

B. 調 查 研 究

I 論 文

1 スギ花粉症の研究

(第一報、スギ花粉飛散と患者の実態調査)

助野 典義 紺野 光雄

1. はじめに

近年、春先になると毎年のようにスギ花粉症患者が急増しマスコミを賑わす。この疾病は日本固有の病気であり、これまではあまり話題にならなかった病気の一つである(文献1)。しかし最近の統計では国民の10から20%が潜在的花粉症患者といわれ、今世紀最後の疫病といわれているインフルエンザの患者の数よりも多く発病する。疫病ではないが一種の季節的な流行病となっており行政上の立場から、あるいは疫学や公衆衛生上の視点からもこの花粉症対策を真剣に取り組む必要性に迫られている。一方、スギ花粉症患者の発病メカニズムや患者の実態、あるいは血清疫学的な調査など未だ究明されていない点も多く、なかでも近年のスギ花粉症患者が急増した理由は不明である(文献2)。本研究ではスギ花粉症患者の発病予防のため、本症の主たる抗原と考えられるスギ花粉の飛散状況の調査を行い、さらにスギ花粉症患者の発病実態調査を行ったのでその結果を報告する。

2. 材料と方法

2-1 スギ花粉数飛散の計測

IS式ロータリー型花粉補集器を当センターの屋上(地上高約10メートル)に設置した。スギ花粉の計測は一辺が20ミリメートルの正方形の黒い線でマークをしたスライドグラス(図1)の枠内に白色ワセリンを塗り、

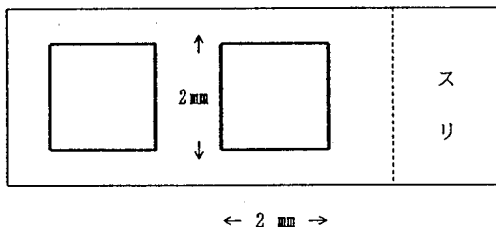


図1 スライドグラス

補集器内に適当時間(24時間から48時間)設置後、グラスに付着した花粉の数を顕微鏡下で計測し、1平方センチ当りの数値で表した。また、当センター以外で計測されているスギ花粉飛散数のデータはキッセイ薬品工業株式会社の東北スギ花粉飛散情報の資料を参考にした。

2-2 スギ花粉患者のアンケート方式による発病実態調査

今回使用した調査票の様式は東京都が行っている様式を参考にしたものでその一部を図2に示した。スギ花粉症の患者は保健環境センターの職員およびボランティアで、男性1名と女性5名の計6名である。これらの人々にスギ花粉の飛散開始が予測される2月19日から終熄が予測される4月30日までの間、毎日3回、花粉症の症状を認めた場合(有症時)に+の記号で記載してもらった。スコアの計算はワンプラス(+)を1点として計算した。

☆☆☆鼻と目の症状記録表☆☆☆
(花粉症日誌)

氏名 _____
住所 _____
勤務先住所 _____

月 日		月(日曜)日		
鼻	くしゃみ	朝	昼	夜
	鼻みず			
の	鼻つまり			
	きゅう覚異常			
目	かゆい			
	まぶしい			
の	なみだ			
	目やに			
症	こぼす感じ			
	痛み			
他気づいたこと				

図2 調査票

2-3 気象データの作成

すべての気象データは日本気象協会東北本部で発行している宮城県気象月報を参考にした。風配図の作成に当たっては保健環境センター大気部のデータ(昭和63年度資料)を基にした。

2-4 植生図の作成

環境庁が行った、第二回自然環境基礎調査(植生調査)昭和56年発行の宮城県現存植生図より転載した。

3. 結果および考察

3-1 スギ花粉飛散状況調査

保健環境センター屋上で観測したスギ花粉の飛散状況を表1に示した。当センターにおける初飛散観測日は平

表1 スギ花粉飛散数計測結果

観測日 月 日	1 月		2 月		3 月		4 月	
	センター	センタ-累計	センター	センタ-累計	センター	センタ-累計	センター	センタ-累計
1			0.00	0.00	4.00	12.70	-	181.25
2			0.00	0.00	14.00	26.70	10.40	191.65
3			0.00	0.00	8.50	35.20	5.75	197.40
4			0.00	0.00	-	35.20	-	197.40
5			0.00	0.00	35.00	70.20	-	197.40
6			0.00	0.00	3.00	73.20	11.70	209.10
7			0.00	0.00	1.10	74.30	-	209.10
8			0.00	0.00	7.30	81.60	-	209.10
9			0.00	0.00	-	81.60	1.40	210.50
10			0.00	0.00	-	81.60	0.10	210.60
11			-	0.00	-	81.60	0.10	210.70
12			-	0.00	8.00	89.60	0.10	210.80
13			-	0.00	7.90	97.50	0.00	210.80
14			-	0.00	22.10	119.60	0.00	210.80
15			0.00	0.00	10.00	129.60	-	210.80
16			0.00	0.00	12.30	141.90	0.10	210.90
17			0.00	0.00	-	141.90	終了	210.90
18	0.00	0.00	0.00	0.00	-	141.90		
19	0.00	0.00	-	0.00	23.60	165.50		
20	0.00	0.00	0.00	0.00	-	165.50		
21	-	0.00	0.30	0.30	5.40	170.90		
22	-	0.00	0.00	0.30	-	170.90		
23	0.00	0.00	0.00	0.30	2.40	173.30		
24	0.00	0.00	-	0.30	-	173.30		
25	0.00	0.00	-	0.30	1.00	174.30		
26	0.00	0.00	4.90	5.20	4.40	178.70		
27	0.00	0.00	2.80	8.00	0.06	178.76		
28	0.00	0.00	0.70	8.70	0.19	178.95		
29	-	0.00	-	-	1.90	180.85		
30	0.00	0.00	-	-	0.40	181.25		
31	0.00	0.00	-	-	-	181.25		

成元年2月21日であった。また、同じ仙台市内の観測場所である東北大学のデータのそれでは2月16日であったが、この状況は昨年初飛散日の2月23日より7日早いことになる(文献3)。その後、一週間は顕著な増加はみられなかったが、2月末より急激に増加した。終熄はほぼ4月中旬と考えられ、飛散数の累計(平成元年2月から4月まで)は当センターで210個であった。また、東北大学の観測では233個であり、ほぼ同数という結果であった。昨年の東北大学の調べではこの累計が2,163個であったので、これとの比較では本年はほぼ十分の一と激減していた。初飛散日が昨年に比べ一週間早まった原因については、本年1月1日からの日最高気温累計が290度に近ずいた日が2月14日であり、昨年の2月23日(気温累計284度)に比べ9日も早まったことでも明らかのように、本年の冬期の気候が温暖で暖かい日が多かったことによるものと考えている。一方、スギ花粉飛散数の累計が激減した原因については、昨年夏期の低温・日照不足によるもの、また昨年は3年周期のスギ花粉豊作年に当り、スギ花粉が大量に飛散したための隔年現象によるものと考えている(文献3, 4, 5, 6)。

3-2 スギ花粉患者の発病実態調査

スギ花粉症患者の有症日をスコア方式で表したのが表2である。今回の調査が初めてということもあり、病状の表現をどの程度とするか個人によって異なり苦慮したようであった。ただ、今回の結果から全員に共通した現

象としては一日のうち平均して朝の起床時の有症例が多くみられ、一日の約半分(494/1,008)が朝方に発症していることが明らかになった。

表2 花粉症アンケート調査結果

月	日	スコア				月	日	スコア				月	日	スコア				
		計	朝	昼	夕			計	朝	昼	夕			計	朝	昼	夕	
3	1	●	18	5	5	6	4	1	○	25	11	5	5					
	2	○	20	6	7	7		2	○	13	7	15	5					
	3	●	20	8	6	4		3	○	10	4	2	4					
	4	●	10	5	0	5	4	4	○	33	14	5	10					
	5	●	16	11	3	2	5	5	○	26	13	5	7					
	6	●	9	6	2	1	6	6	○	30	11	10	9					
	7	●	19	9	4	6	7	7	○	16	7	6	3					
	8	●	3	3	0	0	8	8	●	8	3	2	3					
	9	●	7	4	1	2	9	9	○	12	7	2	3					
	10	○	7	3	4	0	10	10	●	10	5	2	3					
	11	○	5	4	1	0	11	11	●	8	6	1	1					
	12	○	18	13	2	3	12	12	●	8	6	0	2					
	13	○	9	3	3	3	13	13	○	11	6	2	3					
	14	○	18	8	6	4	14	14	○	13	7	4	2					
	15	○	24	13	7	4	15	15	○	22	10	6	6					
	16	○	17	11	4	2	16	16	○	20	9	6	5					
	17	○	7	3	3	1	17	17	○	17	7	5	5					
	18	○	13	8	3	2	18	18	○	20	10	5	5					
2	19	○	9	4	2	3	19	19	○	9	8	4	7					
2	20	○	7	2	2	3	20	20	○	15	9	3	3					
2	21	○	7	4	0	3	21	21	○	5	4	0	1					
2	22	○	16	6	2	8	22	22	○	9	7	2	0					
2	23	○	25	8	10	7	23	23	○	5	3	1	1					
2	24	○	7	6	0	1	24	24	○	6	4	1	1					
2	25	○	4	2	2	0	25	25	○	6	5	0	1					
2	26	●	11	8	3	0	26	26	○	13	9	1	3					
2	27	○	8	7	0	1	27	27	○	10	7	1	2					
2	28	○	17	5	8	4	28	28	○	14	10	3	1					
	29	○	11	6	3	2	29	29	○	17	9	6	2					
	30	○	17	9	6	2	30	30	○	4	3	1	0					
	31	○	16	11	4	1												
月合計	111	52	29	30	月合計	376	212	90	74	月合計	521	230	144	147				
2月合計	52	29	30	23	3月合計	487	284	119	104	24	4月合計	1008	494	263	251			

- 1) 調査人数 : 2月25日より4月15日までは6名、それ以外の日は5名
- 2) 天候表示 : ○⇒晴れ、●⇒曇り、●⇒雨、*⇒雪
- 3) 症状スコア: 症状がた場合に一点とした

3-3 スギ植生図と気象

宮城県のスギ植生を図3に示した。黒く塗りつぶした部分がスギ植生である。スギの植生は山間部、特に県北山間部(花山村、鳴子町、宮崎町)と県北沿岸部(志津川町、津山町、河北町)さらに県南山間部(蔵王町、七ヶ宿町)に多くみられ、仙台圏では仙北の利府町に集積が見られた。

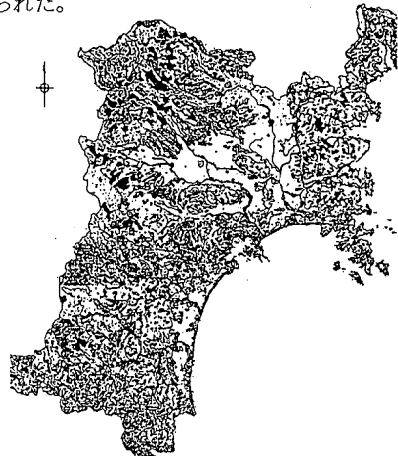


図3 宮城県スギ植生調査図

一方、これらの地区の一ヶ月の平均風向図（風配図）を図4に示した。2月から3月までの風向は北西風が多く、特に県北で顕著であった。4月になると北西風と南東風が同程度となり、海風である南の湿った暖かい風が入ってきていることが分かる。特に県南部でその傾向が顕著であった。これらの結果から仙台地区の2月から3月にかけてのスギ花粉は仙北地域に植生しているスギの樹木から北西の季節風によって飛んできてくることなどが考えられるが、スギ花粉の飛程などについては不明であり今後さらに検討してみたい。

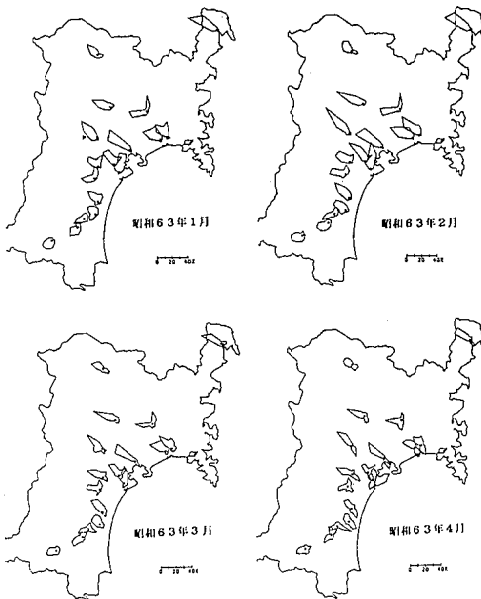


図4 宮城県の冬期風配図

4. まとめ

- (1) 今年のスギ花粉飛散数は例年より顕著に少なく、東北大学のデータでも昨年に比べて約十分の一であった。この傾向は秋田県（昨年比で二分の一）を除けば、東北各県とも同様の傾向であった（表3）。
- (2) スギ花粉患者の調査結果では朝方に発症する例が多い。また、患者のアンケート調査では例年の症状に比べて本年は非常に軽症であったとの報告であった。ただし、今回の調査からスギ花粉飛散数と患者の発症との関係について明確な答えは見い出せなかった。
- (3) スギ花粉症とスギ花粉飛散数あるいは気象との関係では、本年は軽症患者が多かったこと、スギ花粉の飛散量が昨年に比べ顕著に少なかったことなどは明らかであったが、気象と発症との関係について結論を出せなかった。

5. 謝 辞

本研究に対して終始御指導をいただいた東北大学医学教授・高坂知節博士に深謝するとともに東北スギ花粉飛散情報を提供していただいたキッセイ薬品工業株式会社および気象情報を提供していただいた保健環境センター大気部テレメーター部員各員に感謝します。

参 考 文 献

1. スギ花粉症の疫学と治療
高藤 繁, Med.Imm. 15, 73-78, '88
2. 花粉アレルギーの増加と大気汚染
村中正治, 日本医事新報, 3180, 26-32, '85
3. スギ花粉症, 高坂知節ら
公衆衛生情報みやぎ, 147, 7-8, '89
4. 花粉学, 岩波洋造
講談社サイエンティフィック, '87
5. アレルギー性鼻炎と花粉症
斎藤洋三, 有斐閣選書, '86
6. 花粉症の予防と治療
斎藤洋三, 有斐閣選書, '88

表3 東北各県のスギ花粉飛散状況(キッセイ薬品工業株式会社の提供による)

観測日 月日	観測地点(2月)							観測地点(3月)							観測地点(4月)									
	気温	花粉症	東北	山形	秋田	青森	岩手	盛岡	気温	花粉症	東北	山形	秋田	青森	岩手	盛岡	気温	花粉症	東北	山形	秋田	青森	岩手	盛岡
1	212								408.9	○	12.00	2.00	0.30	0.00	0.00	9.80	734.6	○	11.00	45.00	2.00	17.00	69.00	7.10
2	216								418.0	○	4.00	6.00	0.00	0.00	0.00	8.30	749.4	○	5.00	17.00	2.00	29.00	11.00	19.40
3	216								427.1	○	2.00	11.00	1.00	1.00	9.00	9.40	770.2	○	5.00	16.00	1.20	25.00	26.00	19.40
4	220								444.6	○	2.00	7.00	2.00	2.00	8.00	20.50	783.6	○	7.00	10.00	0.00	11.00	21.00	4.30
5	228								453.3	●	9.00	1.00	2.00	0.00	0.00	20.50	793.7	○	1.00	2.00	0.00	1.00	5.00	1.90
6	238		0.00		0.00		0.00		462.1	○	2.00	4.00	0.00	1.00	1.50	20.50	810.2	○	0.00	3.00	0.00	2.00	5.00	2.50
7	247		0.00	0.00		0.00	0.00		468.4	○	2.00	7.00	4.00	1.00	1.50	2.50	823.6	○	1.00	5.00	17.10	10.00	6.00	9.20
8	257		0.00	0.00		0.00	0.00		475.1	○	4.00	13.00	1.00	0.00	6.00	0.00	835.6	○	0.00	1.00	0.30	3.00	1.00	4.90
9	262		0.00	0.00		0.00	0.00		481.0	○	2.00	4.00	0.00	1.00	1.00	2.20	854.0	○	2.00	0.00	0.30	5.00	1.00	2.30
10	268		0.00	0.00		0.00	0.00		491.4	○	2.00	11.00	1.00	6.00	2.50	7.70	866.1	○	2.00	1.00	3.10	4.00	1.00	2.30
11	273		0.00	0.00		0.00	0.00		505.2	○	8.00	15.00	8.00	4.00	12.00	8.60	875.6	○	0.00	0.00	0.40	1.00	0.00	0.30
12	280		0.00	0.00		0.00	0.00		518.3	○	5.00	21.00	8.00	3.00	30.50	5.20	882.7	○	0.00	0.00	1.00	2.00	3.00	0.30
13	286		0.00	0.00		0.00	0.00		532.4	○	6.00	22.00	84.00	63.00	47.50	5.20	900.6	○	0.00	4.00	0.00	4.00	1.00	4.90
14	293	◎	0.00	0.00		0.00	0.00		548.2	○	15.00	69.00	45.50	2.00	32.50	23.10	920.6	終了	1.00	0.00	0.40	1.00	1.00	12.70
15	304		0.00	0.00		0.00	12.70		559.8	○	20.00	35.00	53.00	52.00	46.90	4.30	940.5	○	0.00	0.00	0.00	1.00	2.00	6.20
16	317		1.00			0.00			570.5	○	3.00	12.00	4.00	46.00	14.60	8.80	955.9	○	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	4.90
17	323		0.00			0.00			577.4	○	2.00	3.00	9.00	39.00	9.00	7.70	971.1	○	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.90
18	327		0.00	1.50		0.00			584.1	○	4.00	2.00	2.50	20.00	2.50	3.30	月合計	35.00	105.00	27.80	116.00	154.00	107.50	
19	336		1.00			0.00			584.2	○	1.00	9.00	2.50	18.00	2.50	0.50	累計(A)	233.00	694.10	372.60	750.00	780.00	402.00	
20	346		1.00	0.20		0.00	10.50		605.9	○	3.00	19.00	9.00	20.00	23.00	0.50	累計(B)	2,163	5,841	835	6,405	3,345	6,532	
21	355		6.00	0.20		0.00	11.40		613.6	○	3.00	4.00	8.50	20.00	5.00	2.50	(A/B)%	10.77	11.88	30.85	11.71	33.32	6.16	
22	361		3.00	0.00		0.00	5.80		618.7	○	2.00	4.00	8.50	3.00	2.00	2.50								
23	367	★	0.00	0.00		0.00	0.60		627.0	○	1.00	11.00	2.20	30.00	90.00	3.10								
24	370		1.00	1.20		0.00	1.00		634.1	○	7.00	29.00	39.30	33.00	11.00	3.70								
25	375	○	2.00	0.00		0.00	6.50		647.7	○	3.00	12.00	6.80	75.00	16.00	0.90								
26	380	○	0.00	0.00		0.00	1.00		660.7	○	21.00	41.00			67.00	14.40								
27	385	○	2.00	2.00		0.00	8.00	0.60	669.6	○	10.00	76.00	25.00	26.00	27.00	14.40								
28	395	○	4.00	1.00	0.10	0.00	16.00		676.1	○	0.00	15.00	1.80	35.00	12.00	1.20								
29	月合計		21.00	6.10	0.10	1.00	10.00	54.10	688.9	○	8.00	38.00	3.00	14.00	57.00	4.90								
30	累計		21.00	6.10	0.10	1.00	10.00	54.10	701.1	●	3.00	24.00	3.00	37.00	62.00	4.90								
31									713.9	○	4.00	56.00	9.80	72.00	7.00	9.50								
									月合計	198.00	583.00	344.70	633.00	615.00	230.40									
									累計	219.00	589.10	344.80	634.00	626.00	264.50									

花粉症予測凡例, ○:安定日 ○:注意日

★:昭和63年のスギ花粉初飛散日

◎:昭和63年1月1日から日最高気温累計が290度に達した日

S63:昭和63年, H1:平成元年

2 感染症サーベイランスデータ解析の試み

三浦 英美 助野 典義 紺野 光雄

1. はじめに

感染症サーベイランス事業の目的は監視対象としている疾病の患者発生状況を把握し、これらの疾病の流行に際して適切な措置が講じられるような情報を保健所や医療機関等に提供することである。しかし、現在のサーベイランスシステムではこの事業目的を効果的に実施できるとは言い難い状況にある。そこで我々は提供する情報を分かりやすくするため、また、公衆衛生や医療の現場の人々が実際に活用できるようにするためグラフ表示という方法を試みた。また、本事業の実施によって各疾病の発生に関するデータが約10年間にわたって蓄積されてきた。そこで、本事業の目的を効果的に実施するために、これまでのデータを基にして将来の流行を予測することが大きな課題であり、こうした課題への取り組みとして今回簡単な解析手法による流行予測を試みたので併せて報告する。

2. 方 法

グラフ表示及び流行予測の対象とした疾病は、感染症サーベイランスの対象としている27の疾病のうち週単位でデータの入手が可能な18の疾病である。これらの疾病に関する患者発生のデータは、全国結核・感染症サーベイランス・オンラインシステムを利用して宮城県保健環境センターに設置されたオフィスコンピューターによつ

て集計又は送受信された(図1)。得られたデータはフロッピディスクを介して当センターの汎用コンピューター(NEC-ACOS 430: N 7043-11, 主記憶容量4MB)で処理し、集積、解析を行なった¹⁾。

グラフ表示及び流行予測を行なうにあたってはACOS 430を用い、FORTRAN言語²⁾により独自のプログラムを開発した。また、それぞれのプログラムでグラフ作成の部分はACOS 430のソフトウェアである図形中核システム(Graphic Core System)³⁾を用い、結果をグラフ/イメージモードにより日本語ページプリンタ(NEC製: 7381-21, 印字速度1250行/分)に出力した。

3. 結果及び考察

(1) グラフ表示

疾病流行の周期性や流行の大きさの変化などを見やすくするために年、週をそれぞれ横軸に、報告数を縦軸にとり、それぞれの時期におけるデータ点を縦・横のメッシュ状に結ぶ3次元グラフ表示を試みた。(図2)

グラフは常に手前の方から後方に向かって描かせ、既に描いたグラフの後方の線は描かせないようにして描線が複雑に重ならないようにした。この表示方法では、以前に描いた線の画面座標での最大値を記憶しておき、それより大きい線のみを描かせるようにしている。しかし、このような陰線処理法によりグラフの大きな山の陰に隠れた小さな山など一部のデータが表示されなくなるが、このような場合グラフ画面を前後左右の4方向から表示することにより隠れた部分も描けるように工夫した。今回は1年を52週に分割してグラフ表示しているが('86年の場合は53週目を52週目と平均化)、画面の座標軸には月単位で目盛を付すようにした。また、疾病の流行のピークがグラフの端の第52週目に来て、翌年の第1週目と不連続にならないように表示開始の月を調整した。

図2に18疾病における'89年第35週(8月)までのデータに基づく3次元グラフの基本画面を示した。

今回の3次元グラフ表示により幾つかの疾病について流行の特徴を視覚的に捕らえることが出来るようになった。そして、流行の特徴を視覚的に捕らえることにより、次の解析のための指針が与えられる。例えば、水痘や感染性胃腸炎、ヘルパンギーナ、インフルエ

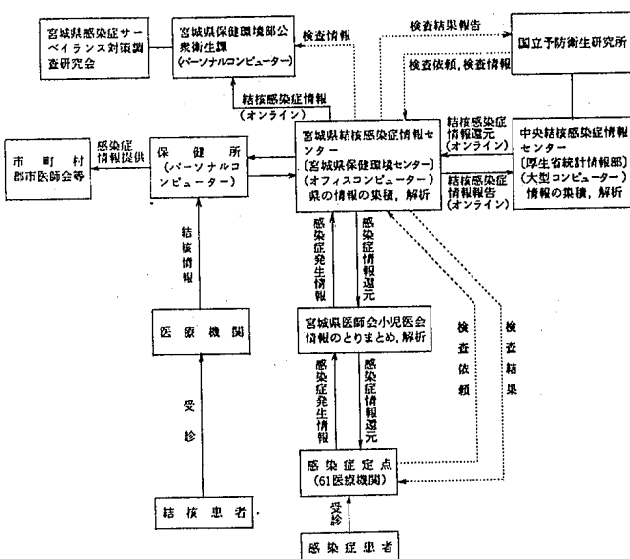


図1 結核・感染症サーベイランス情報の流れ

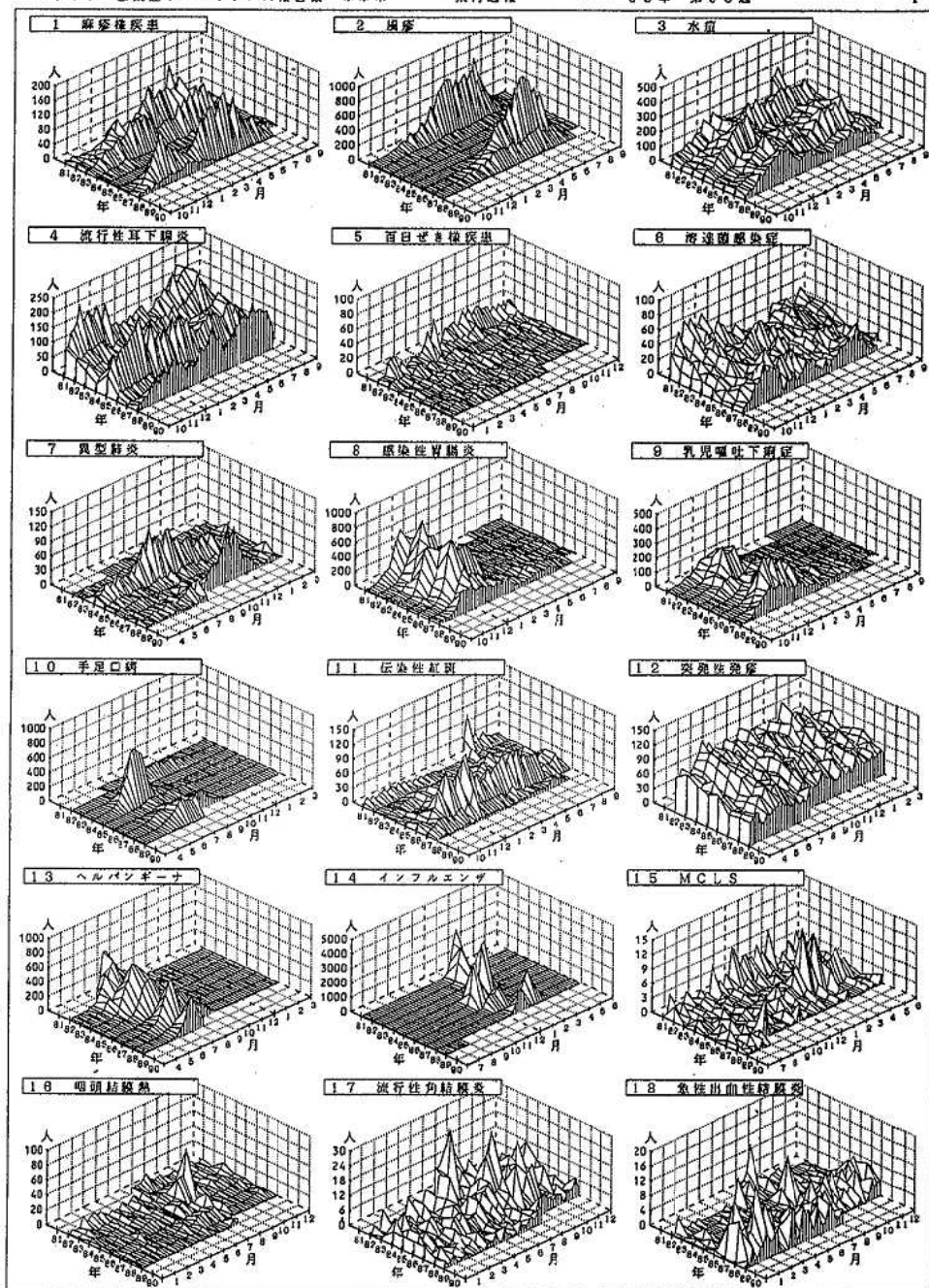


図2 3次元グラフ

感染症サーベイランス予測解析 県内週報 ~ '89年第35週 予測期間: 13週 ('89年第27週)

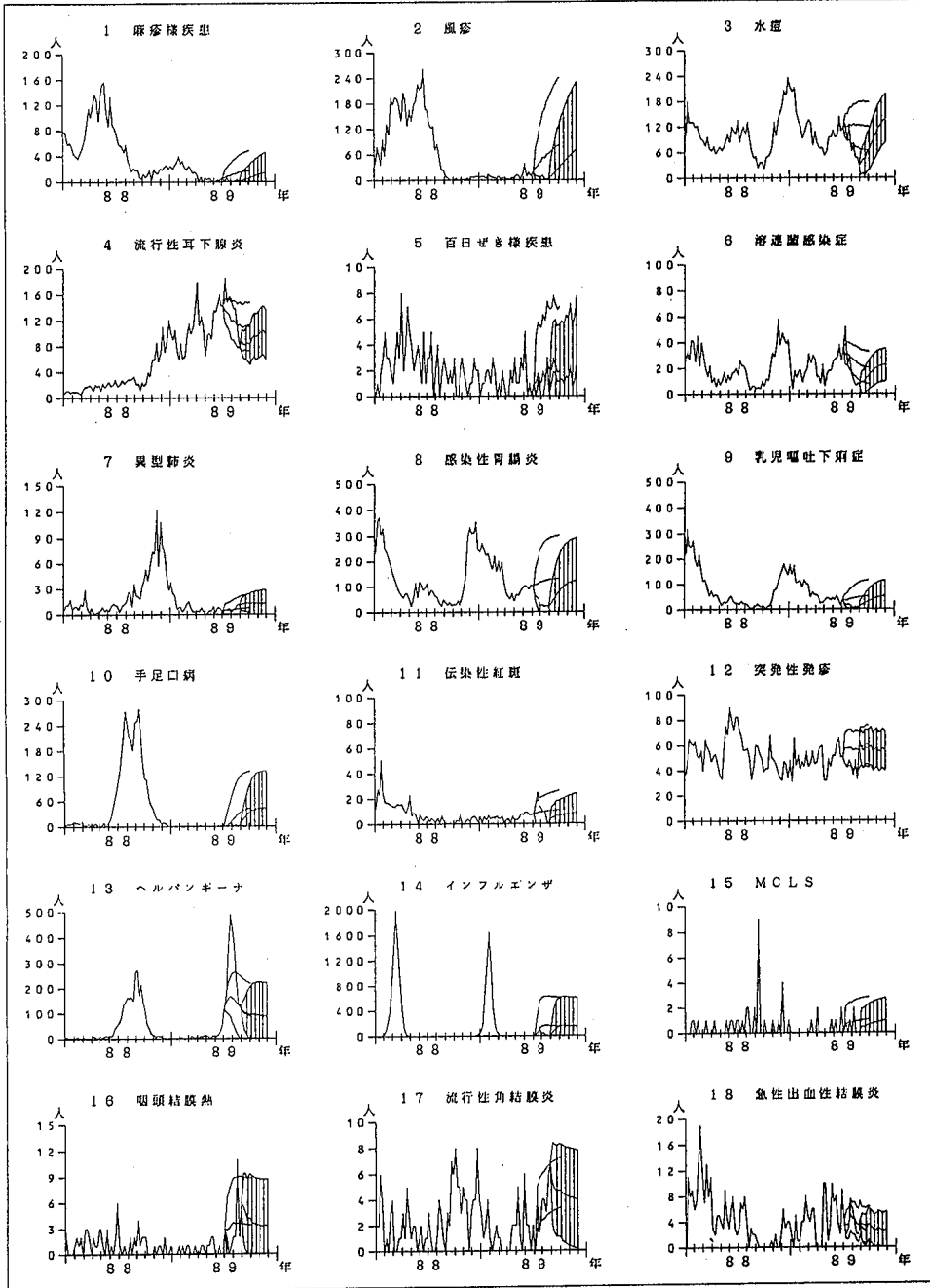


図3 流行予測

ザなどは毎年周期的な流行が見られる疾病であることが分かる。この周期性は前回の流行の規模、感受性グループの抗体価、ウィルスタイプなどが反映しているものと考えている。また、水痘や感染性胃腸炎の流行はインフルエンザの発生に伴いインターフェェアされる傾向が見られる。しかし、毎年冬期に周期的な流行を繰り返すインフルエンザの場合には、流行発生の時期がその年によって変わるので、図4に示したような単純な時系列グラフの方が分かりやすい場合もある。

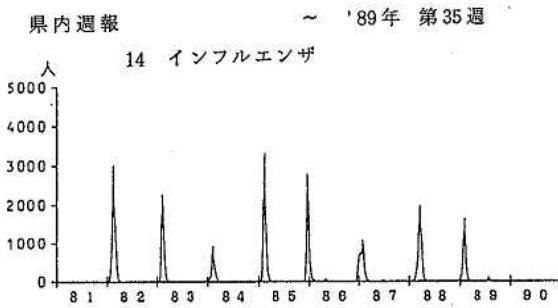


図4 時系列グラフの例

一方、麻疹、風疹、異型肺炎などは数年ごとに大きな流行を繰り返している疾病であり、昭和63年度には麻疹と異型肺炎⁴⁾で大きな流行が見られた(図2)。麻疹と風疹は流行期に入ると2~3年連続的な周期で発生することが知られており、図2のグラフ表示においてもその傾向が見られた。また、本県において異型肺炎は前回の'84年の流行から4年目の流行となったが、今回の流行ではそのピークが2~3カ月遅れたにもかかわらずほぼ同じ時期(翌年1月)に流行が終息している。

(2) 流行予測

流行予測の計算には時系列解析における自己回帰モデルを用いた⁵⁾。このモデルは経済予測などでもよく用いられているものであるが、予測計算に必要なパラメーターを自動的にコンピューターで決めるようにできるなど簡単に利用でき、しかも計算が単純なわりにはマクロレベルでの予測力が高いことが知られている。

自己回帰モデルによれば、時系列 $\{y_n : n=1, \dots, N\}$ の1期先の値 y_{n+1} は m 個の現在及び過去の値 $y_n, y_{n-1}, \dots, y_{n-m+1}$ と白色雑音 v_{n+1} で表すことができる。

$$y_{n+1} = \sum_{j=1}^m a_j y_{n-j+1} + v_{n+1} \quad (1)$$

ここで、 m は自己回帰モデルの次数、 a_j は自己回帰係数、 v_{n+1} は正規分布に従い、平均が0で、分散が y_{n+1} の分散に等しく v_{n+1} の過去と独立な白色雑音である。そこで、与えられた時系列データから標本自己共分散関数を推定し、これをもとに自己回帰係数 a_j を計

算することによって(1)式により順次適当な期間までの予測を行なうことができる。予測計算を行なうための標本自己共分散関数の推定には全期間のデータを用いたが、予測結果のグラフ表示は前年分のデータからとした。

(図3)

今回試みた流行予測はごく初歩的なものであり、報告数が少なくばらつきの大きいデータの疾病に対して、あるいは明確な流行の周期を持たない疾病や流行の周期が数年といった長い疾病に対しては予測の不確かさが大きすぎて的確な予測をしているとは言えなかった。図3のグラフには'89年第35週までのデータとその先13週間の予測(予測の不確かさの範囲を1週おきに縦線で表示; 3カ月)の他に第27週までのデータに基づく13週間先までの予測(実線により予測値と予測の不確かさの範囲をそれぞれ表示)を示している。第27週の時点の予測において、水痘、流行性耳下腺炎、溶連菌感染症は減る傾向を示してその後のデータもほぼそのとおりになっているが、第35週の予測では増える傾向の予測に転じている。しかし、ヘルパンギーナやインフルエンザのような3次元グラフから見て的確な予測ができそうな疾病に対しても、年ごとの流行の時期のずれなどが影響して予測の不確かさが大きく、的確な予測となっていない。

4. 考 案

今回試みたグラフ表示の3次元グラフは、データを分かりやすく表示するための一つの方法に過ぎないが、これをもとにしてデータの有効な活用を図ることができるものと考えている。その一つは、グラフ表示の第一の目的であった公衆衛生、医療の現場でのサーベイランス情報の活用を進めることであり、今後はグラフ表示のためのデータの迅速な伝達方法も含めてより使いやすいグラフ表示システムの作成を検討していきたい。

また、グラフ表示に現れている疾病の流行の特徴を統計的に解析していくことにより、流行予測の精度の向上を図ることが可能になる。そのためには、単に宮城県のデータにとどまらず、東北あるいは全国のデータを使わなければならないであろう。全国47都道府県のデータを週ごとに3次元グラフにより表した場合、幾つかの疾病に南から北へと流行の発生に時間的ずれがみられたが、気象条件との関連も含めて解析してみたい。流行予測においても個々の疾病の特徴を予測計算に反映させるとともに、多次元の自己回帰モデル等により全国のデータの動きを反映させることができるようになればより精度の高い流行予測を行なえるものと期待している。しかし、他県のデータを用いる場合、それぞれの都道府県の報告数の精度が問題となる。感染症サーベイランスにおいて得られる報告数は、あらかじめ定められた幾つかの医療機関からの報告であり、その疾病の都道府県ごとの全発生数ではない。したがって、人口当りの発生数をすることもむずかしく、都道府県によってサーベイランス

の体制が異なる場合もあることから他県のデータとの相対的な比較も注意を要する。

この問題については、突発性発疹のような発生件数がある程度推定できる疾病をベースとして他の疾病に換算するという初歩的な試みも行なったが⁶⁾、不確かな要素が多く結論を得ていない。全発生件数とか人口当りの発生件数といったいわゆる絶対数を求めずに他県のデータと比較し統計処理を行なう場合、都道府県ごとのデータの分散を1とし平均値を0にするとか、分散のみを1にするといった方法も考えられるが、都道府県ごとの有用な差まで消してしまう心配があり、十分な検討が必要である。

参 考 文 献

- 1) 三浦英美：宮城県における結核・感染症サーベイランス事業，公衆衛生情報みやぎ140，8，17（1988）
- 2) 日本電気㈱編：ACOSソフトウェア ACOS 4 / AVP FORTRAN77 言語説明書
- 3) 日本電気㈱編：ACOSソフトウェア ACOS 4 / AVP 図形中核システム説明書
- 4) 異型肺炎急増，東北六県防疫月報，140，11，27
- 5) 村上征勝，田村義保編：パソコンによるデータ解析，朝倉書店
- 6) 第12回東北防疫月報研究会報告，東北六県防疫月報，147，6，20（1989）

3 昭和63年度日本脳炎疫学調査一宮城県におけるコガタアカイエカの発生活消長・屠殺豚H₁抗体の動向および住民の中和抗体保有状況一

山本 仁 秋山 和夫 御代田恭子
佐久間 隆 山田久美子

宮城県内では1968年以降、日本脳炎患者の確認例は報告されていないが、ほぼ毎シーズン自然界での日本脳炎ウイルスの増幅・伝播が起っている。本年もウイルスの媒介者であるコガタアカイエカの発生活消長、ウイルスの増幅者である屠殺豚集団におけるウイルスの伝播状況、一般住民の中和抗体分布状況を調査し、日本脳炎流行の可能性を検討した。

1. 序 文

昭和40年代の前半までは、毎年1,000人を越える患者発生が続いた国内の日本脳炎も、その後は急激な減少を示し、ここ数年は九州地方を中心に年間20~40名の患者発生を見るにとどまっている。

しかし日本脳炎が、最も重篤なウイルス性脳炎の1つであることに変わりはない。生態学的観点からは、典型的な人畜共通感染症であり、自然界のブタコガタアカイエカ間で維持されるウイルスの増幅・伝播サイクルの活動は、宮城県でもほぼ毎夏のごとく観察されている。更にウイルスの伝播に最も重要な役割を果しているコガタアカイエカは、水田が主たる発生源となっており、その根絶はまず不可能である。また数年前の調査では、全国各地で採取されたコガタアカイエカが高度な有機リン系殺虫剤抵抗性を獲得しており、その結果として発生個体数の大巾な増加が指摘された。

かかる背景から、ウイルス媒介者であるコガタアカイエカの発生状況、ウイルス増幅者である屠殺豚でのウイルス汚染状況、一般健康住民における感受性者の分布状況について調査を行い、県内の日本脳炎ウイルス活動の把握とヒト患者発生の予測に努めた。

2. コガタアカイエカの発生活消長

2.1 調査方法

従来と同様に、名取市下余田地区で農業を営むH氏宅の豚舎を、コガタアカイエカ発生活消長調査地点とした。3棟の豚舎には常時約30頭の親豚が飼育されており、調査期間中にも次々と仔豚が誕生していた。豚舎の東側は2車線の市道を挟んで広い水田に面しており、南側は畑と水田である。最南側豚舎の南側軒下約1.5mの位置にノザワ式NH-5型捕虫器(NEC社製BL-6Wブラックライト1灯使用)を1基設置し、原則として毎週火曜日と木曜日の18時から翌朝6時まで運転した。

2.2 調査方法

2.2.1: ライトトラップによる蚊の採取は7月6日に開始し10月7日に終了した。

2.2.2: この調査期間中に7月7回, 8月8回, 9月8回, 10月2回の合計25回, 蚊の採取を実施した。

2.2.3: 各調査日に採取された蚊の個体数を種類別に表1に示した。また種類別・月別の雌蚊採取状況を表2, 表3に示した。

表2 Female Mosquitoes (1988)

	7月 (7回)	8月 (8回)	9月 (8回)	10月 (2回)	Total (25回)
C.tritaen.	33	2881	5051	50	8015
C.pipiens	188	456	208	4	856
Ae.vexans	6	2	0	0	8
An.sinen.	4	567	845	5	1421
Arm.subal	0	1	5	0	6
Other spp.	3	2	5	1	11
Total	234	3909	6114	60	10317

表3 Number of Mosquitoes (1988)

	C.tritaen.		Others		Total	
	(♀)	(♂)	(♀)	(♂)	(♀)	(♂)
7月(7回)	33	0	201	37	234	37
8月(8回)	2881	0	1028	57	3909	57
9月(8回)	5051	0	1063	12	6114	12
10月(2回)	50	0	10	1	60	1
Total(25回)	8015	0	2302	107	10317	107

(Natori, 1988)

2.2.4: 1988年名取地区でライトトラップにより観察したコガタアカイエカの発生活消長を週毎の推移(各週2回採取の平均個体数)として図1に示した。

表1 Natori; 1988 (* : 仙台航空測候所)

採取 月日	天候 (最低気温*)	Culex tritaen.		Culex pipiens		Aedes vexans		Anopheles sinen.		Armigeres subal.		Other spp.		Whole species			
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	Σ	
88.7.6~7	晴~くもり (18.1)	3	0	3	19	2	21	1	0	1	0	0	0	0	23	2	25
11~12	くもり (16.9)	9	0	9	49	2	51	4	3	4	0	3	0	1	66	2	68
14~15	小雨~くもり(17.8)	2	0	2	28	2	30	1	2	2	0	0	0	0	31	3	34
19~20	小雨 (16.7)	3	0	3	21	4	25	0	0	0	0	0	0	0	24	4	28
21~22	小雨 (16.5)	5	0	5	27	5	32	0	1	0	1	0	0	0	33	5	38
26~27	小雨 (14.9)	4	0	4	23	14	37	0	0	0	0	0	1	0	28	14	42
28~29	小雨 (16.0)	7	0	7	21	7	28	0	0	0	0	0	1	0	29	7	36
7月小計	(7回)	33	0	33	188	36	224	6	1	7	4	0	4	0	234	37	271
8.2~3	晴 (21.7)	49	0	49	42	11	53	0	0	0	0	44	0	0	135	11	146
4~5	くもり~雨 (23.0)	168	0	168	56	19	75	0	0	0	0	69	0	0	293	19	312
8~9	晴 (22.7)	44	0	44	25	1	26	0	0	0	0	25	0	1	95	1	96
10~11	くもり~風雨(23.1)	128	0	128	18	3	21	0	0	0	0	15	2	0	161	5	166
16~17	くもり~小雨(19.1)	384	0	384	54	1	55	0	0	0	0	36	0	0	475	1	476
18~19	くもり~小雨(21.7)	445	0	445	89	2	91	0	0	0	0	48	3	1	583	5	588
22~23	晴 (22.9)	589	0	589	75	2	77	0	0	0	0	149	2	0	813	4	817
30~31	くもり一時 豪雨 (19.8)	1,074	0	1,074	97	1	98	2	0	2	0	181	10	0	1,354	11	1,365
8月小計	(8回)	2,881	0	2,881	456	40	496	2	0	2	0	567	17	2	3,909	57	3,966
9.1~2	くもり (18.2)	974	0	974	38	0	38	0	0	0	0	349	5	3	1,366	5	1,371
6~7	雨 (18.7)	1,119	0	1,119	41	0	41	0	0	0	0	236	0	0	1,396	0	1,396
8~9	くもり (16.9)	879	0	879	51	1	52	0	0	0	0	138	2	1	1,071	3	1,074
13~14	晴 (14.9)	361	0	361	25	0	25	0	0	0	0	58	0	1	445	0	445
19~20	くもり (16.9)	251	0	251	14	0	14	0	0	0	0	24	0	0	289	0	289
21~22	晴 (15.0)	641	0	641	16	3	19	0	0	0	0	19	0	0	676	3	679
27~28	小雨 (16.3)	585	0	585	10	0	10	0	0	0	0	18	0	0	613	0	613
29~30	くもり~小雨(14.8)	241	0	241	13	1	14	0	0	0	3	0	1	0	258	1	259
9月小計	(8回)	5,051	0	5,051	208	5	213	0	0	0	0	845	7	5	6,114	12	6,126

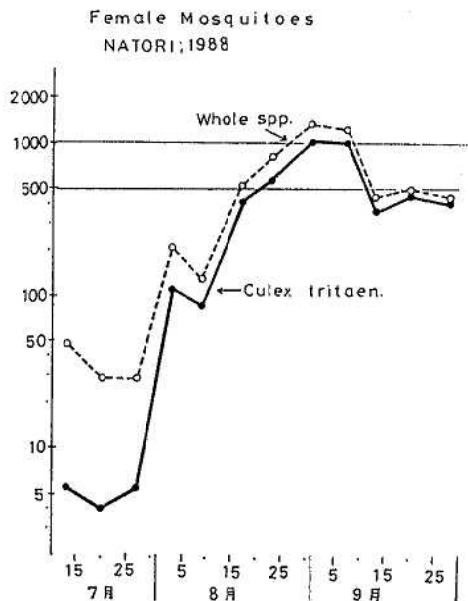


図1 コガタアカイエカの発生活消長 (ライトラップ法)

3. 屠場豚におけるHI抗体の動向

3.1 調査方法

従来と同様に岩沼市営屠畜場を調査地点とし、屠畜場周辺の市町村から搬入された、生後6ヶ月以内の肥育豚から屠殺時に頸動脈血を採取し、自然分離で得られた血清を検体とした。

日本脳炎HI抗体の測定は、予研法に準拠したマイクロタイター法により実施した。即ち冷却アセトンで前処理した血清を新鮮ガチョウ血球で吸収し、非特異的凝集素を除去した。なお40倍以上のHI抗体価が検出された血清については、所定の方法で2-ME(2-メルカプトエタノール)処理を行い、HI抗体価が3管以上低下したものは、2-ME感受性抗体であると判定した。HI試験の抗原は、全て市販のJaGAR#01株凍結乾燥抗原を使用した。

3.2 調査結果

3.2.1: 屠殺豚の血中HI抗体測定は、7月11日に開始し10月4日に終了した。

3.2.2: この調査期間中に7月2回、8月5回、9月6回、10月2回の合計15回検体採取を行い、のべ402件の血清を入手した。

3.2.3: 屠殺豚の日本脳炎HI抗体の推移を週毎にまとめて、表4および図2に示す。図2中の折れ線グラフはHI抗体保有率(HI抗体価10×以上を陽生)を、ヒストグラムは2-ME感受性抗体の比率を示している。

表4 豚血中日本脳炎HI抗体調査

月日	7-11	7-25	8-1	8-8	8-15	8-22	8-29	9-5.6	9-12	9-19 20	9-26	10-3.4
頭数	27	28	24	28	37	28	27	60	32	44	27	40
日陽(%)	0	0	0	0	0	2 (7.1)	3 (11.1)	4 (6.7)	4 (12.5)	11 (25.0)	3 (11.1)	15 (37.5)
2ME感受性(%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1/1 (100)	2/4 (50.0)	3/4 (75.0)	5/10 (50.0)	2/2 (100)	10/13 (76.9)

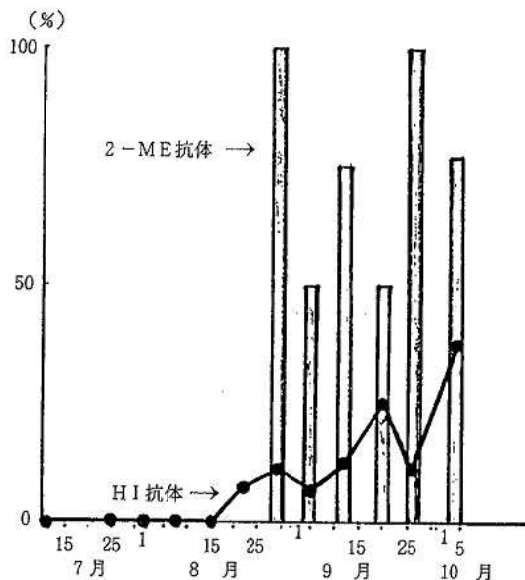


図2 屠場豚における日脳HI抗体の動向 1988 (岩沼)

4. 健康住民の中和抗体保有状況

4.1 調査方法

1988年度は県南部の柴田町(人口約36,200)を調査地点に選び、宮城県内に5年以上居住している健康住民を日毎に採血し、自然分離で得られた血清を検体とした。

日本脳炎中和抗体の測定は、予研法に準拠して実施した。即ち、直径70mmのシャーレに10日令ニワトリ胎児細胞の単層培養を作成し、コントロールに対するブラック形成抑制率から、50%に抑制する血清の希釈濃度を算出する、いわゆるチャート法で行った。

全ての測定を通して、抗原ウイルスはJaGAR#01株を4日令の哺乳マウスに脳内接種後、発症したマウス脳を10%乳剤とし、その遠心上清を-70℃にストックして使用した。

4.2 調査結果

4.2.1 : 1988年10月から11月に、9年令群合計180件の血清を検体として入手した。しかし9才以下の年令群については、柴田町住民の検体が得られなかったため、この年令群にかぎって隣接する岩沼市で検体の採取を行っている。

4.2.2 : 同じく表5に年令群別の中和抗体の分布状況と、中和抗体保有率(中和抗体価12倍以上を陽生)を示した。

表5 昭和63年度日本脳炎流行予測調査結果 (柴田町)

年令	件数	日本脳炎中和抗体価							陽性率 %
		<12	12~20	21~40	41~80	81~160	161~320	>320	
総数	180	40	51	51	20	9	5	4	140/180 77.8
0~4*	11	4	6					1	7/11 63.6
5~9*	16	9	5	2					7/16 43.8
10~14	29	5	4	10	4	3	2	1	24/29 82.8
15~19	24	8	10	5					16/24 66.7
20~29	18	4	2	7	3	2			14/18 77.8
30~39	22	3	4	9	4	2			19/22 86.4
40~49	21	2	5	9	1	2	2		19/21 90.5
50~59	18	2	8	3	2		1	2	16/18 88.9
60才以上	21	3	7	5	6				18/21 85.7

* : 岩沼市

4.2.3 : 図3に年令群別の中和抗体保有率をヒストグラムで示した。各年令群の検体数にバラツキがあるので各保有率に95%の信頼限界を付した。

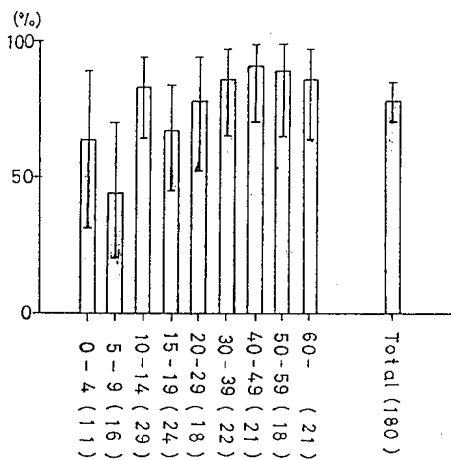


図3 JE-NT Antibody (1988 Shibata T)

5. 考察とまとめ

1988年の日本脳炎流行シーズン中に、名取市の調査定点で採取されたコガタアカイエカ(雌)の総個体数は8,015匹であり、1晩で採取された個体数も8月末から9月初旬にかけての約1,000匹が最高値であった。これは、前年に比較して1/5程度であり、1988年にはコガタアカイエカも含めて、蚊の発生活消長を抑制する要因が強く作用したものと考えられる。仙台管区気象台から発表されている気象データに基づいて、図4に3月から10月までの半月気温偏差を、図5には4月から9月までの日照時間と降水量の旬累計偏差を示した。宮城県内でコガタアカイエカの繁殖が活発となる6月から8月まで、連続して記録的な低温期が出現している。この時期はまた日照時間が平常値を大きく下まわり、降水量も多かった。

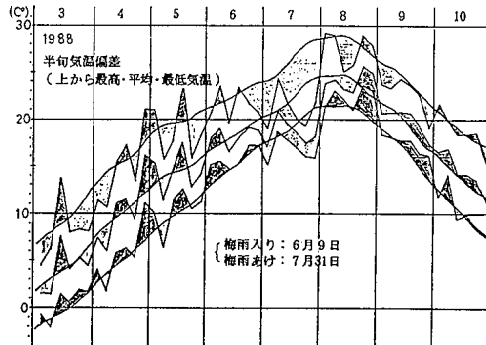


図4 仙台市における半月気温偏差 (仙台管区気象台)

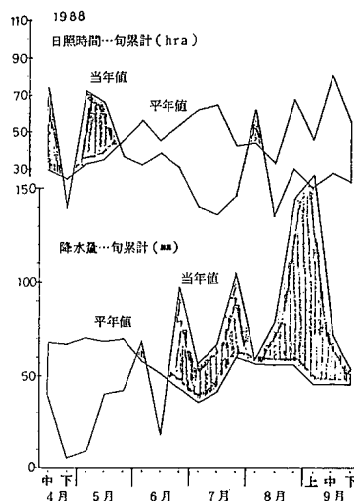


図5 仙台市における日照時間と降水量 (仙台管区気象台)

従来の調査結果から、宮城県内ではコガタアカイエカの発生消長が気温などの気象要因によって大きく左右されることを指摘してきたが、1988年はこれが典型的に現われたものと考えている。コガタアカイエカの発生が大きく抑制された結果として、屠場豚集団における日本脳炎ウイルスの活動も鈍く、8月下旬に新鮮感染豚が確認されたのに、ウイルスの急速な伝播は起らずに、10月に到って約40%のブタが感染を受けたのにとどまった。

ヒトの中和抗体保有状況を調査した柴田町（一部岩沼市）は、県南の水田地帯に位置するが、調査総数180人中140人（78%）が抗体を保有していた。5～9才の年齢群に抗体保有率の谷が認められたが、この年齢群は検体数が16と少なく、5%の危険率で年齢群間に抗体保有率の差は認められない。しかし1971年ほぼ同じ地区で実施した同様の調査では、40才以上の年齢群では全ての被検者が中和抗体を保有しており、しかもその半数は320

倍以上の抗体価を示した。宮城県内では20年間にわたって1人の日本脳炎確認患者も発生しておらず、田園地帯でもワクチン接種を受ける人は非常に稀になっている。また感受性調査の結果に見られるごとく、自然界で抗原刺激を受ける機会も非常に減っているものと考えられる。

最近数年間の調査結果から、宮城県でヒトに波及するような日本脳炎の流行が何らかの前兆もなく再燃する可能性は極めて小さい。しかし、自然感染や予防接種によって免疫を獲得する機会が減少した結果、県内住民の抗体保有率も抗体価レベルも年々低下している。一方近隣諸国においては、日本脳炎が大流行をくり返しており、国内でも毎夏自然界では日本脳炎ウイルスの伝播が確認されている。従って、宮城県でも日本脳炎ウイルスの活動を監視し、情勢に応じて個人防衛の手段を取り得る体制の維持が必要と思われる。

4 神経芽細胞腫マス・スクリーニング —検査方法の変更について—

加茂えり子 清野 陽子 白石 広行
山本 仁

1. はじめに

小児ガン的一种である神経芽細胞腫は、小児期の悪性固形腫瘍の中で最も多く、最も予後不良の腫瘍である。この病気の初期には症状がほとんどなく、症状(発熱、食欲不振、四肢痛等)が認められた時には、すでに手遅れの状態であることが多いが、1才までに発見され治療が行われると、予後はきわめて良好である。神経芽細胞腫の多くは、カテコールアミン代謝産物であるバニールマンテル酸(VMA)、バニール乳酸(VLA)、およびホモバニリン酸(HVA)を尿中に排泄する。このためVMA等を指標とするマス・スクリーニングが可能である。

宮城県では、昭和60年10月に生後6か月児を対象としたマス・スクリーニングを開始した。開始時から昭和63年6月までは1次検査はDip法(定性法)、2次検査は高速液体クロマトグラフィー:HPLC(定量法)で行なった。今回「神経芽細胞腫実施要綱」の改正に伴い、1次検査からHPLCによる定量検査を実施し、良好な結果が得られたので報告する。

2. 材料と方法

2.1 神経芽細胞腫マス・スクリーニングシステム

マス・スクリーニングシステムを図1に示した。市町村における乳児3、4か月健診時に、採尿セット(検査用紙、検査説明書、送付用封筒)を保護者に配付し、マス・スクリーニングについて説明する。保護者は6か月時に採尿後、保健環境センターに郵送し、保健環境センターで検査を行なう。異常の認められた検体等、再採尿を要する検体については、保健所、市町村を通じ採尿を保護者に依頼する。精密検査は保健環境部を通じ東北大学医学部小児外科に依頼している。

2.2 測定方法

変更前の測定方法は既に報告^{1),2)}したので省略する。変更後の測定方法を図2に示した³⁾。尿用紙を直径9mmディスクにパンチアウトし、蒸留水で1時間溶出する。溶出液は、尿濃度の指標となるクレアチニン(Cre)測定用マイクロプレートと、VMA、VLA、HVA測定用のHPLCオートサンプラー用チューブに分注した。そして、HPLCとデータ処理システムを連動することにより、尿濃度で補正した値($\mu\text{g}/\text{mgCre}$)で結果をチャート上に示すようにした。すなわち、Creを測定した

時の検量線の係数と吸光度を前もってデータ処理システムに入力し、検体をHPLCで測定した後、Creで補正した値として示した。このため、手計算の煩わしさがなくなり、またHPLCのチャートとCre補正したVMA、VLA、HVA値を同時に確認することが可能になった。実際の検体の測定においては、検体20件に1件の割合で既知のスタンダードを測定し、スタンダードの回収率およびデータ処理の計算方法に間違いのないことを確認している。

このような方法で、尿紙尿を測定した場合、Cre、VMA、HVAは、共にほぼ100%の回収率である。³⁾

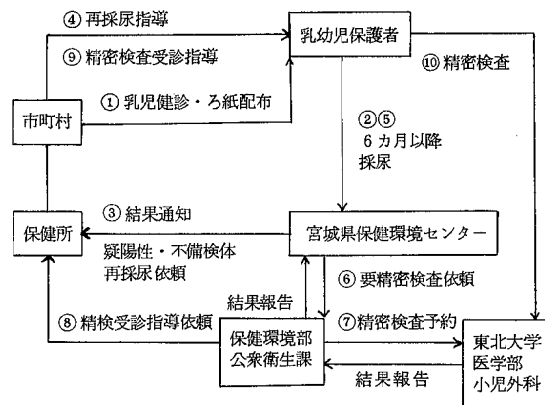


図1 神経芽細胞腫マス・スクリーニングシステム

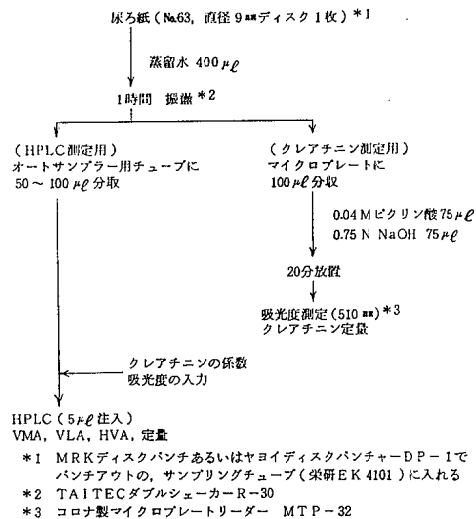


図2 測定方法

HPLC (5 μl 注入)
VMA, VLA, HVA, 定量

*1 MRKディスクパンチあるいはヤロイディスクパンチャー-DP-1でパンチアウトの、サンプリングチューブ(栄研EK 4101)に入れる

*2 TAI TECダブルシュガー-R-30

*3 コロナ製マイクロプレートリーダー MTP-32

2.3 測定条件

変更前の測定条件も、即ち報告^{1), 2)}したので省略する。変更後の測定条件を図3に示した。

変更前は蛍光検出器を用いていたため、試料の濃縮及び妨害物質除去の目的で、酢酸エチル抽出等の複雑な前処理が必要であった。

今回の検査法改正に伴い、選択性、感度が非常に優れている電気化学検出器を導入できたため、尿濾紙を水で溶出するだけで検査が可能となり（直接法）、1次検査よりHPLCによる定量検査を実施できた。図4に同一検体について2種の検出器で測定したクロマトグラムを示した。

(測定機器)

ポンプ: KONTRON 420 (2台), Hitachi 655A-11 (1台)
 オートサンプラー: KONTRON 460 (2台), Hitachi 655A-40 (1台)
 検出器: ESA Coulochem 5100A (3台)

(Analytical cell 5010, Guard cell 5020)

カラムオープン: 島津CTO-GA (2台), Hitachi 655A-52 (1台)

脱気装置: Shodex DEGAS (3台)

恒温槽: NESLAB endocall RTE-110 (2台)

データ処理システム: 日本クロマトCDS

(条件)

カラム: 島津 Shim-Pack CLC-VMA 6×150 mm

ガードカラム: 島津ETH

移動相: 5 mM 酒石酸: アセトニトリル (97:3)

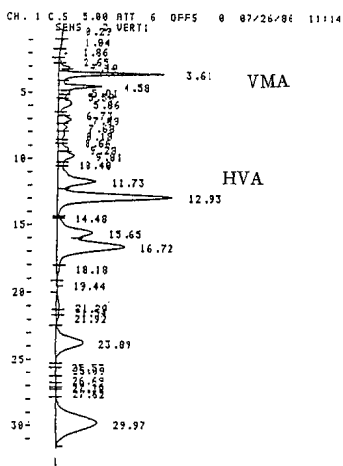
カラム温度: 40℃

流量: 0.8-1.0 ml/min

注入量: 5 µl

分析時間: 14-20 min

図3 HPLC測定条件



(蛍光検出器測定)

3. 陰性・疑陽性の判定基準

一般に臨床検査においては、検査値が正規分布する場合、平均値(M) ± 2~3標準偏差(SD)を正常範囲とすることが多い。Cre値で補正したVMA, HVA値について、各々1,001件のVMA, HVAの測定値度数分布を図5に示した。

今回のマス・スクリーニングにおいて、これまで発見された患児のVMA, HVA値、再検率を考慮して、カットオフ値はM+2.5SDとしVMA 14.0 µg/mgCre, HVA 24.0 µg/mgCre以上を疑陽性とした。VLAについては、VLAを含む検体が少ないため正規分布を求めることは出来なかったが、患児における値などから1.0 µg/mgCre以上を疑陽性とした。

またVMA, HVAのM-2.5SDの検体も何らかの異常(細菌汚染他)が考えられるので、不備検体として再検査を行っている。この測定値度数分布は、夏期、冬期により多少の違いがあり、今後更に検討を進めたいと考えている。

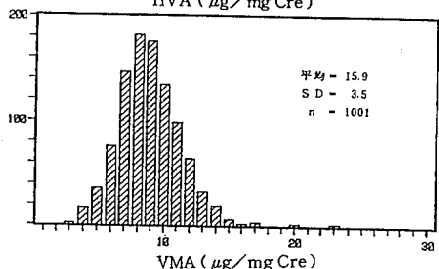
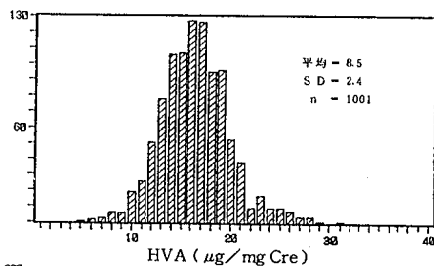
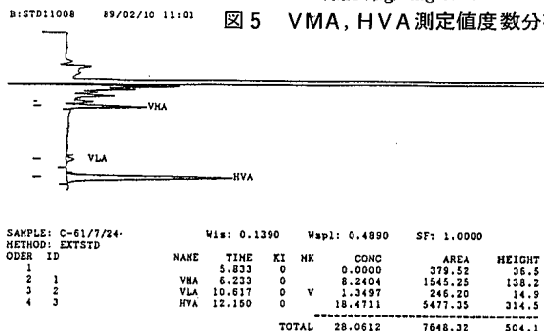


図5 VMA, HVA測定値度数分布



(電気化学検出器測定)

図4 高速液体クロマトグラム

4. 検査結果

表1に昭和63年度の保健所ごとの一次検査結果を示した。受付数22,095件で、疑陽性数は1,227件(5.6%)不備数1,740件(7.9%)で各保健所による差はなかった。採尿日記載漏等による保護者、保健所への問い合わせは、649件(6.4%)もあり事務処理の遅れの原因となっている。

表2に検査法変更前と変更後の内訳を示した。検査方法を変更したことで、分析精度が上ったため、疑陽性と不備の内訳が変わった。疑陽性の割合を比べると、変更前は受付数に対する割合が10.8%、変更後は3.9%になった。これは、変更前の1次検査は、VMA発色の定性検査で、VMA類似の発色反応を示す物質もあり、高い割合で疑陽性が検出されたためと考えられる。変更後定量法に変ったことで、精度が高くなり疑陽性の割合が減った。また不備の割合は、“尿濃度が薄い”が変更前0.8%が、変更後2.2%にふえた。これは、変更前は尿汚紙の色で判定していたが、変更後はCre値を測定することにより尿濃度がはっきりするようになったためである。また変更後新しく不備とした細菌汚染は、VMA、HVA値が平均値より異常に低いもので、何らかの汚染が考えられ、受付数の4%であった。

表3に二次検査内訳を示した。受付数1,335件で、不備数21件(1.5%)、再々検70件(5.2%)である。また一次検査と二次検査の疑陽性と不備検体については、再採尿を保健所を通じて保護者に依頼しているが、かなり高率で未回収がある。

また変更前の定性法は、VMA指標とする検査のためVMA増量のない患児を見のがすおそれがあったが、定量法になったことで、VMA、VLA、HVAが同時に測定可能になり、この点についても改善された。このため表4の発見率を比べると、1/28,220が、1/5,146と約5倍発見率が上がった。

次に表5で一次検査の4年間の受検率を示した。年々上昇はしているが、63年度は約5,000人が受験していない。

表6にスクリーニングで発見された神経芽細胞腫の症例を示した。No.1, 2が検査法変更前に発見された患児No.3~5は変更後のものである。変更後は、VMA、HVAの値が小さい病期の早い時期に発見されている。

表1 一次検査内訳

保健所	受付数	陰性数	疑陽性数	不備	問い合わせ	未回数
仙南	819	698	46	75	27	2
白石	577	490	44	43	22	0
角田	510	439	24	47	16	3
岩沼	1,369	1,189	79	101	45	6
宮黒	439	360	26	53	10	1
塩釜	1,575	1,405	73	97	37	6
大崎	1,510	1,281	83	146	55	4
岩出山	587	500	28	59	29	1
栗原	833	697	52	84	20	4
登米	1,020	881	55	84	54	5
石巻	2,140	1,866	119	155	82	8
気仙沼	1,013	866	60	87	24	6
青葉	2,226	1,963	129	134	51	10
太白	1,845	1,591	95	159	52	8
若林	1,810	1,564	101	145	47	5
宮城野	2,101	1,833	120	148	45	2
宮城	299	256	14	29	13	1
秋保	34	33	1	0	1	0
泉	1,388	1,216	78	94	19	6
計	22,095	19,128	1,227	1,740	649	78

(5.6%) (7.9%) (2.9%) (6.4%)

受付数に対する割合
疑陽性数に対する割合

表2 一次検査の変更前と変更後の内訳

変更前 (昭和63年4月~6月)						
受付数	疑陽性数	日数経過	6ヶ月未満	薄い	その他	
5,225	565 (10.8)	141 (2.7)	14 (0.3)	41 (0.8)	10 (0.2)	
変更後 (昭和63年7月~平成元年3月)						
受付数	疑陽性数	日数経過	6ヶ月未満	薄い	細菌汚染	その他
16,870	662 (3.9)	444 (2.6)	32 (0.2)	373 (2.2)	676 (4.0)	9 (0.1)

(%)は受付数に対する割合

表3 二次検査内訳

保健所	受付数	不備数	再々検査数	精検数	患児数	未回数
仙南	52	0	2	0	0	0
白石	49	0	2	0	0	0
角田	26	0	2	0	0	0
岩沼	81	0	4	1	1	0
宮黒	33	3	2	0	0	1
塩釜	75	0	3	0	0	0
大崎	94	2	6	0	0	1
岩出山	37	1	3	0	0	0
栗原	55	0	3	0	0	0
登米	68	0	2	1	0	0
石巻	127	3	10	0	0	1
気仙沼	63	0	2	1	1	0
青葉	134	1	7	4	1	1
太白	97	1	5	1	1	1
若林	113	1	7	0	0	0
宮城野	132	4	6	0	0	0
宮城	15	2	2	0	0	0
秋保	1	1	0	0	0	0
泉	83	2	2	0	0	0
計	1,335	21	70	8	4	5(7.1%)

()は再々検査に対する場合

表4 検査方法の違いによる発見率の差

方法	期間	検査実人員数	患児数	発見率
定性法	S. 60. 10 ~ 63. 6	56,440	2	1/28,220
定量法	S. 63. 7 ~ H. 1. 3	15,439	3	1/ 5,146

表5 一次検査受検率

	昭和60年度	昭和61年度	昭和62年度	昭和63年度
届出生数	14,542	27,509	27,030	25,589
検査実人員数	9,523	20,967	20,931	20,458
受検率(%)	65.5	76.2	77.4	79.5

届出生数は受付日の6か月前に相当する数とした

表6 神経芽細胞腫症例

No.	生年月日	性	月令	VMA*	HVA*	原発部位	病期
1	86.11.29	男	7	256	155	右副腎 多発性肝転移	IV S
2	87.11.27	男	7	44	101	左副腎そ径部 りんば節転移	IV A
3	87.10. 6	男	9	52	71	左後腹膜 椎管内浸潤	III
4	88. 4.26	女	8	35	44	左副腎	II
5	88. 5.24	男	10	22	32	左副腎	I

*単位：μg/mgCre

5. まとめ

検査方法の変更で精度が高くなり、マス・スクリーニングでの神経芽細胞腫患児の発見率が上昇し、今年度は4名発見することが出来た。

精度が改善されたことで、疑陽性が減り親に不安を与える再検査の割合が減少した。また病期の早い時期に発見出来るようになった。しかしながら、この検査の未受検者、疑陽性、不備の未回収者がかなりいることから、今後このシステムに係わるすべての人達の理解を深めていく事が大きな課題と思われる。

参 考 文 献

- 1) 白石広行他：宮城県保健環境センター年報4，55（1986）
- 2) 清野陽子他：宮城県保健環境センター年報5，57（1987）
- 3) 白石広行他：改訂版神経芽細胞腫マス・スクリーニング86，（1989）

5 先天性副腎過形成症検査試薬キットの 検討とスクリーニング実施状況

沖村 容子 山田久美子 白石 廣行
山本 仁

1. はじめに

先天性副腎過形成症では、副腎皮質ホルモン合成酵素が先天的に欠損することにより、コルチゾール(ステロイドホルモン)が産生されず血液中濃度が低下する。これにともない、間脳、下垂体系が副腎皮質刺激ホルモンを多量に分泌するため、副腎が過形成となる疾患である。この疾患には、現在、5種類の酵素欠損症が知られているが、その90%をしめているのが21-水酸化酵素欠損症である。この疾患は常染色体劣性の遺伝形式をとり、症状によって塩喪失型と単純男性型の2つに分類される。塩喪失型では、コルチゾール、アルドステロンの欠乏により、Na, Kの吸収排泄に異常を起こし、脱水ショック症状のために出生後数日で死亡する。また、単純男性型では、酵素欠損による蓄積物が他の代謝経路に流れ、多量の男性ホルモンが産生されることにより性を誤認することがある。コルチゾール投与等の治療により、予後が良好であること、発生頻度が15,000人に1人と比較的高いことなどから、全国的なスクリーニングが開始されることとなった。

宮城県においては、厚生省の方針を受けて東北の先鞭をきり、1988年10月～12月に試薬キットの選定、17 α -ヒドロキシprogesteron (17-OHP)測定値分布等について検討し、つづいて1989年1月よりスクリーニングを開始したので、その結果を報告する。

2. 材料および方法

A, B, Cの3社製酵素免疫抗体法(ELISA法)キットを使用し、検体として各社添付標準血液濾紙、コントロール濾紙、および1988年9月～11月に、代謝異常マス・スクリーニングを終了した血液濾紙3,000件を使用し検討した。

検査法は、21-水酸化酵素の欠損により、特異的に蓄積する17-OHPを測定するものである。近年モノクローナル抗体作製技術の発達により、安全、簡便なELISA法が開発された。各社の測定法(直接法)は、ほぼ同様なので図1にB社の操作手順を示した。血液濾紙由来の17-OHPと酵素標識17-OHPとを、第1抗体に対して競合させ、反応したものを第2抗体が固相化されているマイクロプレートに付着させる。未反応部分を洗い流し、固相化された酵素に基質液を加え、反応後、492nmで吸光度を測定した。プレートリーダーは、コロナMTP32型とダイナテックMR650型を使用した。

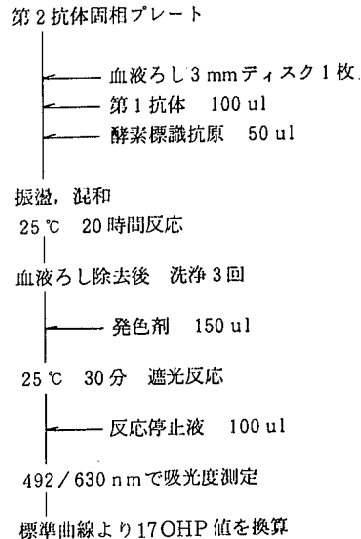


図1 測定操作(直接法)

3. 結果および考察

3.1 A, B, C, 3社製キットの比較

3社のキットについて、再現性、17-OHP測定値分布を比較検討した。測定操作は、使用書のとおりにおこない、再現性については、各キットの標準血液濾紙、または、コントロール濾紙を用いて、同時測定による6回の測定内変動、30日の測定間変動(日差変動)を求め、表1～3にしめした。各社の測定内変動・測定間変動はA社8.2～17.2%・9.1～17.5%、B社3.4～8.7%・8.1～10.7%、C社8.9～11.8%・13.1～31.4%となった。

表1 測定内変更, 測定間変動について(A社)

標準血液濾紙	測定内変動 n=6		測定間変動 n=30	
	Mean±SD	CV%	Mean±SD	CV%
1	1.0±0.1	9.7	1.0±0.1	11.4
3	3.0±0.3	9.8	2.9±0.3	9.4
10	10.2±0.8	8.2	9.8±0.9	9.1
30	31.1±2.9	9.2	32.5±3.8	11.8
100	98.9±11.9	12.0	97.9±11.7	12.0
300	299.6±51.6	17.2	301.6±52.6	17.5

表2 測定内変動, 測定間変動について (B社)

コントロール 血液汚紙	測定内変動 n=6		測定間変動 n=30	
	Mean±SD	CV%	Mean±SD	CV%
C 1	6.1±0.5	8.7	5.8±0.6	10.7
C 2	11.2±0.4	3.4	10.6±1.0	9.3
C 3	41.8±3.3	7.8	40.6±3.3	8.1

表3 測定内変動, 測定間変動について (C社)

標準 血液汚紙	測定内変動 n=6		測定間変動 n=30	
	Mean±SD	CV%	Mean±SD	CV%
2.1			1.9±0.6	31.4
4.2			4.2±0.9	21.2
8.3	8.7±1.0	11.8	8.9±1.4	15.8
16.6	21.3±2.5	11.8	16.9±2.2	13.1
33.3	37.8±3.3	8.9	29.1±4.5	15.3
66.6			82.3±12.7	15.4

次に, 血液汚紙 3,000 件を用いた各キットでの 17-OHP 測定値分布を, 図 2~4 にしめた。各キットとも同じような分布をしめたが, 平均・標準偏差は, A社 1.78・1.23 ng/ml, B社 9.53・5.42 ng/ml, C社 3.71・3.69 ng/ml と少し異なった。このような測定値の差は, キットに使用されている抗体の特異性の違いによる水溶性ステロイドとの反応性によるものと考えられる。

以上のように, 3社製キットを比較し, 正規分布により近く, また, 測定内変動, 測定間変動ともに小さい B社キットを使用して, さらに検討した。また, ELISA法は, 高感度である反面, 測定間に変動がでる点を考慮し, 測定値分布の 95% 値をカットオフ値とした。

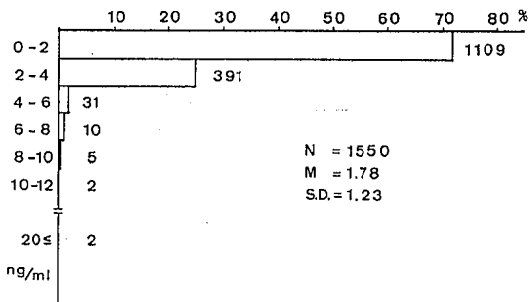


図2 17-OHP測定値分布 (A社)

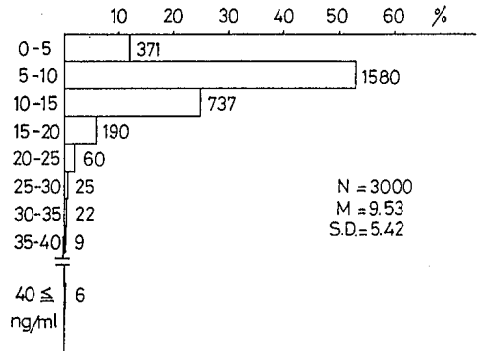


図3 17-OHP測定値分布 (B社)

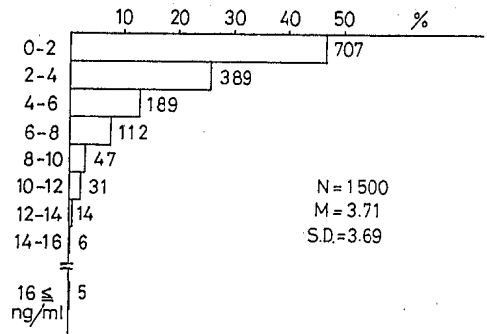


図4 17-OHP測定値分布 (C社)

3.2 反応時間の検討

B社キットを使用し, 第一反応時間(使用書では20~24時間)を, 4, 16, 20時間とかえて吸光度の変化をみた。図5にしめすとおり, 各濃度における吸光度は, 反応時間の増加とともに上昇するが, 16時間と20時間ではその差は小さく, 相対結合率(B/Bo)も同様で, 第一反応時間は16時間でも充分と考えられる。しかし, スクリーニングでは, 作業手順の上から20時間で反応をおこなった。

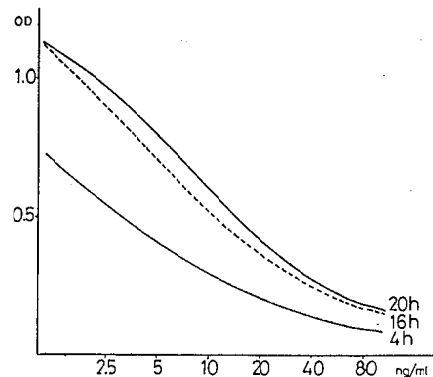


図5 第一反応温度 (反応温度 25°C)

3.3 呈色の安定性

B社キットを使用し、呈色反応停止後の呈色の安定性をみるため、0～60分まで吸光度を測定した。図6に示すとおり、各濃度において大きな変化は認められなかった。従って、反応停止後60分以内に測定すれば、吸光度に大きな差はないと考えられる。

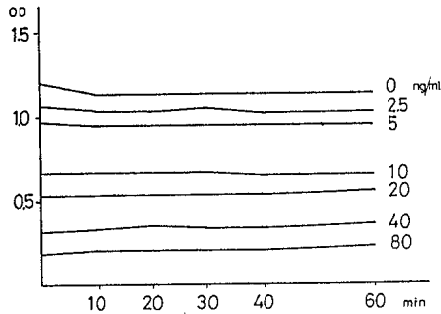


図6 呈色の安定性

3.4 標準曲線の検討

図7に、毎日同じ測定法で8日間測定した時の標準曲線と、各濃度での変動をしめす。B/Bo 90%は1.9ng/ml、B/Bo 50%は11.5 ng/mlで、各濃度での変動は2.1～11.0%であった。

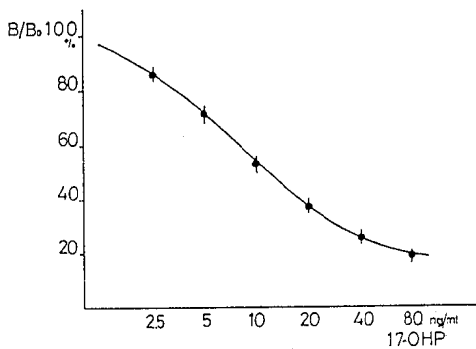


図7 標準曲線

3.5 抽出法による17-OHP測定値分布

直接法は、血液濾紙を直接に検体とするため、迅速性、簡便性、安全性にすぐれているが、水溶性ステロイドに反応するという試薬の性質上、偽陽性率が高くなるという欠点がある。しかし、エーテル抽出法により、水溶性ステロイドを除外できることが知られている。即ち、直接法で95%値以上の高値となった検体について、抽出法による確認をおこなえば、偽陽性検体の大部分は除外できる。そこで、血液濾紙894件について、抽出法により検査をおこない測定値分布を求めた。図8に示すとおり平均3.88 ng/ml、標準偏差2.35 ng/mlの正規分布を示

した。抽出法による測定値は血清値に近く正確なことから、平均+標準偏差(6.23 ng/ml)をカットオフ値とした。

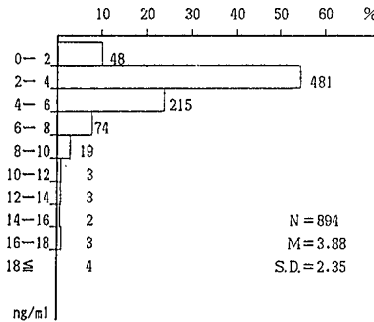
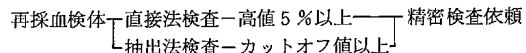
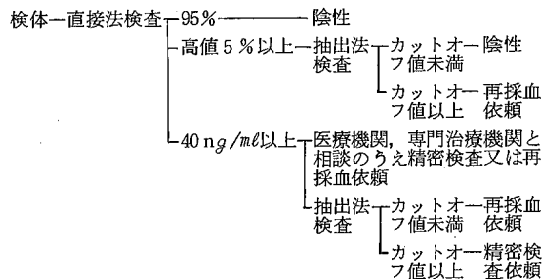


図8 17-OHP測定値分布(抽出法)

3.6 実施状況

1989年1月より、図9に示す検査フローチャートでスクリーニングを開始した。直接法で検査をおこない、17-OHP測定値分布の95%を陰性とし、高値5%について確認のため抽出法検査を実施した。抽出法検査で、平均+標準偏差値以上を疑陽性とし、再検査を実施した。その場合の推定再検査率は、約0.5%である。

なお、異常高値を示した場合は、抽出法検査の結果を待たず精密検査を依頼した。3月末までに、6,118件について検査し、疑陽性数26件(再検査率0.42%)、精密検査数2件であったが、いまだ患児を発見するには至っていない。(表4)



- (注) 直接法：検体(血液濾紙)の3mmディスクを直接プレートにいれ17-OHP値を測定
- 抽出法：検体より17-OHPをエーテル抽出し測定
- カットオフ値：測定値の平均、分散等を参考に、適当な再採血率になるように設定した値

図9 先天性副腎過形成症(CAH)検査フローチャート

表4 実施状況

	総検体数	疑陽性数(%)	精密検査数	陽性数
1989年1月	2,193	7(0.32)	0	0
2月	1,853	11(0.59)	0	0
3月	2,072	8(0.39)	2	0
計	6,118	26(0.42)	2	0

4. まとめ

今後、未熟児や障害児のように、ストレス等が原因で17-OHP高値を示す検体の取り扱いについては、在胎週数、出生体重から分析し、また、偽陽性をより少なくするため、コルチゾール検査等の導入も検討していきたい。とくに、塩喪失型では出生後数日で死亡した症例もある緊急性の高い検査であるから、検査方法の確立に努め、検査体制を、万全なものに改善していきたいと考えている。

最後に、スクリーニング開始にあたり、御指導いただきました関係各位、ならびに、試薬キットを提供いただきました、栄研化学、チバコーニング、三共の各社に、深く感謝いたします。

6 先天性代謝異常マス・スクリーニング

菅原 寿絵* 一條 敦子* 新妻 澤夫*
 沖村 容子 山田久美子 白石 広行
 山本 仁

1. はじめに

先天性代謝異常とは、生まれつき遺伝的にある種の酵素が欠損しているため代謝が著しく異常となり、その結果健全に発育することが困難になる疾患である。わが国では、昭和53年より先天性代謝異常を持つ新生児を早期に発見し治療することを目的に、5疾患(フェニルケトン尿症・メープルシロップ尿症・ホモシスチン尿症・ヒスチジン血症・ガラクトース血症)のマス・スクリーニングが開始された。

宮城県に於いても昭和53年よりこの5疾患についてマス・スクリーニングを開始し、これまで延べ28万人の新生児の検査を行い、61名の患児を発見し大きな成果を納めている。ここでは昭和63年度の検査結果を報告する。

2. 材料と方法

検査対象は県内医療機関で出生し、保護者が検査を希望する新生児で、生後5～7日(出生日を0日とする)に採血した濾紙血液を使用した。「実施要綱」に基づきフェニルケトン血症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症、ヒスチジン血症はガスリー法で、ガラクトース血症は、ポイトラー法及びペイゲン吉田法で一次検査を行った。また、薬剤の影響などの理由により上記の検査で異常を示した検体、精密検査のための確認検査(二次検査)には、アミノ酸分析計(日立L 8500)を使用した。今年度から一次検査は宮城県公衆衛生協会で行った。また、検査フローチャートは、資料編(165ページ)に示した。

3. 結果及び考察

3.1 検査結果

各月毎の検査総数(実人員数については資料編 ページ参照)、陰性数、二次検査依頼数(アミノ酸分析)、再検査依頼(再採血)数、精密検査依頼数を表1に示した。今年度は25,579件を検査し、陰性数24,849件、二次検査依頼数493件、再検査依頼数223件、精密検査依頼数14件となった。再検査依頼数(再検率)は、7月から9月の夏期に増加する傾向がみられた。これは、ガラクトース血症検査のポイトラー法では高温多湿で失活しやすい酵素活性を測定しているため、夏期に偽陽性が多

くなるためと考えられる(表2)。また、一昨年の再検査依頼数99件に比べ多くなっているが、検査担当者の交代による一時的な現象と考えている。

表1 昭和63年度検査結果内訳

月	検査総数	陰性数	二次検査依頼	再検査依頼(再検査)	精密検査依頼
4	2,006	1,952	48	5(0.25)	1
5	2,261	2,232	21	8(0.35)	0
6	2,111	2,057	42	12(0.57)	0
7	2,118	2,048	43	25(1.18)	2
8	2,539	2,431	60	44(1.73)	4
9	2,264	2,172	66	25(1.10)	1
10	2,172	2,120	31	19(0.87)	2
11	2,135	2,041	68	25(1.17)	1
12	1,830	1,782	32	16(0.87)	0
1	2,207	2,163	23	19(0.86)	2
2	1,858	1,818	26	13(0.70)	1
3	2,078	2,033	33	12(0.58)	0
計	25,579	24,849	493	223(0.87)	14

表2 対象疾患別再検査依頼数および精密検査依頼数

対象疾患名	再検査依頼数	精密検査依頼数	陽性者数
フェニルケトン尿症	10	1	1*
メープルシロップ尿症	24	1	1**
ホモシスチン尿症	6	0	0
ヒスチジン血症	3	1	1***
ガラクトース血症	ペイゲン法	105	7
	ポイトラー法	75	4
計	223	14	3

* 一過性高チロジン血症

** 原因不明の全般性高アミノ酸血症 経過観察中

*** 初回検査は昭和62年度に実施

3.2 血色素固定法の検討

フェニルケトン尿症およびメープルシロップ尿症のガスリー法による再チェック検査では、従来血色素の固定にオートクレーブを使用した蒸気固定法を用いてきた。

* 宮城県公衆衛生協会

しかし、第11回代謝異常スクリーニング研究会技術者懇談会に於いて、蒸気固定法ではアミノ酸の減少率が一般検体と標準とは異なる事が指摘され、メタノール固定法が望ましいと報告された。そこで、固定法の違いについて検討した。また、ホモシスチン尿症、ヒスチジン血症の再チェック検査についても、従来法(ガスリー法)との差を検討した。結果を表3に示す。フェニルケトン尿症再チェック検体110件中両固定法で陰性となったのは109件、しかし1件は蒸気固定法で陰性、メタノール固定法で陽性であった。メープルシロップ尿症も同様の結果となった。ホモシスチン尿症、ヒスチジン血症の再チェック検査では、従来法とメタノール固定法との結果に差はなかった。

以上の結果より、マス・スクリーニングの必要条件である見逃しをより少なくするという点で、メタノール固定法は蒸気固定法より優れていると考えられる。

4. ま と め

先天性代謝異常マス・スクリーニング検査で対象となる疾患は数千～数万人に一人という発見率である。しかし、発見が遅れるとその患児の一生をも左右するという重要な検査であるので、見逃しがあってはならない。これからも、その重要性を認識し、確実な検査ができる体制を整備して行きたいと考える。そのためには、今回のような血色素固定法の改善など最新情報への柔軟な対応技術の向上のため努力を続けて行きたい。

最後に、検査に御協力いただきました関係各位に心から感謝いたします。

表3 従来法とメタノール固定法の比較

フェニルケトン尿症 検査総数 110

		従来法 (蒸気固定法)	
		+	-
メタノール 固定法	+	0	1
	-	0	109

メープルシロップ尿症 検査総数 95

		従来法 (蒸気固定法)	
		+	-
メタノール 固定法	+	0	1
	-	0	94

ホモシスチン尿症 検査総数 88

		従来法 (ガスリー法)	
		+	-
メタノール 固定法	+	1	0
	-	0	87

ヒスチジン血症 検査総数 70

		従来法 (ガスリー法)	
		+	-
メタノール 固定法	+	0	0
	-	0	70

ア 宮城県におけるレプトスピラ症

一 県内で分離したレプトスピラの血清型を中心に

佐久間 隆 御代田恭子 秋山 和夫
山本 仁

ネズミおよびレプトスピラ症患者から分離したレプトスピラの血清群および血清型の同定を行った結果、宮城県におけるレプトスピラ症の病原体分布は *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae serovar *copenhageni* が主たるものと推定された。

1. はじめに

宮城県はかつて全国でも有数のレプトスピラ症の発生県であった。これまでの病原体の検索および患者の血清診断から、症状が重篤なため死亡することもあるワイル病（黄疸出血性レプトスピラ病）であることが確認されている¹⁾。近年は1959年の大流行以来、種々の予防対策、いわゆる予防思想の啓蒙、予防接種の実施、土地改良事業の推進、ネズミの一斉駆除などが行われた結果、患者数は激減しており²⁾、最近での発生は1987年10月に1名届出されたのみである。しかし、我々の長年の調査では主要な感染源であるネズミのレプトスピラ保有率の低下は認められず、むしろ上昇の傾向さえみられる。すなわち、ネズミ間でのレプトスピラの汚染は自然環境下では依然として持続していることが明らかとなっている。

今回は、これまでに、ネズミおよびレプトスピラ症患者から分離したレプトスピラの血清学的検討結果について報告する。

2. 材料と方法

2.1 レプトスピラの分離

ネズミは、家屋や納屋およびそれらの外回りに、生け捕り用の捕獲トラップを約50個設置し捕獲した。捕獲したネズミは実験室に運び、腎臓を摘出後、PBSで10%乳剤とした。乳剤を軽く遠心後、その上清について暗視野顕微鏡下でレプトスピラの有無を確認すると共に、乳剤上清約3mlをモルモットの腹腔に接種した。その後、随時心臓から採血して全血をコルトフ培地に接種し、30℃で培養した。患者からの分離は血液を材料とし、直接コルトフ培地に接種し、30℃で培養した。

2.2 抗体測定

顕微鏡学的凝集試験（Microscopic Agglutination Test：MAT）を用い、常法³⁾に従って抗体の測定を行った。抗原は *copenhageni* M20株、*icterohaemorrhagiae* RGA株、*autumnalis* 秋疫A株、*hebdomadis*

秋疫B株および *australis* 秋疫C株の各標準株と、ネズミおよびレプトスピラ症患者由来の分離株を使用した。抗原の作製は各菌株をコルトフ培地に接種、30℃で7日間培養後、PBSで約 1×10^8 個/mlの菌液濃度に調整した。抗体価は、対照菌液と比較して50%以上の凝集が観察された最高血清希釈倍数の逆数とした。

2.3 抗血清

標準株の抗血清は国立予防衛生研究所より分与を受けた。分離株の抗血清はコルトフ培地で30℃、5～7日間培養した菌液をウサギの静脈に接種した。すなわち、初回1ml、追加免疫は5～7日間隔で2～6mlを6回に渡り接種し作製した。

2.4 交差吸収試験

分離株と標準株のうちM20株、RGA株を用い各抗血清の吸収を行った。吸収に使用した菌株はコルトフ培地で30℃、10～12日間大量培養し、10,000rpm30分間遠心後、湿菌をPBSで50mg/mlの濃度に再浮遊させ吸収用抗原とした。

抗血清の吸収はPBSで10倍に希釈した抗血清1容に吸収用抗原4容を加え、30℃で20時間振盪吸収した後、10,000rpm10分間遠心した。この上清をホモの抗原と反応させ、凝集が起こらないことを確認した後、交差吸収試験に用いた。なお、吸収による抗血清の最終希釈度は50倍である。

2.5 血清型の判定

1978年ミュンヘンで開かれたレプトスピラ分類小委員会にて採用された、「充分量のヘテロ抗原による交差吸収試験を行い、ホモ抗原に対する抗体価が10%、またはそれ以上、少なくとも2つの抗血清の中の1つに常に残存すれば、その2つの菌株は異なった血清型に属すると判定される」³⁾の定義に従い血清型の判定を行った。

3. 結果と考察

3.1 レプトスピラの分離状況

表1のごとく、宮城県内において1973年から1987年までの間に13株のレプトスピラが分離された。そのう

ち12株がドブネズミから、1株がヒト血液から分離された。分離地区はワイル病の患者届出数の多少にかかわらず、県北部、県中央部、県南部と地域的に離れた8地域である。

表1 宮城県におけるレプトスピラ分離状況

株名	分離材料	分離年月
米山1	R.norvegicus	1973. 2
柴田2	同上	1975. 3
柴田3	同上	1975. 3
柴田10	同上	1975. 3
中田5	同上	1975. 3
中田6	同上	1975. 3
中田10	同上	1975. 3
古川2	同上	1975. 3
河北7	同上	1975. 3
河南3	同上	1979. 11
河南7	同上	1979. 11
名取6	同上	1982. 12
永沢	患者血液	1987. 10

3.2 血清群の同定

分離したレプトスピラ13株のうち、北部の米山町と中央部の名取市で捕獲したドブネズミ由来の米山株および名取株、さらに南部の丸森町で発生したレプトスピラ症患者から分離された永沢株の3株について血清群の検討を行った。(表2)各抗血清に対するホモ抗原との反応では、1,600倍から12,800倍と高い抗体価を示した。そして、米山株、名取株、永沢株の分離3株は抗M20血清と抗RGA血清に対して12,800倍、6,400倍とホモの抗原で得られたのと同様の抗体価を示した。しかし、秋疫A、B、Cの各抗血清群に対しては100倍未満であった。一方、分離3株の抗血清に対して、M20株とRGA株は高い抗体価を示した。それに反して、秋疫A株、B株、C株は100倍未満であった。以上の結果から、分離3株は標準株であるM20株およびRGA株と同じ *Icterohaemorrhagiae* の血清群に属することが判明した。表には示さなかったが残り10株も同様の結果が得られた。従って、宮城県におけるレプトスピラ症が、この血清群に属する病原体で起こるワイル病であることを再確認できた。

表2 分離レプトスピラ3株の血清群の同定

抗血清株名	M 20	R G A	秋疫A	秋疫B	秋疫C	米山	名取	永沢
M 20	12,800	3,200	<100	<100	<100	6,400	12,800	6,400
R G A	6,400	6,400	<100	<100	<100	3,200	3,200	3,200
秋疫A	<100	<100	12,800	<100	<100	<100	<100	<100
秋疫B	<100	<100	<100	3,200	<100	<100	<100	<100
秋疫C	<100	<100	<100	<100	1,600	<100	<100	<100
米山	12,800	6,400	<100	<100	<100	6,400	12,800	6,400
名取	12,800	6,400	<100	<100	<100	6,400	12,800	12,800
永沢	12,800	6,400	<100	<100	<100	6,400	12,800	12,800

3.3 血清型の同定

分離3株について血清型を決定するため、各々交差吸収試験を実施した。各抗血清を米山株で吸収を行った結果を図1に示した。未吸収の各抗血清の抗体価は、米山株、M20株、およびRGA株に対して、3,200倍から12,800倍と高い抗体価を示した。一方、吸収後の抗体価では、抗米山血清及び抗M20血清は3株に対して100倍未満と、抗体は1/10以下に吸収されていた。しかし、抗RGA血清では米山株とM20株に対して100倍未満であったが、RGA株では800倍の抗体価を示し、抗体が完全に吸収されていなかった。これらの結果および血清

型に関する定義より、米山株はM20株と同じ *serovar copenhageni* に属することが明らかとなった。

次に名取株で吸収を行ったところ、米山株の場合とはほぼ同様の結果が得られた。(図2)異なる点は抗M20血清の吸収後、ホモの抗原に対して200倍の抗体価を示したことである。しかし、血清型に関する定義によれば、ある程度の血清学的差異が許容されており、2つの菌株における吸収試験後、残ったホモ抗体が10%以内であれば、その菌株は同一の血清型に属するとされている³⁾。よって、名取株はM20株と同一の血清型と考えられる。

このことは、永沢株で抗M20血清および抗RGA血清

を吸収した結果についても同様であった。すなわち、M20株に対し、どちらも200倍の抗体価を示したが、残存抗体は10%以内であることから、M20株と同一の血清型であった(図3)。

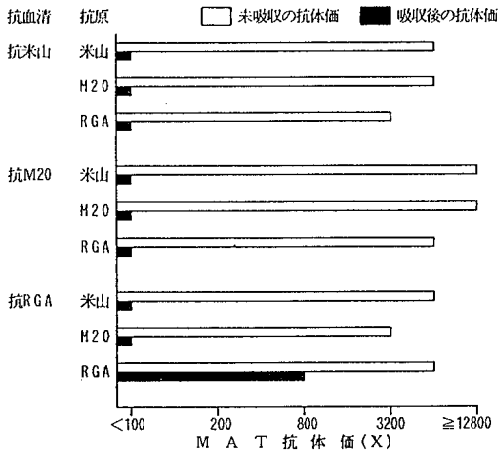


図1 米山株における交差吸収試験

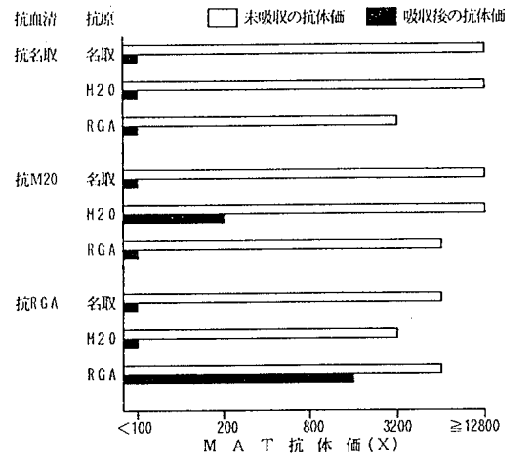


図2 名取株における交差吸収試験

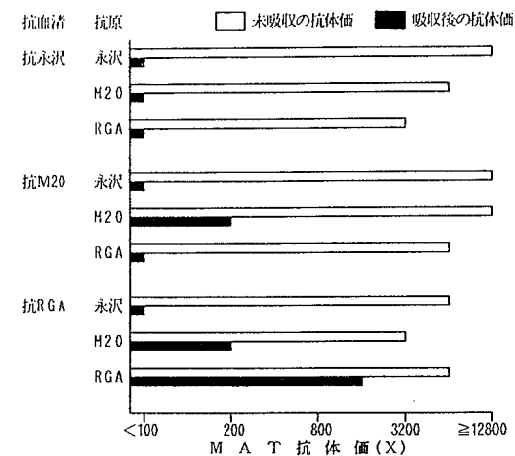


図3 永沢株における交差吸収試験

我が国におけるウイルス病の病原体はIcterohaemorrhagiae群の*icterohaemorrhagiae*と*copenhageni*の2つの血清型の存在が報告されており⁴⁾、この2つの病原体の分布は地域によって異なっている。すなわち、1)*icterohaemorrhagiae*のみが検出される地域、2)*copenhageni*のみが検出される地域、そして3)両者が混合して検出される地域がある。今回の我々の成績で*copenhageni*のみが検出されたことから、宮城県におけるウイルス病の病原体の分布は単独である可能性が示唆された。

3.4 分離株間の血清学的差異

抗M20血清をそれぞれM20株、米山株、名取株および永沢株で吸収した後の交差吸収試験結果を図4に示した。未吸収の抗M20血清は、各抗原に対して12,800倍の高い抗体価を示したが、M20株および米山株で吸収後の各抗原に対する反応は100倍未満であった。しかし、名取株で吸収後はM20株と米山株に対し抗体価200倍、永沢株で吸収後はM20株、米山株、名取株に対して100倍から200倍の抗体価を示し、両者では吸収し切れない抗体の存在が認められた。また、図には示していないが抗名取血清及び抗永沢血清はM20株で吸収後、ホモの抗原とは100倍未満であった。これらの結果より、分離3株はM20株と同一の血清型に属しているのが若干の抗原性の違いが認められた。この差異は本質的なものなのか、或いは継代歴によって起こったものなのか詳細は不明である。今後、モノクローナル抗体などを用いて検討していく必要があると考えられる。

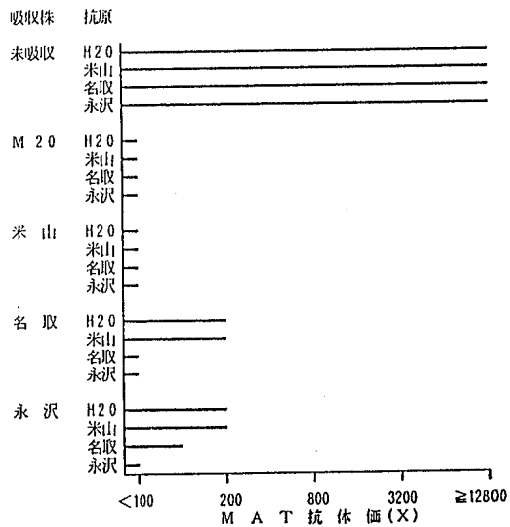


図4 抗M20血清を分離株で吸収した後の交差吸収試験結果

4. ま と め

宮城県において、1973年から1987年までにネズミおよびレプトスピラ症患者から分離された13株のレプトスピラについて血清学的検討を行った結果、いずれも *L. Icterohaemorrhagiae* の血清群に属することが判明した。さらに、分離レプトスピラ3株の血清型は、*Leptospira interrogans serovar copenhageni* と同定された。この3株は宮城県南部、中央部、北部と異なった地域から分離されており、宮城県におけるワイル病の病原体は *serovar copenhageni* が主たるものと推測された。

謝 辞

本調査を行うにあたり、御指導ならびに抗血清を分与していただいた国立予防衛生研究所・体液性免疫部森守博士に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 遠藤好喜他：第13回レプトスピラシンポジウム記録 東京，（1976）
- 2) 秋山和夫他：第22回レプトスピラシンポジウム記録 東京，（1985）
- 3) 古井善作他：レプトスピラ症防疫指針，（1987）
- 4) 森 守他：第18回レプトスピラシンポジウム記録 福岡，（1981）

8 宮城県におけるツツガムシ病調査

— 1987年と1988年の調査成績 —

秋山 和夫 山田久美子 佐久間 隆
御代田恭子 山本 仁

宮城県におけるツツガムシ病は1984年に最初の患者が確認されて以来、1988年までに26名が届出されている。今回は1987年と1988年の患者発生状況およびツツガムシ生息状況について調査を行ない、以下の知見を得た。

- 1) 患者発生は2年間で13名であり、岩出山町、鳴子町とその隣接地域に集中する傾向が認められた。
- 2) 推定感染機会は多様化する傾向を示し、テニスや溪流づりにおいて感染する症例も認められた。
- 3) ツツガムシ生息調査では、前回の調査で最も有力な媒介種と考えられたフトゲツツガムシに加えて、新たにタテツツガムシを確認することができた。

1. はじめに

1976年以降、全国的に増加しつつあった新型ツツガムシ病は1984年の届出患者数970名をピークとして、ここ2、3年は減少する傾向にあり、1988年は626名にとどまった。

一方、宮城県での発生は1984年に2名確認されて以来¹⁾、1985年6名²⁾、1986年5名³⁾、1987年8名、そして1988年5名の併せて26名に達している。

我々は、1984年に宮城県で最初の患者を確認したが、それ以前からツツガムシ病の診断体制を整えると共に、血清疫学的調査を実施してきた。その結果、本県にもツツガムシリケッチアの感染を受け、抗体を獲得したと思われる住民が存在することを確認し、ツツガムシ病が発生しうることを指摘してきた¹⁾。1984年以降は、患者発生調査に加えてツツガムシ生息調査も実施しているが、本報では1987年と1988年の成績について、その概要を紹介する。

2. 調査対象と方法

2.1 患者発生状況調査

医療機関より送付された「ツツガムシ病患者調査表」と、保健所が患者本人に対して行った聞き取り調査を解析の資料とした。

2.2 ツツガムシ生息調査

2.2.1 調査地点と調査時期

1987年の調査は次の2地点で実施した。①岩出山町池月の山地(1984年11月に発病した患者の推定感染地で10月に実施)②古川市内の江合川河川敷(1987年10月に発病した患者の推定感染地と考えられる地点で11月に実施)1988年の調査は次の5地点で実施した。①前述の江合川河川敷(10月、11月、12月の3回実施)②岩出山町下野目の山地(1988年5月に発病した患者の推定感染地である畑に隣接する山地で8月、10月、12月の

3回実施)③中田町内北上川河川敷(11月に実施)④角田市江尻の畑(11月に実施)⑤角田市横倉の野原(12月に実施)

2.2.2 野ネズミの捕獲法とツツガムシ幼虫の採集法

調査地点に約100個ずつ野ネズミ捕獲用トラップを設置し翌日回収した。これを1回の調査で2日ないし3日続けた。野ネズミからツツガムシ幼虫を採集する方法は既報³⁾のとおりである。

3. 結果と考察

3.1 患者の発生状況

表1に示すように2年間で届出されたものは13例であった。全例が血清学的診断でツツガムシ病と確認された症例である。尚、血清学的診断は1例から12例までは当センターで、13例目が他の機関で実施された。

1987年の発生数8名は、これまでの年間発生数では最も多い。この発生状況の中では、鳴子町で5月10日に発病した3才の症例が注目される。これまで経験した中で最も低年齢の感染であり、全国的にみても非常に希な症例と思われる。

また20才代の青年が町内のテニスコートで感染した症例も確認され、ツツガムシ病は、年齢や場所を問わず感染する可能性のあることが示唆された。

患者は図1に示すように、県北の一迫町から県南の七ヶ宿町まで県内全域にわたり発生している。しかし12例が奥羽山脈に近い山添い地方で発生し、海岸地域での発生は北上町の1例のみであった。また11例は鳴子町と岩出山町および両町にはば隣接した地域に集中していた。これは1986年以前の発生状況と同様な傾向であり、当地域における有毒ツツガムシの生息が濃厚であるものと推察される。

推定感染機会について追跡調査を実施しているが、1984年から1986年までの症例では主に農作業や山林作業中に感染を受けていた。一方、この2年間では農作

表1 1987年および1988年のツツガムシ病発生状況

症例No.	居住地	性	年齢	発病年月日	推定被刺地	推定感染機会
1	岩出山町	男	22	1987. 4. 11	岩出山町 (テニス場)	テニス
2	鳴子町	女	43	1987. 5. 10	鳴子町 (山)	山林作業
3	鳴子町	男	3	1987. 5. 10	鳴子町 (庭)	砂遊び
4	古川市	男	26	1987. 5. 27	古川市 (江合川河川敷)	コイ釣り
5	一迫町	女	57	1987. 6. 18	一迫町 (田)	農作業
6	北上町	男	72	1987. 9. 19	北上町 (追波川河川敷)	散歩
7	古川市	男	67	1987. 10. 13	古川市 (江合川河川敷)	農作業
8	色麻町	男	67	1987. 11. 2	色麻町 (船形山)	キノコ採り
9	鳴子町	女	42	1988. 5. 6	鳴子町 (畑)	農作業
10	岩出山町	女	53	1988. 5. 8	岩出山町 (畑)	農作業
11	宮崎町	男	51	1988. 5. 14	宮崎町 (田)	農作業
12	七ヶ宿町	女	75	1988. 6. 22	七ヶ宿町 (山)	散歩
13	仙台市	男	74	1988. 10. 31	仙台市 (レジャー施設)	草刈り

業中の感染に加えて、20才代の男性がテニスや河川での釣りで感染している。さらに前述の3才の幼児は、自宅の庭で砂遊びをしているうちにツツガムシに頭部を吸着されて感染したものと推定された。その他、散歩中に感染したと考えられる2症例も認められた。即ち、推定感染地および感染機会も山や畑での農作業のみならず、河川敷や平地でのレジャーや散歩等においても、ツツガムシに吸着される可能性が明らかとなった。

1984年から1988年までの5年間に、県内で発生したツツガムシ病患者の季節的分布状況を図2に示した。4月から7月初めまでの春型が17例、9月から11月までの秋型が9例で、それぞれ5月および11月をピークとする2峰性を示し、特に5月に約40%が集中している。この発生状況は山形県の発生パターン⁴⁾とよく類似しており、フトゲツツガムシ幼虫の活動時期に一致しているものと考えられる。

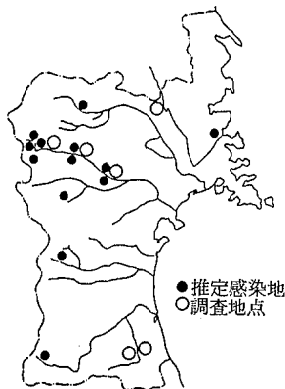


図1 患者の推定感染地と調査地点

3.2 ツツガムシ幼虫の生息状況

2年間に県内6地点において11回のネズミ捕獲を実施し94匹を採取した。種類の内訳はアカネズミ80匹、ハタネズミ11匹、クマネズミ2匹とドブネズミ1匹であった。これらネズミより採集したツツガムシ幼虫の総数は9,052個体であり、ネズミ1匹当たり平均96個体であった。

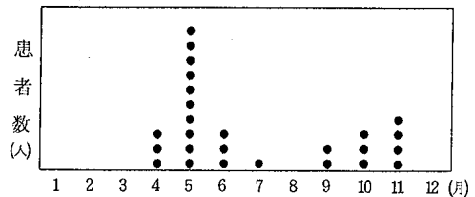


図2 宮城県における月別患者発生分布(1984~1989年)

採集されたツツガムシ幼虫の種類は3属8種(表2)即ち、フジツツガムシ、(以下各種類ともツツガムシを略す)フトゲ、アラト、ヒゲ、タテ、ヤマト、タミヤおよびサダスク・ガーリエブであった。

これまで宮城県において継続的にツツガムシ生息調査を行った報告はないが、Tamiya⁵⁾、高田⁶⁾ならびに大竹等⁷⁾によって、3属11種が同定されている。今回我々が同定した3属8種のうちタミヤを除く7種にキタサト、カワムラ、テラムラおよびナガヨを加えた11種である。キタサトについては我々も前回の調査³⁾で同定しているが、カワラム、テラムラそしてナガヨの3種についてはこれまでの調査からは検出できなかった。今次の調査で新しくタミヤを同定することができた。

以上をまとめると、県内のツツガムシ幼虫は、これまでに3属12種の生息が明らかとなった。

新型ツツガムシ病の重要な媒介種の1つであるタテについては大竹等⁷⁾が宮城県で初めて確認している。今回、

北上川の地点より、わずかに1個体ではあったがタテを検出したことは、県内にも同種が生息している事実をより一層、確実なものにしたと考えられる。さらに表には記載しなかったが、北上川の土壌中からもタテの幼虫を検出している。

今回の調査で同定した8種のうち、文献的にリケッチアを保有しうるツツガムシ幼虫はフトゲ、タテ、ヒゲ、ヤマトおよびサダスク・ガーリュプの5種である⁸⁾。これら5種の分布を調べると、ヤマト、サダスク・ガーリュプはどの地点においても検出され、しかもサダスク・ガーリュプは全ての調査地点で実施毎に必ず検出された。フトゲは角田市の2地点で確認できなかったがその他の地点では頻度に差はあるが検出され、タテは北上川の河川敷のみで検出された。さらにヒゲは北上川で検出頻度が高かった以外は、江合川で1988年11、12月の2回と角田市横倉で僅かに検出されたにすぎなかった。検出頻度に違いこそあれリケッチアを保有しうる5種のうち、いずれかのツツガムシ幼虫が全調査地点で採集されたことは、県内の広い範囲に有毒ツツガムシ幼虫が生息している可能性を裏付けるものと考えられる。

これらの5種のうちでヒト嗜好性のツツガムシ幼虫はフトゲ、タテおよびヒゲの3種である⁸⁾。従って、今回の調査から宮城県におけるヒトのツツガムシ病の媒介種もこの3種と考えられる。そこで、各地点でのフトゲ、タテおよびヒゲの検出頻度を比較した。まず、フトゲの検出頻度が最も高かった地点は江合川の河川敷で、4回実施した平均は47.8%であり、最も多いときで1988年11月の63.9%、少ないときでも1988年11月の23.9%であった。次いで岩出山町池月の10.6%であったが、この地点で1985年5月に調査したときは46.8%の高率であった。その他では下野目と北上川で僅かに検出されたのみであり、角田市の2地点ではまったく検出されなかった。結局、今回の6調査地点で採集された全ツツガムシ幼虫の中で、フトゲの占める割合は36.4%であった。

次にヒゲは、北上川で80.5%と高い検出率であった以外は2地点ではまったく検出されず、検出された2地点でも0.1%、0.2%と非常に低い検出率であった。即ちフトゲの検出総数が36.4%を占めるのに比して、ヒゲは1.8%であった。この様に検出率が低く検出地点が少ないこと、さらにヒゲ幼虫のリケッチア保有率がフトゲ幼虫の保有率よりもかなり低いと報告⁸⁾されていることから、本県ではヒゲがツツガムシ病の主要媒介種とはなりえないものと考えられる。

今回の調査で我々としては初めて県内の生息を確認したタテは、日本における新型ツツガムシ病の非常に重要な媒介種と報告されている。このタテ幼虫は、特に関東以前で秋から冬にかけてよく活動するといわれている。このタテについても県内での媒介種としての役割を解析しなければならないが、今回の調査で採集されたのは1

個体のみであり、詳細な検討を加えるまでには至らなかった。今後、北上川などでの野外調査を継続していく必要があるだろう。

今回は推定感染地周辺での調査を重点的に実施し、岩出山町池月と古川市江合川の調査地点ではフトゲが多数検出された。しかし岩出山町下野目では推定感染地に隣接した山地を採集地点にしたがフトゲの検出率は非常に低かった。フトゲの生息地点は県内の広範囲に及んでいると考えられるが、濃厚な生息地点は比較的限局している可能性が推定できる。また、調査は主に10月から12月に実施したため、ツツガムシ幼虫の季節的な動向を見極めることができなかった。県内でのツツガムシ病の発生が春に集中して発生する傾向があることを考慮にいれながら、ツツガムシ幼虫の生息状況を年間を通じて詳細に調査していく必要があると考えられる。

4. ま と め

宮城県におけるツツガムシ病の発生状況ならびに、媒介動物であるツツガムシ幼虫の生息調査を行った。その結果、患者発生年齢が幼児から老人までと広範囲にわたり、また推定感染機会も多様化する傾向が認められた。

さらに県内における主な媒介種はフトゲツツガムシと考えられるが、タテツツガムシも検出されたことから今後の追跡調査が必要となった。さらに、宮城県ではこれまで文献に記載例のないタミヤツツガムシの生息が確認され新しい知見となった。

謝 辞

終わりにツツガムシ幼虫の同定に御指導、御助言をいただいた福井医科大学・寄生虫学教室の高田伸弘博士に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 秋山和夫他：宮城県保健環境センター年報，3，69（1985）
- 2) 秋山和夫他：宮城県保健環境センター年報，4，52（1986）
- 3) 菱沼早樹子他：宮城県保健環境センター年報，5，63（1987）
- 4) 溝口二郎他：環境管理技術，6，25（1988）
- 5) Tamiya, T: Recent Advance in Studies of Tsutsugamusi Disease in Japan, Medical Culture, Inc, Tokyo, (1962)
- 6) 高田伸弘：衛生動物，33，309（1983）
- 7) 大竹秀男他：大原総合病院年報，29，21（1986）
- 8) 浅沼 靖：臨床と細菌，10，174（1988）

表2 ツツガムシ相調査結果

野ネズミ捕獲地	野ネズミ捕獲年月	捕獲数	フジ	フトゲ	アラト	ヒゲ	タテ	ヤマト	タミヤ	サダスク・ガーリエア*	判定不能	計
総計		94	1,267	3,299	2,274	163	1	1,001	28	982	37	9,052
岩出山町池月	1987.10	11	37	10	3	0	0	16	0	26	2	94
古川市江合川	1987.11	8	0	1,215	1,544	0	0	323	0	244	12	3,338
計		35	1,036	5	90	0	0	24	0	360	10	1,525
岩出山町下野目	1988.8	8	1	0	3	0	0	0	0	1	0	5
同上	1988.10	22	465	2	7	0	0	14	0	345	8	841
同上	1988.12	5	570	3	80	0	0	10	0	14	2	679
中田町北上川	1988.11	8	0	7	1	153	1	0	28	0	0	190
計		21	0	2,062	632	9	0	624	0	151	9	3,487
古川市江合川	1988.10	7	0	68	163	0	0	4	0	42	8	285
同上	1988.11	9	0	1,679	355	1	0	484	0	82	1	2,602
同上	1988.12	5	0	315	114	8	0	136	0	27	0	600
角田市江尻	1988.11	2	0	0	1	0	0	0	0	6	0	7
角田市横倉	1988.12	9	194	0	3	1	0	14	0	195	4	411

*いずれの種もツツガムシを省略

9 抗原抗体の同時検出から見た尿道炎の Chlamydia trachomatis感染症

梅津 幸司 山本 仁 阿部 政雄*

ラム染色陰性双球菌が観察された症例を陽性とした。

2-2-3 抗体測定: IgG, IgA抗体共に「IP Azyme クラミジア AG」(Savyon社)キットを使用した。IgA抗体は血清を16倍に希釈し, IgG抗体は64倍に希釈してスクリーニングを行った。

2-2-4 活動期感染: IgGとIgAが共に陽性であった例と, 回復期に抗体(IgG)の検出された例を活動期感染と判定した。

3. 成績

3.1 対象者と年齢分布

抗原および抗体を同時に検査出来た被検査者は92名で内90名は男性であった。

被検者の年齢分布は20歳以下10, 21-30歳36, 31-40歳26, 41-50歳14, 51歳以上は6名であった。

3.2 臨床診断名

非淋菌性尿道炎(NGU)51, 淋病21, その他腔頸管炎, 合併性尿道炎等20であった。問診の際にNGUの51名は全員が初感染であると申告した(表1)。

1. はじめに

嘗て猛威を振るった眼疾患「トラコーマ」は病態を変え, 性行為感染症(Sexually Transmitted Disease, STD)の一つとして再登場したが, 病原体であるChlamydia trachomatis(クラミジア)は, STDに付随する疾病として母子垂直感染と考えられる新生児の結膜炎ないし肺炎, また呼吸器, 生殖器, 泌尿器, 循環器の感染症や婦人科領域における外妊, 不妊, 早産の原因の一つとも推定¹⁾²⁾³⁾され, 臨床と公衆衛生の両面に幾つかの問題を提起している。今後さらにクラミジアの示す病型が多様化し, 流行が広がることも懸念される。

我々は1988年, 正常妊婦および上気道感染症患児における抗体調査を行い, クラミジアに対する免疫グロブリンA(IgA)抗体測定の意義を検討して, 血清診断の新しい指標と成り得ると考え報告した⁴⁾。

今回は, 尿道炎患者を対象に抗原と抗体の同時検出を試み, 所謂活動期感染の指標やクラミジアの診断基準について検討を加えた。

2. 材料と方法

2.1 抗原検出材料及び血清

1988年11月から1989年7月迄に仙台市内の一診療所を受診した尿道炎患者について, 初診時に尿道擦過物を綿棒(STD-EZE, Abbot社)で採取し直ちにスライドグラスに塗抹し乾燥後, 試験するまで-20℃に保存した。

急性期血清も同時に採取したが, 回復期血清は2~3週間後の再来院時に採取した。

2.2 方法

2-2-1 クラミジア抗原検出法: 「マイクロトラック・クラミジア・ダイレクト・テスト」(Syva社)を使用した。

蛍光染色された基本小体(EB)の数を蛍光顕微鏡で観察し, EBが全視野で10個以上観察された検体を抗原陽性, 1~9個の検体を疑陽性とした。

観察には陽性コントロールスライド及び, 陰性コントロールスライド(共に, Syva社)を併用した。

2-2-2 淋菌の検査: 尿道擦過物をスライドグラスに塗抹し乾燥, 固定後, グラム染色を行い細胞内にグ

表1 被検者の年齢分布と診断名

診断名	年齢層	≤ 20	21-30	31-40	41-50	≥ 51	診断名別合計(%)
NGU		4	19	15	10	3	51(55.4%)
淋病		4	12	3	2	0	21(22.8%)
その他		2	5	8	2	3	20(21.8%)
年齢層の合計(%)		10 (10.9)	36 (39.1)	26 (28.3)	14 (15.2)	6 (6.5)	92 (100%)
			(69.6%)				

3.3 抗原検出と抗体

92例中, EBが10倍以上観察された陽性例は32(34.8%)であったが, 疑陽性例は29(31.5%), 陰性例は31(33.7%)であった。又, 92例の内抗体陽性例は47(51.1%)であった(表2)。

3.4 活動期感染

抗原陽性32例中17(53.1%), 疑陽性29例中2(6.9%), 陰性31例中12(38.8%)であり, 全検査例のうち31例(33.7%)が活動期感染と判定された(表3)。

pair血清を採取し得た50名の内, 回復期にのみ抗体の検出されたのは3例でどれもIgG抗体であった。

* 阿部政雄: 仙台市・阿部膚科医院。

4. 考 察

I g A 抗体の測定結果が感染症の診断に取り入れられたのは、腎臓移植患者に高率に発生するウイルス感染の指標とするためであったが、Piuraら⁵⁾はこのI g A 抗体の消長を持続・再感染するクラミジアに応用し、I g A 抗体の証明が、クラミジアの“active infection” (活動期感染)のマーカーに出来ると報告した。

国内における追試でも吉沢ら⁶⁾は、クラミジアの活動期感染の指標として、I P A zymeによる測定値はI g A 16倍以上(間接蛍光抗体法、以下、F Aで16倍以上) I g G 64倍以上(F Aで64倍以上)の値を妥当とした。現在I g A 抗体の消長はクラミジア治癒の判定、病勢の判定にも使用⁷⁾されている。

これらの新しい知見は、成人におけるクラミジア感染の診断にI g M 抗体の測定がその一助となっていない事を示している。我々も既にこの事実を確認した。

即ち、I g A 抗体の陽性者は、I g M 陽性8例の内6例に、I g M 陰性26例のうち7例に認められ、I g M 陰性群とI g M 陽性群を比較するとI g A の検出に有意差のあることを指摘した($P=0.05 < X=4.12 < P=0.025$)⁴⁾。

細菌感染の証明は原則として起因菌の分離培養で行われている。

血清抗体を積極的に診断に応用している点で、クラミジアは特異な細菌の一つであるが、このことはクラミジアの分離培養が必ずしも容易に行い得ないこと等、技術・施設の面で幾つかの制約があることに由来して²⁾⁶⁾⁷⁾いる。更に、クラミジアの感染は、出産や出生児に影響を及ぼしており、妊婦感染の証明は緊急を要するのにも、女性からのクラミジア検出が容易でないことも背景にある。例えば、クラミジア分離陰性者の約30%に抗体が証明されること⁸⁾と、またI g A 陽性で抗原の検出の検出されなかった母親から出生した新生児の36%に抗原が検出²⁾されたこと等々、分離法でクラミジアの全症例を証明し得なくなってきた。女性の場合には分離材料の採取で採取部位、方法、或は被検者の性周期によって分離率にバラツキが生じるためと考えられている。この点は、分離培養法とほぼ同じ検出率を示す抗原検出キットも同様と考えられており、クラミジア感染を正確に把握出来る新しい指標が模索されている。

1984年Ceveniniら³⁾は、クラミジア分離陽性の非淋菌性尿道炎患者の94%にI g A 抗体を証明し、I g A 抗体検出によるクラミジア診断の可能性を示した。

その後、吉沢ら⁶⁾はサルによる感染実験でI g A 検出の有用性を証明した。

今回の調査では、尿路感染症におけるNGUの割合が55.4%であり従来の報告と一致している。

又、受診患者の年齢も好発年齢層とも考え得る21-40歳までで全体の約70%を占め、これも他の報告と同様であ

った。この内受診病日(平均15.6日)を算定し得たの51名はその起算日にprostitute と接触があったと回答しており、クラジアの感染原としてprostitute の存在が示唆された。

なお、患者の内4名は夫婦で受診しており、家族内感染を推定させた。

全体の抗原検出状況を見ると抗原陽性が34.8%、疑陽性が31.5%、陰性33.7%であった。また疾病別陽性率はM G U が43.1%(22/51)、淋病が23.8%(5/21)、合併症・その他が25%(5/20)で他の報告と一致した。

表2 診断名別、抗原抗体検出の比較

抗原検出	診断名	NGU (N=51)		淋病 (N=21)		合併症、その他 (N=20)		抗体原出
		抗体陽性	抗体陰性	抗体陽性	抗体陰性	抗体陽性	抗体陰性	
ク	陽性 (EB≥10)	13	9	3	2	3	2	32 (34.4%)
ラ	疑陽性 (EB1-9)	7	12	3	2	3	2	29 (31.5%)
ミ	陰性	5	5	6	5	4	6	31 (33.7%)
シ	陰性+疑陽性	(12)	(17)	(9)	(7)	(7)	(8)	60 (65.2%)
ア	出							
診断名別合計		25	26	12	9	10	10	92
(抗体陽性率)		49.1%		57.1%		50.0%		(100%)

全血清の抗体陽性率 47/92=51.1%

次に抗体の保有率は、全体で51.1%(47/92)、NGUで49.1%(25/51)、淋病で57.1%(12/21)、合併症・その他で50%(10/20)であり、淋病と合併症・その他の部分で高い値を示したが、淋病の12例中8例と合併症・その他10例中8例には何れもI g G とI g A 抗体が同時に検出され、活動期感染を推定させた。

一方、抗原陽性例に占める抗体陽性の割合はNGUで59.1%(13/22)と低く、抗原陽性全体(32例)でも59.4%(19/32)と低率であった。当然、抗原陽性で抗体反応のなかった割合が高く(40.6%)、従って抗原陰性で抗体の検出された割合も48.3%(15/32)と高率であった。

クラミジアの血清反応、特に抗原陽性例における抗体検出率は頸管炎等女性の疾患では一般に高率²⁾³⁾⁷⁾で、多くは90%以上の数値を報告しているが、NGUについてもCvenini³⁾らは94%の高率に検出されたとしている。これに反して天野⁹⁾ら、Philip¹⁰⁾らはクラミジア抗原が検出されても、抗体に変動のない症例のあることを報告している。特に天野らの報告では、抗原陽性でもI g G の検出されない例が42%であった。

今回の我々の調査における数値は抗原陽性例における抗体検出の割合がCveniniら³⁾の成績を大幅に下回っており、むしろ天野⁹⁾ら、Philip¹⁰⁾らの成績に近く、抗原陰性例(疑陽性を含む)における抗体陽性率の高さ(46.7%)も同様であった。

これまで、NGUにおけるクラミジアの診断は抗原検出で充分と云われてきた。それはクラミジア抗原陽性NGU患者の94.1%に抗体が検出され、健康人との比較で有意差が証明されたとするCveniniら³⁾の報告に依るが

この報告でも抗原陰性者の20.5%から抗体が検出されていた。

我々の成績では抗原検出の結果と抗体測定結果との間に有意差は証明されなかった ($P < 0.05$)。即ち、今回使用したキットの組み合わせによるクラミジアの診断は、抗原と抗体の両面から判定する必要性を示唆するものと解釈出来るが、問題を残していない訳ではない。

今回抗原検出に用いた「マイクロトラック・クラミジア・ダイレクト・テスト」と、組織培養法による抗原検出の陽性一致率を幾つかの報告と比較すると、67.9%¹⁾、82%²⁾、91%³⁾等と筆者により巾があるものの陰性一致率は高いことで共通している。

検体採取部位別では尿道擦過物に比べて結膜炎からの材料の方が陽性一致率が良好であると云われ、これら一致率の違いは検体採取法に帰する所が多いとされている。然るに、今回の約9ヶ月間にわたる調査期間内での抗原検出率は、ほぼ一定であった。吉沢⁶⁾らはサルに対する感染実験で、皮下および結膜への接種ではI g Gが産生されたのみであったが、腔腔への接種でI g Aが産生されたとしており、クラミジア感染による抗体産生機構の一部を説明していると理解される。

次に、血清反応で判定した活動期感染の割合は33.7% (31/92)であった。これを抗原検出との関係で見るとここでも抗原陽性例では53.1% (17/32)と低率で、抗原陰性例(疑陽性を含む)では23.3% (14/60)であった。又、初診時の血清で抗体が陽性だった44名中39名(88.6%)では同時にI g A抗体が検出され、pair血清50中回復期にのみ抗体が検出されたのは3例に過ぎなかった。クラミジア症での活動期感染の指標は、NGUにおける成績と急性卵管炎における40数%の値を根拠に抗原が検出されない母親から出生した新生児の36%に抗原が検出された事実に対処すべく、主に妊婦のクラミジア診断に使用されている。

表3 活動期感染の割合 (N = 92)

抗原検出	検出抗体の種類	活動期感染	その他の検出された抗体		
			Gのみ+	Aのみ+	G & A共+
クラミジア抗体検出	陽性 (EB ≥ 10)	17	2	0	13
	疑陽性 (EB 1-9)	2	11	0	16
	陰性 (陰性+疑陽性)	12 (14)	3 (14)	0 (32)	16 (32)
合計		31 (33.7%)	16	0	45

活動期感染: I g G, A共に陽性か、回復期で抗体価の検出された例

更にI g A測定の結果を治療の指標として使用し有効であったとする報告は活動期感染に対するI g A測定の意義を間接的に証明した⁷⁾ものと理解される。

今回のNGUにおける活動期感染の成績が示す結論は先に述べた様に、クラミジアの診断は抗原と抗体の両面か

ら判定する必要性、に帰する。

しかも、平均受診病日が15.6日だったとは云え初診時の血清の88.6%にI g Gと共にI g A抗体が検出されたこと、pair血清50中回復期に抗体の上昇が見られたのが3例に過ぎなかったこと等は、妊婦におけるクラミジアの抗体測定も一度で事足りることを示している。

抗原の検出でEBが1~9個の検体を疑陽性と判定し集計では陰性として処理した。キット添付の手技・方法マニアや西浦¹¹⁾¹³⁾らの再検査の必要性を示したことを考慮した処置である。その結果、活動期感染と判定された症例は6.9% (2/29)であり、具体的には抗原陰性と判定しても支障のないことを示した。即ち、臨床的に感染症を疑い、治療を開始している患者を再検査する意味は余り見当たらない。

5. まとめ

仙台市内の皮膚泌尿器科を受診した主に尿道炎患者92名について、クラミジア・トラコマティスに対する抗原検出と抗体測定を同時に実施し次の結果を得た。

5-1 尿路感染症に占めるNGUの割合は55.4%であり、受診患者の年齢層は21-40歳で全体の約70%を占めた。この仙台市のクラミジアによるNGUの発生状況は他の報告と一致した。

5-2 感染源として患者の約半数に当たる51名はprostituteとの接触を示唆しSTDとしてクラミジア感染症の流行が改めて確認された。

5-3 92例中、抗原陽性例は32 (34.8%)、疑陽性例は29 (31.5%)、陰性例は31 (33.7%)であった。又、92例中、抗体陽性は47例 (51.1%)であった。

5-4 活動期感染は抗原陽性32中17 (53.1%)、全例では31例 (33.7%)であった。

5-4 抗原陽性例に占める抗体陽性の割合はNGUで59.1% (13/22)、抗原陽性全体 (32例)でも19例 (59.4%)と低率であり、逆に抗原陰性で抗体の検出された割合は48.3% (15/32)と高率であった。

5-6 以上の調査成績は、非淋菌性尿道炎と診断された症例でもクラミジア感染の診断は抗原と抗体の両面から判定する必要性を示唆するものと解釈した。

本調査の一部は厚生省・特別補助事業「クラミジアトラコマティスの血清診断薬の精度管理に関する研究委員会」活動の一環として実施した。

参 考 文 献

- 1) 千葉俊三: ウイルス, **36**, 43-53, 1986.
- 2) 原尻真理, 他: 感染症誌, **62**, 147-155, 1988.
- 3) Cevenini.R,et al;J.Clin.Pathol. **37**, 1984.
- 4) 梅津幸司他: 宮城県保健環境センター報告: No.6, 54-56, 1988.
- 5) Piura.B,et al;Eur.J.Epdemiol. **1**: 110-115, 1985.
- 6) 吉沢花子, 他: 感染症誌, **61**, 893-899, 1987.
- 7) 笠松高弘, 他: 日産婦会誌, **41**, 479-486, 1989.
- 8) Ripa.T,et al;Am.J.Obstet.Gynecol. **138**, 960-964, 1980.
- 9) 天野正道, 他: 日泌尿会誌, : **77**, 1254-1262, 1986.
- 10) Philip,R.N,et al;J.Immunol, **122**, 2162. 2-2133, 1973.
- 11) 西浦常雄, 他: 感染症誌, **58**, 1305-1314, 1984.
- 12) 恒川琢司, 他: 感染症誌, **59**, 478-485, 1985.
- 13) Allen.M, et al.: Summary Report, Clinical Study, NO3, Syva Co, Palo Alto, U, S, A, 1983.

10 きゅうり、ばれいしょ中に残留する 有機塩素系農薬調査結果

鈴木 滋 佐藤 勤 佐藤真貴子
小野 研一 加茂えり子 石川 潔*
佐藤 信俊** 菊池 格

昭和53年から63年度までに実施したきゅうり、ばれいしょ中に残留するBHC、DDT、Drin等の有機塩素系農薬の調査結果を全国値と比較しながら検討した。その結果、宮城県では検出率、平均値ともきゅうり中ではDrin類が最も高く、次いでBHC類、DDT類の順であったが、ばれいしょ中では若干BHC類が高く、次いでDrin類、DDT類の順であった。これらの中では特にきゅうりのDrin類が高い値を示し、検出率(0.001ppm以上)は平均44.5%であった。これらの宮城県での傾向は全国平均値でもほぼ同様であった。

1. はじめに

BHC、DDT、Drin等の有機塩素系農薬は、その残留性のため広範囲な環境汚染を引き起こし、我が国では昭和46年にその製造、使用が全面禁止された。当県ではこれらの農薬の食品中残留について昭和45年以来、検査を続けてきたが、その汚染は使用禁止になってから20年近く経過した現在でも継続している。1)~3) 今回はこれらの汚染の中から、野菜類で塩素系農薬を取り込みやすいと考えられている、きゅうり、ばれいしょについて昭和53年から63年までの調査結果を報告する。

また国立衛生試験所、食品部を中心とする厚生省食品汚染物質研究班により、毎年全国の衛生研究所等から集められたモニタリングデータ⁴⁾についても報告し、宮城県のデータと比較した。

2. 方 法

2.1 試料

毎年宮城県内できゅうり、ばれいしょを5~20件採取し試料とした。

昭和53年から63年までの総件数はきゅうり86件、ばれいしょ79件であった。

2.2 分析方法⁵⁾

試料をミキサーで均一後、その10gをアセトニトリルで抽出(30, 15, 15ml)する。抽出液に水150ml、無水硫酸ナトリウム3gを加えn-ヘキサン50mlで2回再抽出する。n-ヘキサン層を濃縮後10%硝酸銀フロリジルカラム(3g)に負荷し、3%ベンゼン/n-ヘキサン100mlで溶出する。溶出液を濃縮後ECD-GLCにより定性、定量を行う。

分析項目はBHC類が α 、 β 、 γ 、 δ の4種類でこれらの和をT-BHCとし、DDT類はpp'-DDT、

pp'-DDE、pp'-DDD、op'-DDTの4種としその総和をT-DDT、Drin類は、Aldrin、Dieldrin、Endrinの3種でその和をT-Drinとした。(モニタリングデータでは、BHC類、DDT類は同じであるが、Drin類はAldrinとDieldrinの和で計算している。)

3. 結果及び考察

図1、図2には宮城県で昭和53年から63年までの間に検出限界(0.001ppm)を超えて検出されたT-BHC、T-DDT、T-Drinの割合を示した。

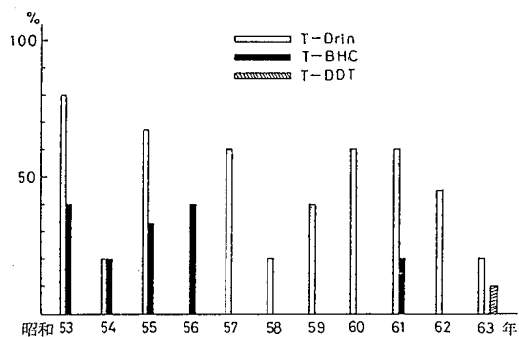


図1 きゅうり中塩素系農薬検出率

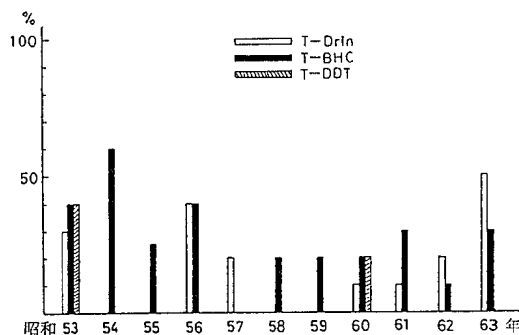


図2 ばれいしょ中塩素系農薬検出率

* 現阿武隈川下流域下水道事務所

** 現原子力安全対策室

きゅうりでは明らかにT-Drinの検出率が高く、また経年変化でも顕著な減少傾向は認められない。一方T-BHCは昭和53年から56年までは検出されていたが昭和57年以降は殆んど検出されず、T-DDTは昭和63年に1件検出されたのみである。

これらの全データを平均すると、T-Drinが44.2%、T-BHCが10.5%、T-DDTが1.2%となり、T-Drin（殆んどがDieldrin）が最も高い値を示した。

一方、ばれいしょでは、全般的に検出率は低い、比較的T-BHCが高い頻度で検出されており、次いでT-Drin、T-DDTの順であった。全データの平均値はT-BHC 26.6%、T-Drin 19.0%、T-DDT 7.6%であるが、昭和60年から63年にかけてT-Drinの検出率が上昇しているのが気になるところであり、今後も監視する必要があると考えられる。

次に、図3、図4にはきゅうりの、図5、図6にはばれいしょの昭和53年から63年までの宮城県及び全国の平均値を示した。全国値ではnd（検出せず）の場合、検出限界の1/2の値を使って計算しているため、宮城県のデータもndは検出限界の1/2（0.0005 ppm）を用いて計算しており、グラフに現われた数値は必ずしも有意な実測値ではない。

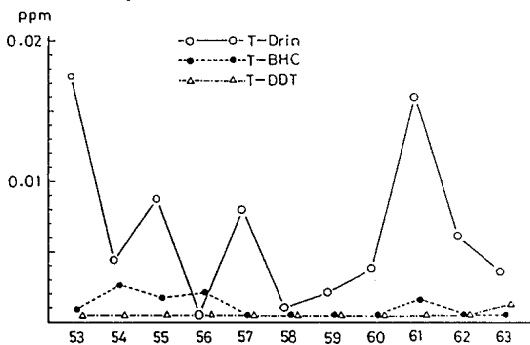


図3 きゅうり中塩素系農薬の経年変化（宮城）

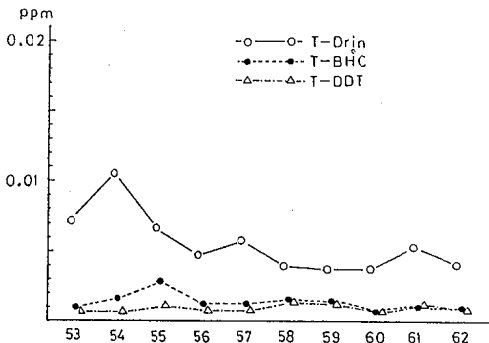


図4 きゅうり中塩素系農薬の経年変化（全国）

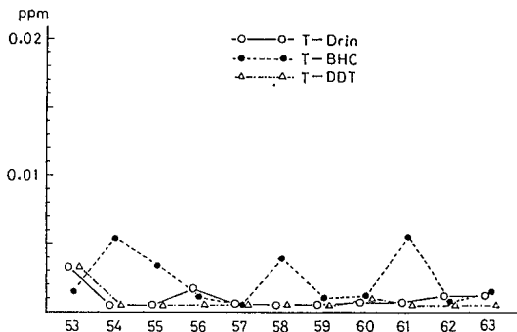


図5 ばれいしょ中塩素系農薬の経年変化（宮城）

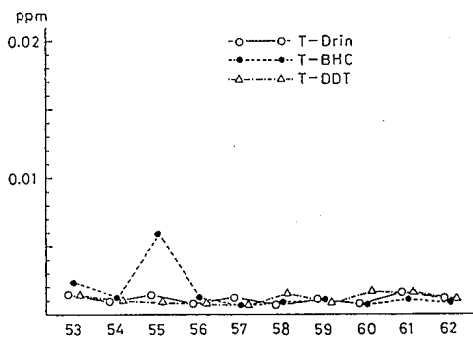


図6 ばれいしょ中塩素系農薬の経年変化（全国）

きゅうりでは、宮城、全国いずれもT-Drinが高い値を示しており、全データの平均は宮城がT-Drin 0.0067 ppm、T-BHC 0.00095 ppm、T-DDT 0.00058 ppmであり、全国値はT-Drin 0.0059 ppm、T-BHC 0.0015 ppm、T-DDT 0.00094 ppmとなり、ほぼ一致した傾向であった。経年変化では全国値でT-Drinがやや減少傾向が認められるが、宮城の場合、顕著には認められなかった。

ばれいしょでは、きゅうりに比べると低レベルであるが、宮城でT-BHCが高くなる年が見受けられ、全データの平均では宮城でT-BHC 0.0022 ppm、T-Drin 0.0012 ppm、T-DDT 0.00092 ppm、全国ではT-BHC 0.0017 ppm、T-Drin 0.0011 ppm、T-DDT 0.0011 ppmであった。経年変化もきゅうりのT-Drinのように大きな変化は認められないが、宮城のT-Drinが昭和60年以降やや上昇傾向にあるように思えた。

今回得られた値は、ndの場合検出限界の1/2の値を用いており、あくまでも実測値ではない。検出率（図1、2）を見ても明らかのように、ndのケースが多いため実際の汚染レベルは不明である。しかし今回得られた値が我々に対しどの程度健康上影響を及ぼしているのかを考察するため、宮城の全平均値をADI（一日許容摂取量）と比較してみた。

表1 A D I と の 比 較

	きゅうり (宮城)			ばれいしょ (宮城)			A D I μg/50kg/day
	濃 度	摂取量* ¹	A D I と の 比	濃 度	摂取量* ²	A D I と の 比	
B H C	0.00095 ppm	0.0082 μg	1/76000	0.0022 ppm	0.058 μg	1/11000	625* ³
D D T	0.00058	0.0050	1/50000	0.00092	0.024	1/10000	250
D r i n	0.0067	0.058	1/86	0.0012	0.031	1/160	5* ⁴

*¹ 昭和62年度国民栄養調査(東北)よりきゅうり 8.6g 摂取すると仮定

*² " (東北)よりばれいしょ 26.2g 摂取すると仮定

*³ γ-BHC (A D I 値)

*⁴ Dieldrin (A D I 値)

その結果、BHC、DDTはきゅうり、ばれいしょともA D Iよりはるかに低い摂取量(数万分の1)となり問題はないと考えられるが、DrinはややA D Iに近い値(きゅうり1/86、ばれいしょ1/160)となっている。これはDrinのA D Iがかなり小さいことも影響しているが、特にきゅうりについては、検出率、平均値ともBHC、DDTより高いレベルにあり、また減少傾向も認められないこと等を勘案すると、まだ何らかの汚染源があるのではないかと推察される。

以上の結果より、これらの農薬(特にDrin)の汚染は現在でもまだ継続中であり、今後もその動向は注意深く監視する必要があると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 小野研一 他：宮城県保健環境センター年報，2，100 (1984)
- 2) 鈴木 滋 他：宮城県保健環境センター年報，3，83 (1985)
- 3) 鈴木 滋 他：宮城県保健環境センター年報，5，80 (1987)
- 4) 内山 充，斎藤行生 他：食品汚染物モニタリングデータ(1978～1987)
- 5) T. Suzuki et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62, 681 (1979)

1 1 ガスクロマトグラフィーによる魚介類中のトリブチルスズ化合物の分析法

佐藤真貴子 菊地 秀明 鈴木 滋
佐藤 勳 菊池 格

漁網、船底の防汚剤として使用されているトリブチルスズ化合物の魚介類中の残留分析法について検討した。抽出液を塩酸処理シリカゲルで精製することにより目的成分付近の夾雑ピークを少なくすることができた。又、ECD-GCのカラム充填剤として10% Thermon-Hgを使用することでテーリングの少ない再現性の良いピークが得られた。

本法により養殖銀鮭のTBTOを分析したところ、すべての試料から検出され、その範囲は0.019~0.125ppmであった。

1. はじめに

トリブチルスズ化合物(TBT化合物)は藻類等の生物に対する毒生が強いことから漁網や船底に藻や貝などが付着するのを防ぐ防汚剤として使用されている。しかし最近になってTBT化合物が海洋を汚染し魚介類へ移行残留していることが明らかとなった。魚介類汚染は養殖魚だけでなく天然魚にもおよび汚染は広範囲に亘っている。

トリブチルスズオキシド(TBTO)はTBT化合物のなかでも使用量が多く、厚生省では昭和60年にTBTOの一日許容摂取量(ADI)を暫定的に1.6 μg/kg体重/日と定めた。又、昭和63年には「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律」に基づきTBT化合物は指定化学物質に指定された。

これに伴い、漁網防汚剤については全国漁業協同組合連合会及び全国かん水養魚協会が昭和62年に自主的に使用禁止措置をとったが、船底塗料については代替物の開発がおくれており塗料中のTBT化合物含有率の低減化が指導されているだけである。これらのことからTBT化合物については今後共、汚染の実態を監視していかなければならない。

TBT化合物の分析法には、塩化トリブチルスズ¹⁾(TBTC)、ハイドライド体²⁾(TBTH)、テトラアルキル体³⁾にそれぞれ誘導して、ECD、FID、FPD検出器付のガスクロマトグラフで定量する方法、あるいは液体クロマトグラフィー⁴⁾等の報告がある。我々はTBT化合物を塩酸酸性下でTBTCとし、塩酸処理シリカゲルで精製してECD-GCで定量する簡便な分析法について検討した。又、本法を養殖魚の銀鮭のTBTO分析に応用したので併せて報告する。

2. 方 法

2.1 試薬及び装置

TBTC標準液：東京化成工業株製TBTC、純度95%をヘキサンに溶解し、適宜希釈して用いた。

塩酸：和光純薬工業株製、精密分析用

シリカゲル：Merck社製 kieselgel 60 Art.7734

その他の試薬は和光純薬工業株製、残留農薬試験用を用いた。

ガスクロマトグラフ：島津製作所製GC-4CM(63Ni ECD付)カラム、10% Thermon Hg Chromosorb W(AW-DMCS)80~100 mesh、φ3mm×1.6m、

カラム温度：160°C 検出器温度：220°C

ガスクロマトグラフ、質量分析計：横河ヒューレットパッカード社HP 5890、日本電子社製D-300、日本電子社製JMA-3100

ホモジナイザー：Biotrona社パイオトロン

2.2 塩酸処理シリカゲルカラムの作成

あらかじめ130°Cで4時間活性化したシリカゲル40gを1N塩酸100mlに浸潤させスターラーで1時間攪拌する。上澄をデカントした後No.2のろ紙でろ過、約30分放置後磁製の蒸発皿に移し約120°Cのマッフル炉で5時間活性化しデシケーター中で放冷、保管する。

この塩酸処理シリカゲル5gを内径1cm、長さ30cmのクロマト管に乾式で充填し、無水硫酸ナトリウム2gを積層した後ヘキサンを充填剤の上端まで満たす。

2.3 試験溶液の調製

細切した試料10gを遠沈管にとりアセトニトリル30mlを加えてホモジナイザーで均一化し、1N塩酸10mlを加えて振とう抽出する。約2000rpmで5分間遠心分離してアセトニトリル層を分取する。残留物に更にアセトニトリル15mlを加えて2回振とう抽出する。アセトニトリル層を合わせて遠沈管にとり水150ml、硫酸ナトリウム3gを加え、ヘキサン50mlで2回振とう抽出し遠心分離後ヘキサン層をナスフラスコに分取する。ヘキサン層を40°C以下の水浴上で減圧下で約5mlに濃縮する。この濃縮液を塩酸処理シリカゲルカラムに負荷する。ヘキサン50mlでカラム内を洗浄し、30%ベンゼン・ヘキサン溶液50mlでTBTCを溶出する。溶出液を40°C以下の水浴上で減圧上で乾固しないように注意しながら濃縮し、ヘキサンで5ml定容として試験溶液とする。

2.4 定量法

試験溶液 3 μ l を GC-ECD に注入し、ピーク高さにより TBTC として定量する。TBTC は下記の式により TBTO へ変換する。

$$(\text{TBTO 濃度}) = (\text{TBTC 濃度}) \times 0.92$$

3. 結果と考察

3.1 抽出溶媒

TBT 化合物は 0.1 N 以上の塩酸で定量的に TBTC に移行⁵⁾し ECD 感度もよくなることから TBTC として抽出されることが多く、我々もこの方法によることにした。

抽出溶媒として、ベンゼン、ヘキサン、メタノール、アセトニトリルの 4 種について検討した。このうちヘキサンとベンゼンは試料への浸透度が悪く、またエマルジョンを形成しやすく有機溶媒層との分離が困難であった。メタノール、アセトニトリルでは試料への浸透度もよく有機溶媒層との分離も良好であった。しかし、表 1 に示したように実試料ではアセトニトリルの方が抽出効率がすぐれていたため抽出溶媒はアセトニトリルを用いることにした。

表 1 TBTC 抽出溶媒の比較

抽出溶媒	TBTC 検出値 (ppm)	平均値
ヘキサン	0.017, 0.026, 0.023, 0.031	0.023
ベンゼン	0.011, 0.018, 0.018, 0.017	0.016
メタノール	0.404, 0.365, 0.407, 0.368	0.386
アセトニトリル	0.478, 0.485, 0.492, 0.472	0.482

* 試料：銀鮭

3.2 精製法

TBT 化合物の精製にはアルミナ、フロリジル、シリカゲル、陰イオン交換樹脂、陽イオン交換樹脂等が用いられている。

このうち、アルミナ、フロリジル及びシリカゲルについて検討した。アルミナは TBTC の回収率に難点があり、フロリジルはロットにより TBTC の回収率にバラツキがみられた。

一方、シリカゲルは TBTC の吸着が強く、ヘキサン、ヘキサン・ベンゼン (1 : 1) の各溶液では溶出しなかった。ヘキサン・酢酸エチル (1 : 1)、アセトン等の溶液で溶出したが、実試料では夾雑ピークが多くなる可能性があった。しかし、シリカゲルを塩酸で処理する⁶⁾と TBTC の吸着が弱くなり、ヘキサン・ベンゼン (1 : 1) 溶液、2% 酢酸エチル・ヘキサン溶液でそれぞれ溶出した。実際に試料に応用すると、2% 酢酸エチル・ヘキサン溶液は精製効果がなく TBTC の定量は困難であった。そこで抽出溶媒をヘキサン・ベンゼンの混合溶液として、塩酸処理シリカゲルの活性に影響

を与える要因となる塩酸処理時間と処理後の活性化時間の関係、そして TBTC のカラムからの溶出パターンについて検討した。まず、活性化時間を 120°C 4 時間と一定して塩酸処理時間を変化させた。図 1 に示したように

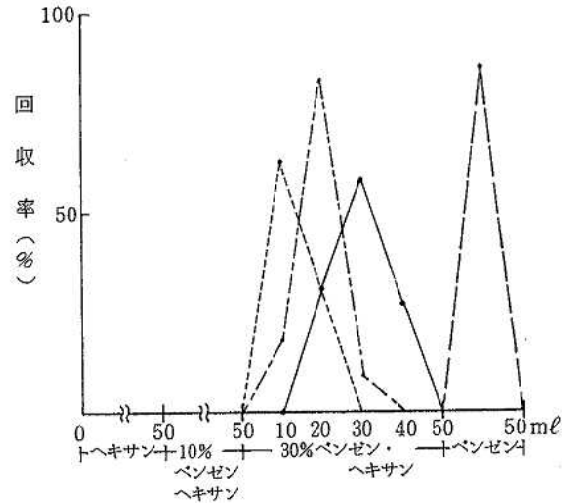


図 1 塩酸処理シリカゲルからの TBTC 溶出

活性化時間 4 時間
塩酸処理時間 ●—● 30分 ●—● 1時間
●—● 2時間 ●—● 3時間

溶出液量を各 50 ml とした場合、処理時間が 1 ~ 3 時間では 30% ベンゼン・ヘキサン溶液で TBTC は溶出した。処理時間が短くなると、より極性の大きな溶液が必要になる傾向があったので、処理時間は 1 時間とすることにした。又、活性化時間を長くすると同様に極性の大きな溶液で溶出する傾向が見られた。塩酸処理後は、最初、G 2 のガラスろ過器を用いて吸引ろ過していたが、吸引時間を一定にしても再現性の良いシリカゲルが得られなかった。これはシリカゲルへの塩酸の結合度合、水分含量等の微妙な相違からと考えられたのでデカント後、No. 2 のろ紙でろ過することにした。ろ紙でろ過しただけのシリカゲルは相当量の水分を含むことから活性化時間は 5 時間とした。

塩酸処理 1 時間、活性化時間を 120°C で 5 時間とすると比較的再現性の良いシリカゲルが得られた。

このシリカゲルカラムからの TBTC の溶出を図 2 に示した。STD、STD 添加試料とも 30% ベンゼン・ヘキサン溶液で TBTC は溶出し、夾雑ピークも除去することができた。しかし試料により 10% ベンゼン・ヘキサン溶液で TBTC の溶出が認められる場合もあったのでヘキサンで洗浄後、30% ベンゼン・ヘキサン溶液で溶出することにした。

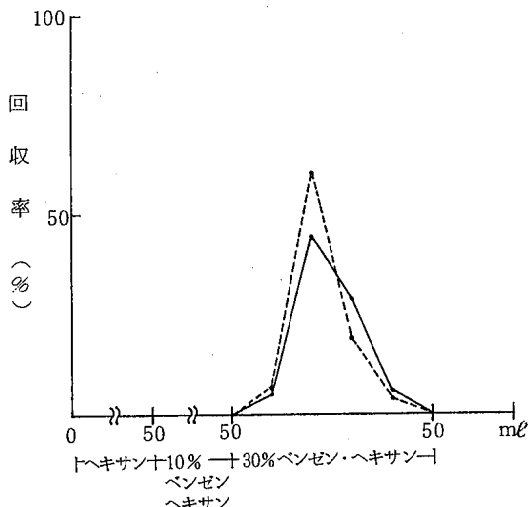


図2 塩酸処理シリカゲルからのTBTC溶出
 塩酸処理時間1時間、活性化時間5時間
 ——— STD, - - - - サンプル+STD

3.3 GC測定法

分離用の液相としてOV-1, OV-17等について検討したが、これらはTBTCの吸着が大きく、塩酸・アセトン溶液を同時注入しないとピークが得られなかった。塩酸・アセトン同時注入を繰り返すとマイクロシリンジの操作が困難になり消耗がはげしかった。又、ECD検出器にも悪影響をおよぼすことが考えられた。

一方、Thermon-Hgは水銀分析用の充填剤であるが塩酸・アセトン同時注入しなくても再現性のよいTBTCのピークが得られた。検量線はTBTCとして0~3ngまで直線性があり相関係数は0.9997であった。図3にTBTCのクロマトグラムを示した。本法の検出限界は0.010ppmであった。

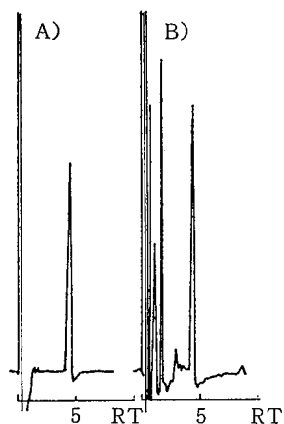


図3 TBTCのガスクロマトグラム
 10% Thermon-Hg 1.6m, 160°, 200°
 A) TBTC0.1ppm B) Sample

3.4 添加回収試験

試料 10.0 gにTBTC 5 μgを添加した時の添加回収試験の結果は表2のとおりであった。回収率は91.5~104.1%といずれも良好な結果が得られた。

表2 TBTCの添加回収試験

試料	TBTC添加量(μg)	回収率(%)
銀 鮭	5	94.3
ア オ メ	5	94.6
タ ラ	5	104.1
タ ラ 卵	5	91.5
タ ラ 肝臓	5	91.1

3.5 実試料への応用

本法を用いて宮城県産の養殖魚銀鮭のTBTO分析を行った。結果を表3に示したがすべての銀鮭からTBTOが検出され、その範囲は0.019~0.125ppm、平均0.049ppmであった。これは、他の調査結果に比べ高い値ではなかった。最も高い値を示したものでTBTOの一日摂取量を計算すると12.5 μg/50kgとなりADIの15.6%であった。

表3 銀鮭中のビストリプチルスズオキシド (TBTO) の検査結果

No.	買上地	体長	体重	TBTO (ppm)
1	歌津全町漁協	54 cm	2.1kg	0.125
2	"	55 cm	2.5kg	0.033
3	志津川町漁協	60 cm	3.3kg	0.053
4	"	60 cm	3.2kg	0.061
5	"	59 cm	3.5kg	0.056
6	桃浦地区漁協	62 cm	3.6kg	0.048
7	牡鹿漁協	58 cm	2.5kg	0.050
8	雄勝湾漁協	63 cm	3.8kg	0.025
9	女川町漁協	55 cm	2.9kg	0.019
10	"	59 cm	2.9kg	0.023

搬入年月日：昭和63年7月21日 検出限界：0.010ppm

3.6 GC-MS, SIMによる確認

3.5においてTBTOが検出されたものについてGC-MS, SIMで確認した。測定条件を表4に示した。

表4 GC-MS, SIMの条件

カラム：DB-5 0.53mm×15m (J&W)
 カラム温度：120° (1min)→20°C/min→200°
 カラムヘッド圧：5 psi
 注入口温度：260°C
 イオン化電圧：70eV
 イオン化電流：300 μA
 検出イオン：M/Z 177, 179
 注入量：2 μl (スプリットレス)

測定方法は 2.3 の試験溶液 2 ml を窒素ガスでおだやかに風乾して、ただちにメタノールに溶解し、ホウ素酸ナトリウム 0.05 g を加えて水素化し、水を加えてヘキサンに逆抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水したものをを用いた。STD も同様に水素化した。

TBTH のマススペクトルを図 4 に、SIM のクロマトグラムを図 5 に示した。

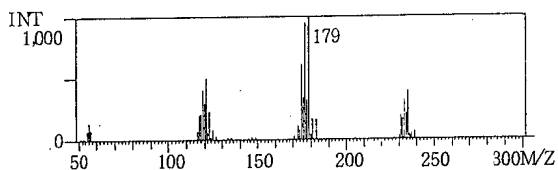


図 4 TBTH のマススペクトル

DB-5 0.53mm×30m

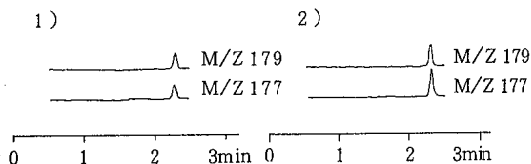


図 5 SIM のクロマトグラム

1) 銀鮭 2) TBTH 1ppm

4. ま と め

魚介類中の TBTH 化合物の簡易分析法について検討した。抽出溶媒はアセトニトリルの抽出効率が優れていた。塩酸処理シリカゲルで TBTH を簡便に精製することができた。本法を用いて養殖魚銀鮭の調査をしたところ、すべての銀鮭から TBTH が検出され、その範囲は 0.019 ~ 0.125 ppm であった。

参 考 文 献

- 1) 竹内正博, 水石和子, 山野辺秀夫, 渡辺四男也: 東京衛研年報, **37**, 154 (1986)
竹内正博他: 分析化学, **36**, 143 (1987)
- 2) 高見勝重, 山本仁史, 奥村為男, 杉前昭好, 中本雅雄: 日本分析化学会第 34 年会講演要旨集, P630 (1985)
- 3) R.J. MAGUIRE & H. HUNEAULT, J. Chromatogr., **209** (1981) 458
- 4) 永見大志, 宇野正清, 陰地義樹, 山添胖: 食衛誌, **29**, 125 (1988)
- 5) 竹内正博, 伊藤弘一, 森謙一郎, 原田裕文: 東京衛研年報 **28-1**, 69 (1977)
- 6) Y. HATTORI, A. KOBAYASHI, S. TAKEMOTO, K. TAKAMI, Y. KUGE, A. SUGIMAE, M. NAKAMOTO: J. Chromatogr., **315**, 341 (1984)
- 7) 環境庁環境保健部保健調査室: 「化学物質と環境」(昭和 63 年 12 月) P 121 ~ 127, P 145 ~ 146

12 鶏卵中の残留スルファモノメトキシンの分析について

高槻 圭悟 菊池 格

A gas chromatographic - mass spectrometric method for determination of sulfamonomethoxine in egg was developed. Selected ion monitoring technique was used for selective and precise detection. Egg sample was extracted with acetonitrile, the extract was passed through Sep Pak Silica and concentrated. Diazomethane in ether was added to methylate sulfamonomethoxine. Methylated products were cleaned up using silica gel column chromatography and acid - ether partition to eliminate interfering substances. Sulfamonomethoxine methyl was determined with GC-MS SIM using m/z 230 as detection ion.

1. 序 文

畜水産業では疾病に対処するための医薬品としてのみならず、生産性向上のため飼料添加物としても多数の抗生物質、合成抗菌剤が用いられている。一方食品衛生法では、「食品は抗生物質を含有してはならない」「食肉食鳥卵及び魚介類は化学的合成品たる抗菌性物質を含有してはならない」と規定されている。従って食品中の残留抗菌性物質について常時監視する必要があり、迅速精確な残留分析法が必要である。サルファ剤の残留分析法としては厚生省からの通知により公定法が示されており^{1,2)}ジアゾメタンによるメチル化後ECD-GLC分析を行う方法とHPLC法とが使われている。また、HPLC法による一斉分析法が報告されている。³⁻⁵⁾しかし、これらの分析法にはいくつかの難点が見られ、銀鮭中の残留スルファモノメトキシンの分析についてHPLC法の改良やGC-MS SIM法の開発を先に報告した。⁶⁾

昭和63年度にはECD-GLC法の改良法並びにGC-MS SIM法を用いて鶏卵中の残留スルファモノメトキシンの分析を行い、残留例1件についてGC-MSによる確認を行ったのでその経過を報告する。

なお産卵中の鶏に対しては、動物用医薬品並びに飼料添加物の抗菌剤は使用禁止となっている。^{7,8)}

2. 方 法

2.1 装 置

ホモジナイザー：バイオトロンBT10 20 350 D (スイス、バイオトロナ社)。

振とう器：8-1-W型(ヤヨイ社)

ロータリーエバポレーター：N-1型(東京理科器械)

クロマト管：ガラス製、径15mm、長さ300mm、グラスフィルター、テフロンコック付。

バスツールピペット：7095B-9(コーニング社)。

ガスクロマトグラフ用カラム：DB-17(0.53mm×15m)、DB-5(0.53mm×15m)(J&W社)。

ガスクロマトグラフ：GC-4CME(電子捕獲検出器付)(島津製作所)にキャピラリーカラム取付用変換キット、2-3640、2-3641(スペルコ社)を用いてDB-17カラムを取付けた。

ガスクロマトグラフ-質量分析計：HP-5890 Aガスクロマトグラフ(横河ヒューレットパッカード社)を全ガラス製1段ジェットセパレーターを経てD300型質量分析計(二重収束型)(日本電子)に接続。JMA3100データアナリシスシステム(日本電子)を使用。

カラムはDB-5(0.53mm×15m)。

2.2 試 薬

アセトニトリル、エーテル、塩化メチレン、n-ヘキサン-残留農薬用(和光純薬)。

塩化メチレン、エーテル-使用直前にアルミナカラムを通して精製する。

カラム用シリカゲル-No.7734(メルク社)、140°Cで3時間活性化し、デシケーターに保存する。

カラム用アルミナ-中性、Akt I(ヴェルム社)。

シリカゲルカートリッジカラム-セップバックシリカ(ウォーターズ社)。

N-ニトロソ-N-メチルウレア-No.N-4766(シグマ社)。

ジアゾメタンのエーテル溶液-使用直前に文献(9,6)に従って調製。

(注) ジアゾメタンはドラフト中で防護シールドを置いて調製する。有毒かつ爆発性を有するため取扱いに注意し、全量を使いきる。残ったジアゾメタンは酢酸と反応させた後処分する。詳細は文献(10,6)を参照すること。

スルファモノメトキシシン(第一製薬)。

標準溶液-スルファモノメトキシシン10.0mgを精秤しアセトニトリル100ml溶液として100ppm原液とする。これをアセトニトリルで希釈し10, 5, 1ppmとして標準溶液とする。冷蔵庫に保存する。

2.3 抽出, メチル化, 精製

均一化した鶏卵10.0gを100ml遠沈管に精秤し、アセトニトリル20mlを加えて5分間ホモジナイズする。2000rpmで10分間遠心分離し、アセトニトリル層を100ml分液ロートに移す。ホモジナイザーシャフトをアセトニトリル20mlで洗浄し、これを遠沈管に加える。残渣をスパチュラで細かく砕き、栓をして10分間振とうする。遠心分離後アセトニトリル層を分液ロートに加える。食塩約2gをアセトニトリル抽出液に加え、よく混合した後10-30分放置する。分離した下層(水層)を捨て、アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後口過する。セップパックシリカカートリッジカラムを5mlのアセトニトリルで洗浄後、上の抽出液をこのカラムを通し、更にアセトニトリル5mlを通す。溶離液を100mlナスフラスコに集め、35°Cでロータリーエバポレーターを用いて約5mlに濃縮する。蒸発乾固させないように注意する。ジアゾメタンのエーテル溶液5mlを加え、室温1時間完全に遮光して反応させる。反応中時々反応液を振り混ぜる。反応後ドラフト中ウォーターアスピレーター減圧下で加熱せずに過剰のジアゾメタンを溜去する。溶液の温度は10°C以下に低下するが、過剰のジアゾメタンが完全に溜去するまで加熱しないようにする。更に40°Cエバポレーターを用いて溶媒を溜去し、残留物を塩化メチレン2mlに溶解する。クロマト管にシリカゲル5gを充てんし、無水硫酸ナトリウム2gを積層する。n-ヘキサン-塩化メチレン(1:1)20mlでカラムを洗浄後、抽出物の塩化メチレン溶液をカラムに負荷し、フラスコを塩化メチレン2mlで洗浄しこれもカラムに負荷する。溶液がシリカゲルに浸とう後塩化メチレン40mlで溶出し、これは捨てる。更に塩化メチレン70mlで溶出し、これを100mlナスフラスコに集め、35°Cエバポレーターで溶媒を溜去する。残留物を3及び2mlエーテルを用いて10ml試験管に移し、氷冷する。1N塩酸及び1N水酸化ナトリウム溶液を氷冷しておく。エーテル溶液に1N塩酸1mlを加え、栓をして激しく振とう後、氷冷して2~5分静置し分離した水層をパスツールピペット

で分取し、氷水1mlに加える。この抽出操作をもう一度繰り返す。氷冷しながら酸抽出液に5N水酸化ナトリウム溶液を滴下し、pH10以上のアルカリ性とする。エーテル2mlで3回抽出し、エーテル抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、窒素気流下0.3mlに濃縮する。この溶液をECD-GLC又はGC-MS SIMの試料溶液とする。直ちに測定しない場合には冷蔵庫に保存する。

2.4 メチル誘導体標準溶液の調製

スルファモノメトキシシン標準溶液10ppmを1ml分取し、50mlナスフラスコに入れアセトニトリル5mlを加える。ジアゾメタンのエーテル溶液5mlを加え、室温で1時間完全に遮光して反応させる。2.3節と同様に過剰のジアゾメタンを溜去し、更に溶媒を溜去する。残留物をエーテルに溶かして10ml容とし、1ppmメチル体標準溶液とする。スルファモノメトキシシン5及び1ppm溶液を同様に処理し0.5ppm及び0.1ppm溶液を作製する。

2.5 ECD-GLC測定

メチル誘導体の標準溶液並びに試料溶液を表1の条件に設定したECD-GLCに注入し、ピークの保持時間から定性、ピーク高により定量を行う。

表1 ECD-GLCの条件

カラム	DB-17 (0.53mm×15m)
カラム温度	250°C
インジェクター温度	260°C
検出器(ECD)温度	270°C
キャリアー(窒素)流量	4.5 ml/min
メイクアップガス(窒素)流量	37.5 ml/min
検出器感度	10 ² - 8 ダイレクト
試料注入方式	インジェクション

2.6 GC-MS SIM測定

表2の条件により標準液並びに試料溶液をGC-MSに注入し、保持時間から定性、ピーク面積から定量を行う。

表2 GC-MS, SIMの条件

カラム	DB-5 (0.53mm×15m)
カラム温度	270°C, 4分, 270→290°C, 10 ² min 290°C, 2分
キャリアー(He)	15 psi
カラムヘッド圧	
試料注入部温度	270°C
試料注入方式	スプリットレスインジェクション
ジェットセパレーター温度	270°C
EIイオン化電圧	70eV
フィラメント電流	30µA
イオンマルチプライヤー	300
SIM検出イオン	230, 229

2.7 大量試料からの抽出、精製

分析用操作法 2.3 と殆んど同様であるが、試料 100 g に対応して試薬類を増量した。すなわち試料 100 g をアセトニトリル 150 ml でホモジナイズ遠心分離を 2 回行い、抽出液に食塩 20 g を加えて混合、分離した水を捨てる。硫酸ナトリウム乾燥後 5 g のシリカゲルカラムを通し、20 ml に濃縮後ジアメタン/エーテル溶液 50 ml を加えてメチル化する。2.3 と同様にして過剰のジアゾメタン、続いて溶媒を溜去し残留物をエーテル 20 ml 溶液として氷冷下 1 N HCl 15, 10 ml と 2 回抽出する。5 N NaOH 溶液で氷冷下アルカリ性とし、エーテル 15, 15, 10 ml で 3 回抽出し、Na₂SO₄ 乾燥後エーテルを溜去、残留物をアセトン 0.5 ml 溶液として GC-MS 測定液とする。

3. 結果と考察

前報(5)に記したように、公定法¹⁾には次の難点がみられた。

- (1) 試料からの抽出・精製に大量の試薬類を使用すること。
- (2) SMTX は両性物質であるため、酸抽出後有機溶媒への逆抽出に際し、厳密な pH コントロールを必要とすること。
- (3) ジアゾメタンによるメチル化反応の際に、副生成物が生成すること。

そこで新しい精製法を開発し、ECD-GLC 法並びに GC-MS SIM 法により定性・定量を行うこととした。

SMTX のカラムクロマトグラフィーによる回収率は吸着・分解によりかなり低下すると文献記載がみられるが²⁾、我々の実験に於いても、シリカゲルカラムの条件の違いにより大きなバラツキを示していた⁶⁾。またアルミナカラムからの溶出には酸一水を含む溶媒が必要であり濃縮等がやや困難になった。

さらに SMTX の酸抽出一有機溶媒による逆抽出を用いる精製法では、SMTX が両性物質であるため厳密な pH 調整を必要とした^{11,12)}。

一方 SMTX を GLC カラムから溶出させるためには N-1 メチル誘導体とする必要がある。N-1 メチル体は SMTX よりも安定性が高く、カラムからの溶出も容易である。酸性プロトンがメチル化されているため、酸抽出後、有機溶媒の逆抽出を行う際も、単にアルカリ性にするだけでよく、酸一有機溶媒分配による精製も操作が簡単になると思われた。以上の観点から、抽出後まずメチル化反応を行い、メチル体について精製を行うこととした。

前報(6)に記したが、ジアゾメタンのメチル化反応に際しては、N-1 メチル体の他に、もう一種の副生成物が生成することが、GLC から判明した。副生成物の収率

は反応毎に大幅に変化し、N-1 メチル体よりも大量に生成する場合もみられ、正確な定量を困難にした。

しかし本報 2.3 節に記したように、ジアゾメタンとの反応中に完全に遮光すること、並びに反応後過剰のジアゾメタンを減圧下低温で溜去することの二点に注意することにより、副生成物の量を N-1 メチル体の 2~3% 以下に抑えることができた。従って N-1 メチル体を用いた定量で実用上十分な精度を得ることができるようになった。

N-1 メチル誘導体の GLC 溶出条件は、2.5 及び 2.6 節に記したとおりであるが、キャピラリーカラムの採用により、充てんカラムよりも 20°C 程度低温で溶出可能となり、条件の設定が容易になった。また ECD-GLC に用いた機種は充てんカラム専用の機種であるが、変換キットを用いて径 0.53 mm のカラム取付が可能となり、ダブルカラム取付可能となっているため、一方の流路をカラム取付に、他方をメイクアップガス用に使用した。ECD 検出器の汚染も防ぐことができ、劣化を抑えることができた。

鶏卵からのアセトニトリル抽出液に、ジアゾメタンを反応させた後、ECD-GLC 又は GC-MS SIM 測定を行った結果、妨害ピークのため、SMTX-メチルのピークの確認は困難であり、何らかの精製操作を必要とした。溶離液に塩化メチレンを用いたシリカゲル又はアルミナカラムクロマトグラフィーを行ったが全く効果がみられなかった。そこで 1 N HCl 溶液に N-メチル体を抽出し、アルカリ性にした後エーテルで逆抽出を行う方法を試みたところ、完全に妨害ピークを除去できることが分った。N-メチル体は両性ではなく、塩基性化合物となっているため、エーテル逆抽出の際も、pH の厳密なコントロールも必要なく、エーテルへの溶解度も高くなっているため、文献で多用されているサルファ剤自体の酸抽出一有機溶媒逆抽出^{13,14)}よりも操作が容易になり、回収率も良好に保つことができた。

試料抽出液中の SMTX のメチル化の収率を調べるため、銀鮭 10 g からのアセトニトリル抽出液 40 ml に SMTX 10 µg 加えた溶液を調整し、これに次のような処理を行ったものについてジアゾメタンのエーテル溶液を加え、GC-MS SIM 法によりメチル体の収率を算出した。その結果、抽出液そのままにジアゾメタンを反応させた場合には 40%、抽出液を 5 ml に濃縮後反応させた場合には 70%、抽出液をセップバックシリカ又はセップバックフロリジルを通した後 5 ml に濃縮、反応させた場合には 90~100% の収率となった。従ってメチル化反応に於て高収率を得るためには、第 3 番目の処理を行うのが有効であることが分り、これを精製法に組込むこととした。なおカートリッジカラムを素早く通す処理であるため、先に記したような、SMTX のカラムクロマトグラフィー中の分解・吸着による回収率の低下

やバラツキはみられず、安定に定量的回収率を得ることができた。

昭和63年度の鶏卵検体9件について上記の方法により抽出精製を行い、ECD-GLC測定を行った結果、妨害ピークはほぼ除去されたものの、SMTX-メチル体の保持時間の直前にベースラインのドリップ（負のピーク）が現れ、これが確実な結論を下すことを困難にする場合がみられた。図1は標準品0.4 ng注入時のECD-ガス chromatogramである。図2(a)は試料No.7のECD

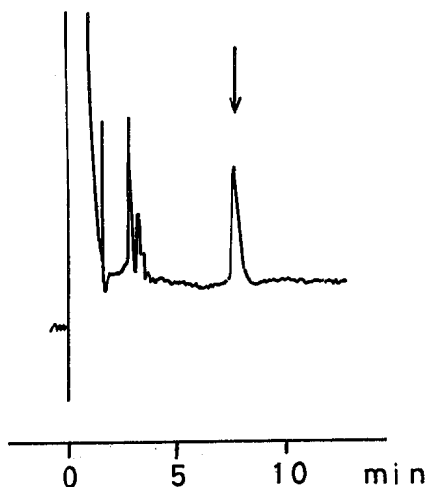


図1 ECDガス chromatogram
矢印：スルファモノメトキシ-メチル
(0.4 ng)

ガス chromatogramであるが、SMTX-Meのピークはみられず（図2，矢印），NDであることは明らかである。しかし図2(b)の試料No.4では、必ずしも明確ではない。図2(c)の試料No.9では明らかにSMTX-Meと思

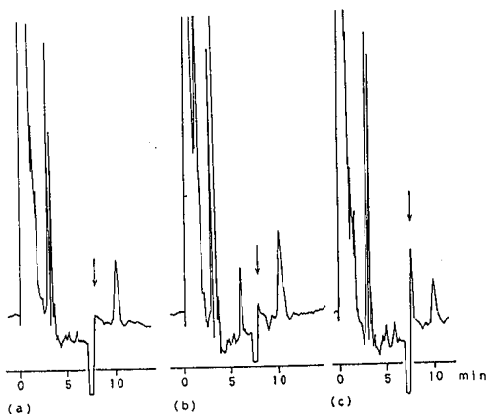


図2 ECDガス chromatogram

矢印：スルファモノメトキシ-メチルの保持時間
(a) 鶏卵 No.7
(b) 鶏卵 No.4
(c) 鶏卵 No.9

われるピークを検出することができる。全9検体でみると、5検体は明確にNDであったが、3検体については結論を下すのが困難であり、1検体は明らかにSMTX-Meを検出という結果となった。このSMTX-Me検出のNo.9試料について、SMTX残留量を算出したところ、0.010ppmという結果が得られた。

次にGC-MS SIM測定を検出イオンm/z 230, 229 (M^+-SO_2 , M^+-HSO_2 , m/z 230がベースイオン)を用いて行ったところ、全く妨害ピークがみられず、明確にSMTX-Meのピークを判定することができた。図3(a)は標準SMTX-メチル2 ng注入時のSIM chromatogramであり、(b)はNDの試料No.3, (c)はECDにおいてもSMTX-Meを検出した試料No.9の chromatogramである。面積法により残留濃度を算出した結果、

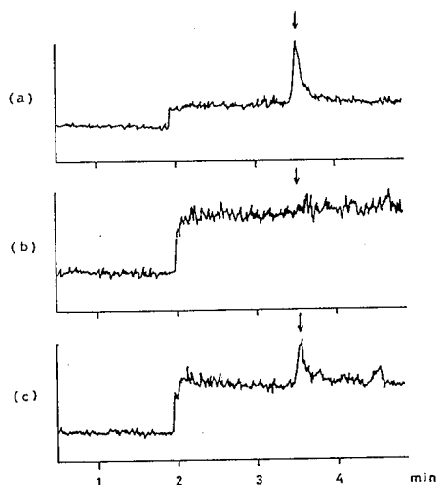


図3 SIM chromatogram

検出イオンm/z : 230

- (a) スルファモノメトキシ-メチル (2 ng)
(b) 鶏卵 No.3 ND
(c) 鶏卵 No.9 0.011ppm (試料濃度)

0.011ppmとなり、ECD-GLCの結果と非常に良い一致を示した。またECD-GLC法では判然とした結果の得られなかった3検体については、公定法の定量下限0.01ppm以下であることは明らかであり、NDとなった。このようにECD-GLCでは結果の判定が明確にできない場合にも、GC-MS SIM法ではSIM検出の選択特異性の高いことから、明確な結果を得ることができる場合が多いと思われ、その有効性が示された。全試料のスクリーニングからGC-MS SIM測定を行うのが効率的であると思われる。

SMTX以外に日本で使用されている5種のサルファ剤についても、メチル誘導体を作製し、一斉分析を目的にGLC条件を検討した。その結果この6種のサルファ剤全てに、ジアゾメタンとの反応に於て、N1-メチル

体以外にもう一種の副生成物が生成することが分った。これらは同一の反応様式で生成していると考えられるが構造等の詳細は検討中である。副生成物の生成は、この報告に記した条件でメチル化を行えば抑えられることが分った。またスルファメタジンのN1-メチル体は、SMTXのN1-メチル体と極く近接した保持時間を有しDB-5及びDB-17の15mカラムでは殆んど分離しないことが分った。従ってECD-GLCでは両者の識別は困難であり、GC-MS SIMの検出イオンによる選択性により識別する必要がある。スルファメタジン-メチルのマススペクトルに於けるベースピークは m/z 228 ($M^+-SO_2^+$)であり、SMTX-Meのベースピークは m/z 230 ($M^+-SO_2^+$)である。 m/z 230と m/z 228のどちらかにピークが観測されるかにより、保持時間は極く近接していても両者を判定できる。試料No.9の場合には、 m/z 230のSIMクロマトグラムにピークがみられ(図3) m/z 228によるクロマトグラムには相当する保持時間にピークは観測されず(図4)、スルファモ

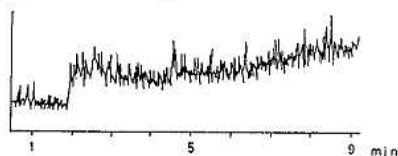


図4 SIMクロマトグラム
検出イオン m/z : 228
鶏卵No.9

ノメトキシンを決定することができた。なお6種のサルファ剤のGC-MS SIMによる一斉残留分析法については更に検討を加え、日本食品衛生学会に於いて発表した。¹⁵⁾

試料No.9のスルファモノメトキシンのについては、更に確認のため、100gの試料からの抽出・精製を行い、フルマススペクトルの測定を試みたが、濃度が不足して困難であった。図5(a)はこの抽出液のトータルイオンクロマトグラムであるが、SMTX-Meの保持時間4.9分には明確なピークはみられず、(SIMの条件よりカラ

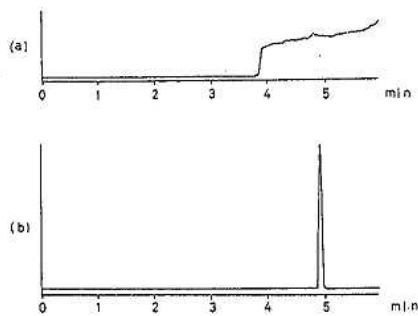


図5 GC-MSクロマトグラム
鶏卵 No.9
(a) トータルイオンクロマトグラム
(b) m/z 230によるマスククロマトグラム

ム温度下げている)、この位置でのマススペクトルもバックグラウンドイオンが強く、SMTX-Meに由来するフラグメントイオンの確認は困難であった。しかし、このトータルイオンクロマトグラムから、 m/z 230のイオンのみによるクロマトグラム(マスククロマトグラム)を抽かせると、図5(b)のように4.9分に明確にピークを確認することができた。またSIM測定を行うと m/z 230, 229にピークを確認し(図6)前に得られた結果を確実にした。

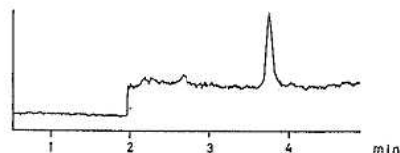


図6 SIMクロマトグラム
検出イオン m/z : 230
鶏卵 No.9

GC-MS SIMによる添加回収実験の結果は表3に記した。添加濃度1ppmでは良好な回収率を示し、0.2ppm添加の低濃度では回収率、CV共に低下したが実用上充分であると思われる。定量下限は試料中0.01ppmであった。

比較的簡易な精製法によりGC-MS SIM法の定性・定量を用いるこの方法は、日常分析の方法として充分実用になると考えられる。

表3 添加回収実験、鶏卵

添加濃度 (ppm)	1	0.2
回収率 (%)	93.7	57.2
	93.4	67.4
	94.7	52.6
平均回収率 (%)	93.9	59.1
CV (%)	0.73	12.8

参考文献

- 厚生省環境衛生局乳肉衛生課、畜産物中の残留物質検査法 第2集の3, P1 (昭和54年8月)
- 能勢憲英, 菊池好則, 山田文子, 渡辺昭宣, 食衛誌 20, 115 (1979)
- 堀義宏, 食衛誌, 24, 447 (1983), 25, 158 (1984)
- 中澤裕之, 四宮一総, 藤田昌彦, 北田善三, 山本政利, 永田知子, 込山茂久, 高島英伍, 食衛誌, 26, 7 (1985)
- 永田知子, 佐伯政信, 食衛誌, 29, 13 (1988)
- 高槻圭悟, 瀬戸輝武, 菊池格, 宮城県保健環境センター年報, 昭和62年度, 6, 61, (1988)
- 動物用医薬品の使用の規制に関する省令

- (昭和55年9月30日, 農水令42)
- 8) 飼料及び飼料添加物の成分規格に関する省令
(昭和51年7月24日, 農令35)
- 9) Bachman, W.E., Struve, W.S., Organic Reactions, Vol. 1, Adams, R., Editor-in-Chief, John Wiley & Sons, New York. P50 (1957)
- 10) de Boer, T., Backer, H.J., Organic Synthesis, Collective Vol. 3, John Wiley & Sons, New York, P.250-253 (1963)
- 11) Horwitz, W., J. Assoc. Off. Anal. Chem., **64**, 104 (1981)
- 12) Banes, D., Riggleman, O.H., J. Assoc. Off. Anal. Chem., **54**, 1195
- 13) Tishler, F., Sutter, J.L., Bathish, J.N., Hagmann, H.E., J. Agric. Food Chem., **16**, 50-53 (1968)
- 14) Simpsor, R.M., Suhre, F.B., Shafer, J.W., J. Assoc. Off. Anal. Chem., **68**, 23-26 (1985)
- 15) 高槻圭悟, 菊池 格, 日本食品衛生学会第57回学術講演会講演要旨集, P 53 (1989)

1 3 まひ性貝毒の蛍光化による簡易分析

菊池 秀明 菊池 格

まひ性貝毒の簡易分析法として、活性炭による前処理と組み合わせた蛍光化法を検討した。活性炭への吸着はpH6で行ない、溶出は1%酢酸酸性20%エタノールで行った。蛍光化はアルカリ性下4%過酸化水素で室温下暗所で行ない、酢酸で酸性にした後、励起波長340 nm、蛍光波長395 nmで測定した。

蛍光強度から求めた毒量と生物検定法で求めた毒量には良い相関が得られた。

1. はじめに

近年、まひ性貝毒(PS Pと略)による二枚貝の毒化は全国的に起きていることが明らかにされており¹⁾ホタテ貝等の養殖海域では年間を通じて毒化の推移を調査し出荷の規制等の対策を取っている。

PS Pの分析法としては、マウスを用いた生物学的試験法が公定法²⁾³⁾となっており、広く用いられている。この方法は、毒力をトータルとして把握できる点で優れているが、生物試験に伴うばらつきや規定された体重のマウスの確保の問題があり、また、動物愛護の観点からもこれに代わる方法が求められている。その方法としてこれまで蛍光化法⁴⁾⁵⁾や高速液クロ法、RIA法^{6)~9)}が報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。

われわれは今回、公定法に従いが調製した試験液を用いマウスを用いず簡易にPS Pを分析することを目的に過酸化水素による蛍光化法とそのための活性炭による前処理法を検討した。

2. 方 法

2.1 試 料

PS P精製標品：1984年7月宮城県雄勝町水浜産ムラサキガイ中腸腺(226 MU/g)を既報¹²⁾の方法で精製したもので、GT X 2,3を主成分とする。

分析用試料：1988年および1989年に宮城県女川町横浦および雄勝町水浜で採取したムラサキガイ中腸腺

2.2 試薬および器具

活性炭：和光純薬製クロマトグラフ用

過酸化水素：三徳化学製特級(30%)

用時、0.1 NKMnO₄で標定を行った。

カラム：Isolab社製(生化学工業)Practi-Column(15mm od×100mmℓ)

2.3 機 器

分光蛍光光度計：島津製作所製RF-520

励起波長：340 nm(スリット5 nm)

蛍光波長：395 nm(スリット10 nm)

Gain：10

硫酸キニーネ2.0 ppm(0.1 N硫酸)の蛍光強度が50になるように調整した。

2.4 分析方法

2.4.1 試験液の調製

ムラサキガイ中腸腺10 gを用い、公定法に従いが0.1 N HClで加熱抽出し、貝毒抽出液を調製した。抽出液3 mlをコニカルビーカーにとり、水2 mlを加えて後、1 N NaOHでpHを約6に調整した。これに活性炭0.75 gを加え混和し約5分室温に放置後、カラムに移し口過した。ビーカー中の内容物を水20 mlですべてカラムに洗い込み、流出液は捨てた後、1%酢酸酸性20%エタノール溶液15 mlで溶出し、これを蛍光分析用の試験液とした。にごりがある場合は0.45 μmのメンブランフィルターで口過して用いた。

2.4.2 蛍 光 化

溶出液を水で2倍に希釈した後、その1.0 mlを2本の試験管にとり、両方に0.5 N NaOH 1.0 mlを加える。次いで一方には4% H₂O₂ 0.3 ml、他方にはブランク用として水0.3 mlを加え混和後、室温下暗所に30分放置する。これに酢酸0.2 mlを加えて後、励起340 nm、蛍光395 nmでブランクを対照にして蛍光強度(F)を測定し、次式により試料1 g当りの毒量を求めた。

$$\text{まひ性貝毒量 (MU/g)} = F \times \frac{20}{A}$$

20：希釈倍数

A：1 MU/mlの蛍光量

2.4.3 毒量の測定

ddY系雄性マウス(体重18~23 g)を用い、毒量を測定した。活性炭溶出液の毒量の測定は溶出液を減圧濃縮し乾固した後、適当量の水に溶解したものを注射液として行った。

3. 結果および考察

3.1 活性炭処理

公定法により調製した中腸腺抽出液を試験液としてH₂O₂による蛍光化を行い測定に供した場合、にごりによる消光や共存蛍光物質による妨害で支障があり、前処理が必要であった。

PS Pの精製には、活性炭やBio Gel P-2, Bio-Rex 70等が組み合わせて用いられているが、簡便さから見て活性炭が適当であると考えられた。そこで活性炭での前処理条件について検討した。

中腸腺10g
 | 0.1N HCl 10ml
 pH 3~4に調整
 | 煮沸 5分
 | 20ml 定容
 | 遠心分離
 | 上清(抽出液)
 | 抽出液 3ml
 | 水 3ml
 pH約6に調整
 | 活性炭 0.75g
 | カラムに流入
 | 水20mlで洗浄
 | 1%酢酸/20%エタノール
 溶出液 15ml

2倍希釈溶出液 1.0 ml
 | 0.5N NaOH 1.0ml
 | 4% H₂O₂ (H₂O) 0.3ml
 暗所 30分
 | 酢酸 0.2 ml
 蛍光測定
 Ex 340 nm, Em 395 nm

図1 分析方法

3.1.1 吸着時の液性

活性炭へは非解離状態の物質が吸着される。PSPのうちGTXはグアニジン骨格の正電荷と13位の炭素にスルホン酸基の負電荷を持つ両性物質であり、溶液のpHにより解離状態が異なるので、中腸腺抽出液のpHを変え、活性炭への吸着量を調べた。

図2に示すように、pHが上がるとともに吸着量が増し、pH 6~8では92%以上が吸着された。そこで吸着はPSPの安定性も考えpH 6で行うこととした。

3.1.2 活性炭の量

抽出液3mlを用いた場合に必要の活性炭の量を調べると、表1に示すように0.75g以上で92%以上の吸着が得られた。

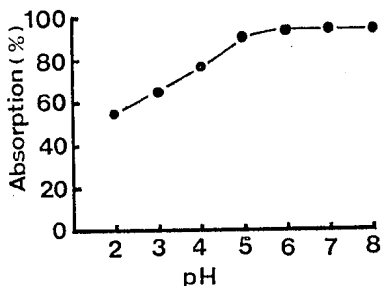


図2 PSPの活性炭吸着に及ぼすpHの影響

貝毒抽出液(11MU/ml) 3mlを種々のpHに調整後活性炭に吸着させ、水で溶出した液の毒量から、吸着した毒量を求めた。

表1 PSPの吸着に及ぼす活性炭の量の影響

活性炭の量(g)	流出液中の毒量(MU)	吸着割合(%)
0.25	2.0	87
0.5	1.5	90
0.75	< 1.3	> 92
1.0	< 1.3	> 92
1.5	< 1.3	> 92

* 中腸腺抽出液 3ml (5 MU/ml) に活性炭を加え吸着、流出液の毒量を測定。

3.1.3 活性炭からの溶出条件

活性炭からの溶出には酢酸酸性エタノール溶液がよく用いられている。斎藤¹³⁾は溶出率に及ぼすエタノール濃度(1%酢酸酸性)の影響を調べ10~80%で90%以上の溶出を得ている。そこでわれわれも同様の検討を行ったところ、表2に示すように1%酢酸酸性20%エタノール以上でほぼ90%の回収率が得られたので、他の溶出物質を少なくする上からも1%酢酸酸性20%エタノールで溶出することにした。

3.1.4 溶出液量

1%酢酸酸性20%エタノールの溶出液量とPSPの回収量を調べたところ、表3に示すように、15mlまでで毒量、蛍光生成量とも94%が回収されたので、溶出液量は15mlとした。

表2 活性炭からのPSP溶出に及ぼすエタノール濃度の影響

EtOH (%)	回収毒量 (%)
10	78.8
20	88.5
50	89.2

* 中腸腺抽出液 (4 MU/ml) 3mlを活性炭0.75gに吸着させ、水洗後、1%酢酸酸性エタノール溶液20mlで溶出。

表3 1%酢酸酸性20%エタノール溶出液量と毒量の回収率

溶出液量	回収率 (%)	
	毒量	蛍光量
10 ml	84.3	75.1
15 ml	94.3	94.3
20 ml	> 94.3	98.9

* 中腸腺抽出液 (10MU/ml) 3mlを活性炭に吸着

3.2 蛍光化の条件

PSPの精製品と、必要に応じ活性炭処理試験液を用い、 H_2O_2 による蛍光化の最適条件を検討した。

3.2.1 励起および蛍光波長

図3に示すようにGTX2, 3を含むPSP精製品では最大励起波長345nm, 最大蛍光波長は395nmであった。活性炭処理液では蛍光波長のピークは、水を対照にすると400nmにあったが、ブランク液を対照にすると395nmであった。測定時、試料に励起光が当たると蛍光が除々に減少していく傾向が見られたので、励起側のスリットは5nmとした。

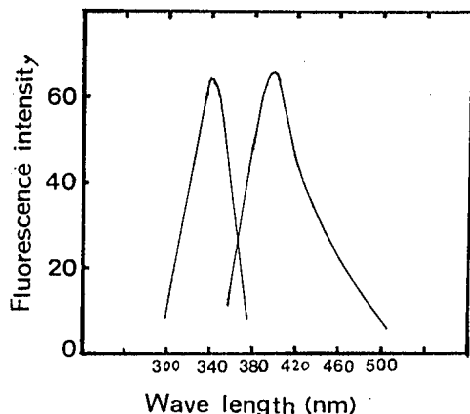


図3 PSPの蛍光生成物の励起・蛍光スペクトル

3.2.2 反応時のアルカリ濃度

H_2O_2 による蛍光化反応時のNaOH濃度の影響を調べると、図4に示すように0.5Nの時蛍光強度が最大となり、更にアルカリ濃度が増すと減少した。

3.2.3 蛍光強度測定時の液性

蛍光強度は酸性で増大する。そこで添加する酢酸量を変えて蛍光強度を調べると、酢酸0.1~0.5mlでほぼ一定の値が得られた。

3.2.4 H_2O_2 の濃度

蛍光強度に及ぼす添加する H_2O_2 の濃度を調べると、図5に示すように3~4%の時最大強度が得られた。 H_2O_2 濃度が増すと蛍光強度は低下したが、これは生成した蛍光物質が分解を受けるためと考えられる。

3.2.5 蛍光化の反応時間および光の影響

H_2O_2 による反応時間の蛍光強度に及ぼす影響を調べると、図6に示すように暗所で反応させた場合は5~60分に亘りほぼ一定した強度を示したが、明所で反応させた場合は蛍光強度も弱く、時間とともに減少した。これは光により蛍光生成物が分解するためと考えられる。

3.2.6 反応温度

20~40℃ではほぼ一定した蛍光強度を示した。

3.2.7 蛍光物質の安定性

蛍光化反応後、酢酸酸性にして明所及び暗所下室温で

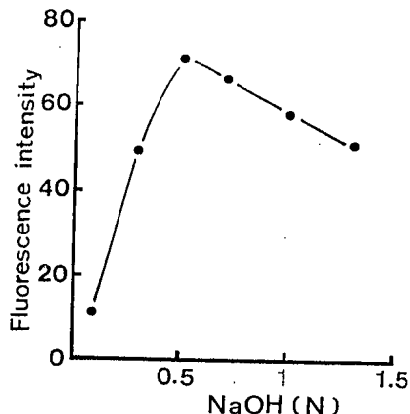


図4 蛍光強度に及ぼすNaOH濃度の影響

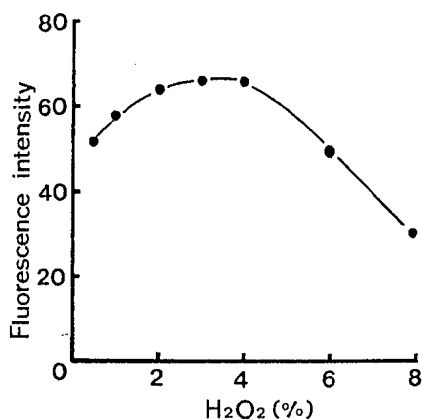


図5 蛍光強度に及ぼす H_2O_2 濃度の影響

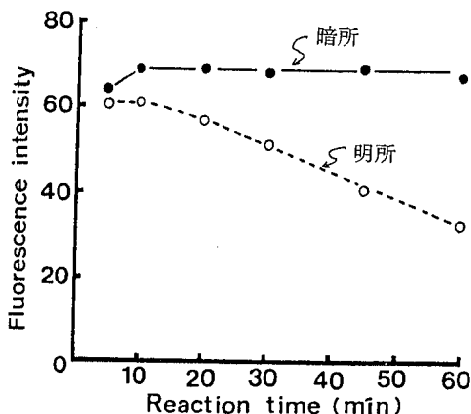


図6 蛍光強度に及ぼす反応時間の影響

放置した時の蛍光強度の経時変化を調べると図7に示すように明所では30分、暗所では60分間安定であった。

3.2.8 蛍光化に及ぼすエタノールの影響

蛍光化反応に及ぼす1%酢酸酸性20%エタノールの影響を調べたが、水溶液の場合と比較し差はなかった。

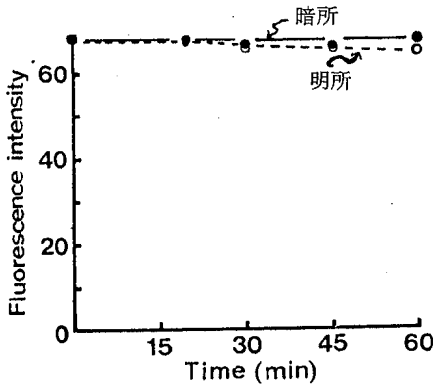


図7 蛍光生成物の安定性

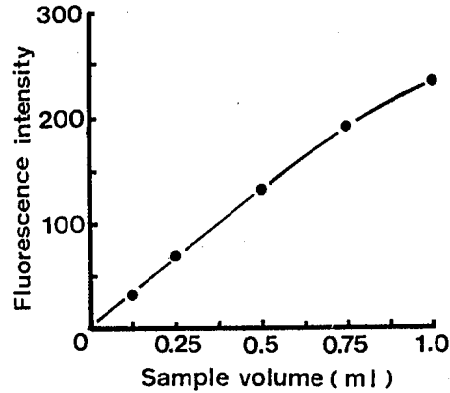


図9 蛍光強度に及ぼす活性炭処理液量の影響

3.2.9 検量線

PSP精製品を用いマウス単位と蛍光強度との相関を調べると、図8に示すように0~2 MU/mlの範囲で良好な直線関係が得られた。

3.2.10 溶出液量と蛍光強度

活性炭溶出液(2 MU/ml)を用い溶出液量と蛍光強度の相関を調べると、図9に示すように0.5 mlまでは液量と蛍光強度に比例関係が見られたが、それ以上では蛍光の増加割合がわずかに少なくなった。そこで溶出液量は0.5 mlとした。

3.2.11 蛍光化法と生物検定法の相関

宮城県においては1985年から1988年に亘りまひ性貝毒による毒化がほとんど起こらず、実試料での分析が出来なかった。そこで無毒のムラサキガイ中腸腺の0.1 N塩酸抽出液に1~10 MU/mlになるようにPSP精製品を添加し、活性炭処理を行って測定を行った。

その結果、図10に示すように添加毒量と蛍光法により求めた毒量とに良い相関が得られた。

この方法での検出限界は測定時の蛍光強度を5とした場合、試料1 g当り1.19 MUとなり、マウスを用いた場合(1.75 MU/g)より低い値であった。

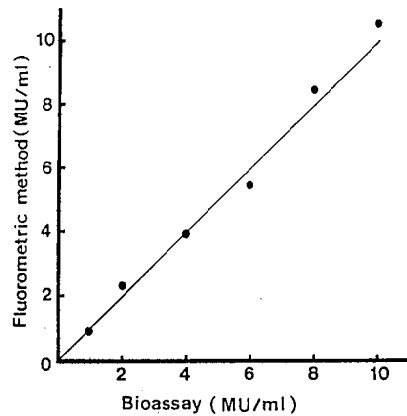


図10 生物検定法と蛍光法の相関

本法はGTX 2, 3を主成分とするPSPを標準に用いているため、その他の成分を含む試料の場合には成分による蛍光強度の違いによりそのまま適用が出来ない難点がある。

しかし、GTX 2,3を主成分とすることがわかった海域で貝毒の推移を把握する方法としては簡便で有効な方法といえる。

参 考 文 献

- 1) 大島泰克:「有毒プランクトン」P 73~P 87 (日本水産学会編, 恒星社厚生閣) 1982
- 2) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長: 環乳第30号(昭55. 7.1), 食品衛生研究 30, 765 (1980)
- 3) AOAC: OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS 18.086 - 18.092 (1984)
- 4) Bates H.A. et al.: J. Agric. Food Chem. 26, 252 (1978)
- 5) Shoptaugh et al.: J. Agric. Food Chem. 29, 198 (1981)
- 6) Buckley L.J. et al.: Anal. Biochem. 85,

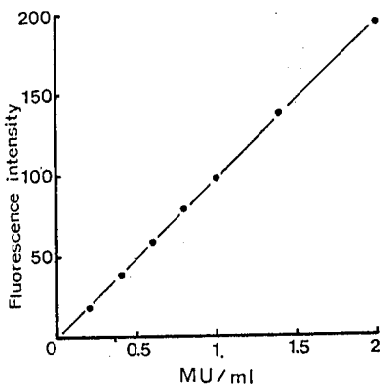


図8 検量線

- 157 (1978)
- 7) Sullivan J. J. et al : J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66** , 297 (1983) J. Food Sci. **48** , 1312 (1983), *ibid* **50**, 26 (1985)
- 8) Nagashima et al. : Nippon Suisan Gakkaishi **53** , 819 (1987)
- 9) Salter J. E et al. : J. Assoc. Off. Anal. Chem. **72** , 670 (1989)
- 10) Chu F. S and Fan T. S. L. : J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 13 (1985)
- 11) Yang G. C. et al. : Bull. Environ. Cotam. Toxicol. **39**, 264 (1987)
- 12) 菊地秀明, 牛沢 勇 : 宮城県保環七年報 **2**, 104 (1984)
- 13) 斎藤 健, 熊谷昭輔 : 岩手衛研年報 **23**, 31 (1980)

1 4 柑橘類中の防ばい剤残存量調査

—最近10年間（昭和54年～63年）の調査結果について—

勝倉 由美 菊地 秀明 佐藤真貴子
山田 わか* 菊池 格

防ばい剤-OPP, DP, TBZが我国で食品添加物として指定されてから日も浅く、その安全性についても論議がある。我々は昭和54年度より柑橘類中のOPP, DP, TBZの検査を実施している。今回63年度までの10年間の検査結果を分析し、OPP, DPが継続的に使用されている実態、TBZの使用割合、使用量とも増加傾向にあること、また近年3種の防ばい剤を同時に併用する傾向が強くなったなどの結果が得られた。

1. はじめに

我国でかんきつ類とバナナに使用が認められている防ばい剤のオルトフェニルフェノール (OPP), ジフェニル (DP), チアベンダゾール (TBZ) は、輸入かんきつ類増加の中で比較的最近食品添加物として指定されたものである。即ち、DPが昭和46年にグレープフルーツ、レモン、オレンジ類に限ってカビ止めとして使用を認められ、次いでOPPとそのナトリウム塩が昭和52年にかんきつ類のカビ止めとして、翌53年にはTBZがかんきつ類とバナナに使用が認められている。その用途からみて、実際に防ばい剤が使用されているのはほとんど輸入品と考えられる。

一方、これらの防ばい剤については発ガン性や発ガン増強作用を有するという報告¹⁾²⁾がみられ、その安全性について必ずしも確定していない。また、ポストハーベスト農薬の問題ともからんでその取り扱いが注目される。

我々は昭和54年度から毎年輸入のレモン、オレンジ、グレープフルーツについて、OPP, DP, TBZの残存量検査を実施しており、63年度で10年目になる。今回その結果をまとめ若干の知見を得たので報告する。

2. 方 法

2.1 試 料

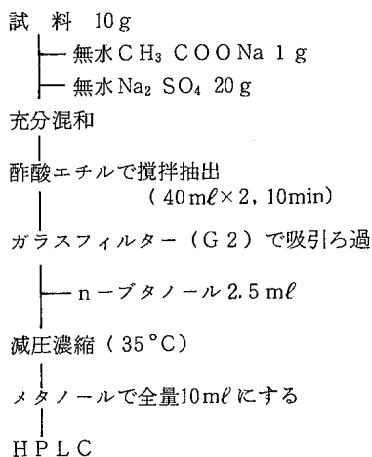
毎年1回県内各地で市販されている中から10～26検体を試買または取去して試料とした。10年間に検査した試料はレモン47検体、オレンジ42検体及びグレープフルーツ47検体、計136検体である。

136検体の生産地はアメリカ合衆国が126検体(93%)で他はイスラエル、ニュージーランド、アフリカなどであった。

また、加工品として昭和55年度に仙台市内のデパート等で購入したマーマレード6件について併わせて分析した。内訳は日本製3検体、フランス、アメリカ合衆国イギリス製が各1検体である。

2.2 分析方法

- 1) 昭和59年度～62年度：厚生省環境衛生局食品化学課編「食品中の食品添加物分析法」及びその原案に準じ、ガスクロストグラフ法で定量した。
- 2) 昭和63年度：中里らの方法³⁾に準じ、酢酸エチルで抽出した後、蛍光検出器付き液体クロマトグラフ法で定量した。分析法の概要を図1に示した。



〔HPLC条件〕

カラム：NOVA PAK C₁₈
移動相：CH₃CN・MeOH・H₂O (20:45:35)
containing 10mM Sodium 1-laurylsulfate (pH 2.4)

流速：1.5 ml/min.

検出器：蛍光検出器 Ex 280 nm, Em 325 nm

カラム温度：室温

注入量：10 μl

図1 OPP, DP, TBZのHPLCによる同時分析法

* 現宮城県塩釜保健所

3. 結果と考察

3.1 県内で市販された輸入かんきつ類中の防ばい剤の残存量

県内で市販されている輸入かんきつ類のレモン、オレンジ、グレープフルーツについて、昭和54年度から63年度までの10年間にOPP、DP、TBZの残存量を分析した結果を表1に示した。分析結果は全果（果皮・果肉とも）についてのものである。昭和55年度は果皮・果肉に分けた分析のみ実施したため含まれていない。また、検出限界以下のものは検出限界の $\frac{1}{2}$ の値を使って計算した。

また、各防ばい剤の残存量の経年推移を図2～4に示した。OPPとDPの残存量は10年間で横ばい状態だがTBZには漸増傾向がみられた。この傾向はレモン、オレンジ、グレープフルーツで同じ様にみられた。

10年間の各防ばい剤の検出率はOPP 87%、DP 98%、TBZ 80%で、昭和46年に使用を認められていたDPの検出率が高く、一方昭和53年に指定されたTBZは当初検出率が低かったが、最近ではほとんどの検体から検出されるようになっており、使用割合、使用量とも増加していることが認められた。10年間で基準残存量を超えたものはDPで57年度に1件グレープフルーツから検出されただけであった（基準値70ppmに対して99.8ppm）。

表1 かんきつ類中の防ばい剤残存量10年の推移

(単位: ppm)

防ばい剤種類	年度										計	
	区分	54	55	56	57	58	59	60	61	62		63
OPP	試料数	10	—	20	15	5	10	15	10	10	10	105
	平均	1.0	—	0.7	1.1	1.0	0.5	1.4	1.0	1.2	1.0	1.0
	範囲	nd ~2.4	—	nd ~2.8	nd ~3.5	0.5 ~2.7	nd ~2.1	nd ~4.0	nd ~2.8	0.2 ~4.9	0.1 ~2.6	nd ~4.9
DP	試料数	10	—	20	15	5	10	15	10	10	10	105
	平均	15.3	—	8.0	20.9	16.7	22.1	15.4	9.8	8.9	16.1	14.4
	範囲	nd ~57	—	1.4 ~17.0	1.2 ~99.8	1.9 ~25.2	1.4 ~49.5	2.0 ~42.0	0.3 ~27.8	0.5 ~43.1	3.0 ~29.0	nd ~99.8
TBZ	試料数	6	—	20	15	5	10	15	10	10	10	101
	平均	0.3	—	0.3	0.8	1.0	1.0	1.2	1.6	2.4	1.5	1.1
	範囲	nd	—	nd ~1.0	nd ~2.5	0.3 ~1.6	0.2 ~2.2	0.3 ~2.5	0.4 ~2.8	1.2 ~4.5	nd ~4.4	nd ~4.5

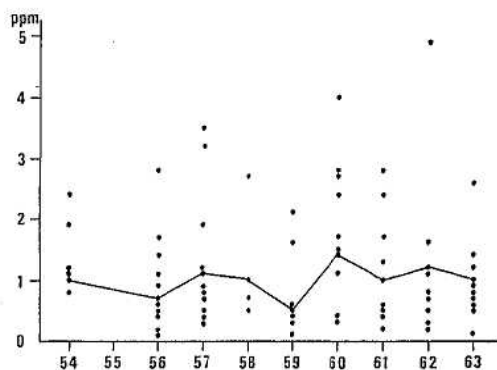


図2 柑橘類中のOPP残存量の経年推移 (折線は平均値)

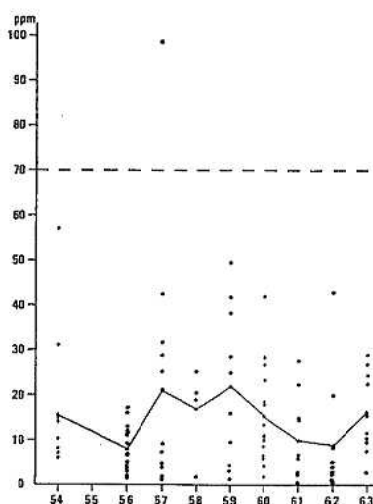


図3 柑橘類中のDP残存量の経年推移 (折線は平均値, 点線は基準値)

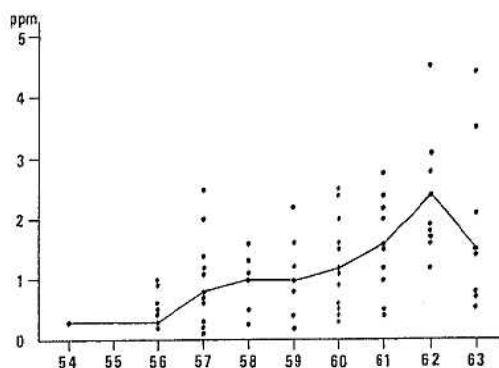


図4 柑橘類中のTBZ残存量の経年推移 (折線は平均値)

3.2 防ばい剤残存量分布

OPP, DP, TBZの残存量別の検出率を図5に示した。OPPは基準値(10ppm)の $\frac{1}{10}$ である1ppm未満のものが64%と多く、基準値の $\frac{1}{2}$ を超えたものはなかった。また、TBZも基準値(10ppm)の $\frac{1}{10}$ の1ppm未満のものが54%と半数を超え、基準値の $\frac{1}{2}$ を超えたものはなかった。一方、DPは基準値(70ppm)の $\frac{1}{10}$ の7ppm未満のものは35%と $\frac{1}{3}$ 強であり、比較的高濃度に分布するものが多くなっている。基準値の $\frac{1}{2}$ を超えたものも8%みられた。基準値を超えたものは1検体で99.8ppmであった。

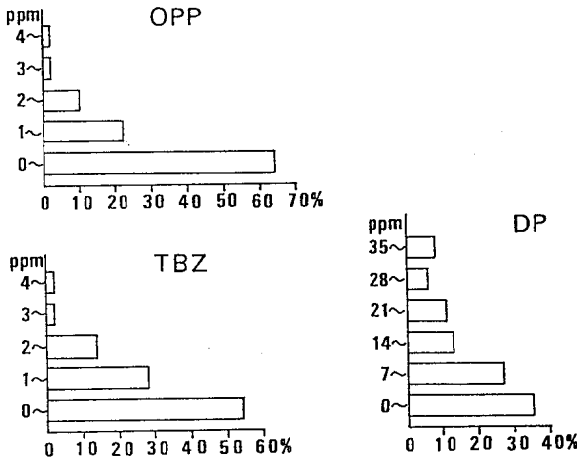


図5 柑橘類中の防ばい剤残存量別分布

3.3 かんきつ類の種類による防ばい剤残存量の傾向

かんきつ類の種類別の防ばい剤の残存量を図6に示した。OPPはレモンで残存量が多くグレープフルーツで少ないが、DPは逆にレモンで少なくなっている。またTBZの残存量には目立った差はみられなかった。

レモン (斜線) オレンジ (点線) グレープフルーツ (白)

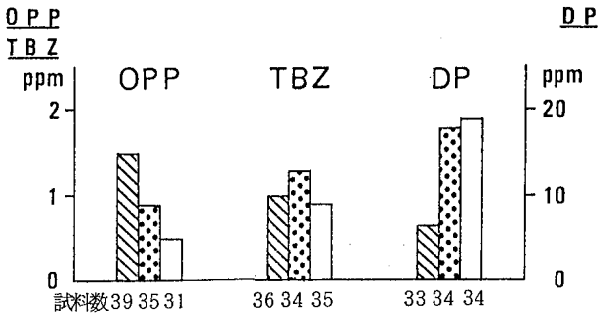


図6 柑橘類中のOPP, DP, TBZの平均残存量

3.4 OPP, DP, TBZの混合使用割合

防ばい剤の検査結果の推移をみてみると、前述したようにDPの残存量が常に多い傾向とTBZの残存量が年を追う毎に増加していること、またOPPも常に安定した残存量となっていることから予想されることではあるが、最近3種の防ばい剤が1つの果実で併用される傾向がみられる。図7は昭和56年度から63年度までの8年間のOPP, DP, TBZの混合使用状況を示したものである。なお、54年度は1検体につき1種の防ばい剤の検査のみ実施しているので図には示していないが、OPPは10検体中検出限界以下(nd)のものが3検体DPは10検体中nd2検体、TBZは6検体全部ndであった。57年度頃まで序々に3種混合使用割合が増加する傾向がみえ、58年度以降は8~10割を占めるようになっていく。各防ばい剤のカビに対する効果の違いから併用されるものと思われるが、TBZがOPP-Naによるラットの膀胱ガンの発現を増強するという報告もあり単独ではそれぞれ基準値以内であっても、併用時の問題も考慮する必要があると思われる。

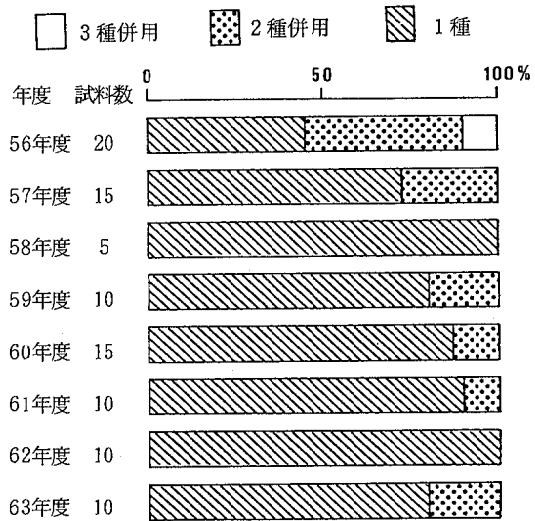


図7 柑橘類中のOPP, DP, TBZの混合使用状況

3.5 防ばい剤の果肉への浸透

果物の表面に塗布または浸透した防ばい剤が果肉中にどれ位移行するか調べるために、昭和55, 56年度の2年間試料を果皮と果肉に分けて防ばい剤の残存量を調べた。その結果を表2に示したが、果皮からは3種の防ばい剤が高い割合で、しかも高濃度に検出されたにもかかわらず、果肉からの検出例は1例もなかった。市販のかんきつ類に添加された防ばい剤が、果肉の方までは浸透していないことを示しており、同様の結果は他の報告⁴⁾でもみられる。但し、同じ報告で、高濃度添加のモデル実験をしたところTBZのみは果肉への浸透がみられた

ことが報告されている。我々が行った検査は昭和55,56年度で、まだTBZの使用量が少ない頃であり、最近その使用量が増加傾向にあることから、果肉へのTBZの浸透については今後調査してみる必要があると思われる。

表2 防ばい剤の果肉への浸透状況

年 度	検 体 数			果皮からの検出状況						果肉からの検出状況		
	レモン	オレンジ	グ ラ ブ フ ル ー ツ	OPP 検出 数	検出 範囲	DP 検出 数	検出 範囲	TBZ 検出 数	検出 範囲	OPP 検出 数	DP 検出 数	TBZ 検出 数
55	15			15	ppm 0.2	14	nd	12	nd	0	0	0
	5	5	5		11.7		ppm 103.1		8.3			
56	20			19	nd	20	7.5	13	nd	0	0	0
	6	7	7		ppm 13.4		ppm 152		ppm 6.1			

3.6 マーマレード中の防ばい剤含有量

防ばい剤は果皮中に多く残存しているため、果皮を使って作られるマーマレード中の防ばい剤含有量を昭和55年度に検査している。検査したのは日本製のマーマレード3検体、外国製のもの3検体の6検体のみであるが、このうちフランス製と日本製のマーマレード各1件からOPPがそれぞれ0.2 ppmずつ検出されている。マーマレードについてもTBZとの関係で再調査の必要があると思われる。

4. ま と め

県内で市販された輸入のレモン、オレンジ、グレープフルーツ中の防ばい剤-OPP, DP, TBZの残存量を昭和54年度から63年度の10年間にわたって調査し、次の結果を得た。

- (1) 10年間に調査した市販のかんきつ類136検体の93%はアメリカ合衆国産であった。
- (2) 検査したかんきつ類中の防ばい剤の検出率はOPP

87%, DP 98%, TBZ 80%であり、そのうち残存量の基準値を超えたのはグレープフルーツのDP 1件だけで、その値は99.8 ppmであった。

- (3) 3種の防ばい剤の残存量の経年変化をみると、OPPとDPは横ばいだが、TBZには漸増傾向がみられた。これはレモン、オレンジ、グレープフルーツとも同様の傾向がみられた。
- (4) OPP, DP, TBZの残存量別の分布では、OPP, TBZで基準値の $\frac{1}{10}$ 未満のものが半数を超え、基準値の $\frac{1}{2}$ を超えたものはなかった。一方DPは比較的高濃度に検出され、基準値の $\frac{1}{2}$ を超えたものが8%みられた。基準値を超えたものも1件あった。
- (5) かんきつ類の種類毎の残存傾向では、レモンでオレンジやグレープフルーツに比べOPPが多く、逆にDPが少ないという結果がみられた。TBZには顕著な差はみられなかった。
- (6) 最近ではOPP, DP, TBZの3種の防ばい剤を併用する例が多くなっている。
- (7) 防ばい剤の果肉部分への浸透、及び果皮の加工品であるマーマレード中の防ばい剤含有量については今後再調査したい。

参 考 文 献

- 1) Hiraga, K. and Fujii, T.: *Fd Cosmet. Toxicol.*, **19**, 303 (1981) 他
- 2) Fujii, T., Mikuriya, H., Kamiya, N. and Hiraga, K.: *Fd Chem. Toxic.*, **24**, 207 (1986) 他
- 3) 中里光男他: *衛生化学*, **34**, 401 (1988)
- 4) 井部明広他: *東京都立衛生研究所研究年報*, **33**, 198 (1982)