沈着量である湿性沈着量と非降水時の沈着量である乾性沈着量の把握も必要であるが、今回は湿性沈着量についてのみ検討した。

表3に各イオン成分の降下量を示した。また、図11と図12に酸性及び中和各成分の降下量の経年変化を示した。

H⁺の年間降下量は22.5～39.5meq/m²/yの範囲にあり、平成8年度のみ著しく値が高くなっていた。

NO₃⁻の年間降下量は22.2～36.1meq/m²/yの範囲にあり、ほぼ一定の値を示していた。

nss-SO₄²⁻の年間降下量は26.2～52.9meq/m²/yの範囲にあ

り、年間降雨量の少なかった平成6年度を除くと減少傾向を示していた。

NH₄⁺は降水中では酸を中和する役割を果たすが、土壤中において微生物により酸化され硝酸となり土壤の酸性化に寄与することが指摘されている。したがって、NH₄⁺濃度に関しては酸性成分と中和成分の両方の視点によりみていく必要がある¹¹⁾。NH₄⁺の年間降下量は24.1～44.8 meq/m²/yの範囲にあり、nss-SO₄²⁻と同様に減少傾向がみられた。

nss-Ca²⁺の年間降下量は1.9～10.5meq/m²/yの範囲にあり、変動係数が最も大きく、年度によるばらつきがあり一定の傾向がみられなかった。

表3 年間沈着量

	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	H ⁺	NH ₄ ⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	nss-SO ₄ ²⁻	nss-Ca ²⁺
	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y	meq/m ² /y
平成6年度	22.2	27.2	16.1	22.5	24.1	3.4	1.3	3.3	9.0	26.2	3.0
平成7年度	29.2	53.7	41.8	32.2	44.8	6.9	2.1	10.6	22.5	51.0	5.9
平成8年度	33.8	55.8	32.6	39.5	37.4	7.3	1.6	7.0	24.0	52.9	6.2
平成9年度	29.1	48.3	27.8	32.0	34.6	4.6	1.3	5.2	20.2	45.8	3.7
平成10年度	36.1	50.0	29.6	26.1	35.4	2.8	4.3	5.3	20.7	47.5	1.9
平成11年度	26.5	41.5	23.4	28.1	24.7	11.3	2.6	3.7	18.4	39.3	10.5

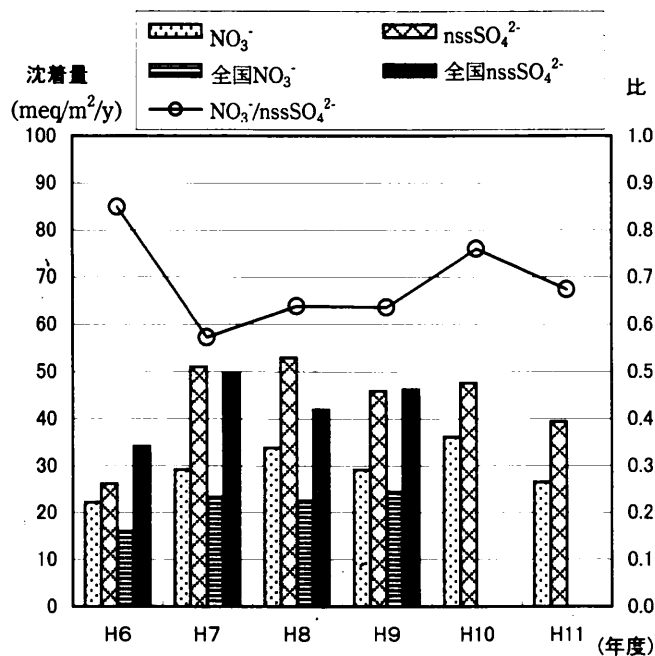


図11 酸性成分の沈着量経年変化

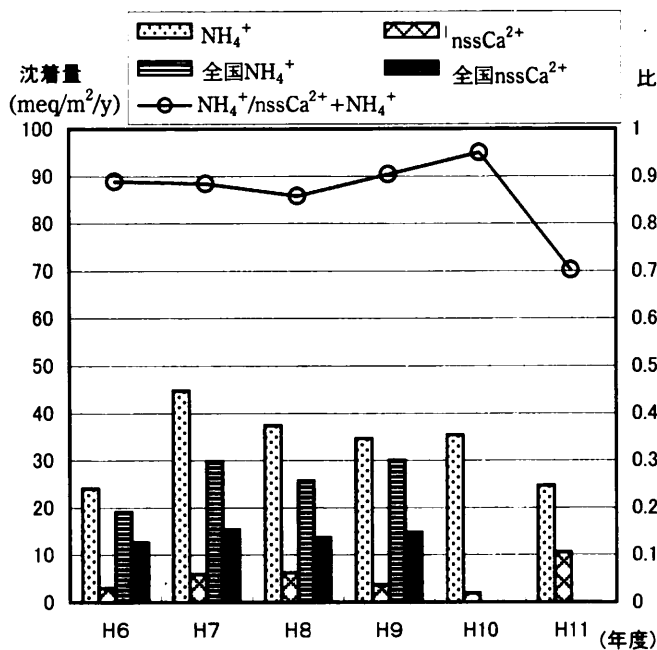


図12 中和成分の沈着量経年変化

5. 他都市との比較

環境庁が行った第3次酸性雨調査報告¹⁰⁾をもとにして、全国平均との比較を行った。

1) 降水量とpH

図3にてpHと降水量を比較した。pHはほぼ全国平均(4.7~4.8)と同じ値で同じ経年変化がみられた。また、降水量においても大きな差はなく、全国平均(1,019~1,859mm)とほぼ等しかった。

2) イオン成分

(1) 酸性成分

図9及び図11に示している全国平均と比較すると、平成6年度を除くと、nss-SO₄²⁻及びNO₃⁻ともに全国平均よりわずかに上回っていた。

N/S比はNO₃⁻とnss-SO₄²⁻のどちらが酸性に寄与する割合が大きいかを示す指標であり、一般に本州都市部では降水の低pH化にNO₃⁻が寄与する割合が大きいため、N/S比は大きくなるといわれている¹⁰⁾。京都市のN/S比は0.61~0.89で推移しており、全国平均は0.47~0.53であった。したがって、京都市ではNO₃⁻が寄与する割合が全国平均に比べて大きかった。

(2) 中和成分

図10及び図12にて、中和成分について全国平均と比較すると、NH₄⁺はいずれの年も全国平均を上回っていたが、逆にnss-Ca²⁺は全国平均を下回っていた。

IV まとめ

1993年4月から2000年3月まで京都市中京区において、雨水を一降雨毎に採取した。雨水の分析により、次の結果を得た。

1. 雨水のpHの年平均は4.80~5.18で、緩やかな上昇傾向がみられた。
2. 降水中のイオン濃度は、SO₄²⁻が最も高く、全体の23.0%であった。次にNH₄⁺とH⁺が高かった。陽イオン及び陰イオン濃度とも、非海塩成分が占める割合が全体の70%以上であった。
3. 酸性成分及び中和成分とも、イオン濃度の経年変化が、緩やかに減少していた。酸性成分ではnss-SO₄²⁻の寄与が大きく、中和成分ではNH₄⁺の寄与が大きかった。
4. pHについて京都市は、全国平均とほぼ同様の経年変化を示していた。また、酸性成分及び中和成分の降下量は、nss-Ca²⁺を除いて、いずれも全国平均を上回っていた。N/S比は全国平均が0.47~0.53であったのに対し、京都市では0.61~0.89で推移していた。

V 参考文献

- 1) 重田 勇夫, 他: 京都市における酸性雨について (第1報), 京都市公害センター年報, 6, 61-76(1985)
- 2) 重田 勇夫, 他: 京都市における酸性雨について (第2報), 京都市公害センター年報, 7, 63-69(1986)
- 3) 重田 勇夫, 他: 酸性雨のイオン成分降下量について,

京都市公害センター年報, 8, 50-59(1987)

4) 小畑 九仁雄, 他: 酸性雨の調査結果について,
京都市公害センター年報, 11, 34-42(1990)

5) 京都市衛生公害研究所 環境部門: ろ過式採取装置
による酸性雨調査, 京都市衛生公害研究所年報, 59,
135-144(1993)

6) 京都市衛生公害研究所 環境部門: ろ過式一括採取装
置及び湿性/乾性物採取装置による降下物量について,
京都市衛生公害研究所年報, 60, 146-148(1994)

7) 酸性雨調査法研究会: 酸性雨調査法, 279-291,
ぎょうせい(1993)

8) 京都地方気象台: 京都府気象月報, 平成5年4月～
平成12年3月

9) 原 宏: 酸性雨-第3講酸性雨データをどうみるか-,
大気汚染学会誌, 26, A51-A59(1991)

10) 環境庁酸性雨対策検討会: 第3次酸性雨対策調査
とりまとめ(1999)

11) 平成9年度環境庁委託業務結果報告書; 酸性雨の実態
把握調査, 1-2(1998)

12) 植松 広子, 他: 高知県における酸性雨調査(第9報),
高知県公害防止センター所報, 15, 120(1998)

第7部 短報

目 次

1. LC/MS/MS による鶏肉の残留スルファキノキサリン検出	-----	(生活衛生)	--	111
2. エゾボラモドキによるテトラミン食中毒事例について	-----	(生活衛生)	--	117
3. クレチン症マス・スクリーニングにおける FT ₄ 値の検討	-----	(臨 床)	--	120
4. 餅つき大会における食中毒事件について	-----	(臨 床)	--	124
5. 低脂肪乳などを原因とする食中毒について	-----	(臨 床)	--	126
6. 豚枝肉の衛生評価	-----	(病 理)	--	128
7. 河川水中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシル分析における抽出法の検討	-----	(環 境)	--	131

Chapter 7 Short notes

Contents

1. Detection of Residual Sulfaquinoxaline in chicken by LC/MS/MS	(Food)	--	111
2. A case of tetramine poisoning by <i>Neptunea intersculpta</i>	(Food)	--	117
3. Study of Free T ₄ Measurement in Neonatal Screening for Congenital Hypothyroidism	(Clin)	--	120
4. A case of food poisoning at a rice-cake making party	(Clin)	--	124
5. A case of food poisoning caused by low-fat milks and others	(Clin)	--	126
6. Survey of bacterial contamination in swine carcasses	(Path)	--	128
7. Extraction method for the analysis of di(2-ethylhexyl) phthalate in river waters	(Envir)	--	131

LC/MS/MSによる鶏肉の残留スルファキノキサリン検出

塩見哲生¹, 辻由起¹, 谷口哲彦¹, 福本智也¹,
新美達也¹, 森田恵一¹, 川上雅弘¹, 井崎やゑ子¹, 森田正和¹

Detection of Residual Sulfaquinoxaline in chicken by LC/MS/MS

Tetsuo SHIOMI, Yoshiki TSUJI, Tetsuhiko TANIGUCHI, Tomoya FUKUMOTO,
Tatsuya NIIMI, Keiichi MORITA, Masahiro KAWAKAMI, Yaeko IZAKI, Masakazu MORITA

Key Words : 鶏 chicken, 残留動物用医薬品 residual veterinary drugs, スルファキノキサリン Sulfaquinoxaline(SQX),
液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatography-mass spectrometry

I はじめに

動物用医薬品として用いられる抗菌性物質（抗生物質、合成抗菌剤）や駆虫薬は、その使用が適切でなければ畜水産食品に残留し、人の健康を脅かす可能性がある。このような動物用医薬品残留による健康被害防止のため、「畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査実施要領（厚生労働省）」に基づいて定期的なモニタリング検査を行っている。このうち、鶏肉については抗生物質（4系統）、合成抗菌剤（11種類（表1参照）、内寄生虫用剤（1種類）がモニタリング対象項目として設定されている。今回、コクシジウム治療薬として用いられるスルファキノキサリン（SQX）が保健所収去の鶏肉から検出された事例について報告する。また、平成12年度に新規備品として生活衛生部門に導入された液体クロマトグラフ質量分析計（liquid chromatography/mass/mass spectrometry, LC/MS/MS）を用いた検出も行ったので、これについても報告する。

II 検査法

抽出は、平成5年4月1日付け衛乳第79号中の「畜水産食品中の残留合成抗菌剤の一斉分析法（改訂法）」（以後、一斉分析法と記す）に準じて行った。一斉分析法においてはUV検出器付きHPLCで検出する事になっているが、今回はそれに加えてLC/MS/MSを用いた検出もおこなった。

1. サンプル

市内保健所の食品衛生監視員により、各管内の食鳥処理場から収去された鶏22ロット（1ロットに筋肉、腎臓、

肝臓を含む、計66検体）について残留検査を行った。サンプルは基本的には1個体から筋肉、腎臓、肝臓を採取するが、同一生産ロットに属する複数の個体から採取されたものも含む。

表1 鶏肉における合成抗菌剤のモニタリング対象項目

化合物名	分類
スルファメラジン	サルファ剤
スルファジミジン	サルファ剤
スルファモノメトキシ	サルファ剤
スルファジメトキシ	サルファ剤
スルファキノキサリン	サルファ剤
オキシリン酸	キノロン系抗菌剤
チアンフェニコール	クロラムフェニコール系抗菌剤
オルメトプリム	薬酸拮抗薬
トリメトプリム	薬酸拮抗薬
ピリメタミン	薬酸拮抗薬
ナイカルバジン	鶏コクシジウム予防薬

2. 抽出

試料5gから、アセトニトリル25mlで抽出後、アセトニトリル-ヘキサン分配により精製する。これを2回行って得られたアセトニトリル層に1-プロパノール10mlを加えて減圧乾固（水浴40℃）後、残さをアセトニトリル-水（4：6）2mlに溶解し、アセトニトリル-水-ヘキサン分配により精製する。ヘキサン層を除去したものをHPLC試験溶液とする。

3. UV（PDA：フォトダイオードアレイ検出器）による検出

測定装置：SHIMADZU LC-10ADvp

カラム：Mightysil RP-18（4.6×250mm）

¹ 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

カラム温度：40℃

移動相：A 0.3% CH₃COOH aq

B 0.3% CH₃COOH in CH₃CN:H₂O(6:4)

グラジエント：B 0-63% in 41min

流速：1.0ml/min

注入量：20 μl

UV(PDA)：270nm

4. MS/MS による検出

1) HPLC

測定装置：Agilent 1100 series

カラム：ZORBAX SB-C18(2.1×30mm) Agilent 製

カラム温度：40℃

移動相：A 0.1% CH₃COOH aq

B 0.1% CH₃COOH in MeOH

グラジエント：B 0%-24% in 8min

流速：0.3ml/min

注入量：10 μl

UV(PDA)：270nm

2) MS

測定装置：FINNIGAN LCQ^{DECA}

(イオントラップ MSⁿ 型)

イオン化モード：ESI(ElectroSpray Ionization)

Ion Polarity：positive

Segment time：18min

Scan event：

Full ms2 301.00@25.00[150.00-310.00]

質量数301.00のプリカーサーイオンのみを選択してトラップし、相対的衝突エネルギーを25%として衝突活性化によるイオン分解を行う。その結果生成したプロダクトイオンを質量数[150.00-310.00]の範囲でモニターする。

III 試験結果

1. UV による検出結果

一斉分析法に基づいた UV(PDA)による検出の結果、検査を行った22ロット(66検体)中で、6ロット9検体からスルファキノキサリンを検出した。この検出結果を表2に示す。検体中から抽出されたスルファキノキサリンと疑われる化合物と SQX 標準品との PDA による UV スペクトル類似度はすべて97%以上であった。また、この検査におけるスルファキノキサリンの添加回収率は90%以上であった。

SQX 標準品と筋肉、腎臓、肝臓における代表的なクロマトグラム、及び SQX 標準品と腎臓で検出された化合物

の UV 吸収スペクトルを図2に示す。

表2 UV検出による定量結果

	部位	UVスペクトル 類似度 (%)	SQX濃度 (検体中) (μg/g)
サンプル1	腎臓	97.0	0.054
サンプル2	腎臓	99.5	0.036
サンプル3	腎臓	99.9	1.299
	肝臓	98.6	0.055
サンプル4	腎臓	98.6	0.578
	肝臓	98.4	0.112
サンプル5	腎臓	99.9	0.233
サンプル6	筋肉	99.7	0.157
	腎臓	100.0	0.425

2. MS/MS による検出結果

確認試験として、筋肉、腎臓、肝臓から1検体ずつ LC/MS/MS による検出を行った。スルファキノキサリン分子イオン (m/z：301.00) とイオン分解による生成フラグメント (m/z：156.00, 図1参照) をモニターした結果、標準品と同じ保持時間にピークが検出された。その保持時間でのマススペクトルと SQX 標準マススペクトルは高い類似度を示した。

SQX 標準品と各部位のマスキロマトグラム、及び SQX 標準品と腎臓で検出された化合物のマススペクトルを図3に示す。いずれのマススペクトルにおいてもスルファキノキサリン分子イオン (m/z：301.00) と生成フラグメントイオン (m/z：156.00) が現れている。

また、LC/MS/MS 検出によって得られた定量結果を表3に示す。

表3 MS/MS検出による定量結果

	部位	検出SQX濃度 (検体中) (μg/g)
サンプル6	筋肉	0.144
サンプル3	腎臓	1.824
サンプル4	肝臓	0.156

IV 考察

UV 検出と LC/MS/MS 検出のクロマトグラムを比較することによって、以下のような LC/MS/MS 検出の有効性を見いだすことができる。

1. マトリックスの影響を受けにくい。

UV 検出では、主なサルファ剤を検出する270nm において夾雑マトリックス成分の妨害を受けやすい。特に、医薬品残留の可能性が高い腎臓、肝臓ではこの影響が大きい。

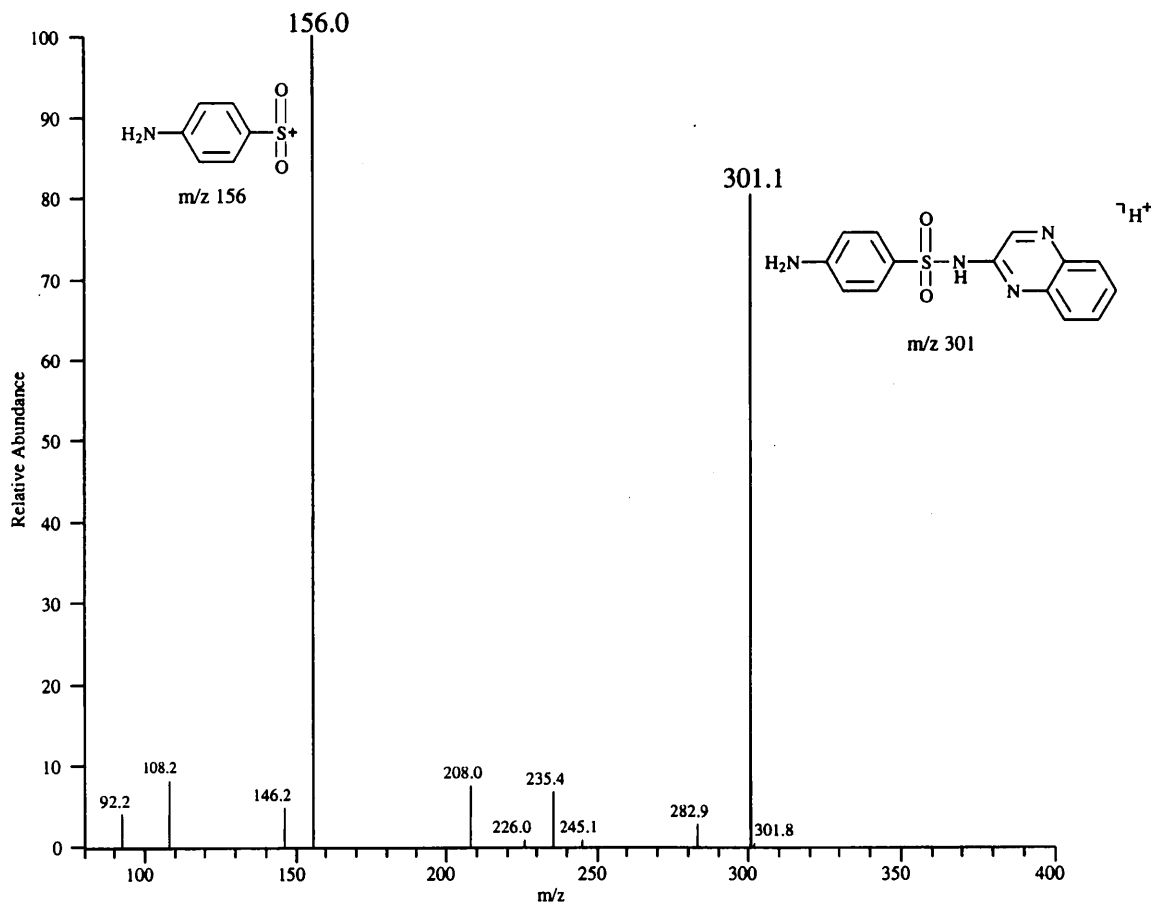


図1 スルファキノキサリンの開裂フラグメント

それに対して、LC/MS/MSによる検出ではマトリックスによる影響が少なく、注目成分に対する特異性が高いシンプルなクロマトグラムが得られる。これは本機の特徴である tandem-in-time MS/MS 分析によるものである。つまり、目的分子イオン (m/z : 301.00) 以外の生体成分イオンを排除した後、イオントラップ内で目的分子イオンにエネルギーを与えてイオン分解させ、その結果得られる生成フラグメント (m/z : 156.00) をモニターするためである。

2. 感度が高い。

MS/MS 検出は、UV 検出に比べて上記のような理由等により、S/N 比が向上している。その結果、UV 検出では困難であった一斉分析法の検出下限値 (0.03ppm) レベルにおける定量検査が可能になった。

3. 同定能力が高い。

UV 検出では検出化合物の同定条件として、

- 1) 保持時間
- 2) UV 吸収スペクトル類似度

の2点であるのに対して、MS/MS 検出では、

- 1) 保持時間
- 2) 選択される分子イオン

3) 選択される分子イオンの分解によって生成するフラグメント

の3点の条件である。従って、UV 検出に比べて MS/MS 検出の同定能力は向上している。

4. 特徴的な UV 吸収スペクトルの無い化合物にも適用できる。

今回検出したスルファキノキサリンは UV 吸収スペクトルが特徴的な形状であるため、UV 吸収スペクトル類似度でも同定できたが、特徴的な UV 検出や蛍光検出が困難な化合物は検出自体が困難である。しかし、LC/MS/MS 検出では質量数が明らかな多くの化合物に適用できるという利点も持っている。

以上のように、現在まで UV 吸収や蛍光検出によって行っていた検査についても、今後は LC/MS 検出への移行を検討し、重要な判断基準の一つとして確立していく必要があると思われる。

食品衛生法「食品一般の成分規格」では、食品は合成抗菌剤を含有してはならない、と包括規制されているが、た

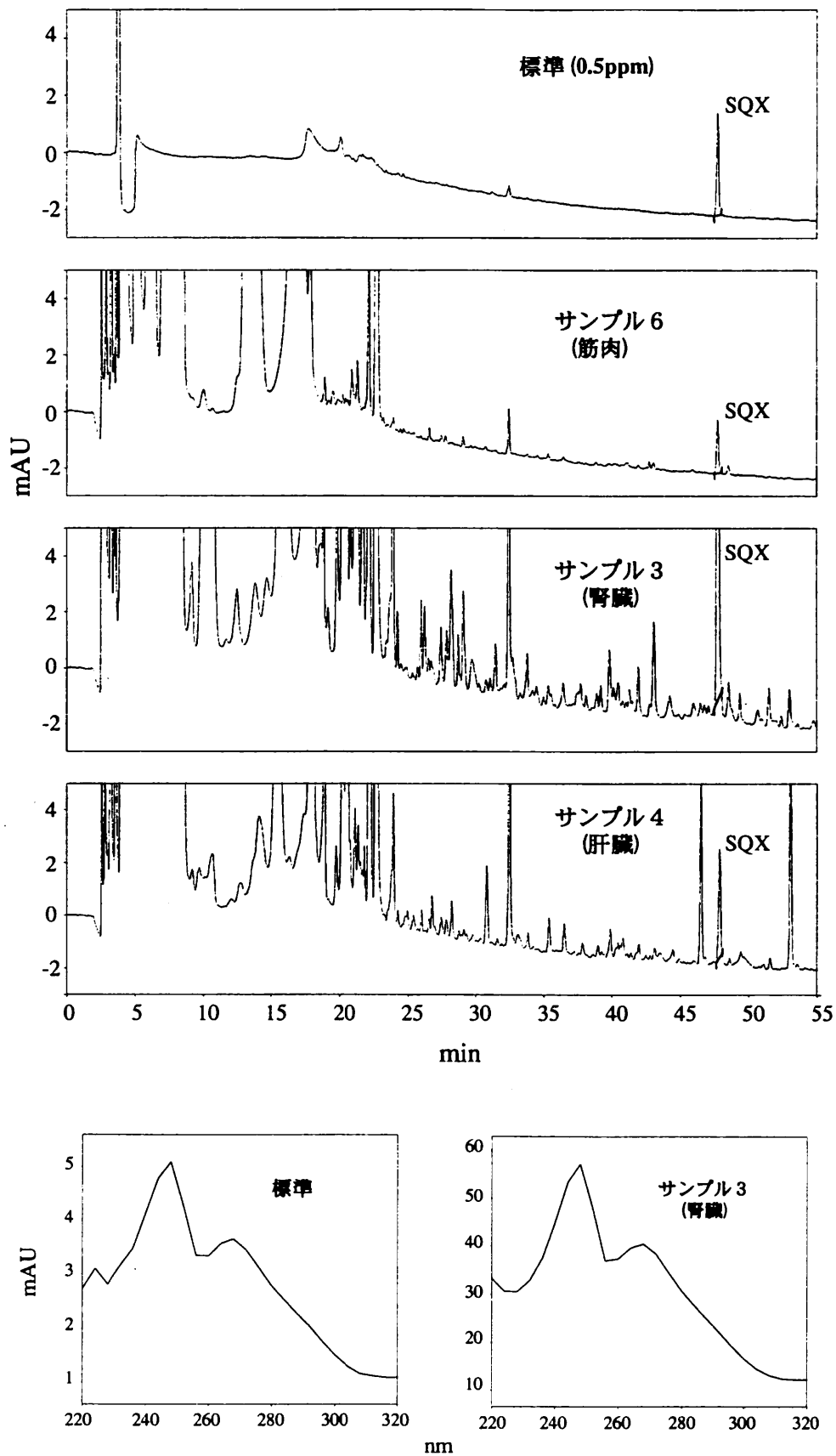


図2 SQX検出例の代表的なUV (270nm) クロマトグラムとUV吸収スペクトル

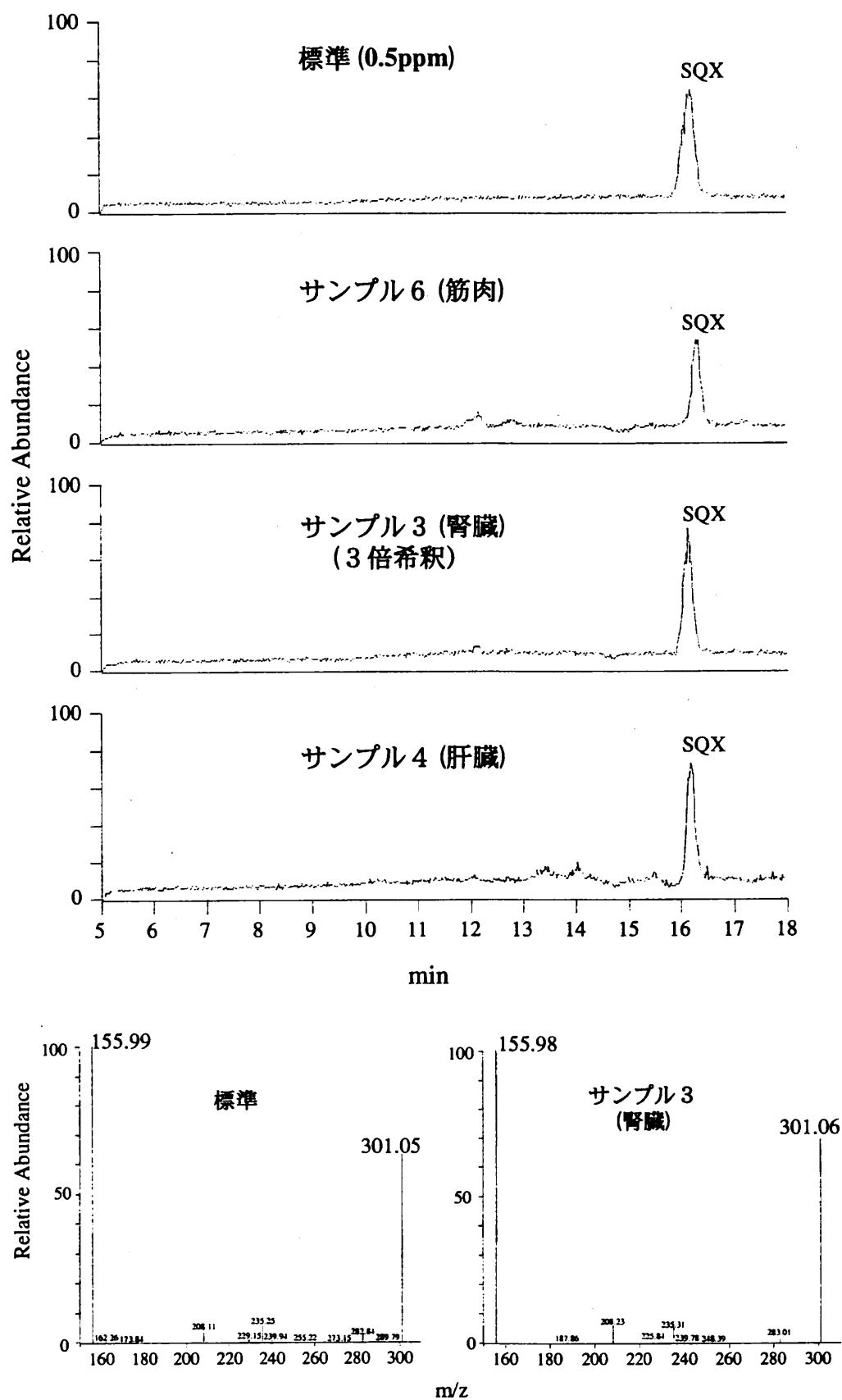


図3 SQX検出例の代表的なLC/MS/MSクロマトグラムとマススペクトル

だし書きにより、その一部の薬剤について残留基準値が設定されている。鶏（筋肉、腎臓、肝臓）においては、合成抗菌剤のうち、スルファジミジン（0.1ppm）、ナイカルバジン（0.2ppm）についてのみ残留基準値が設定されており、スルファキノキサリンについては設定されてない。従って、今回の検査でスルファキノキサリンが検出された検体は、全て食品衛生法第7条2項違反である。これに基づいて調査が行われた結果、これらの鶏肉の収去先は市内の4区、5店舗にわたっていたが、その仕入先は市内食鳥卸売業者に集約された。さらに、遡り調査が行われた結果、以下の事実が判明している。市内食鳥卸売業者に鶏肉を卸していたA県の飼育業者が、当該鶏舎の隣接鶏舎での医薬品の使用を認めており、薬剤の飲水投与に用いるドリンカーバルブの閉め忘れによって、誤って、当該鶏舎群に薬剤が投与されたものと推測された。

IV 参考文献

- 1) 丹羽利充：最新のマスマススペクトロメトリー—生化学・医学への応用—，化学同人，京都（1995）
- 2) 中沢裕之：動物用医薬品データブック，林純薬工業株式会社，大阪（1998）
- 3) (財) 畜産生物科学安全研究所：畜水産食品の薬物残留とその分析法，近代出版，東京（1995）

謝辞

調査に御協力いただいた市内保健所食品衛生係，及び生活衛生課食品衛生係の皆様へ深く感謝します。

エゾボラモドキによるテトラミン食中毒事例について

福本智也¹, 塩見哲生¹, 辻由起¹, 谷口哲彦¹,
新美達也¹, 森田恵一¹, 川上雅弘¹, 井崎やゑ子¹, 森田正和¹

A case of tetramine poisoning by *Neptunea intersculpta*

Tomoya FUKUMOTO, Tetsuo SHIOMI, Yoshiki TSUJI, Tetsuhiko TANIGUCHI,
Tatsuya NIIMI, Keiichi MORITA, Masahiro KAWAKAMI, Yaeko IZAKI, Masakazu MORITA

Key Words : テトラミン tetramethylammonium, エゾボラモドキ *Neptunea intersculpta*

I はじめに

深い寒海に生息するエゾバイ科の巻貝のうち食用になるものは「ツブ貝」と呼ばれ、エゾボラモドキ *Neptunea intersculpta* (図1), ヒメエゾボラ *Neptunea arthritica* などがその代表格である。これらの肉食性巻貝の唾液腺に局在しているテトラミン(tetramethylammonium: 図2)は、食中毒を起こす原因物質となっている¹⁻⁴⁾。唾液腺部分を除去せずに喫食した場合、四級アミンであるテトラミンの薬理学的作用、すなわち、クラール様作用(運動神経末梢麻痺)・副交感神経刺激作用により、数十分後に頭痛・めまい・嘔吐感・めいてい感・眠気を発症する。症状は軽く、数時間で回復する。また、熱に安定であり、調理中に唾液腺から可食部に移行する⁵⁾ことも報告されており、調理前に除去することが最善の予防策といえる。

平成12年4月に京都市内で発生したテトラミン食中毒事件の概要と検査結果について報告するとともに、市場に流通する種々の巻貝におけるテトラミン含有量について調査した結果をあわせて報告する。

II 事件概要

平成12年4月26日、下京区内の病院の医師から「貝を食べた後、めまい・脱力感を訴える患者が2名いる」という届け出が保健所にあった。患者らは、北海道の知人より送られてきた冷凍貝12個をゆで、それぞれ4個及び6個を喫食し、食後30分で上記症状を発症した。残置食の貝は、下京保健所及び中京保健所により搬入された。貝殻は螺旋状に巻いており、殻高は平均100.5mm、殻径は平均50.6mmであった。殻の表面は薄茶色、殻口(開口部)は中心軸に

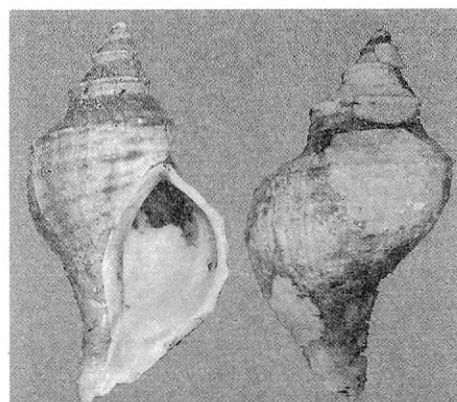


図1 エゾボラモドキ *Neptunea intersculpta*

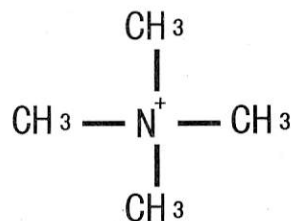


図2 テトラミン構造式

そつてのびており、殻幅の約半分を占める程度に大きく開き、内部は黄色がかった淡い紫色をしている。表面にはとげ状の突起はなく、わずかな線状の突起(「ら肋」と呼ばれる)がらせんの方向に連続している。これらの外観的特徴はエゾボラモドキとよく一致するものであった^{3, 4, 6)}。患者の症状及び貝の外観的特徴から、この事件は「エゾボラモドキを喫食したことによるテトラミン食中毒」と推定された。

¹ 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

Ⅲ 材料と方法

1. 材料

食中毒事件の検査には、残置食として搬入された貝のうち可食部の残っている貝2個を用いた。

巻貝のテトラミン含有量調査には、京都市中央卸売市場第一市場で購入した貝7種類及び一般小売店舗で購入した加工品2種類を用いた。

2. 標準品、試薬

標準品として塩化テトラメチルアンモニウム (tetramethylammonium chloride: ナカライテスク (株) 特級) を蒸留水に溶解して用いた。

テトラミンの発色には、イオン会合性試薬であるテトラブロモフェノールフタレインエチルエステルカリウム (tetrabromophenolphthalein ethyl ether potassium (TBPE·K): ナカライテスク (株) 特級) を用いた。TBPE·K を溶解させた1,2-ジクロロエタン (dichloroethane (DCE): ナカライテスク (株) 特級) と等量の蒸留水 (希塩酸でpH 3に調整) を混合振とうし、DCE 層を TBPE/DCE 溶液とした。

3. 方法

藤井らの方法⁷⁾に準じてテトラミンの抽出・定量を行った。細切した検体からメタノール抽出し濃縮乾固させた後、蒸留水にて溶解させ、水酸化ナトリウム水溶液を加えアルカリ性水溶液とした。TBPE/DCE 溶液と混合振とうし、DCE 層溶液の610nmにおける吸光度を測定した。

Ⅳ 結果及び考察

1. 本食中毒事件の残置食におけるテトラミンの検出

喫食されていなかった貝の可食部を観察したところ、いわゆる「壺焼き」として調理されており、唾液腺は除去されていなかった。患者らは、唾液腺を含め身肉部分を喫食したと推定され、検査に際しては、唾液腺、身肉部分についてテトラミンの定量を行った。その結果は表1のとおりであった。

この結果から、検査を行った貝1個あたりのテトラミンの平均含有量は9.7mgと推定される。喫食量は4個ないし6個であるので、一人あたり40~60mgのテトラミンを

摂取したと推測される。文献により多少異なるがヒトのテトラミン中毒量は10~50mg^{5, 7-10)}とされており、患者らが中毒に至るのに十分な量のテトラミンを摂取したことが推測される。

また、身肉部分からテトラミンが検出されたのは、調理によって唾液腺から移行したことが原因と考えられる。

2. 市場流通貝における調査

一般に肉食性巻貝は、捕食時に対象物を麻痺させるため唾液腺にテトラミンを含有するものが多いことが知られている。今回、京都市中央卸売市場第一市場に流通するエゾボラモドキを含む数種の巻貝についてバックグラウンド値を知る目的でテトラミンの含有量調査を行った。調査に用いた貝からの検出値は表2のとおりであった。

じゅず貝、いそつぶ貝、つのにし貝、ウズラ貝、テングニシからは0.35~2.49mg/個体のテトラミンが検出されたが、多量に喫食しない限り中毒を引き起こさないと考えられる。しかし、エゾボラモドキ、エッチュウバイでは、数個の喫食でテトラミン中毒が発生する可能性が示された。エゾボラモドキの唾液腺 (図3矢印) は小豆粒程度と大きく、その他の貝に比べ唾液腺重量、含有濃度ともに高かった。なお、参考までに市販の串焼き用に加工された貝について定量を行ったところ、ほとんど検出されず、水産加工

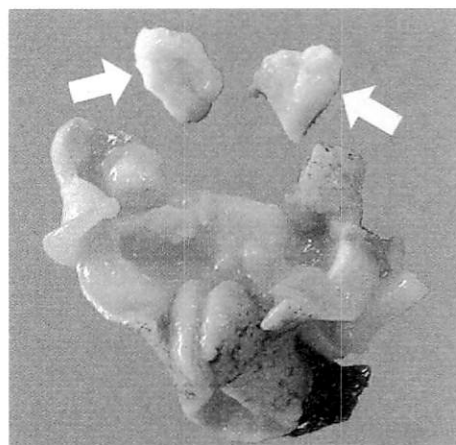


図3 エゾボラモドキ (解剖図)

注) 貝殻からとりだした身を切り開き、唾液腺 (白矢印) を取り出している。唾液腺は、淡黄色、大きさ約1cm。

表1 残置食におけるテトラミン定量結果

	殻高 (mm)	殻径 (mm)	検査部位	重量 (g)	テトラミン濃度 (mg/g)	テトラミン量 (mg)	テトラミン量 (mg/個体)
エゾボラ モドキ1	92	49	唾液腺	0.84	1.50	1.26	
			身肉部分	10.74	0.59	6.34	7.60
エゾボラ モドキ2	110	62	唾液腺	2.69	0.85	2.29	
			身肉部分	25.61	0.37	9.48	11.77

表2 市場流通貝及び貝加工品における調査

品 名	テトラミン量 (mg/個体)
巻貝類	
エゾボラモドキ (n=10)	5.01
エッチュウバイ (n=5)	8.71
つのにし貝 (n=1)	2.49
テングニシ (n=3)	0.96
ウズラ貝 (n=3)	0.66
いそつぶ貝 (n=1)	0.59
じゅず貝 (n=1)	0.35
*参考	
つぶ貝 (串焼用) (n=6)	0.08
ニシ貝 (串焼用) (n=5)	0.03

場などで唾液腺除去等の適正な処理が行われていると思われる。

V おわりに

ツブ貝の産地である東北・北海道では、ツブ貝の毒（テトラミン）についてよく知られており、唾液腺（通称：アブラ）は除去してから調理加工されている。しかし、他の地域ではあまり知られておらず、毎年、家庭内調理を原因として同様のテトラミン食中毒事件が発生している。本事件の原因となった貝を送った北海道の知人は、京都より移住した人であった。そのため「調理前にツブ貝の唾液腺を除去する」という調理上の注意点を知らなかったと思われ、貝を受け取った患者らも知らずに調理・喫食していた。再発防止のためには、ツブ貝の正しい取扱いについての周知が重要であると考えられる。事件後、ツブ貝の処理方法に

関するパンフレットを作製、卸売市場の仲卸業者等に配布し、小売店・購入者に注意喚起するよう指導啓発している。しかし、流通形態の多様化に伴い本食中毒事件のように消費者が食材を産地より直接入手する機会が増え、こういった事件は増加するものと予想される。今後、一般消費者に対する予防知識の提供も必要であると考えられる。

VI 参考文献

- 1) 浅野元一：日本水産学会誌，17，1-5（1952）
- 2) 橋本芳郎：魚介類の毒，学会出版センター
- 3) 辺野喜正夫，他：原色食品衛生図鑑，建帛社
- 4) 菅原龍幸，他：新版原色食品図鑑，建帛社
- 5) 新藤哲也，他：食品衛生学雑誌，41，11-16（2000）
- 6) 吉良哲明：原色日本貝類図鑑，保育社
- 7) 藤井令子，他：食品衛生学雑誌，33，237-240（1992）
- 8) 成田弘子：食品衛生学雑誌，26，549（1985）
- 9) 小林香夫，他：食品衛生学雑誌，31，424-425（1990）
- 10) 八島哲：第8回マリントキシン研究会講演要旨集

謝辞

文献資料等を提供していただいた大阪市立環境科学研究
所衛生分析毒性室 山野哲夫 氏，大阪市中央卸売市場東
部市場食品衛生検査所 川人優 氏に深く感謝いたします。

調査に御協力いただいた中京保健所食品衛生係，下京保
健所食品衛生係及び生活衛生課食品衛生係の皆様にも深く感
謝します。

クレチン症マス・スクリーニングにおけるFT₄値の検討

井本幸子¹, 八木雅代¹, 竹信尚恵¹, 丸岡捷治¹

Study of Free T₄ Measurement in Neonatal Screening for Congenital Hypothyroidism

Sachiko IMOTO, Masayo YAGI, Hisae TAKENOBU, Shoji MARUOKA

Key words : 甲状腺機能低下症 Hypothyroidism, 甲状腺刺激ホルモン Thyroid Stimulating Hormone (TSH), 遊離サイロキシン Free Thyroxine (FT₄)

I はじめに

先天性甲状腺機能低下症は、通称クレチン症といい、甲状腺ホルモンの先天性の欠乏によって起こる疾患である。甲状腺ホルモンは、体内の代謝調節を行う重要なホルモンで、生後数年以内の成長発育に重大な役割を演じ、とりわけ神経系の発達には生後早期に必須であり、これを欠くと修復不能の知能障害をきたす。本症は、早期発見、早期治療することによって、発育障害及び知能障害を予防できることから、昭和52年から厚生省母子保健事業の一環として、全国で、マス・スクリーニングが行われている。

現在、本疾患のマス・スクリーニングにおいては、甲状腺刺激ホルモン(TSH)の測定が実施され、その有用性が認められている。

甲状腺機能の指標となる物質は、TSH 以外にも、総サイロキシン(T₄)、遊離トリヨードサイロニン(FT₃)、遊離サイロキシン (FT₄)などが知られている。下垂体性(二次性)、視床下部性(三次性)甲状腺機能低下症はTSHによって検出できないため、それを補完するFT₄の測定法が開発されており、理想的には両者の併用が望ましいといわれており、FT₄を併用している自治体もある。

今回、スクリーニングの精度を高め、再採血依頼件数を減らすことを目的とし、クレチン症マス・スクリーニングにおけるFT₄値併用の有用性に関する検討を行ったので報告する。

II 方法

1. スクリーニング方法

日齢5の新生児から採取した濾紙血中の甲状腺刺激ホル

モン(TSH)値を指標とし、初回濾紙血中TSH値が30 μ U/ml以上の時は、初検陽性とし、カットオフ値(10 μ U/ml)以上で30 μ U/ml未満の場合は再採血を行った。再採血後のTSH値が10 μ U/ml以上をスクリーニング陽性(以下陽性とする)、10 μ U/ml未満の検体を疑陽性とした。

出生時体重2,000g未満の低出生体重児(未熟児)については、日齢5で初回採血を行い、さらに生後1ヶ月時または体重が2,500gに達した時のうちどちらか早い時点で2度目の採血を行った。

2. 対象

- | | |
|--|------|
| 1) 平成10～12年度の初検陽性検体 | 21件 |
| 2) 平成10～12年度の陽性検体 | 85件 |
| 3) 平成12年度の疑陽性検体 | 75件 |
| 4) 平成12年度の未熟児検体 | 73件 |
| 5) 正常検体(平成12年度初回TSH10 μ U/ml未満のもの) | 141件 |

なお、2)～4)については、初検及び再採血の両者を検体とした。

3. TSH, FT₄測定法

TSHは、ELISA法(エンザプレートN-TSH、バイエルメディカル社)、FT₄は、ELISA法(エンザプレートN-FT₄、バイエルメディカル社)で、それぞれの試薬キットに添付の操作手順に準じて測定を行った。

III 結果及び考察

1. 対象別の平均値と度数分布

各検体におけるTSH, FT₄の平均値 $\pm$ SDを表1に示す。FT₄の平均値は、初検陽性検体、陽性検体(再採血)において低値を示した。疑陽性検体(初検)では、正常検体に比して、低い傾向が見られ、再採血時にはさらに低い傾向を示した。また、未熟児検体(初検)においては、正常検

表 1 各検体のTSH, FT₄値

	指 標	件数	TSH (μ U/mL) 平均値 $\pm$ SD	FT ₄ (ng/mL) 平均値 $\pm$ SD
初検陽性	初回TSH 30 μ U/mL以上	21	70.33 $\pm$ 15.52	1.04 $\pm$ 0.69
陽性	初 検	85	14.44 $\pm$ 4.57	2.17 $\pm$ 0.56
	再採血		19.36 $\pm$ 14.41	1.35 $\pm$ 0.55
疑陽性	初 検	75	12.05 $\pm$ 2.68	2.02 $\pm$ 0.44
	再採血		3.79 $\pm$ 1.73	1.76 $\pm$ 0.27
未熟児	初 検	73	2.44 $\pm$ 2.3	1.73 $\pm$ 0.76
	再採血		2.62 $\pm$ 1.8	1.54 $\pm$ 0.41
正常	初回10未満	141	3.05 $\pm$ 1.88	2.41 $\pm$ 0.54

*P<0.05 有意差有り

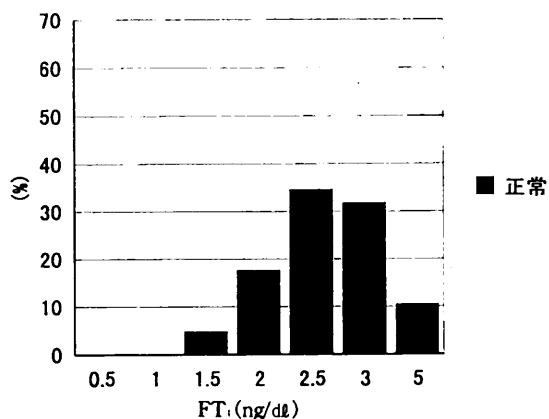


図 1 正常検体の分布

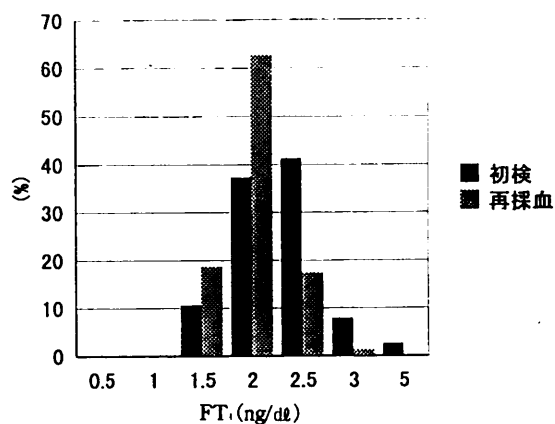


図 2 疑陽性検体の分布

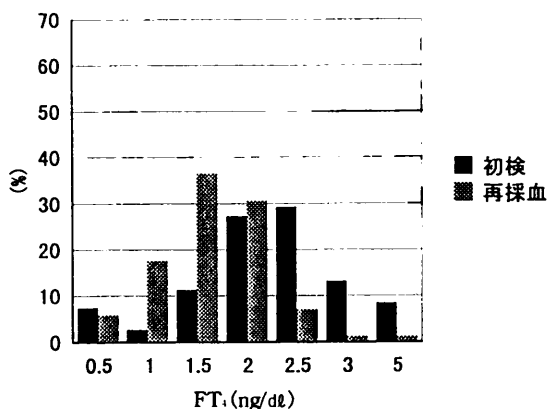


図 3 陽性検体の分布

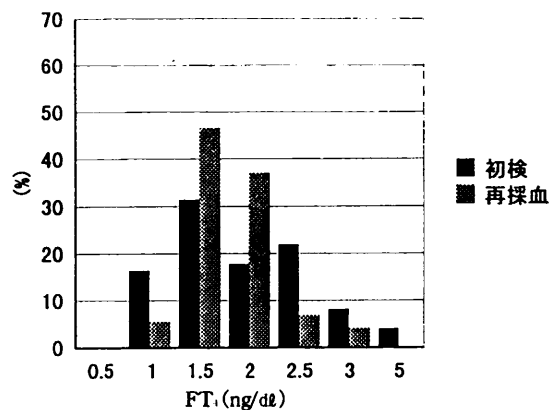


図 4 未熟児検体の分布

体に比して低い傾向がみられ、再採血時には、さらに低い傾向を示した。

正常検体、疑陽性検体、陽性検体の FT₄度数分布を図 1～3 に示す。

正常検体では、2.5 をピークとする分布が得られ、疑陽性検体（初検）は、正常検体より低値の 2～2.5 をピークとする分布を示した。陽性検体（初検）においても、2～2.5 をピークとする分布となり、疑陽性との度数分布に差が見られず、両者の区別は難しいことが示された。また、

陽性検体では、1 以下の分布が見られた。

再採血では、疑陽性群は、2 をピークとした分布となり、陽性群は、1.5～2 をピークとし、ともに初検よりも低値に移行した分布を示した。

未熟児検体の FT₄度数分布を図 4 に示す。

初検では、正常検体と同じ 2.5 と低値の 1.5 との二峰性のピークが見られ、再採血検体では、1.5～2 をピークとする分布を示した。

2. 要治療群及び経過観察群の比較

陽性検体のうち、当所で精検結果が入ってきた検体について解析を行った。

要治療または経過観察と診断された検体の TSH 及び FT₄ の平均値 ± SD を表 2 に示す。

表 2 要治療、経過観察検体の TSH, FT₄ 値

	件数	TSH (μU/mL) 平均値 ± SD	FT ₄ (ng/dL) 平均値 ± SD
要治療 初 検	12	45.92 ± 31.13	1.45 ± 0.97
再採血	6	39.17 ± 22.59	0.83 ± 0.60
経過観察 初 検	18	15.22 ± 5.05	2.32 ± 0.38
再採血	18	14.78 ± 7.21	1.50 ± 0.32

**P<0.01 有意差有り

要治療群において、経過観察群と比較して、TSH は高く、FT₄ は有意に低い傾向が見られ、再採血時には、さらに低くなる傾向が見られた。

要治療群の検体内訳は、先天性甲状腺機能低下症 4 件、甲状腺機能低下症 5 件及びクレチン症 3 件であり、経過観察群は、一過性高 TSH 血症 14 件、高 TSH 血症 3 件、甲状腺機能低下症 1 件であった。

要治療群、経過観察群における TSH, FT₄ の相関を図 5, 6 に示す。

要治療群 (18 件) において、 $r=0.839$ の相関が得られ、TSH が増加するにつれ、FT₄ が低下する傾向が見られた。

このうち再採血分 (6 件) についてみると、FT₄ は初検時には 1.2~3.3 の値を示したが、再採血時には 1 件を除き 1 以下を示した。

また、初検陽性検体 (6 件) の FT₄ は 1 件を除きすべて 1 以下を示した。

経過観察群 (36 件) では、相関は得られず、TSH は 10~40 μU/mL, FT₄ は 0.8~3.2 ng/dL の範囲であった。

また、FT₄ の値は初検時は 1.5 以上で、再採血時は 1 件を除き、1 以上の値を示した。

3. 未熟児群について

在胎週数 28~40 週の未熟児検体において、在胎週数による TSH を図 7-1, 7-2, FT₄ を図 8-1, 8-2 に示す。

初検では、在胎週数が短くなるにつれ、TSH は高く、FT₄ は低くなる傾向が見られた。胎児の血中 TSH 濃度は、妊娠 20~30 週で最高値を示し、FT₄ は、妊娠中期以降、上昇を示すことが知られており、今回、未熟児初検検体においても同じ様な傾向が見られた。

再採血検体では、ともに平坦な分布が見られ、在胎週数による影響は見られなかった。

4. 初回 FT₄ 値による分類

FT₄ 値により 3 分類した群別の、初回 FT₄ 平均値及び各

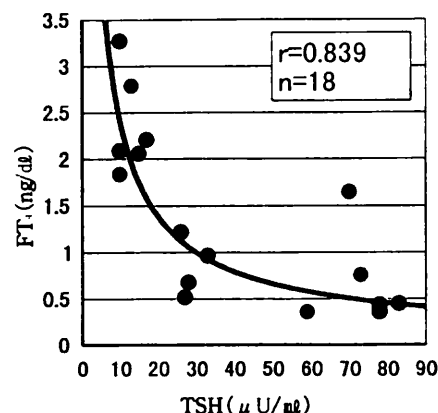


図 5 TSH と FT₄ の相関 (要治療)

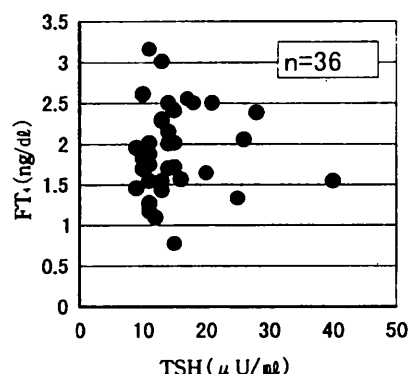


図 6 TSH と FT₄ の相関 (経過観察)

表 3 初回 FT₄ 値による検体内訳

初回 FT ₄ 値 (ng/dL)	平均値 ± SD	内 訳	件数	%
1 未満	0.64 ± 0.24	陽 性 疑陽性 未熟児 正 常 合 計	11 (10) 0 11 0 22	50.0 0.0 50.0 0.0
1 以上 1.5 未満	1.27 ± 0.16	陽 性 疑陽性 未熟児 正 常 合 計	12 (4) 8 24 7 51	23.5 15.7 47.1 13.7
1.5 以上	2.31 ± 0.51	陽 性 疑陽性 未熟児 正 常 合 計	83 (7) 67 38 134 322	25.8 20.8 11.8 41.6

() 初検陽性数

検体の内訳を表 3 に示した。

一般に FT₄ スクリーニング陽性とされている 1.0 ng/dL 未満の群では、正常群、疑陽性群 0%, 未熟児群 50%, 陽性

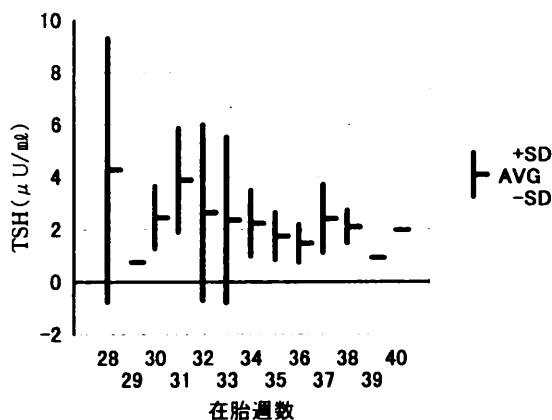


図 7-1 在胎週数とTSH (初検)

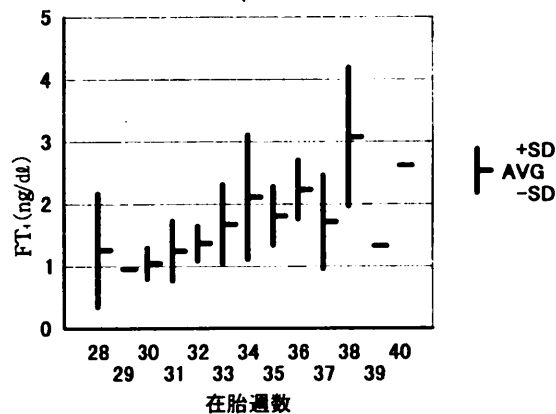


図 8-1 在胎週数とFT4 (初検)

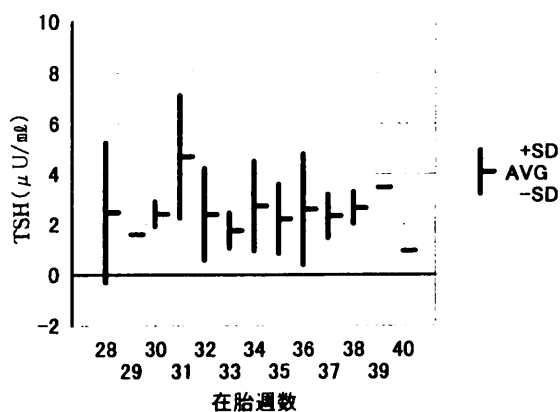


図 7-2 在胎週数とTSH (再採血)

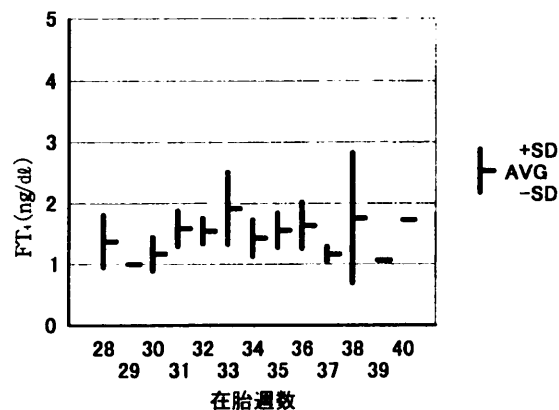


図 8-2 在胎週数とFT4 (再採血)

群50%となり、スクリーニング陽性率が非常に高いことが示された。FT₄値が1ng/dL未満の場合には早急な対応が必要であり、再採血を行わずに精密検査に出すことも可能であると思われたが、11件のうち10件が初検陽性であり、再採血率は軽減されないことが示された。

IV まとめ

TSH 高値検体において FT₄ 値を併用することにより、より確実な判定が可能となり、検査結果の精度向上と、結果判定の迅速化に役立つものと思われた。

また、初検から使用すると、下垂体性、視床下部性甲状腺機能低下症の発見が可能であり、見逃しの防止に役立て

ることも可能である。

しかし、再採血率を減らすことは困難であり、今後、疑陽性の原因のひとつとして、さい帯が取れた後の消毒剤として使用されるイソジンなどのヨード剤の影響もあげられていることから、さらに検討を行い、再採血率を軽減できるよう努めていきたい。

V 参考文献

- 1) 鈴木恵美子他：医学と薬学，25，1577-1583(1991)
- 2) 丸尾猛他：ホルモンと臨床，47，1-9(1999)
- 3) 原淳他：日本マス・スクリーニング学会誌，10(2)，60(2000)

餅つき大会における食中毒事件について

原田保¹, 伊藤千恵¹, 米田昌裕¹, 山野親逸¹, 丸岡捷治¹

A case of food poisoning at a rice-cake making party

Tamotsu HARADA, Chie ITO, Masahiro KOMEDA, Chikaitsu YAMANO, Shoji MARUOKA

Key words : 小型球形ウイルス SRSV, 逆転写酵素反応 RT-PCR, 酵素免疫測定法 ELISA

I はじめに

平成12年12月に、北区のT小学校において実施された餅つき大会で調理提供された餅を原因食品とする小型球形ウイルス (Small Round Structured Virus : SRSV) による大規模な食中毒が発生した。

II 期間及び対象

平成12年12月5日から12日までに有症者便および食品などの169検体について細菌性食中毒菌の検査を実施し、そのうち130検体について SRSV の検査を行った。130件の内訳は患者便111, 食材4, 器具拭き取り13, 水, 吐物各1件であった。

III 検査方法

食中毒原因細菌については食品衛生検査指針に準じた方法で、SRSV については 厚生省検査マニュアルに準じて RT-PCR 法¹ 及び一部の検体は国立感染症研究所ウイルス

第二部から供与された NLV 検出キット (研究用) を用いて ELISA 法を行った。

IV 検査結果

SRSV は患者便111検体中29検体 (26.1%) が陽性で、全て NLV II 型であった。なお、RT-PCR 法及び ELISA 法ともに型は同じであった。

細菌では、黄色ブドウ球菌が患者便112検体中22検体 (19.6%), その他食材から8検体, 器具の拭き取り3検体から分離された。また、セレウス菌も食材1検体から分離された (表1)。

原因菌として、黄色ブドウ球菌は発症状況 (平均潜伏時間32時間, 発熱等) 及びコアグラゼ型や毒素型が多様であることにより考えにくい (表2)。一方 SRSV については、主症状が吐き気, 嘔吐, 下痢等であること及び潜伏時間が24~72時間 (平均38時間) と一致していることから、原因因子と断定された。

表1 検査結果 (陽性数)

	細菌検査			SRSV検査	
	検体数	黄色ブドウ球菌	セレウス菌	検体数	SRSV (NLV II)
患者便	112	22		111	29
食材	14	8	1	4	
器具拭き取り	40	3		13	
水	2			1	
吐物	1			1	
合計	169	33	1	130	29

¹ 京都市衛生公害研究所 臨床部門

表 2 黄色ブドウ球菌陽性数

		患者自然便	食材	器具拭き取り
コアグラーゼⅠ型	エンテロトキシン陰性	3		
	エンテロトキシンC型	1		
コアグラーゼⅡ型	エンテロトキシン陰性	1		
	エンテロトキシンC型	1		
コアグラーゼⅢ型	エンテロトキシン陰性	2		
	エンテロトキシンA・D型		1	3
コアグラーゼⅣ型	エンテロトキシンA型	1		
コアグラーゼⅤ型	エンテロトキシン陰性	3		
	エンテロトキシンC型		3	
コアグラーゼⅦ型	エンテロトキシン陰性	2	1	
	エンテロトキシンB型	2	1	
コアグラーゼⅧ型	エンテロトキシン陰性		2	
コアグラーゼ型不明	エンテロトキシン陰性	4		
	エンテロトキシンC型	2		
合計		22	8	3

V 考察

SRSV は冬季、カキの生食により発症することが多く報告されているが、他都市においても今回のような餅による食中毒が報告されていることから、今後も喫食状況や患者の症状、潜伏時間等を考慮して、ウイルスによる食中毒事例も念頭において検査に取りかかる必要があると考えられる。

VI 文献

- 1) 国立感染症研究所編：ウイルス性下痢症診断マニュアル（第1版），18 - 23（1999）

低脂肪乳などを原因とする食中毒について

原田保¹, 伊藤千恵¹, 米田昌裕¹, 山野親逸¹, 丸岡捷治¹

A case of food poisoning caused by low-fat milks and others

Tamotsu HARADA, Chie ITO, Masahiro KOMEDA, Chikaitsu YAMANO, Shoji MARUOKA

Key words : 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*, ポリメラーゼ連鎖反応 PCR, ラテックス凝集法 latex agglutination

I はじめに

平成12年6月, Y(株)大阪工場で製造された低脂肪乳などを原因とする黄色ブドウ球菌(エンテロトキシンA型)による大規模な食中毒(有症者数14,780名)が発生し,本市においても同工場で製造された低脂肪乳を飲用したため,嘔吐,下痢などの症状を呈する患者が発生する事態となった。

当初,食中毒原因究明のため,食中毒菌及び有害物質(農薬,重金属など)の検査を臨床及び生活衛生両部門において実施したが,特に原因と考えられる菌,農薬などは検出されなかった。

しかし,6月30日に和歌山市衛生研究所において黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンA型の遺伝子が,次いで7月2日に大阪府公衆衛生研究所において同菌のエンテロトキシン自体が検出され,この事件について黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンA型が原因である可能性が高くなった。

そこで,本研究においても低脂肪乳を始め,乳・乳製品からの黄色ブドウ球菌エンテロトキシン及び遺伝子について検出を試みたので,その結果について報告する。

II 期間及び対象

平成12年6月29日から7月10日までに各保健所から検査依頼のあった63検体(低脂肪乳,患者便など)を対象に検査を行った。これらの検体のうち,低脂肪乳などの乳・乳製品19検体については,エンテロトキシンA型及び遺伝子の検査を行った。

III 検査方法

1. 食中毒原因細菌については,通常通り,食品衛生検査指針に準じた方法で行った。

2. 検体からのエンテロトキシン抽出は,大阪府公衆衛生研究所の方法に準じて行った。

なお,抽出に関しては,生活衛生部門が担当した。

3. エンテロトキシンの検出は,ラテックス法(デンカ生研の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット)によった。

4. 黄色ブドウ球菌からのエンテロトキシン遺伝子の検出法は,和歌山市衛生研究所の方法を参考にし,キアゲン社のQIAmp DNA Blood Mini Kitを用いて,検体からのDNA抽出を行った。

エンテロトキシン遺伝子の検出はPCR法(宝酒造の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子用プライマーセットを使用)によった。

IV 検査結果

1. 食中毒原因細菌の検査結果は表1のとおりである。

食材からは,黄色ブドウ球菌は検出されなかった。また,患者便からは,黄色ブドウ球菌が8件検出されたが,エンテロトキシンA型は検出されなかった。

表1 検査結果(陽性数)

	検体数	<i>S. enteritidis</i>	EPEC	<i>S. aureus</i>
患者自然便	3	1	0	1
患者直採便	39	0	7	7
食 材	20	0	0	0
吐 物	1	0	0	0
合 計	63	1	7	8

2. 乳・乳製品における黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA型及び遺伝子の検査結果は,表2の通りである。

大阪工場で作られた低脂肪乳9件から,黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA型の遺伝子が検出された。また,このうち7件からエンテロトキシンが検出された。

¹ 京都市衛生公害研究所 臨床部門

表2 検査結果（毒素及び毒素遺伝子）

商品名	製造所(固有記号)	賞味期限	毒素遺伝子	毒素
低脂肪乳	AHE	00. 6. 30	検出	検出
低脂肪乳	AHE	00. 6. 30	不検出	不検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 1	検出	不検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 2	検出	検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 2	検出	検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 2	検出	検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 2	検出	検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 3	検出	検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 3	検出	検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 4	検出	不検出
低脂肪乳	AHE	00. 7. 5	不検出	不検出
牛乳	AHE	00. 7. 1	不検出	不検出
コーヒー	AHE	00. 6. 24	未検査	不検出
牛乳	AHMKN	00. 6. 26	不検出	不検出
低脂肪乳	AHMTA	00. 6. 30	不検出	不検出
低脂肪乳	AHMKE	00. 7. 1	不検出	不検出
低脂肪乳	AHMR2	00. 7. 4	不検出	不検出
牛乳	AHMKY	00. 7. 4	不検出	不検出
カルパワー	神戸工場	不明	不検出	不検出

注) 製造所(固有記号)AHEは大阪工場を示す

V 考察

黄色ブドウ球菌の検査では、菌を分離同定した後、分離菌を用いてラテックス凝集法による毒素の検査が行われる。通常、毒素は充分産生されるため、毒素の精製、濃縮の操作を必要としない。しかし、本事件においては、製造工程中の高温殺菌及び毒素が低濃度であったことなどにより、通常の方法では毒素を検出することが出来なかった。

今回の事件では、検体からの毒素精製、濃縮について、生活衛生部門の協力を得て、本市でも原因物質が黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンA型であることが速やかに確認できた。今後とも複雑で大規模な食中毒事件に備え、部門間の協力体制が必要と考えられる。

豚枝肉の衛生評価

小野寺佳隆¹, 野波正浩¹, 田邊輝雄¹, 眞方敏行¹, 藤井三郎¹

Survey of bacterial contamination in swine carcasses

Yoshitaka ONODERA, Masahiro NONAMI, Teruo TANABE, Toshiyuki MAGATA, Saburo FUJII

Key words : 豚 swine, 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, より衛生的なと畜解体処理が求められるようになった。豚などの小動物については平成14年4月1日から完全施行されるが, この政省令の改正に対応して, 京都市と畜場においても, 温湯による消毒槽設置などの施設改善工事が行われた。そこで, 施設改善後における豚枝肉の衛生状態を把握するため, 細菌検査を行ったのでその結果を報告する。

II 調査方法

1. 調査期間: 平成12年6月～11月
2. 検査項目: 一般生菌数, 大腸菌群数
3. 検体の採取及び検査方法

<解体作業工程>

生体検査→電撃→放血→と体自動洗浄→内臓摘出前処理(ナイフ剥き): 左側肛門周囲部及び左側胸部の剥皮→懸吊→内臓摘出→左側腹～肋部・両後肢剥皮(デハイダー剥き)→頭部切断→残りの部位の剥皮(縦式スキナー)→横隔膜除去→枝肉検査→背割り→整形→枝肉自動洗浄→冷蔵庫入庫

検体採取は, 表1のとおり, 内臓摘出前処理(以下前処理)後, 枝肉検査ポジション(以下枝肉検査P)及び水洗後冷蔵庫入庫前(以下洗浄後)にて, 左側肛門周囲部(以下尻部), 左側胸部(以下胸部), 左側腹～肋部(以下肋部), 及び左側腰部(以下腰部)の枝肉各部位表面を100cm²拭き取った。検査方法は食品衛生検査指針¹⁾に従い, 一般生菌数は標準寒天培地を, 大腸菌群数についてはデシキコーレイト寒天培地を用い, 混釈培養法により定量した。

表1 検体採取について

解体作業工程段階	採取部位	剥皮方法
内臓摘出前処理	肛門周囲部	ナイフ手剥き
	左胸部	ナイフ手剥き
枝肉検査ポジション	肛門周囲部	ナイフ手剥き
	左胸部	ナイフ手剥き
	左腹～肋部	デハイダー剥き
	腰部	大型スキナー剥き
仕上げ洗浄後	肛門周囲部	ナイフ手剥き
	左胸部	ナイフ手剥き

III 結果及び考察

一般生菌数及び大腸菌群数の測定結果は表2に示すとおりである。

作業レーン工程別の「同一部位・経時的菌数の変化」は, 尻部及び胸部の,

前処理→枝肉検査P→洗浄後
それぞれのデータで検討した。結果は, 図1のとおりである。洗浄後においては, 一般生菌数と大腸菌群数ともに, 大幅な菌数の減少が認められた。また, 作業工程が進むと, 尻部の菌数より胸部の菌数が多くなる傾向が見られた。これは, と体が後肢側を上・頭部側を下にして吊り下げられており, 現場での蒸気や洗浄水などの水分により, 菌が下へ流されていく結果と考えられる。算術平均においても, 幾何平均と同様の傾向が見られるが, いずれも洗浄後には高い洗浄効果が認められた。

剥皮方法による菌数の値は, 枝肉検査Pでの菌数比較より, 図2のように, 予想どおり,
スキナー(腰部) < デハイダー(肋部) < ナイフ(尻・胸部)

¹ 京都市衛生公害研究所 病理部門

表2 各部位における結果

		生菌数				大腸菌群数			
		幾何平均	最大値	最小値	中央値	幾何平均	最大値	最小値	中央値
前処理	尻部	1,399	110,000	17	1,200	0.18	16	0	0
	胸部	785	21,000	4	1,100	0.63	37	0	2
枝肉P	尻部	1,338	41,000	92	815	1.28	500	0	1
	胸部	1,888	30,000	130	1,450	1.98	220	0	3
	腰部	138	2,400	0	275	0.36	16	0	0
	肋部	676	29,000	12	585	1.03	31	0	2
洗浄後	尻部	44	270	7	53	0.19	21	0	0
	胸部	672	13,000	110	570	1.28	28	0	2

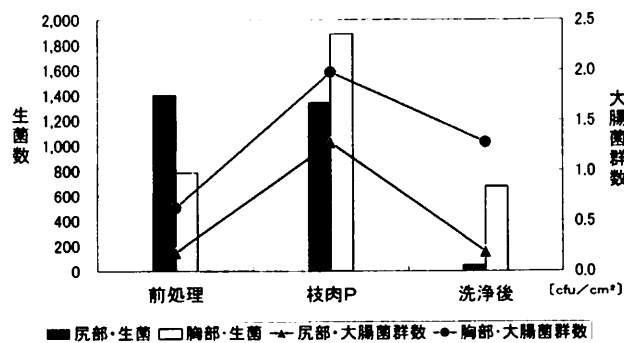


図1 作業工程による菌数の変化

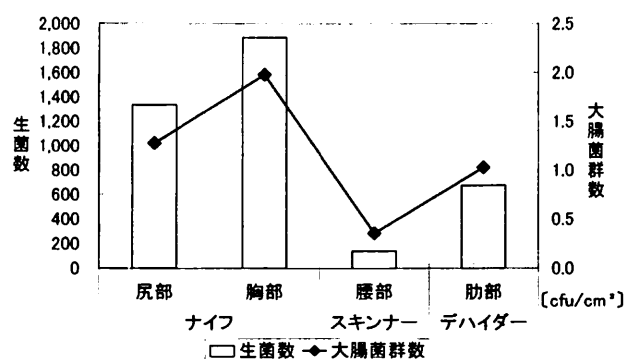


図2 剥皮方法別にみた菌数の比較

という順に菌数の増加・汚染が認められた。

これは、それぞれの部位が、剥皮されてから検体が採取されるまでの時間とも比例しており、その間に前後の枝肉同士の接触や、作業員の接触機会が増えることが一つの要因といえる。比較的、値の低かった大型剥皮機縦式スキナーは、1頭毎に接触部分が自動洗浄され、さらに腰部への接触機会が、ごく限られているために、最も低い菌数だったといえる。最も高い数値のナイフ剥きは、内臓摘出時に接触もしくは腸内容物による汚染、と体同士の接触などの機会が多くなること、1頭毎のナイフ消毒の不徹底などの影響が大きいと思われる。このことは、表2の前処理で

の大腸菌群数・最大値からも推測することができる。

さらに今回のデータから、洗浄後の胸部・一般生菌数において、「500cfu 個/cm²」で区切り、[500 超]・[500 以下]での互いの幾何平均値を比較し、表3及び図3に示した。その結果、[500 以下]のものは、他の工程・部位でも、おおむね[500 超]のものを下回った。このことから、仕上げ段階で、より「キレイな」枝肉にするため、作業工程でも、より一層の汚染防止を心掛ける必要がある。このことを検査員も再認識して、現場作業員にも指導し、より衛生的な解体作業に取り組んでいけるよう努力したい。

表3 幾何平均値での比較

		500 以下	500 超
前処理	尻部	1,424.0	1,346.7
	胸部	297.2	2,948.3
枝肉P	尻部	982.8	1,258.4
	胸部	1,207.6	2,848.6
	腰部	42.9	422.4
	肋部	350.8	1,229.0
洗浄後	尻部	28.6	53.9
	胸部	293.6	1,608.4

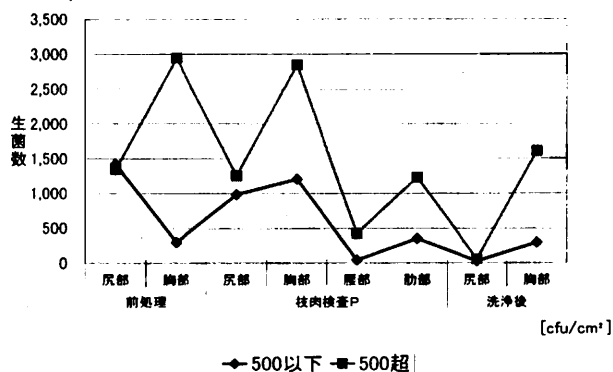


図3 洗浄後の差による検証

また、平成 6 年度に行った、ライン改善前の旧・豚解体ラインでの調査データ²⁾と比較した。仕上げ洗浄後・冷蔵庫前での豚枝肉の大腿部と頸部で拭き取ったデータであり、若干の部位の違いはあるが、それぞれを尻部と胸部で比較

し、表 4 に示した。

このことより、ライン改善により、衛生的作業は向上していると言える。これからも最大値を極力下げようとし、枝肉等の衛生管理に努力していきたい。

表 4 新・旧ラインの比較

	12 年度・新ライン		6 年度・旧ライン	
一般生菌数	尻部	39 (6.5 ~ 270)	大腿部	1,600 (37 ~ 21,000)
	胸部	687 (110 ~ 13,000)	頸部	1,800 (71 ~ 16,000)
大腸菌群数	尻部	0.09 (0 ~ 21)	大腿部	3.3 (0 ~ 27)
	胸部	1.02 (0 ~ 28)	頸部	4.2 (0 ~ 27)

[cfu個/cm² : ()内は範囲]

IV 文献

1) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 微生物編、70 - 88, (社) 日本食品衛生協会 (1990)

2) 京都市衛生公害研究所病理部門：同研究所年報、No. 61, 93 - 95 (1995)

河川水中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシル分析における抽出法の検討

中川和子¹, 吉川俊一¹, 橋本和平¹

Extraction method for the analysis of di(2-ethylhexyl) phthalate in river waters

Kazuko NAKAGAWA, Shunichi YOSHIKAWA, Kazuhei HASHIMOTO

Key words : フタル酸ジ-2-エチルヘキシル di(2-ethylhexyl) phthalate (PDEH), 抽出法 extraction method, 遠心分離 centrifugal separation, 浮遊固形物 suspended solid

I はじめに

外因性内分泌攪乱化学物質として危惧されているフタル酸エステル類は、塩化ビニル樹脂、メタクリル酸樹脂などと良好に相溶性があるため、プラスチックの可塑剤として使用されている。

特にその中でも、1999年環境省が行った外因性内分泌攪乱化学物質実態調査結果¹⁾で検出割合の高かったフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (以下略 PDEH) の分析法について、検討を行ったので報告する。

PDEH の分析法として、現在暫定マニュアル²⁾が作成されている。また、剣持³⁾も PDEH の測定条件について検討している。

これは試水を n-ヘキサンで抽出する方法であるが、抽出時間、攪拌時間、攪拌速度などが確定したものではなく、抽出時間も長い。試料によってはエマルジョンの形成により、後の操作が困難になる例もある。

そこで今回、簡便でかつ満足のできる回収率が得られる抽出法について検討した。

サンで希釈して使用。

フタル酸エステル類測定用水(住友精密工業製): ブランク水として使用(以下ブランク水)。

塩化ナトリウム: 試薬特級(700℃ 8 時間加熱後デシケーターで放冷後ガラス瓶にて密閉保存)

無水硫酸ナトリウム: 林純薬工業製 PCB 測定用(700℃ 8 時間加熱後デシケーターで放冷後ガラス瓶にて密閉保存)

溶媒: アセトン, n-ヘキサン(ナカライ製残留農薬分析用)

3. 器具及び装置

遠心分離機にかけられる透明すり共栓付100ml フラスコを作成した (Fig. 1)。

使用する器具は全てアセトン, n-ヘキサンの洗浄後、200℃で2時間乾熱した。

ガスクロマトグラフ: 島津製作所製 GC-17A

質量分析計: 島津製作所製 QO-5000

振とう機: ミヤモトリケン社製シェイカー

遠心分離機: Hitachi Automatic Refrigerate Centrifuge

II 方法

1. 試料 河川水 (有栖川にて採水)

2. 試薬

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(ジーエルサイエンス社製): n-ヘキサンで1,000 μ g/mlにしたものを n-ヘキサンで希釈して使用。

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d4(関東化学社製環境分析用試薬): n-ヘキサンで1,000 μ g/mlにしたものをアセトンで希釈して使用。

内部標準物質: フルオランテン-d10(関東化学社製環境分析用試薬): n-ヘキサンで1,000 μ g/mlにしたものを n-ヘキ

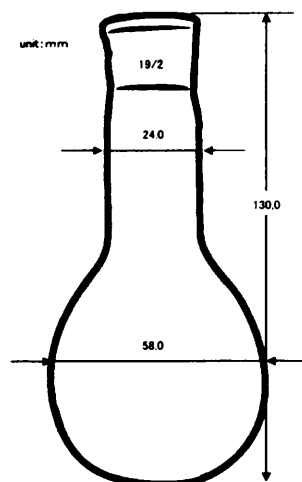


Fig.1 The flask fits for centrifugal separator

¹ 京都市衛生公害研究所 環境部門

4. GC/MS 分析条件

分析はフルオランテン-d10を内部標準物質に用い SIM 法で定量をした。

選択マスナンバー

PDEH: 149 (定量用); 179, 279 (確認用)

フルオランテン-d10: 212

PDEH-d4: 153

分析条件は Table 1 に示した。

Table. 1 GC/MS operating condition

GC Column	DB-5 (J&W)	30m×0.25mm×φ0.25μm
Carrier Gas	He	
Flow rate	20ml/min	
Oven Temp.	50°C (2min) -10°C/min-270°C (10min)	
Inj. Mode.	Splitless	
Inj. Vol.	1μl	
Inj. Temp.	250°C	
Interface Temp.	280°C	
Ionization	E I	70 e V

5. 分析方法

テフロン栓つき抽出フラスコに試水を90ml 採取し、塩化ナトリウム15g, n-ヘキサン2.5ml を加え10分間振とう後、そのままの状態です5分間2,500rpm 遠心分離を行い、パスツールピペットで n-ヘキサン層を採取し、バイアルビンに入れる。テフロン栓付着物を少量の n-ヘキサンで洗う。再び n-ヘキサンを2 ml 入れ、同様に抽出し、全ての n-ヘキサン層を合わせる。n-ヘキサン溶液にミクロスパーテル1 杯分の無水硫酸ナトリウム、及びフルオランテン-d10溶液 (絶対量で0.5μg) を加え、窒素ガスを吹き付け1 ml まで濃縮し、GC/MS で測定する。

分析フローチャートを Fig. 2 に示した。

III 結果と考察

1. 暫定マニュアル²⁾によれば、開封直後の n-ヘキサンを使用することになっているが、検討の結果、毎回そうする必要はなく、汚染の有無を調べた上で使用しても差し支えなかった。

2. テフロン栓使用時のブランク値はガラス栓の場合と差異は無く、検出限界以下であった。

3. 振とう抽出時間

10分、30分と振とうを行った結果、両時間ともに回収率94%と変わらず、振とう時間を10分とした。

4. 回収率

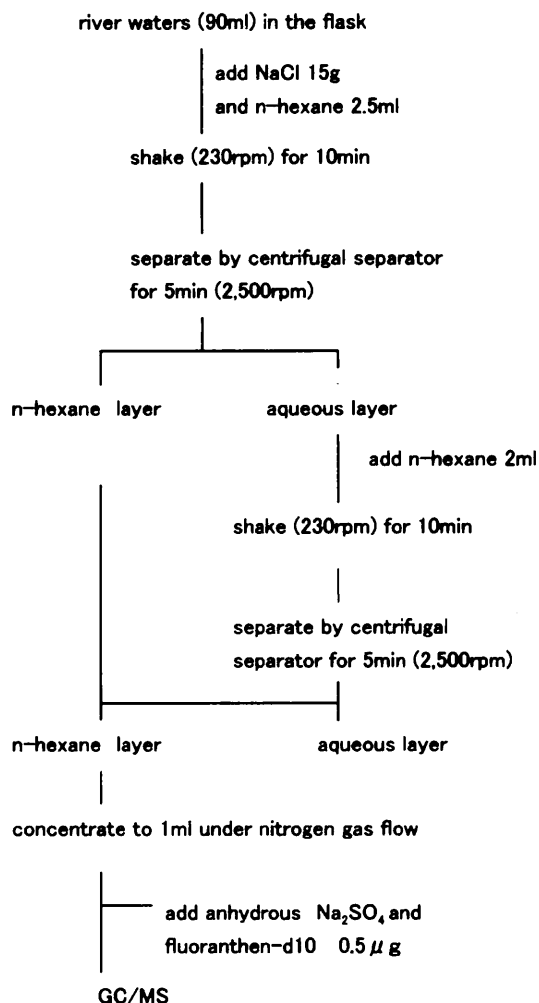


Fig. 2 Analytical procedure for di(2-ethylhexyl) phthalate in river waters

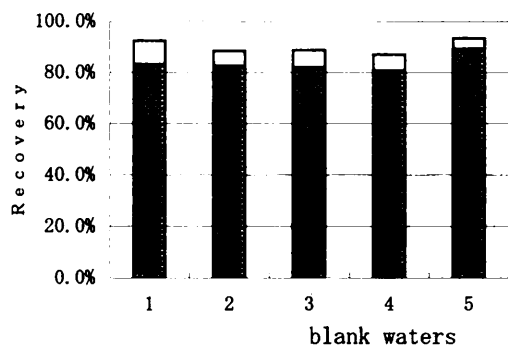
フタル酸エステル類測定用水に PDEH を0.4μg添加、抽出し、2回の n-ヘキサン抽出物をそれぞれについて測定した。そのときの回収率を Fig. 3 に示す。合計回収率は、88~93%と良好であった。

河川水 (有栖川) も同様に添加回収実験を行ったが、サンプル自体 PDEH を含んでおり、正確な回収率が求めにくいため、PDEH-d4を1μg添加し、回収率を求めた。

そのときの合計回収率の結果を Fig. 4 に示す。回収率は、88~100%と良好な結果であった。

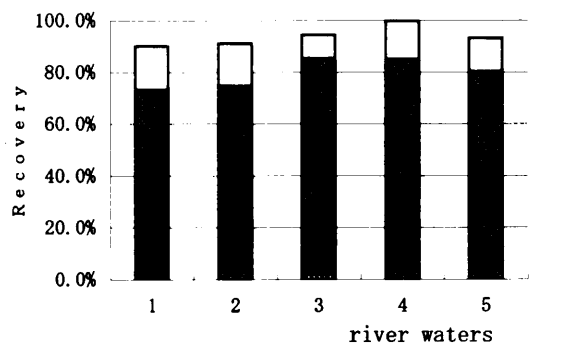
2回目の抽出により、添加した PDEH は、5~10%、PDEH-d4は、10~20%回収され、2回の抽出は必要であると考えられた。ブランク値は検出限界未満であった。

なお、本法による定量限界値は0.33μg/l、検出限界値は0.09μg/lであった。



90.0 ± 0.02% (mean ± S. D)

Fig. 3 Percent recoveries of PDEH from blank waters



93.7 ± 0.33% (mean ± S. D)

Fig. 4 Percent recoveries of PDEH-d4 from river waters

5. コンタミネーションについて

PDEH 分析における最大の注意点は室内汚染によるコンタミネーションであるといわれている。

現在, PDEH 抽出時に使用している実験台の25×25cm²部分を n-ヘキサンで湿らせた脱脂綿でふき取り分析したところ, 5.63 μg/100cm²の PDEH が検出された。

実験台の材質中に PDEH が含まれていた可能性もあるが, 機器室のストーンテーブルからも0.57 μg/100cm²の PDEH が検出された。

また, 分析に使用するゴム製安全ピペッター, ゴム手袋からも検出された。

6. 河川試料中の浮遊固形物への PDEH 吸着について

Fig. 5 には河川水試料を浮遊固形物と上澄み部分に分離して, それぞれに含まれる PDEH を測定した結果を示した。分離は2,500rpm で5分間遠心分離して行なった。

その結果, 河川水試料中で, 浮遊固形物質分画に含まれる PDEH の割合がかなり高いことがわかった (上澄中の約2倍)。暫定マニュアル²⁾では試料水を採水瓶に満水に

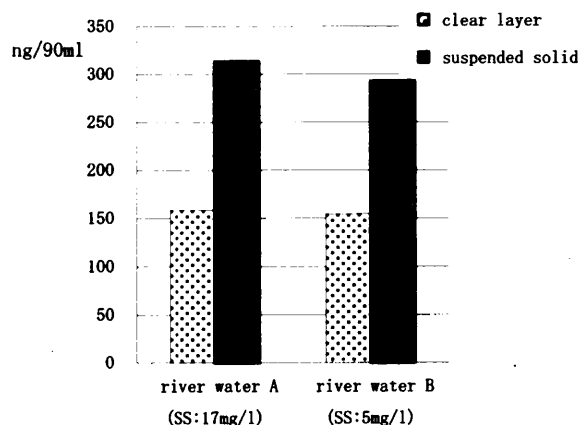


Fig. 5 The amounts of PDEH contained in the clear layer and in the suspended solid fractionated from river water samples, along with the concentration of suspended solid (SS) in the samples.

して密栓し, かつ分析操作時の空気接触をなるべく避けることとされているが, 上記の結果から分析試料のフラスコへの採取時には, 特に試料の均一性に充分注意する必要がある。

IV まとめ

河川水中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシル抽出の検討を行った。

遠心分離機にかけることができる特製フラスコで抽出操作を行うことにより, エマルジョンの生成による妨害を受けずに n-ヘキサン層をほとんど採取できるようになった。

さらに10分の振とう抽出を2回繰り返すことにより河川水で PDEH の回収率88%~100%と良好に抽出された。

PDEH の分析は, 室内塵, 試薬, 器具などから汚染されやすいが, 実験台も用途にかかわらず汚染されていることがわかり, 細心の注意が必要である。

分析試料をフラスコに採取する際に, 採水瓶中の河川水の一部を捨て, 十分な量の空隙層をとり, それを窒素ガスで置換後, 均一になるように振とうする必要がある。

V 文献

- 1) 環境庁: 水環境中の内分泌攪乱化学物質実体調査 (1999)
- 2) 環境庁: 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアルIV-1~IV-10 (1998)
- 3) 剣持堅志: 岡山県環境保険センター HPC ニュース Vol 3 (1999)

京都市衛生公害研究所年報
第 67 号

発行日	平成 13 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、古紙配合率100%、白色度70の再生紙を使用しています。)

