

ISSN 0386-3476

k381

昭和63年度

愛媛県立衛生研究所年報

第 50 号



Annual Report
of
Ehime Prefectural Institute of Public Health

愛媛県立衛生研究所

目 次

I 研究報告	
セレウス菌の性状	1
愛媛県における毒素原性大腸菌の侵淫調査	5
結核病床における抗酸菌患者の動向	11
モノクローナル抗体による腸管アデノウイルスの検出	15
小児のウイルス性胃腸炎の免疫学的研究	21
血清中遊離H L A抗原の分子性状	27
愛媛県における骨髄移植の現況とドナープールの適正規模の推定	31
A T Lの疫学調査	37
愛媛県内主要河川の水質特性について	41
異臭味地下水における油様成分の分析について	51
精油定量器を用いた食品中の残留農薬分析	55
パーティ用玩具中のシュウ酸定量法の検討	61
II 資 料	
昭和63年度集団食中毒および下痢症報告	65
昭和63年度伝染病流行予測調査	66
愛媛県特定流行性疾患調査成績	70
昭和63年度先天性代謝異常検査成績	73
昭和63年度神経芽細胞腫検査成績	73
愛媛県産野菜・果実等の残留農薬分析調査成績(県行政検査)	74
昭和63年度食品添加物使用実態調査(県行政検査)	75
主要食品の食物繊維量測定に関する研究	76
昭和63年度鉱泉分析成績	77
昭和63年度松くい虫防除薬剤空中散布に伴う調査について(県行政検査)	79
昭和63年度理化学試験精度管理実施結果	80
III 抄 録	
他誌発表論文	81
学会発表	84
IV 公衆衛生技術研究集会(第3回)	91
V 機構および業務概要	97
VI 業務実績	
1 微生物病理部の概要	101
2 衛生試験部の概要	105
VII 技術研修指導, 研究発表の状況	107

セレウス菌の性状

矢野玲子^{*1} 鍋屋孝司^{*2} 齊藤 健 井上博雄

Characterization of Isolated Strains of *Bacillus cereus*

Reiko YANO, Takashi NABEYA, Tuyoshi SAITO, Hiroo INOUE

One hundred and twenty-two strains of *B. cereus* isolated from either various kind of foods or the healthy stools were tested for biochemical characteristics, drug and heat sensitivity as well as toxin producing capacity.

The results were summarized as follows:

- 1) In biochemical characteristics, there was a significant difference of positive rates of nitrate reduction, Simmons citrates and acid formation from salicin between food-originated (F-0) strains and stool-originated (S-0) strains.
- 2) S-0 strains were significantly more resistant than F-0 strains to tetracycline.
- 3) Both 67.9% of F-0 strains and 56.3% of S-0 strains were heat resistant at 100°C for 15 min.
- 4) 93.2% of F-0 strains and 85.4% of S-0 strains were able to produce verotoxin, which showed mouse lethality at 61.5% of F-0 strains and 69.2% of S-0 strains respectively.

Keywords : *Bacillus cereus*, biochemical characteristics, verotoxin

はじめに

セレウス菌は、ヒトおよび生活環境の農作物、河川、山野などに広く分布し、腐敗細菌として知られている。そのため、一般の食品などにおいて、セレウス菌に汚染されていることが多く報告¹⁻³⁾されてきた。われわれが、前報⁴⁾で報告した、検出状況においても、穀類、魚介類、複合調理食品、とうふ、牛乳など、各種食品から32.9%と高率に検出された。その他にも、集団給食従事者のふん便から13.6%セレウス菌が検出された。

一方、セレウス菌食中毒は、潜伏期間が8~16時間で下痢を主徴とする「下痢型」と潜伏期間が1~5時間で嘔吐を主徴とする「嘔吐型」の2種の型に分けられ、別の毒素であると考えられている。

今回、セレウス菌の性状から、生化学的性状検査、薬剤感受性試験、耐熱性試験、細胞障害試験、マウス致死試験を行ったので報告する。

材料および方法

1. 材料

1987年4月から1988年10月までの間、魚介類、肉類、冷凍食品、複合調理食品、穀類、とうふ、牛乳など、各種食品から分離した74株と、同時期に集団給食従事者の糞便から分離した48株を対象とした。

2. 生化学的性状検査

村上ら⁶⁾、寺山ら⁷⁾の同定方法に基づき、溶血性、カタラーゼ、ゼラチン液化、7% NaCl 発育、インドール反応、VP反応、運動性、ブドウ糖の発酵、炭水化物の分解(マンニット、アラビノース、キシロース、白糖、サリシン)、シモンズのクエン酸塩、クリステンゼンのクエン酸塩、デンプン分解、硝酸塩還元、尿素分解、エスクリン、DNase 産生を行った。

*1 現愛媛県今治中央保健所

*2 現愛媛県立医療技術短期大学

3. 薬剤感受性試験

供試薬剤はアンピシリン、カルベニシリン、ペニシリン、セファロチン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、トリメトプリムースルファメトキサゾール、ナリジクス酸の12剤のBBLセンシディスクを用い、Kriby - Bauer 法により行い、それぞれに形成される阻止円の直径を測定し、感受性測定判定表に従って判定した。

4. 耐熱性試験

ポテトデキストロース寒天培地で30℃ 7日間培養し芽胞形成を確認の後、芽胞数 $10^7/ml$ となるよう菌液を調整し、浮遊液1mlを100℃15分、100℃30分、各々加熱後、2倍濃度の普通ブイヨン1mlを加えて、30℃、24~72時間培養し、耐熱性の有無を判定した。

5. 細胞障害試験

ブレインハートインヒュジョンブイヨンで30℃、5~7時間振盪培養後、遠心分離し、上清をミリポアフィルター(0.45 μ)でろ過後、ろ液とVero細胞浮遊液($5 \times 10^4/ml$)を1:9に調整し、37℃一晩CO₂インキュベートし、顕微鏡下で細胞の変成をみた。また、ろ液を56℃、5分間加熱したものについても、同様に行った。

6. マウス致死試験

細胞障害試験でVerotoxin産生のみられたろ液の中から食品由来13株、糞便由来13株をマウスの腹腔内に0.5mlずつ投与し、マウスの生死をみた。

結果および考察

1. 生化学的性状検査

食品および糞便由来株の生化学的性状は表1のとおりであった。さらに、生化学的性状の有意差検定を行った結果、硝酸塩還元0.01%以下、サリシン分解1%以下、シモンズのクエン酸塩利用5%以下の危険率で有意差がみられた。

また有意差のみられた、硝酸塩還元、シモンズのクエン酸塩、サリシン分解の3つの生化学的性状で分類を試みた(表2)。由来による差をみると、硝酸塩還元陽性、シモンズのクエン酸塩陽性、サリシン分解陽性のパターンと硝酸塩還元陰性、シモンズのクエン酸塩陰性、サリシン分解陰性のパターンが糞便由来に多くみられ、硝酸塩還元陽性、シモンズのクエン酸塩陰性、サリシン分解陰性のパターンが食品由来に多くみられた。

表1 食品および糞便由来株の生化学的性状

性 状	食 品 n=74		糞 便 n=48	
	陽 性 (%)	陰 性	陽 性 (%)	陰 性
溶 血 性	74	0	48	0
カタラーゼ	74	0	48	0
ゼラチン液化	74	0	48	0
7% NaCl発育	74	0	48	0
インドール反応	0	74	0	48
V P 反応	74	0	48	0
運動性	74	0	48	0
ブドウ糖の発酵	74	0	48	0
炭水化物				
マンニット	0	74	0	48
アラビノース	0	74	0	48
キシロース	0	74	0	48
白 糖	38 (51.4)	36	19 (39.6)	29
サリシン	18 (24.3)	56	23 (47.9)**	25
シモンズのクエン酸塩	10 (13.5)	64	15 (31.3)*	33
クリステンゼンのクエン酸塩	54 (73.0)	20	41 (85.4)	7
デンプン分解	27 (36.5)	47	12 (25.0)	36
硝酸塩還元	61 (82.4)	13	23 (47.9)***	25
尿素	3 (4.1)	71	1 (2.1)	47
エスクエン	30 (40.5)	44	24 (50.0)	24
D N a s e	54 (73.0)	20	31 (64.6)	17

P: * 5%以下 ** 1%以下 *** 0.01%以下

表2 食品および糞便由来株の生化学的性状の差

生化学的性状			食 品	糞 便
硝 酸 塩 還元	シモンズのクエン酸塩	サリシン	(%)	(%)
+	+	+	0 (0)	5 (10.4)
+	+	-	10 (13.5)	5 (10.4)
+	-	+	9 (12.2)	3 (6.3)
+	-	-	42 (56.8)	10 (20.8)
-	+	+	1 (1.4)	5 (10.4)
-	+	-	0 (0)	0 (0)
-	-	+	8 (10.8)	10 (20.8)
-	-	-	4 (5.4)	10 (20.8)
計			74	48

表3 食品および糞便由来株の薬剤感受性試験

化学療法剤 抗生物質	薬剤含有量 (μ g)	食 品 n=74 耐 性 (%)	糞 便 n=48 耐 性 (%)
Ampicilin	10	73 (98.8)	45 (94.8)
Carbenicillin	100	72 (97.3)	44 (91.7)
Penicillin	10	74 (100.0)	48 (100.0)
Cephalotin	30	72 (97.3)	44 (91.7)
Kanamycin	30	0 (0)	3 (6.3)
Gentamicin	10	0 (0)	0 (0)
Streptomycin	10	1 (1.4)	0 (0)
Erythromycin	15	0 (0)	2 (4.2)
Tetracycline	30	2 (4.2)	7 (14.6)
Chloramphenicol	30	0 (0)	0 (0)
Trimethoprin	1.25/23.75	0 (0)	0 (0)
-sulfamethoxazol			
Nalidixic acid	30	1 (1.4)	1 (2.1)

表4 食品および糞便由来株の耐熱性試験

加熱条件	食 品 n=74		糞 便 n=48	
	陽性	(%)	陽性	(%)
100℃ 15分	48	(64.9)	27	(56.3)
100℃ 30分	33	(44.6)	14	(29.2)

2. 薬剤感受性試験

表3に示すとおり、アンピシリン、カルベニシリン、ペニシリン、セファロチンは食品由来、糞便由来ともに耐性であった。カナマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、ナリジクス酸はともに感受性を示した。特に、テトラサイクリンでは、糞便由来が食品由来よりも多く耐性がみられた。しかし、牛乳や肉類など食品別による差はみられなかった。

3. 耐熱性試験

セレウス菌が食品衛生上問題となるには、本菌が自然界に広く分布すること、本菌の芽胞が示す強い耐熱性のため、調理加熱によっても死滅せず、芽胞の形成で残留し、その後、発芽増殖に適した環境に放置されると、しばしば食中毒の原因となる。Gilbertらは100℃、D値1.2~7.5分と高い温度での耐熱性を報告している⁸⁾。今回、われわれの結果でも表4に示すとおり100℃、15分では食品由来64.9%、糞便由来56.3%、100℃、30分では食品由来44.6%、糞便由来29.2%が耐熱性を示した。

表5 食品および糞便由来株の細胞障害試験

	食 品 n=74		糞 便 n=48	
	陽性	(%)	陽性	(%)
Verotoxin (処理なし)	69	(93.2)	41	(85.4)
Verotoxin (56℃ 5分加熱)	0	(0)	0	(0)

表6 Verotoxin 産生株のマウス致死試験

	食 品 n=13		糞 便 n=13	
	陽性	(%)	陽性	(%)
マウス致死	8	(61.5)	9	(69.2)

4. 細胞障害試験

セレウス菌による食中毒では「嘔吐型」と「下痢型」の毒素を産生することが報告されている⁵⁾。そこで、今回、毒素原性大腸菌、コレラ菌のエンテロトキシン検出に用いられる細胞障害試験を用いて、本菌のエンテロトキシンを測定した。表5に示す結果では食品および糞便由来株のろ液で、Verotoxin 産生がみられたのは、食品由来株93.2%、糞便由来株85.4%であった。また、56℃、5分加熱したものは、毒素の失活がみられた。

5. マウス致死試験

植村らは⁹⁾、セレウス菌のマウス致死毒は、血液透過性因子およびエンテロトキシンと同一物質であると報告している。今回、Verotoxin 産生の食品、糞便由来各々13株のろ液を用いて、マウス致死試験を行った。食品由来株では61.5%、糞便由来株では69.2%にマウス致死がみられた(表6)。

まとめ

1. 食品由来株と糞便由来株において、硝酸塩還元、シモンズのクエン酸塩、サリシンの分解の3つの生化学的性状の陽性率で有意差がみられた。

2. テトラサイクリンで食品由来株と糞便由来株で耐性の差がみられた。

3. 100℃、15分では、食品由来株64.9%、糞便由来株56.3%と高い耐熱性を示した。

4. Verotoxin 産生株は、食品由来株93.2%、糞便由来株85.4%であった。

5. Verotoxin産生株のうち、食品由来株61.5%(8/13)、糞便由来株69.2%(9/13)がマウス致死を示した。

本論文の要旨は、第58回日本感染症学会西日本地方会総会(島根)で発表した。

文献

- 1) 楠淳他：東京衛研年報，28, 11~14 (1977)
- 2) 寺山武他：食衛誌 19, 98~104 (1978)
- 3) 神保勝彦他：東京衛研年報，29, 158~162 (1978)
- 4) 矢野玲子他：愛媛衛研年報，49, 1~4 (1987)
- 5) 坂井千三：食中毒Ⅱ(坂崎利一編)，353~363
- 6) 村上一：モダンメディア，23, 1~10 (1978)
- 7) 寺山武：検査と技術，8, 1007~1012 (1980)
- 8) Gilbert, R.J. : J. Hyg., 73, 433~438 (1974)
- 9) 植村興他：日本細菌学雑誌，39, 791~801 (1984)

愛媛県における毒素原性大腸菌の侵淫調査

鍋屋孝司^{*1} 矢野玲子^{*2} 斉藤 健 井上博雄

Epidemiological Survey on Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Ehime Prefecture

Takashi NABEYA, Reiko YANO, Tuyoshi SAITO, Hiroo INOUE

Isolation of enteropathogenic bacteria was attempted from diarrheal stools 118 overseas travellers stools of 813 healthy peoples and 79 water samples of rivers or wells.

Various enteropathogenic bacteria were isolated from 45.8% of the cases examined.

The species of bacteria isolated were as follows: enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), 14.4%; *Salmonella*, 11.9%; *Campylobacter jejuni*, 7.6%; enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), 7.6%; *Shigella*, 5.9% and *Vibrio parahaemolyticus*, 63.4%.

These ETEC showed both toxin production and positive agglutination reaction on either hydrophobicity or HA test.

On the other hand, 7 strains of *E. coli* were isolated from healthy people stools (3 strains) and water samples (4 strains), which carried the same serotype as ETEC.

However, the 7 strains produced neither heat-stable enterotoxin (ST) nor heat-labile enterotoxin (LT). Moreover, no agglutination reaction were observed on either hydrophobicity or HA test.

Keywords: Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Traveller's diarrhoea, Epidemiological survey

はじめに

大腸菌は、ヒトの腸管内正常細菌叢を構成する菌種の一つであるが、ある種の大腸菌はヒトに対して下痢や腸炎を起こすことが知られている。その原因となる大腸菌は、病原大腸菌と呼ばれ、現在その病原性、発生機序の違いから組織侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *Escherichia coli*: EIEC)、毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC)、病原性大腸菌 (Enteropathogenic *Escherichia coli*: EPEC) の三つのカテゴリーに区分¹⁾されている。

特にETECは、東南アジアを中心に世界中に広く分布していることが明らかになっており、汚染地域への旅行者下痢症の主要な原因菌²⁾として注目されてい

る。わが国においても、近年海外旅行者下痢患者から多くのETECが分離³⁾されている。また1983年1月から1986年5月までの全国集団食中毒発生事例⁴⁾をみても、病原大腸菌による集団発生例が54件みられ、なかでもETECによるものが34件 (63.0%) と多く、その原因としても、長野県の例⁵⁾をはじめ井戸水等による水系感染が多くみられる。本県においても、1988年N市内のマンションでEPEC、ETECにより汚染された飲料水が原因による集団発生がみられた。

そこで我々は、本県におけるETECの侵淫状況を知らため今回、海外旅行者下痢患者、健康者の糞便、河川水からETECの検出を試み検討したので報告する。

*1 現愛媛県立医療技術短期大学

*2 現愛媛県今治中央保健所

材料および方法

1. 検査対象

海外旅行者糞便は、1982年7月から1988年6月までの間、コレラ汚染地区およびその周辺諸国を旅行後下痢を呈した118検体を用いた。健康者の糞便は1988年5月から9月の間、給食従事者、食品取扱者及び短期大学生813検体、河川水は1988年5月から9月の間、H川、17か所から採取した51検体、また井戸水は1988年3月から10月の間、細菌検査依頼のあった中で大腸菌群が検出された28検体を用いた。

2. 検査方法

(1) 糞便からの病原菌検出方法

糞便はCary-Blair培地あるいはグリセリン保存液に採取したものをを用いた。糞便からの病原菌検索は、コレラ菌、赤痢菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、NAGビブリオ、カンピロバクター、病原大腸菌等を対象に、常法に準じて行った。増菌培養は、アルカリ性ペプトン水、セレンイト培地を用い、分離培地としては、SS寒天培地、DHL寒天培地、TCBS寒天培地、Skirrow培地を用いた。

(2) 毒素原性大腸菌の検出法

検出方法は、図1に示した、採取した糞便は、直接DHL寒天培地に塗抹し36℃、18~20時間培養を行った。DHL寒天培地に発育した乳糖分解集落は、CFA寒天培地に釣菌し、36℃、18~20時間培養後、本田ら⁶⁾のhydrophobicity-test (salting-out法) およびEvansら⁷⁾の方法に準じて、ウシ、ヒトの赤血球凝集試験を行った。さらに、それと並行して診断用免疫血清により血清型および生化学的性状試験を常法に準じて行った。hydrophobicity、赤血球凝集能および血清型別により毒素原性大腸菌が疑われた菌株は、耐熱性毒素(ST)、易熱性毒素(LT)の産生試験を行った。河川および井戸水は、50mlをBGLB培地で36℃、46~48時間培養し、ガスの発生が見られたものを糞便同様検査を行った。

(3) ST, LT産生試験

ST産生については、菌株をCAYE培地で36℃、20~24時間振とう培養を行い遠心上清を生後2~4日のddY系乳飲みマウスを用いて経口投与を行い3時間後に開腹し、腸管内の液体貯留程度をfluid accumulation (FA) 比を算出して0.09以上を陽性とした⁸⁾。LT産生についてはFlek変法⁹⁾および、逆受身ラテックス凝集反応(VET-RPLA生研)により行った。

(4) 薬剤感受性試験

検出された菌株の薬剤感受性は、Ampicillin (ABPC), Chloramphenicol (CP), Tetracycline (TC), Streptomycin (SM), Kanamycin (KM) の5剤について、Muller-Hinton II 培地を用いた一濃度ディスク法(センシディスク)により行った。

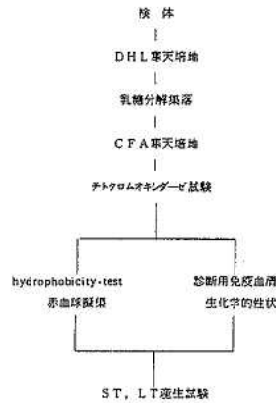


図1 毒素原性大腸菌の検査方法

表1 愛媛県における海外旅行者下痢患者からの病原菌検出状況

検査件数	118*
病原菌陽性者数	54 (45.8)
ETEC	17 (14.4)
サルモネラ	14 (11.9)
EPEC	9 (7.6)
カンピロバクター	9 (7.6)
赤痢菌	7 (5.9)
腸炎ビブリオ	4 (3.4)
コレラ菌	0 (0)
NAGビブリオ	0 (0)

* 1982年7月~1988年6月

表2 海外旅行下痢患者から検出された毒素原性大腸菌の毒素産生型および血清型

血清型 ¹⁾	毒素産生型			計
	ST-LT	ST	LT	
O6:K15	1			1
O25:K1		2		2
O27:K*		1		1
O126:K71		3		3
O148:K*		3		3
O UT ²⁾	1	5	1	7
計	2	14	1	17

1) 診断用免疫血清により型別

2) UT: untypable

結果

本県における海外旅行下痢患者 118 名からの病原菌検出状況を表 1 に示した。海外旅行下痢患者のうち 54 名 (45.8%) から病原菌が検出された。菌種別にみると、ETEC が最も多く 17 株 (14.4%)、次いでサルモネラ 14 株 (11.9%)、カンピロバクター 9 株 (7.6%)、EPEC 9 株 (7.6%)、赤痢菌 7 株 (5.9%)、腸炎ビブリオ 4 株 (3.4%) の順に検出された。次に、検出された ETEC 17 株の毒素型および血清型による分類を表 2 に示した。毒素型でみると ST 産生型が 14 株と最も多く、ST-LT 両産生型が 2 株、LT 産生型が 1 株みられた。さらに、血清型でみると O 148:K+ および O 126:K71 が 3 株、O-25:K+ が 2 株、O27:K+ および O 6:K15 が 1 株、診断用免疫血清では型別できなかった大腸菌が 7 株みられた。

健康者の糞便 823 検体、河川水 51 検体および井戸水 28 検体からの ETEC の検出状況を表 3 に示した。健

表 3 健康者糞便、河川水および井戸水からの毒素原性大腸菌検出状況

検体名	検出件数 検査件数 (%)	血清型 ¹⁾	毒素産生試験		
			ST	LT	STLT
健康者糞便	813 3 (0.4)	O 6:K15	N ²⁾	N	
		O 6:K15	N	N	
		O 27:K+	N	N	
河川水	51 2 (3.9)	O 6:K15	N	N	
		O 148:K+	N	N	
井戸水	28 2 (7.1)	O 6:K15	N	N	
		O 27:K+	N	N	

1) 診断用免疫血清に凝集反応がみられた株
2) N: not detected

表 4 毒素原性大腸菌の hydrophobicity および赤血球凝集能と毒素産生

検体名	試験 菌数	hydrophobicity のみられた菌株 ¹⁾	赤血球凝集の のみられた菌株 ²⁾	1)か2)に凝集反 応がみられた菌株	毒素産生が みられた菌株
海外旅行下痢患者糞便	17	15	16	17	17
健康者糞便	3	0	0	0	0
河川水	2	0	0	0	0
井戸水	2	0	0	0	0

1) 1.0M の (NH₄)₂SO₄ 溶液に凝集のみられたもの
2) ヒトあるいはウシ 0.5% 赤血球溶液に凝集のみられたもの

表 5 毒素原性大腸菌の薬剤感受性試験成績

検体名	試験 菌数	耐 性 菌 数 (%)	C					単剤耐性菌		多剤耐性菌							
			T	A	S	K	計	T	S	A	計	C	T	S	C	計	
海外旅行下痢患者糞便	17	16 (94.1)	6	12	3	12	1	3	2	1	6	4	1	3	1	1	10
健康者糞便	3	1 (33.3)	1	1	1	1											1
河川水	2	1 (50.0)					1	1	1								
井戸水	2	0															

C: Chloramphenicol T: Tetracycline A: Ampicillin
S: Streptomycin K: Kanamycin

健康者の糞便から3株がETEC該当診断用免疫血清に凝集がみられた。血清型の内訳はO 6:K 15が2株、O 27:K +が1株であった。しかし、毒素産生(ST, LT)を示した株はみられなかった。河川水および井戸水からETEC該当診断用免疫血清に凝集がみられた株は、河川水2株、井戸水2株であった。血清型でみると河川水では、O 148:K +が1株、O 6:K 15が1株であった。また井戸水では、O 6:K 15が1株、O 27:K +が1株であった。しかし、毒素産生を示した株は健康者の糞便同様みられなかった。

海外旅行下痢患者から検出されたETECと健康者の糞便、河川水および井戸水から検出されたETEC診断用免疫血清に凝集を示したが、毒素産生のみられなかった株のhydrophobicityおよび赤血球凝集能について表4に、薬剤感受性試験成績を表5に示した。hydrophobicityまたは赤血球凝集能がみられた株は、海外旅行者から検出された毒素産生株のみであった。次に薬剤感受性試験成績についてみると、海外旅行下痢患者から検出された17株のうち16株(94.1%)に供試5薬剤のいずれかに耐性がみられた。供試薬剤別の耐性出現率をみると、TC(70.6%)、SM(70.6%)、CP(35.3%)、ABPC(17.6%)、KM(5.9%)の順に高く、2剤以上に耐性の多剤耐性菌も耐性株のうち58.8%にみられた。しかし、健康者糞便、河川水および井戸水から検出された株では、健康者糞便から多剤耐性菌1株、河川水からSM耐性菌1株みられたのみであった。

考 察

ETECは、主として東南アジア、中南米およびアフリカにおいて旅行者下痢症の原因菌として極めて重要であることが明らかになっている²⁾。また開発途上国ばかりではなく、先進諸国においてもその分離が相次いで報告されており、今では世界中に広く分布しているものと考えられている¹⁰⁾。わが国においても、主として東南アジアへの旅行者下痢症の原因菌³⁾や食中毒および集団・散発下痢症の原因菌として報告^{11,12)}され注目されている。

本県における過去6年間、海外旅行者下痢患者から検出された原因菌では、病原大腸菌が約半数を占めており、その中でもETECが高率に検出された。この結果は、宮田ら¹³⁾、山田ら¹⁴⁾による海外旅行者下痢原因菌検索と同様であり、本県においても病原大腸菌、特にETECは、海外旅行者により持ち込まれる輸入感染症として重要であると思われる。

ETECの健康保菌者、河川水および井戸水における侵淫調査では、診断用免疫血清に凝集を示した大腸菌は検出されたが、毒素産生は全くみられなかった。

ETECの発症機序については、Evansら¹⁵⁾により定着因子の関与が報告されており、また診断法の一つとしても検討されている¹⁶⁾。近年、既知の定着因子を有する菌は、常に高いhydrophobicityおよび各種動物の赤血球を凝集する能力を有することが明らかにされている¹⁶⁾。そこで、今回海外旅行者より検出された毒素産生菌また健康者糞便、河川水および井戸水より分離された毒素非産生菌についてhydrophobicityあるいは赤血球凝集能についてみると、これらは毒素産生菌にのみみられた。したがって、同じ血清型の大腸菌であっても、毒素産生を支配するEnt-プラスミッドおよび定着因子を有する菌と有しない菌が存在しそれらを有するものが病原性を有するものと思われた。次に、薬剤感受性についてみると海外旅行下痢患者から検出されたETECは、94.1%にTC, SM, CP, ABPC, KMのいずれかに耐性がみられた。しかし、健康者糞便、河川水および井戸水から検出された菌では耐性がみられたのは28.6%にすぎなかった。

ETECはSTまたはLT毒素を産生する大腸菌であり、今回の調査では健康者糞便、河川水および井戸水からは検出されなかった。しかし、今後も海外旅行者によりETECが、県内に持ち込まれるケースが増加するものと予想され、二次汚染による感染が懸念される。1988年には、N市内のマンションにおいて地下水汚染によるETECおよびEPECによる集団下痢症の発生がみられており、今後も引き続き海外旅行による下痢患者、集団・散発下痢患者および環境中から本菌の検出を系統的に実施していく必要があると思われた。

まとめ

我々は、本県におけるETECの侵淫状況を知るため、今回海外旅行下痢患者、健康者糞便、河川水および井戸水から検出を行い検討した。

1. 海外旅行下痢患者からETECが17株(14.4%)と高率に検出され、海外旅行者による県内へ持ち込まれる輸入感染症として重要であると思われた。

2. 健康者糞便、河川水および井戸水からは、ETECと同じ血清型を示す大腸菌はみられたが、毒素産生を支配するEnt-プラスミッドおよび定着因子の脱落等により病原性はみられずETECは検出されなかった。

3. 今後も、県内に持ち込まれるケースが増加するものと予想され、引き続き海外旅行による下痢患者、集団、散発下痢患者および環境中からのETECの検出を行う必要があると思われた。

本研究は、「愛媛県特別研究事業費」により実施したものである。

文 献

- 1) 工藤泰雄：医学のあゆみ， 131, 853～857 (1984)
- 2) Merson, M.H. et al : New England J. Med., 294, 1299～1305 (1976)
- 3) 阿部久夫他：感染症学雑誌， 55, 679～690 (1981)
- 4) 国立予防衛生研究所，厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室編：病原微生物検出情報， 78, 141～160 (1986)
- 5) 村松絃一他：感染症学雑誌， 60, 1～6 (1986)
- 6) 本田俊一他：メデイヤサークル， 32, 533～541 (1987)
- 7) Evans, D. J. et al : Infect Immun., 23, 336～346 (1979)
- 8) 三輪谷俊夫他：日本細菌学会教育委員会， 83～90 (1981)
- 9) 竹田美文：メデイヤサークル， 28, 285～296 (1983)
- 10) Black, R.E. et al : Proceedings 14th Joint Conference US-Japan cooperative Medical Science Program Cholera Paner, Toho Univesity, Tokyo, 282～301 (1978)
- 11) 竹田多恵他：感染症学雑誌， 56, 1160～1163 (1982)
- 12) 内村真佐子他：感染症学雑誌， 57, 783～787 (1983)
- 13) 宮田義人他：感染症学雑誌， 62, 108～121 (1988)
- 14) 山田澄雄他：メデイヤサークル， 31, 536～547 (1986)
- 15) Evans, D. G. et al : Infect. Immun., 12, 656～667 (1975)
- 16) 本田武司：医学細菌学 2 巻， 65～95 (1987)

結核病床における抗酸菌患者の動向

齊藤 健 鍋屋孝司*¹ 矢野玲子*² 井上博雄

Trends and Current states of Tuberculosis and Atypical Mycobacteriosis in Sanatoria

Tuyoshi SAITO, Takashi NABEYA, Reiko YANO, Hiroo INOUE

Trends and current states of tuberculosis and atypical mycobacteriosis in ehime prefecture were searched at three hospitals with wards for tuberculosis in 1982 and 1988.

As the results,

- 1) Isolation rate of *M.tuberculosis* was decreased in 1988(4.8%) as compared with 1982(7.1%). On the other hand, the increased isolation rate of atypical mycobacteria in 1988(1.8%) was observed in comparison with 1982(1.3%).
Moreover, *M.gordoniae*, *M.nonchromogenicum*, *M.fortuitum*, were isolated just in 1988 and never isolated in 1982.
- 2) Most prominent phage type of *M.tuberculosis* was A₀ type both in 1982 and 1988.
- 3) Prominent serotypes of *M.avium* complex were 16, 18 and 15 type.
- 4) Difference of clinical features were observed between patients with tuberculosis and atypical mycobacteriosis.

Keyword: *Mycobacterium tuberculosis*, Atypical mycobacteria, Sanatorium

はじめに

結核は医療の進歩と共に著しく減少してきたが、今なお、多くの患者をかかえる感染症である。近年、各地において集団発生^{1,2)}や新登録患者の増加、リ患率減少の鈍化がみられるようになってきた。また、結核菌の減少に反し、非定型抗酸菌による感染症が増加³⁾してきた。そこで、県内における抗酸菌の動向を把握するため、結核病床のある病院3カ所を中心に昭和57年度と62年度調査し、結核菌と非定型抗酸菌の分布を検討したので報告する。

材料および方法

結核の統計は、愛媛県保健環境部の衛生統計年報と財団法人結核予防会の結核の統計を用いた。

患者の調査は、昭和57年度と62年度において市立宇

和島病院、国立療養所愛媛病院、県立新居浜病院で実施し、分離された菌株のうち、結核菌128株と非定型抗酸菌47株を被検菌とした。また、臨床所見は各病院の医師の協力を得た。

結核菌のフェージ型別は、Redmondの方法⁴⁾、*Mycobacterium avium-intracellulare* complex (*M.avium* complex)の血清型別はSchaeferの方法^{5,6)}によって行った。

薬剤感受性試験はマイクロタイター法で行った。

結果と考察

1) 結核の統計

図1は、全国と愛媛県のリ患率(人口10万人対)を比較した。結核統計のはじまった昭和26年度、愛媛県のリ患率は600.9(新登録患者9170名)と高値を示したが、年々減少し、昭和62年度では半以下に減少している。調査を実施した昭和57年度のリ患率は62.8(新登録患者951名)、昭和62年度のリ患率52.3(新登録患者

*¹ 現愛媛県立医療技術短期大学

*² 現愛媛県今治中央保健所

795名)であり、この6年間でも、り患率10.5、新登録患者156名の減少をみている。特に、結核は西高東低の疾患といわれるように西日本地方に多く、愛媛県の場合も同様に全国平均のり患率を上回っている。地域別分布では、愛媛県の南部、山間部に高いり患率がみられた。新登録患者の年齢別構成では、50才以上の層に多くみられ、全体の60%以上を占めてきている。また、事業所、学校等を中心に行われる結核健康診断の統計では、ツベルクリン反応陽性者において昭和54年度以降、自然陽性者数よりもBCG接種者数の割合が上回り、昭和62年度BCG接種者が58%とワクチン依存型になっている。

2) 結核菌と非定型抗酸菌の検索

結核菌と非定型抗酸菌の菌検出状況を把握するため、結核病床をもつ3ヵ所の病院について昭和57年度と62年度調査を行った。菌検出状況では、表1に示すとおり結核菌の検出率が減少し、非定型抗酸菌の検出率が増加している。そこで、愛媛県の非定型抗酸菌症の発生率を国立非定型抗酸菌症共同研究班⁷⁾(国療共研)と同様に推定してみた。昭和62年度における結核症入院患者と非定型抗酸菌症と診定された患者の比率から求めると人口10万人対2.49で国立共研平均2.64とほぼ一致した。

表2は、非定型抗酸菌の検出菌種について示した。M.avium complexが優占種を示し、全体の90%を占め国療共研と同様⁷⁾の結果を得た。また、昭和62年度は昭和57年度に比べM.gordonae, M.nonchromogenicum, M.fortuitumの菌種が増えた。特記すべき点では、M.chelonaeが肺病変部の気管支ファイバー生検によって、またM.scrofulaceumが塵肺症から検出されたことである。

検出された結核菌についてはRedmondによるファージ型別、非定型抗酸菌の中で優占種であったM.avium complexについてはSchaeferの血清型別を実施した。128株のうち115株の結核菌を用いて、ファージ型別を行い、Ao型が71株(60%)と最も多くみられた(表3)。また、昭和62年度は昭和57年度に比べAo(x)型の検出率が高く、Ao(x,9)型もみられた。水口^{8,9)}によるとAo型は日本、ホンコン、アフリカに多く、B型は北米、欧州、C型は米国に多い地域性をもっている。愛媛県は、60%がAo型で日本に多い型であった。また、B型であった1名には、戦争中、海外における感染歴が認められた。このファージ型別では、型別不能が20%と多く、被検菌株のクローニング汚染と考えられる。

62株のM.avium complexは13種類の血清型別を行い7種類に菌凝集がみられた。特に、16型、18型、15型は多く、東村の報告¹⁰⁾と同様であった。57年度は15型、18型が多く、62年度は11型が最も多く、新たに、

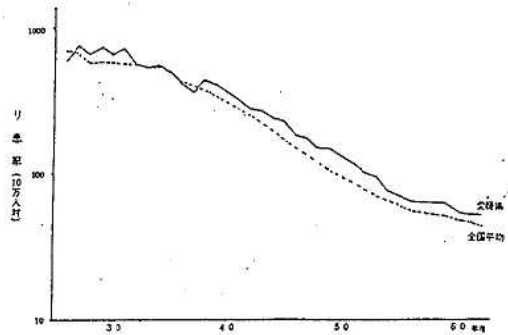


図1 全国と愛媛県の結核り患率

表1 抗酸菌検出状況

	検体数	結核菌	菌検出率	非定型抗酸菌	菌検出率
昭和57年度	10,565	750	7.1	137	1.3
昭和62年度	8,300	400	4.8	148	1.8
計	18,945	1,150	6.1	285	1.6

表2 非定型抗酸菌検出菌種

群	菌種	昭和57年度	昭和62年度
I	M. scrofulaceum	3	5
	M. gordonae		2
II	M. avium-intracellulare complex	132	130
	M. nonchromogenicum		2
IV	M. fortuitum		7
	M. chelonae	2	2
	計	137	148

表3 結核菌ファージ型別

	Ao	Ao(x)	Ao(x,9)	B	C	un	計
昭和57年度	57	5	0	1	0	9	72
昭和62年度	14	7	4	1	0	17	43
計	71	12	4	2	0	26	115
(%)	(61.7)	(10.4)	(3.5)	(1.8)	(0)	(22.6)	(100.0)

9型, 14型, 19型, 20型も認められた。柚木¹¹⁾によると M.avium complex は豚にも多く検出され、愛媛県においても確認¹²⁾されている。今回、患者の血清型と豚の血清型を比較すると、患者は16型, 18型, 15型に多く、豚は4型, 8型, 9型と宿主特異性が認められた。

薬剤感受性試験は、マイクロタイター法を用い、化学療法に多く用いられるSM (硫酸ストレプトマイシン), PAS (パラアミノサリチル酸塩), INH (イリニコチン酸ヒドラジド), EB (エタンブロール), RFP (リファンピシン) の5剤について結果を示す(表5)。昭和62年度は、結核菌, 非定型抗酸菌とも全ての薬剤に対する低下がみられ、特に結核菌の感受性の低下が顕著であった。

3) 患者の臨床像

今回の菌検索で得られた結核症患者38名と非定型抗酸菌症患者28名について、病院の医師の協力を得て臨床像の調査を行った。結核症患者の平均年齢は67才、主症としては発熱、倦怠感が多くみられた。合併症としては胃腸炎、腎炎、視聴障害などの抗結核薬の副作用と思われるものがみられた。非定型抗酸菌症患者の平均年齢は62才、主症としてはせきが多くみられ、結核症患者と異なっていた。既往症では、圧倒的に陳旧性結核が多く、次いでけい肺・じん肺、気管支拡張症など肺に何らかの障害をもつ症状がみられた。非定型抗酸菌症は日和見感染^{13,14)}といわれ、結核症ほど有効な治療法が少ない。そのため、今なお排菌が続いている者が多くみられた。

表4 M.avium complex 血清型別

	9	14	15	16	18	19	20	un	計
昭和57年	0	0	10	6	13	0	0	1	30
昭和62年	2	3	3	11	3	2	5	3	32
計 (%)	2 (3.2)	3 (4.8)	13 (21.0)	17 (27.4)	16 (25.8)	2 (3.2)	5 (8.1)	4 (6.5)	62 (100.0)

表5 薬剤感受性率 (%)

		SM	PAS	INH	EB	REF
結核菌	昭和57年度 (n=72)	55.0	92.9	90.1	72.4	81.7
	昭和62年度 (n=56)	48.6	86.3	75.1	68.4	67.1
非定型抗酸菌	昭和57年度 (n=27)	62.7	94.2	91.2	55.3	89.7
	昭和62年度 (n=20)	60.0	90.6	88.7	52.9	83.7

表6 患者の臨床像

項目		結核症患者 38名	非定型抗酸菌症患者 28名
症状	発熱	28	8
	倦怠感	16	10
	せき	8	17
	胸痛	6	6
合併症	胃腸炎	10	2
	腎炎	6	
	糖尿病	6	2
	視聴障害	6	1
既往症	陳旧性結核	6	14
	けい肺・じん肺	1	5
	気管支拡張症	1	4
	がん・ホルモン投与		1
排菌	(+)	12	22
	(-)	26	6
平均年齢 (男:女)		67 (24:14)	62 (20:8)

本報文の要旨は、第47回日本公衆衛生学会総会（札幌）で発表した。

まとめ

- 1) 抗酸菌の検出状況では、非定型抗酸菌の検出率、検出菌種が増えている。
- 2) 結核菌のフェージ型別は、Ao型が圧倒的に多く、日本固有のフェージ型を示した。
- 3) *M. avium* Complex の血清型別では、16型、18型、15型が多く、型別の種類も増えている。
- 4) 薬剤感受性試験では、結核症患者の感受性低下がみられた。
- 5) 患者の臨床像では、結核症患者と非定型抗酸菌症患者に相違がみられた。

文献

- 1) 原宏紀他：結核，**57**,491～496 (1982)
- 2) 田辺栄一他：日本公衆衛生雑誌，**24**,515～519 (1977)
- 3) 国立療養所非定型抗酸菌共同研究班：結核，**63**,493～499 (1988)
- 4) William R Redmond. et al : Method. Microbil, **13**,345～375 (1979)
- 5) Schaefer, W.B. et al : Amer. Rev. Resp. Dis., **92**,85～93 (1965)
- 6) Schaefer, W.B. et al : Amer. Rev. Resp. Dis., **97**,18～23 (1968)
- 7) 国立療養所非定型抗酸菌共同研究班：結核，**62**,319～327 (1987)
- 8) 水口康雄：臨床医，**7**,68～70 (1981)
- 9) 水口康雄：産業医科大学雑誌，**1**,215～224 (1979)
- 10) 東村道雄：結核，**52**,261～267 (1977)
- 11) 柚木弘之：食品衛生研究，**31**,323～333 (1981)
- 12) 斉藤健他：愛媛県立衛生研究所年報，**45**,11～14 (1984)
- 13) 東村道雄：結核，**52**,367～372 (1977)
- 14) 山本正彦：臨床と微生物，**13**,685～692 (1986)

モノクローナル抗体による腸管アデノウイルスの検出

高木賢二 大瀬戸光明*¹ 山下育孝 井上博雄
西尾 治*² 石丸啓郎*³

Serological Detection and Differentiation of Enteric Adenovirus Type 40 and 41 with Monoclonal Antibodies

Kenji TAKAGI, Mitsuaki OHSETO, Yasutaka YAMASHITA, Hiroo INOUE,
Osamu NISHIO, Yoshiro ISHIMARU

Monoclonal antibodies were prepared against enteric adenovirus by fusing SP 2/O-Ag14 mice myeloma cells with Balb/c mice splenocytes immunized with enteric adenovirus Type 40 or 41.

Three kind of monoclonals (1C, 12D, 15D) were developed and tested for specificity by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). As the result, the specificity of each monoclonals so far available was as follows, 1C for anti-Ad41; 12D for anti-Ad40; 15D with anti-adenovirus group specificity. It was possible to differentiate between Adenovirus 40 and 41 by ELISA using these monoclonals. The use of ELISA with these monoclonals will be highly useful in tests for the rapid diagnosis of adenovirus gastroenteritis.

Keyword: Monoclonal Antibodies Enteric Adenovirus Type 40 and 41, ELISA

はじめに

小児下痢症患者の電子顕微鏡(電顕)による病原検索では、アデノウイルス(Ad)が毎年約4%検出され、そのうち40型及び41型は腸管アデノウイルスと呼ばれている¹⁻³⁾。Ad40及びAd41は中和試験において交差反応を示すため、血清型別は、ウイルスDNAの制限酵素分析が標準とされている^{4,5)}。しかし、これらの方法は手技が煩雑なうえ、多くの検体を検査するには不適である。そこで今回、腸管アデノウイルスに特異的なモノクローナル抗体を作製し、ELISA法による検索を試みたので報告する。

材料及び方法

1. モノクローナル抗体(MoAb)の作製方法

Ad 3, Ad40, Ad41をそれぞれ免疫したBalb/C マウス脾細胞とSP 2/O-Ag 14ミエローマ細胞を融合し、限界希釈法により3種のハイブリドマクローン15D, 12D, 1Cを得た。手順は図1に示す。Ad40, Ad41, 及びSP2/O-Ag14ミエローマ細胞は国立予研より分与された。Mo Abは、アデノウイルスのAからF亜群の6つのグループに属する17の血清型株を用い、ELISA法及び間接蛍光抗体法により特異性を検討した。抗体サブクラスの決定には、Rabbit Antiserum to Mouse Ig (G1, G2a, G2b, G3, M, LITTON BIONETICS社)を使用したELISA法にて検討した。

2. ELISA法

抗Ad41ウサギ免疫血清または抗Ad3モルモット免疫血清を捕獲抗体に、特異性が検討されたMoAbを検出抗体とする2抗体サンドイッチ法を用いた。手順は図2に示す。プレートは、Substrate I (メック社)を使用した。

*¹ 現愛媛県松山中央保健所

*² 愛知県衛生研究所

*³ 石丸小児科医院

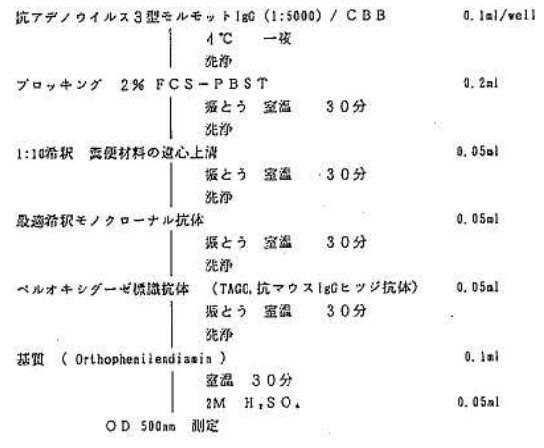
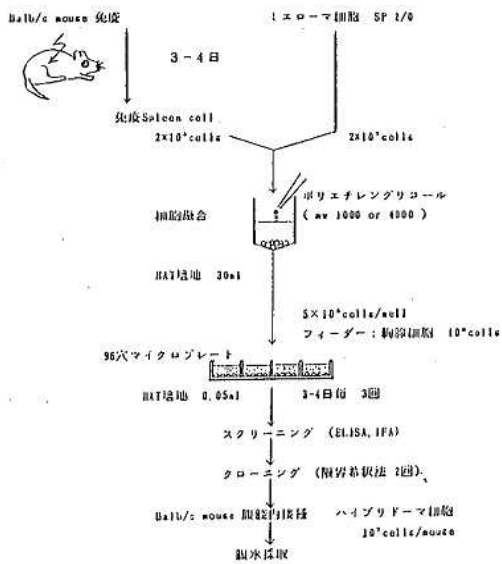


図2 ELISA法

図1 モノクローナル抗体の作成法

表2 抗アデノウイルスモノクローナル抗体のサブクラス

ハイブリドーマ		
クローン名	特異性	抗体サブクラス
15D	Group specific	IgG 2b
12D	Type 40 specific	IgG 2b
1C	Type 41 specific	IgG 1

表1 抗アデノウイルスモノクローナル抗体の特異性の検出

サブグループ	血清型	ELISA*(OD 500nm X1000)			間接蛍光抗体法**		
		抗Ad41 (GPS)	モノクローナル抗体		モノクローナル抗体		
			12D	1C	15D	12D	1C
A	12, 31	517-532	-	-	+	-	-
B:1	3, 7	514-556	-	-	+	-	-
B:2	11, 34, 35	520-753	-	-	+	-	-
C	1, 2, 5, 6	233-607	-	-	+	-	-
D	8, 19, 37	430-730	-	-	+	-	-
E	4	376	-	-	+	-	-
F	40	1601	474	-	+	+	-
	41	1700	-	1240	+	-	+

* 各血清型株感染293細胞 (cpe ---) の凍結融解上清を抗原として用いた。捕獲抗体には、抗アデノ41ウサギ血清を用いた。
 ** 各血清型株感染293細胞をスライドグラスに固定したものを抗原とした。

表3 制限酵素分析による型別とELISA法の比較

NO	EM	PAGE	ELISA (OD 500nm x1000)		
			15D	12D	1C
86-137	+++	40	1462	1568	28
86-178	++	40	1058	1357	-13
86-291	+++	40	1549	1600	185
86-1326	+++	40	1430	1478	60
87-1141	+++	40	1438	1540	39
86-165	+++	41	1640	-24	1218
86-822	++	41	1422	-62	797
86-1134	++	41	1338	-32	764
86-1327	+++	41	1547	-42	942
86-1741	+	41	115	21	137
86-1742	+++	41	1681	24	1270
86-1752	++	41	1646	-27	973
87-692	++	41	1656	-19	1032
87-958	+	41	1018	-54	572
87-1055	+++	41	1474	-87	718
86-1841	+++	40+41	1605	814	1014
86-607	++	nonEAd	150	-29	-15

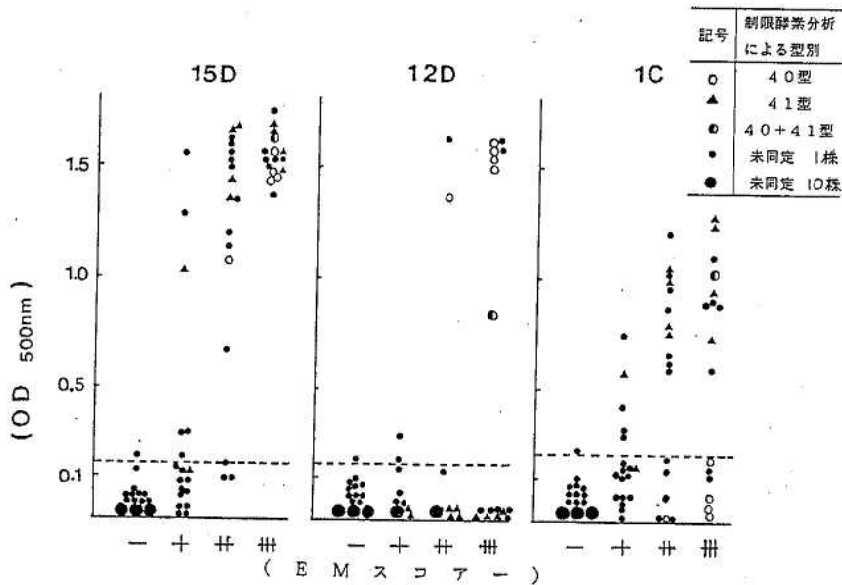


図3 モノクローナル抗体を用いたELISA吸光度

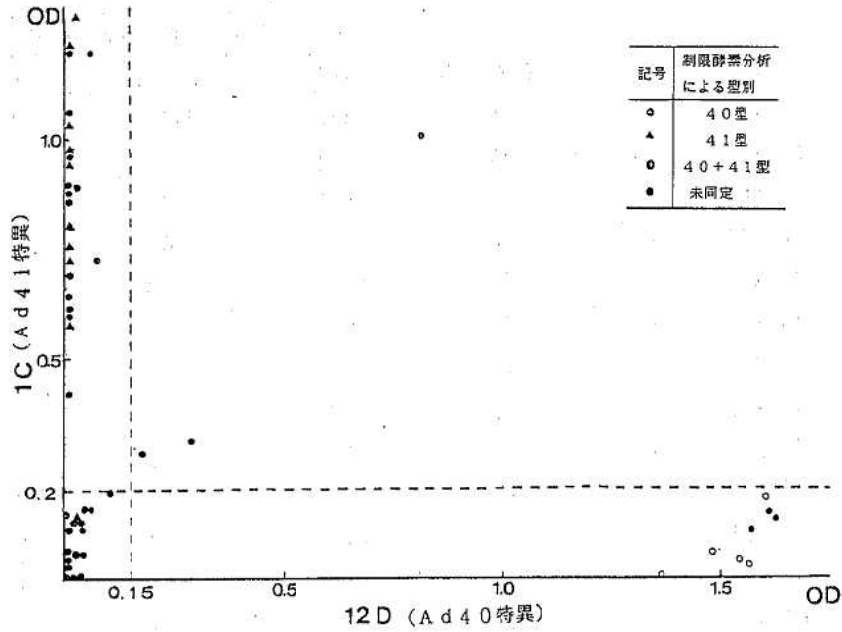


図4 Ad40とAd41型特異モノクローナル抗体のELISA吸光度

表4 モノクローナル抗体を用いたELISAによる型別検出数

血清型別	1986年	1987年	1988年	合計
(検査数)	27	16	8	51
Ad40	5	2	1	8
Ad41	9	10	4	23
Ad40+41	2		1	3
Ad型別不能	4	1		5
陰性	7	3	2	12

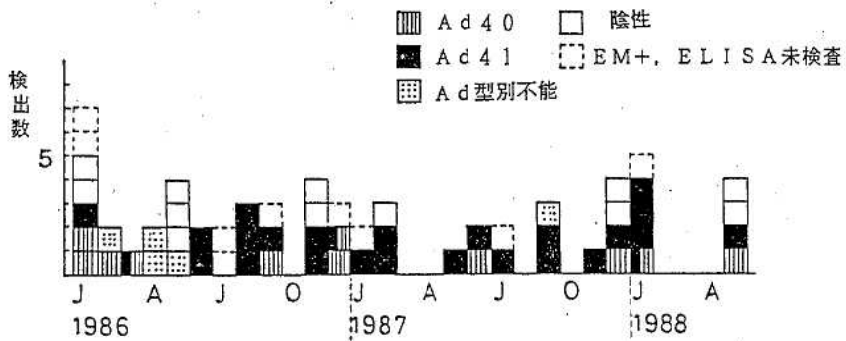


図5 月別の血清型別腸管アデノウイルスの検出数

検査材料は、1986年1月から1988年5月までの小児の下痢症患者の糞便の中で、電顕法にてAd陽性を示す51例を用いた。陽性限界値は電顕法にてAd陰性を示す41例の吸光度を測定し、その平均値+2SDとした。制限酵素分析⁶⁾及び電顕法⁷⁾についてはすでに報告した方法に準じた。

結果

1. 3種のMoAb15D, 12D, 1Cの特異性およびそのサブクラスについては表1, 表2に示す。15Dは、検査した17のすべての血清型ウイルス株に反応し、12Dは40型のみ、1Cは41型のみに反応することにより、15DはAd群特異性、12DはAd40特異性、1CはAd41特異性を有すると同定した。また、抗体サブクラスは、15D, 12DはIgG2b, 1CはIgG1であった。

2. 制限酵素 (Sma I) 分析により型別の判明している検体17例を用いて、ELISA法と比較した結果を表3に示す。(陽性限界値は、15D, 12Dが150, 1Cは200, ×1000)

40型は12Dに、41型は1Cに特異的に反応し、電顕法で粒子数の少ない1例(86-1741)を除いて、すべて制限酵素分析の結果と一致した。86-1841のように混合感染が確認されたものでは、12D, 1Cの両方に反応した。非腸管アデノウイルスと同定された86-607では、15Dに低値で反応したが、12D, 1Cには反応しなかった。

3. 電顕法とELISA法の相関については、図3に示す。電顕法でAd陽性の検体51例を粒子数により(+)から(♯)に分けてプロットした。群特異MoAb15Dでは、電顕法と比較して37例/51例(72.5%)が陽性と判定した。(♯)では、16例/16例(100%)、(♯)では15例/17例(88.2%)、(+)では6例/18例(33.3%)の検出率であった。

Ad40型特異MoAb12Dでは、制限酵素分析により40型と同定された5例は陽性であり、41型と同定された10例は陰性であった。

Ad41型特異MoAb1Cでは、41型と同定された10例は、1例(86-1741)を除いて陽性であり、40型と同定された5例は陰性であった。15D, 12D, 1Cも粒子数の増加に伴い、吸光度も高くなる傾向が見られた。

4. 12D, 1CのELISA吸光度を図4に示す。12Dと1Cにクリアーに分かれ、12Dに陽性を示すのが8例、1Cに陽性を示すのが23例、両方に陽性を示すのが3例であった。どちらにも陰性であるのが17例であった。

5. 1986年から1988年5月までの間に、電顕法でAd陽性を示した51例を型別した結果を表4に示し、月別の検出状況を表5に示す。51例中39例(76.5%)を検出できた。そのうち34例/39例(87.2%)が腸管アデノウイルスと診断された。血清型別では、Ad40型が8例/34例(23.5%)、Ad41型が23例/34例(67.6%)であり、Ad41型を多く検出した。混合感染も3例/34例(8.8%)検出した。また、当調査においては季節的な変化は不明であった。

まとめ

1. アデノウイルス群特異、40型特異、41型特異モノクローナル抗体を作製した。
2. これらのモノクローナル抗体を用いたELISA法により、糞便から直接腸管アデノウイルスを検出することが可能となった。
3. 電顕法でアデノウイルス陽性51例の糞便材料のうち、76.5%(39例/51例)がELISA法で陽性を示した。

本論文の要旨は、第58回西日本感染症学会(昭和63年11月)において発表した。

文献

1. J.C.de Jong, et al: Journal of Medical Virology, 11, 215~231 (1983)
2. Uhnnoo, J, et al: Journal of Clinical Microbiology, 20: 365~372 (1984)
3. Uhnnoo, J, et al, Develop. Biol. Standard 55: 311~318 (1983)
4. Wadell G, et al, Infect Immun 21: 238~246 (1980)
5. Martha Broun, et al, Journal of Virological Methods, 9: 87~98 (1984)
6. 桑原広子他: 愛媛衛研年報49, 11~14 (1988)
7. 山下育孝他: 愛媛衛研年報46, 9~12 (1985)

小児のウイルス性胃腸炎の疫学的研究

山下育孝 大瀬戸光明*¹ 高木賢二
井上博雄 石丸啓郎*²

Epidemiological Studies on Acute Viral Gastroenteritis of Children

Yasutaka YAMASHITA, Mitsuaki OSETO, Kenji TAKAGI
Hiroo INOUE, Yoshiro ISHIMARU

Epidemiological and electronmicroscopical (EM) study on acute viral gastroenteritis of children were performed in Ehime prefecture during five years from 1984 to 1988.

Outbreaks of both infectious gastroenteritis and infantile vomiting and diarrhea were regularly observed during winter in every year, particularly at December for a peak incidence of the former and January to February for the latter.

The most detectable season of etiological agents for acute viral gastroenteritis so far observed with EM were as follows. Both rotaviruses (HRV) and small round viruses (SRV) in winter, astroviruses in spring to early summer, adenoviruses throughout year.

Due to concordant period of a peak incidence of viral isolation and outbreak of the disease, such as SRV and infectious gastroenteritis in December, or HRV and infantile vomiting and diarrhea in January to February, the etiological virus of infectious gastroenteritis or infantile vomiting and diarrhea was presumed as SRV or HRV respectively.

Keywords: Acute gastroenteritis, Rotavirus, Small round virus

はじめに

ウイルス性胃腸炎の研究は、1972年に、Kapikianら¹⁾がノーウォークウイルスを、翌1973年に、Bishopら²⁾がロタウイルスを電子顕微鏡観察により発見して以来急速に進歩し、また、電子顕微鏡を用いて糞便材料から直接ウイルス粒子を検出する方法が一般化した。それとともに、アデノウイルスや多くの小型球形ウイルス^{3,5)}が急性胃腸炎の病原体として報告されてきた。

我々は、1980年以来継続して、小児急性胃腸炎の病原検索を行い、1984年11～12月にハワイ因子関連ウイルスの流行^{6,7)}を、また、1985年2～4月にC群ロタウイルスの流行^{8,9)}を、わが国で初めて確認し報告してきた。

今回は、わが国において、長期間にわたり同一地域で急性胃腸炎の疫学について調査した例が少ないため、1984年から1988年の5年間に得られた、愛媛県における急性胃腸炎の疫学について報告する。

材料と方法

調査期間は、1984年から1988年までの5年間で、検査方法は、電子顕微鏡法 (EM) によるウイルス粒子の検出およびウイルス核酸の電気泳動型の分析で、詳細は既法^{6,9,10)}に示した。

下痢症の患者発生数は、愛媛県感染症サーベイランス事業に基づき、県下の29定点医院から報告された患者数を集計した。

結果

1. 愛媛県における下痢症患者発生状況

*1 現愛媛県松山市中央保健所

*2 石丸小児科医院

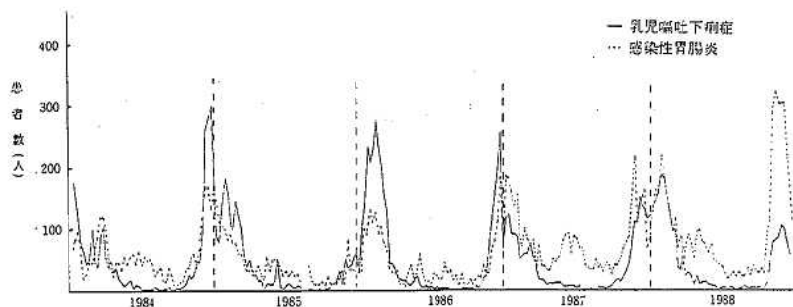


図1 愛媛県における下痢症の患者発生状況

調査期間中の乳児嘔吐下痢症および感染性胃腸炎の週別の患者発生状況を図1に示した。患者の発生状況は、両疾患とも夏期に少なく、11月頃から増加し、12月から1月にピークを作り、その後減少する規則的な季節的消長が認められた。

感染性胃腸炎については、1986年1月を除いて患者数のピークは毎年12月であった。また、乳児嘔吐下痢症の患者数のピークは、1984年を除いて1月から2月であった。

2. 小児急性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

1984年から1988年の5年間に、3066例の糞便をEM

表1 小児急性胃腸炎患者からのウイルス検出状況

ウイルス別	検出例数	検出率(%)
ロタウイルス	634	20.7
アデノウイルス	134	4.4
30-35nm 粒子	119	3.9
アストロウイルス	47	1.5
カリシウイルス	44	1.4
ピコルナ/バルボ様ウイルス	45	1.5
計	1023	33.4

検査総数 3066例

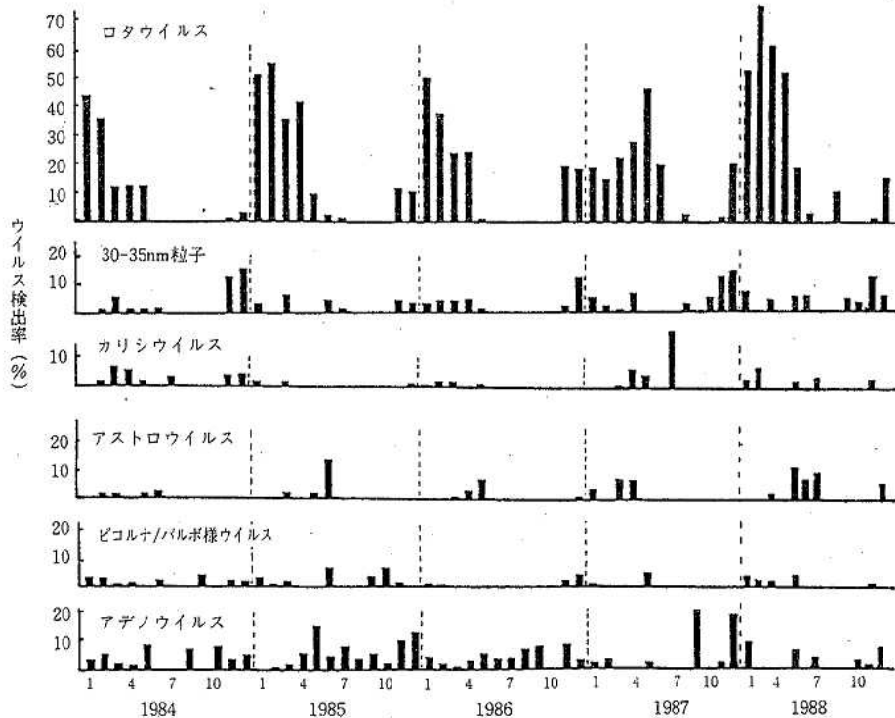


図2 小児急性胃腸炎患者からの月別ウイルス検出状況

で観察し、1023例 (33.4%) から種々のウイルス粒子が検出された。内訳は、ロタウイルスが最も多く 634例 (20.7%) でウイルス全体の約60%を占めていた。次いでアデノウイルス135例 (4.4%), 直径が30-35nmの小型球形ウイルス (以下30-35nm粒子) 119例 (3.9%) であった。その他、アストロウイルス、カリシウイルス、ピコルナ/パルボ様ウイルスが各1.5%検出された。

3. 月別のウイルス検出状況

ウイルス別の月別検出率を図2に示した。ロタウイルスの検出率は、例年1~2月の冬期が最も高く、4~5月にかけて徐々に減少した。これは、当地における乳児嘔吐下痢症の患者発生状況とほぼ一致していた。ピーク時の検出率は50~70%であった。

30-35nm粒子は、冬期によく検出されるが、特に、11~12月に多く検出された。

アストロウイルスは、毎年4~6月に検出され、このウイルス特有の季節的消長が認められた。

アデノウイルスは、年間を通して検出され、カリシウイルス、ピコルナ/パルボ様ウイルスは、調査期間中散発的に検出された。

調査した5年間で合算した月別検出率を図3に示した。ウイルスの検出率は1月が最も高く、その後徐々に減少し、8~10月が最低で、11月から再び増加した。

ロタウイルスは、図2で見られた1~2月にピークがありその後減少するという季節的消長が、より明確に確認された。30-35nm粒子は、11~12月に検出率が最も高く、ロタウイルスの同時期の検出率を上回っていた。

4. ウイルス別の陽性者年齢分布

ウイルスが検出された患者の年齢分布を図4に示した。ロタウイルスは、0才、1才が最も多く、この年齢層で全体の約50%を占めていた。アデノウイルスは、6才以下の年齢層に多く全体の90%を占めていた。

30-35nm粒子は、1~3才の年齢層において検出率が

高く、好発年齢は、ロタウイルスに比べ若干高いようであった。

カリシウイルスは、加齢とともに増加し、4~6才の年齢層で36%とピークとなり、このウイルス特有の年齢分布が認められた。アストロウイルスは幅広い年齢層から検出され、ピコルナ/パルボ様ウイルスは、高齢年齢層から多く検出された。

5. ウイルス別の臨床症状

ウイルス別の症状発現頻度を表2に示した。30-35nm粒子、カリシウイルスは、約20%が発熱を伴い、ロタウイルス、アデノウイルス、ピコルナ/パルボ様ウイルスは、発熱を伴うものは約50%で、しかも、39℃以上の高熱を示す例も10数%含まれていた。

30-35nm粒子は、他のウイルスに比べ下痢の頻度が

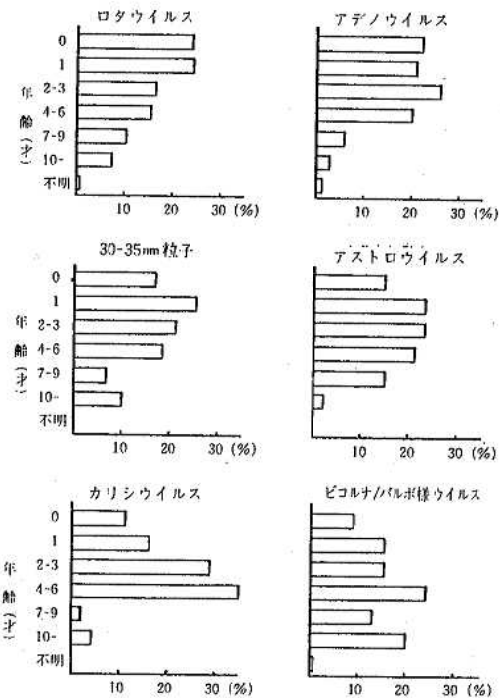


図4 ウイルス別陽性者年齢分布

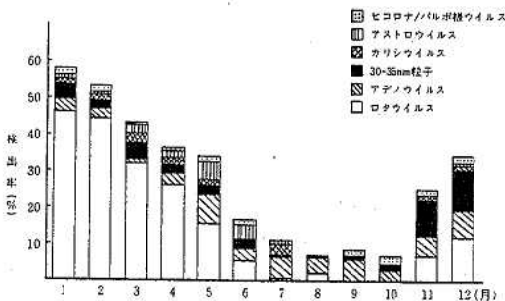


図3 月別のウイルス検出状況 (1984-1988)

表2 ウイルス別の急性胃腸炎の症状 (%)

ウイルス別	発熱					下痢	腹痛	嘔吐	嘔気
	<37	37~	38~	39~	40~				
ロタウイルス(618)	53	12	23	11	1	96	52	68	66
アデノウイルス(123)	54	9	20	16	2	95	44	45	35
30-35nm粒子(110)	79	14	3	3		80	50	87	73
アストロウイルス(15)	60	13	25	2		98	64	32	34
カリシウイルス(12)	77	7	7	9		93	63	70	65
ピコルナ/パルボ様ウイルス(40)	45	20	16	11	2	83	76	64	60

低く、嘔吐が下痢を上回っており、胃腸炎の病原として固有の性質を持つことが示された。ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、カリシウイルスは下痢が主症状であった。

6. ロタウイルスRNAの電気泳動型の分析

1985年から1988年の間に、EMでロタウイルスが検出されたものうち用い得た331例についてSDS-PAGEによるRNAの泳動型の分析を行った。結果は表3に示すとおりで、A群ロタウイルスのL型の泳動像を呈するものが202例(46.9%)、S型が62例(14.4%)、C群を呈するものが60例(13.9%)であった。A群とC群ロタウイルスの割合は4.4:1であった。

また、各泳動型の月別分布状況を図5に示した。C群ロタウイルス株は、12月の1例を除きすべて2~5月に分布し、ピークは3月であった。A群ロタウイルス(L型、S型)は、11月から増加し1月にピークとなり、その後減少した。C群ロタウイルス株の検出時期は、A群ロタウイルスに比べ遅いことが示された。

考察

愛媛県感染症サーベイランスにおける乳児嘔吐下痢症と感染性胃腸炎の患者発生状況は、ともに毎年夏期に少なく、12~1月の冬期にピークを示す規則的季節的消長が認められた。しかし、両疾患にはピークに若干のずれが認められた。感染性胃腸炎は12月にピークを示し、乳児嘔吐下痢症は、1984年を除き例年1~2月にピークを示した。また、年により夏期に感染性胃腸炎の小ピークが見られるが、その多くは、サルモネラ、カンピロバクター等の細菌によるものと考えられる。

1984年から1988年の間に、主にEMによる小児急性胃腸炎の病原検索を行った結果、ロタウイルスは、例年1~2月に最も多く検出され、乳児嘔吐下痢症患者の発生パターンとよく一致していた。これは、上記疾患の主要な病原がロタウイルスであることを示している。1984年11~12月には、例年と異なり乳児嘔吐下痢症患者が多発したが、主病因はロタウイルスではなく30-35nm粒子(ハワイ因子関連ウイルス)であった⁸⁾。乳児嘔吐下痢症の大部分はロタウイルスによるものであるが、それ以外の病原体(30-35nm粒子等)も主病因となることが認められた。

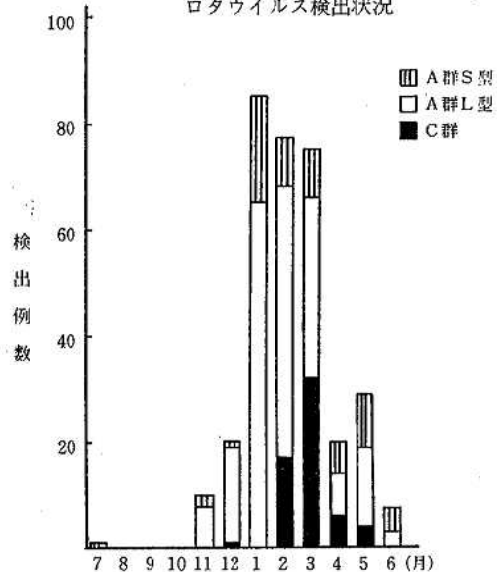
一方、30-35nm粒子の検出状況と感染性胃腸炎の患者数の発生パターンは類似し、伴に11~12月にピークを形成した。この時期のロタウイルスの検出率は低く、11~12月の急性胃腸炎の主要な病原体は、30-35nm粒子であると考えられた。これは、岡田の浦和市におけるウイルス性胃腸炎の病原検索の結果と一致していた¹¹⁾。

表3 ロタウイルスRNAの泳動型の分析 (1985-1988)

泳動パターン	検出数	検出率(%)
A群L型	202	46.9
A群S型	62	14.4
非定型(C群)	60	13.9

検査数 431例

図5 電気泳動型別の月別ロタウイルス検出状況



11~12月の胃腸炎患者数に比べ30-35nm粒子の検出率が低いのが、これは、糞便中へのウイルス排泄期間が短く、また排泄量が少ないためと考えられる。これらのウイルスの感染を確実に診断するためには、より感度の高い検出方法の開発が必要と考えられる。

これら以外には、アストロウイルスが、主に春から初夏にかけて検出され、このウイルス固有の季節的消長が示唆された。この現象は、すでに報告¹²⁾している通り何らかの季節的要因が関与しているものと考えられる。

ウイルスが検出された患者の年齢分布においては、ロタウイルスは0~1才児が最も多く全体の約50%を占めていた。しかし、病原微生物検出情報の集計データ¹³⁾よりは非常に低く、また本県においては、4才以上が約35%と多い。これは、A群ロタウイルスよりも好発年齢が高い⁷⁾C群ロタウイルスが60例(13.9%)検出されているためと考えられる。30-35nm粒子が検出された患者は、1才が最も多いが、4才以上でも35%で、このウイルス陽性者が幅広い年齢層に広がっていることが確認された。

ウイルスが検出された患者の臨床症状は、検出ウイ

ルスによって異っていた。たとえば、30-35nm粒子は
ロタウイルスに比べ発熱・下痢が少なく、嘔吐が多い
特徴がみられた。30-35nm粒子、カリシウイルスは、
ロタウイルス・アデノウイルスよりも症状が軽い傾向
を示した。しかし、多少の違いはあるものの臨床症状
でウイルスを推定することは困難と考えられた。

1984年から1988年の5年間に検出されたウイルスは、
ロタウイルスが最も多く、次いでアデノウイルス、30-
35nm粒子であった。これらは、検出ウイルスの87%
を占め、急性胃腸炎の病因として重要な位置を占めて
いることが確認された。

ロタウイルスについては、最近、本県以外でも検出
の報告^{14,15)}がなされているC群ロタウイルスの感染源
や伝播様式の解明が必要であると考えられる。

下痢症から検出されるアデノウイルスの多くは、腸
管アデノウイルスと呼ばれるアデノウイルス40型、41
型である。我々は、これらの腸管アデノウイルスに対
するモノクローナル抗体を作成した¹⁶⁾ので、今後、腸
管アデノウイルス(40型、41型)の疫学像の解明に努
めたい。

30-35nm粒子については、食中毒の発生と関連して
いるため^{17,18)}、感染経路や伝播様式の解明および培養
系の確立が急務と考えられる。

まとめ

1. 感染性胃腸炎と乳児嘔吐下痢症の患者数は、夏期
に少なく、冬期に増加する規則性が認められた。し
かし、両疾患にはピークに若干のずれがあり、前者
は12月に、後者は1~2月にピークを示した。
2. EMによる病原検索の結果、11~12月の急性胃腸
炎の主病因は、30-35nmの小型球形ウイルスで、1
~2月の下痢症の主病因は、ロタウイルスであるこ
とが示された。
3. アストロウイルスは、主に春から初夏にかけて流
行する規則性が認められた。
4. 調査期間中に検出されたウイルスの内訳は、ロタ

ウイルス634例(20.7%)、アデノウイルス134例(
4.4%)、30-35nm粒子119例(3.9%)、アストロ
ウイルス47例(1.5%)、カリシウイルス44例(1.5%)、
ピコルナ/バルボ様ウイルス44例(1.4%)であつ
た。

5. ウイルスにより年齢分布や臨床症状に若干の差異
が認められた。

文献

- 1) Kapikian, A.Z. et al.: J.Virol., 10, 1075~
1081 (1972)
- 2) Bishop, R.F. et al.: Lancet., ii 1281~1283
(1973)
- 3) Madeley, C.R. et al.: Lancet., II 124 (1975)
- 4) Madeley, C.R. et al.: Lancet., I 119 (1976)
- 5) Thornhill, T.S. et al.: J.Infect.Dis., 135 20~
27 (1977)
- 6) 山下育孝他: 愛媛衛研年報, 46, 9~12 (1985)
- 7) 山下育孝他: 愛媛衛研年報, 48, 1~4 (1987)
- 8) 大瀬戸光明他: 医学のあゆみ, 136, 223~224
(1986)
- 9) 大瀬戸光明他: 愛媛衛研年報, 49, 5~9 (1988)
- 10) 厚生省監修: 微生物検査必携ウイルス・クラミジ
ア・リケッチア検査第3版 第2分冊各論1, 176
~179 (1987)
- 11) 岡田正次郎: 食品と微生物, 4, 93~102 (1987)
- 12) 山下育孝他: 愛媛衛研年報, 44, 22~28 (1983)
- 13) 厚生省感染症対策室・国立予防衛生研究所: 病原
微生物検出情報, 8, 25, 48 (1987)
- 14) 松本和男, 小林桂子: 病原微生物検出情報, 9,
147~148 (1988)
- 15) 上羽修, 藤井理津志: 同上, 9, 148 (1988)
- 16) 高木賢二他: 愛媛衛研年報, 50, 15~19 (1989)
- 17) 安藤民衛他: 食品と微生物, 4, 103~114 (1987)
- 18) Sekine, S. et al.: Microbiol.Immunol., 33, 207
~217 (1989)

血清中遊離HLA抗原の分子性状

木下幸正 坂本尚穂 藤原郁子 高見俊才 井上博雄

Molecular Characterization of Soluble HLA antigens in Serum

Kosei KINOSHITA, Hisaho SAKAMOTO, Ikuko FUJIWARA, Shunsai TAKAMI, Hiroo INOUE

Molecular characterization of soluble HLA antigens in serum was studied with gel filtration, lipo protein fractionation and agarose gel electrophoresis.

As a result, Both class I and II HLA antigens were fractionated in void volume of gel filtration with Sephadex G-150.

Both class I and II HLA antigens were recognized in mainly 2nd PPT and HDL fractions. Class I HLA antigens were recognized in α -globulin separation of agarose gel electrophoresis.

Keywords: soluble HLA antigens, gel filtration, lipoprotein, agarose gel electrophoresis

はじめに

ヒト主要組織適合性抗原であるHLA抗原は細胞膜上に存在するだけでなく、血清中にも遊離抗原として存在することが知られている¹⁻⁴⁾。この血清中遊離抗原はクラスI抗原のみでなく、クラスII抗原も存在し、種々の細菌に吸着することをすでに報告している。

また血清中遊離HLA抗原が、クラスI、クラスII抗原ともに、リポタンパク分画のHDL分画に主として存在し、セファデックスG-150を用いたゲル濾過法にて、Void Volumeに流出することを確認している。これらの分子性状およびアガロース電気泳動法での易動度について検討したので報告する。

材料と方法

1. 抗原血清

抗HLA抗体を保有しないHLA型既知の健常人を抗原血清として用いた。

2. 抗HLA血清

用いた抗HLA血清は、クラスI: A24(EPH1065), B51+Bw52(EPH871), クラスII: DR2(EPH985), DQw1(EPH1032)の計4本で、それぞれの特異性について表1に示した。

3. リンパ球細胞障害阻止テスト

血清は段階希釈を行い、細胞障害の認められた最終

希釈倍数を1力価単位とし、細胞障害阻止テスト³⁾には2単位の抗血清を用いた。リンパ球細胞障害阻止テストは試料液2 μ lに抗血清2 μ lを加え、37 $^{\circ}$ C 1時間静置後、 3×10^6 /mlに調整した標的細胞を1 μ l加え、ついでNIHのリンパ球細胞障害テストに従った。

4. セファデックスG-150によるゲル濾過

ゲル濾過は常法どおりセファデックスG-150のゲル濾過を行い、各分画をポリエチレングリコール6000にて濃縮後、PBSにて透析しリンパ球細胞障害阻止テストを行った。

5. リポタンパク分画

リポタンパク分画は、図1に示すリタンングステン酸ナトリウムMgCl₂沈殿法により、LDL, 2nd ppt, HDL, およびSupの4つの粗分画について、PBSにて透析後、リンパ球細胞障害阻止テストを行った。

5. アガロース電気泳動

アガロース電気泳動には、アガロース(SERVA社, Agarose hohe-EEO-high), ベロナールBuffer(pH8.6 m=0.05)を用いた。

(1) 1.5%アガロース20mlにてアガロースゲル(8 \times 8cm)を作製し、抗原血清100 μ lに3%アガロース100 μ lを加え試料液としたのち、45mA50分電気泳動を行った。電気泳動の終わったゲルを5mm間隔にカッターで切り出し各分画ゲルを試験管へ入れ、-20 $^{\circ}$ C 1夜冷

結させたのち融解し、試料液を抽出後、ミニコン (CS-15) にて100 μ l まで濃縮しリンパ球細胞障害阻止テストを行った。また各分画について和光の総コレステロールキットにてコレステロールを測定した。

(2) Electroendosmotic Preparative electrophoresis Unit, (ELFE GENOFIT 社) にて、図2 に示すごとく電気泳動を行い、得られた各フラクションについて、リンパ球細胞障害阻止テスト、ならびに、ローリー法にて総タンパク量を測定した。

表1 HLA 抗血清の特異性

	特異性	++	+-	-+	--	N	R	SI
EPH1065	A24	130	17	1	98	246	0.86	0.90
EPH 871	B51+Bw52	84	1	6	158	249	0.94	0.98
EPH 985	DR2	617	45	78	1343	2083	0.87	0.74
EPH1032	DQw1	36	2	1	50	89	0.93	0.80

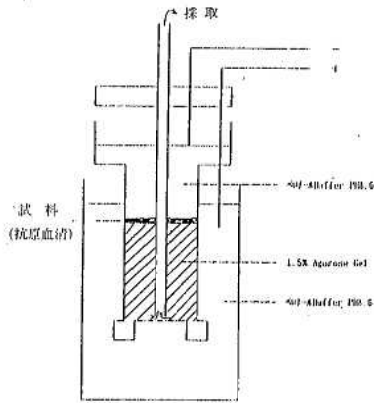


図2 ELFE electroendosmotic preparative electrophoresis unit

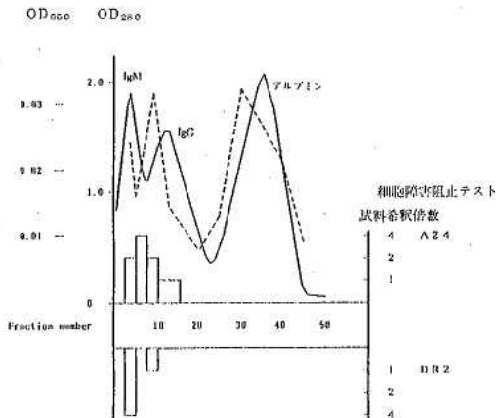


図3 ゲル濾過分画におけるリンパ球細胞障害阻止テスト

結果

1. セファデックスG-150によるゲル濾過

セファデックスG-150によるゲル濾過の各フラクションにおけるA24, DR2のリンパ球細胞障害阻止テストの結果および、OD280にて蛋白量, OD550にてリボタンパク量を測定した結果を図3に示す。A24は、IgG~IgM分画程度、DR2はVoid Volume にリンパ球細胞障害阻止活性のピークが認められた。

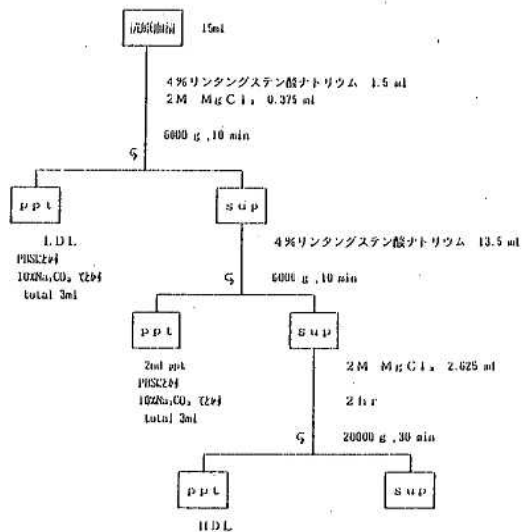


図1 リンタングステン酸ナトリウム MgCl₂ 沈殿法

2. リポタンパク分画

図4にリンタングステン酸ナトリウム $MgCl_2$ 沈殿法にて得られた LDL, 2nd ppt, HDL, sup の4つの粗分画について、リンパ球細胞障害阻止テストを行った結果を示す。ここで2nd pptとは、抗原血清より LDL, HDL を得る過程にて得られる分画であり、LDL, HDL が混在していると考えられる。また対照には、リポタンパク分画に使用した抗原血清を用いた。

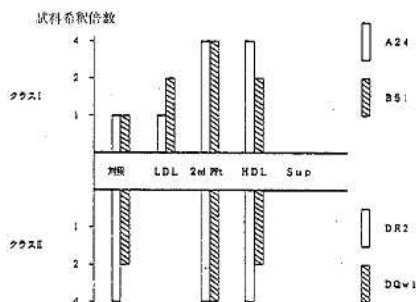
クラス I 抗原は、A24, B51 について検討を行い、A24, B51 ともに、2nd ppt, HDL に高い細胞障害阻止活性が認められ、sup には、認められなかった。クラス II 抗原は、DR 2, DQw 1 について検討を行った。DR2, DQw 1 ともに、2nd ppt, HDL に高い細胞障害阻止活性が認められ、LDL, sup には認められなかった。

(1) アガロース電気泳動後、抽出したそれぞれの試料液について、コレステロール測定、および A24 についてリンパ球細胞障害阻止テストを行った結果を図5に示す。

コレステロール測定の結果2つのピークが観察され、ゲルNo.7はLDL、ゲルNo.11はHDLのピークと考えられる。一方、A24の細胞障害阻止活性は、 α -グロブリン分画程度に認められたが、HDLのピークとは一致しなかった。

(2) ELFIにて採取したフラクションを用いて、タンパク定量、およびA24のリンパ球細胞障害阻止テストの結果を図6に示す。タンパク定量にて観察された最初の高いピークは、アルブミン、次の低いならば

図4 リポタンパク分画におけるリンパ球細胞障害阻止テスト



なピークは、 α -グロブリンおよび β -グロブリンと考えられる。A24の細胞阻止活性は、 α -グロブリンよりも、若干アルブミンに近い分画に認められた。

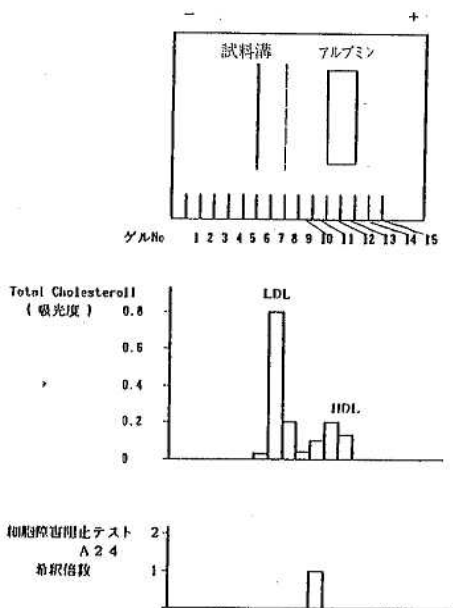


図5 アガロース電気泳動分画におけるリンパ球細胞障害阻止テスト

考察

血清中遊離HLA抗原については、HLA-A 9抗原について、血清中リポプロテイン分画のHDL分画に存在し、ゲル濾過法で分子量19万相当に抗原活性があり、膜からsheddingしたHLA分子が脂質と複合体を形成していることを示唆する報告がある²⁾。当所で行ったリンタングステン酸ナトリウム $MgCl_2$ 沈殿法においてもクラス I 抗原ではA24, B51, クラス II 抗原ではDR 2, DQw1 抗原が主にHDL分画に存在し、セファデックスG-150ゲル濾過法でA24, DR 2抗原がVoid Volume 分画に流出することが確認された^{5,6)}。

またアガロース電気泳動にて、A24抗原が、ほぼ α -グロブリン分画に存在することが観察された。

当所において血清中遊離HLA抗原について確認された分子性状について表2に示す。これらの結果より血清中遊離HLA抗原は、 α -グロブリン相当の移動度を有し、複合体として存在するものと考えられる。またこれらの遊離HLA抗原は、Salmonella tyhimurium等の細菌への吸着が認められ、モノクローナル抗体抗HLAクラス I, 抗HLAクラス IIを用いたELISA法にて確認されている。

図6 ELFIによるアガロース電気泳動分画におけるリンパ球細胞障害阻止テスト

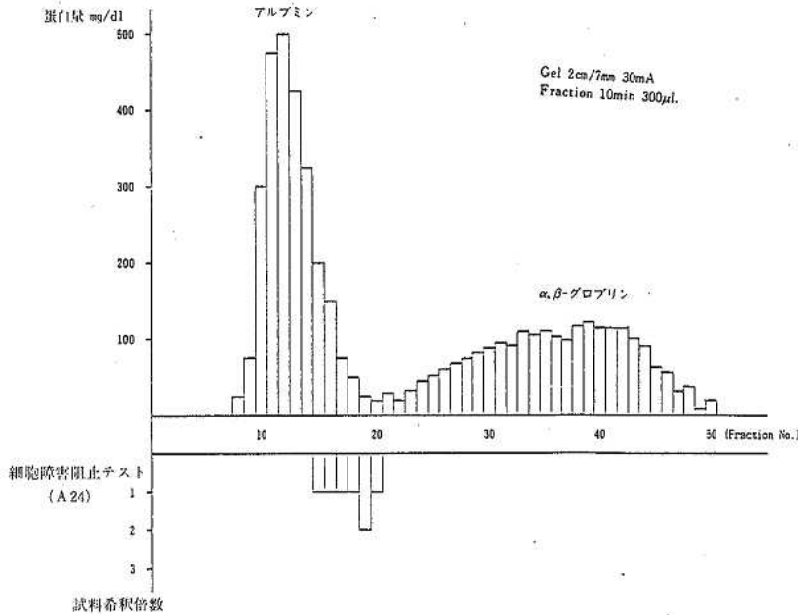


表2 血清中遊離HLA抗原の分子性状

	クラス I	クラス II
Sephadex G-150分画	IgG~M分画	Void Volium
リボ蛋白分画	2nd Ppt, HDL	2nd Ppt, HDL
アガロース電気泳動 (易動度)	α-グロブリン分画	
細菌への吸着		
Sal. typhimurium	+	+
E. coli	+	+
HBB*による ELISA	+	+
counter immunoelectr- -ophoresis		
Western blot (page)	不成功	不成功
Western blot (dot)		

* HBB: HLA binding Bacteria

一方, Counter immunoelectrophoresis, western blot (PAGE, dot) 法にて遊離HLA抗原の検出を試みたが現在のところ成功するに至っていない。

本報文は第37回日本輸血学会総会(神戸)にて発表した。

文献

- 1) Van Rood, J.J, et. al: HLA Inhibitory Activity in Serum. In Histocompatibility Testing-1970. Mun Ksgaad, Copenhagen (ed. P.I. Terasaki) 1970, P.483~485
- 2) Allison, J.P, et. al: Biologic and Chemical Characterization of HLA Antigen in Human Serum, J. Immunol, 118:1004~1009, 1977
- 3) 辻 公美, 他: 血漿中遊離HLA抗原の性状の測定方法とその生物学的意義, 移植14:171~176, 1979
- 4) Pellegrino, M.A, et. al: HLA Antigen in Serum, Methods in Enzymology 108:614~625, 1984
- 5) 宮岡信恵, 他: 血清中遊離HLA抗原の性状, Proc.Jap. Soc.Immunol. 17:474, 1987
- 6) 宮岡信恵, 他: 血清中遊離HLA抗原の研究, 今日の移植, 1.3,226~230, 1988

愛媛県における骨髄移植の現況とドナープールの適正規模の推定

坂本尚穂 木下幸正 藤原郁子 高見俊才 井上博雄

Estimation of an Appropriate Size of Unrelated Donor pool for Bone Marrow Transplantation Based on Current Status in Ehime Prefecture

Hisaho SAKAMOTO, Kosei KINOSHITA, Ikuko FUJIWARA, Shunsai TAKAMI, Hiroo INOUE

We estimated an appropriate size of unrelated donor pool for HLA matched BMT. From these distribution of frequencis of HLA haplotypes, we estimated percent of potential BMT recipients to find at least one HLA matched donor in different donor pool sizes.

To find at least one HLA-identical donor for more than 75% of potential BMT recipients, it necessary to register 100,000 donor candidates.

Keywords: bone marrow transplantation, HLA, unrelated donor bank

はじめに

骨髄移植は、白血病、再生不良性貧血、先天性免疫不全症候群などの難治性疾患の根治療法として行われており、HLA抗原の検査、免疫抑制剤の開発等によって治療成績は向上してきている。

骨髄移植を行う際には、患者と骨髄提供者間にHLA抗原の一致が必要条件と考えられ、通常はHLAが遺伝的に一致した同胞（兄弟姉妹）間で行われている。愛媛県内においても、骨髄移植希望者が増加してきており、当所においても、骨髄移植のためのHLAタイピングを行ってきた。

今回は、当所でHLAタイピングを実施した移植希望者の実状および移植可能な提供者の出現頻度について検討し、ドナープールの適正規模を推定したので報告する。

対象と方法

愛媛県内における骨髄移植希望者のうち当所においてHLAタイピングを実施した31例を対象とした。

HLAタイピングはNIH microlympho cytotoxicity test法に従った。

非血縁者ドナープールを推定するにあたり、当所と兵庫県立西宮病院の388家系の家族調査より同定でき

た776本のハプロタイプのうち、直接算定したハプロタイプ頻度を求めた¹⁾(表1)。このハプロタイプ頻度からHLA型の完全一致を前提として、2ハプロ1組の組合せのみで表現型頻度を算定した。

結果

当所においてHLAタイピングを実施した骨髄移植希望者31例の年度別、疾患別状況を表2、3に示した。

検査の結果、2ハプロタイプ一致の同胞を発見できたのは31例中10例(約1/3)であった。残り21例の2ハプロタイプ一致の同胞が見つからなかった患者のうち、ID No.2.8.17.22.24は、従兄等の血縁者についてもHLAタイピングを行ったが、2ハプロタイプ一致は発見できなかった(表4、5)。

表6に、10万人当たりの適合者数を表現型ごとに示した。枠内に各1千人、1万人および10万人の登録者の中で、少なくとも1人の適合者を発見できる表現型を示し、()内にその患者のパーセントを示した。その結果、登録者規模1千人で4.5%、1万人で31.8%、10万人で75.1%の患者が少なくとも1人の適合ドナーを得ることができる。

表1 ハプロタイプ頻度 ($\times 10^{-4}$)

HLA型				ハプロタイプ 頻度 ($\times 10^{-4}$)	HLA型				ハプロタイプ 頻度 ($\times 10^{-4}$)	HLA型				ハプロタイプ 頻度 ($\times 10^{-4}$)	HLA型				ハプロタイプ 頻度 ($\times 10^{-4}$)					
A	B	C	DR		A	B	C	DR		A	B	C	DR		A	B	C	DR		A	B	C	DR	
24 w 52 — 2	583	2 w 54 w 1 w 8	26	2 w 48 w 3	6N	13	24 14 — 4	13																
w 33 44 — w 13	387	2 w 54 w 1 9		2 w 48 — 2			24 35 w 3 2																	
24 7 w 7 1		2 w 70 w 7 w 8		2 w 48 — 9			24 35 — 4																	
24 w 54 w 1 4	258	2 w 75 w 3 4		2 w 48 NJ 25			24 35 w 3 —																	
2 w 46 w 11 w 8	155	2 — w 3 9		2 51 w 1 2			24 39 w 7 2																	
11 w 54 w 1 4	142	2 — — 9		2 51 w 7 w 13			24 39 w 7 NJ 25																	
26 w 61 — 9	116	11 w 48 — w 11		2 w 51 — NJ 25			24 39 w 7 w 8																	
2 7 w 7 1	103	11 51 — w 8		2 w 54 w 1 2			24 44 — w 13																	
11 w 62 w 4 4		11 51 — w 8		2 w 54 w 1 w 11			24 w 48 — 2																	
24 51 — 4		11 w 54 w 1 w 8		2 w 54 w 1 w 13			24 w 48 — 4																	
2 w 61 w 3 9	90	24 7 w 7 2		2 w 54 w 1 NJ 25			24 w 48 — w 8																	
2 w 75 w 3 9		24 13 w 3 —		2 w 54 w 1 NJ 28			24 w 48 — 9																	
24 w 61 w 3 4		24 35 w 3 w 8		2 w 54 w 1 —			24 51 w 1 4																	
2 35 w 3 w 8	77	24 w 46 w 11 4		2 w 55 w 1 2			24 51 w 3 9																	
2 w 61 — 9		24 51 — NJ 25		2 w 55 — 9			24 51 — 5																	
2 35 w 3 9	64	24 w 55 w 1 4		2 w 56 w 1 9			24 51 — 6N																	
11 39 w 7 w 8		24 w 60 w 3 4		2 w 60 w 3 4			24 51 — NJ 28																	
24 w 59 w 1 4		24 w 60 w 4 9		2 w 60 w 3 9			24 w 52 w 3 1																	
31 51 — 9		24 w 62 w 3 —		2 w 60 — 2			24 w 52 — 1																	
2 w 46 w 11 9	52	24 w 62 w 3 —		2 w 60 — w 8			24 w 52 — w 13																	
2 w 48 — 4		24 w 67 w 2 2		2 w 61 w 1 w 14			24 w 52 — NJ 28																	
2 w 54 w 1 4		24 w 70 w 7 4		2 w 61 w 4 4			24 w 54 w 1 w 8																	
2 w 55 w 1 4		26 35 — 4		2 w 61 w 7 NJ 28			24 w 54 w 1 w 13																	
2 w 61 w 3 w 8		26 w 48 — 2		2 w 61 w 3 4			24 w 54 — 4																	
11 w 61 — 9		26 w 60 w 7 NJ 28		2 w 61 w 3 w 13			24 w 55 w 1 9																	
24 w 46 w 11 w 8		26 w 61 w 3 4		2 w 61 — NJ 28			24 w 55 w 3 9																	
24 51 — w 8		26 w 61 — —		2 w 61 — —			24 w 55 — w 11																	
24 w 52 — 4		26 w 62 w 3 NJ 25		2 w 62 w 3 4			24 w 56 w 1 w 8																	
24 w 62 w 3 4		26 w 62 — w 8		2 w 62 w 4 4			24 w 56 w 4 9																	
26 35 w 3 4		26 w 62 w 7 9		2 w 62 w 4 w 13			24 w 59 w 1 w 8																	
26 w 61 w 3 9		31 39 w 7 w 8		2 w 62 w 7 5			24 w 60 w 3 2																	
31 51 — 4		31 51 — w 11		2 w 62 w 3 —			24 w 60 w 3 w 8																	
w 33 44 — w 8		31 51 — w 13		2 w 62 — w 11			24 w 60 w 3 9																	
2 13 w 3 NJ 28	39	31 51 — —		2 w 67 w 7 4			24 w 60 w 10 9																	
2 w 48 — NJ 28		31 w 60 w 3 w 8		2 w 70 w 7 4			24 w 60 w 7 4																	
2 51 — 2		31 w 62 w 3 w 14		2 w 70 — 9			24 w 60 — 9																	
2 51 — 4		w 33 17 w 3 w 13		2 — w 1 2			24 w 60 — —																	
2 51 — 9		w 33 44 — w 14		2 — w 1 w 8			24 w 61 w 3 2																	
2 w 52 — 4		— 7 w 7 1		2 — w 3 2			24 w 61 w 3 9																	
2 w 62 w 3 4		— 7 — 1		2 — w 7 w 8			24 w 61 w 10 9																	
26 35 w 3 4		— 39 w 7 2		2 — w 1 —			24 w 61 w 3 9																	
26 w 61 w 3 9		— w 48 — 9		2 — — —			24 w 61 w 3 NJ 6																	
31 51 — 4		— w 48 — —		3 44 — 9			24 w 61 w 3 NJ 28																	
31 51 — w 8		— 51 — 4		11 27 — w 8			24 w 61 w 3 w 11																	
w 33 44 — w 8		— 51 — w 8		11 35 w 3 4			24 w 61 — 4																	
2 13 w 3 NJ 28	39	— w 52 — —		11 w 35 w 9 4			24 w 61 — w 8																	
2 w 48 — NJ 28		— w 54 — 2		11 w 35 — NJ 28			24 w 61 — w 8																	
2 51 — 2		— w 61 w 3 w 8		11 w 48 w 3 4			24 w 61 w 9 —																	
2 51 — 4		— — — 2		11 w 48 — 1			24 w 61 w 3 6																	
2 51 — 9		1 37 — w 10	13	11 w 48 — 2			24 w 62 — w 11																	
2 w 52 — 2		1 37 — 4		11 w 48 — w 14			24 w 67 w 7 w 8																	
2 w 59 w 1 4		1 37 — 6N		11 51 — 9			24 — w 7 2																	
2 w 62 w 3 9		2 7 — 6		11 w 51 — —			24 — w 7 4																	
2 w 62 w 7 4		2 7 — —		11 w 54 w 1 4			24 — w 11 —																	
11 w 48 — 9		2 13 w 3 w 8		11 w 54 w 1 —			24 — — 1																	
11 w 60 w 7 w 8		2 13 w 3 w 12		11 w 55 w 1 w 8			24 — — 9																	
24 7 — 1		2 39 w 7 9		11 w 55 w 1 9			26 7 w 7 4																	
21 35 w 3 4		2 35 w 1 2		11 w 55 w 1 NJ 28			26 7 w 1 —																	
24 51 — —		2 35 w 1 4		11 w 55 w 3 9			26 13 w 3 w 8																	
24 w 60 w 3 4		2 35 w 1 5		11 w 55 — —			26 35 w 3 w 8																	
24 w 61 w 3 —		2 35 w 3 1		11 w 56 w 1 NJ 28			26 37 — 9																	
24 w 61 — 9		2 35 w 3 2		11 w 56 — 2			26 39 w 7 4																	
24 w 62 w 4 4		2 35 w 3 4		11 w 60 w 3 4			26 44 — 9																	
26 w 61 — w 8		2 35 w 3 w 13		11 w 60 w 7 NJ 28			26 w 46 w 11 w 8																	
31 w 52 — 2		2 35 w 3 NJ 28		11 w 60 w 7 —			26 w 48 — —																	
w 33 w 60 w 7 4		2 35 w 4 9		11 w 60 — w 8			26 51 w 3 w 14																	
w 33 7 w 7 1		2 35 w 3 —		11 w 61 w 1 w 8			26 51 — 4																	
w 33 44 — —		2 38 w 7 w 8		11 w 61 w 3 5			26 51 — w 8																	
— w 46 w 11 w 8		2 39 w 7 2		11 w 61 — w 8			26 52 — 2																	
— — — w 8		2 39 w 7 9		11 w 62 — 4 9			26 w 54 w 1 9																	
1 — w 6 — 25		2 39 w 7 NJ 28		11 w 62 w 4 — 9			26 w 55 w 3 4																	
2 7 — 1		2 39 — 2		11 w 62 w 4 —			26 w 55 w 3 9																	
2 35 — 2		2 39 — 4		11 w 67 — 2			26 w 55 w 1 w 8																	
2 35 — NJ 28		2 44 — w 13		11 w 75 w 3 w 8			26 w 60 w 4 9																	
2 39 w 7 w 8		2 w 46 w 3 4		11 — 3 9			26 w 60 w 7 9																	
2 51 — w 8		2 w 46 w 1 w 8		11 — — w 8			26 w 60 — w 14																	
		2 w 46 w 3 w 8		24 13 1 w 8			26 w 61 w 3 2																	
				24 13 w 3 NJ 28			26 w 61 w 3 5																	

HLA型				ハロタイプ 頻度 ($\times 10^{-4}$)	HLA型				ハロタイプ 頻度 ($\times 10^{-4}$)
A	B	C	DR		A	B	C	DR	
26	w 61	w 3	-	13	-	35	w 4	-	13
26	w 62	w 3	2		-	39	w 7	v 4	
26	w 62	w 3	6N		-	39	w 7	v 8	
26	w 62	w 3	w 8		-	39	-	w 8	
26	w 62	w 3	9		-	44	-	w 8	
26	w 62	w 3	-		-	w 46	w 11	9	
26	w 62	w 9	9		-	w 48	-	2	
26	w 62	w 4	4		-	w 48	-	6N	
26	w 62	w 4	NJ 25		-	w 52	-	2	
26	w 70	w 7	4		-	w 52	-	NJ 25	
26	w 70	w 7	-		-	w 54	w 1	w 14	
26	-	w 3	9		-	w 55	w 1	4	
26	-	w 3	w 14		-	w 55	w 1	w 8	
26	-	w 3	-		-	w 55	w 3	9	
26	-	w 7	w 8		-	w 56	-	9	
26	-	w 11	9		-	w 59	w 1	4	
26	-	-	w 8		-	w 60	w 3	9	
26	-	-	9		-	w 60	w 4	9	
26	-	-	-		-	w 61	w 3	4	
31	7	w 7	1		-	w 61	-	w 14	
31	7	-	1		-	w 61	-	9	
31	21	-	-		-	w 62	w 3	2	
31	35	w 3	4		-	w 62	w 3	-	
31	35	w 3	9		-	w 62	w 3	NJ 25	
31	35	w 4	4		-	w 62	w 7	w 8	
31	35	w 4	NJ 25		-	-	w 3	4	
31	35	w 4	-		-	-	w 3	9	
31	35	-	4		-	-	w 7	-	
31	35	-	5		-	-	-	1	
31	35	-	9		-	-	-	9	
31	37	-	w 10		-	-	-	-	
31	39	w 7	9		-	-	-	-	
31	44	-	w 13		-	-	-	-	
31	w 46	w 11	w 8		-	-	-	-	
31	w 48	-	4		-	-	-	-	
31	w 48	-	-		-	-	-	-	
31	51	-	1		-	-	-	-	
31	51	-	2		-	-	-	-	
31	51	-	w 14		-	-	-	-	
31	51	-	NJ 28		-	-	-	-	
31	w 54	w 1	1		-	-	-	-	
31	w 54	w 1	4		-	-	-	-	
31	w 54	w 1	9		-	-	-	-	
31	w 55	w 1	NJ 28		-	-	-	-	
31	w 56	w 4	4		-	-	-	-	
31	w 60	w 1	9		-	-	-	-	
31	w 60	w 3	4		-	-	-	-	
31	w 60	-	2		-	-	-	-	
31	w 60	-	w 8		-	-	-	-	
31	w 61	w 3	3		-	-	-	-	
31	w 61	w 3	4		-	-	-	-	
31	w 61	w 3	w 8		-	-	-	-	
31	w 61	w 3	9		-	-	-	-	
31	w 61	w 3	NJ 28		-	-	-	-	
31	w 61	-	NJ 28		-	-	-	-	
31	w 61	-	9		-	-	-	-	
31	w 61	-	w 14		-	-	-	-	
31	w 62	w 3	2		-	-	-	-	
31	w 62	w 4	w 8		-	-	-	-	
31	w 70	w 1	-		-	-	-	-	
31	5135	w 3	w 8		-	-	-	-	
31	w 75	w 3	9		-	-	-	-	
31	-	w 4	-		-	-	-	-	
31	-	w 3	4		-	-	-	-	
w 33	35	w 3	9		-	-	-	-	
w 33	44	w 1	w 8		-	-	-	-	
w 33	44	w 7	7		-	-	-	-	
w 33	44	-	1		-	-	-	-	
w 33	44	-	2		-	-	-	-	
w 33	44	-	4		-	-	-	-	
w 33	44	-	9		-	-	-	-	
w 33	44	-	w 11		-	-	-	-	
w 33	44	-	NJ 28		-	-	-	-	
w 33	w 46	w 11	w 8		-	-	-	-	
w 33	w 54	w 1	-		-	-	-	-	
w 33	w 60	w 3	4		-	-	-	-	
-	7	w 7	9		-	-	-	-	
-	35	w 3	1		-	-	-	-	

表2 骨髄移植希望者の年度別検査数

年 度 別	人 数
S 6 0 年 度	2
6 1	6
6 2	8
6 3	15
計	31

表3 骨髄移植希望者の疾患別検査数

疾 患 別	人 数
再生不良性貧血	8
A L L	7
A M L	6
C M L	5
ゴ-シェ病	1
リンパ芽球性貧血	1
赤芽球性貧血	1
骨髄異型性症候群	1
悪性リンパ腫	1
計	31

表4 同胞間の適合者

ID No	性	疾患名	H L A 型				同胞数	非同胞間の適合者数 (10万人当たり)	
			A	B	C	DR			
1	F	AML	2	51	-	4	24 w52 - 2	1	46
13	F	CML	31	35	-	5	24 w54 w1 1	2	0.3
15	F	AML	24	w52	-	2	24 51 - -	3	46
18	M	CML	24	w52	-	2	- w52 - 2	2	15
19	M	ALL	11	13	w7	5	24 w52 - 2	2	15
20	M	CML	24	7	w7	1	2 51 - 4	3	30
27	M	AML	26	w60	-	9	2 w48 w3 -	3	0.3
29	F	ALL	24	w52	-	2	24 w52 - 2	1	352
30	M	慢性リンパ腫	2	w61	-	NJ28	24 7 w7 1	2	20
31	M	再生不良性貧血	11	-	w7	4	31 w60 w3 w8	1	1

表5 同胞間の非適合者

ID No	性	疾患名	H L A 型				同胞数	血縁者数	非同胞間の適合者数 (10万人当たり)	
			A	B	C	DR				
2	M	ALL	31	w60	w3	w8	26 w61 w3 2	1	30	0.6
3	F	ALL	24	w60	w3	2	11 w62 w4 4	2		3
4	F	再生不良性貧血	11	w55	w1	w8	26 13 w3 w8	1		0.3
5	M	ALL	w33	17	w3	w13	24 w62 w4 4	1		1
6	M	AML	24	w52	-	2	2 - w3 w8	3		15
7	F	再生不良性貧血	2	39	-	4	11 w62 w4 4	3		3
8	F	リンパ腫	24	w48	-	-	31 51 - 4	0	5	0.6
9	M	AML	(A2A11, B7Bw46, Cw1Cw11, DR9-)					2		-
10	M	再生不良性貧血	2	w46	w3	4	31 w48 w11 w8	1		0.3
11	M	リンパ腫	2	w54	w1	5	2 w52 - 2	1		0.3
12	M	再生不良性貧血	24	w52	-	4	11 w48 w3 4	2		1
14	M	再生不良性貧血	26	w61	w1	4	1 37 w6 -	2		0.3
16	M	再生不良性貧血	24	w52	-	4	24 w62 w3 -	2		3
17	M	急性骨髄性白血病	26	-	-	9		2	7	-
21	M	ALL	24	w54	w1	4	24 13 w3 -	1		13
22	F	CML	24	35	w3	4	26 35 w3 4	1	20	4
23	M	再生不良性貧血	w33	7	w7	1	31 51 - -	1		2
24	F	再生不良性貧血	24	7	w7	1	24 w54 w1 4	2	5	200
25	F	AML	31	w62	w1		w33 44 -	2		-
26	F	ALL	2	w67	w7	4	26 35 w3 4	3		1
28	F	CML	(2)w54 w1 2				(31) - - -	1		-

表6 100,000人当たりの適合者数

ハプロタイプ (例)		頻度 (10 ⁴)	ハプロタイプ数	1,000人(4.5%)**																								
A	B	C	DR	593	1	352																						
24	w52	-	2			(300)*																						
B	w33	44	-	w13	387	2	459	150																				
C	24	w54	w1	4	258	1	306	200	87																			
D	2	w46	w11	w8	155	1	184	120	80	24	10,000人(31.8%)**																	
E	11	w54	w1	4	142	1	168	110	73	44	20																	
F	26	w81	-	9	118	1	138	90	60	36	33	13																
G	2	7	w7	1	103	3	122	80	53	32	30	24	11	(21)*														
H	2	w75	w3	9	90	3	107	70	46	28	28	21	19	8														
I	2	w61	-	9	77	2	91	60	40	24	22	18	18	14	6	100,000人(75.1%)**												
J	11	39	w7	w8	64	4	76	50	33	20	18	15	13	12	10	4	(8)*											
K	2	w48	-	4	52	18	62	40	27	16	15	12	11	9	8	7	3	(5)*										
L	2	w62	w3	9	39	25	46	30	20	12	11	9	8	7	6	5	4	2	(3)*									
H	24	35	w3	4	26	55	31	20	13	8	7	6	5	5	4	3	3	2	(1.3)*									
H	1	37	-	w10	13	292	15	10	7	4	4	3	3	2	2	2	1	1	0.6									
																			(0.3)*									
																			0.16									

*下段ホモ、()ヘテロ頻度

**少なくとも1人の適合者を見出す登録規模と適合ドナーを得る患者の%

考察

骨髓移植希望者は全国的にみても、また、当所における検査数の増加からみてもわかるとおり、年々増えてきている。しかしながら、骨髓移植を実施するには、原則として患者と骨髓提供者間にHLAの一致した同胞が必要であるため、約2/3の患者は、非血縁適合ドナーに頼らざるをえない。

今回、各HLA型の患者に対する適合者の出現頻度とドナープールの適正規模について推定した。その結果、ドナープールの規模が大きくなるにつれて適合者の得られる患者の割合は高くなっており、約75%の患者が最低1人の完全適合骨髓提供者を得るには、10万

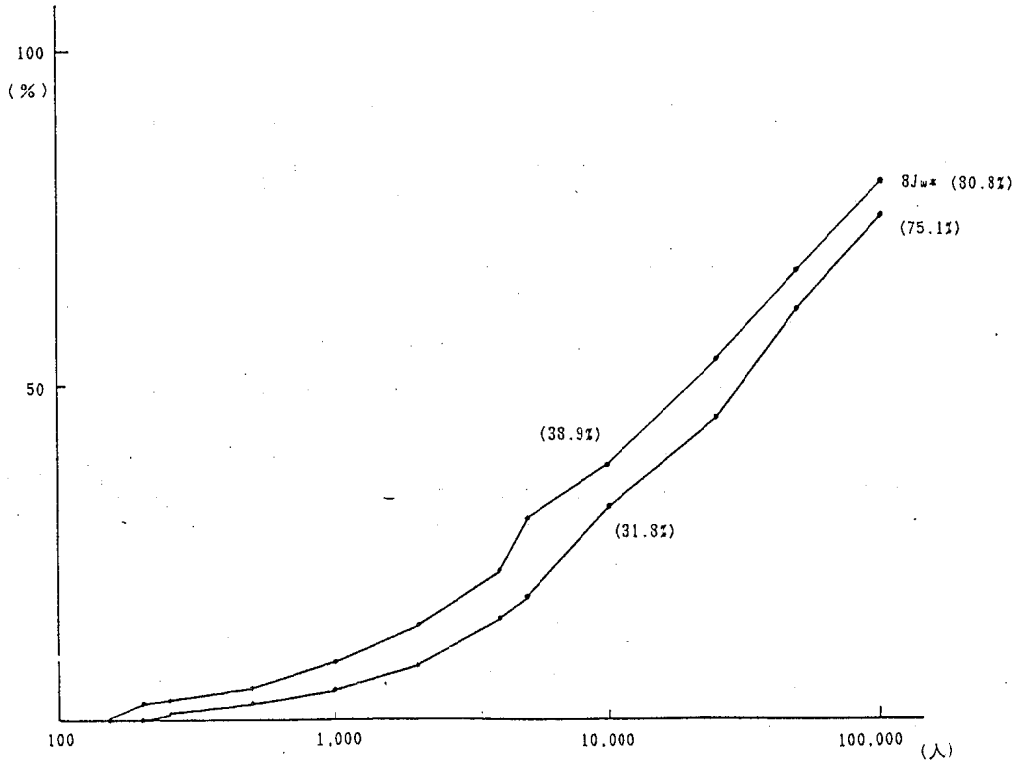
人規模のドナープールが必要となる(図1)²⁾。このことは、全国規模の非血縁骨髓バンク設立の必要性を示唆している。

本研究の要旨の一部は、第33回中四国輸血学会にて発表した。

文献

- 1) 井上博雄：今日の移植，1-3，276-278 (1988)
- 2) 十字猛夫：第8回日本HLAワークショップ，移植，17,476-546; 18,59-203 (1983)

図1 少なくとも1人の適合者を見出す登録規模と
適合ドナーを得る患者の%



*8Jw:第8回日本HLAワークショップ資料より

ATLの疫学調査について

高見俊才 藤原郁子 木下幸正 坂本尚穂 井上博雄
宮本直明※1 兼吉 章※1 近藤俊文※1 伊藤孝徳※2 森純一郎※2
富岡尚徳※3 吉田良一※3 小泉幸夫※4

Seroepidemiological Study on Adult T cell Leukemia

Shunsai TAKAMI, Ikuko FUJIWARA, Kosei KINOSHITA, Hisaho SAKAMOTO, Hiroo INOUYE
Naoaki MIYAMOTO, Akira KANEYOSHI, Toshifumi KONDO, Takanori ITO, Junichiro MORI,
Naonori TOMIOKA, Ryoichi YOSHIDA, Yukio KOIZUMI

Serological survey for anti-ATLA antibody was performed by Gelatin particle agglutination test. Among healthy inhabitants in Nanyo district, seropositive rates were 4.8% in male, 7.9% in female respectively. Seropositive rate rose with age.

96 out of 3,202 pregnant were HTLV-I seropositive. When the seropositive mothers were delivered, cord blood and breast milk were tested for HTLV-I antigen and antibody. As the result, only the maternal antibody was found until eight month, but no seroconversion of the babies were observed.

Keywords : ATL, HTLV-I, Maternal Transmission

はじめに

ATL (成人T細胞白血病) は、九州、南四国に患者の多発する疾患である。原因ウイルスであるHTLV-Iはフリーのウイルスのみでは感染せず、生細胞とともに取り込まれることによって感染することが知られている。感染経路としては、輸血による感染、母子感染、夫婦間感染が主として考えられている。1986年11月以降献血の抗ATLA抗体スクリーニングが実施され、輸血による感染はなくなったので、現在では母子感染の予防が最も主要な課題と考えられている。また、母子感染は母乳を介して起こることが一條ら¹⁾、日野ら²⁾により報告されている。

そこでATL患者多発地域である南予地域において住民および妊婦の抗ATLA抗体測定を行った結果を報告する。

対象と方法

1982年から住民健診で得られた血清および1986年から南予地域の3病院(1987年から4病院)を受診した妊婦の血清を対象とした。抗ATLA抗体測定はゼラチン粒子凝集法(PA法、フジレビオ社製セロディアATLAキット)を用いて行った。陽性血清はMT-I細胞を用いた蛍光抗体法も併用した。

抗ATLA抗体陽性妊婦の出産時に、母体血、臍帯血および母乳を採取し、HTLV-I抗原、抗体を検査した。抗原の検出は、フィコールコンレイにてリンパ球分離後、TCGF加RPMI1640で、10日から数週間培養を行い、途中一部ずつ数回採取して、風乾アセトン固定をして、モノクローナル抗体(GIN-7, FR24, FR28)を用いて間接蛍光抗体法で行った。

※1 市立宇和島病院

※2 愛媛県立南宇和病院

※3 八幡浜市立総合病院

※4 小泉産婦人科医院

結果と考察

南予地域における性別、年齢別抗ATLA抗体保有状況を図1に示した。20歳未満では男性1例、女性2例のみ陽性であった。20歳以上70歳までは男女とも加齢とともに抗体保有率の上昇がみられた。30歳以上は男性より女性の抗体保有率が高率であり、夫婦間感染で夫から妻への一方向に感染が起っていることを窺わせる結果であった。南予地域住民の男性4.8%女性7.9%がそれぞれ陽性であった。

次に南予地域2市1町の病院を受診した妊婦の年齢別抗ATLA抗体陽性率を表1に示した。1986年3%、1987年2.5%、1988年3.5%計3,202例中96例(3.0%)が陽性であり、妊婦の約3%が陽性であることが示された。

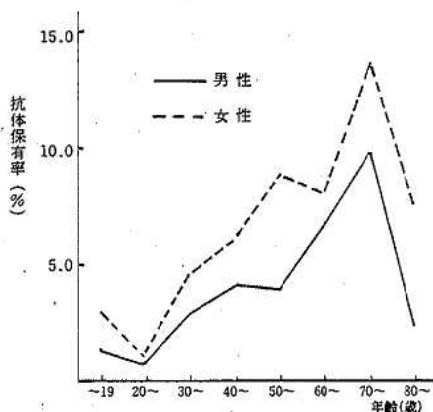


図1 南予地域における性別、年齢別抗ATLA抗体保有状況

表1 妊婦の抗ATLA抗体保有状況 (PA法)

1988.12.26 現在

年齢\年度	1986	1987	1988	計
~19	0/12(0)	0/15(0)	0/22(0)	0/49(0)
20~	2/108(1.9)	0/252(0)	10/254(3.9)	12/614(2.0)
25~	12/302(4.0)	16/638(2.5)	24/643(3.7)	52/1583(3.3)
30~	3/143(2.1)	11/301(3.7)	9/314(2.9)	23/758(3.0)
35~	0/30(0)	3/74(4.1)	3/65(4.6)	6/169(3.6)
40~	1/3(33.3)	2/14(14.3)	0/12(0)	3/29(10.3)
計	18/598(3.0)	32/1294(2.5)	46/1310(3.5)	96/3202(3.0)

年齢区分毎に比較すると、19歳以下では陽性率0%であったが、20~40歳代では3%前後、40歳以上では高い陽性率であった。一般住民の抗体保有率は加齢とともに上昇が認められたが、妊婦の場合は20~39歳が大半を占めるため、年齢差による陽性率の差は明らかでなかった。

また妊婦の出生地別に抗ATLA抗体陽性率の比較を行った(表2)。南予以外の出身者は例数も少なかったが陽性率も低率であった。南予地域出身者全体では、3.2%で、市郡別には1.9~5.1%の差がみられ、妊婦の出身地別抗体保有状況は住民の市町村別の抗体保有状況と類似していた³⁾。

表2 妊婦の出身地別抗ATLA抗体保有状況

地域別	検査数	陽性者数(%)
県外	252	4 (1.6)
東予	28	0
中予	70	1 (1.4)
A市	475	9 (1.9)
南B*	685	20 (2.9)
C*	59	3 (5.1)
予D郡	35	1 (2.9)
E*	613	25 (4.1)
F*	102	2 (2.0)
G*	256	6 (2.3)
H*	627	25 (4.0)
計	2852	91 (3.2)
総計	3202	96 (3.0)

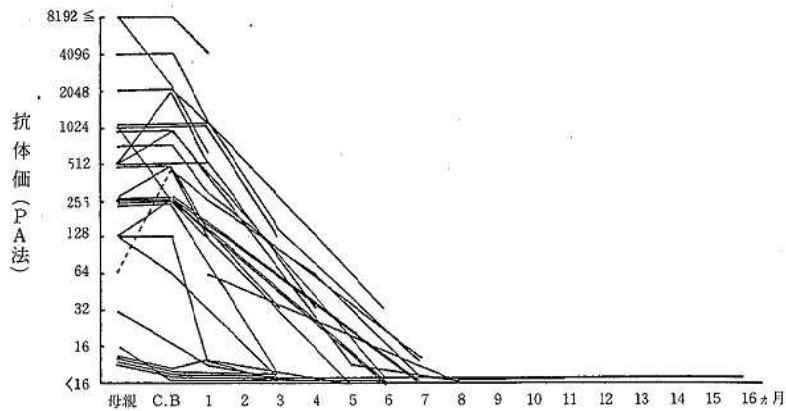


図2 抗ATLA抗体陽性妊婦の出産児の抗体価の変動

抗ATLA抗体陽性妊婦の出産時に、母親と臍帯血の抗体価はほぼ同力価であった。その後の追跡調査で8ヵ月後までに陰性化しなかった例がないことから、総て移行抗体であると思われる(図2)。またその後の追跡調査(最長2年間)で陽転化した例は見られていない。

本論文の要旨は第33回中四国輸血学会で発表した。

まとめ

抗ATLA抗体保有の血清学的調査をPA法にて行い、南予地域の住民において、男性4.8%、女性7.9%が

それぞれ陽性であった。抗体保有率は加齢に伴って上昇がみられた。

また、妊婦3202例中96例が抗体陽性であった。この陽性妊婦の出産児のHTLV-I抗原・抗体調査を行っているが現在まで陽転例はみられていない。

文献

- 1) 一條元彦他：日本医事新報，3267：11～14，1986
- 2) Hino S. et al：Jpn. J.Cancer Res, 76：474～480，1985
- 3) 高見俊才他：感染症学雑誌，62：7～11，1988

愛媛県内主要河川の水質特性について

石丸尚志 出口修一 篠崎由紀* 大倉敏裕 中島庄一

Water Quality of Rivers in Ehime Prefecture

Takashi ISHIMARU, Shuichi DEGUCHI, Yuki SHINOZAKI, Toshihiro OHKURA, Shoichi NAKAJIMA

Inorganic and organic compounds in water of major 6 rivers in Ehime prefecture were measured at several sampling points on each river.

Inorganic composition of water in every rivers were grouped into a type of calcium carbonate in a key diagram, except Iwamatsu river indicating intermediate type among calcium carbonate, magnesium sulphate and sodium chloride. The ratio of inorganic components were unchangeable throughout flow course of every river.

Organic compounds from pollution were detected in almost all the points. In some points the source of pollution was presumed to be generated from human activities.

The level of contamination in water of every river except one point showed low enough to utilize as resource of drinking water.

Keywords : Inorganic components ratio, Organic contamination, Source of load

はじめに

愛媛県内主要河川の栄養塩からみた水質特性については、前報にて示したが¹⁾、栄養塩類の挙動から見れば、県内主要河川の水質は、ほとんどの地点で良好であった。また、他の主要成分の挙動からも、地質との関連が示唆されたほか、人為的要因による流下過程での水質変化が示唆された。

また、流下過程に存在する貯水池(ダム)の評価については、利水上の便のみならず、負荷の受皿としての役割が示唆された。負荷源は、自然系・農耕系・家庭排水系の3タイプが考えられたが、水道水源としての評価からは、人為的負荷の考えがたい地点でも、水道水源とはなりにくい地点があることが推察された。

それを受けて本報では、前報¹⁾のデータに、1988年~89年のデータを追加し、更に採水地点も銅山川で、1ポイントを追加したほか、汚濁負荷源を特定するのに有益な資料を提供する項目として、陰イオン界面活性剤(MBAS)、アンモニア性窒素(NH₄-N)浮遊物

質量(SS)、過マンガン酸カリウム消費量(C-KMnO₄)等の項目を追加して調査した結果汚濁解析に有益な資料を提供した。また、主要溶存成分についても、解析を実施し、地質由来成分、人間活動由来成分の判別を行った。同時に、採水時点と、直前の降雨のパターンの類型化を行い、その集水域の特性が、河川水質にいかなる影響を与えるかについて考察した。

このように、多面的角度から河川の水質特性について考察を加えたので報告する。

採取地点および時期・分析項目・分析方法

図1に、河川水の採取地点を、番号で示す。新たに追加した点は、銅山川の別子ダム上流に新たに採取地点を設置したことである。その地点の特徴は、それより上流には人間が住んでいないことであり、銅山川(吉野川)水系の源流といえるポイントである。その他の地点の所在地および、特徴は前報¹⁾に示したとおりであり、変化はない。

採取時期は、1987年4月、7月、10月、1988年1月、4月、7月、10月、1989年1月の計8回である。

* 現愛媛県公害技術センター

調査項目は、現場で水温、気温・流速（浮き子により一定間隔で測定）・断面の形状の測定を行い、流速と断面積から流量を実測した。

水質分析は、pH値、電気伝導度（EC）の他、
主要成分としては、Na、K、Ca、Mg、Cl、CO₃

SO₄、NO₃-N、その総量としてT・I
（meq/l）

栄養塩として、NH₄-N、T-N、PO₄-P、T-P、SiO₂
汚濁指標として、MBAS、SS、C-KMnO₄

分析方法は、概ね上水試験方法、JISK0102に、従ったが、それ以外の項目は以下に示すとおりである。

Na、K	炎光光度法
CO ₃	中和滴定法
T・I	主要成分をミリグラム当量/lで表しその総量として求めた。
T-N、T-P	環境庁告示法
MBAS	MIBK抽出吸光光度法 ²⁾

分析結果

表1に、各採水地点における主要成分の状況を最大～最小、下段に平均値（銅山川①は4回の平均、その他の地点については8回の平均）を掲げた。T・Iは平均値のみ掲げた。

同様に、表2には、Fe、Mn、Zn、Cuの金属成分、N、P等の栄養塩類、MBAS、SS等汚濁関連因子を同様に表した。

1. 主要成分について

陽イオンとして、Na、K、Ca、Mg、陰イオンとして、Cl、CO₃、SO₄、NO₃-Nが、通常の水における主要溶存イオンである。

それぞれのイオンのその水の中での、構成比率により、水質の類型化を行うことができる。また、イオン総量T・Iは、汚濁成分の負荷量と同様に、雨水が地表を流下したり、一度地下に浸透したのち、再度表流水となってでてくる、または人為的活動に利用された後の水であるかというような水の進化を表す指標と考えられる。

その、二点からの考察を加えていくが、概して言えることは、各河川において、主要成分の構成比率はある程度定まっており、炭酸カルシウム型、炭酸ナトリウム型・硫酸マグネシウム型等の類型化ができ、また、各河川においてもその流下過程で、イオン総量が漸増しているのがわかり、水の進化が読み取れる結果となっている。

季節変動に関しては見られず、流量との逆相関が読み取れる結果となっている。各河川の特徴については後に考察する。

2. 金属成分について

各河川とも、SS態に起因すると推測されるもののFeが多量に検出された。しかし、他の金属成分はほとんど検出されず、利水上の問題点はないものと考えられる。

3. 栄養塩類について

状況は、前報¹⁾とほとんどかわりない。

4. 汚濁関連因子について

県内河川で、MBASについて報告された例は小野川に見られるのみで²⁾、今回実施した全県下のMBASについての調査結果から、生活排水による汚染が各河川に広がっていることがわかる。

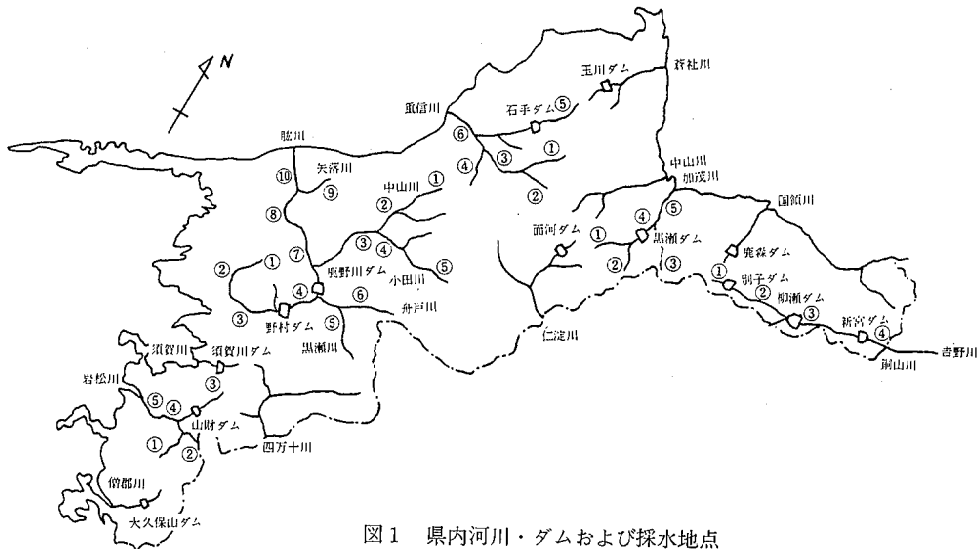


図1 県内河川・ダムおよび採水地点

表 1 主要成分の状況

	場所	pH 値	EC ($\mu\text{S/cm}$)	Na (mg/l)	K (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)	Cl (mg/l)	CO ₃ (mg/l)	SO ₄ (mg/l)	NO ₃ -N (mg/l)	SiO ₂ (mg/l)	T I (meq/l)
銅 山 川	①中七番	7.77-7.16 7.49	74.1-33.2 55.1	1.79-1.40 1.54	0.46-0.34 0.39	10.84-3.73 7.33	1.41-0.56 1.10	2.13-1.13 1.77	16.57-5.40 10.68	6.34-4.22 5.28	0.15-0.05 0.11	6.28-4.18 5.22	1.057
	②南向院	8.40-7.59 7.93	61.5-45.5 56.0	1.84-1.90 1.53	0.45-0.21 0.23	9.76-6.89 8.36	2.07-0.60 1.23	2.84-1.13 1.93	14.40-9.60 12.41	7.40-0.67 5.74	0.08-0.00 0.04	6.31-4.90 5.78	1.183
	③神竜橋	9.09-6.78 7.45	102-48.1 64.3	3.95-1.54 2.76	1.49-0.41 0.89	13.11-4.80 7.99	2.24-0.49 1.56	5.96-1.84 3.71	18.78-6.54 11.49	12.68-4.32 7.77	0.72-0.22 0.36	10.01-5.17 6.96	1.347
	④新宮下	8.60-7.54 8.08	130-102 114	9.75-5.63 7.05	1.61-1.23 1.39	15.43-12.60 13.77	2.72-1.80 2.18	9.93-5.39 7.59	20.34-15.96 18.16	19.12-14.22 16.71	1.30-0.68 0.87	10.90-7.22 8.76	2.439
加 茂 川	①高 深	8.06-6.99 7.69	80.1-69.4 69.4	2.57-1.96 2.21	0.48-0.34 0.38	11.78-6.41 9.43	1.92-0.97 1.48	4.40-2.27 3.21	16.32-9.36 14.07	6.24-3.27 5.21	0.50-0.36 0.42	6.75-2.27 5.28	1.396
	②西之川	8.00-7.32 7.60	197-84.5 144	9.50-2.77 6.21	0.94-0.44 0.74	24.36-10.86 18.93	4.18-2.62 3.07	14.89-5.39 9.47	35.34-15.96 26.71	18.64-10.43 14.86	0.63-0.32 0.51	7.98-4.54 6.36	2.990
	③中之池	7.95-7.24 7.70	92.2-60.5 82.2	1.66-1.24 1.48	0.45-0.16 0.24	14.83-12.02 13.02	2.36-1.39 1.98	3.26-1.99 2.38	18.66-16.20 11.33	13.26-9.41 10.96	0.32-0.24 0.28	6.32-4.23 5.24	1.775
	④兔の山	7.97-7.39 7.68	89.6-63.5 75.7	2.59-1.80 2.24	0.63-0.40 0.57	10.39-7.00 8.64	2.16-1.43 1.79	3.97-1.13 2.89	14.22-9.84 11.72	11.43-6.63 8.73	0.87-0.32 0.59	6.97-4.82 5.73	1.387
	⑤国道橋	8.65-7.84 8.21	96.4-81.1 88.1	3.00-2.05 2.52	0.57-0.25 0.47	13.19-10.10 11.71	2.58-1.41 2.10	4.25-2.84 3.53	17.70-15.12 16.44	10.28-5.96 9.18	0.68-0.44 0.56	7.17-5.03 5.88	1.757
重 信 川	①木 地	7.92-7.62 7.75	98.6-82.2 92.9	4.36-3.90 4.15	1.60-0.68 0.89	13.35-10.22 11.60	2.45-0.85 1.49	4.68-2.84 3.86	16.02-13.26 14.41	16.04-11.24 14.06	0.55-0.28 0.40	14.65-9.39 11.86	1.816
	②表 川	7.85-7.44 7.64	91.4-66.4 80.7	7.71-6.18 6.80	1.50-0.48 0.71	17.17-3.61 5.65	4.47-1.22 2.18	5.53-3.66 4.43	16.44-11.16 14.14	15.27-4.03 6.79	0.68-0.37 0.49	20.17-13.49 17.04	1.548
	③拜志橋	8.87-7.57 8.11	168-124 148	8.84-6.67 7.79	3.10-1.35 1.92	21.60-12.91 18.22	4.57-1.65 3.29	8.57-6.24 7.09	27.96-17.88 23.37	29.39-21.67 24.68	1.70-0.94 1.31	18.85-12.40 15.49	3.154
	④砥部川	8.07-7.81 7.95	148-87.4 123	7.14-4.76 5.70	1.80-0.57 0.88	15.12-7.33 12.87	12.35-3.77 5.45	7.66-5.36 6.49	29.73-17.82 24.62	39.10-8.03 14.43	1.00-0.66 0.76	16.05-10.01 13.33	2.720
	⑤米野々	7.95-7.64 7.84	107-74.9 93.9	4.66-3.92 4.20	1.50-0.07 0.64	14.76-7.29 12.11	1.99-0.83 1.48	4.54-3.82 4.15	22.32-11.46 18.54	8.84-6.15 7.24	0.47-0.38 0.59	16.58-11.58 13.57	1.853
	⑥出合橋	9.04-7.30 7.91	285-179 231	21.77-11.55 15.54	5.90-2.48 3.70	29.58-12.64 23.77	13.00-3.26 5.25	21.27-11.34 15.95	41.92-23.56 32.39	35.93-27.05 33.00	4.27-0.92 2.35	15.19-10.02 13.26	4.774
小 田 川	①佐礼谷	7.92-7.47 7.63	126-89.8 112	4.95-3.90 4.35	0.77-0.62 0.68	13.72-10.14 11.95	5.74-4.13 4.67	8.22-6.52 7.43	15.55-10.17 12.89	20.65-16.14 18.62	2.43-1.63 2.27	13.14-8.97 11.50	2.375
	②中 山	7.91-7.36 7.59	196-142 170	11.29-6.71 8.47	2.10-0.96 1.34	20.72-16.35 18.57	7.02-4.67 5.74	14.89-9.73 11.90	34.10-21.54 26.05	22.57-19.11 21.26	2.67-1.32 2.32	14.82-9.39 11.95	3.617
	③五十崎	8.77-7.66 8.20	152-112 135	6.15-4.89 5.42	1.28-0.59 0.95	19.16-14.09 17.34	4.62-2.50 3.96	8.57-5.67 5.90	32.06-21.78 26.54	19.12-13.06 14.91	1.35-0.34 0.97	13.55-9.44 11.58	2.910
	④河口橋	8.71-7.88 8.22	147-96.8 124	5.36-3.76 4.44	1.08-0.70 0.89	19.04-14.03 16.96	3.79-2.26 3.13	6.66-4.54 5.46	30.81-21.83 26.08	12.87-9.41 11.16	0.88-0.48 0.73	13.45-8.92 11.62	2.629
	⑤小田上	8.32-7.65 8.02	125-89.4 107	2.89-2.53 2.69	0.65-0.42 0.54	17.03-13.51 15.37	3.35-1.46 2.57	4.62-3.26 3.79	25.06-20.04 22.21	12.87-6.44 10.47	0.57-0.33 0.43	12.96-8.45 10.76	2.205
腋 川	①平野川	7.89-7.65 7.75	109-80.2 92.5	4.53-3.60 3.91	1.30-0.36 0.57	14.88-6.41 11.03	4.50-2.11 3.00	6.95-4.66 5.28	27.18-18.06 21.48	7.68-3.07 4.64	0.45-0.03 0.19	12.49-9.42 10.77	1.957
	② 芝	8.51-6.93 7.36	136-100 119	6.57-4.68 5.60	2.20-0.76 1.40	16.51-12.94 14.62	3.91-2.26 2.94	9.93-5.39 8.03	29.94-19.92 24.17	11.62-6.44 8.45	1.01-0.05 0.51	13.77-8.56 10.24	2.496
	③下宇和	7.65-7.11 7.38	137-98 118	8.88-6.10 7.43	3.03-1.56 2.36	15.63-9.30 11.88	3.11-1.86 2.48	11.77-8.37 9.96	22.15-13.80 17.98	17.58-7.97 10.84	1.80-0.40 1.16	13.56-9.90 11.38	2.370
	④野 村	8.75-7.74 8.30	126-91.8 109	7.62-5.41 6.39	2.70-1.32 2.12	14.68-8.74 11.92	2.50-1.02 2.04	8.79-7.23 7.75	23.15-14.52 18.60	12.68-7.76 9.35	1.64-0.55 0.93	11.70-6.96 9.61	2.196
	⑤黒瀬川	9.11-8.22 8.43	139-110 123	6.34-5.21 5.73	2.00-0.87 1.23	16.92-14.11 16.76	3.11-1.48 2.27	6.24-5.10 5.69	33.38-23.63 27.59	10.95-7.20 9.11	0.77-0.24 0.48	12.76-8.08 10.69	2.610
	⑥舟戸川	8.38-7.79 8.09	165-123 144	6.48-5.44 5.92	1.17-0.59 0.85	25.61-17.23 20.52	4.13-1.73 2.85	5.96-4.54 5.62	38.10-26.56 32.05	18.31-11.43 13.81	0.82-0.16 0.48	13.84-8.70 11.72	3.086
	⑦鳥 首	8.35-7.62 7.91	138-103 121	6.29-4.40 5.27	2.10-1.08 1.34	16.03-12.26 14.90	4.20-1.87 2.99	7.66-5.39 6.68	28.62-19.38 23.82	12.58-8.35 10.31	1.24-0.55 0.87	15.12-7.09 10.49	2.513
	⑧臥 龍	8.16-7.51 7.80	138-104 121	5.90-4.60 5.24	2.10-1.04 1.32	16.07-12.10 14.66	3.89-2.33 2.96	7.54-5.96 7.09	27.66-18.78 23.02	12.10-6.11 10.30	1.22-0.74 0.95	14.63-7.96 10.72	2.483
	⑨矢落川	8.75-7.73 7.63	144-121 135	5.55-4.40 4.83	1.80-0.70 0.96	18.08-14.43 16.03	5.19-3.79 4.62	8.51-7.37 7.67	31.41-24.78 28.26	10.69-6.53 8.72	1.36-0.80 1.07	17.28-9.74 12.62	2.830
	⑩峠 橋	8.16-7.48 7.68	148-113 130	7.14-5.33 5.94	2.30-1.11 1.39	17.15-12.75 15.19	4.96-2.87 3.81	9.08-6.67 7.66	29.58-20.96 25.18	13.64-10.37 12.29	1.19-0.69 0.98	14.43-8.95 11.25	2.747
岩 松 川	①中之川	7.53-7.00 7.37	73.8-48.8 60.8	7.14-5.04 5.88	1.01-0.64 0.80	6.24-2.08 3.59	2.55-1.22 1.76	6.38-5.39 5.80	11.37-6.76 8.65	9.38-4.22 6.37	0.40-0.19 0.29	22.19-14.23 16.17	1.204
	②横 吹	7.33-7.23 7.28	50.7-39.6 45.4	6.15-4.10 4.71	1.40-0.52 0.75	3.40-0.80 1.78	3.85-0.70 1.58	6.24-4.66 5.58	6.58-4.13 5.54	11.39-0.86 4.13	0.55-0.14 0.37	19.44-11.75 13.96	0.898
	③御代川	7.66-7.19 7.43	62.3-51.2 54.6	5.50-4.30 4.83	0.77-0.49 0.67	4.72-2.31 3.70	1.99-0.41 1.26	5.67-4.11 4.88	8.28-5.98 7.53	7.97-0.00 5.48	0.41-0.26 0.30	17.08-11.77 13.33	1.039
	④嵐 部	7.35-6.81 7.09	70.8-53.5 62.5	7.57-4.77 5.53	1.20-0.67 0.83	7.25-3.40 4.83	2.94-0.82 1.51	7.09-4.82 5.80	15.85-7.08 9.42	10.28-5.09 6.60	0.69-0.29 0.39	16.49-11.62 13.58	1.270
	⑤三島橋	8.13-7.00 7.51	98.0-71.6 82.1	6.15-5.42 5.92	1.35-0.86 1.03	8.86-4.13 6.41	3.45-1.65 2.18	7.94-5.39 6.67	15.78-10.17 11.91	10.76-6.92 8.50	0.90-0.20 0.54	17.57-11.90 13.73	1.583

表2 その他成分水文データ

河川	場所	Fe ($\mu\text{g}/\ell$)	Mn ($\mu\text{g}/\ell$)	Zn ($\mu\text{g}/\ell$)	Cu ($\mu\text{g}/\ell$)	C-MnO ₄ (mg/ℓ)	PO ₄ -P ($\mu\text{g}/\ell$)	TP ($\mu\text{g}/\ell$)	NH ₄ -N ($\mu\text{g}/\ell$)	T-N (mg/ℓ)	MBAS ($\mu\text{g}/\ell$)	SS (mg/ℓ)	流量 ($\text{万}\ell/\text{日}$)	
銅 山 川	①中七番	14~6 9	1>~ 1>	10~2 4	2~1> 1>	2.5~2.3 (2.4)	3~1> 1	4~1> 2	16~5> (8)	0.24~0.10 0.14	10~5> (7)	0.8~0.5> (0.5>)	6.9~1.3 (4.1)	
	②南向院	28~3 10	1>~ 1>	5~2 3	3~2 2	2.6~1.9 (2.1)	8~4 5	10~5 6	14~5 (10)	0.29~0.10 0.14	19~5> (8)	0.5>~ (0.5>)	5~2 (3.2)	
	③神竜橋	667~13 163	72~1> 22	5~2 3	3~2 3	3.4~2.3 (2.6)	10~1> 4	10~3 6	19~7 (13)	1.12~0.31 0.51	31~5 (14)	2.4~0.5> (1.1)	27~26 (27)	
	④新宮下	123~14 42	9~1> 4	9~2 6	8~3 6	2.5~2.0 (2.3)	18~3 10	18~5 12	21~12 (10)	1.54~0.24 0.90	18~7 (13)	2.3~0.5> (1.3)	14~4 (8.7)	
加 茂 川	①高 瀑	29~6 16	1>~ 1>	6~2 4	1>~ 1>	2.3~1.6 (1.8)	5~1 3	7~1 4	15~5> (8)	0.65~0.10 0.39	11~5> (6)	0.6~0.5> (0.5>)	16~5 (10)	
	②西之川	32~8 19	1>~ 1>	15~2 10	4~2 3	1.7~1.1 (1.3)	4~1 3	5~1 3	18~6 (13)	0.67~0.25 0.50	11~5 (8)	1.0~0.5> (0.5>)	14~1 (4)	
	③中之池	61~5 22	1>~ 1>	17~4 7	4~2 3	1.6~1.0 (1.2)	3~1 2	6~2 4	5~5> (5>)	0.72~0.19 0.42	10~5> (5)	0.5>~ (0.5>)	32~7 (15)	
	④兎の山	1085~9 209	65~1> 26	7~3 5	2~2 2	3.6~2.7 (3.2)	12~2 4	36~4 15	46~12 (29)	0.93~0.33 0.62	16~5> (10)	5.5~1.0 (2.6)	37~15 (23)	
	⑤国道橋	214~14 64	6~1> 3	5~2 4	3~1 2	2.6~1.5 (1.8)	5~1 3	12~1 7	32~5> (10)	0.76~0.19 0.58	13~7 (10)	1.6~0.5 (0.9)	54~5 (25)	
重 信 川	①木 地	26~6 13	1>~ 1>	6~1 4	1>~ 1>	2.7~1.4 (1.0)	8~3 6	8~4 6	15~9 (12)	1.10~0.18 0.54	11~5> (5>)	0.7~0.5> (0.5>)	10~2 (5)	
	②表 川	120~11 50	4~1> 2	9~2 4	1>~ 1>	4.6~1.3 (3.0)	14~6 10	20~6 11	31~5> (10)	1.16~0.32 0.52	19~5> (9)	5.0~0.5 (2.1)	7~0.5 (1.8)	
	③拝志橋	138~18 67	4~1> 2	3~3 3	2~1> 1	5.7~2.2 (3.7)	124~11 37	135~14 47	35~25 (30)	1.65~0.93 1.26	42~7 (22)	5.4~1.8 (4.2)	53~5 (19)	
	④砥部川	85~13 44	5~1> 2	3~2 3	1~1> 1>	3.3~1.8 (2.5)	15~6 11	31~5 14	45~15 (30)	1.25~0.32 0.81	11~5> (7)	2.5~0.5> (1.3)	4.6~1 (3)	
	⑤米野々	114~4 58	4~1> 2	6~1 3	2~1> 1	4.2~2.0 (2.9)	13~2 5	17~3 4	29~5> (13)	1.25~0.25 0.63	16~5> (7)	3.0~0.6 (2.1)	38~8 (11)	
	⑥出合橋	275~63 141	42~12 19	38~5 15	2~2 2	7.0~5.9 (6.6)	306~82 188	547~140 275	771~374 (572)	6.70~1.79 3.55	306~18 (140)	8.0~2.3 (5.1)	84~13 (38)	
小 田 川	①佐礼谷	112~11 38	4~1> 1	15~3 8	5~3 4	2.4~1.5 (1.9)	58~20 30	58~22 31	7~5 (6)	3.38~1.62 2.30	6~5> (5>)	6.8~0.4 (2.3)	1.6~0.1 (0.7)	
	②中 山	296~20 105	14~1> 7	9~4 7	2~1 2	3.3~2.2 (2.7)	27~16 20	35~19 26	54~33 (44)	2.83~1.75 2.37	75~19 (41)	3.6~2.5 (3.1)	45~5 (19)	
	③五十崎	107~17 59	6~1> 4	10~2 4	3~2 2	3.6~2.1 (2.6)	21~6 15	26~8 19	53~6 (30)	2.23~0.43 1.09	44~5 (18)	3.2~0.8 (1.9)	83~25 (51)	
	④河口橋	128~25 63	5~1> 3	4~2 3	3~2 3	3.1~2.0 (2.4)	18~10 15	20~13 16	20~6 (13)	1.00~0.57 0.80	12~5> (8)	3.8~1.1 (2.3)	80~17 (35)	
	⑤小田上	99~12 40	4~1> 2	3~1 2	1~1> 1>	2.2~1.5 (1.9)	12~6 9	13~7 9	14~6 (10)	0.66~0.25 0.35	5>~ (5>)	3.7~0.6 (2.3)	3.4~1 (1.5)	
	⑥平野川	465~39 196	92~28 64	8~2 5	2~1> 1	3.3~2.3 (2.7)	23~6 13	29~10 18	35~20 (28)	0.55~0.14 0.28	48~5> (17)	6.6~1.2 (3.3)	1.8~0.1 (0.8)	
腋 川	② 芝	369~47 182	24~10 18	9~3 5	2~1 2	6.1~2.0 (3.5)	110~8 37	127~13 44	16~15 (10)	1.13~0.57 0.74	45~13 (28)	11.5~1.4 (4.8)	2.3~0.4 (1.3)	
	③下宇和	688~147 334	46~8 25	14~4 8	2~1 2	9.7~3.6 (6.6)	80~10 37	109~42 56	91~62 (70)	1.80~0.60 1.17	77~30 (32)	13.4~4.5 (9.6)	31~6.0 (1.7)	
	④野 村	153~29 94	6~4 5	17~3 8	1~1> 1	6.7~3.7 (4.9)	55~13 27	77~29 38	102~16 (54)	1.74~0.73 0.99	42~21 (32)	4.9~1.6 (3.0)	33~10 (1.9)	
	⑤黒瀬川	122~13 48	4~1> 2	4~2 3	2~1> 1	4.4~1.9 (2.7)	28~8 15	26~13 20	19~14 (17)	0.79~0.31 0.51	53~8 (23)	2.4~0.5> (1.1)	23~9 (15)	
	⑥舟戸川	96~11 37	4~1> 1>	18~2 7	1~1> 1>	4.5~2.0 (2.7)	17~6 11	30~10 16	12~7 (10)	0.84~0.18 0.46	93~7 (48)	0.9~0.5> (0.6)	24~1 (6)	
	⑦鳥 首	297~13 92	9~1> 4	6~2 5	1~1> 1>	4.0~2.8 (3.3)	18~5 9	30~10 9	51~12 (32)	1.34~0.80 1.13	18~5> (10)	6.2~1.5 (3.5)	198~32 (112)	
	⑧臥 龍	410~32 128	28~2 9	6~2 3	1~1> 1	3.4~2.3 (3.1)	18~5 11	32~8 19	39~4 (22)	1.21~0.81 0.94	29~5> (13)	4.5~1.7 (3.3)	352~33 (114)	
	⑨矢落川	289~10 100	32~1> 10	7~2 3	1~1> 1>	3.8~1.9 (2.6)	51~25 40	64~25 46	46~25 (38)	1.42~0.74 1.08	16~5> (11)	2.5~0.5 (1.8)	11~3 (7)	
	⑩峠 橋	677~19 197	104~2 35	4~3 3	2~1> 1	3.6~2.2 (3.2)	33~10 20	45~19 29	44~41 (43)	1.22~0.78 0.96	24~6 (12)	6.0~2.8 (4.6)	394~33 (121)	
	岩 松 川	①中之川	99~13 31	1>~ 1>	59~1> 15	8~1> 2	4.8~1.6 (2.5)	13~5 8	21~6 11	16~5> (8)	0.84~0.25 0.47	12~5> (6)	1.4~0.5> (0.5)	14~0.4 (4.2)
		②横 吹	58~11 27	1>~ 1>	3~1 2	1>~ 1>	3.3~1.6 (2.1)	10~2 5	10~2 6	20~5> (10)	0.66~0.15 0.43	7~5> (5>)	1.4~0.5> (0.5)	36~0.8 (8)
③御代川		36~6 20	1>~ 1>	31~1 8	1>~ 1>	4.5~1.5 (2.3)	9~2 5	10~2 7	11~5> (6)	0.55~0.19 0.35	10~5> (6)	0.5>~ (0.5>)	12~0.6 (7)	
④嵐 部		97~10 34	1>~ 1>	2~1 2	1>~ 1>	3.9~1.4 (2.3)	18~2 6	29~3 10	17~6 (12)	1.10~0.10 0.51	6~5> (5)	3.8~0.5> (1.3)	74~1.4 (12)	
⑤三島橋		800~14 295	37~1> 14	6~2 4	1>~ 1>	6.5~2.2 (3.4)	21~2 10	48~9 23	36~12 (24)	1.07~0.10 0.65	15~5> (8)	38.4~3.6 (13.0)	104~2.4 (26)	

図2 キーダイアグラム

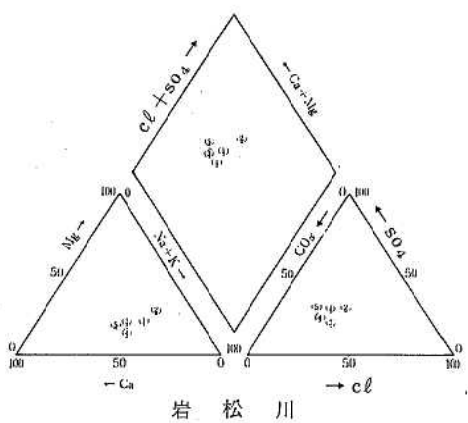
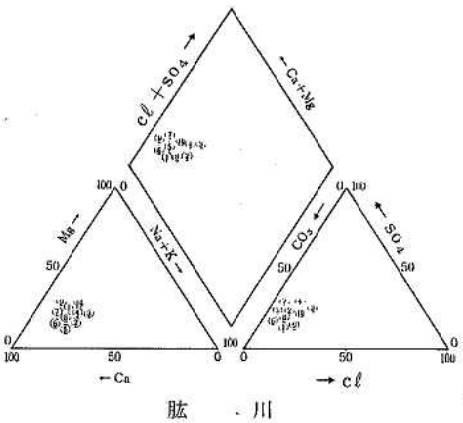
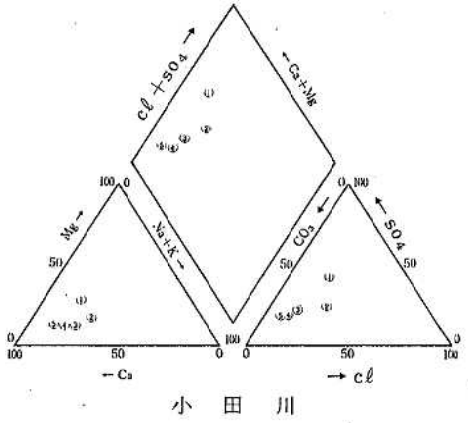
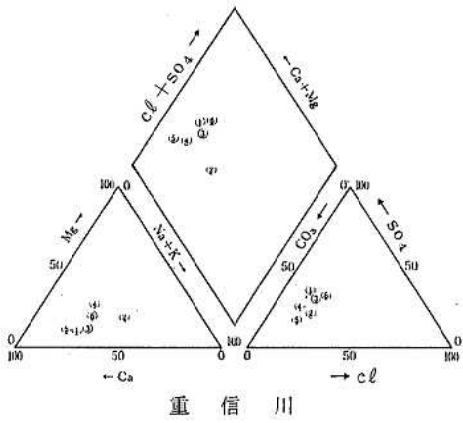
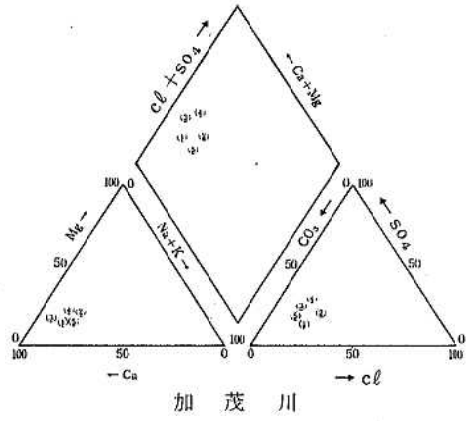
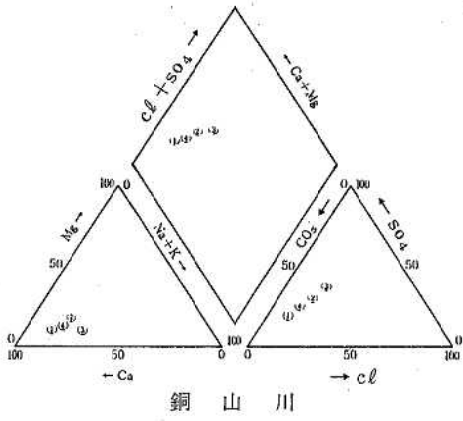
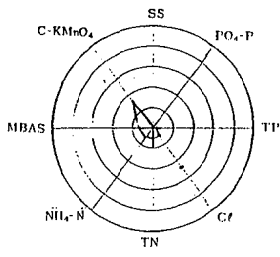
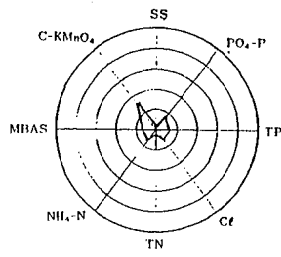


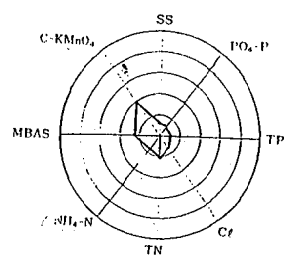
図3 レーダーチャート



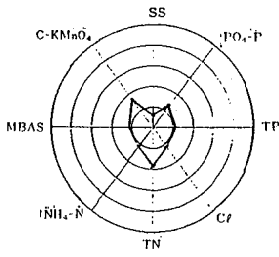
銅山川 ①



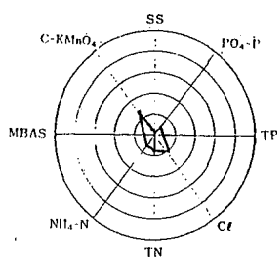
銅山川 ②



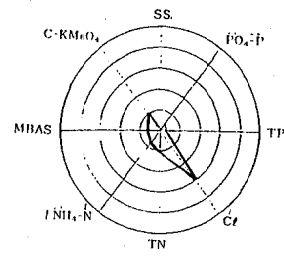
銅山川 ③



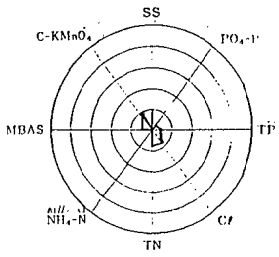
銅山川 ④



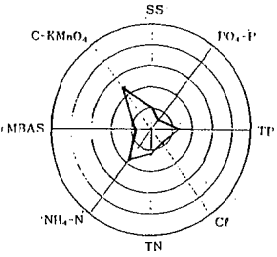
加茂川 ①



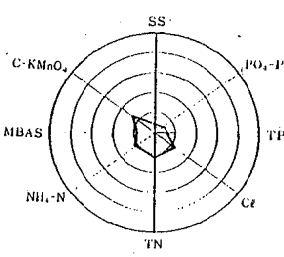
加茂川 ②



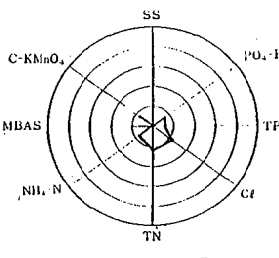
加茂川 ③



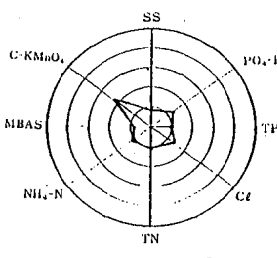
加茂川 ④



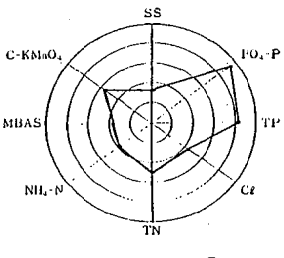
加茂川 ⑤



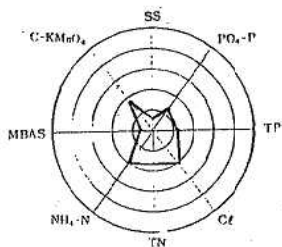
重信川 ①



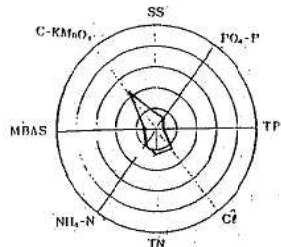
重信川 ②



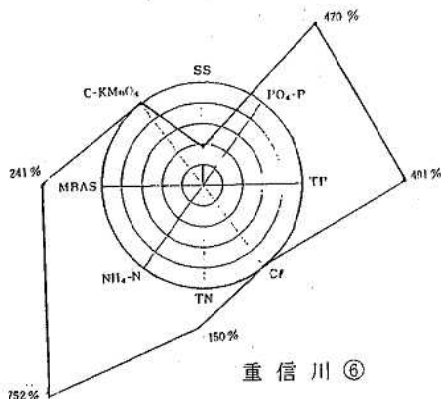
重信川 ③



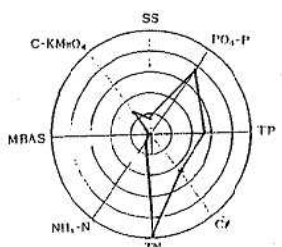
重信川 ④



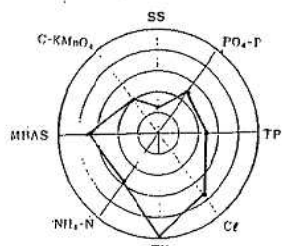
重信川 ⑤



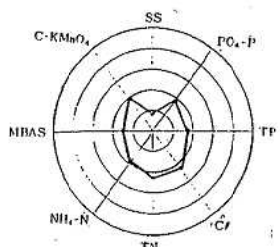
重信川 ⑥



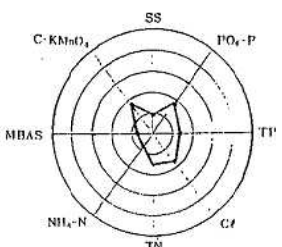
小田川 ①



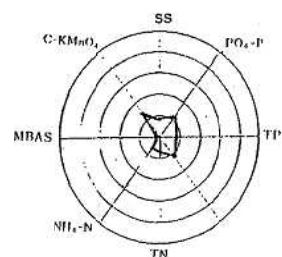
小田川 ②



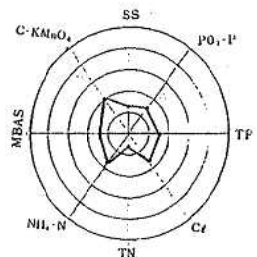
小田川 ③



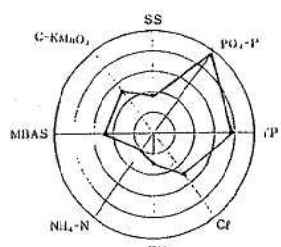
小田川 ④



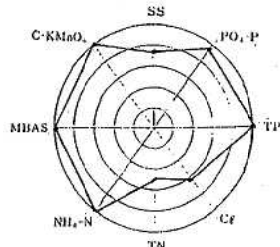
小田川 ⑤



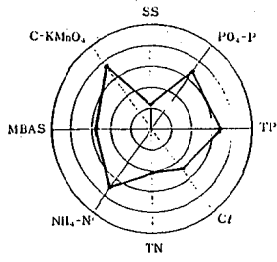
脛川 ①



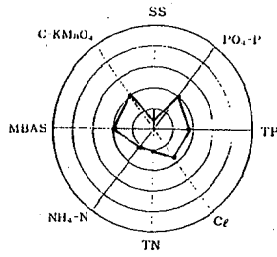
脛川 ②



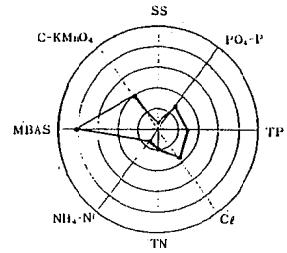
脛川 ③



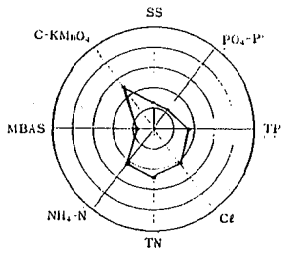
肱川 ④



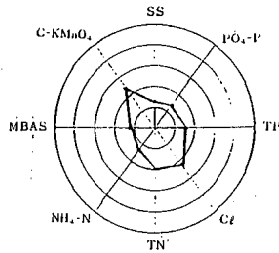
肱川 ⑤



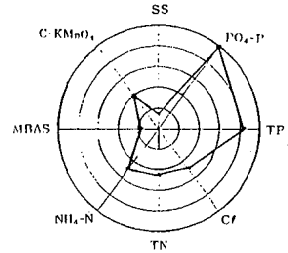
肱川 ⑥



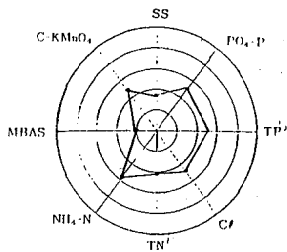
肱川 ⑦



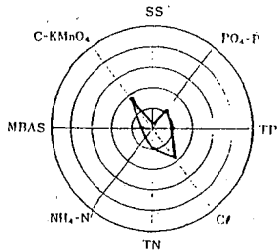
肱川 ⑧



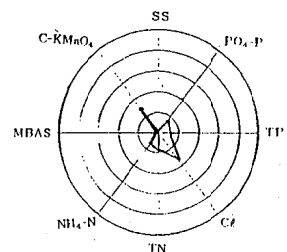
肱川 ⑨



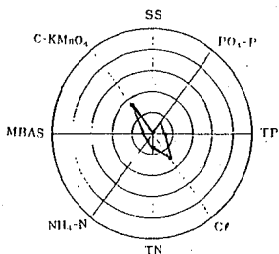
肱川 ⑩



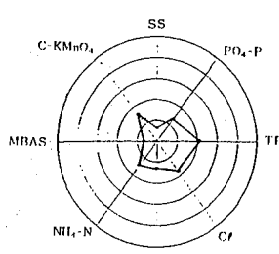
岩松川 ①



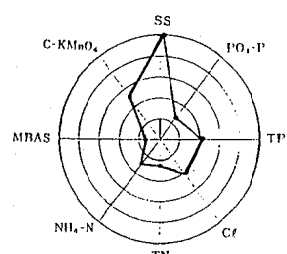
岩松川 ②



岩松川 ③



岩松川 ④



岩松川 ⑤

考察

1. 主要成分からの考察

キーダイヤグラムからみれば、県内主要河川は、ほとんどが炭酸カルシウム型であり、唯一岩松川のみが、中間型であると位置付けられる。かつて当所で実施した、自然的状態における愛媛県内主要河川の無機成分の状況と比べられる⁴⁾。その結果当時と比べ、全体のバランスに変化が見られないものの、溶存成分量および汚染関連成分の顕著な増加が窺えた。

また、溶存成分量からみれば、各河川とも下流へいくほど溶存成分量がふえているが、成分のバランスからみれば、各河川上流地点の水質バランスの平均化したものであることがわかる。以下に、各河川の概要について考察する。

1) 銅山川

下流へ行くほど、 SO_4 の比率が高まっているのが大きな特徴であるが、Ca, Mg, Na, Clの比率はほとんど変わっておらず、山林地又は市街地からの SO_4 イオンの供給が考えられる。

2) 加茂川

3つの大きな支流の上流のうち、石鎚山登山口下を流れる支流では、Na Clの割合が他の上流の地点より高い。これは、前報¹⁾で栄養塩からの考察で示した結論と同じであり、この支流については登山口の上と下で水質比較を行って見たところ、この負荷源はそれより上流であることが示され、この上流には人為的負荷源が見当たらないことから、自然負荷に由来することが示唆された。しかし、全体としてみれば CaCO_3 型であり、地質の影響を受けている。

3) 重信川

全体として、Ca比率の卓越が他の河川より少なく、特に表川上流の地点は、Naの影響が強く、他の支流とは異なった地質の影響が考えられる。最下流の出合橋では、人為的汚染の影響が強くあらわれ、Cl+ SO_4 の比率が高いのみでなく、総イオン量も大きい。

4) 小田川

中山川上流佐礼谷において、とび抜けて SO_4 の比率が高く、また中山町中心部通過後の地点では、Clの比率が高いのが特記されるが、それぞれの原因については、栄養塩類からの考察同様農耕由来、生活排水由来が容易に想定される。

本流小田川の方が流量が大きいため五十崎では、本流のタイプに近く、 CaCO_3 型である。

5) 脇川

主要成分のバランスからみれば、生活排水汚染の目立つ下宇和の地点でも、他の地点とは離れた地点と位置付けられず、全体に CaCO_3 型に分類され、主要成分のバランスからは、特徴が見いだせない。

6) 岩松川

調査した河川のなかで、唯一 CaCO_3 型でなく、中間型と位置付けられる河川である。Ca, CO_3 の比率は、それぞれ50%を下回り、Mg, Na, SO_4 , Clの比率が上昇して中間型である。これは、他の河川が三波川帯を主として流下するのに対し、四万十帯にこの川が位置することにより、地質の影響を大きく受けていることが想像される。

2. 栄養塩・汚濁関連成分からの考察

汚濁負荷源および栄養塩供給源の推定を行うため、各地点各水質項目の最大値を100とし比率で示す、レーダーチャートを用いたが、その結果から、生活排水による汚染の考えられるパターンとしてMBASおよび $\text{NH}_4\text{-N}$ の突出したパターンが抽出された。また、自然負荷では、チャートの大きさが小さくかつ、TN, C-KMnO₄に突出していることが示された。

1) 銅山川

各地点とも汚濁されておらず、自然負荷のみであることが推察される。

2) 加茂川

石鎚山登山口下の点が、Clで突出しているが、その原因が自然負荷であることが、他の成分から推察された。

3) 重信川

石手川上流及び、本流上流は清澄であるが、表川および砥部川上流ではわずかに負荷が認められる。拝志および出合橋では、人為的負荷が認められ、特に出合橋では、他のどの地点にもない負荷が観測された。

4) 小田川

佐礼谷では、農業由来、中山では生活排水由来の負荷が容易に想像される他は、ほとんど清澄である。

5) 脇川

芝・矢落川では農耕由来、下宇和ではそれに加え、生活排水による汚染が卓越している。

野村では、ダムにより負荷の減少がわずかに認められるが、その後野村町内の負荷を加えるため、その上流とほとんど変化なく、それより下流では大水量にて希釈されるため汚染は重信川ほどひどくない。

6) 岩松川

最下流で、時折濁度が検出されるものの、顕著な有機汚濁は認められない。

3. 降雨パターンと流域の流出特性

各河川の各採水時点の前に、10mm/日以上雨量を記録した日迄の日数と、各水質項目との関連を述べることは、集水域の特性が反映されるものであり、流出

解析において負荷の流出制御のための方策を考えるための一助となる。

本研究は、河川の平水時の水質を測定することを目的としたため、10mm/日以上雨量を記録したその翌日は原則として採水していない。(例外的に1988年7月岩松川の採水は、降雨1日後であり、SSの最大値を示した。)

降雨後2～21日目間に採水したが、最下流の地点での、Clの水質変動をもって評価を行う。Clを選んだ理由は化学的に変化を受けにくく、水量に追従する成分であるからである。表3に各河川最下流の地点のClの変化と降雨⁵⁾後採水パターンを掲げる。

表3 Clの変化と降雨後採水パターン

場所 \ 日	1～3	4～7	8～14	15～21
銅山川	1.00	0.75	0.70	0.65
加茂川	1.00	0.86	0.81	—
重信川	1.00	0.77	1.12	0.97
小田川	1.00	0.95	0.98	0.79
肱川	—	1.00	1.12	0.93
岩松川	1.00	1.03	1.05	0.80

表中のClの変化は、1～3日の時のClの濃度の平均を各河川ごとに1とし、4日目以降の流出Cl濃度を比で表したものである。(肱川では1～3日の採水はなかった。)

表中の右欄へ向かうほど、数字の減少の割合の大きい河川は流出し易さを示す河川であり、数字の変化の小さい河川は集水域の保水機能や、貯水池の影響により流出が徐々に行われることを示す。

流量追従性の大きいSSでは、表中右欄へ向かうほ

ど数字が減少するが、これは表面流出を示すものであり、一方数字の変化の小さい指標は、表面流出より地下流出が卓越していることを示し、流動特性を表す一つの指標となる。

肱川・加茂川では徐々に流出が行われている様子が推測され、重信川では負荷変動が降水以外の要因(例えば生活排水)にあることが示唆され、流出率の推算を伴った精査が今後必要と思われる。

まとめ

県内主要河川の水質を無機成分のバランスから考えて、ほとんどが地質に影響を受けたCaCO₃型であることがわかった。

有機汚濁は人間活動の行われた後の地点で検出されるが、出合橋を除きその程度は低く、十分利水に堪える。また負荷源の特定を行ったところ肱川本流沿いの各地点および、重信川下流の地点では、生活排水由来の負荷であることが推定され、農耕由来の負荷が推定されたのは小田川支流中山川上流・肱川支流矢落川等であった。

本研究は、衛生研究所「特別研究事業費」により、なされたものである。

なお、本研究の一部は第23回水質汚濁学会にて、発表した。

文献

1. 石丸尚志他：愛媛衛研年報49, 39～42 (1988)
2. 浅野淑子他：愛媛県公害技術センター所報2, 57～59 (1980)
3. 越智久尚他：愛媛県公害技術センター所報7, 16～19 (1986)
4. 武智拓郎他：愛媛衛研年報40, 41～48 (1979)
5. 財団法人日本気象協会：気象月報1987・4月～1989・2月

異臭味地下水における油様成分の分析について

大倉敏裕 武智拓郎 出口修一
篠崎由紀* 石丸尚志 中島庄一

Analysis of Petroleum in Underground Waters with Unusual Odor

Toshihiro OHKURA, Takuro TAKECHI, Shuichi DEGUCHI,
Yuki SHINOZAKI, Takashi ISHIMARU, Shoichi NAKAJIMA

Analytical method for petroleum constituents was applied in underground waters with unusual odor.

Because the samples had a gasoline-like odor, threshold odor value of gasoline and threshold odor number (TON) of the samples were determined. As a result, threshold odor value of gasoline was $0.05\mu\text{l}/\text{l}$ and TON of the samples were 10~20000, that were corresponding to concentration of 0.5~1000 $\mu\text{l}/\text{l}$ as gasoline.

Both extraction with n-pentane and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) were successfully used to characterize petroleum as gasoline, kerosene and light oil. It was suggested that the odor was due to contamination with gasoline.

Keywords : petroleum, underground water, GC-FID

はじめに

近年、地下水環境を取り巻く状況は、多様化しており、特に都市部においては、種々の地下水汚染事例が報告されている。田瀬¹⁾によれば、日本での発生事例における汚染物質は、有機塩素系化合物が最も多く、次いで、メッキ関連の重金属類、燃料系の有機化合物、微生物等があり、一方、汚染源は、たれ流し、貯蔵タンク・処分地等からの漏出、天然起源によるものに分けられる。

今回、我々は、石油様物質による地下水汚染事例に遭遇し、異臭味を呈する地下水の油様成分の分析を実施したので、その概要を報告する。

実験方法

1. 試料

M市内の7ヵ所から採水した地下水

2. 試薬

n-pentane : 特級を蒸留 (35~36℃) して使用
ガソリン、灯油、軽油 : 市販品をn-pentane溶液とした。

3. GC-FID条件

装置 : 島津GC-7A, クロマトパックCR-1B

カラム : ϕ 3mm \times 2m ガラスカラム

10% Sillicone GESE-52

(Gas-chromQ 60/80)

カラム温度 : 70℃ (4分) ~ 230℃ (8分)

昇温 10℃ / 分

注入口温度 : 260℃

ガス流量 : 窒素 40ml / 分

水素 50ml / 分

空気 500ml / 分

4. 分析方法

1) 臭気

試料 200 ml を共栓三角フラスコ (300 ml) に入れ 50℃ に加温した後、官能試験を実施した。

また、試料を適宜希釈し、臭気を感じなくなった

* 現愛媛県公害技術センター

時点の希釈倍数を、臭気強度 (TON) とした²⁾。

2) ヘッドスペース・GC-FID法

試料50mlをバイアル瓶に入れ、50℃で1時間放置後、気層500 μ lをGC-FID分析に供した。

3) 抽出・GC-FID法³⁾

試料20ml~4 ℓ に対しn-pentaneで抽出し、濃縮した後、5 μ lをGC-FID分析に供した。

なお、n-pentaneは特級を蒸留し、濃縮操作後、GCクロマトグラム上に妨害ピークのないことを確認して使用した。

結果および考察

1. 臭気

官能試験により試料中に混入した油様物質を推定するため、ガソリン・灯油・軽油を対象として実施したところ、ガソリンが最も類似した臭気を呈した。

さらに、試料に混入したと考えられるガソリン量を推定するため、各種濃度のガソリン水溶液を調整し、しきい値を求めた。

表1に示すとおり、10人により官能試験をした結果、本実験では、0.05~0.1 μ l/lがガソリン臭のしきい値と考えられる。

また、ガソリン臭のする7試料の臭気強度 (TON) を測定した結果、表2に示すように、10から20000の範囲であった。

これは、ガソリン臭のしきい値を0.05 μ l/lとすれば、0.5~1000 μ l/lのガソリン濃度に相当する。

2. ヘッドスペース・GC-FID法

前処理操作の簡単なヘッドスペース法について検討した。

ガソリンと灯油の沸点は、図1に石油類の沸点範囲^{4,5)}を示すように、一部重複しているが、低沸点の成分で識別できると考えられる。

しかし、当GC条件では、50℃前後で揮発する成分によって両者を識別することは困難であり、汚染物質を特定することはできなかった。

表1 ガソリン臭のしきい値

ガソリン濃度(μ l/l)	感じる(人)
0.02	0
0.05	5
0.1	7
0.2	10

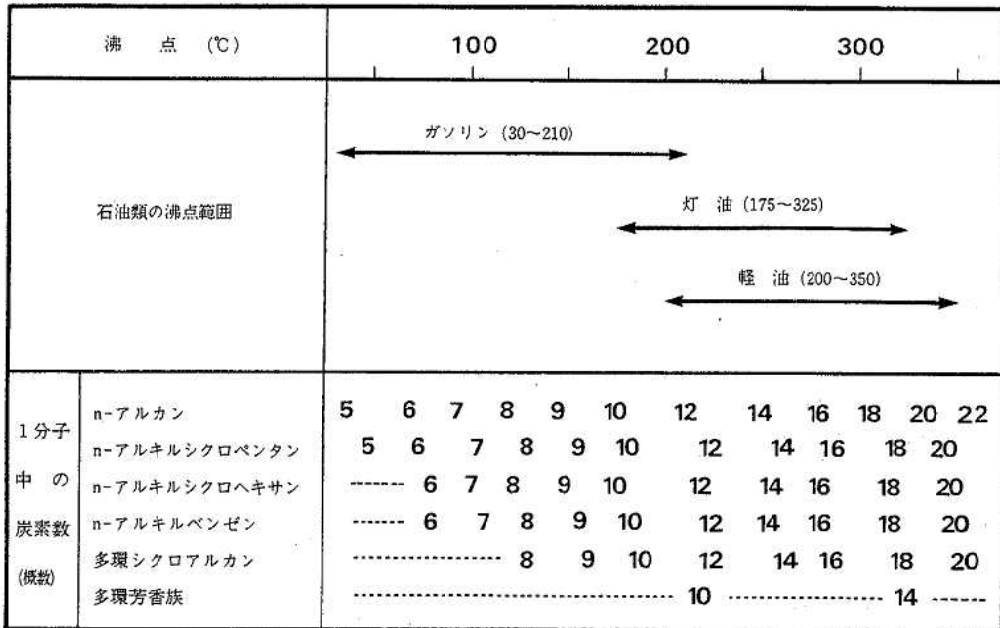


図1 石油類および炭化水素の沸点

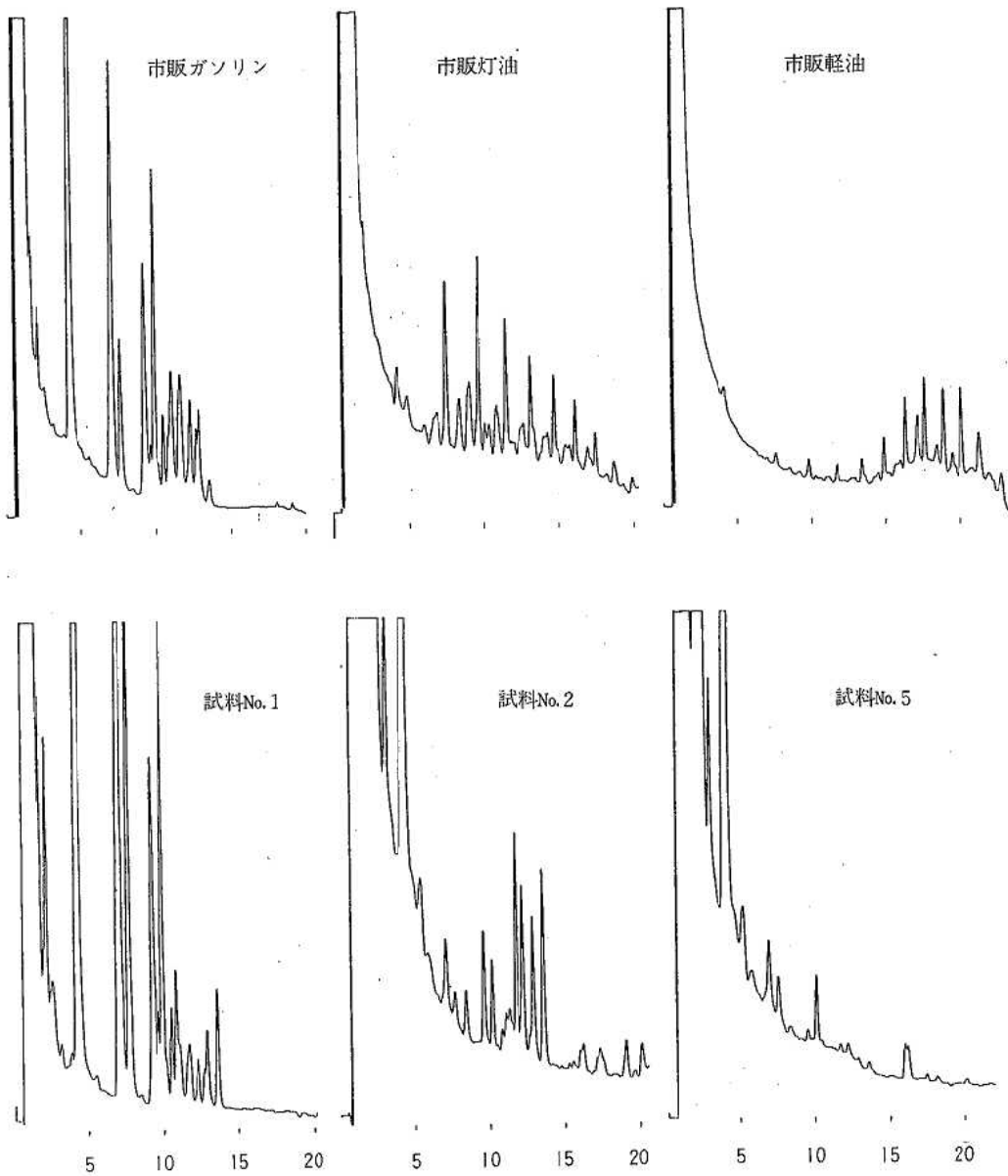


図2 石油類および試料のGCクロマトグラム

表2 臭気強度およびガソリン濃度推定値

試料 No.	1	2	3	4	5	6	7
臭気強度 (TON)	20000	100	100	50	20	10	10
TONより算出した ガソリン濃度 ($\mu\text{l}/\text{l}$)	1000	5	5	2.5	1	0.5	0.5
G C-FID法より算出した ガソリン濃度 ($\mu\text{l}/\text{l}$)	700	2.8	3.0	1.3	0.8	1.0	2.6

3. 抽出・GC-FID法

石油類を試料より抽出し、濃縮するためには、低沸点の溶媒を用いる必要があるため、n-pentaneを抽出溶媒とした。

臭気強度を参考にし、GC供試溶液がガソリンとして約2000 $\mu\text{l}/\text{l}$ となるよう、各々試料量を決定してn-pentaneで抽出した。

市販のガソリン・灯油・軽油のn-pentane溶液をGC分析に供したところ、GCクロマトグラムを図2に示すように、100 $\mu\text{l}/\text{l}$ 以上で各々のGCパターンを識別できた。

試料のGCパターンは、ガソリンのそれと最も類似していることから、ガソリンが混入しているものと考えられた。

しかし、市販ガソリンの組成は、製品によって相違し、また、地下水環境中において吸着・分解等により組成の変化⁶⁾が考えられ、GCパターンは完全に一致しなかったものと考えられる。

また、特定のピークを基にガソリン濃度を算出したところ、表2に示すように、臭気強度から算出したガソリン濃度とほぼ相関のある値を示した。

本法での定量値は、近似値であると考えられるが、本事例の解析のためには、十分参考になる値であった。

まとめ

- 40~50度法によるガソリン臭のしきい値は、0.05~0.1 $\mu\text{l}/\text{l}$ であった。
- ヘッドスペース・GC-FID法ではガソリンと灯油の識別ができなかった。
- n-pentaneを用いる抽出・GC-FID法により、GCパターンからガソリン・灯油・軽油を識別することができた。
- 試料に混入しているのはガソリンと推定された。
- TON、GC-FID法の双方よりガソリン濃度を算出したところ、ほぼ相関があった。

文献

- 田瀬則雄：地下水学会誌，30,2,103~108 (1988)
- 日本水道協会：上水試験方法，199~204 (1985)
- 近藤幸憲他：長崎県衛生公害研究所報，25,151~152 (1983)
- 日本化学会：化学便覧応用編，515~526 (1976)
- 荒木峻他：環境科学辞典，457 (1985)
- I.J.Higgins et al.：The Chemistry and Microbiology of Pollution，95~120 (1975)

精油定量器を用いた食品中の残留農薬分析

関谷 安正 武智 拓郎 西原 伸江*
松浦 榮美 中島 庄一

A Simple Method for Quantitation of Pesticides in Foods Using Essential Oil Distillator

Yasumasa SEKIYA, Takuro TAKECHI, Novue NISHIHARA,
Shigemi MATSUURA, Shoichi NAKAJIMA,

Essential oil distillator was used by for quantitation of pesticides in foods and applied to extract pesticides from foods by distillation. Following Sep-pak Frolisil was used to eliminate interference substance before applying samples to gaschromatography.

By using these procedunes, the results showed satisfactory recovery rate, except a certain pesticides (EPN, chlorobenzilate).

Keywords : essential oil distillator, pesticides in food, Sep-pak Frolisil

はじめに

食品中の残留農薬分析法は、主に有機溶媒による抽出法であり、この方法では多量の植物色素や油脂成分が混入し操作が煩雑である。

このことから、簡易分析法として直接蒸留法¹⁾、水蒸気蒸留法²⁻⁴⁾、改良型精油定量器を用いる蒸留法⁵⁾など種々報告されているが、これら蒸留法による野菜・果実中の分析例は少なく、特に有機リン系農薬分析についてはみられない。

そこで、今回我々は日本薬局方収載の精油定量器と市販のクリーンアップ用カートリッジカラム (Sep-pak フロリジル) を用い、野菜・果実中の残留農薬分析に適應できるか否かを検討した。

実験方法

1. 試料

愛媛県下で1988年に生産された野菜・果実を使用した。

2. 試薬

有機リン系農薬標準品：ダイアジノン、クロルピリホス、マラチオン、フェントエート (PAP)、フェント

ロチオン (MEP)、パラチオン、EPN (以上和光純薬工業製農薬標準品) 各100mgをベンゼン：ヘキサン (1 : 1) に溶解した。標準品はヘキサンで適宜希釈調製した。

有機塩素系農薬標準品：BHC (α , β , γ , δ), DDT (pp'-DDE, pp'-DDD, pp'-DDT), アルドリリン, デイルドリン, エンドリン, クロルベンジレート (以上和光純薬工業製農薬標準品) を有機リン系農薬標準品と同様に調製した。

有機溶媒：ヘキサンおよびエーテルは残留農薬分析用、それ以外は試薬特級を用いた。

Sep-pakフロリジル：Waters Assoc.

3. 装置

ガスクロマトグラフ：島津GC-7A (FPD)
島津GC-8A (ECD ⁶³Ni)

カラム：10%QF-1, 20%DC-200
1.5%OV-225, 3%OV-17

精油定量器：第11改正日本薬局方収載

マントルヒータ：大科電器株式会社、留液が3～5 ml / 分になるよう調整した。

4. 分析操作

4.1 試料からの抽出

図1に示すとおり、細切した試料10gを凍結乾燥し

* 現愛媛県保健環境部業務課

エーテル10mlを加え、一夜放置し20分間振とう後、水100mlを加えエーテルを留去し、リン酸0.3ml、硫酸マグネシウム150gおよびシリコン1~2滴添加した。精油定量器に少量の水を入れヘプタン：クロロホルム(4:1)5mlを加え、冷却器を取り付け3時間蒸留を行い、冷後有機溶媒層を取り、脱水後、減圧濃縮しヘキサンで2mlに定容し、試料溶液とした。

有機リン系農薬はそのままGC-FPD検液とした。

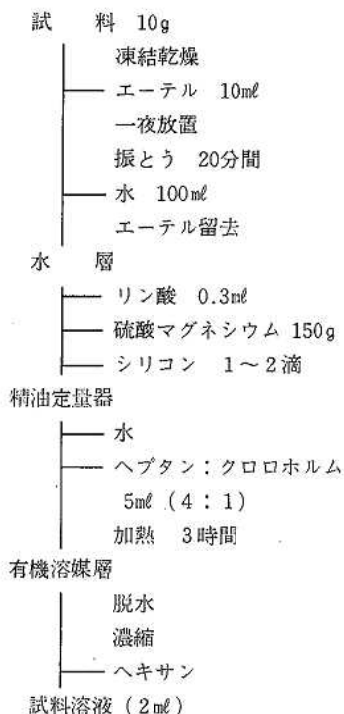


図1 抽出操作

4.2 カートリッジカラム

有機塩素系農薬は、Sep-pakフロリジルを用いて試料の精製を行った。

試料溶液1mlをSep-pakフロリジルに通し、5%エーテル・ヘキサン溶液20mlおよびエーテル10mlで溶出させ、その溶液を減圧濃縮後ヘキサンで1mlに定容し、GC-ECD検液とした。

結果及び考察

1. 蒸留条件の検討

1) 捕集溶媒

溶媒は、ヘキサン、ヘプタン、ベンゼンおよびヘプタン：クロロホルム混液を用いた。標準農薬を添加した水を1時間蒸留し、回収率を求めた。

この結果、表1に示したとおり有機塩素系農薬ではあまり差は見られなかったが、有機リン系農薬は、ベンゼンとヘプタン：クロロホルム混液が良く、沸点の高いヘプタン混液を使用することにした。

また、ヘプタン混液(3:1)はクロロホルムがヘプタンと分離することがあったので、ヘプタン：クロロホルム混液は(4:1)とした。

2) 塩濃度

水の状態では、回収率が低いいため塩化ナトリウム15g、30g添加し1時間蒸留を行った。

表2に示したとおりMEP、マラチオン及びPAPが20%と低く、塩化ナトリウムでは、これ以上は過飽和になるので、熱湯に対して溶解性の高い硫酸マグネシウムを用いたところ100g以上で良好な結果が得られた。

3) リン酸濃度

農薬標準品をキャベツに添加し、リン酸を0、0.3、0.5および1.0ml添加し2時間蒸留を行った。

図2に示したとおり有機塩素系農薬は、リン酸濃度による変化はあまり見られなかった。しかし、有機リン系農薬はリン酸無添加では10~15%と低く、0.3、0.5mlではほぼ良好であったが、1.0mlになるとダイアジノンが低下した。これは、ダイアジノンが酸性で不安定になるためである。

また、酸性が強すぎるとドリッジ剤が分解するおそれ

表1 捕集溶媒による回収実験結果

有機溶媒 農薬名	%				
	ヘキサン	ヘプタン	ベンゼン	ヘプタン:クロロホルム 3:1	ヘプタン:クロロホルム 4:1
総BHC	54.8	63.1	65.8	70.9	73.4
アルドリル	74.0	75.1	72.2	77.1	74.2
ディルドリン	78.3	81.9	85.5	82.5	79.0
エンドリン	78.7	83.2	78.1	81.6	79.0
総DDT	78.6	78.2	82.8	81.9	74.8
クロロホルム	30.1	33.1	45.0	44.5	49.9

有機溶媒 農薬名	%				
	ヘキサン	ヘプタン	ベンゼン	ヘプタン:クロロホルム 3:1	ヘプタン:クロロホルム 4:1
ダイアジノン	23.8	65.6	64.8	67.6	67.3
クロルピリホス	30.2	79.4	83.2	85.6	81.2
マラチオン、PAP	4.8	10.1	15.6	17.7	20.6
フェネトロチオン	3.2	12.7	20.1	18.2	19.4
パラチオン	15.0	30.1	46.9	41.7	46.7
EPN	7.0	17.2	25.5	24.9	23.7

があるため、リン酸の添加量は0.3mlとした。

4) 蒸留時間

キャベツを用い、リン酸0.3ml、硫酸マグネシウム150g添加し1時間から4時間蒸留を行った。

図3に示したとおり有機塩素系農薬は、1時間の蒸留で十分であったが、有機リン系農薬は、3時間以上の蒸留が必要であり、特にEPNは4時間以上の蒸留が必要であると思われる。

2. Sep-pakフロリジルによる精製

蒸留後、試料溶液を直接ガスクロマトグラフにて測定すると、有機リン系農薬は図4・Aに示すとおり妨害するピークもなく定量可能であったが、有機塩素系農薬では図4・Bに示すとおり最初の4分までに妨害ピー

クが現われ、 α -BHCの定量ができなかったときがあった。

そこで、有機塩素系農薬のクリーンアップにSep-pakフロリジルを用いて検討した。各塩素系農薬の溶出パターンを図5に示した。5%エーテル・ヘキサン溶液では、アルドリンおよび α 、 β -BHCは最初の5mlですべて溶出した。クロルベンジレートは5%エーテル・ヘキサン溶液20mlでは全く溶出されず、溶出させるのに5%エーテル・ヘキサン溶液20ml流した後、エーテル5mlで溶出した。

以上の結果からSep-pakフロリジルの溶出溶媒を5%エーテル・ヘキサン溶液20mlおよびエーテル10mlとし、試料溶液のクリーンアップを行うと、図4・Cに示すとおり妨害となるピークが完全に除去できた。

表2 塩濃度による回収実験結果

農薬名	有機塩素 無添加	NaCl		MgSO ₄		
		15g	30g	100g	150g	200g
総BHC	49.1	55.3	70.0	84.1	90.4	92.1
アルドリン	26.2	47.6	63.9	71.6	84.4	91.2
ディルドリン	68.5	78.6	80.5	94.7	94.7	87.8
エンドリン	69.3	88.0	91.3	90.9	95.7	92.4
総DDT	54.6	83.5	82.3	88.0	89.3	89.1
クロルベンジレート	31.7	54.1	77.7	94.8	96.6	87.8

農薬名	有機塩素 無添加	NaCl		MgSO ₄		
		15g	30g	100g	150g	200g
ダイアジノン	7.5	80.3	95.9	95.4	95.3	91.3
クロルピリホス	18.2	83.7	96.5	98.7	99.1	97.1
マラチオン.PAP	15.2	9.4	18.8	61.5	60.3	52.3
フェントロチオン	15.1	12.2	20.9	64.9	61.3	51.8
パラチオン	38.9	53.6	73.0	87.4	84.1	78.4
EPN	14.0	31.0	55.7	83.5	89.9	78.3

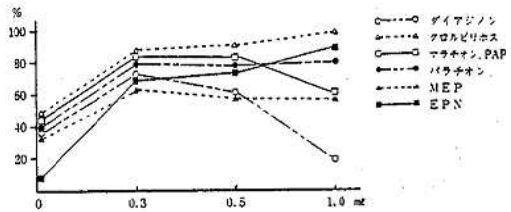
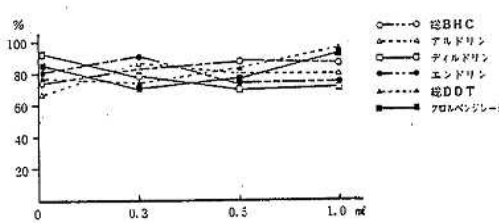


図2 リン酸濃度による回収実験結果

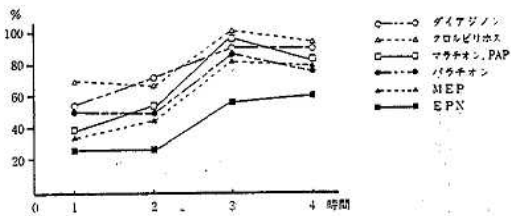
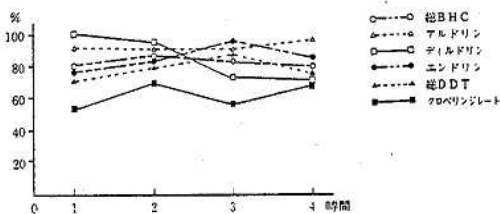
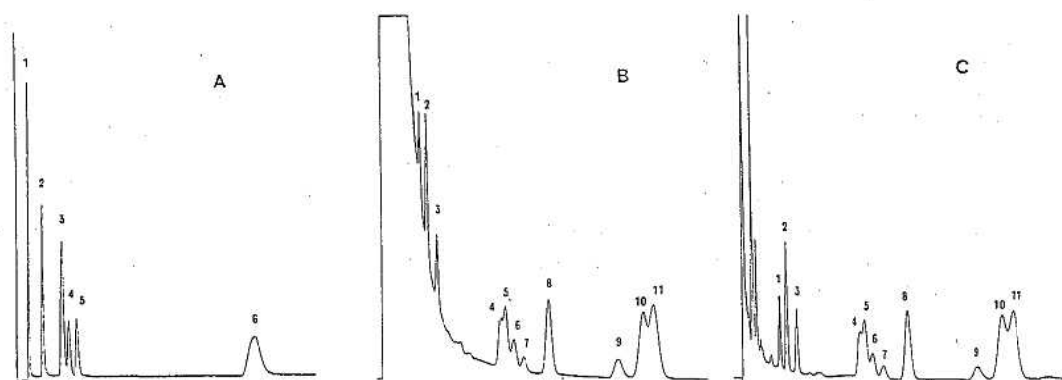


図3 蒸留時間による回収実験結果



A : びわに添加した有機リン系農薬のクロマトグラム

1. ダイアジノン 2. クロルピリホス 3. マラチオン, P.A.P. 4. MEP 5. パラチオン 6. EPN

GC条件: カラム 10%, QF-1 (φ 3mm×2m)
カラム温度 200℃
注入口及び検出器温度 250℃
N₂ 40ml/min H₂ 0.5, 1.1kg/cm²
空気 1kg/cm²

B : びわに添加した有機塩素系農薬のクリーンアップ前のクロマトグラム

1. α-BHC 2. アルドリシ 3. γ-BHC 4. PP'-DDE 5. β-BHC 6. δ-BHC 7. ティルドリン 8. エンドリン 9. クロルベンジレート 10. PP'-DDT 11. PP'-DDD

GC条件: カラム 1.5%, OV-225 (φ 3mm×2m), カラム温度 215℃
注入口及び検出器温度 280℃, N₂ 40ml/min

図4 実試料に添加した各農薬のクロマトグラム

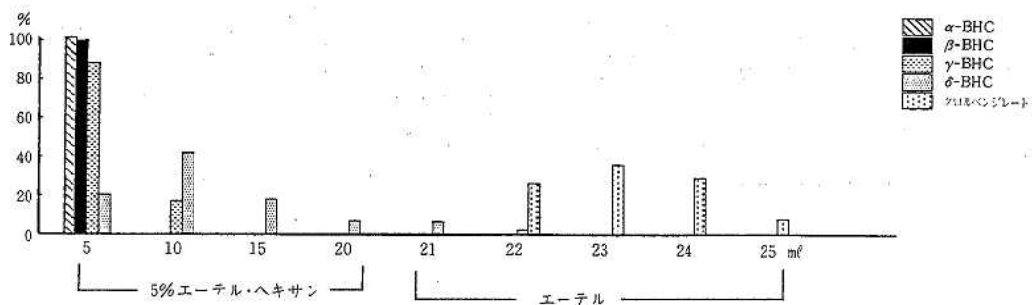
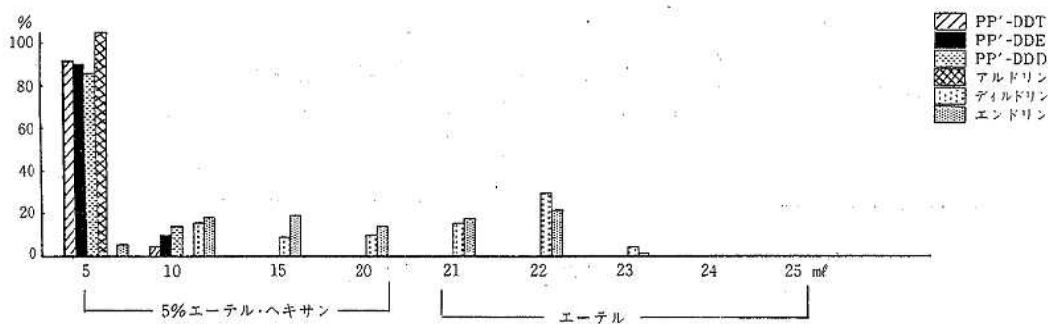


図5 Sep-pak フロリジルからの有機塩素系農薬の溶出状況

表3 野菜・果実による添加回収実験結果

単位：%

農薬名	きゅうり	キャベツ	びわ	ぶどう	レタス	ほうれん草	夏みかん (皮)	夏みかん (実)
α-BHC	92.1	95.1	100.1	97.9	85.4	81.6	96.7	93.3
β-BHC	95.4	92.7	94.2	81.5	95.8	82.5	76.0	74.9
γ-BHC	93.0	98.9	97.6	101.7	84.9	87.6	90.8	89.8
δ-BHC	80.2	82.9	97.9	72.5	76.5	87.0	81.1	79.5
アルドリノ	87.6	86.5	104.1	91.3	82.5	83.0	90.1	88.3
ディアルドン	85.8	68.4	83.7	101.7	97.9	91.3	59.0	81.5
エンドリン	92.3	84.2	92.1	79.1	86.6	77.9	77.4	70.3
PP'-DDT	81.6	79.1	87.7	75.1	77.6	69.4	77.3	64.8
PP'-DDD	87.9	78.1	88.9	73.6	81.7	64.9	88.8	77.8
PP'-DDE	86.7	102.1	94.0	82.8	81.8	81.1	85.0	83.5
クロルベンジレート	60.7	53.6	68.3	58.3	62.7	50.6	49.8	45.5
ダイアジノン	78.9	82.5	78.9	83.7	79.6	82.3	86.2	85.9
クロルピリホス	79.3	95.0	90.4	89.7	94.2	90.9	93.5	94.1
ラチオン	84.4	88.7	83.4	78.2	83.2	78.7	81.6	81.0
フェントエート	77.9	82.2	82.4	75.1	74.6	73.2	78.0	78.9
フェントロチオン	75.9	82.9	75.3	72.4	74.9	75.6	72.2	71.1
パラチオン	73.0	83.4	76.4	74.1	76.2	72.6	71.6	73.1
E P N	45.2	52.2	57.2	36.1	42.7	31.2	34.0	31.6

3. 添加回収実験

今回検討した分析法に従って野菜・果実を分析し、各農薬の回収率を求めた。その結果は表3に示すとおり各農薬は、ほうれん草におけるE P Nの31.2%からびわにおけるアルドリノの104.1%までの広範囲の回収率を示した。農薬別に見るならば、クロルベンジレートおよびE P Nの回収率がそれぞれ45.5~68.3%と31.2~57.2%の範囲内にあり、他の農薬と比較して明らかに低く、かつ広い分布を示した。

また、E P Nについては蒸留時間の不足が原因と考えられる。

まとめ

精油定量器を用い、野菜・果実中の残留農薬分析法の検討を行ったところ、添加回収実験の結果は、一部農薬を除きほぼ良好な結果を得た。

以上の結果から、本法は簡易分析法として十分実用

できるものと思われる。

しかし、分析に当たっては、蒸留器具の大きさ、型および加熱条件の相異などが回収率に影響することが考えられるので、それぞれについて回収率を求め補正係数を定める必要がある。

本報告の要旨は、第27回日本薬学会中国四国支部大会(出雲市)において発表した。

文献

- 1) Nash, R.G.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 67, 199~203 (1984)
- 2) 平野和行他: 分析化学, 20, 364~365 (1971)
- 3) 畑中久勝他: 兵庫衛研研究報告, 6, 56~58 (1971)
- 4) 河村典久他: 愛知衛研所報, 23, 61~66 (1973)
- 5) 松本浩他: 食衛誌, 16, 165~171 (1975)

パーティ用玩具中のシュウ酸定量法の検討

井上 智 大倉敏裕 武智拓郎
中島庄一 井上博雄

Studies on Method for Determination of Oxalic Acid in Party Goods

Satoshi INOUE, Toshihiro OHKURA, Takuro TAKECHI,
Shoichi NAKAJIMA, Hiroo INOUE

A simple and rapid method for quantitation of oxalic acid in party goods was applied by using preminicolumn to eliminate concomitant metal elements which reacted with oxalic acid.

Sample dissolved in water was passed through preminicolumn to eliminate copper, then, oxalic acid in the elution was quantified by potassium permanganate method.

This method possesses an advantage of reduced time for the quantitation procedure.

Keywords: oxalic acid, minicolumn, party goods

はじめに

現代の社会生活では、化学薬品と生活は密接な関係を持つようになり、数知れぬほど多数の化学薬品が日常生活に広く使用されているが、これらの中には毒物又は劇物に相当するものもたくさんある。このような中で、これらのものの定性及び定量試験を実施し、毒物又は劇物に該当するか否か確認することにより、人体に対する安全性を確保する必要性が増している。

元来、花火中には、炎色剤の目的でシュウ酸リチウム等のシュウ酸塩が広く使用されてきたが¹⁾、これらは、血液中の石灰分を奪取し、神経系をおかす作用があり、シュウ酸として10%を超えて含有すると、毒物及び劇物取締法で劇物に指定されている²⁾。そこで今回、パーティ用玩具として市販されている花火についてシュウ酸の定量法を検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 試薬

1 N 塩酸溶液：塩酸（和光純薬工業株式会社製試薬特級）90mlを精製水で1ℓとした。

1 N 酢酸溶液：酢酸（和光純薬工業株式会社製試薬特級）6gを精製水で100mlとした。

0.01Mアンモニア水溶液：アンモニア水（和光純薬工業株式会社製精密分析用25%）65mlを精製水で1ℓとし、100倍希釈した。

1 N水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（和光純薬工業株式会社製試薬特級）40.0gを精製水で1ℓとした。

0.1 N水酸化ナトリウム溶液：1 N水酸化ナトリウム溶液を精製水で10倍希釈した。

10%塩化カルシウム溶液：塩化カルシウム（和光純薬工業株式会社製試薬特級）100gを精製水で1ℓとした。

(1+2) 硫酸：JIS K0102 17, 100℃における過マンガン酸カリウムによる酸素消費量により調製した。

N/40過マンガン酸カリウム溶液：JIS K0102 17, 100℃における過マンガン酸カリウムによる酸素消費量により調製した。

シュウ酸リチウム標準液（1mg/ml）：シュウ酸リチウム（和光純薬工業株式会社製化学用）1gを精製水で1ℓとした。

硫酸銅溶液（1mg/ml）：硫酸銅（和光純薬工業株式会社製試薬特級）1gを精製水で1ℓとした。

試料前処理用カートリッジ：TOYOPAK IC-SP M（東ソー株式会社製）

2. 試料

パーティ用玩具

表示成分量を表1に示す。

3. 分析操作

図1に示すとおり、粉碎した試料100mgを三角フラスコに秤量し、精製水50mlを加え攪拌後、不溶物をろ過除去した。このろ液を試料前処理用カートリッジに注入し、溶出液を分取し、1N水酸化ナトリウム溶液1ml、10%塩化カルシウム溶液2mlを加え、シュウ酸カルシウムの沈殿を生成させた³⁾。この液をろ過後沈殿を分取し、(1+2)硫酸10mlに溶解後、精製水100mlを加え、70℃に保ちながらN/40過マンガン酸カリウム溶液で滴定した⁴⁾。

結果および考察

1. 分析法の検討

1) pHの影響

pHによるシュウ酸カルシウムの生成条件を検討した。試料と同濃度のシュウ酸リチウム溶液(15mg/50ml)を調製し、pH調整のために、それぞれ、1N塩酸溶液、1N酢酸溶液、0.01Mアンモニア水溶液、0.1N水酸化ナトリウム溶液および1N水酸化ナトリウム溶液を加えた。次いで、10%塩化カルシウム溶液2mlを加え、シュウ酸の定量を行なった。表2に示すように、pH3.7~12.4ではシュウ酸リチウム定量値に差はなかったが、pH1.7では回収率が70.2%と低かった。これは、強酸性下ではシュウ酸カルシウムが溶解しやすいためと考えられる。強酸性下以外の条件ではシュウ酸カルシウムの生成量に差はなかった。

一方、試料を前処理用カートリッジで処理したときの溶出液は、pH3.7以下であり、回収率が93.3%と低くなった。従って、前処理用カートリッジの溶出液には、1N水酸化ナトリウム溶液1mlを加えることとした。

2) 塩化カルシウムの影響

加える塩化カルシウムの影響を検討した。試料と同濃度のシュウ酸リチウム溶液(15mg/50ml)を調製し、それぞれ、塩化カルシウム5mg、10mg、20mg、40mg、80mg、100mgおよび200mgを加えた。図2に示すように、シュウ酸リチウムの定量値は、加える塩化カルシウムの量が40mgまでは次第に増加しているが、40mg以上では、ほぼ一定となっている。シュウ酸カルシウム生成反応では、シュウ酸リチウム15mgに対する塩化カルシウムの当量は、8.2mgであるが、実際は過剰の塩化カルシウム(40mg以上)が必要である。これは、反応系において、塩化カルシウムが過剰になると反応が進みシュウ酸カルシウムが速やかに生成するためと考えられる。そこで、加える塩化カルシウムの量は200mgと

表1 パーティ用玩具中の表示成分量

成分名	成分量 (mg)	成分含有率 (%)
メタルデヒド	730	76.8
シュウ酸リチウム	140	14.7
硫酸銅	40	4.2
ホウ酸	10	1.1
チタン	30	3.2
計	950	100.0

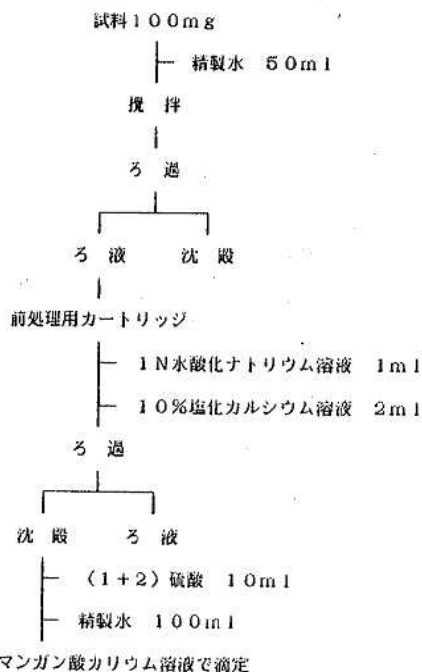


図1 分析操作

表2 pHとシュウ酸リチウム定量値の関係

pH調整液	調整後pH	シュウ酸リチウム 定量値 (mg)	回収率 (%)
1N塩酸溶液	1.7	10.5±0.4	70.2±2.5
1N酢酸溶液	3.7	15.0±0.2	100.0±1.2
	5.8	15.1±0.1	100.5±0.4
0.01Mアンモニア水溶液	8.6	15.1±0.1	100.5±0.4
0.1N水酸化ナトリウム溶液	10.9	15.0±0.1	100.2±0.4
1N水酸化ナトリウム溶液	12.4	15.0±0.1	99.8±0.4

した。

2. 共存物質の影響

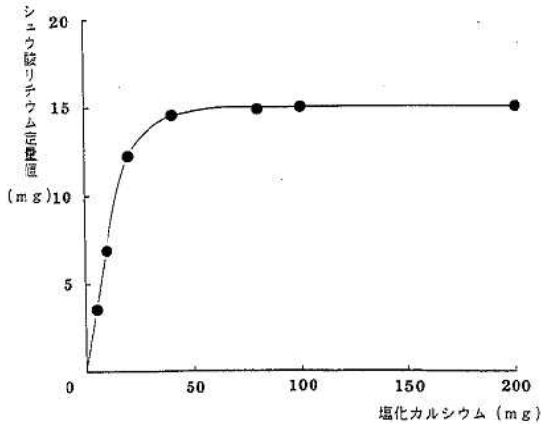


図2 塩化カルシウムとシュウ酸リチウム定量値の関係

表3 硫酸銅の分析におよぼす影響

硫酸銅 (mg)	シュウ酸リチウム定量値 (mg)	前処理後シュウ酸リチウム定量値 (mg)
0	15.0 ± 0.2	15.0 ± 0.0
5	13.1 ± 0.3	14.9 ± 0.1
10	10.9 ± 0.4	15.0 ± 0.1
15	9.1 ± 0.2	14.8 ± 0.1

表4 パーティ用玩具の分析結果

成分名	定量値	回収率
シュウ酸リチウム (%)	13.3 ± 0.6	105.7 ± 4.0

試料の成分のうち、シュウ酸と錯化合物を生成する銅イオンの影響を検討した。試料と同濃度のシュウ酸リチウム (15mg / 50ml) を調製し、それぞれ、硫酸銅溶液 (1mg / ml) を 5ml, 10ml および 15ml を加えた。表3に示すように、加えた硫酸銅溶液の増加に伴い、シ

ュウ酸リチウム定量値が減少している。加えた硫酸銅量とシュウ酸リチウム定量値の関係は、相関係数 $r = 0.999$, $y = 15.01 - 0.398x$ の負の相関関係を示した。回帰式から計算すると硫酸銅を 10mg 加えたときのシュウ酸リチウム量 (添加量一定量値) は 3.98mg である。このときの銅イオンとシュウ酸イオンのそれぞれのモル数は、 $4.01 \times 10^{-2} \text{ mmol}$, $3.91 \times 10^{-2} \text{ mmol}$ ほぼ等しく、試料溶液中の全ての銅イオンがシュウ酸と反応していると考えられる。このことより、銅イオンが共存すると、シュウ酸イオンはまず銅イオンと反応し、シュウ酸銅を生成すると考えられる。

しかし、前処理用カートリッジで銅イオンを除去すると、加えた硫酸銅の量にかかわらず良好な結果が得られた。

3. パーティ用玩具中のシュウ酸リチウムの定量

パーティ用玩具中のシュウ酸リチウムの定量値および回収率を表4に示した。定量値は 13.3%, 回収率は 105.7% と、良好な結果が得られた。

まとめ

1. シュウ酸カルシウムの生成には、pH は影響しないが、加える塩化カルシウムは過剰に必要である。
2. シュウ酸の定量時、銅イオンが共存すれば負の誤差を生じるが、銅イオンを前処理用カートリッジで除去することにより、迅速かつ容易に分析できる。

文献

- 1) 細谷政夫：花火の科学，92～98，東海大学出版会 (1980)
- 2) 下村孟：毒物劇物取扱の手引，315～320，時事通信社 (1973)
- 3) 日本薬学会：薬毒物化学試験法注解増補版，23，南山堂 (1985)
- 4) 並木博他：詳解工場排水試験方法，75～84，日本規格協会 (1986)