

j211e

ISSN 0385-1575

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

岐阜県衛生研究所報

第 3 5 号

平 成 2 年

Report of Gifu Prefectural
Institute of Public Health

No. 3 5

1 9 9 0

岐阜県衛生研究所

Gifu Prefectural Institute
of Public Health

目 次

〈調査研究〉

- ウイルス分離状況と分離方法との関連性について…………… 1
- 平成元年度における岐阜県のインフルエンザの流行について (1989/1990) …………… 9
- 神経芽細胞腫マスキリーニング小児尿由来 *Arthrobacter* の抗原分析…………… 16
- 神経芽細胞腫マスキリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究
 (第三報) 細菌汚染防止対策としての塩化ベンザルコニウム添加の効果…………… 23

〈資料〉

- 神経芽細胞腫マスキリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究
 (第四報) 細菌汚染防止対策としてのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム添加の効果…………… 31
- 神経芽細胞腫マスキリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究
 (第五報) 高速液体クロマトグラフィーによるVMA, VLA, HVA測定に対する
 塩化ベンザルコニウムの影響…………… 36
- 水蒸気蒸留法による家庭用品中のベンゼンの定量…………… 40
- 水道水中のジクロロエチレンの測定…………… 45

〈他誌掲載論文〉…………… 48

〈学会報告〉…………… 53

CONTENTS

<ORIGINAL ARTICLE>

Studies on Relationship between Virus Isolation and Method in Infantile Viral Disease.	1
The Outbreaks of Influenza-like Illness in Gifu Prefecture (1989~1990)	9
Antigenic Analysis of Creatinine-Cleaving <i>Arthrobacter</i> Isolated from Urines of Infants for Neuroblastoma Mass-Screening.	16
Bacterial Contamination of Infant Urine Samples from Filter Papers used in Neuroblastoma-Screening Test. (3) Protective Effects of Preaddition of Benzalkonium Chloride in Filter Papers or Containers for Urine on Bacterial Break-Down of Creatinine, Vanillylmandelic Acid and Homovanillic Acid.	23

<REPORT>

Bacterial Contamination of Infant Urine Samples from Filter Papers Used in Neuroblastoma-Screening Test. (4) Protective Effects of Preaddition of Ethylenediaminetetraacetic acid in Filter Papers or Containers for Urine on Bacterial Break-Down of Creatinine, Vanillylmandelic Acid and Homovanillic Acid.	31
Bacterial Contamination of Infant Urine Samples from Filter Papers Used in Neuroblastoma-Screening Test. (5) The Influence of Benzalkonium Chloride on Determination of Vanillylman- delic Acid, Vanillyllactic Acid and Homovanillic Acid by High Performance Liquid Chromatography.	36
Determination of Benzene in Household Necessities by Entrainment Disti- llation with Water.	40
Measurement of Dichloroethylenes in Drinking Water.	45
<i>Papers and Abstracts in Other Publications</i>	48
<i>Present Themes and Society Meetings</i>	53

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.ウイルス分離状況と分離方法との
関連性について

三 輪 智恵子*, 渡 辺 豊*

総 括

1985年から1989年の5年間に、4種の継代細胞と乳のみマウス(SM)を使用して、岐阜県感染症サーベイランス検査定点からの患者材料1,736検体について分離検査を実施し、598株(34.4%)のウイルスを分離した。

5年間に分離されたウイルスは、ポリオウイルス(Polio)2種、エコーウイルス(Echo)10種、コクサッキーウイルス(Cox.)A群8種、B群5種、エンテロウイルス(EV)71、アデノウイルス(Ad)4種の合計30種であった。

HeLa細胞は30種のうちの19種(63.3%)、CMK₁-S₁細胞は12種(40.0%)、RD-18S細胞は18種(60.0%)、KB細胞は10種(33.3%)のウイルス血清型が分離できた。乳のみマウスでは、Cox. A群の8種のうちの7種(87.5%)が分離できた。

HeLa細胞は、Polio-2, Echo-3, 7, 11, 21, 25, 30, Cox. B-1, 3~5に感受性が高かった。CMK₁-S₁細胞は、Polio-3, Echo-22, Cox. B-2, 3, EV-71, Ad-4, に感受性が高かった。RD-18S細胞は、Echo-7, 9, 11, 16, 18, Cox. A-9に感受性が高かった。KB細胞は、Ad-3に感受性が高かった。

はじめに

1981年7月に全国的に感染症サーベイランス事業が実施されるようになってから今日まで、著者等はウイルス性対象疾病からのウイルス分離と同定を実施し、その成績を検査情報として報告した^{1~3)}。

分離検査に、著者等は常時3~4種の異った株細胞と乳のみマウスを使用している。検査定点から送付された検査材料を処理後、種々の株細胞や乳のみマウスに接種した場合に、ウイルスの型によって細胞や乳のみマウスに対する感受性に差のあることが判明した。そこで最近5年間に分離されたウイルスについて、分離方法と分離ウイルス型との関係を検討したので、ここに報告する。

材 料 と 方 法

1. 検査材料：感染症サーベイランス事業の検査定点から送付された検体のうち、1985年221検体、1986年570検体、1987年239検体、1988年389検体、1989年317検体、合計1,736検体について検査した。検体は、咽頭ぬぐい液642検体、髄液589検体、糞便433検体、その他72検体であった。
2. 分離に用いた細胞及び乳のみマウス：細胞は、HeLa細胞(北大医学部附属病院検査部より分与された株細胞)、CMK₁-S₁細胞(国立予防衛生研究所腸内ウイルス部より分与された株細胞)、RD-18S細胞(愛知県衛生研究所ウイルス部より分与された株細胞)、KB細胞(名古屋市衛生研究所ウイルス部より分与された株細胞)を使用した。乳のみマウス(SM)

* 岐阜県衛生研究所：500 岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health：6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

は、市販の ddY 系妊娠マウスを購入し、生後24時間から48時間経過マウスを使用した。

3. 分離ウイルスの同定：コクサッキーウイルス (Cox.) A群は、Cox. A-9とCox. A-16以外の分離ウイルスは、補体結合反応で同定した。その他のウイルスは、すべて中和法で同定した。

成 績

1. 1985年におけるウイルス分離状況：表1で示したように、HeLa細胞では、218検体から37株(17.0%)が分離され、CMK₁-S₁細胞では210検体から13株(6.2%)が分離できた。RD-18S細胞では、154検体のうち23株(14.9%)、SMでは145検体から13株(9.0)

A-16は、分離株数の54%がこの細胞で分離された。

RD-18S細胞では、Echo-3, 16, Cox. A-3, A-16, B-4の5種類のウイルス型が分離された。Echo-16は、この細胞でのみ分離された。

SMでは、Cox. A-3とA-16の2種類のウイルス型が分離された。Cox. A-3は、SMでのみ分離された。Cox. A-16は、HeLa, CMK₁-S₁, RD-18S細胞でも分離されたが、SMが最高分離率であった。

2. 1986年におけるウイルス分離状況：表2に示したように、HeLa細胞では、570検体から279株(48.9%)が分離され、RD-18S細胞では529検体から248株(46.9%)が分離された。CMK₁-S₁細胞では、127検体から3株(2.4%)、KB細胞では142検体から36

表1 1985年における分離方法別ウイルス分離状況

ウイルス型	型別全分離 ウイルス株数	分離方法別分離ウイルス株数			
		HeLa細胞	CMK ₁ -S ₁ 細胞	RD-18S細胞	乳のみマウス
エコー-3	5	5(100)		2(40)	
-16	5			5(100)	
-22	1		1(100)		
Cox. A-3	2			1(50)	2(100)
A-16	13	1(8)	7(54)	5(38)	11(85)
Cox. B-4	31	31(100)		10(32)	
エンテロ-71	4		4(100)		
アデノ-4	1		1(100)		
分離率 (%)	62/221 (28.1)	37/218 (17.0)	13/210 (6.2)	23/154 (14.9)	13/145 (9.0)

Cox.: コクサッキーウイルス

%)が分離できた。

1985年に分離されたウイルス型は、エコーウイルス (Echo) 3, 16, 22, Cox. A-3, 16, B-4, エンテロウイルス (EV) 71, アデノウイルス (Ad.) 4の8血清型が分離された。

HeLa細胞では、Echo-3, Cox. A-16, Cox. B-4の3種類が分離されたが、Echo-3とCox. B-4はウイルス分離株数の100%を分離したが、Cox. A-16はウイルス分離株数の8%が分離されたに過ぎなかった。

CMK₁-S₁細胞では、Echo-22, Cox. A16, EV-71, Ad-4の4種類が分離された。Echo-22, EV-71, Ad-4はこの細胞でのみ分離された。Cox.

株(25.4%)が分離された。SMでは、158検体から7株(4.4%)が分離された。

1986年に分離できたウイルス型は、Echo-7, 18, 25, Cox. A-2, A-4, A-6, A-9, A-10, B-1, B-4, Ad-1, 2, 3の13血清型であった。HeLa細胞では、Echo-7, 25, Cox. A-9, B-1, B-4, Ad-1, 2, 3の8種類が分離された。Echo-25とCox. B-1は、HeLa細胞でのみ分離された。またEcho-7は、CMK₁-S₁, RD-18S, KB細胞でも分離できたが、HeLa細胞が最高の分離率であった。

RD-18S細胞では、Echo-7, 18, Cox. A-6, A-9, B-4の5種類のウイルス型が分離されたが、Echo-18はこの細胞でのみ分離され、Cox. A-9,

Echo-7, Cox. B-4 は高い比率で分離された。

KB 細胞では, Echo-7, Cox. B-4, Ad-1, 2, 3 の 5 種類が分離されたが, Ad-2 と Ad-3 が高い分離率であった。

SM では, Cox. A-2, 4, 6, 10 の 4 種類が分離されたが, Cox. A-2, 4, 10 は, SM のみで分離できた。

3. 1987年におけるウイルス分離状況: 表 3 に示したように, HeLa 細胞では 239 検体から 13 株 (5.4%),

表 2 1986年における分離方法別ウイルス分離状況

ウイルス型	型別全分離 ウイルス株数	分離方法別分離ウイルス株数 (%)				
		HeLa 細胞	CMK ₁ -S ₁ 細胞	RD-18S細胞	KB細胞	乳のみマウス
Echo-7	266	252(95)	3(1)	227(85)	26(10)	
-18	1			1(100)		
-25	2	2(100)				
Cox. A-2	2					2(100)
A-4	1					1(100)
A-6	4			2(50)		2(50)
A-9	3	1(33)		3(100)		
A-10	2					2(100)
Cox. B-1	4	4(100)				
B-4	18	16(89)		15(83)	1(6)	
Adeno-1	2	1(50)			1(50)	
-2	2	1(50)			2(100)	
-3	6	2(33)			6(100)	
分離率 (%)	313/570 (54.9)	279/570 (48.9)	3/127 (2.4)	248/529 (46.9)	36/142 (25.4)	7/158 (4.4)

Cox.: コクサッキーウイルス

表 3 1987年における分離方法別ウイルス分離状況

ウイルス型	型別全分離 ウイルス株数	分離方法別分離ウイルス株数 (%)				
		HeLa 細胞	CMK ₁ -S ₁ 細胞	RD-18S細胞	KB細胞	乳のみマウス
Polyo-2	1	1(100)		1(100)		
-3	3	2(67)	3(100)	1(33)	2(67)	
Echo-7	1	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	
-18	2			2(100)		
-25	1			1(100)		
Cox. A-4	2					2(100)
A-5	8					8(100)
A-10	1					1(100)
A-16	9	1(11)	6(67)			6(67)
Cox. B-1	1				1(100)	
B-2	6	1(17)	3(50)		4(67)	
B-3	6	5(83)	5(83)		4(67)	
B-4	5	2(40)	3(60)	1(20)	4(80)	
Adeno-1	1				1(100)	
分離率 (%)	47/239 (19.7)	13/239 (5.4)	21/226 (9.3)	7/202 (3.5)	17/233 (7.3)	17/71 (23.9)

CMK₁-S₁ 細胞では226検体のうち21株 (9.3%) が分離された。RD-18S 細胞では、202検体のうち7株 (3.5%), KB 細胞では233検体のうち17株 (7.3%) が分離できた。SM では、71検体のうち17株 (23.9%) が分離できた。

1987年に分離できたウイルス型は、ポリオ 2, 3, Echo-7, 18, 25, Cox. A-4, 5, 10, 16, Cox. B-1~4, Ad-1, の14種類のウイルス型が分離できた。

HeLa 細胞では、14種のうち7種が分離でき、ポリオ 2型と Echo-7 は高率に分離できた。CMK₁-S₁ 細胞では、14種のうち6種が分離でき、ポリオ 3型と Echo-7 は高率に分離できた。RD-18S 細胞では、14種のうち6種が分離でき、ポリオ 2型, Echo-7, 18, 25 が高率に分離できた。KB 細胞では、14種のうち7種が分離でき、Echo-7, Cox. B-1, Ad-1 が高率に分離できた。SM では、14種のうち4種が分離できたが、Cox. A-4, 5, 10はSMでのみ分離できた。

4. 1988におけるウイルス分離状況：表4に示したよ

1988年に分離されたウイルス型は、Polio-2, Echo-18, 21, 30, Cox. A-4, 16, B-4, EV-71, Ad-2 の9種と同定不能株であった。

HeLa 細胞では、9種のうち7種が分離でき、Polio-2, Echo-21, 30, Ad-2 で高い分離率であった。CMK₁-S₁ 細胞では、9種のうち5種と同定不能株が分離できた。RD-18S 細胞では、9種のうち6種が分離でき、Echo-18と Cox. B-4 が最高分離率であった。KB 細胞では9種のうち2種、SMでも9種のうち2種が分離されたのみであった。

5. 1989年におけるウイルス分離状況：表5に示したように、HeLa 細胞では317検体のうち21株 (6.6%), CMK₁-S₁ 細胞では317検体のうち10株 (3.2%) が分離できた。RD-18S 細胞では、317検体のうち42株 (13.2%), SM では67検体のうち12株 (17.9%) が分離できた。

1989年に分離できたウイルス型は、Echo-3, 9, 11, 25, Cox. A-4, 5, 6, 9, B-2, 4, 5, Ad-2 の12種であった。

表4 1988年における分離方法別ウイルス分離状況

ウイルス型	型別全分離 ウイルス株数	分離方法別分離ウイルス株数(%)				
		HeLa 細胞	CMK ₁ -S ₁ 細胞	RD-18S 細胞	KB 細胞	乳のみマウス
ポリオ-2	2	2(100)	2(100)		2(100)	
エコー-18	68	4(6)		68(100)		
-21	3	3(100)		2(67)		
-30	3	3(100)				
Cox. A-4	18			4(22)		15(83)
A-16	17	7(41)	8(47)	2(12)		13(76)
Cox. B-4	4	1(25)	1(25)	4(100)		
エンテロ-71	2		1(50)	1(50)		
アデノー-2	1	1(100)	1(100)		1(100)	
未同定	1		1(100)			
分離率 (%)	119/389 (30.6)	21/389 (5.4)	14/389 (3.6)	81/355 (22.8)	3/219 (1.4)	28/94 (29.8)

うに、HeLa 細胞では、389検体のうち21株 (5.4%), CMK₁-S₁ 細胞では389検体のうち14株 (3.6%) が分離できた。RD-18S 細胞では、355検体のうち81株 (22.8%) が分離できたが、KB 細胞では219検体のうち3株 (1.4%) が分離できたに過ぎなかった。一方、SM では、94検体のうち28株 (29.8%) が分離できた。

HeLa 細胞では、12種のうち8種が分離でき、Echo-25, Cox. B-4, 5, Ad-2 等は高分離率を示した。CMK₁-S₁ 細胞は、12種のうち2種しか分離できなかったが、Cox. B-2 では最高分離率であった。RD-18S 細胞では、12種のうち9種が分離でき、Echo-9, 11, 25, Cox. A-5, 6, 9, B-4 で最高分離率

表 5 1989年における分離方法別ウイルス分離状況

ウイルス型	型別全分離 ウイルス株数	分離方法別分離ウイルス株数(%)			
		HeLa 細胞	CMK ₁ -S _i 細胞	RD-18S細胞	乳のみマウス
エコー 3	4	3(75)		2(50)	
9	1			1(100)	
11	5	4(80)		5(100)	
25	2	2(100)		2(100)	
Cox. A-4	14			13(92)	10(100)
A-5	1			1(100)	
6	2			2(100)	2(100)
9	14	3(21)		14(100)	
Cox. B-2	9	4(44)	9(100)		
4	2	2(100)		2(100)	
5	2	2(100)	1(50)		
アデノ 2	1	1(100)			
分離率 (%)	57/317 (18.0)	21/317 (6.6)	10/317 (3.2)	42/317 (13.2)	12/67 (17.9)

を示した。SM では、12種のうち Cox. A 群の 2 種しか分離できなかったが、Cox. A-4, A-6 は最高分離率であった。

6. 5年間に分離されたウイルス型と分離法との関連性について

1985年から1989年の5年間に検査した患者検体からのウイルス分離率は、表6のような結果であった。1985年と1986年は、HeLa 細胞、1987年から1989年の3年間は、乳のみマウスが最も高い分離率であった。

分離ウイルス型(ロタウイルスを除く)は、ポリオウイルス(Polio) 2, 3, Echo-3, 7, 9, 11, 16, 18, 21, 22, 25, 30, Cox. A-2~6, 9, 10, 16, Cox. B-1~5, Ad 1~4, EV-71の合計30種類であった。

表7に示したように、HeLa 細胞では30種のうち19種(63.3%)、CMK₁-S_i細胞では12種(40.0%)、RD 18S細胞では18種(60.0%)、KB細胞では10種(33.3%)が分離できた。SM では、主として Cox. A 群ウ

表 6 5年間の分離方法別ウイルス分離率

年	ウイルス 分離率 (%)	分離方法別ウイルス分離率				
		HeLa 細胞	CMK ₁ -S _i 細胞	RD-18S細胞	KB細胞	乳のみマウス
1985	62/221 (28.1)	37/218 (17.0)	13/210 (6.2)	23/154 (14.9)		13/145 (9.0)
1986	313/570 (54.9)	276/570 (48.9)	3/127 (2.4)	248/529 (46.9)	36/142 (25.4)	7/158 (4.4)
1987	47/239 (19.7)	13/239 (5.4)	21/226 (9.3)	7/202 (3.5)	17/233 (7.3)	17/71 (23.9)
1988	119/389 (30.6)	21/389 (5.4)	14/389 (3.6)	81/355 (22.8)	3/219 (1.4)	28/94 (29.8)
1989	57/317 (18.0)	21/317 (6.6)	10/317 (3.2)	42/317 (13.2)		12/67 (17.9)

イルスが起因と考えられる疾病にのみ分離を試みたので、細胞等と直接比較できないが、7種(23.3%)が分離できた。

Polio-2 は、HeLa, CMK₁-S_i, RD-18S, KB細胞等

表 7 5 年間 (1985~1989) の分離方性別ウイルス分離状況

ウイルス型	型別全 分離ウイ ルス株数	分離方法別分離ウイルス株数(%)				
		HeLa	CMK ₁ -S ₁	RD-18S	K B	乳のみマウス
ポリオ—2	3	3(100)	2(67)	1(33)	2(67)	
—3	3	2(67)	3(100)	1(33)	2(67)	
エコー—3	9	8(89)		4(44)		
—7	267	253(95)	4(1)	228(90)	27(10)	
—9	1			1(100)		
—11	5	4(80)		5(100)		
—16	5			5(100)		
—18	71	4(6)		71(100)		
—21	3	3(100)		2(67)		
—22	1		1(100)			
—25	5	4(80)		3(60)		
—30	3	3(100)				
Cox. A—2	2					2(100)
—3	2			1(50)		2(100)
—4	35			17(49)		28(80)
—5	9			1(11)		8(89)
—6	6			4(67)		4(67)
—9	17	4(24)		17(100)		
—10	3					3(100)
—16	46	9(20)	21(46)	7(15)		30(65)
Cox. B—1	5	4(80)			1(20)	
—2	15	5(33)	12(80)		4(27)	
—3	6	5(83)	5(83)		4(67)	
—4	60	52(87)	4(7)	32(53)	5(8)	
—5	2	2(100)	1(50)			
エンテロー71	6		5(83)	1(17)		
アデノ—1	3	1(33)			2(67)	
—2	4	3(75)	1(25)		3(75)	
—3	6	2(33)			6(100)	
—4	1		1(100)			

Cox. : コクサッキーウイルス

で分離できたが、
HeLa細胞が最も
高率に分離できた。

Polio 3 も前述の
4 種の細胞で分離
できたが、CMK₁-
S₁ 細胞が最も高率
に分離できた。

Echo—3 は、
HeLa 細胞の方が
高率に分離できた。

Echo—7 は、4 種
の細胞で分離でき

たが、HeLa 細胞
が最も高い分離率
であった。Echo—
9 は、RD—18S 細
胞でのみ分離でき

た。Echo—11 は、
HeLa と RD—18
S 細胞で分離でき

たが、RD—18S
細胞が最高分離率
であった。Echo—

16 は、RD—18S
細胞でのみ分離で
きた。Echo—18 は
HeLa と RD—18
S 細胞で分離でき

たが、RD—18S 細胞の方が高い分離率であった。E
cho—21 は、HeLa と RD—18S 細胞で分離できた
が、HeLa 細胞の方が高い分離率であった。Echo—
22 は、CMK₁-S₁ 細胞でのみ分離できた。Echo—25
は、HeLa と RD—18S 細胞で分離できたが、HeLa
細胞の方が高い分離率であった。Echo—30 は、He
La 細胞でのみ分離できた。

Cox. A—2 と A—10 は、SM でのみ分離できた。
Cox. A—3, A—4, A—5 等は、RD—18S 細胞と
SM で分離できたが、SM の方が分離率が高かった。
Cox. A—6 は、RD—18S 細胞と SM で分離できた
が、分離率は両者同率であった。Cox. A—9 は HeLa

と RD—18S 細胞で分離できたが、RD—18S 細胞
が最も高率に分離できた。Cox. A—16 は、HeLa,
CMK₁-S₁, RD—18S 細胞及び SM で分離できた
が、SM が最も高率に分離できた。

Cox. B 群ウイルス等は、HeLa 細胞が一般に高い
分離率であったが、Cox. B—2 は CMK₁-S₁ 細胞
の方が高い分離率であった。RD—18S 細胞は、Cox.
B—4 のみが分離できたが、他の型は分離できなかつ
た。KB 細胞では、Cox. B—1~4 が分離できたが、
Cox. B—5 は分離できなかつた。

EV—71 は、CMK₁-S₁ と RD—18S 細胞で分離
できたが、CMK₁-S₁ 細胞の方が高率に分離できた。

アデノウイルスは、HeLa, CMK₁-S₁, KB 細胞で分離できたが、KB 細胞が比較的高率に分離できた。Ad-4 は、CMK₁-S₁ 細胞でのみ分離できた。

考 察

昭和56年(1981)7月より、全国的に感染症サーベイランス事業が実施されるようになり、岐阜県でもこの事業に、昭和56年より参加している。この事業では、検査定点から検査対象ウイルス性疾患の検体が、岐阜県衛生研究所の微生物第1部に搬入され、検査成績は検査定点に還元し、1か月分の成績は検査情報として地方感染症情報センターに報告している。

著者らは、対象疾病の診断名から原因ウイルスが推定可能な検体については、感受性が高いと一般に報告されている分離方法⁴⁾で分離を実施している。しかし、原因ウイルスが推定不能な疾病名からの検体については、常に3~4種の分離方法を用いてウイルス分離を実施している。原らによれば、エコー7型の分離でも、地方衛生研究所(地研)により1種類から7種類まで使用細胞の幅があり、3または4種類の細胞を用いている地研が58.2%を占めていたとの報告がある。

栄ら⁶⁾は、1975年から7年間にわたり、MK, HeLa, HEL の3種の細胞を使って分離されたエンテロとアデノウイルスに対する分離率を検討している。更に1985年⁷⁾には、RD-18S細胞のコクサッキーA群とエコーウイルスに対する感受性についても報告している。栄ら⁶⁾は、3種の細胞で、7年間に35種、1,300株を分離

したことを報告しているが、著者らは5年間に30種、598株を分離した。分離率の比較は総検体数が不明のため、比較できなかったが、表7から明らかなように分離方法を組み合わせて使用することは、分離率を向上させると同時に、種々のウイルス型を分離することに役立つことが明らかとなった。

文 献

- 1) 岐阜県衛生部：岐阜県感染症サーベイランス情報〔年報〕No.1 & No.2, 1982 & 1983.
- 2) 岐阜県衛生環境部：岐阜県感染症サーベイランス情報〔58年報〕～〔61年報〕, 1984～1986.
- 3) 岐阜県衛生環境部：岐阜県結核・感染症サーベイランス情報〔62年報〕～〔63年報〕, 1987～1988.
- 4) 予研学友会編：ウイルス実験学 各論, 48-61, 140-143, 丸善, 1982.
- 5) 原 稔, 萩原昭夫, 斉藤芳子：エコー7型分離株の細胞感受性——アンケート調査のまとめ——臨床とウイルス, 16, 341-347, 1988.
- 6) 栄 賢司, 石原佑式, 森下高行, 井上裕正：エンテロウイルスを中心としたウイルス検査の一方法, 臨床とウイルス, 12, 20-22, 1984.
- 7) 栄 賢司, 石原佑式, 森下高行, 西尾治, 鷺見順子, 井上裕正：RD細胞からのクローン株, RD-18SのコクサッキーA群とエコーウイルスに対する感受性および各種材料からのウイルス分離, 感染症学雑誌, 59, 664-669, 1985.

Studies on Relationship between Virus Isolation and Method in Infantile Viral Disease

Chieko MIWA, and Yutaka WATANABE

Gifu Prefectural Institute of Public Health

Summary

Infantile viral disease was investigated for 5 years from 1985 to 1989 in Gifu prefecture.

By methods of four kinds of cell lines and suckling mice, 598 virus strains were isolated from 1736 specimens of patients.

Thirty types of enteroviruses and adenoviruses were isolated from specimens, that is, 2 types of polioviruses 10 types of echoviruses, 8 types of coxsackieviruses group A 5 types of coxsackieviruses group B, enterovirus type 71 and 4 types of adenoviruses. Nineteen types (63.3%) of them were isolated in HeLa cells, 12 types (40.0%) in CMK cells, 18 types (60.0%) in RD-18S cells and 10 types (33.3%) in KB cells. In suckling mice, 7 types of 8 isolated types of coxsackieviruses group A were isolated.

HeLa cells were sensitive to poliovirus type 2, echoviruses type 3, 7, 11, 21, 25, 30, coxsackieviruses group B type 1, 3, 4, 5.

CMK₁-S₁ cells were sensitive to poliovirus type 3, echovirus type 22, coxsackievirus group B type 2, 3, enterovirus type 71 and adenovirus type 4. RD-18S cells were sensitive to echoviruses type 7, 9, 11, 16, 18 and coxsackievirus group A type 9. KB cells were sensitive adenovirus type 3. Suckling mice were sensitive to coxsackieviruses group A type 2, 3, 4, 5 and 10.

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.平成元年度における岐阜県のインフル
エンザの流行について (1989/1990年)

猿 渡 正 子*, 渡 辺 豊*, 三 輪 智 恵 子*

総 括

平成元年11月から平成2年3月の間に、インフルエンザの流行が見られた。届出患者数は、48,445人、小中学生の罹患率は17.9%であった。患者の咽喉ぬぐい液またはうがい液材料171からインフルエンザA香港型 (H₃N₂) ウイルス7株と、B型のウイルス16株を分離した。また、急性期と回復期のペア血清90のHI抗体価を測定したところ、A (H₃N₂) 抗原に対して45ペア血清に有意抗体上昇が見られ、B型抗原に対しては7ペア血清に有意抗体上昇が見られた。

岐阜県のA (H₃N₂) 型ウイルス分離株7株は、A/北海道/20/88類似株であった。岐阜県における2つの型のウイルスによる流行は、A (H₃N₂) 型ウイルスがB型ウイルスに先行して分離されていることから、A (H₃N₂) 型の流行が起こりその後B型の流行が入り込んだと思われる。

はじめに

平成元年11月から平成2年3月にかけて、岐阜県においてA香港型 (以降“香港”をH₃N₂と略す) とB型の2つの型のインフルエンザウイルスによる流行が認められた。流行規模は、患者数約4万人程の中規模流行であった。

複数の型のインフルエンザウイルスによる混合流行は、昭和54年度のA (H₃N₂) 型、Aソ連 (以降“ソ連”をH₁N₁と略す) 型、B型による混合流行以来のことであった。そのときの流行では、A (H₁N₁) 型ウイルスの分離のみで、他の2つの型の流行は、血清学的検査においてのみ確認され、しかも各々1箇所採取された材料においてのみであった。今回の流行では、2つの型のウイルスが分離され、しかも広範囲の地域にわたって流行の確認ができた。このことから、岐阜県内において、A (H₃N₂) 型とB型の2つの型がどのように流行したのか検討を加えたのでここに報告する。

1. 流行状況

調査方法と調査結果

流行状況の把握は、集団風邪の発生により学級閉鎖

等の措置を行った施設 (幼稚園、保育園、小学校、中学校) から、県保健予防課に届出された患者情報をもとに行った。

1) 流行期間

平成元年11月29日に報告された初発から、平成2年3月15日の最終報告までの約3ヶ月半にわたり流行した。

2) 患者発生状況

届出患者数は48,445人、内欠席者数12,426人であった。

休校は17施設、学年閉鎖および学級閉鎖の延べ数は、それぞれ121,342であった。

岐阜県の週別患者発生状況を図1に、地区別週別患者発生状況を図2に示した。

岐阜県の患者発生は、平成元年11月 (第49週)、12月 (第51週) にも見られたが、本格的な流行は平成2年1月 (第2週) 学校等の冬休み明けから始まり、1月後半 (第5週) に11,528人の患者発生、2月後半 (第8週) に9,098人と、2つの患者発生の山を示す二峰性の患者発生パターンを示した。

岐阜県を大きく岐阜、西濃、中濃、東濃、飛騨の5地区に分けてその患者発生パターンを見てみると、大

* 岐阜県衛生研究所 : 500 岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health : 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

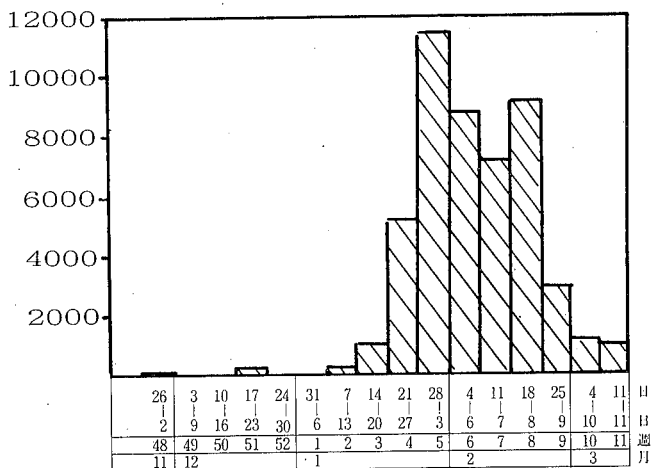


図1 週別届出患者数 (1989/1990)

中濃地区は、第一の山が2月初旬(第6週, 患者数1,292人), 第二の山(第8週, 患者数1,064人)に見られた(間隔1週間)。

岐阜地区は、1月下旬(第5週, 患者数5,200人)に1つの山, 次いでもう1つの山が2月中旬(第8週, 患者数5,708人)にみられた。(間隔2週間)。

一峰性のパターンを示す地区は、飛騨地区と西濃地区であった。

飛騨地区は、1月下旬(第5週, 患者数3,459人)に峻鋭な山を持つ流行であり、西濃地区は、2月の中旬(第7週, 患者数2,432人)山があるが、1月下旬(第4週)から1,500人前後の患者発生が3週間にわたり続いた。

3) 小中学生の罹患率

小中学生の地区別患者数及び罹患率は、表1に示したが、患者数の多かった地区は、岐阜地区で21,712人、次いで西濃地区の10,478人であった。罹患率は、岐阜県全体としては、17.9%であり、地区では、飛騨地区が29.4%と最も高く、ついで岐阜地区の25.2%であり、最も低いのは、東濃地区の8.8%であった。

表1 小中学生の罹患率 (1989/1990)

地区	小中学生 ⁵⁾ 生徒数	患者数	罹患率(%)
岐阜	86,146	21,712	25.2
西濃	62,398	10,478	16.4
中濃	49,714	5,395	10.8
東濃	45,168	3,778	8.8
飛騨	21,066	6,198	29.4
岐阜県	264,490	47,342	17.9

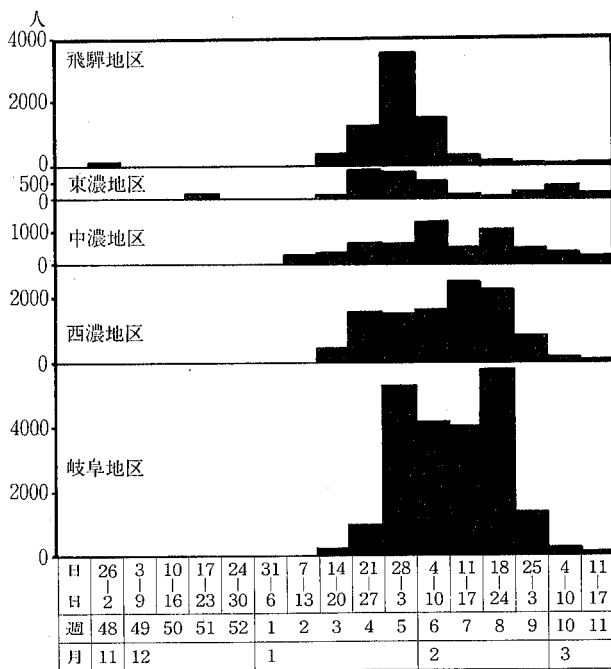


図2 地区別届出患者数 (1989/1990)

大きく2つの型に分けられた。1つは、岐阜県全体の患者発生パターンと同様二峰性を示すものと、もう一つは一峰性のものであった。

二峰性を示す地区は、東濃、中濃、岐阜の3地区であった。

東濃地区は、1月中旬(第4週, 患者数946人)に第一の山, 3月初旬(第10週, 患者数446人)に第二の山が見られた(間隔5週間)。

4) 岐阜県における流行の拡大状況

岐阜県における流行拡大状況はほぼ全域に拡がっており99市町村のうち64市町村で流行が報告された。

2. ウイルス学的検査ならびに血清学的検査概況

検査材料と検査方法

検査材料は、集団風邪により学級閉鎖等の措置を行った小中学校の風邪患者から採取されたもの(集団発生)と、岐阜市内の医療機関を訪れた風邪患者から採取さ

れたもの（流行予測事業）を用いた。

集団風邪からの検査材料は、平成元年12月21日より平成2年2月14日の間に10施設より搬入された。搬入された検査材料は、うがい液98検体と、急性期と回復期のペア血清90対であった。

流行予測事業の検査材料は、平成元年10月から平成2年3月の間に採取されたもので、検査材料は咽頭ぬぐい液73検体であった。うがい液98検体と咽頭ぬぐい液73検体の計171検体はインフルエンザウイルス分離に用い、90ペア血清はインフルエンザ血球凝集抑制(HI)抗体測定に用いた。

1) インフルエンザウイルスの分離同定

インフルエンザウイルスの分離は、²⁾ふ化鶏卵法を用い、35℃にて3代盲継代して行った。

分離ウイルスの同定は、³⁾HI法で行い、日本インフルエンザセンター配布の抗血清5種類を用いて行った。

A (H₃N₂) 型 : A/四川/2/87
A/北海道/20/89

A (H₁N₁) 型 : A/山形/120/98

B 型 : B/山形/16/88
B/愛知/5/88

2) 血清中のHI抗体測定

HI抗体測定は、⁴⁾マイクロ法を用い、抗原は、日本インフルエンザセンター配布抗原5種類と、今季岐阜県分離株3種類の計8抗原を使用した。

A (H₃N₂) 型抗原

A/四川/2/87 (ワクチン株)
A/北海道/20/88
A/岐阜/3/90 (分離株)

A/岐阜/5/90 (分離株)

A (H₁N₁) 型抗原

A/山形/120/86

B 型抗原 B/山形/16/88 (ワクチン株)

B/愛知/5/88 (ワクチン株)

B/岐阜/1/90 (分離株)

検査結果

1) インフルエンザウイルス分離

ウイルスの分離状況を表2に示した。

A (H₃N₂) 型ウイルス7株とB型ウイルス16株の計23株を分離した。分離率は、13.4%であった。

週別ウイルス分離状況を図3に示した。

ウイルス分離期間は平成元年12月末(第51週)から平成2年3月中頃(第12週)であった。A (H₃N₂) 型ウイルスは、12月(第51週)から1月(第5週)の間に分離された。B型は、A (H₃N₂) 型ウイルス分離後6週間遅れ、A (H₃N₂) 型ウイルスの分離期間と一部クロスして1月(第5週)から3月(第12週)の間に分離された。地区別のウイルス分離状況は岐阜地区では、A (H₃N₂) 型ウイルス、B型ウイルスの2つの型のウイルスが分離され、西濃、東濃、飛騨地区では、A (H₃N₂) 型ウイルスのみ、中濃地区では、B型ウイルスのみ分離された。

2) HI抗体検査結果

HI抗体検査により、回復期の抗体価が急性期の抗体価の4倍以上上昇したものを有意抗体上昇とし、それぞれの抗原に対し有意抗体上昇を示したペア血清の数を表2に示した。

表2 インフルエンザウイルス分離および血清学的検査成績 (1989/1990)

地区	ウイルス分離					HI抗体測定								
	検体数			ウイルスの型		検体数	A (H ₃ N ₂) 型				B 型			A (H ₁ N ₁) 型
	集団発生	流行予測	計	A (H ₃ N ₂)	B		A/四川/2/87	A/北海道/20/88	A/岐阜/3/90	A/岐阜/5/90	B/愛知/5/88	B/山形/16/88	B/岐阜/1/90	A/山形/120/86
岐阜	20	67	87	3	14	19	7	10	10	9	0	0	0	0
西濃	20	0	20	2	0	18	5	6	7	7	2	1	5	0
中濃	28	6	34	0	2	25	5	10	15	10	0	1	1	0
東濃	10	0	10	1	0	9	6	7	7	6	0	0	0	0
飛騨	20	0	20	1	0	19	2	2	3	3	0	0	0	0
岐阜県	98	73	171	7	16	90	25	35	42	35	2	2	6	0

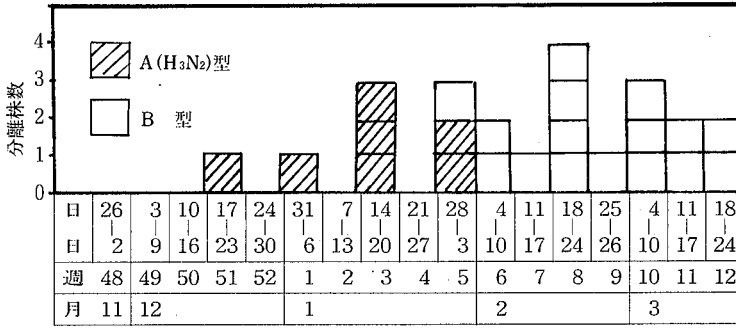


図3 インフルエンザウイルス分離状況 (1989/1990)

A (H₃N₂) 型のワクチン株 A/四川/2/87 に対して有意抗体上昇を示したのは 25 (27.8%) であった。A/北海道/20/88 には 35 (38.9%) であった。岐阜県での分離株 A/岐阜/3/90 に対しては 42 (46.7%), A/岐阜/5/90 に対しては 35 (38.9%) であった。

A (H₃N₂) 型の抗原の何れかに有意抗体上昇を示したものは 45 (50.0%) であった。

B 型のワクチン株 B/愛知/5/88, B/山形/16/88 に対してはそれぞれ 2 (2.2%) であり、分離株の B/岐阜/1/90 に対しては 6 (6.7%) であった。

B 型抗原の何れかに有意抗体上昇を示したものは 7 (7.8%) であった。

A (H₁N₁) 型の抗原 A/山形/120/86 に対する有意抗体上昇は認められなかった。

地区別に A (H₃N₂) 型と B 型に対する HI 抗体の有意上昇状況を見てみると (表 3), 岐阜地区, 東濃地区, 飛騨地区では A (H₃N₂) 型抗原のみ見られ, 西濃地区, 中濃地区では, A (H₃N₂) 型, B 型の 2 つに対し見られた。

被検急性期血清におけるワクチン株, 分離株に対する抗体価の分布を図 4 に示した。

表 3 インフルエンザ A (H₃N₂) 型と B 型の地区ごとの流行状況 (1989/1990)

地 区	ウイルス分離		血清学的検査 (HI 抗体測定)	流 行 状 況
	集団発生	流行予測		
岐 阜	A (H ₃ N ₂)	A (H ₃ N ₂), B	A (H ₃ N ₂)	A (H ₃ N ₂), B
西 濃	A (H ₃ N ₂)	B	A (H ₃ N ₂), B	A (H ₃ N ₂), B
中 濃	—	B	A (H ₃ N ₂), B	A (H ₃ N ₂), B
東 濃	A (H ₃ N ₂)	—	A (H ₃ N ₂)	A (H ₃ N ₂)
飛 騨	A (H ₃ N ₂)	—	A (H ₃ N ₂)	A (H ₃ N ₂)

ワクチン株, A/北海道/20/88, および A/岐阜/3/90 に対する抗体価は, A/岐阜/5/90 に対する抗体価に比し高く, 16 倍以下を示すものは A/岐阜/5/90 は 53 と多く, A/岐阜/3/90, A/北海道/20/88, ワクチン株は, それぞれ 26, 20, 23 と少なかった。

分離株 A/岐阜/3/90 と A

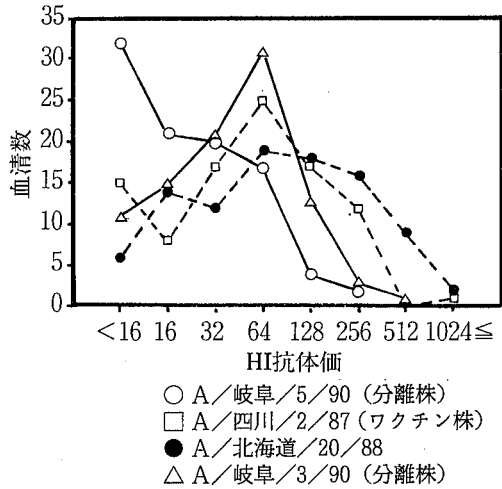


図 4 急性期の HI 抗体価分布

岐阜/3/90 と A/岐阜/5/90 の国立予防研究所における抗原分析成績を表 4 に示した。A/岐阜/3/90 と A/岐阜/5/90 は共に A/北海道/20/88 に類似性を示しているが, A/岐阜/3/90 と A/岐阜/5/90 はやや抗原性を異にしていた。ちなみに, 岐阜県の A (H₃N₂) 型分離株 7 株のうち A/岐阜/3/90 株に抗原性が非常によく似ている株は 6 株であった。

患者の 90 ペア血清が 4 種の A (H₃N₂) 型抗原のうち, どの抗原に対し有意抗体上昇を示したのかを見てみると (表 5), 半数は, 4 種類の抗原すべてに対し有意上昇を示し (21 ペア血清), 残りも殆どが A/岐阜/3/90 株に対して有意抗体上昇を示した (21)。A/岐阜/3/90 株に有意抗体上昇を示さなかった血清は, A/岐阜/5/90 と A/四川 20/87 株,

表 4 インフルエンザウイルス抗原分析成績

フレット感染抗原血清 ウイルス抗原	A/福岡/C29/85 No. 1385	A/四川/2/87 No. 1484	A/北海道/20/89 No. 1575	A/GUIZHOU/54/89 No. 1599
A/福岡/C29/85	1024	64	128	256
A/四川/2/87	64	1024	512	64
A/北海道/20/89	64	512	2048	256
A/GUIZHOU/54/89	128	128	256	256
A/岐阜/3/90	512	256	1024	256
A/岐阜/5/90	64	512	1024	128

アンダーラインは抗原と抗血清の homologous を示す

A/岐阜/5/90株の抗原に対し有意抗体上昇を示した3検体のみであった。すなわち、他の二抗原に対する抗体上昇は、A/岐阜/3/90株またはA/岐阜/5/90株の何れかの抗原と共に抗体上昇が見られていて、単独での抗体上昇は見られなかった。

表 5 ペア血清において認められた抗体価の有意上昇抗原の組みあわせ

A (H ₃ N ₂) 抗原									計	
A/岐阜/3/90	○	○	○	○	○	○	○		42	
A/岐阜/5/90	○	○	○	○				○	35	
A/北海道/20/88	○	○			○	○			35	
A/四川/2/87	○			○	○			○	25	
ペア血清数	21	6	4	1	2	6	2	1	2	45

○印は有意抗体上昇を示す

考 察

1. A (H₃N₂) 型ウイルスとB型ウイルスの岐阜県内の流行状況とその時期について

平成元年度インフルエンザの流行は、A (H₃N₂) 型ウイルスとB型ウイルスの2つの型のウイルスによる昭和54年度以来の久々の混合流行であった。ウイルスもA (H₃N₂) 型B型共に例年に無くかなり分離され(分離率13.3%) たので県内の流行状況とその時期の検討を行った。

岐阜県内でA (H₃N₂) 型ウイルスとB型ウイルスの5地区での流行状況を表4にまとめたが、ウイルス分離から見ると、2つの型のウイルスが分離されたのは、岐阜、中濃地区で、残りの地区は、A (H₃N₂) 型のウイルスのみであった。

血清学的検査からは、2つの型の抗原に対し有意抗体上昇が認められた地区は、西濃、中濃地区であった。残りの地区は、A (H₃N₂) 型抗原に対してのみであった。

ウイルス分離と血清学的検査結果を総合的に見てみると、A (H₃N₂) 型とB型の2つの型のウイルスの流行が確認された地区は、岐阜、西濃、中濃の3地区であり、残りの東濃、飛騨地区については確認されなかった。

ウイルスの週別分離状況を見てみるとA (H₃N₂) 型ウイルスの分離期間が平成元年12月(第51週)～平成2年1月(第5週)であった。それに遅れてB型ウイルスの分離が始まり、平成2年1月(第4週)～3月(第12週)となっている。すなわち、ウイルスの分離状況からは、A (H₃N₂) 型ウイルスによる流行が先行し、その流行の中にやや遅れてB型ウイルスの流行が入りこんだと思われる。このことと、患者発生パターン(図1)と併せて検討してみると、患者発生の前半の山(第5週)はA (H₃N₂) の分離時期に、後半の山(第8週)はB型分離の時期でありB型ウイルスの最も多く分離された時期に一致していた。

一方、患者発生に影響を与える因子の一つに気象があげられており、⁶⁾低温、低湿度の状況で流行は増幅さ

れ高温高湿度の状況では流行は抑制されると言われている。そこで、今年度のインフルエンザの流行時期の岐阜市と高山市（岐阜地区と飛騨地区）の気象状況を見てみた（図5）。岐阜地区においては、患者は第3

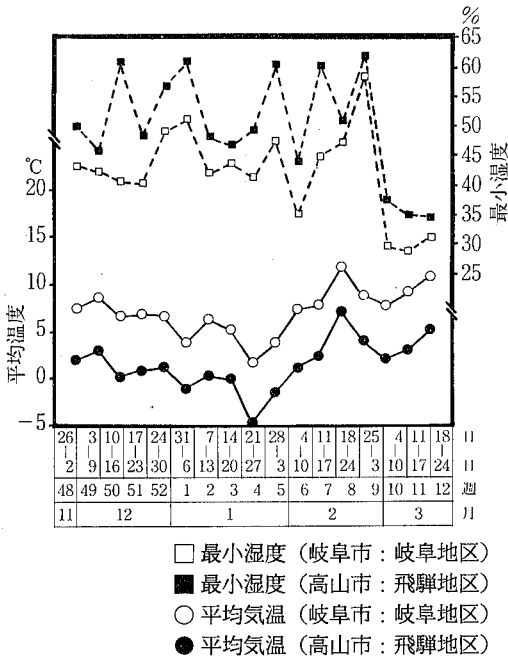


図5 岐阜県におけるインフルエンザ流行期間の平均気温と最小湿度（1989/1990）

週から第5週と増加、この時期の岐阜市の週平均気温は1.7~1.5℃、週平均最小湿度41.0~47.4%でありインフルエンザ流行に適した状況であった。続く第6・7週は、患者発生は減少してきており、週平均気温は7.2~7.9℃と前週に比し気温が少し上昇し、最小湿度は34.8~44.6%であった。患者発生の増加の見られた第8週には、気温は11.8℃と前週より3.9℃上回り最小湿度は47%であった。その後、患者は減少し、平均気温は7.8~9.2℃で有り、最小湿度も28.6~58.4%であった。このことから、特に第8週が患者発生を増加させるような低温、低湿度の気象状況であったわけでは無かった。高山市においても同様であった。従って、気象状況により患者発生が二峰性パターンとなったとは言えないだろう。

以上のことから、平成元年度のインフルエンザの流行は、A (H₃N₂) 型の流行、次いでやや遅れてB型の流行が入り込んだ混合流行であり、その時期的なず

れが、患者発生の二峰性のパターンとなって現れ、前半の山はA (H₃N₂) によるもの、後半の山はB型によるものと推測された。

地区ごとの検討では、岐阜、西濃、中濃については岐阜県全体と同様のことが推測される。東濃地区については、患者発生において明瞭な山が2つ認められ、しかも後半の3月の山はB型ウイルス分離の多い時期に一致していることから、後半は、B型の流行であったと考えられるが、証明はされていない。飛騨地区については、B型の流行の実態は不明であり、もしB型の流行があったとしてもA (H₃N₂) の流行の中に隠れてしまったことも考えられる。

2. 岐阜県で分離されたA (H₃N₂) 型ウイルス株、A/岐阜/3/90とA/岐阜/5/90について

今シーズン、分離されたA (H₃N₂) 型ウイルス株は7株すべて、A/北海道/20/88類似株であったが、そのなかでも1株（A/岐阜/5/90）が他の6株（代表株A/岐阜/3/90）とやや抗原性が異なっていた。

患者の急性期の抗体価は、A/岐阜/5/90株に対する抗体価はA/岐阜/3/90株に比し低い所に分布し、16倍以下の抗体を示す血清は53とA/岐阜/3/90株の26に比し多かった。また、有意抗体上昇も、A/岐阜/5/90株に対しては、42であり、A/岐阜/3/90株に対しては35であった。これらのことから、岐阜県で流行したウイルスは、A/岐阜/3/90株が主流であり、A/岐阜/5/90株は側流であったと推測される。

文 献

1. 猿渡正子, 川本尋義, 三輪智恵子: 今冬 (1979-1980) 岐阜県に流行したインフルエンザについて, **25**, 45-47, 1980
2. 国立予防衛生研究所学友会: ウイルス実験学各論, **37**, 丸善 (1967)
3. 国立予防衛生研究所学友会: ウイルス実験学総論, 164-167, 丸善 (1967)
4. 加地正郎: インフルエンザ研究の進歩, 92-93, 近代出版, 1976
5. 岐阜県企画部統計課: 学校基本調査結果, 統苑, 増 **8**, 16-27, 1989

6. 庄司真, 角田行, 石田名香雄: 気象と感染症流行の相関について—宮城県の感染症サーベイランス情報を中心にして—, 抗酸菌病研究所, **38**, 91—101, 1986

謝 辞

検査材料採取にあたり御協力頂いた県立岐阜病院小児科田中浩先生, ならびに患者情報の提供頂いた県予防課の方々に感謝いたします。

The Outbreaks Influenza-like Illness in Gifu Prefecture

(1989—1990)

Seiko SAWATARI, Yutaka WATANABE, Chieko MIWA

Gifu Prefectural Institute of Public Health

Summary

Outbreaks of influenza-like illness had occurred in Gifu prefecture, through November in 1989 to March in 1990. An accumulative population of the outbreaks was 48, 445 patients ranging in age distribution among pre-school, primary school, junior high school. The attack rate of the illness among students of primary school and junior high school were estimated to be 17.9%. In our influenza viral survey, 7 viruses of type A (H₃N₂) and 16 viruses of type B were isolated from throat each swab and/or nasopharyngeal swab out of 171 patients, while a significant antibody raises in paired sera were detected in 45 against type A (H₃N₂) and 7 against type B by hemagglutination inhibition tests, respectively. The 7 isolates of type A were antigenically similar to A/Hokkaido/20/88 strain. During the first influenza disease season, several isolates of influenza A (H₃N₂) viruses were detected, while influenza B viruses were isolated during the late stages of an epidemic. Therefore, it was seemed that the outbreak of influenza B had spreaded from the stages of the epidemic caused by influenza A (H₃N₂), in Gifu prefecture.

岐 衛 研 所 報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

神経芽細胞腫マスキリーニング小児尿 由来 *Arthrobacter* の抗原分析

後 藤 喜 一*, 長 野 功*, 所 光 男*,
今 井 準 三*, 河 合 信*

総 括

Cre 分解性 *Arthrobacter* の保有する抗原とその性質および血清型別を検討し、次の結果を得た。

- (1) 全菌体に易熱性抗原と耐熱性抗原が含まれ、耐熱性抗原により産生される抗体の特異性が高かった。
- (2) 易熱性抗原は耐熱性抗原抗体反応を妨害することから、表在性抗原とみなされた。
- (3) 免疫株の所有する易熱性抗原と耐熱性抗原の組合せと異なる血清型が確認された。
- (4) 生物学的性状と血清型との相関が認められなかった。

ま え が き

全国都道府県で実施されている小児神経芽細胞腫マスキリーニング (NB検査) で Dip 法¹⁾に用いられている紙尿の細菌汚染が検査結果に影影を与えることが報告されている。主要汚染菌の一つで、クレアチニンを特異的に分解する *Arthrobacter* (Cre 菌) の汚染機作を解明するため、Cre 菌の細分類の目的で血清型別⁵⁾を報告した。家兎へのクロム処理抗原免疫で得られた抗血清がホルマリン死菌 (生菌) と100°C 60分加熱死菌 (死菌) に対する挙動の異なることを認め、菌体に易熱性抗原 (LA) と耐熱性抗原 (SA) の存在が示唆された。こゝで、クロム処理抗原免疫血清と100°C 60分加熱抗原免疫血清の血清学的性状を比較検討した。また、Cre 菌の保有する抗原の種類、性状等を検討した結果、LAに比較してSAの特異性が優れていることが明らかとなった。血清型別用に考案した常用血清別セットで難型別株と判定された分離株の抗原分析を行い、血清型と生物学的性状との関連についても検討したので、その概要を併せて報告する。

材料及び方法

(1) 供試株 1987~1989年、衛生研究所に郵送されて来た小児ろ紙尿から NA—Cre 培地⁴⁾で分離し、表1に示したスクリーニングテスト⁶⁾で Cre 菌と推定した分離株500株を用いた。

表1 *Arthrobacter* のスクリーニング・テスト

試 験 項 目	
グラム染色	陽性、桿菌
Rod—Coccus cycle	有
チトクローム・オキシダーゼ	陰 性
カタラーゼ	陽 性
クレアチニン分解能	陽 性
シモンズ・クエン酸塩培地	発 育
T S I 寒天培地	—/—

選択分離培地：NA—Cre 培地

(2) 免疫原株 表2に示した30株を生物学的性状等を考慮に入れて選定した。なお、対照株として、*Arthrobacter globiformis*, *A. ureafasciens*, *A.*

* 岐阜県衛生研究所：500 岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health：6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

表 2 免疫株一覧表

菌 株 No. UR-	尿中窒素化合物分解能*			
	クレアチニン	尿 素	馬尿酸	尿 酸
7, 60, 73, 81, 83, 91, 102, 106, 117, 118, 128, 129, 131, 141, 146, 162, 166	+	-	+	+
66, 90, 140, 145, 155, 179	+	-	-	+
88, 104	+	-	-	-
135, 189	+	+	+	+
110	+	+	-	+
75, 77	+	+	-	-
<i>Arthrobacter ureafaciens</i> I AM 1658	+	+	+	+
<i>Arthrobacter aurescens</i> I AM 12340	+	+	+	-
<i>Arthrobacter globiformis</i> I F O 3062	-	+	+	-

* + : アルカリ化 - : 変化せず

なっている UR-7, 60, 66, 106, 117 の 5 株の抗血清の血清学的性状を表 3 および表 4 に示した。表 3 に示したクロム処理抗原免疫血清では生菌に対する抗体上昇が極めて良好であった。死菌に対する抗体価は低く、その上各菌株間の類属集反応も認められなかった。抗 UR-7 血清は

aurescens の 3 株を用いた。

(3) 免疫血清の調製 前報に従った。

(4) スライド凝集反応 供試株のトリプトソイ寒天培地 30°C 20 時間培養菌を用い、生菌抗原および死菌抗原を調製した。

(5) 凝集素吸収試験 常法に従った。

成 績

(1) 免疫血清の血清学的性状

免疫血清は分離株 30 株に於いて調製したが、クロム処理抗原免疫血清と加熱抗原免疫血清の両者が一対と

表 3 クロム処理抗原免疫未吸収血清

抗 原	抗 血 清				
	7	60	66	106	117
UR-7 生	1280	0*	0	0	640
死	40	0	0	0	0
UR-60 生	0	160	0	0	0
死	0	40	0	0	0
UR-66 生	10	0	160	0	0
死	0	0	40	0	0
UR-106 生	0	0	0	320	0
死	0	0	0	20	0
UR-117 生	640	0	10	0	1280
死	0	0	0	0	80

* 0 : 1 : 10 倍以下

表 4 加熱抗原免疫未吸収血清

抗 原	抗 血 清				
	7	60	66	106	117
UR-7 生	40	0*	10	0	0
死	320	0	10	0	0
UR-60 生	0	10	0	0	0
死	0	160	0	0	0
UR-66 生	0	0	20	0	0
死	0	0	320	0	0
UR-106 生	0	0	0	10	0
死	0	0	0	80	0
UR-117 生	40	0	0	0	40
死	0	0	0	0	320

* 0 : 1 : 10 倍以下

UR-117 に高い類属凝集反応がみられたが、UR-117 で吸収することにより単味抗血清が得られた。一方、死菌免疫血清では、表 4 に示したように菌株間に交差類属凝集反応が認められず、高い特異性を示した。生菌に対する凝集素は対応する菌株で注意深く吸収することにより SA のみに反応する単味抗血清が得られた。死菌免疫血清に対して生菌は低い凝集性を示したが、加熱することにより高い凝集素価が得られたことから、LA は SA 凝集を妨害するものと推定された。

(2) LA の加熱による抗原性の変化

表 5 に LA の加熱による凝集性の変化を示した。供

表 5 易熱性抗原の加熱による凝集性の変化

菌 株 No.	加 熱 温 度				
	30 °C	60 °C	80 °C	100 °C	120 °C
UR— 7	+++	+++	—	—	—
60	+++	+++	—	—	—
66	+++	++	—	—	—
106	+++	++	—	—	—
117	+++	+	—	—	—

加熱時間：60分

試した5株ともそのLAは80°C60分加熱で凝集性が失われた。UR—66, 106, 117のLAは60°C60分加熱でも凝集性がかなり低下した。これらの成績から、LAが比較的熱に不安定な抗原に属することが立証された。

(3) 常用血清型別セットによる血清型別

表1に示した30免疫原株を用い、調製した30抗血清のうち、型特異性を備え、血清型別用抗血清として使用可能な26抗血清について仮に抗原No.を付したものを表6に示した。類属凝集反応パターンを参考にし

表 6 *Arthrobacter* の抗原

免疫菌株No.	易熱性抗原No.	耐熱性抗原No.
UR— 7	LA—1	SA—1
UR— 60	LA—2	SA—2
UR— 66	LA—3	SA—3
UR— 73	LA—4	SA—4
UR— 75	LA—5	SA—5
UR— 77	LA—6	SA—6
UR— 81	LA—7	SA—7
UR— 88	LA—8	SA—8
UR—102	LA—9	SA—9
UR—104	LA—10	SA—10
UR—106	LA—11	SA—11
UR—110	LA—12	SA—12
UR—117	LA—13	SA—13
UR—128	LA—14	SA—14
UR—129	LA—15	SA—15
UR—131	LA—16	SA—16
UR—135	LA—17	SA—17
UR—140	LA—18	SA—18
UR—144	LA—19	SA—19
UR—145	LA—20	SA—20
UR—146	LA—21	SA—21
UR—155	LA—22	SA—22
UR—162	LA—23	SA—23
UR—166	LA—24	SA—24
UR—179	LA—25	SA—25
UR—189	LA—26	SA—26

表 7 *Arthrobacter* 血清型別セット

混合血清	単 味 抗 血 清				
	I	II	III	IV	V
I	1	13	17	21	24
II	2	12	16	22	25
III	3	4	19	23	26
IV	11	14	15	18	20
V	5	6	7	9	10
VI	8	12340	1658	3062	—

て組合せた常用血清型別セットを表7に示した。この型別セットで分離株500株の型別率はほぼ50%であった。常用血清型別セットで型別される分離株の多くはLAとSAの組合せが一定であるが、表8に組合せが

表 8 易熱性抗原と耐熱性抗原との組合せ

菌 株 No.	保 有 抗 原	
	易 熱 性	耐 熱 性
UR— 83	1, 17	2
250	11	20
303	2	3
363	3	24
418	2	25
406	13	1

異なっている分離株を示した。UR—83はLAが1, 17を保有し、SAは2となっており、LAが1, 17ならば、SAは1または17であるのが通常分離される分離株の抗原因子である。従って、UR—83は通常のLAとSAの組合せの異なる血清型株であるとみなされる。UR—250など5分離株がLAとSAの組合せの異なる血清型株であると判定された。

(4) 難型別株UR—83の抗原分析

UR—83の抗原分析のため、UR—83のクロム処理免疫血清、死菌免疫血清を調製した。UR—83のクロム処理免疫血清の凝集反応パターンを表9に、吸収試験成績を表10に示した。抗UR—83血清はUR—7, 117にほぼ等価の凝集素価を示し、UR—7またはUR—117の単独吸収ではUR—83に対する凝集素価が低下するものの完全に吸収しきれない。UR—7およびUR—117の両菌株で吸収すると、UR—83に対する凝集素が完全に吸収された。従って、抗UR—83血清はUR—7, 117のLAに対する凝集素を含むことが

表 9 UR-83クロム処理免疫血清凝集パターン

血清希釈	抗原菌株 No.						U R - :					
	生			菌			死			菌		
	7	60	83	117	118	135	7	60	83	117	118	135
10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-
20	+++	++	+++	+++	+	+++	-	+++	+++	-	-	-
40	+++	-	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	-	-	-
80	+++	-	+++	+++	-	+	-	+++	+++	-	-	-
160	+++	-	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-
320	+++	-	+++	+++	-	-	-	+	+	-	-	-
640	++	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
1280	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2560	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

表10 UR-83クロム処理免疫血清吸収試験

吸 収 菌	抗 原 (生 菌)					
	7	60	83	117	118	135
未吸収	320	20	640	540	10	40
UR-7	0*	0	320	320	0	0
UR-117	160	0	320	0	0	0
UR-7 + UR-117	0	0	0	0	0	0

* 0 : 1 : 10以下

表12 UR-83, 60加熱死菌免疫血清の
交差吸収試験

抗原(死菌)	抗 血 清			
	U R - 83		U R - 60	
	未吸収	UR-60 吸 収	未吸収	UR-83 吸 収
U R - 83	160	0*	160	0
U R - 60	160	0*	160	

* 0 : 1 : 10以下

明らかとなった。一方、死菌免疫血清の凝集反応パターンを表11に、交差吸収試験成績を表12に示した。LA

表11 UR-83加熱死菌免疫未吸収
血清凝集パターン

血清希釈	抗 原 (死 菌)						U R - No. : -					
	7	60	83	117	118	135	7	60	83	117	118	135
10	+	+++	+++	-	-	-						
20	-	+++	+++	-	-	-						
40	-	+++	+++	-	-	-						
80	-	+++	+++	-	-	-						
160	-	+++	+++	-	-	-						
320	-	++	++	-	-	-						
640	-	-	-	-	-	-						

で高い類属凝集を示したUR-7, 117, 135に類属凝集反応がなく, UR-60に高い凝集素価が得られた。表12に示した交差吸収試験でUR-60死菌吸収により

UR-83に対する凝集素が完全に吸収されたことから, UR-83, 60のSAは同一であることが確認された。

(5) 血清型と生物学的性状

抗原分析で同一抗原因子を保有すると確認された分離株の生物学的性状と血清型との関連を表13に示した。LA1, SA1を保有するUR-7(免疫株)とは同一抗原因子を保有する代表株UR-423はUR-7と生物学的性状が一致した。UR-83はLA1, 17であり, UR-7とは抗原因子が異なるが, 生物学的性状はUR-7に一致した。LA1を確認し, SAが一致しなかったUR-387はサルコシン, 馬尿酸分解能が欠如していた。LA11保有株UR-412はUR-106(免疫株)と抗原因子, 生物学的性状とも一致したが, UR-402はベタイン分解能が異なっていた。LAがLA11に該当したが, SAが一致しなかったUR-359はUR-106の生物学的性状に一致した。UR-383は馬尿酸分解能のみが異なっていた。以上の成績

表13 血清型と生物学的性状

菌株	保有抗原		クレアチニン	サルコシン	尿素	馬尿酸	尿酸	アラントイン	ベタイン	シモンズ培地
	易熱	耐熱								
7	1	1	+	+	-	+	+	+	-	+
423	1,17	1	+	+	-	+	+	+	-	+
83	1,17	2	+	+	-	+	+	+	-	+
387	1	不明	+	-	-	-	+	+	-	+ ^w
106	11	11	+	+	-	+	+	+	-	+
412	11	11	+	+	-	+	+	+	-	+
402	11	11	+	+	+	+	+	+	-	+
359	11	不明	+	+ ^w	-	+	+	+	-	+ ^w
383	11	不明	+	+	-	-	+	+	-	+

* アラントインを分解し、尿素集積

から、血清型と生物学的性状との間に特定な関係がみられなかった。

考 察

病原細菌領域では疫学的調査手法として病原細菌をより細分類する目的で血清型が取り扱われている。グラム陰性桿菌類である腸内細菌、腸炎ビブリオの血清型は流行の把握、感染源の追求に汎用されている。グラム陽性桿菌類ではウェルシュ菌の Hobbs 型別が⁸⁾ 実用化されているに過ぎない。非病原菌類については衛生学的見地から、分離、同定が必須とみなされる細菌類のみに詳細な検討がなされるのみで、その他の細菌は雑菌として取り扱われ、研究対象になっていない。

NB 検査で検体となる小児尿の細菌汚染が測定項目に影響を与え、特にクレアチニンは尿濃度の目安となり、パニルマンデル酸、ホモパニリン酸のクレアチニン補正値算定に⁴⁾ 常用されている。小児尿細菌汚染で Cre 分解菌の分離法を⁴⁾ 考案し、検索した結果、分離された Cre 分解菌の90%は *Arthrobacter* に⁴⁾ 帰属した。 *Arthrobacter* のうち Cre 分解能を有する菌種は一部に限られていた。そこで、Cre 分解性 *Arthrobacter* の血清型別を検討した。全菌体を用い、クロム処理抗原、加熱死菌抗原免疫で得られた抗血清の検討から、菌体保有抗原は LA と SA から構成されて

いる。LA 抗体は数株間に類属凝集反応を有し、型特異性のある単味抗血清を得るには類属凝集株で強力に吸収することが必要であった。しかし、SA は免疫原株30株間で類属凝集反応がみられず、LA に比較して SA の特異性が高い。免疫での抗体上昇は LA が優れており、SA の抗体上昇が鈍いので SA 抗血清調製には一工夫を要する。LA は熱に対して極めて不安定で、80℃60分加熱で完全に不活化された。また、生菌は加熱死菌免疫血清に凝集しないことから、LA は SA 凝集を妨害するものと推定された。腸内細菌、腸炎ビブリオに常用されている表在抗原 (K 抗原) に相当するものが LA であり、菌体抗原 (O 抗原) に相当するものが SA であろうと推定される。本報に記載した常用血清型別セットでの型別率はほぼ50%に留まった。型別不能株については新たに免疫血清を調製することにより解決されるであろう。型別された分離株数は自然界に分布する *Arthrobacter* の極一部に過ぎないであろう。LA と SA の組合せが通常の組合せと異なる難型別株の存在が明らかとなったが、腸炎ビブリオにおいても通常の OK 組合せと異なる血清型が分離されている。従って、SA、LA の両抗原を確認して血清型を判断する必要がある。血清型と生物学的性状との間に特定な関連が認められない。このことから、免疫株と同一抗原を保有していても生物学的性状の異なる場合の血清型の判定には十分に考慮する必要がある。即ち、生物学的性状が一致した分離株の細分類が前提となっている血清型別であるため数多くの分離株を検討して結論されるべきものである。

NB 検査で細菌汚染が測定項目に影響を与えることから、川合ら¹⁰⁾、水田ら¹¹⁾ は尿ろ紙の乾燥を提案し、今井^{12,13)} らは塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジン等の殺菌剤の添加で細菌汚染防止が可能であることを報告した。細菌汚染源は家庭環境に常在する Cre 菌⁵⁾ に起因することが血清型別導入で明らかとなった。非病原菌に血清型別を用いることにより、より細分化することは食品、化粧品原料等の細菌汚染防止、保存の検討手段として有用であろう。

本報告の要旨は日本防菌防黴学会第17回年次大会で発表した。

参 考 文 献

- 1) 中田利一, 石井譲治, 児玉京子, 三谷一憲, 土平一義, 山中克巳, 磯村修三, 角岡秀彦, 加藤敬純, 長縄信幸, 正岡 昭, 加藤 浩: Dip 法を利用した乳児期における神経芽細胞腫の VMA (Vanillylmandelic acid) の検査, 日本公衛誌, **30**, 227~233, 1983.
- 2) 水田満里, 海佐裕幸: 神経芽細胞腫のマス・スクリーニングについて. 日本公衛誌, **35**, 179~183, 1988.
- 3) 今井準三, 田中久子, 後藤喜一, 坂井至通, 森下有輝, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿のクレアチニン異常低下の解析. 日本公衛誌, **35**, 521~525, 1988.
- 4) 後藤喜一, 田中久子, 今井準三, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究, (第一報) クレアチニン分解菌の分離とその汚染状況について. 日本公衛誌, **36**, 645~651, 1989.
- 5) 後藤喜一, 長野 功, 所 光男, 今井準三, 岩田久子, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究, (第二報) クレアチニン分解性 *Arthrobacter* の血清型別の試み. 臨床と細菌, **17**, 83~88, 1990.
- 6) Keddie, R, M, & Jones, D. : Aerobic, saprop hitic corynne-form bacteria. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. 1838~1878, Starr, S. et al eds., Springer-Verlag, New York, 1981.
- 7) 医科学研究所学友会編: 細菌学実習提要改訂5版丸善, 東京, 1976.
- 8) 厚生省監修: 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第2版, 日本公衆衛生協会, 東京, 1978.
- 9) 所 光男: 腸炎ビブリオ抗原の血清学的研究, II 新しい組合せを有する腸炎ビブリオ, 感染症誌, **55**, 161~170, 1981.
- 10) 川合常明, 花井潤師, 以頭まゆみ, 佐藤泰昌, 清水良夫, 富所謙吉, 高杉信男, 武田武夫: 神経芽細胞腫マススクリーニング—尿ろ紙中のクレアチニンの分解による HVA 異常高値について—, 札幌市衛生年報, **14**, 53~55, 1986.
- 11) 水田満里, 瀬川和幸: 神経芽細胞腫のマススクリーニングの精度向上に関する研究, 広島県衛生業務年報, **28**, 23, 1988.
- 12) 今井準三, 岩田久子, 長島久美子, 後藤喜一, 河合 信: 神経芽マススクリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第3報) 細菌汚染防止対策としての塩化ベンザルコニウム添加の効果, 岐衛研所報, **35**, 23~30, 1990.
- 13) 今井準三, 岩田久子, 後藤喜一, 森 洋隆, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第6報) 細菌汚染防止対策としてのグルコン酸クロルヘキシジン添加の効果, 日本公衛誌, 投稿中.

Antigenic Analysis of Creatinine-Cleaving *Arthrobacter* Isolated
from Urines of Infants for Neuroblastoma Mass-Screening

Kiichi GOTO, Isao NAGANO, Mitsuo TOKORO, Junzo IMAI,
and Makoto KAWAI

Gifu Prefectural Institute of Public Health

Summary

An antigenic analysis on creatinine-cleaving bacteria isolated from urines of infants was carried out, and resulted as follows.

- 1) The whole cell had contained two kinds of antigen, heat labile and heat stable antigen. Antigenic specificity of the heat stable antigen higher than heat labile of one.
- 2) The Heat labile antigen was confirmed as surface antigen which had prevented to heat stable antigen-antibody agglutination.
- 3) Combination of heat labile antigen and stable antigen different from immune strain was discovered in 500 strains tested.
- 5) No relationship between serovar and biochemical properties was found.

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

神経芽細胞腫マスキリーニングにおける ろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第三報) 細菌汚染防止対策としての塩化ベンザルコ ニウム添加の効果

今井 準三*, 岩田 久子*, 長島 久美子*,
後藤 喜一*, 河合 信*

総 括

神経芽細胞腫マスキリーニング (NB検査) のルーチン尿からのクレアチニン (Cre) 分解菌の分離株は液体培地中で Cre だけでなくバニルマンデル酸 (VMA), ホモバニリン酸 (HVA) をも低下させることが明らかとなった。このことは NB 検査の偽陽性だけでなく偽陰性の危険性のあることを意味し, なんらかの細菌汚染防止対策が必要と考えられた。

防止対策として, 採 (集) 尿に用いるろ紙あるいは容器にあらかじめ塩化ベンザルコニウムを添加することの効果を実験室のおよび実際のフィールド試用実験により調べた。

その結果, 塩化ベンザルコニウムが 0.02% となるように添加すれば Cre 分解菌の発育を完全に抑制し, Cre, VMA, HVA の低下も防止できることが明らかとなった。

容器尿の場合は塩化ベンザルコニウム無添加でもろ紙尿ほど Cre 分解菌の作用は発現しなかったが, 添加した方がより安全と思われた。

このように塩化ベンザルコニウムは細菌汚染防止目的には十分効果を示したが, 操作時に発泡することと Cre 測定時に濁りを生ずるため工夫を要することの難点があるのでさらに有用な薬剤の検討が必要と思われた。

緒 言

神経芽細胞腫マスキリーニング (NB検査) は沢田ら¹⁾がろ紙尿を用いてのバニルマンデル酸 (VMA) の呈色反応をスクリーニング検査法として確立したことにより, 1985年より全国的に実施されるようになった。乳児の尿はろ紙にしみこませるかまたは容器に入れて郵送されてくる。ろ紙にしみこませて送られる場合クレアチニン (Cre) が異常に低下している尿がみられ, その原因が細菌汚染であることを水田ら²⁾が報告した。著者らも同様に細菌汚染によることを報告

³⁾し, これらの Cre 分解菌は主に *Arthrobacter* であり, 汚染頻度は 20% に上ることを認め, 何等かの汚染防止対策が必要であることを報告した。⁴⁾

そこで汚染防止のためにろ紙及び容器に殺菌剤を添加することを考え, 殺菌消毒剤として広く使用されている塩化ベンザルコニウムの添加効果について検討を加えた。

材料及び方法

1. 尿材料

* 岐阜県衛生研究所 : 500 岐阜市野一色 4 丁目 6 番 3 号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health : 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

プール尿：NB検査で陰性であった6～7ヶ月児のろ紙尿を適宜プールし、0.2 μ mメンブランフィルターでろ過滅菌した。

2. 供 試 株

NB検査の乳児尿よりの分離株で、UR-7, 88, 106の3株は *Arthrobacter* と同定された分離株である。⁴⁾ これらの菌株は Cre を分解して尿素を蓄積する。⁵⁾ UR-58, 72, 80は *Micrococcus varians*, UR-112は *Pseudomonas*, UR-114は緑膿菌と同定された分離株である。⁴⁾

3. Cre 分解菌の分離培養及び確認培養

⁴⁾ 既報によった。

4. 試 薬

日本薬局方塩化ベンザルコニウム液はオスバン「ダイゴ」(大五栄養化学)、Cre は和光純薬、VMA、ホモバニリン酸 (HVA) は東京化成、他は試薬特級を用いた。

5. 塩化ベンザルコニウム添加ろ紙及び容器の調製

塩化ベンザルコニウム液は蒸留水で希釈し、2%及び0.01～0.05%溶液を調製した。

0.01～0.05%溶液にろ紙(東洋ろ紙 No. 63, 1.5×5 cm)を30秒間浸漬してしみ込ませ、クリップにはさんで吊し、風乾した。

ポリエチレン製の魚型容器(容量1.5ml)に2%溶液を10 μ l 添加した。

6. 塩化ベンザルコニウム添加ろ紙使用(ろ紙法)の効果判定

実験的検討：プール尿に Cre 分解菌分離株を 10^2 個/ml接種した後塩化ベンザルコニウム添加ろ紙にしみこませ、チャック付きポリエチレン袋に密封した。これを30°C, 72時間静置後にしぼりだし、Cre, VMA, HVA の残存量を測定した。また、接種した菌の生残の有無を NA-Cre 培地で確認した。⁴⁾ 対照として無添加ろ紙を用いて同様に操作した。

フィールド試用：ルチン検査において、VMA 定性反応(Dip 法)の結果が陰性で Cre 分解菌陽性であった乳児に、薬剤添加ろ紙、無添加ろ紙各1日分(5枚)を送り、連続2日間採尿し、湿ったままのろ紙を2日分まとめて郵送してもらい(添加、無添加は保護者には連絡せず、また、どちらを1日目に使うかは任意とした)、Cre, VMA, HVA 量を測定し、生

菌数をトリプトソイ寒天、Cre 分解菌の有無を NA-Cre 培地で計測、確認した。Cre 分解菌が薬剤無添加ろ紙で陽性で添加ろ紙で陰性的場合に効果あり、どちらも陰性的場合は不明、添加ろ紙で陽性的場合に効果なしと判定した。採尿時期は1987年11月～1988年2月であった。

7. 塩化ベンザルコニウム添加容器使用(容器法)の効果判定

実験的検討：プール尿に Cre 分解菌分離株を 10^5 および 10^2 個/ml接種し、塩化ベンザルコニウム添加魚型容器に1mlづつ入れ、チャック付きポリエチレン袋に密封し、30°C, 48時間振とうした後、Cre, VMA, HVA の残存量を測定した。接種した菌の生残の有無を NA-Cre 培地で確認した。対照として無添加容器を用いて同様に操作した。

フィールド試用：ろ紙法の場合と同様に選別した乳児に添加、無添加容器を脱脂綿とともに送った。就寝中に脱脂綿にしみこませた尿を翌朝容器に移してもらう方法で連続2日間採尿、郵送してもらい、以下ろ紙の場合と同様に測定、効果判定を行った。

採尿時期は1989年11月～1990年4月であった

8. 定 量 法

1) Cre 測定

⁶⁾ Jaffe 反応を用いる方法によった。ただし、塩化ベンザルコニウム添加の検体については、トリトン X-100を添加する改良法によった。⁷⁾

2) VMA, HVA 測定

⁸⁾ 高速液体クロマトグラフ法によった。

3) pH

万能 pH 試験紙(東洋ろ紙)によった。

結 果

1. Cre, VMA, HVA 低下作用の試験

Cre 分解菌の Cre 及び VMA, HVA に対する低下作用の有無を検討する目的で液体培地にルチン検査尿から高頻度に分離された⁵⁾分離株8株を接種し、振とう培養を行い Cre, VMA, HVA の変化を調べた成績を表1に示した。

Cre はいずれの株でも低下したが、UR-7, 88, 106で著しく低下した。

HVA は UR-58, 72, 80, 88, 106 で著しく低下

表 1 供試株の Cre, VMA, HVA 低下作用
(1% TS ブイヨン, 30°C, 72hr, 振とう)

菌 株	Cre	VMA	HVA	OD ₆₅₀	菌 種
UR-7*	3.7	99	101	7.64	アースロバクタ
58*	43	93	2.6	4.44	マイクロコッカス
72**	73	51	0	8.63	マイクロコッカス
80**	64	49	0	6.08	マイクロコッカス
88	3.1	0	0	6.13	アースロバクタ
106	4.3	66	0	9.73	アースロバクタ
112	73	75	95	2.65	シュードモナス
114	89	18	95	2.41	緑 膿 菌

* ; 1% ペプトン NaCl 加 PBS, ** ; 1% ソイトン NaCl 加 PBS, 数値は残存 %, 培地中濃度 : Cre 5 mg/ml, VMA 0.5mg/ml, HVA 1 mg/ml

した。VMA は UR-88, 114 で著しく, 72, 80, 106 でほぼ半量が低下した。特に, UR-88 では Cre, VMA, HVA すべてがほぼ完全に消失した。

2. ろ紙法の効果

1) 実験的検討

ろ紙法についての実験的検討結果を表 2 に示した。

表 2 塩化ベンザルコニウムろ紙の効果 (プール尿, 30°C, 72hr)

塩ベ %	0			0.01			0.02			0.03	後 培 養 (外観*)	
	Cre	VMA	HVA	Cre	VMA	HVA	Cre	VMA	HVA	Cre	塩 べ 0 %	塩 べ 0.01 %
UR-7	99	110	113	96	105	103	98	104	108	99	+++ (濁)	- (殆ど澄明)
58	33	100	3.5	99	104	105	96	101	103	98	+++ (〃)	- (〃)
72	6.2	93	5.2	98	100	104	97	104	104	98	+++ (微濁)	- (〃)
80	6.2	105	8.7	95	110	105	97	105	106	97	+++ (〃)	- (〃)
88	7.9	27	12	94	100	103	96	105	106	98	+++ (濁)	- (〃)
106	9.7	101	3.5	95	102	100	97	100	103	94	+++ (〃)	- (〃)
112	86	107	102	95	102	100	96	107	108	96	+++ (〃)	- (〃)
114	95	105	107	97	103	98	99	103	104	98	+++ (微濁)	- (〃)

数値は残存%を示す。*ろ紙よりしぼり出した尿

プール尿の値 ; Cre 0.29mg/ml, VMA 4.0 μg/ml, HVA 5.6 μg/ml, pH 9~10

塩化ベンザルコニウム無添加ろ紙では UR-7, 112, 114 を除く 5 株で Cre が, UR-58, 72, 80, 88, 106 で HVA が, UR-88 で VMA が低下するのが認められた。一方, 塩化ベンザルコニウム添加ろ紙では 0.01% 添加でも十分効果のあることが認められた。供試株 8 株のすべてで Cre, VMA, HVA の低下は完全に抑制され, 後培養の結果でも接種菌の生残は認められなかった。

なお, UR-7 は液体培地および確認培養では Cre

を分解して尿素を集積する分離株であったが尿中での Cre 分解は極めて弱かった。

2) フィールド試用成績

実験的検討で塩化ベンザルコニウムの細菌増殖抑制効果が確認されたので, 実際のフィールドに試用した。

ろ紙法の成績を表 3 に, 容器法の成績を表 4 に示した。

ろ紙法では塩化ベンザルコニウム 0.02% 溶液をしみこませたろ紙を用いた。同一尿を塩化ベンザルコニウム添加, 無添加ろ紙にしみこませてもらえれば最も判然と差異の比較が可能であるが, 同時に 2 種のろ紙をオムツにはさみ採取することは困難であるので止むを得ず, 連続 2 日の別々の尿についての比較となった。

ろ紙法で Cre 分解菌不検出で効果ありと判定されたのは 18 例中 11 例であった。また, Cre 分解菌が検

出され, 効果なしと判定されたのは 2 例, 不明が 5 例であった。

添加ろ紙の方が 1 日目の尿が多く無添加ろ紙より採尿後の日数が経過しているものが多いにもかかわらず pH は低く, Cre 値も高い傾向が認められた。特に, HVA では無添加ろ紙で著しく低下しているものが 8 例認められたが, 添加ろ紙では 1 例のみであるという顕著な差異が認められた。生菌数でも添加ろ紙で抑制される傾向が認められた。詳細は表には示さなかった

表 3 塩化ベンザルコニウム添加ろ紙の試用成績

No.	塩化ベンザルコニウム無添加								塩化ベンザルコニウム0.02%添加								判定
	日	pH	Cre	VMA	HVA	* 1	* 2	HVA/VMA	日	pH	Cre	VMA	HVA	* 1	* 2	HVA/VMA	
1	1	7	0.077	14.9	22.4	+++	+++	1.50	2	8	0.098	13.9	23.4	NG	-	1.68	○
2	1		0.058	14.3	14.6	++	-	1.02	2	7-8	0.063	15.3	13.5	++	-	0.88	△
3	1	9	0.021	85.1	22.6	++	+	0.27	2	7-8	0.170	22.1	19.1	+++	++	0.86	×
4	1	7	0.134	12.3	11.8	++	+	0.96	2	7	0.080	10.2	10.2	+++	-	1.00	○
5	1	10	0.091	12.0	< 1	+++	++	< 0.1	2	8-9	0.100	10.2	10.2	NG	-	1.00	○
6	1	8	0.097	16.0	< 1	+++	-	< 0.1	2	7-8	0.140	15.2	18.7	++	-	1.23	△
7	1	8	0.214	15.2	< 1	++	+	< 0.1	2	8	0.168	13.6	1.4	+++	-	0.10	○
8	3	7-8	0.246	10.5	2.1	+++	++	0.20	2	7	0.239	13.2	12.6	+++	-	0.95	○
9	4	8	0.109	10.6	< 1	++	+	< 0.1	3	8	0.171	11.0	17.4	NG	-	1.58	○
10	1	8	0.160	10.5	15.7	+++	-	1.50	0	7	0.126	8.8	16.2	+	-	1.84	△
11	1	9	0.034	18.2	< 1	+++	++	< 0.1	2	7	0.034	11.0	10.8	NG	-	0.98	○
12	2	7	0.230	10.9	9.6	+++	-	0.88	1	7	0.068	11.2	13.2	+	-	1.18	△
13	1	7	0.071	14.4	22.0	+	-	1.53	2	7	0.186	8.5	16.6	NG	-	1.95	△
14	2	8	0.087	32.0	< 1	++	++	< 0.1	1	7-8	0.253	15.1	20.1	++	+	1.33	×
15	1	7	0.043	21.7	< 1	++	+	< 0.1	2	7	0.068	17.0	15.0	NG	-	0.88	○
16	1	8	0.063	7.0	14.0	+++	+	2.00	2	7	0.208	12.7	16.0	NG	-	1.26	○
17	3	9	0.095	10.6	12.4	+++	+	1.17	2	8	0.123	11.0	13.7	NG	-	1.25	○
18	2	9	0.034	18.3	10.5	+++	+	0.57	1	9	0.137	16.5	12.1	++	-	0.73	○

Cre ; mg/ml, VMA ; HVA ; μg/mg Cre, * 1 ; 発生集落数, * 2 ; Cre 分解菌, NG : 集落発生なし
 判定 : ○ ; 効果あり, × ; 効果なし, △ ; 不明, 日 ; 尿ろ紙受付日一採尿日

表 4 塩化ベンザルコニウム添加容器試用成績

No.	塩化ベンザルコニウム無添加								塩化ベンザルコニウム0.02%添加								判定
	日	pH	Cre	VMA	HVA	* 1	* 2	HVA/VMA	日	pH	Cre	VMA	HVA	* 1	* 2	HVA/VMA	
1	2	7	0.121	10.9	18.8	+++	-	1.72	1	7	0.266	9.7	16.5	NG	-	1.70	△
2	2	8	0.162	11.7	18.4	+++	-	1.57	1	7-8	0.139	11.4	18.0	NG	-	1.58	△
3	2	6	0.384	9.7	16.7	+++	-	1.72	1	7	0.300	10.1	19.2	NG	-	1.90	△
4	2	7	0.173	8.3	13.6	+++	-	1.64	1	7	0.177	10.9	18.7	NG	-	1.72	△
5	2	8-9	0.153	10.3	12.0	+++	++	1.17	1	8	0.228	11.6	14.5	NG	-	1.25	○
6	1	9	0.228	12.2	17.1	+++	+	1.40	2	8	0.236	11.6	21.4	NG	-	1.84	○
7	2	9	0.196	11.3	14.8	+++	-	1.31	1	8	0.147	9.9	17.0	NG	-	1.72	△
8	2	8	0.138	10.7	18.2	+++	-	1.70	1	7	0.082	11.5	19.0	NG	-	1.65	△
9	1	7	0.222	11.1	19.8	+++	-	1.78	0	6-7	0.448	11.4	20.0	NG	-	1.75	△
10	1	8	0.422	12.7	20.2	+++	-	1.59	2	9	0.461	13.9	21.9	NG	-	1.58	△
11	1	9	0.245	12.2	20.9	+++	-	1.71	2	8	0.222	11.7	20.7	NG	-	1.77	△
12	2	8	0.688	11.9	19.6	+++	-	1.65	1	7	0.171	11.4	16.4	NG	-	1.44	△
13	2	7	0.139	11.5	17.1	+++	-	1.49	1	6-7	0.236	14.1	21.0	NG	-	1.49	△
14	1	7	0.121	13.3	16.0	+	+	1.20	2	6	0.294	12.9	20.1	NG	-	1.56	○
15	3	8	0.292	10.8	13.6	+++	+	1.26	2	7	0.594	14.2	18.9	NG	-	1.33	○
16	2	7	0.282	10.2	26.2	+++	-	2.57	1	6-7	0.161	11.2	24.2	NG	-	2.16	△
17	2	6	0.308	8.5	18.2	+++	-	2.14	1	5	0.621	5.5	17.5	NG	-	3.18	△
18	2	6	0.479	7.6	17.0	+++	-	2.24	1	6	0.227	8.5	20.3	NG	-	2.39	△
19	1	8	0.173	9.5	22.1	+++	-	2.33	2	8	0.260	9.0	16.3	NG	-	1.81	△
20	2	9	0.490	11.9	23.4	+++	-	1.97	1	8	0.291	10.8	20.9	NG	-	1.94	△
21	3	7	0.208	10.7	26.5	+++	-	2.48	4	6-7	0.286	12.2	25.4	NG	-	2.08	△
22	3	8	0.500	14.5	23.4	+++	-	1.61	2	7-8	0.293	14.3	26.6	NG	-	1.86	△
23	2	7	0.104	11.5	15.2	+++	-	1.32	1	6	0.086	11.8	14.9	NG	-	1.26	△
24	2	7	0.239	9.1	15.8	+++	+	1.74	1	6	0.143	8.2	13.4	NG	-	1.63	○
25	1	7	0.299	10.4	14.5	+++	-	1.39	2	6	0.244	8.6	13.9	NG	-	1.62	△
26	2	7	0.152	9.2	18.6	+++	-	2.02	1	7	0.199	8.2	19.9	NG	-	2.43	△
27	3	7	0.106	6.1	11.2	+++	-	1.84	2	7	0.248	8.9	21.5	NG	-	2.42	△
28	1	7	0.307	15.1	19.0	+++	+	1.26	2	6	0.329	13.4	28.6	NG	-	2.13	○
29	1	6	0.156	5.4	12.6	+++	-	2.33	2	6	0.501	13.6	22.5	NG	-	1.65	△
30	1	7	0.167	14.0	22.4	+++	-	1.60	2	9	0.121	10.6	26.4	NG	-	2.49	△

Cre ; mg/ml, VMA ; HVA ; μg/mg Cre, * 1 ; 発生集落数 * 2 ; Cre 分解菌, NG ; 集落発生なし
 判定 : ○ ; 効果あり, × ; 効果なし, △ ; 不明, 日 ; 尿受付日一採尿日

が、0.01%溶液をしみこませたろ紙では17例中効果ありと判定されたものが6例、効果なしが6例、不明が5例で0.02%とは差が認められた。

魚型容器には容量が1.5mlであるので、通常採尿量は1mlと想定して、塩化ベンザルコニウム濃度が0.02%となるように2%溶液を10μl添加した。

Cre 分解菌が不検出で効果ありと判定されたのは30例中6例、不明が24例で効果なしは1例も認められなかった。無添加容器では30例すべてに多数の細菌が検出されたが、添加容器ではいづれにも細菌の生育は認められなかった。また、pHも添加容器の方が低い傾向が認められた。

3. フィールド試用成績のまとめ

フィールド試用成績のまとめを表5に示した。

表5 塩化ベンザルコニウム添加ろ紙、容器の試用成績

		n	Cre	VMA	HVA	HVA/VMA	*1	*2	○	×	△
ろ紙	塩べ無添加	17	0.111±0.064	18.24± 8.04	14.00±21.65	0.66±0.62	17	10			
	0.01%	17	0.141±0.068	14.54± 5.04	12.73± 9.84	0.88±0.56	16	6	6	6	5
	無添加	18	0.103±0.068	18.58±17.51	9.15± 8.23	0.68±0.64	18	13			
	0.02%	18	0.135±0.062	13.14± 3.39	14.45± 4.86	1.15±0.44	8	2	11	2	5
	61年度 HCI	39	0.181±0.100	10.90± 3.11	16.89± 3.63	1.62±0.39					
	62年度 HCI	44	0.199±0.127	12.14± 3.06	17.22± 5.51	1.43±0.44					
容器	塩べ無添加	30	0.255±0.142	10.74± 2.22	18.10± 3.93	1.73±0.39	30	6			
	0.02%	30	0.267±0.137	11.04± 2.11	19.85± 3.81	1.84±0.42	30	0	6	0	24

Cre ; mg/ml, VMA, HVA ; μg/mg Cre (平均値±標準偏差), * 1 ; 集落発生件数,

* 2 ; Cre 分解菌陽性件数 判定 : ○ ; 効果あり, × ; 効果なし, △ ; 不明, 塩べ ; 塩化ベンザルコニウム

ろ紙法の場合、塩化ベンザルコニウム0.02%添加では無添加に比べ、Cre 平均値が上昇し、VMA 平均値は低下し、HVA 平均値は上昇することが認められた。HVA/VMA 比が上昇し、3成分ともバラツキが小さくなることが認められた。

容器法の場合、塩化ベンザルコニウム添加では、無添加に比べCre, VMA, HVA 平均値, VMA/HVA 比ともほぼ同じ値が得られた。

容器の場合は薬剤無添加でもろ紙に比較して Cre, VMA, HVA の低下, 変動が小さく、ろ紙ほど細菌の影響が顕著ではない傾向が認められた。

参考として昭和61, 62年度のルチン検査において、細菌汚染を防止する目的で0.3N塩酸をしみこませた

脱脂綿を採尿後のろ紙にのせ、押さえて塩酸をろ紙全体に行きわたらせてもらった結果を示した。薬剤添加の成績は塩酸添加の成績と近似している。Cre 平均値が容器ではろ紙より高くなっているが、ろ紙では希塩酸もしくは水を加えてしぼりだすため希釈されて低くなったものである。

考 察

NB検査の採尿方法では保護者に無菌的な取扱いを要求することは不可能であり、細菌汚染は避けられない。また、検査機関に到着するまでには1~2日の日数経過も必要である。

水田²⁾は実験的に湿った尿ろ紙を用いた場合、Cre が低下する原因が細菌汚染であることを報告した。著

者³⁾も Cre 異常低値尿から分離された分離株を用いて実験的に尿中 Cre が分解することを報告した。さらに、後藤⁴⁾らは、新たに考案した Cre 分解菌の選択分離培地 (NA-Cre 培地) を用いて Cre 分解菌の汚染状況を調査した。ほぼ通年にわたる1,003件のろ紙尿の調査の結果、197件 (19.6%) に Cre 分解菌が検出された。分離株197株の内訳は175株が *Arthrobacter*, 14株が *Micrococcus*, 8株が *Pseudomonas* と同定あるいは推定した。また、これら *Arthrobacter* の血清型別を行い同一血清型の汚染が継続することを認めている。⁵⁾

高頻度に検出された血清型の Cre 分解菌の代表株 8 株の Cre, VMA, HVA の低下作用を液体培地で

調べたところ、Cre だけでなく VMA, HVA の低下作用も持っていることが明らかとなった。プール尿に同様に 8 株を接種した場合でも Cre, HVA さらには VMA の低下作用を持っていることが認められた。このように Cre 分解菌が高頻度に検出され、汚染が継続し、尿中において Cre だけでなく VMA, HVA も低下させる菌株があることは NB 検査において偽陽性、偽陰性につながる危険性があることを示しており、何らかの細菌汚染防止対策が必要と考えられた。

細菌汚染防止対策としては、既にろ紙を採尿後乾燥させれば良いことが報告されている^{9,10)}。しかし、この方法は保護者に余分な手間を要求することになる。また、乾燥条件についても VMA は光に対し不安定であることから、光、熱に注意する必要がある。さらに半乾きのろ紙では細菌作用が避けられないなどの問題点がある。そこで著者らは保護者にできるだけ負担を要求しない方法として、予めろ紙あるいは容器に薬剤を添加する方法を考えた。

特にろ紙に薬剤を添加することは、夜間に尿がしみたまの状態で長時間放置される場合でも、細菌の生育に対し抑制効果が期待できるものと考えられた。

薬剤の選択にあたっては、Cre 分解菌が主として G (+) 桿菌、G (+) 球菌であることからこれらに対して抗菌作用を有すること、さらに乳児の肌に触れることがあるかもしれないことから皮膚刺激性の少ないこと、手軽に入手でき、安価であることなどの条件を考え、殺菌消毒剤として日本薬局方で粘膜や皮膚に使用が許可されている塩化ベンザルコニウム利用の可能性を検討した。

塩化ベンザルコニウムをろ紙に添加した場合、プール尿を用いての実験的検討では、供試した 8 株すべてに対して 0.01% 溶液で十分に効果のあることが認められた。通常の尿汚染としては考え難いような高濃度の菌量を接種した場合でも 30°C、72 時間後には接種菌は生残せず、Cre, VMA, HVA の低下も完全に防止された。しかし、実際の乳児の尿を採尿し郵送してもらったフィールド試用実験の結果では全般的に有効であるとの結果が得られたが、0.01% 溶液をしみこませたろ紙では効果が十分でなく、効果なしが 17 例中 6 例も認められた。0.02% ろ紙では 18 例中効果ありが 11 例、効果なしが 2 例とかなりの効果が認められたものの実

験的検討結果と異なり抑制効果が弱かった。

これは採尿時に塩化ベンザルコニウムが流れ出したためではないかと考えられる。

しかし 0.02% 添加ろ紙のフィールド試用実験において、pH が低く、VMA, HVA のバラツキが小さくなり、平均値が Cre, HVA で高く、VMA で低くなる傾向が認められたことは細菌の生育が抑制された結果と考えられる。

容器に 0.02% 量添加したフィールド試用実験でも、添加容器では Cre 分解菌はもとより細菌が検出された例は 1 例もみられず、Cre, VMA, HVA 値の変動が小さくなり、尿のアルカリ化も抑制される傾向がみられるなどの効果が認められた。

ただし、容器の場合は薬剤無添加でもろ紙に比較して Cre, VMA, HVA の低下、変動が小さく、ろ紙ほど細菌の影響が顕著ではない傾向が認められた。これは Cre 分解菌が好気性菌であり、容器ではろ紙ほど空気との接触面が大きくないため生育しないことによるものと考えられる。あるいはろ紙では、尿中の Cre 分解菌の生育に不都合な成分例えば胆汁酸塩⁴⁾などが吸着されたりするのかもしれない。

容器の場合でも塩化ベンザルコニウムを添加するのが安全と考えられる。

このように塩化ベンザルコニウムを 0.02% 量添加すれば、Cre 分解菌の Cre, VMA, HVA 低下作用はほぼ完全に防止出来ることが判明したが、試料が発泡するために取り扱いに注意を要することや、Cre 測定の際に反応液が混濁するので 0.1% のトリトン X-100 を加える必要があるなどの煩雑さが残るので、さらに有効な薬剤の検討が必要と考える。また、塩化ベンザルコニウムの HPLC 測定への影響、カラム寿命への影響等については今後の課題である。

本稿の要旨の一部は第 46, 47 回日本公衆衛生学会総会 (1987, 長崎, 1988, 札幌) 第 58 回日本衛生学会総会 (1988, 岡山) において発表した。本研究は、財団法人大同生命厚生事業団からの医学研究助成を受けた。

文 献

- 1) 沢田 淳, 戸沢睦彦, 東道伸二郎, 天野忠温, 田井純子, 高田 洋, 今宿晋作, 楠 智一: Function-

- nal Neural Tumor, 特に神経芽細胞腫 (Neuroblastoma) の早期発見のための Mass Screening について—(Ⅲ) 乳児期のマススクリーニング—, 日本小児外科学会誌, **14**, 25—31, 1978.
- 2) 水田満里, 海佐裕幸: 神経芽細胞腫のマス・スクリーニングについて: 日本公衛誌, **35**, 179—183, 1988.
- 3) 今井準三, 田中久子, 後藤喜一, 坂井至通, 森下有輝, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿のクレアチニン異常低下の解析, 日本公衛誌, **35**, 521—525, 1988.
- 4) 後藤喜一, 田中久子, 今井準三, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第一報) クレアチニン分解菌の分離とその汚染状況について: 日本公衛誌, **36**, 645—651, 1989.
- 5) 後藤喜一, 長野 功, 所 光男, 今井準三, 岩田久子, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第二報) クレアチニン分解性 *Arthrobacter* の血清型別の試み, 臨床と微生物, **17**, 83—88, 1990.
- 6) 齊藤正行, 北村元仕, 丹羽正治編: 臨床化学分析 II, 東京化学同人 (東京), 78, 1968.
- 7) 田中久子, 今井準三: 神経芽細胞腫マススクリーニング検査における防腐剤添加ろ紙の試み: 岐阜衛研所報, **33**, 27—30, 1988.
- 8) 今井準三, 田中久子: 神経芽細胞腫マススクリーニングの精度向上に関する検討 (第二報) 高速液体クロマトグラフ法による尿中 VMA, HVA 定量法の検討: 岐阜衛研所報, **32**, 30—33, 1987.
- 9) 川合常明, 花井潤師, 以頭まゆみ, 佐藤泰昌, 清水良夫, 富所謙吉, 高杉信男, 武田武夫: 神経芽細胞腫マススクリーニング—尿ろ紙中のクレアチニンの分解による VMA, HVA 異常高値について—: 札幌市衛研年報, **14**, 53—55, 1986.
- 10) 水田満里, 瀬川和幸: 神経芽細胞腫のマス・スクリーニングの精度向上に関する研究, 広島県衛研業務年報, **23**, 28, 1988.
- 11) 大平恵美子, 岩田久子, 今井準三, 後藤喜一, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングの精度向上に関する研究—VMA, HVA 溶液の安定性—, 岐阜衛研所報, **34**, 27—30, 1989.
- 12) 日本薬局方: 厚生省告示第58号, 昭和61年3月28日.

Bacterial Contamination of the Infant Urine Samples from
Filter papers used in Neuroblastoma-Screening Tests

(3) Protective Effects of Preaddition of Benzalkonium Chloride in Filter Papers or Containers for Urine on Bacterial Break-Down of Creatinine, Vanillylmandelic Acid and Homovanillic Acid

Junzo IMAI, Hisako IWATA, Kumiko NAGASHIMA,
Kiichi GOTO, Makoto KAWAI

Gifu Prefectural Institute of Public Health

Summary

Urine samples soaked into filter papers at home are sent by mail to a laboratory for a neuroblastoma screening test.

We have previously observed that the urine samples are often contaminated with strains of creatinine-cleaving bacteria and that some of the strains break down vanillylmandelic acid (VMA) and homovanillic acid (HVA) as well as creatinine (Cre) in urine.

The bacterial contamination seems to form the major cause of false-positive or false-negative results in the screening test.

The present study was, thus, designed to examine in laboratory and field experiments whether preaddition of benzalkonium chloride as a disinfectant to filter papers or containers used for urine sampling could prevent the bacterial break-down of Cre, VMA and HVA in urine samples.

The results of both experiments indicated that the treatment with benzalkonium chloride of 0.02% volume could prevent the destruction by inhibiting almost completely growth of the creatinine-cleaving bacteria.

The benzalkonium chloride treatment gave, however, some analytical troubles such as foaming of urine samples or turbidity in Cre-measuring processes. This necessitates further search for other suitable disinfectants.

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

神経芽細胞腫マスキリーニングにおける ろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第四報) 細菌汚染防止対策としてのエチレンジアミン 四酢酸二ナトリウム添加の効果

今井 準三*, 長島 久美子*, 後藤 喜一*

緒 言

現行の神経芽細胞腫マスキリーニング (NB検査) における検体尿の取り扱いで, 尿採取時の細菌汚染, 常温輸送による細菌増殖が避け難く, クレアチニン (Cre), ホモバニリン酸 (HVA), バニルマンデル酸 (VMA) の低下が懸念されている^{1~3)}。NB検査の精度向上のために細菌汚染防止対策として尿への薬剤添加効果を検討し, 今までに殺菌消毒剤として汎用されている塩化ベンザルコニウム, グルコン酸クロルヘキシジンの添加試用を報告した^{4,5)}。塩化ベンザルコニウム添加は細菌汚染防止の目的は達成されるものの, 発泡し易い, Cre測定時に混濁するなどの難点があった。グルコン酸クロルヘキシジンは塩化ベンザルコニウムと比較して細菌汚染防止効果は同等であり, 輸送, 測定時に発泡の無いこと, Cre測定時に混濁のないことなどの点で優れていることを認め報告した。

今回, 有効な薬剤検索の一環として, 塩化ベンザルコニウム, グルコン酸クロルヘキシジンとは異なる作用機作で抗菌効果が認められており, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に影響しないと考えられるエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) の効果を調べたので, その結果を報告する。

材料及び方法

1. 尿材料

プール尿: NB検査で陰性であった6~7ヶ月児のろ紙尿を適宜プールし, 0.2 μ mメンブランフィルター

でろ過滅菌した。

2. 供試株

前報と同様NB検査の乳児尿よりの分離株を用いた。UR-7, 66, 83, 106, 110, 135, 146の7株は³⁾ *Arthrobacter* と同定された分離株である。このうちUR-7, 66, 83, 106, 146の5株はCreを分解して尿素を集積する。また, UR-110, 135はウレアーゼを保有しCre分解で生成した尿素をNH₃に分解する⁸⁾。UR-72, 80は*Micrococcus varians* と同定された分離株である³⁾。

3. Cre分解菌の分離培養及び確認培養

前報によった。

4. 試薬

EDTAは同仁化学, Creは和光純薬, VMA, HVAは東京化成, 他は試薬特級を用いた。

5. Cre分解菌分離株に対するEDTAの最小発育阻止濃度 (MIC)

TS寒天平板にEDTAを0.2, 0.1, 0.05, 0.025%になるように含有させ, Cre分解菌分離株の1白金耳を接種し, 30°C, 48時間培養で菌の発育の有無を観察した。

6. EDTA添加容器使用の効果判定

実験的検討: プール尿にCre分解菌分離株を10⁸および10⁵個/ml接種し, あらかじめ10%EDTA水溶液を10 μ l添加した魚型ポリエチレン容器 (容量1.5ml) に1mlづつ入れ, チャック付きポリエチレン袋に密封し, 30°C, 48時間振とうした後, Cre, VMA, HVAの残存量を測定した。接種した菌の生残の有無を

* 岐阜県衛生研究所: 500 岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

NA-Cre 培地⁹⁾で確認した。対照として無添加容器を用いて同様に操作した。

フィールド試用：ルチン検査において、VMA定性反応 (Dip 法) が陰性で Cre 分解菌陽性であった乳児に、EDTA 添加容器、無添加容器各 1 個を脱脂綿とともに送った。就寝中に脱脂綿にしみこせた尿を翌朝容器に移してもらう方法で連続 2 日間採尿、郵送してもらい (添加、無添加は保護者には連絡せず、また、どちらを 1 日目に使うかは任意とした)、Cre, VMA, HVA 量を測定し、生菌数をトリプトソイ寒天、Cre 分解菌の有無を NA-Cre 培地で計測、確認した。Cre 分解菌が EDTA 無添加容器で陽性で添加容器で陰性の場合に効果あり、どちらも陰性の場合は不明、添加容器で陽性の場合に効果なしと判定した。採尿時期は1989年10月～12月であった。

7. 定量法

1) Cre 測定

Jaffe 反応を用いる方法⁹⁾によった。

2) VMA, HVA測定

高速液体クロマトグラフ法¹⁰⁾によった。

3) pH

万能pH 試験紙 (東洋ろ紙) によった。

結 果

1. EDTA のMIC

Cre 分解菌分離株の EDTA に対する感受性試験の成績を表 1 に示した。UR-7, 110, 146 に MIC は 0.1 % を示し、66 等 5 株の MIC は 0.05 % であった。した

表 1 Cre 分解菌分離株の EDTA に対する感受性試験

菌株 No.	EDTA 濃 度 (%)			
	0.2	0.1	0.05	0.025
UR-7	-	-	+	+
66	-	-	-	+
106	-	-	-	+
110	-	-	+	+
135	-	-	-	+
146	-	-	+	+
72	-	-	-	+
80	-	-	-	+

UR-72, 80 は *M. varians*, 他は *Arthrobacter*

がって、以下の EDTA の効果検討には 0.1 % を使用

した。

2. EDTA の効果

1) 実験的検討

EDTA 添加容器についての実験的検討成績を表 2 に示した。(次頁別掲) 0.1 % 量の EDTA 添加で接種細菌量が少ない場合 (10^8 個/ml) は細菌の発育がほぼ完全に阻止され、後培養で細菌は検出されなかった。また、Cre, VMA, HVA の低下も抑制された。接種細菌量が多い場合 (10^9 個/ml) は後培養でわずかではあるが接種菌が検出される菌株がみられた。しかし、Cre, VMA, HVA の低下はみられなかった。なお、無添加容器における Cre, VMA, HVA の低下は接種菌量が多いほど大きい傾向が認められた。

2) フィールド試用成績

実験的検討で EDTA 添加の効果が確認されたので、実際のフィールドに試用した。同一尿を EDTA 添加、無添加容器にとってもらえれば最も判然と差異の比較が可能であるが、同時に 2 つの容器に採尿を依頼することは保護者の同意を得る点で困難であったので止むを得ず連続 2 日の別々の尿について比較した。

成績を表 3 に示した。Cre 分解菌が不検出で効果ありと判定されたのは 18 例中 3 例、不明が 13 例で効果なしは 2 例認められた。EDTA 無添加容器では 18 例すべてに多数の細菌が検出されたが、EDTA 添加容器でも 18 例中 17 例に細菌が検出され、無添加容器とあまり差がみられない例が多く認められた。pH は添加容器の方が低い傾向が認められた。HVA が異常に低値と思われる例は無添加容器に 2 例 (No. 10, 11) 認められたに過ぎず、この例は HVA/VMA 比が 1 以下を示した。Cre 分解菌が検出された 6 例の Cre, VMA, HVA, HVA/VMA 比は特に低値ではなかった。

Cre, VMA の平均値は差がみられなかったが、EDTA 添加により HVA, HVA/VMA 比は若干高くなり、Cre, HVA のバラツキが小さくなる傾向がみられた。

考 察

NB 検査用尿の細菌汚染による Cre, VMA, HVA 測定値への影響^{1, 2)}、汚染頻度同一菌の継続汚染³⁾が報告されており、なんらかの汚染防止対策の確立が急がれる。

表 2 EDTA 添加魚型容器実験成績 (プール尿, 菌接種, 振とう)

供試菌	EDTA 無添加							
	接種菌量 10 ² /ml				接種菌量 10 ⁵ /ml			
	Cre	VMA	HVA	NA-Cre*	Cre	VMA	HVA	NA-Cre
UR-7	100	93.3	102	+++	102	98.3	105	+++
66	93.0	108	111	+++	67.2	102	101	+++
72	98.2	100	99.5	-	95.1	85.8	7.7	+++
80	95.1	95.2	90.0	+	39.8	66.7	7.4	++
83	75.1	100	105	+++	83.0	98.5	104	+++
106	7.3	58.2	1.3	+++	43.2	54.0	1.1	+++
110	97.3	86.6	96.3	+++	6.1	95.7	101	+++
135	9.7	101	99.5	-	99.1	92.1	94.4	+
146	92.1	91.0	99.5	+++	5.5	89.7	100	+++
control					101	100	100	-

供試菌	EDTA 0.1% 添加							
	接種菌量 10 ² /ml				接種菌量 10 ⁵ /ml			
	Cre	VMA	HVA	NA-Cre	Cre	VMA	HVA	NA-Cre
UR-7	97.6	97.0	102	-	99.1	91.7	92.4	+
66	97.3	98.9	101	-	100	105	96.4	+
72	98.5	108	107	-	99.4	98.5	97.6	-
80	97.0	95.4	96.4	-	98.2	100	99.9	+
83	97.9	97.0	98.7	-	97.6	95.8	96.0	-
106	97.3	86.5	86.7	-	98.3	97.9	97.1	-
110	95.7	97.0	97.2	-	99.4	96.8	96.8	+
135	97.6	97.3	95.6	-	99.1	100	94.9	-
146	98.8	99.4	96.7	-	97.3	97.7	97.0	+
control					99.7	94.8	94.8	-

数値は残存率 (%) を示す。* ; 後培養, UR-72, 80 ; *M. varians* 他は *Arthrobacter*, プール尿の値 ; Cre 0.3mg/ml, VMA ; 4.7μg/ml, HVA ; 8.7μg/ml

表 3 EDTA 添加容器試用成績

No.	EDTA 無添加								EDTA 0.1% 添加								判定
	日	pH	Cre	VMA	HVA	* 1	* 2	HVA/VMA	日	pH	Cre	VMA	HVA	* 1	* 2	HVA/VMA	
1	2	7	0.166	7.9	21.6	+++	-	2.73	1	6	0.120	7.7	18.9	+	-	2.45	△
2	1	8	0.196	10.8	13.9	+++	-	1.29	2	5-6	0.142	9.3	20.3	NG	-	2.18	△
3	2	9	0.560	8.5	17.9	+++	-	2.10	1	7	0.185	8.3	20.8	++	-	2.51	△
4	1	7	0.267	10.1	15.2	+++	-	1.50	2	7	0.296	10.0	18.8	+++	-	1.88	△
5	2	7-8	0.141	2.7	8.4	+++	-	3.11	1	7	0.415	3.8	10.9	+++	-	2.87	△
6	2	8	0.131	10.9	20.0	++	-	1.83	1	6-7	0.474	5.6	16.2	+	-	2.89	△
7	3	6-7	0.164	8.0	20.0	+++	-	2.50	2	6-7	0.455	9.5	20.6	+++	-	2.17	△
8	2	7-8	0.290	9.0	20.2	+++	-	2.24	1	7	0.154	7.2	18.7	+++	-	2.60	△
9	1	7	0.590	9.0	20.3	++	-	2.26	2	7	0.358	9.4	20.4	+++	-	2.17	△
10	2	7	0.140	7.4	2.7	+++	-	0.36	1	6	0.081	5.3	18.1	+	-	3.42	△
11	2	7	0.123	5.3	2.4	+++	-	0.45	1	7	0.500	6.8	16.3	+++	-	2.40	△
12	2	7-8	0.182	8.9	19.5	+++	-	2.19	1	6-7	0.133	6.9	17.5	+++	+	2.54	×
13	2	8	0.186	9.1	18.9	+++	+	2.08	1	7-8	0.250	9.6	17.3	++	-	1.80	○
14	1	7	0.718	8.3	20.3	+++	+++	2.44	2	7	0.457	8.6	14.3	+	-	1.66	○
15	2	7	0.099	9.5	18.1	+	+	1.90	1	6-7	0.190	9.9	18.2	+++	++	1.84	×
16	2	7	0.108	9.6	17.9	+++	+	1.86	1	6-7	0.198	11.0	17.7	+	-	1.61	○
17	1	7	0.400	10.4	22.5	+++	-	2.16	2	7	0.236	13.4	24.2	+	-	1.80	△
18	1	7	0.461	10.9	21.1	+++	-	1.94	2	7	0.352	14.8	28.7	+++	-	1.94	△
$\bar{X} \pm SD$			0.273	8.6	16.7			1.94			0.278	8.7	18.8			2.26	
			± 0.190	± 2.0	± 6.1			± 0.70			± 0.138	± 2.7	± 3.8			± 0.49	

Cre ; mg/ml, VMA, HVA ; μg/mg Cre * 1 ; 発生集落数, * 2 ; Cre 分解菌, NG ; 集落発生なし
判定 : ○ ; 効果あり, × ; 効果なし, △ ; 不明, 日 ; 尿受付日一採尿日, $\bar{X} \pm SD$; 平均値±標準偏差

細菌汚染防止対策としては、ろ紙を採尿後乾燥させれば良いことが既に報告されているが^{11,12)}、この方法は保護者に余分な手間を要求することになる。また、乾燥条件についても不安が残り、半乾きのろ紙では細菌作用が避けられないなどの問題点がある。著者らはマスキリングでは被検者、保護者にできるだけ負担、条件を要求しない方法が望ましいとの考えからあらかじめろ紙あるいは容器に薬剤を添加する方法を考えてきた。

^{4,5)} 前報で細菌汚染防止剤として塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジンの0.02%溶液をろ紙あるいは容器に添加すれば実験的検討、フィールド試用成績ともに十分な効果が確認されたが測定への影響が無いグルコン酸クロルヘキシジンが優れていることを報告した。今回は、塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジンと作用機作⁷⁾の異なる EDTA の効果を調べた。EDTA は HPLC への影響の懸念がないことも有利な点と考えられた。

実験的検討では、Cre 分解菌分離株のうちで検出頻度の高かった菌株⁸⁾を中心に代表株 8 株に対する EDTA の MIC を求め、その結果に基づき EDTA を 0.1% 量添加して実施した。菌株を 10^6 個/ml 接種したもののうち 48 時間後にはわずかに生残を認めるものがみられたが、Cre, VMA, HVA の低下はみられなかった。これは塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジンを添加した場合に全く生残を認めなかった事実^{4,5)}に比べ殺菌効果が弱いことを示していたが、Cre 等の低下防止には十分な効果を持つことが示されたものと考えられ、実際のフィールド試用にその効果が期待された。

フィールド試用にあたっては容器に EDTA を 0.1% 量になるように添加して実施したが、一定の効果が認められた。添加容器で Cre 分解菌が検出された例は 18 例中 2 例認められたに過ぎず、Cre, HVA の値もバラツキが小さくなり、HVA/VMA 比も大きくなり効果が認められた。しかし、塩化ベンザルコニウムやグルコン酸クロルヘキシジンほどの殺菌効果は認められなかった。これは作用機作が異なるためと考えられ、EDTA ももっと高濃度に添加すれば効果が期待できるであろうが限られた濃度では有効性が劣ることを示すものである。

今回の容器の実験結果は、塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジンの実験の場合と同様^{4,5)}、薬剤無添加でも（ろ紙に比較して）Cre, VMA, HVA の低下、変動が小さく、ろ紙ほど細菌の影響が顕著⁴⁾ではない傾向が認められた。これは前述したように Cre 分解菌が好気性菌であり、容器ではろ紙ほど空気との接触面が大きくないため生育しないことによるものと考えられる。あるいはろ紙では、尿中の Cre 分解菌の生育に不都合な成分、例えば胆汁酸³⁾などが吸着されたりするのかもしれない。

EDTA は細菌作用抑制効果が認められたが、塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジロほどではなく実用性においてグルコン酸クロルヘキシジンより劣ると考えられた。

文 献

- 1) 水田満里, 海佐裕幸: 神経芽細胞腫のマスキリングについて: 日本公衛誌, **35**, 179~183, 1988.
- 2) 今井準三, 田中久子, 後藤喜一, 坂井至通, 森下有輝, 河合 信: 神経芽細胞腫マスキリングにおけるろ紙尿のクレアチニン異常低下の解析, 日本公衛誌, **35**, 521~525, 1988.
- 3) 後藤喜一, 田中久子, 今井準三, 河合 信: 神経芽細胞腫マスキリングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究(第一報)クレアチニン分解菌の分離とその汚染状況について: 日本公衛誌, **36**, 645~651, 1989.
- 4) 今井準三, 岩田久子, 長島久美子, 後藤喜一, 河合 信: 神経芽細胞腫マスキリングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究(第三報)細菌汚染防止対策としての塩化ベンザルコニウム添加の効果: 岐阜衛研所報, **35**, 23~30, 1990.
- 5) 田中久子, 今井準三, 後藤喜一, 河合 信: 神経芽細胞腫マスキリング検査における(ろ紙)尿の細菌汚染に関する研究(第5報)生尿における Cre 分解菌の作用と汚染防止対策の試用成績, 日本衛生学雑誌, **44**(1), 388, 1989.
- 6) 田中久子, 今井準三: 神経芽細胞腫マスキリング検査における防腐剤添加ろ紙の試み: 岐阜衛研所報, **33**, 27~30, 1988.

- 7) 芝崎 勲：微生物制御とその基礎 微生物と化学薬剤, 防菌防黴誌, **14**, 201~210, 1986.
- 8) 後藤喜一, 長野 功, 所 光男, 今井準三, 岩田久子, 河合 信：神経芽細胞腫マスキリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第二報) クレアチニン分解性 *Arthrobacter* の血清型別の試み, 臨床と微生物, **17**, 83~88, 1990.
- 9) 斉藤正行, 北村元仕, 丹羽正治編：臨床化学分析 II, 東京化学同人 (東京), 78, 1968.
- 10) 今井準三, 田中久子：神経芽細胞腫マスキリーニングの精度向上に関する検討 (第二報) 高速液体クロマトグラフ法による尿中 VMA, HVA 定量法の検討：岐阜衛研所報, **32**, 30~33, 1987.
- 11) 川合常明, 花井潤師, 以頭まゆみ, 佐藤泰昌, 清水良夫, 富所謙吉, 高杉信男, 武田武夫：神経芽細胞腫マスキリーニング—尿ろ紙中のクレアチニンの分解による VMA, HVA 異常高値について—：札幌市衛研年報, **14**, 53~55, 1986.
- 12) 水田満里, 瀬川和幸：神経芽細胞腫のマスキリーニングの精度向上に関する研究, 広島県衛研業務年報, **23**, 28, 1988.

Bacterial Contamination of Infant Urine Samples from Filter Papers Used in Neuroblastoma-Screening Test

(4) Protective Effects of Preaddition of Ethylenediaminetetraacetic Acid, in Containers for Urine on Bacterial Break-Down of Creatinine, Vanillylmandelic Acid and Homovanillic Acid

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

神経芽細胞腫マスキリングにおける ろ紙尿の細菌汚染に関する研究 (第五報) 高速液体クロマトグラフィーによる VMA, VLA, HVA 測定に対する塩化ベンザルコ ニウムの影響

今井 準三*, 長島 久美子*, 坂井 至通*,
後藤 喜一*, 河合 信*

緒 言

神経芽細胞腫マスキリング (NB 検査) に使用される検体の乳児尿の細菌汚染およびその影響について報告されている¹⁻³⁾。また、著者らは先に採尿に使用するろ紙および容器にあらかじめ殺菌剤の塩化ベンザルコニウムかグルコン酸クロルヘキシジンを追加すれば、細菌によるクレアチニン (Cre)、バニルマンデル酸 (VMA)、ホモバニリン酸 (HVA) の低下が防止できることを報告した^{4,5)}。塩化ベンザルコニウムおよびグルコン酸クロルヘキシジン添加の Cre 測定への影響についてはすでに検討を行い報告した⁶⁾。

今回は、塩化ベンザルコニウムの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定における VMA, バニル乳酸 (VLA), HVA の測定値, 保持時間に及ぼす影響, カラム洗浄によるカラムからの溶出について検討した。また、尿を入れる容器に塩化ベンザルコニウムをしみこませたろ紙を入れる場合のろ紙からの溶出についても検討した。

材料および方法

1. 試 薬

日本薬局方塩化ベンザルコニウム液はオスバン「ダイゴ」、Cre は和光純薬、VMA, VLA, HVA は東京化成、他は試薬特級を用いた。

2. 塩化ベンザルコニウムの VMA, VLA, HVA の感度, 保持時間に対する影響

VMA, VLA, HVA 標準液 (2-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に塩化ベンザルコニウムを 0.002% 濃度に添加し、その液 10 μl について HPLC により測定した。薬剤を添加しない標準液を同様に測定し、その時の値と比較した。

HPLC は以下の条件で測定した。

- a) カラム; Nucreosil 5C₁₈ (4×150mm)
溶離液; 0.03Mリン酸-カリウム (pH3) + アセトニトリル (925+75), EDTA 2 Na 40mg/l
流速; 0.7ml/min. カラム温度; 40°C
検出器; アンペロメトリー (Shimadzu ECD 6 A, 0.8V)
- b) カラム; Shimpac CLC-VMA (4.6×150mm)
溶離液; 0.03M酒石酸+アセトニトリル (970+30), EDTA 2 Na 40mg/l
流速; 1.0ml/min. カラム温度; 40°C
検出器; アンペロメトリー (Shimadzu ECD 6 A, 0.8V)

3. 塩化ベンザルコニウムの HPLC カラムからの溶離量の測定

4% 塩化ベンザルコニウム溶液を 5 μl づつ 70 秒間隔で 11 回連続注入した。続いて溶離液を水-メタノール (1+1, 2+8), メタノール, 水-メタノール (2+8)

* 岐阜県衛生研究所: 500 岐阜市野一色 4 丁目 6 番 3 号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

+ 5 mM オクタンスルホン酸ナトリウムと順次変えて溶出する各分画を捕集した。各溶出分画の塩化ベンザルコニウム量を測定した。

HPLC の測定条件は以下のとおりである。

1) 塩化ベンザルコニウムの HPLC カラムからの溶出

a) カラム ; Nucreosil 5C₁₈ (4×150mm)

初期溶離液 ; 0.03Mリン酸-カリウム (pH 3) + アセトニトリル (925+75), EDTA 2 Na 40mg/l
溶離液 ; 0.7ml/min. カラム温度 ; 40°C

b) カラム ; Shimpac CLC-VMA (4.6×150mm)

初期溶離液 ; 0.03M 酒石酸+アセトニトリル (970+30), EDTA 2 Na 40mg/l
流速 ; 1.0ml/min. カラム温度 ; 40°C

次ぎに続く溶離液 ; 水-メタノール (1+1, 2+8),
メタノール, 水-メタノール (2+8) + 5 mM オクタンスルホン酸ナトリウム,

流速 ; 1.0ml/min. カラム温度 ; 40°C

検出器 ; UV₂₅₄

2) 塩化ベンザルコニウムの定量

Meyer, R. C. の方法⁷⁾によった。

カラム ; Nucreosil 5 CN (4×150mm)

溶離液 ; 0.1M酢酸ナトリウム+アセトニトリル (40+60)

流速 ; 0.3ml/min. カラム温度 ; 40°C

検出器 ; UV₂₅₄

4. ろ紙からの塩化ベンザルコニウムの溶出

2%塩化ベンザルコニウム溶液の10 μ l および15 μ l を小ろ紙片 (東洋ろ紙No.2, 2×20mm), 大ろ紙片 (同, 10×20mm) にしみこませ風乾した。これを1枚づつ魚型ポリエチレン容器もしくは小試験管 (15×105mm) にとり水1.0mlを加え24時間放置後各液中の塩化ベンザルコニウム濃度を測定した。塩化ベンザルコニウムの測定条件は前述3. 2) と同様である。

実験結果

1. 塩化ベンザルコニウムの VMA, VLA, HVA の感度, 保持時間に対する影響

前報⁴⁾で塩化ベンザルコニウムは, 検体尿に0.02%量添加されれば細菌汚染をほぼ完全に防止することが判明している。通常, 尿の VMA, HVA を直接測定するには尿を10~20倍希釈するので標準液に0.002%量の塩化ベンザルコニウムを添加して測定し, 薬剤不添加の標準液の値と比較した。その結果を表1に示した。

HPLC カラムが Nucreosil 5C₁₈, Shimpac CLC-VMA いずれでも, VMA, VLA, HVA の保持時間, 感度に影響を及ぼさないことが確認された。

2. 塩化ベンザルコニウムの HPLC カラムからの溶離量の測定

負荷された薬剤がカラム上でどのような挙動をするのか, また, カラム洗浄により溶出されるのかどうか検討を行った。

検体5,500件に相当する塩化ベンザルコニウムを負荷した後, 溶離液を変えて順次流し, 各溶離分画を捕

表1 VMA, VLA, HVA 測定への影響

	n	Nucreosil 5C ₁₈						Shimpac CLC-VMA					
		VMA		VLA		HVA		VMA		VLA		HVA	
		Rt*	Area**	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area
標準液, 10 μ l	5	4.20 ± 0.01	100 ± 6.2	9.21 ± 0.02	100 ± 3.7	13.91 ± 0.02	100 ± 0.9	5.33 ± 0.01	100 ± 6.0	7.82 ± 0.00	100 ± 1.5	8.77 ± 0.01	100 ± 1.6
塩ベ0.002%含有標準液 10 μ l	5	4.21 ± 0.01	98.1 ± 4.7	9.22 ± 0.02	96.7 ± 1.4	13.91 ± 0.02	97.0 ± 0.9	5.34 ± 0.00	96.4 ± 5.6	7.82 ± 0.00	98.1 ± 1.8	8.76 ± 0.01	99.1 ± 0.7

* ; 保持時間 (分), ** ; 面積感度 (標準液の値を100とする) (平均値 \pm 標準偏差), 塩ベ ; 塩化ベンザルコニウム

集した。この各分画中の塩化ベンザルコニウムの量を測定し、初めの注入量（負荷量）に対する回収率を求めた。結果を表2に示した。

小ろ紙からはほぼ90%が溶出した。大ろ紙からは75~78%の溶出率であった。

表2 塩化ベンザルコニウムの溶離回収

カラム	溶 離 液	回収率 %
Nucreosil 5C ₁₈	H ₂ O-MeOH (1+1) 50ml	trace
	H ₂ O-MeOH (2+8) 50ml	35.0
	MeOH 50ml	52.7
	計	87.7
Shimpac CLC-VMA	H ₂ O-MeOH (1+1) 50ml	6.6
	H ₂ O-MeOH (2+8) 50ml	18.2
	MeOH 50ml	35.5
	H ₂ O-MeOH (2+8), 5mM Na-OSA 30ml	20.3
	計	80.6

MeOH ; メタノール, Na-OSA ; オクタンスルホン酸ナトリウム

Nucreosil 5C₁₈ カラムでは溶離液でほとんど溶出せず、水-メタノール(1+1)で痕跡程度、(2+8)で35.0%、メタノールで52.7%の計87.7%量が溶出した。Shimpac CLC-VMA カラムでは溶離液ではほとんど溶出せず、水-メタノール(1+1)で6.6%、(2+8)で18.2%、メタノールで35.5%に留まり、さらに水-メタノール(2+8)にイオンペア試薬を添加して20.3%、計80.6%量の溶出に留まった。

3. 塩化ベンザルコニウムのろ紙から溶出

尿容器に薬剤を添加する方法としてろ紙に薬剤をしみこませて容器に入れることとした場合にろ紙から薬剤が十分溶出してくれる必要がある。

ろ紙を大小2種類(2×20, 10×20mm)用いて、あらかじめしみこませた薬剤の水への溶出率を求めた。表3に24時間後の塩化ベンザルコニウムの溶出率を示した。

表3 塩化ベンザルコニウム溶出試験成績(ろ紙より)*

ろ紙への添加 薬剤濃度及び 添加量	小ろ紙 (2×20mm)	大ろ紙 (10×20mm)
	溶出率 %	溶出率 %
2%, 10 μl	89.5±4.1	75.5±1.7
2%, 15 μl	92.6±3.8	78.1±3.9

*薬剤含有ろ紙に水1mlを加え24時間静置した。n=5

考 察

NB検査の検体尿の細菌汚染防止対策として、塩化ベンザルコニウムおよびグルコン酸クロルヘキシジンの添加効果を認め報告した^{4,5)}が、実際の利用にあたっては、VMA, HVA測定への影響の無いことが必須条件となる。実験は実際の尿の測定条件に合わせ、塩化ベンザルコニウムを0.02%含む尿を10倍希釈してHPLC測定することを想定して行った。HPLCカラムは、実際のNB検査で広く使用されているShimpac CLC-VMAとODS系カラムの一つであるNucreosil 5C₁₈を用いた。

塩化ベンザルコニウムは0.002%量含まれても、どちらのカラムでもVMA, VLA, HVAの保持時間、電気化学検出器での感度になら影響を及ぼさなかった。

負荷された塩化ベンザルコニウムはどちらのカラムでもVMA等測定用の溶離液では溶離せず保持されるが、Nucreosil 5C₁₈では通常のカラム洗浄に用いられる水-メタノール、メタノールでほぼ全量溶離されることが確認された。しかし、Shimpac CLC-VMAでは水-メタノール、メタノールでは60.3%の溶離に留まり、水-メタノール(2+8)にオクタンスルホン酸を添加した場合でもようやく80.6%に達したに過ぎなかった。

実際に尿を容器に入れ郵送する場合に薬剤を添加する方法としては、溶液で添加する、薬剤をしみこませたろ紙片を入れる、容器の内面等に塗布もしくは付着させる等が考えられる。薬剤をしみこませたろ紙片を入れる場合には、ろ紙からの薬剤の溶出が十分であることが望ましい。塩化ベンザルコニウムはグルコン酸クロルヘキシジンと同様セルロース基材に吸着される^{8,9)}との報告があるのでろ紙片からの溶出について検討を加えた。

小ろ紙片(東洋ろ紙No.2, 2×20mm)では添加量のほぼ90%が溶出されたが、大ろ紙片(10×20mm)では75~78%量が溶出された。溶出量は添加量に対しろ紙

量が相対的に増加する程減少することが認められた。小さな紙片であれば十分に添加効果を発揮できると考えられた。

以上の結果をグルコン酸クロルヘキシジンの結果と¹⁰⁾比較すると VMA 等の保持時間、感度への直接影響はともに認められないが、塩化ベンザルコニウムを添加した検体を多数測定することを想定した大量負荷時の HPLC カラムからの洗浄溶離量は、グルコン酸クロルヘキシジンの方がほぼ100%溶出することから優っている。ろ紙からの溶出挙動はほぼ同じと思われる。グルコン酸クロルヘキシジンのように5,500検体相当の量を HPLC カラムに負荷した時の VMA 等の測定への影響の有無については検討しなかったため、その差異については言及できない。

尿に細菌汚染防止の目的で添加するには、塩化ベンザルコニウムはクレアチニン測定において混濁を生ずる⁶⁾難点があること、測定操作を通じて発泡することも⁴⁾考慮すると、グルコン酸クロルヘキシジンの方が優れていると考えられる。

本研究は財団法人大同生命厚生事業団からの医学研究助成を受けた。資料を提供していただいた(株)アイ・シー・アイファーマ医薬部白石亮一氏に感謝します。

文 献

- 1) 水田満里, 海佐裕幸: 神経芽細胞腫のマス・スクリーニングについて, 日本公衛誌, **35**, 521~525, 1988.
- 2) 今井準三, 田中久子, 後藤喜一, 坂井至通, 森下有輝, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿のクレアチニン異常低下の解析, 日本公衛誌, **35**, 521~525, 1988.
- 3) 後藤喜一, 田中久子, 今井準三, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究(第一報)クレアチニン分解菌の分離とその汚染状況について, 日本公衛誌, **36**, 645~651, 1989.
- 4) 今井準三, 岩田久子, 長島久美子, 後藤喜一, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究(第三報)細菌汚染防止対策としての塩化ベンザルコニウム添加の効果, 岐阜衛研所報, **35**, 23~30, 1990.
- 5) 田中久子, 今井準三, 後藤喜一, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニング検査における(ろ紙)尿の細菌汚染に関する研究(第5報)生尿における Cre 分解菌の作用と汚染防止対策の試用成績, 日本衛生学雑誌, **49**(1), 388, 1989.
- 6) 田中久子, 今井準三, 神経芽細胞腫マススクリーニングにおける防腐剤添加ろ紙の試み, 岐阜衛研所報, **33**, 27~30, 1988.
- 7) Meyer, R. C.: Determination of Benzalkonium Chloride by Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography, J. Pharm. Sci., **69**, 1148~1150, 1980.
- 8) 細淵和成, 佐藤健二: セルロース製品に対する殺菌剤の吸着, 防菌防黴誌, **5**, 163~165, 1977.
- 9) 細淵和成, 佐藤健二: 殺菌剤に対する放射線照射の影響(第4報), 防菌防黴誌, **6**, T154~160, 1978.
- 10) 今井準三, 岩田久子, 長島久美子, 坂井至通, 後藤喜一, 河合 信: 神経芽細胞腫マススクリーニングにおける(ろ紙)尿の細菌汚染に関する研究(第6報)HPLCによるVMA, VLA, HVA測定に対するグルコン酸クロルヘキシジンの影響, 第18回日本マススクリーニング学会抄録, 1990.

Bacterial Contamination of Infant Urine Samples from Filter Papers Used in Neuroblastoma-Screening Test

(5) The Influence of Benzalkonium Chloride on Determination of Vanillylmandelic Acid, Vanillyllactic Acid and Homovanillic Acid by High Performance Liquid Chromatography

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.水蒸気蒸留法による家庭用品中の
ベンゼンの定量

森 仁, 今 井 準 三

はじめに

家庭用品として使用されているしみ抜き剤, 塗料, うすめ液, エアゾール製品等には, 多量の有機溶剤が使用されており, それらの中には発ガン性や血液障害, 肝臓障害等を起こすベンゼンが含有することが報告されている¹⁾。すでに, 米国では工業用溶剤中のベンゼン含有量を0.5%以下と規定している²⁾。

このため, 厚生省では「有害物質を含有する家庭用品に関する法律」に基づき規制の方向で基準値と規制対象品目の検討が進められている。一方国立衛生試験所では, 地方の衛生研究所と共同試験を実施し, 基準試験法の作成について検討が行われている^{3, 4)}。この報告によればガスクロマトグラフ法 (GC法) と高速液体クロマトグラフ法 (HPLC法) の両法を併用すれば測定上の問題が少ないが, 共存物質を除くための前処理法については改良する必要があることを指摘している。これらの問題を解決する方法として微量拡散法が報告されている⁵⁾。

著者らは, PCB, 有機塩素系農薬, 酸化防止剤等の前処理に用いられている精油定量装置の一部を改良した装置を試作し, 家庭用品中のベンゼンの測定の前処理に適用したところ, 操作が簡易で分析精度も高く, 実用性が認められたので報告する。

実験方法

1 試薬及び装置

トルエン: 試薬特級を用いた。なお, あらかじめガスクロマトグラム上に妨害ピークが検出されないことを確認した。

ベンゼン標準溶液: ベンゼン1gをとり, トルエンを加え全量を100mlとし, ベンゼン10mg/ml溶液を調製した。この溶液を適宜トルエンで希釈して用いた。

ガスクロマトグラフ装置: 島津4BM (FID検出器) を用いた。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) 装置: 日本分光 TRIROTAR-V (UV検出器) を用いた。

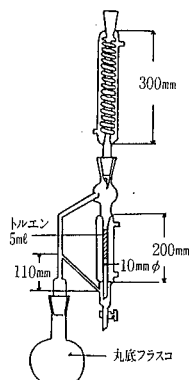


図1 水蒸気蒸留装置

蒸留装置: 図1に示したような構造の装置を試作して用いた。装置を試作するについては, ベンゼンが比較的沸点化合物であること, 抽出溶媒として用いたトルエンの比重が0.872と, これらの装置の抽出溶媒として用いられているヘキサンに比べ大きいこと, 下川らが考案した装置を一部改良した⁶⁾。

その改良点は, 抽出溶媒の温度上昇を防ぐこと及びベンゼンの揮散を少なくするため, 抽出器の冷却器の長さを200mmと長くしたこと, 液滴と抽出溶媒との分離を容易にするため, 抽出部の管径を10mmφと大きくし

* 岐阜県衛生研究所: 500 岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

たことである。

2 試料

実験に供した試料は、一般に市販されている家庭用品の中から、有機溶剤を主な成分としているしみ抜き剤、カイロ用燃料、塗料、うすめ液、エアゾル製品等 17種類を選んだ。

3 分析操作

試料約 1 g を正確に 150 ml の丸底フラスコにとり、トルエン 1 ml、蒸留水 100 ml 及び沸石を加える。蒸留装置の抽出部に蒸留水適量とトルエン 5 ml を入れた後、蒸留装置をセットし直火で加熱し沸騰が始まってから 30 分間蒸留する。

室温まで冷却した後、冷却器の上部から蒸留水 5 ml をゆっくり注ぎ冷却器を洗浄する。次に抽出器の水相を捨てトルエン相を脱脂綿層を通して分取する。さらに抽出器をトルエン 1 ml で 2 回洗浄し、先に分取したトルエン相に合わせ全量を 10 ml とし、これを試験溶液とする。

標準については、ベンゼン標準溶液を用いてベンゼン 25~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トルエン溶液を段階的に調製し、その 1 ml をとり、試料と同様の蒸留操作を行い調製する。

ベンゼンの分析は、GC 法及び HPLC 法によった。その測定条件を下記に示した。なお、試験溶液の注入量は GC 法 1 μl 、HPLC 法 5 μl とした。

ガスクロマトグラフ条件

① カラム：10% PEG 1500 (Chromosorb W AW DMCS 60~80 mesh) 2 m \times 3 mm i. d., 温度：カラム 80 $^{\circ}\text{C}$, 注入口及び検出器 150 $^{\circ}\text{C}$, キャリアーガス：窒素 30 ml/min, 水素ガス：1 kg/cm 2 , 空気：0.5 kg/cm 2 .

② カラム：1% SP-1200 (cabopak B 80~100 mesh) 1 m \times 3 mm i. d., 温度：カラム 190 $^{\circ}\text{C}$, 注入口及び検出器 240 $^{\circ}\text{C}$, キャリアーガス：窒素 30 ml/min, 水素ガス：1 kg/cm 2 , 空気：0.5 kg/cm 2 .

高速液体クロマトグラフ条件

カラム：TSK ゲル ODS-80TM 5 μm (150 mm \times 4 mm i. d.), 溶離液：アセトニトリル-水 (3:2), 流速：0.8 ml/min, 測定波長：254 nm.

結果及び考察

1 抽出溶媒の検討

抽出溶媒は、ペンタン、ヘキサン、トルエン、キシレン、MIBK 及び酢酸 n-ブチルの中から以下の事項を考慮して選んだ。

① ベンゼンを容易に溶解し、水に対する溶解度が小さく水相との分離が完全である溶媒。

② 溶解ピークがベンゼンのピークと完全に分離し、しかも不純物による妨害ピークが少ない溶媒。

ペンタン、ヘキサンについては、数種のガスクロ条件下で検討したが、溶媒のピークがベンゼンの前に検出されリテンションタイム (Rt) が接近しており、ベンゼンと完全に分離することが困難であった。キシレン、MIBK 及び酢酸 n-ブチルについては、不純物、異性体等のピークが多数検出され抽出溶媒としては不適當であった。トルエンは、ベンゼンの後にピークが検出されるとともに不純物のピークが最も少なかったので抽出溶媒とした。

なお、トルエンは、規格、ロットより不純物が含有されている場合があったためあらかじめ不純物の有無を確認しておく必要があった。

2 蒸留時間の検討

蒸留水にベンゼンを添加し、蒸留時間がベンゼンの回収率に及ぼす影響を調べた。

蒸留水 100 ml に 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のベンゼン標準液を 1 ml 添加し、分析操作に従って加熱時間を 10~60 分間と変化させ添加回収実験を行った。

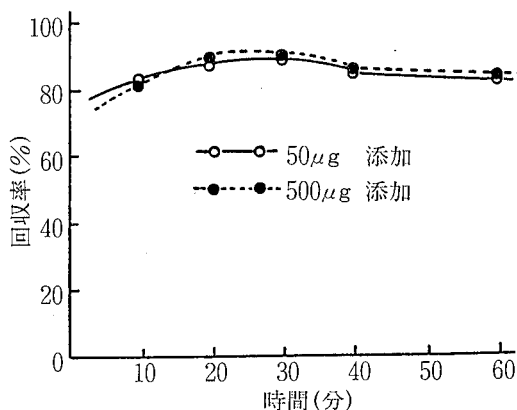


図 2 蒸留時間の検討

その結果を図 2 に示した。回収率は、加熱時間 20~30 分間で最高値の 90% を示した。従って、加熱時間を 30 分間とした。

3 トルエン量の検討

抽出器のトルエン量がベンゼンの回収率に及ぼす影響を調べるため、トルエン量を変化させ回収実験を行った。

蒸留水100mlに50 μ g/mlのベンゼン標準液を1ml添加し、トルエン量を1~8mlと変化させ回収率を調べた。その結果は、図3に示したようにトルエンの添

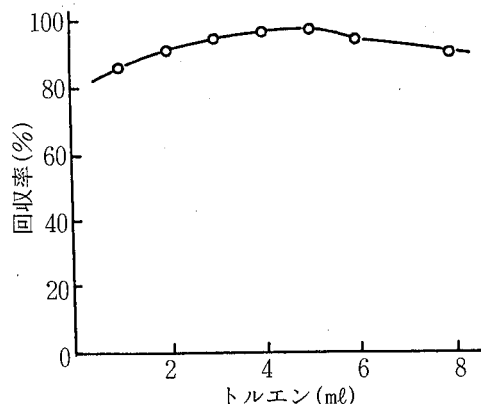


図3 トルエンの量の検討

加量が増加するに従って上昇し、3~4mlでほぼ一定となった。トルエンの添加量は、分析感度等から試験溶液の液量を10ml以下とする必要があるため、抽出器の洗浄量を考慮して5mlとした。

4 蒸留水の添加量の影響

試料に蒸留水を添加して蒸留操作を行うため、蒸留水の添加量がベンゼンの回収率に与える影響を調べる必要がある。

そこで、500 μ g/mlのベンゼン標準液を1mlとり、蒸留水の添加量を25~200mlと変化させ回収実験を行った。その結果は、図4に示したように添加量100~150

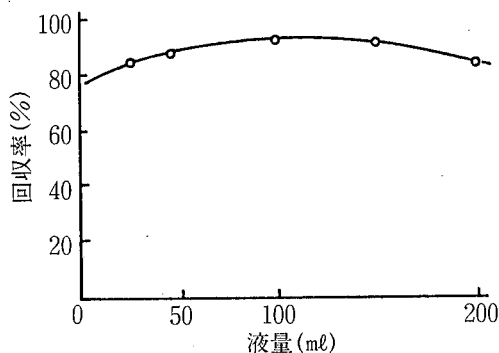


図4 蒸留水添加量の影響

mlで回収率はほぼ一定を示した。従って、蒸留水の添加量を100mlとした。

5 検量線、定量下限及び分析精度

検量線は、GC法では0~200 μ gの濃度範囲で、HPLC法では0~500 μ gで良好な直線を示した。また、定量下限はS/N比2とした場合、それぞれ13 μ g、10 μ gであった。

なお、試料中のベンゼン含有量の定量下限値は、試料1gを採取した場合、両法とも0.01W/W%であった。

次に、分析精度を求めるため、50 μ g/mlのベンゼン標準液を1ml添加し、GC法及びHPLC法により6回のくり返し実験を行った。その結果、変動係数は、前者が2.73%、後者が1.20%と良い結果が得られた。

6 実試料への適用

蒸留水にベンゼン標準液を添加した実験では良好な結果が得られたが、本法を家庭用品に適用するにあたっては、添加されている種々の有機溶剤等の影響及び塗料等の粘性を有する試料における回収率の低下が考えられる。

そこで、市販されている家庭用品17種類を用いてGC法(2分析条件)とHPLC法によるベンゼン含有量の測定と標準添加回収実験を併せて行い本法の実用性を検討した。その結果を表1(次頁参照)に示した。測定結果は、GC法ではPEG1500で分析した場合、塗料、うすめ液、エアゾル製品が、SP1200ではしみ抜き剤、カイロ用燃料で共存物質の妨害が認められた。一方、HPLC法ではさび止剤を除けば妨害が認められず、GC法に比べて妨害物質の影響が少ないことが認められた。

妨害物質の影響が認められた試料のうち、その一例として試料NO1、NO16クロマトグラムを図5(次頁参照)に示した。これらの試料は、ベンゼンのピークに妨害物質のピークが重なるため、標準添加回収実験を行っても正確な測定結果を得ることが困難であることを示した。従って、家庭用品中のベンゼン含有量を求めるには、少なくともGC法(2分析条件)とHPLC法とを併用して測定値を求める必要があると考えられる。

測定対象とした家庭用品中のベンゼン含有量を、GC法とHPLC法の平均値から求めると、しみ抜き剤一

1が1.9W/W%、しみ抜き剤-2が0.05W/W%未満、しみ抜き剤-3が3.7W/W%、カイロ用燃料-1が2.9W/W%、カイロ用燃料-2が1.6W/W%であった。それ以外の塗料、エアゾル製品等はいずれも0.05W/W%未満であった。

まとめ
家庭用品中のベンゼンの測定を目的として、揮発性成分の抽出・

表 1 家庭用品中のベンゼンの分析結果及び回収率

試料 NO	種 類	ベンゼン 添加量 (W/W%)	C G 法				HPLC法	
			PEG-1500		SP-1200		ベンゼン 検出量 (W/W%)	回収率 (%)
			ベンゼン 検出量 (W/W%)	回収率 (%)	ベンゼン 検出量 (W/W%)	回収率 (%)		
1	しみぬき剤-1	—	1.96	—	2.99	—	1.92	—
		1.0	2.76	93.2	3.51	88.8	2.76	94.5
2	しみぬき剤-2	—	<0.05	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	0.1	100	0.10	100	0.102	102
3	しみぬき剤-3	—	3.64	—	5.15	—	3.68	—
		2.0	5.24	92.7	6.41	89.7	5.08	94.8
4	カイロ用燃料-1	—	2.99	—	3.66	—	2.86	—
		2.0	4.39	88.0	4.86	85.7	4.24	87.2
5	カイロ用燃料-2	—	1.64	—	2.91	—	1.58	—
		2.0	3.44	94.7	4.42	90.0	3.32	92.7
6	塗 料 (工作用)	—	<0.05	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	0.095	95.0	0.098	98.0	0.105	105
7	塗 料 (玩具用)	—	<0.05	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	0.1	100	0.102	102	0.100	100
8	塗 料 (建材用)	—	0.65	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	1.60	95.0	0.967	96.7	0.895	89.5
9	塗 料 (建材用)	—	分析不能*	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	—	—	0.097	97.0	0.097	97.0
10	うすめ液 (エナメル用)	—	2.10	—	<0.05	—	<0.05	—
		2.0	4.20	102	1.79	89.5	1.89	94.5
11	うすめ液 (ペイント用)	—	分析不能*	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	—	—	0.098	98.0	0.094	94.0
12	エアゾル製品 (車)	—	<0.05	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	0.092	92.0	0.090	90.0	0.096	96.0
13	エアゾル製品 (窓)	—	<0.05	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	0.094	94.0	0.10	100	0.098	98.0
14	エアゾル製品 (タイヤ)	—	<0.05	—	<0.05	—	<0.05	—
		0.1	0.096	96.0	0.096	96.0	0.089	89.0
15	エアゾル製品 (ピッチクリナー)	—	1.05	—	<0.05	—	<0.05	—
		1.0	2.00	97.6	1.00	100	1.05	105
16	エアゾル製品 (さび止め剤)	—	<0.05	—	<0.05	—	6.63	—
		0.1	0.096	96.0	0.097	97.0	6.65	103

*分析不能とは妨害ピークのためベンゼン量を求めることができないもの。

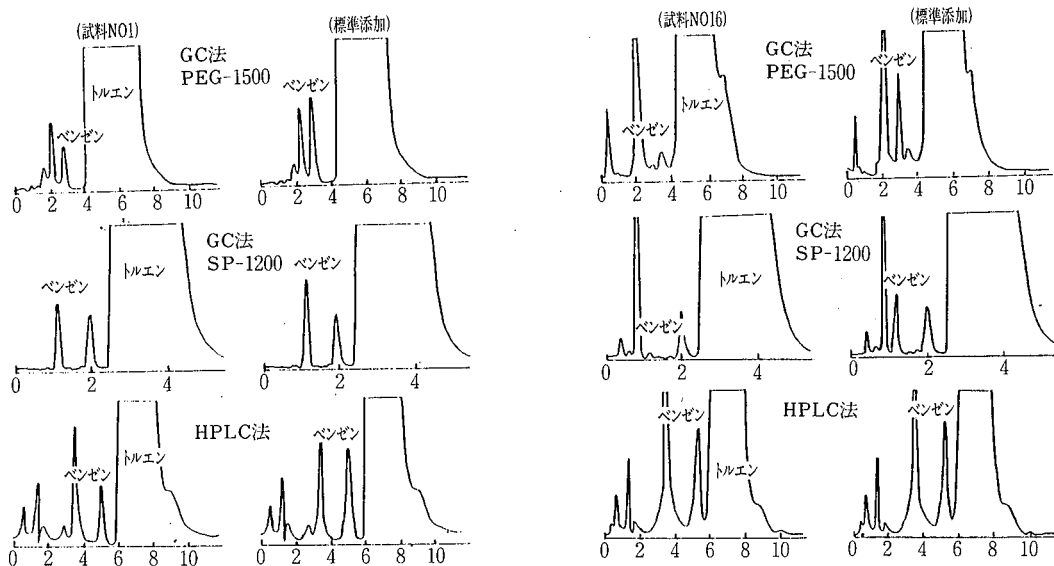


図 5 試料NO1, 16のクロマトグラム

分離に使用されている精油定量装置を一部改良した蒸留装置を試作し、実試料への適用性を試みた。その結果、本法は抽出効果も高く、しかも操作が簡易であり、実試料中のベンゼン含有量の測定法の前処理として十分利用できると思われる。

(第26回全国衛生化学技術協議会年会(神戸)で発表した。)

文 献

- 1) L. Parmeggiani, "Encyclopaedia of Occupational Health and Safety." 3th Edision, 257 (1983)
- 2) OSHA. Federal Register, 52 (176), Friday, September 11, 1987, 34460
- 3) 五十嵐良明, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 真鍋静子, 中島晴信, 松永一朗, 仲村智子, 斉藤 稔, 中島重人, 青山大器, 宇都宮暁子, 長谷川一夫, 中川友夫, 瀬上昭子, 鈴木助治, 中村義昭, 中島慶子 : 家庭用有機溶剤中のベンゼンの分析—基準作成にむけてクロスチェックの試み—, 第25回全国衛生化学技術協議会年会, 講演要旨集, 186, 1988
- 4) 五十嵐良明, 鹿庭正昭, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 青山大器, 中島重人 : 家庭用有機溶剤中のベンゼンの分析, 日本薬学会第109年会, 講演要旨集, 6 H-3-5, 1989
- 5) 大野浩之, 青山大器 : 微量拡散法を応用した家庭用有機溶剤商品中のベンゼンの分析, 衛生化学, **36**, 143~148, 1990
- 6) 下川洪平, 高田英明, 渡辺憲人 : 水蒸気蒸留法による河川底質中のポリクロロビフェニルの定量法, 分析化学, **27**, 452~454, 1978

Determination of Benzene in Household Necessities by Entrainment Distillation with Water.

岐衛研所報

Rep. Gifu
Inst. P. H.

水道水中のジクロロエチレンの測定

寺尾 宏*, 森 仁*, 今井 準 三*

はじめに

近年、低沸点有機塩素化合物による地下水汚染が大きな社会問題となっている。1989年6月には「水質汚濁防止法」が改正され、地下水の汚濁防止が法の目的に加えられ、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンが有害物質に指定された^{1,2)}。環境庁では1982年(昭和57年度)から、全国規模の汚染調査を継続しており、1989年12月に発表された昭和63年度の調査結果では、ジクロロエチレンの検出率が高く、WHO ガイドライン、EPA 基準値を超える井戸もみられた³⁾。ジクロロエチレンには3種類の異性体(1, 1-ジクロロエチレン, cis 1, 2-ジクロロエチレン, trans 1, 2-ジクロロエチレン)が存在するが、工業的にはcis体、trans体はほとんど生産されていない。cis体はトリクロロエチレンの微生物分解により生成するという報告⁴⁾もあり、土壤中で細菌などの働きにより分解してジクロロエチレンが生成する可能性が高いと考えられている。

これらの調査結果をふまえて、厚生省から水道水に含まれるジクロロエチレンのガスクロマトグラフによる測定方法が参考資料として示された⁵⁾。この方法は、溶媒抽出法による前処理を行い、パックドカラムSP-1000/Carbopack Bを用いるECDガスクロマトグラフによる方法である。しかし、問題点がいくつか認められたので、改めて3種類のジクロロエチレンを対象に測定方法の検討を行った。さらにトリクロロエチレンが検出されている水源井などを対象に、ジクロロエチレンの測定を試みた。

方 法

1. ガスクロマトグラフィ

厚生省の示した方法にかえて、キャピラリカラムVOCL (ECD検出器)、パックドカラムSP-1200 (FID検出器)を用いてジクロロエチレン3物質の分離条件、検出感度などの検討を行った。

2. 試料の前処理

測定方法の検討、試料の測定はすべてヘッドスペース法による。試料100mlをバイアルびん(100ml)に採り、恒温水槽で25℃、1時間以上放置し、気相1mlを注入した。標準溶液の調製には、使用前に戸外で十分煮沸を続け、水で急冷した蒸留水を使用し、バイアルびんも使用前に加熱処理を行った。なお、恒温水槽に入れるまでの操作は実験室の汚染を避けるためにすべて戸外で行った。

3. 試料の採取

1990年3月6日、4月11日の2回、トリクロロエチレンが検出されているためブロー処理を行っているA水道の水源井、ブロー処理水、給水栓水の3カ所から採水を行った。また、微量のトリクロロエチレンが検出されているB水道の水源井7カ所の採水も行った。

結果および考察

1. ガスクロマトグラフィ

ECD, およびFIDの測定条件の検討を行い、その結果を表1に示した。VOCOL (30m×0.53mm)によるクロマトグラムを図1に示したが、3物質の分離状態を向上させるためにはカラム温度を下げる必要があるであり、オープンのふたを開けた状態で27~28℃に保ち測定を行った。検出感度は1,1体0.1μg/l, cis体5μg/l, trans体2μg/lであった。cis体の標準(Aldrich, ガスクロ工業)はいずれも不純物としてクロロホルム、四塩化炭素が含まれており、大き

* 岐阜県衛生研究所: 500 岐阜市野一色4丁目6番3号

* Gifu Prefectural Institute of Public Health: 6-3, Noishiki 4 chome, Gifu 500, Japan

表 1 ガスクロマトグラフの測定条件

○ECD (島津 4 BM, 14A)	
カラム	VOCOL (SPELCO社製) 30 m × 0.53 mm ID, 3.0 μm Film
カラム温度	27-28°C (温度計による実測)
注入口温度	200 °C
検出器温度	200 °C
窒素流量	20 ml/min以下 (0.9 kg/cm ²) 20 ml/min (メイクアップ)
試料注入量	1 ml (ガスタイトシリンジ)
○FID (島津 4 CM)	
カラム	SP-1200/UniportB 60-80 mesh 2 m
カラム温度	80°C (温度計による実測)
注入口温度	150 °C
検出器温度	150 °C
窒素流量	30 ml/min
試料注入量	1 ml (ガスタイトシリンジ)

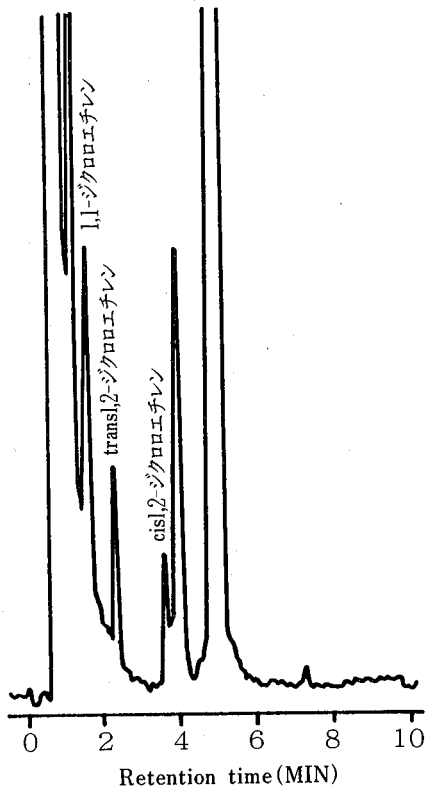


図 1 VOCOL による標準物質のクロマトグラム

な妨害ピークを示した。

SP-1200によるクロマトグラムを図2に、検量線を図3に示した。カラム温度は80°Cで、分離は良好で

あった。特に、共存する可能性の強いクロロホルム、四塩化炭素は感度が極めて低く、リテンションタイムが大きく異なること、あるいは標準の希釈溶媒メタノー

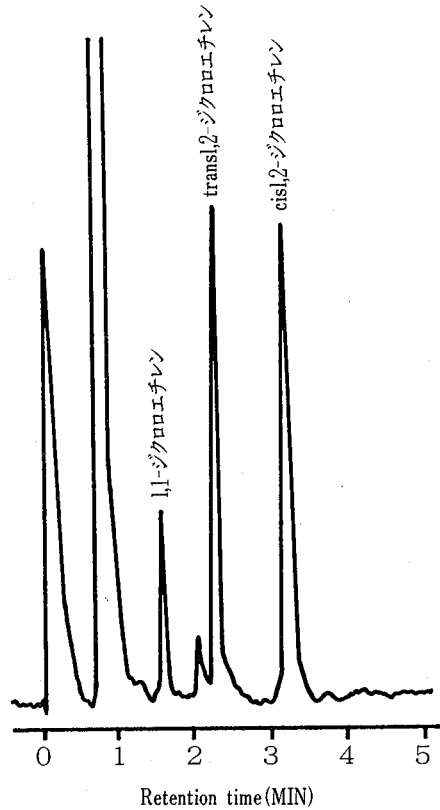


図 2 SP-1200による標準物質のクロマトグラム

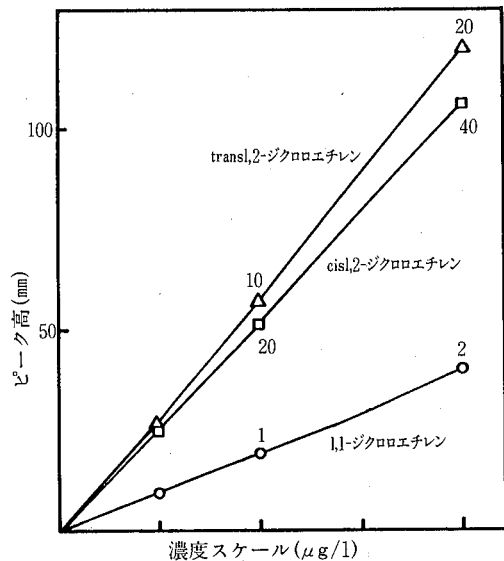


図 3 SP-1200によるジクロロエチレンの検量線

ルの妨害を受けないことなどが大きな利点である。検出感度は、1, 1 体 $0.1 \mu\text{g}/\ell$, cis 体 $1 \mu\text{g}/\ell$, trans 体 $0.5 \mu\text{g}/\ell$ であり cis 体, trans 体は ECD より高感度であった。

以上の結果から SP-1200 (FID) を用いる方法がすぐれており, VOCOL (ECD) を併用することにより, 上記検出感度で水道水中のジクロロエチレンの測定ができることが明らかになった。また, 注入量を多くすること, 検出器の測定感度を上げることにより感度を高くすることも可能であると思われる。

厚生省の方法は, cis 体と共存するクロロルムのピークが重なること, ベースラインが溶媒の影響を受けて不安定なことなどの問題点があった。水道水のジクロロエチレンを対象とした測定には用いることはできなかった。

2. 採水した水道原水などの測定結果

表 2 にジクロロエチレンの測定結果と種々の基準値, ガイドライン値を示したが, A 水道の水源井からジクロロエチレンを検出した。WHO ガイドライン, EPA

表 2 A 水道水源井の測定結果と基準値等との比較

物質名	90.3.6	90.4.11	WHO	EPA
1, 1-ジクロロエチレン	0.2	0.3	0.3	7
cis 1, 2-ジクロロエチレン	1	1	—	70
trans 1, 2-ジクロロエチレン	< 0.5	< 0.5	—	100
(水道水暫定基準値)				
1, 1, 1-トリクロロエタン	< 1	< 1	300	
トリクロロエチレン	59	54	30	
テトラクロロエチレン	< 1	< 1	10	

基準値と比較すると, 1, 1-ジクロロエチレンが WHO ガイドラインと同じレベルであった。しかし, ブロア処理水, 給水栓はいずれも検出限界 ($1, 1$ 体 $0.1 \mu\text{g}/\ell$, cis 体 $1 \mu\text{g}/\ell$, trans 体 $0.5 \mu\text{g}/\ell$) 未満であった。これは, ブロア処理によりトリクロロエチレンと共にジクロロエチレンが揮散するためと考えられる。また, B 水道の 7 水源井はいずれも検出限界未満であった。前述したように, ジクロロエチレンの生成はトリクロロエチレンの分解によるという視点に立てば, あわせて測定したトリクロロエチレン濃度 (ヘッドスペース法/ECD-VOCOL) は $2 \sim 6 \mu\text{g}$

$/\ell$ の低い濃度範囲にあることが, 不検出となった原因の 1 つと考えられる。

前述の環境庁の調査報告によると, 1, 1-ジクロロエチレンは調査対象の 15.9% の井戸から検出され, WHO ガイドライン ($0.3 \mu\text{g}/\ell$) を超過する割合が 10.6%, cis 体は 31.2% の井戸から検出され, EPA 基準値 ($70 \mu\text{g}/\ell$) を超過する割合は 6.7% であった。岐阜県では A 水道の水源井の外に高いトリクロロエチレンを含む水道施設はないので, ジクロロエチレンが分解生成物と考えると, ジクロロエチレンによる地下水汚染はほとんどないと考えられる。

なお, ヘッドスペース測定用試料, 標準溶液の調製には細心の注意が必要である。採水日に調製, 測定を行わないと目的ピーク付近に夾雑ピーク (未同定) が出現することを経験した。

文 献

- 1) 早川哲夫: 水質汚濁防止法の改正と地下水質保全, 水道協会雑誌, **662**, 29~39, 1989
- 2) 早瀬隆司: 水質環境保全のための有害化学物質対策, 公害と対策, **25**, 1111~1116, 1989
- 3) 環境庁水質保全局: ジクロロエチレンによる地下水汚染について, 環水管第 266 号, 1989
- 4) 新潟県衛生公害研究所: 有機塩素系溶剤の環境における動態及び分解性に関する研究報告書, 46~50, 1988
- 5) 厚生省水道整備課: ジクロロエチレンによる地下水汚染について (事務連絡), 1989

Measurement of Dichloroethylenes in Drinking Water

〈 他 誌 掲 載 論 文 〉

1986年岐阜県におけるエコーウイルス7型による無菌性髄膜炎の流行について

三輪智恵子, 渡辺 豊 (岐阜県衛生研究所)

感染症誌, 63(6), 584~592, 1989

1986年4月から11月にかけて, 岐阜県で無菌性髄膜炎 (AM) の流行がおこった. 190症例について疫学的・ウイルス学的に検討し, 更に血清疫学的に流行原因についても検討した結果, 以下の事が判明した.

1. 患者の年齢は, 0歳から30歳に分布していたが, 7歳以下が84.2%を占めていた.
2. 190症例中136症例 (71.6%) より, 7種類のエンテロウイルスが分離されたが, 121症例 (88.9%) からエコーウイルス7型 (Echo-7) が分離された.
3. 交差中和試験で, Echo-7 の1986年分離株と標準株との間の抗原構造は, 大差がなかった.
4. 岐阜県内住民の過去10年間の血清疫学的調査により, Echo-7 に対する抗体保有率が低下していたことが判明した.
5. 過去18年間, 岐阜県では Echo-7 は分離されなかったが, 血清疫学的調査により散発的小流行があったことが確認できた.

無菌性髄膜炎の疫学的, 臨床的検討 (第5報)

—エコーウイルス7型による

髄膜炎の臨床的検討—

近藤富雄, 安田寛二, 山崎嘉久, 西田 隆,
平泉泰久, 藤井秀比古 (大垣市民病院小児科)
長澤宏幸 (岐阜大学医学部小児科学)
三輪智恵子 (岐阜衛研)

小児科診療, 52 (12), 2761~2766, 1989

1986年に経験したエコーウイルス7型による髄膜炎112例について臨床的に検討した. 月別では7月が最多であった. 年齢分布は乳幼児に多かった. 臨床症状は発熱100%, 嘔吐85.7%, 頭痛78.6%, 項部硬直57.1%などであった. 血液検査では, 正常から軽度の炎症反応を示した. 髄液所見は, 細胞数の平均が799/3/

mm³であり, 蛋白量, 糖量は大部分が正常範囲であった. 急性期頭部CT像, 脳波にて数例に異常がみられた.

Survey of Human Rotavirus Serotypes in Different Locales in Japan by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Monoclonal Antibodies

Shozo Urasawa, Tomoko Urasawa, Koki Taniguchi, Fumiko Wakasugi, Nobumichi Kobayashi, Shunzo Chiba, Norio Sakurada, Morihiro Morita, Osayuki Morita, Masayoshi Tokieda, Hiroyoshi Kawamoto, Yoshiichi Minekawa, Mitsuaki Ohseto
J. Infect. Dis. 160 : 44~51, 1989

(型特異モノクローナル抗体 ELISA 法による本邦7地域におけるA群ヒトロタウイルス血清型疫学)

日本国内各地に広く侵淫しているA型ヒトロタウイルス (HRV) の各血清型の相対的頻度を調査すべく, 本邦7地域で1986年11月から1988年3月までを調査期間とし, HRV 感染が証明された胃腸炎患者糞便の合計562検体について1~3型の各血清型特異モノクローナル抗体を用いて ELISA 法により血清型別試験を実施した.

調査の結果, 全国的には1986年から1987年冬季には1型が優位を占めたが, 翌年の1987年から1988年冬季には1型と2型が高頻度に検出された. また, 同じ地域内調査成績の比較で, 各血清型の地域内侵淫状況を, 個々の地域で年次的に変遷していることを血清型別相対頻度で示した.

また, HRV 亜群抗原I型とII型のそれぞれ特異的なモノクローナル抗体による ELISA 法を用い, 今回得られた HRV 株の血清型と亜群の関連を検討し次の結果を得た. 亜群抗原I型を保有した HRV 血清型は2型で, 亜群抗原II型を保有した血清型は1, 3, 4型のいずれかであるという基本所見が確定した. ま

た、亜群抗原 I 型と II 型の両方を保有するか又はそのいずれをも保有していなかった通常型でない HRV や新血清型を代表するとおぼしき分離株も今回の調査で発見された。

本邦 7 地域における下痢症患者便中ヒトロタウイルスの血清型別試験成績

浦沢正三, 浦沢价子, 谷口孝喜
(札幌医大衛生学教室)

千葉峻三 (札幌医大小児科)

桜田教夫 (北海道立衛生研究所)

森田盛大 (秋田県衛生研究所)

森田修行 (富山県衛生研究所)

時枝正吉 (千葉県衛生研究所)

川本尋義 (岐阜衛研)

峰川好一 (大阪府立公衆衛生研究所)

大瀬戸光明 (愛媛県衛生研究所)

臨床とウイルス, 17: 132~136, 1989

患者下痢便中に排出される本ウイルスの血清型の同定は、本ウイルス感染症でしばしば経験される乳児期の再感染の機序の解明、さらに世界各地における各血清型のウイルスの疫学的意義の理解のためにも重要である。しかし細胞培養によるウイルスの分離と血清型の同定には長時間を要し、またその分離率も低いため、細胞培養を用いない簡便な血清型別法の確立が待たれていた。

我々は、血清型 1~4 の各型ヒトロタウイルスをマウスに免疫して 30 余種の単クロン抗体を作成し、これらを用いて本ウイルスの抗原構造の解析を行っているが、これらのうち血清型 1~4 特異的単クロン抗体 (いずれも各型ウイルスの VP 7 上の特異的抗原エpitep と反応する) を用いる ELISA 法により、糞便材料中のヒトロタウイルスを直接血清型別 (serotyping) する方法を開発した。また蛍光フォーカス中和試験によって得られた成績との比較により、本法の有用性を確認している。

本論文では、この方法を用いて、1986年~1987年と 1987年~1988年の 2 冬期間にわたり、本邦におけるヒトロタウイルス各血清型の地域別検出頻度について検討し報告した。

北の札幌市より順に、各地域における 1986~1987年、1987~1988年の 2 冬期間について、週別の各型ウイルスの検出状況を調査した。

札幌では 1 型ウイルスが最初の冬の全期間にわたって高頻度に検出されたのに対し、2 年目の冬には代わって 2 型ウイルスが 12 月を中心に頻度高く検出された。この間 3 型ウイルスの分離はなかった。秋田ではこの 2 年間を通じて血清型の確定した株のほとんどすべてが 1 型であった。高岡 (富山県) では初年度の冬には全血清型が検出されたが、63 年に入り検出された株は 3 例を除きすべてが 1 型ウイルスという際立った変化が見られた。市原 (千葉県) では 2 冬期間を通じて各種の血清型の浸淫が見られた。岐阜でも両冬期間を通じ全血清型が検出されたが、初年度には 3 型、次年度には 4 型の分離が最も高頻度であった。大阪も同様、全期間を通じて 4 血清型共に浸淫が見られたが、1 型の頻度が比較的高かった。松山では初年度の冬は全期間にわたり、1 型が終始高率に分離されたが、2 年目の冬には 1 型と 2 型が共に高頻度に検出された。

全体として 1, 2, 3, 4 型ウイルスの検出頻度は順に、40.5%, 21.3%, 8.8%, 6.1% であり、23.8% で血清型の決定ができなかった。また札幌、岐阜、大阪、松山の各地においては、初年度に比して 2 年目の冬に 2 型ウイルスが高率に検出されたことが注目される。

本研究において、糞便材料中の A 群ロタウイルスの確認は、A 群ウイルス特異的単クロン抗体を用いる ELISA 法により行った。A 群検出用キットに比し、これと同等またはより以上のウイルス検出率を示したことから、A 群ウイルス検出における本法の sensitivity はほぼ満足すべきものと考えられる。

岐阜県における小児冬季胃腸炎下痢症に関連した A 群ヒトロタウイルス流行と血清疫学

川本尋義 (岐阜衛研)

北村政和, 久野保夫, 田中 浩

(県立岐阜病院小児科)

浦沢正三, 浦沢价子, 谷口孝喜

(札幌医大衛生学教室)

小児科臨床, 42: 1493~1498, 1989

冬季型胃腸炎・下痢症の気象因子との関連を分析し、また主病因としてのA群 HRV について感染源および感受性調査を実施した。1986年11月から翌年3月までの初回調査では92名の患児から、1987年11月から翌年3月までの2次調査では114名の患児から糞便206検体と血清140検体（内47ペア血清）を採取し、次の調査成績を得た。①岐阜地域の乳児嘔吐下痢症の流行は月平均気温が10℃を下回る頃から流行が始まり、5℃以下になると最盛期を向かえ、10℃以上になると流行は終息する周期が示され、本症発生流行予測にこの月平均気温が有効な指標となることが示唆された。②患児糞便のR-PHA検査による抗原陽性は合計206名中100名（48.5%）、初回調査で67.4%、次回調査で33.3%であった。また、陽性糞便からのA群HRV血清型の鑑別では、初回調査では3型が全体の50%、次回調査時は4型が全体の39.1%を占め血清型分布に年次推移変遷が認められた。

日本の1984年における牛および豚の *Chlamydia psittaci* に対する抗体保有状況

緒方勇人（岐阜県関保健所）

長野 功（岐阜衛研）

長谷川孝明，佐橋 隆

（岐阜県大垣食肉衛生検査所）

平井克哉（岐阜大学・農学部）

日獣会誌，42(11)，799～802，1989

1984年に牛および豚それぞれ約500頭から採取した血清について *C. psittaci* の抗体保有状況を complement fixation (CF) test により調査した。抗体保有率は牛では15.9%であり、生産県別において若干の差が認められた。また、加齢により保有率の上昇する傾向があった。しかし、肉眼病変と保有率の間には明らかな関係は認められなかった。いっぽう、豚においては1.2%と低率であったが、豚のクラミジア感染が本邦においても存在する可能性を示唆していると思われた。

神経芽細胞腫マスキリングにおけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究

（第一報）クレアチニン分解菌の分離と

その汚染状況について

後藤喜一，田中久子，今井準三，河合 信
（岐阜衛研）

日本公衛誌，36，645～651，1989

Dip法を用いる神経芽細胞腫（NB）検査で、ろ紙尿の細菌汚染を解明する目的で、著者らの考案した Nalidixic acid-Creatinine 培地（NA-Cre 培地）を用いてクレアチニン（Cre）分解菌の検査を行った。

1987年1月～1988年2月に提出されたる紙尿1,003件の検索成績から、Cre分解菌の検出率は年間を通じて約20%であった。Cre分解能を有する分離株197株のうちの代表株について同定検査を行った結果、*Arthrobacter* 175株、*Micrococcus* 14株、*Pseudomonas* 8株であった。

ろ紙尿中のCre量とCre分解菌との関係について検討した結果、Cre分解菌検出尿のCre平均値はCre分解菌不検出尿の1/2以下であり、またCre分解菌陽性の尿でCre値の低い尿が多く認められた。これらの事実から、Cre分解菌がろ紙尿のCre異常低値現象の一要因になり得ることが明らかとなった。

神経芽細胞腫マスキリングにおける濾紙尿の細菌汚染に関する研究

第二報：クレアチニン分解性 *Arthrobacter* の血清型別の試み

後藤喜一，長野 功，所 光男，今井準三，
岩田久子，河合 信（岐阜衛研）

臨床と微生物，17(1)，83～88，1990

NB検査における濾紙尿のCre異常低値をきたすCre分解菌の1つであるCre分解性 *Arthrobacter* の血清型別を検討して、次のような結果を得た。

(1) クロム処理抗原を免疫原として調製した免疫血清は、生菌抗原で2～8分離株間に類属凝集反応を認めたが、類属凝集反応を示した当該菌で吸収することにより類属凝集素が除かれ、単味抗血清が得られた。

(2) 継続検査で分離された *Arthrobacter* の単味抗血清による血清型別の成績から、Cre分解性 *Arthrobacter* が持続的に家庭内に常在し、濾紙尿の細菌汚染源になり得るであろうと推定された。

(3) 濾紙尿由来 *Arthrobacter* のみで調製した26単味抗血清に該当しない分離株が多数存在したことから、環境に常在する *Arthrobacter* の血清学的分類には広い範囲からの菌株収集と多数の免疫血清を調製する必要がある。

神経芽細胞腫マスキリングで経験した

VMA 反応偽陽性の原因物質

—キサンツレン酸—

今井準三, 岩田久子, 後藤喜一, 河合 信

(岐阜衛研)

松川洋子, 山本隆雄

(岐阜県可茂保健所)

松浦健二, 竹内千尋 (日本電子株式会社)

山口清次 (岐阜大学医学部小児科学教室)

医学のあゆみ, 152(2), 133~134, 1990.

神経芽細胞腫マスキリング (NB検査) において、尿ろ紙を用いる VMA 呈色反応 (Dip 法) では強い陽性を示したが VMA, HVA 値は正常範囲である例に遭遇した。VMA に似た発色を示した原因物質を薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー質量分析法より検索したところ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で認められた不明ピークが VMA 呈色反応偽陽性の原因物質であり、トリプトファン代謝物のキサンツレン酸であると判明した。キサンツレン酸はトリプトファン代謝異常症で尿中排泄が増加することが知られており、尿より塩酸性で酢酸エチルに抽出可能であった。また尿を希釈するだけの直接分析でも容易に分離確認が可能 (電気化学検出器) であったので、今後 NB 検査の HPLC により、キサンツレン酸尿症などのトリプトファン代謝異常症も同時にスクリーニング可能であることを示唆するものと考えられる。

Differential Inhibitory Effects of Various Herb Extracts on the Activities of Reverse Transcriptase and Various Deoxyribonucleic Acid (DNA) Polymerases

Katsuhiko Ono, Hideo Nakane

(愛知県立ガンセンター)

Meng Zheng-mu (中国薬科大学)

Youki Ose, Mizuo Mizuno (岐阜薬科大学)

Yoshimichi Sakai (岐阜衛研)

Chemical and Pharmaceutical

Bulletin, 37(7), 1810~1812, 1989

(逆転写酵素および種々 DNA ポリメラーゼの活性における薬草エキスの阻害作用)

アジア地域で採取された28種の薬草から得られたエキスより調製した40種の試料について、ネズミレトロウイルス逆転写酵素およびヒト DNA ポリメラーゼの活性阻害を検討した。40種のうち35種が逆転写酵素活性を阻害し、29種が DNA ポリメラーゼ α 活性を阻害した。これらエキスの阻害活性は、酵素活性が50%阻害されたとき IC_{50} で示した。特に強い阻害を示したのは、*Millettia pachycarpa* と *Mallotts apelta* で、逆転写酵素活性は、0.4~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, DNA ポリメラーゼ α 活性は、0.9~1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で阻害を示した。酵素反応速度分析では、テンプレートプライマー [poly (rA) \cdot oligo (dT)] に関する競合阻害とデオキシ三リン酸 (dTTP) 基質に関する非拮抗阻害によることが示された。逆転写酵素と DNA ポリメラーゼ α の他に、*E. coli* から得られた DNA ポリメラーゼ I と RNA ポリメラーゼもこれら2つのエキスにより活性が阻害された。これらの結果は、まだ同定されていないが、逆転写酵素と細胞内 DNA ポリメラーゼの活性を阻害する因子がこれら薬草中に含まれていることを示している。

芍薬成分のベンゾ [a] ピレンに対する抗変異原性作用

坂井至通, 河合 信 (岐阜衛研)

小瀬洋喜 (岐阜市立女子短期大学)

永瀬久光, 鬼頭英明, 佐藤孝彦, 水野瑞夫

(岐阜薬科大学)

衛生化学, 35(6), 433~443, 1989

漢方処方にも繁用される生薬のエキス18種について、ベンゾ [a] ピレン (B[a]P) に対する抗変異原活

性を検討し、芍薬エキスに強い活性が認められた。芍薬エキス中の抗変異原活性因子を検索するため、芍薬エキスをさらに酢酸エチルおよびn-ブタノールで抽出し、これら抽出エキスの抗変異原活性を調べたところ、両エキスともB[a]Pに対する強い抗変異原活性が観察された。酢酸エチルエキスは、セファデックス LH-20 によって20のフラクション (Fr. 1-20) に、n-ブタノールエキスは、分取高速液体クロマトグラフィーによって6のフラクション (Fr. 21-26) にそれぞれ分画した。これらフラクションの内、抗変異原活性を示した Fr. 2 と Fr. 22 は没食子酸 (GA), Fr. 9-12 はペンタガロイルグルコース (PGG) であることが明らかとなった。高速液体クロマトグラフィーによる両エキス中のGAおよびPGG含量の分析結果から、エキスの抗変異原活性は、主にこれら化合物によるものと考えられた。GAとPGGが抗変異原活性を示す作用機作としては、(I) B[a]Pとの反応および吸着、(II) S9mix中の酵素活性阻害、(III) 変異原性物質の代謝物に対する不活性化、(IV) DNA損傷菌に対する作用、などが考えられたので、それぞれについて検討を加えた。その結果、GAとPGGは、変異原性代謝物に対して不活性化作用を示し、また、PGGはさらにS9mixの酵素活性の発現を抑制することによりB[a]Pの代謝を阻害することが認められた。また、これらの化合物が、B[a]Pと反応したり吸着作用を示さないこと、DNA損傷菌に対して作用をしないことから、両化合物の抗変異原性作用は de-smutagen 作用であることを確認した。

養殖ニジマスにおけるナリジクス酸及びその代謝物の組織内濃度について

(第2報) ナリジクス酸のニジマスにおける残留性及び *in vitro* における淡水魚肝マイクロソーム酸化について

春日洋二, 棚橋宣康 (岐阜衛研)
荒井 真, 森川 進 (岐阜水試)
食品衛生学雑誌, 31(2), 166~170, 1990

ニジマスにナリジクス酸 (以下NA) の20mg/kgを一日量として5日間自由経口で投与し、その残留性を検討し、又、NAの *in vitro* におけるヒドロキシル化活性をニジマス、アユ、イワナ、ヤマメ及びアマゴを用いて検討したところ、次のような結果を得た。

NAの残留試験では、血清、肝臓、腎臓及び筋肉の平均濃度は投薬後1日目で最高値 (それぞれ7.18, 8.48, 11.89及び5.04 μg) を示し、5日目までは指数関数的に減少した。その後は数十ppbの低レベルで推移し、全組織とも投薬後16日で検出限界未満となった。投薬後7日目の上記各組織のNA濃度はそれぞれ 0.03 ± 0.01 , 0.03 ± 0.01 , 0.03 ± 0.01 及び $0.04 \pm 0.00 \mu\text{g/g}$ であり、公定法での検出限界が $0.05 \mu\text{g/g}$ であることから、現行休薬期間 (7日) を遵守すればニジマス中のNA濃度は検出限界未満となり、食品衛生上問題ないと言えるが、飼育条件の多様性、より高感度な分析法の開発等を考慮すれば16日程度の休薬期間が望まれる。

NAの肝マイクロソーム酸化では、ニジマス、アユ、イワナ、ヤマメ及びアマゴの各魚種及び魚類と哺乳動物を比較する目的でマウスについてヒドロキシル化活性を測定したところ、魚類の活性はマウスの1/10であった。又、ニジマスと他の魚種では活性に殆ど差は無かった。本結果と既報でNAを投与した時の代謝物の組織内濃度が未変化体に比べてかなり低かったことを考え合わせると、ニジマス同様他の魚種においても抗菌性を有する代謝物の組織内濃度は未変化体よりかなり低いことが推察され、その残留は食品衛生上問題にならないと考えられる。

学 会 報 告

- 岐阜県におけるエコーウイルス18型による無菌性髄膜炎について

三輪智恵子, 渡辺 豊 (岐阜衛研)

第62回日本感染症学会総会 平成元年 4 月 盛岡市

- 市販抗原によるアメーバ症の血清学的診断

長野 功 (岐阜衛研)

大友弘士 (岐阜大学・医学部)

増田剛太 (都立駒込病院・感染症科)

第63回日本感染症学会総会 平成元年 4 月 盛岡市

- フェノールカルボン酸類の Benzo [a]pyrene に対する抗変異原性

坂井至通, 河合 信 (岐阜衛研)

小瀬洋喜 (岐阜市立女子短期大学)

永瀬久光, 鬼頭英明, 佐藤孝彦, 長谷川浩一,

水野瑞夫 (岐阜薬科大学)

日本薬学会第109年会 平成元年 4 月 名古屋市

- 丹参エキスの変異原性に対する作用

孟 正木 (中国薬科大学)

坂井至通 (岐阜県衛研)

小瀬洋喜 (岐阜市立女子短期大学)

佐藤元泰, 佐藤孝彦, 永瀬久光, 鬼頭英明,

早野美穂 (岐阜薬科大学)

日本薬学会第109年会 平成元年 4 月 名古屋市

- 神経芽細胞腫マスキリーニング検査におけるろ紙尿の細菌汚染に関する研究

(第5報) 生尿における Cre 分解菌の作用と汚染防止対策の試用成績

田中久子, 今井準三, 後藤喜一, 河合 信

(岐阜衛研)

第59回日本衛生学会総会 1989年 4 月 秋田市

- 小児ろ紙尿から分離された Creatinine 分解性 *Arthrobacter sp* の血清型別の試み

後藤喜一, 今井準三, 所 光男, 長野 功,

河合 信 (岐阜衛研)

日本防菌防黴学会第16回年次大会 平成元年 5 月

東大阪市

- 「生カキ」摂食に起因した急性胃腸炎集団発生からのウイルス学的病原検索による小型球形粒子 (SRV) の高頻度検出事例について

川本尋義, 三輪智恵子 (岐阜衛研)

長谷川澄代, 森田修行 (富山県衛生研究所)

小林信行, 杉藤善樹 (元伊奈波保健所)

後藤判友 (県衛生環境部生活衛生課)

第35回東海公衆衛生学会 平成元年 6 月 名古屋市

- MTTアッセイによるリンパ球幼若化反応の評価と牛乳投与の影響

渡辺 豊, 長野 功, 猿渡正子 (岐阜衛研)

第35回東海公衆衛生学会 平成元年 6 月 名古屋市

- CF用アメーバ抗原による ELISA 法の確立とその有用性の検討

長野 功 (岐阜衛研)

大友弘士 (岐阜大学・医学部)

増田剛太 (都立駒込病院・感染症科)

第35回東海公衆衛生学会 平成元年 6 月 名古屋市

- 水道水の pH 測定における問題点の検討

寺尾 宏, 森 仁 (岐阜衛研)

第35回東海公衆衛生学会 平成元年 6 月 名古屋市

◦ 神経芽細胞腫マスキリーニングの精度向上に関する研究

— VMA, HVA 溶液の安定性 —

大平恵美子, 岩田久子, 今井準三, 後藤喜一,
河合 信 (岐阜衛研)

第35回東海公衆衛生学会 平成元年6月 名古屋市

◦ エコーウイルス16型による発疹症の流行について

三輪智恵子, 渡辺 豊 (岐阜衛研)

第30回日本臨床ウイルス学会
平成元年6月 金沢市

◦ 腸炎ピブリオとピブリオ・フルビアリスの検出された2つの食中毒事例

所 光男 (岐阜衛研)

衛生微生物技術協議会第10回研究会
平成元年7月 秋田市

◦ 抗変異原物質の構造活性相関

坂井至通, 河合 信 (岐阜衛研)
小瀬洋喜 (岐阜市立女子短期大学)
吉岡義正 (岐阜医療技術短期大学)
鬼頭英明, 佐藤孝彦, 長谷川浩一, 水野瑞夫
(岐阜薬科大学)

日本薬学会東海支部大会 平成元年7月 岐阜市

◦ 水蒸気蒸留法による家庭用品中のベンゼンの分析

森 仁, 今井準三 (岐阜衛研)

第26回全国衛生化学技術協議会年会
平成元年9月 神戸市

◦ ヒトロタウイルス ELISA — serotyping による血清型別不能糞便ウイルスの検討

浦沢正三, 浦沢价子, 谷口孝喜, 若福富美子,
小林宣道 (札幌医大衛生学教室)
千葉峻三 (札幌医大小児科)
桜田教夫 (北海道立衛生研究所)
森田盛大 (秋田県衛生研究所)

森田修行 (富山県衛生研究所)
時枝正吉 (千葉県衛生研究所)
川本尋義 (岐阜衛研)
峰川好一 (大阪府立公衆衛生研究所)
大瀬戸光明 (愛媛県衛生研究所)

第37回日本ウイルス学会総会
平成元年10月 大阪市

◦ 血清型特異単クローン抗体を用いた ELISA 法による岐阜地域におけるヒトロタウイルス血清型疫学

川本尋義 (岐阜衛研)
田中 浩 (県立岐阜病院小児科)
浦沢正三, 浦沢价子, 谷口孝喜
(札幌医大衛生学教室)

第37回日本ウイルス学会総会
平成元年10月 大阪市

◦ 岐阜県内に発生した小型球形粒子 (SRV) による「生カキ」摂食中毒様急性胃腸炎集団発生

川本尋義, 三輪智恵子 (岐阜衛研)
長谷川澄代, 森田修行 (富山県衛生研究所)

第37回日本ウイルス学会総会
平成元年10月 大阪市

◦ 岐阜における冬季型乳幼児胃腸炎下痢症とA群ロタウイルス (HRV) 血清型の変遷

田中 浩, 北村政和, 小野博正, 久野保夫
(県立岐阜病院小児科)

川本尋義 (岐阜衛研)
浦沢正三, 浦沢价子, 谷口孝喜
(札幌医大衛生学教室)

第21回日本小児感染症学会 平成元年10月 札幌市

◦ 岐阜県におけるつつが虫病の血清疫学的研究

— 患者由来株による血清検査成績 —
野田伸司 (岐阜衛研)
粕谷志郎, 大友弘士 (岐阜大医)

第32回日本感染症学会中日本地方会
平成元年10月 富山市

- 新しく考案した赤痢菌鑑別培地, CA培地 (Citrate Acetate agar) について
 所 光男, 長野 功, 後藤喜一 (岐阜衛研)
 中村 章 (岐阜県公衆衛生検査センター)
 第32回日本感染症学会中日本地方会
 平成元年10月 富山市
- 鶏卵成分中の抗菌性物質
 中屋謙一, 小林香夫 (岐阜衛研)
 第58回日本食品衛生学会
 平成元年10月 山口市
- 岐阜県下呂温泉における温泉水の化学成分と酸素同位体組成の関係について
 寺尾 宏, 清水英徳 (岐阜衛研)
 加藤喜久雄 (名大水圏研)
 1989年度日本地球化学会年会
 平成元年10月 東京都
- 接触ばっ気法による上水臭気物質の生分解性(その2)
 金子光美 (摂南大工学部)
 南部敏博 (岐阜衛研)
 第48回日本公衆衛生学会 平成元年10月 筑波市
- 数量化理論 I 類を用いたフェノールカルボン酸類の抗変異原性構造活性相関
 坂井至通, 河合 信 (岐阜衛研)
 小瀬洋喜 (岐阜市立女子短期大学)
 吉岡義正 (岐阜医療技術短期大学)
 鬼頭英明, 佐藤孝彦, 長谷川浩一, 水野瑞夫
 (岐阜薬科大学)
 森口郁生 (北里大学薬学部)
 第17回構造活性相関シンポジウム
 平成元年11月 大阪府豊中市

岐阜県衛生研究所投稿規定

1. 投稿者は当所職員であることを原則とする。
2. 投稿の区分は次の通りとする。

○研究（調査）報告	（原稿用紙20枚以内）
○資 料	（ 〃 15 〃 ）
○研究速報（短報とする）	（ 〃 10 〃 ）
○他誌掲載論文抄録	（ 〃 2 〃 ）
3. 原稿は、定められた期日までに学術委員会に提出すること。
4. 原稿はB5版400字詰横書き原稿用紙を用いる。
5. 研究報告、表題、著者名、英文表題（前置詞、接続詞、冠詞、動詞以外、イニシアルを大文字、他は小文字、著者名は、本人が常用しているローマ字を用いて、名、苗字の順とし、Kōtaro TAKAMURAのようにする）、英文抄録、総括、序文、材料および方法、成績、考察、謝辞、文献の順とする。
所属、住所は和文、英文の順に欄外に入れる。英文は前置詞、接続詞、冠詞、動詞以外イニシアルを大文字、他は小文字とする。
6. 資料および研究速報、研究報告に準ずるが、英文抄録は特に必要としない。
7. 他誌掲載論文抄録、表題、著者名、掲載雑誌名（巻、頁、年号）および抄録とする。
8. 表題は簡潔にし、続報のものは必ず副題をつけ、その前にアラビア数字で1.2.などの番号をつける。
9. 外来語はカタカナ、外国人名は外国語（タイプ又はブロック体）とする。
10. 表は方眼紙または同型の白紙を用い、表の上には「表1, Table 3」などの番号と表題を明瞭に書く。図（写真を含む）は、他の方法で表わし難いもの

みとし、1報につき5図以内とする。1図1枚とし、そのまま製版できるように墨書（黒インキでもよい）する。図の下に「1., Fig. 1」などの番号と表題および図中の文字（数字を含む）を鉛筆で明瞭に書く。

英文抄録を付した報告については原則として表、図共に英文とし、標題は前置詞、接続詞、冠詞、動詞以外イニシアルを大文字にし、他は小文字とする。

11. 表、図および写真は、本文とは別にして本文中挿入すべき場所の欄外に赤色でその位置を明示する。
12. 文献は本文中引用個所右肩に小さく番号⁽¹⁾⁽²⁾のように片括弧をつける）を付し、最後にまとめて次の方式に従って記載する。

○雑誌の場合

著者名：表題、雑誌名、巻（ゴジックにする）、頁、年号（西歴）（例：Stark, R. L. and Duncan, C. L. : Purification and Biochemical Properties of *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin, *Infect. Immunity*, 6, 662-673, 1972）

○単行本の場合

著者名：書名、版数、頁、発行所、年号（西歴）ただし、頁については、全内容を総括的に引用した場合は不要とする。（例：Conn, E. E. and Stumpf, P. K. : *Outlines Biochemistry*, 1st ed., 83-85, John Wiley & Sons, Inc., 1963）

13. 著者校正は初校のみとする。その際新たな追加あるいは変更をしないこと。
14. その他所報編集に関し、必要な事項は学術委員会において決定する。

<監 修>

河 合 信

<編 集 委 員>

後 藤 喜 一, 川 本 尋 義, 寺 尾 宏
中 屋 謙 一, 坂 井 至 通

岐 阜 県 衛 生 研 究 所 報 No. 35
平 成 2 年 1 1 月
Report of Gifu Prefectural
Institute of Public Health No. 35
1 9 9 0

編 集 発 行 岐 阜 県 衛 生 研 究 所
岐 阜 市 野 一 色 4 丁 目 6 番 3 号 〒 5 0 0
TEL <0582> 46-1101
Editorial Gifu Prefectural Institute
Office of Public Health :
6-3, Noishiki 4 chome,
Gifu 500, Japan
印 刷 所 水 野 印 刷 紙 工 株 式 会 社
岐 阜 市 下 川 手 413 ☎ <0582> 71-6248
