

愛媛県立衛生研究所年報

第 57 号

平成7年度 (1995)

Annual Report
of
Ehime Prefectural Institute of Public Health



愛媛県立衛生研究所

目 次

I 研究報告

愛媛県におけるコクサッキーウイルス A16型による手足口病の流行	1
愛媛県における麻疹ウイルスの血清疫学的研究	4
ELISA 法によるアストロウイルス迅速検出法の開発	7
愛媛県における神経芽細胞腫マス・スクリーニングの現況（第3報）	12
PCR - SSCP法を用いたHLA - DR4 抗原のサブタイピング	15
水処理副生成物に関する基礎的研究	21

II 資 料

平成7年度法定伝染病事例報告	31
平成7年度食中毒事例報告	32
平成7年度伝染病流行予測調査	33
愛媛県感染症サーベイランス事業調査成績	35
平成7年度先天性代謝異常検査成績	39
平成7年度神経芽細胞腫検査成績	40
平成7年度微生物検査精度管理実施結果	41
平成7年度し尿処理場放流水基準試験結果について	43
平成7年度松くい虫防除薬剤空中散布に伴う調査について	46
平成7年度愛媛県産野菜・果実等の残留農薬分析調査成績	48
平成7年度食品添加物使用実態調査	50
平成7年度医薬品の品質調査	51
平成7年度有害物質を含有する家庭用品の調査	52
平成7年度温泉分析成績	53
平成7年度理化学試験精度管理実施結果	57

III 抄 録

他誌発表論文	59
学会発表	59

IV 第10回公衆衛生技術研究会（抄録）

V 業務実績

1 組織及び業務概要	69
2 微生物試験室の概要	75
3 理化学試験室の概要	77

VI 技術研修指導, 研究発表の状況

愛媛県におけるコクサッキーウイルスA16型による手足口病の流行

高橋一博 呼石弘子 大瀬戸光明 森 正俊 井上博雄
中野省三*¹ 石丸啓郎*¹

An Epidemic of Hand, Foot and Mouth Disease Associated with Coxsackievirus A16 in Ehime

Kazuhiro TAKAHASHI, Hiroko YOBISHI, Mitsuaki OSETO, Masatoshi MORI,
Hiroo INOUYE, Yoshiro ISHIMARU*¹, Shozo NAKANO*¹

From May to August in 1995, an epidemic of hand, foot and mouth disease (HFMD) occurred in Ehime Prefecture. According to the result of virus isolation test and serological analysis, it was considered that this epidemic of HFMD was caused by coxsackievirus A16 (CA16). Cross-neutralization test of CA16 isolates showed that the antigenicity of CA16 isolated in 1995 was a little different from isolates in 1975, but not different from isolates since 1980.

Sero-epidemiological study suggested that this epidemic was mainly due to infection of susceptible children accumulated after an epidemic of CA16 in 1990.

Keywords : coxsackievirus A16, virus isolation, cross-neutralization tests, antigenicity

はじめに

1995年5月から8月上旬に愛媛県において手足口病の流行があった。感染症サーベイランス情報¹⁾によると、全国的には本年の手足口病の流行は、1982年のサーベイランス開始以来最大の流行であった。今回の流行は主にコクサッキーA16型(以下CA16)によるものであった。このCA16分離株は、全国各地で同定が困難であるとの情報が伝えられ、非常に大きな抗原変異が生じていることも考えられた。

そこで、流行の要因を検討するためウイルス疫学的、血清学的調査を行ったので報告する。

材料と方法

材料は手足口病患者の咽頭ぬぐい液、水疱内容液および直腸ぬぐい液を松山市内のI小児科外来で採取した。ウイルス分離には、FL, RD-18S, Vero細胞をもちいた。分離ウイルスの同定は、ダイフロン処理1回後ブラック中

和法で行った。交差中和試験および血清の中和抗体価測定は、FL細胞を用い既報²⁾に準じた50%プラック減少法で行った。

ヒト血清は、1994年10月および1995年10月に採取した流行予測用血清114件を用いた。

また、各CA16の免疫血清は、ウサギあるいはモルモットを免疫した自家血清を用いた。

成績

1 流行状況

愛媛県の感染症サーベイランスにおける手足口病患者の報告数を月別に図1に示した。愛媛県では、1985年、1990年にCA16による流行があり、またエンテロ71による流行は、1988年、1993年にみられた。今回の流行は、1993年より患者数が多く比較的大規模な流行であった。

最近の患者報告数を週別に図2に示した。1994年10月から12月にかけて小さな流行があり、その後1995年5月から8月にかけて本格的に流行した。

1995年の患者の年齢分布を図3に示した。2~3歳児が最も多く、4歳以下の患者が全体の80%を占めていた。

愛媛県立衛生研究所 松山市三番町8丁目234番地
*1 石丸小児科医院

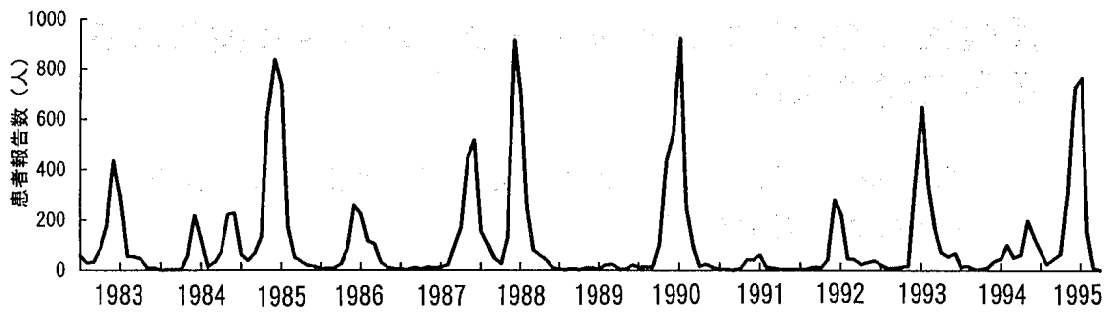


図1 愛媛県感染症サーベイランス手足口病発生状況 (1983-1995.10)

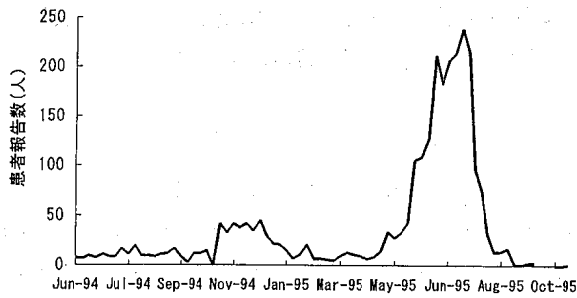


図2 手足口病患者発生状況 (1994.6-1995.10)

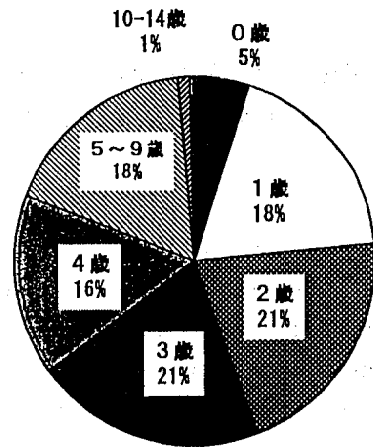


図3 手足口病患者年齢分布 (1995年)

2 ウイルス分離

1994年夏以降の手足口病患者からのウイルス分離状況を表1に示した。60名中39名からウイルスが分離され、38名はCA16であった。CA16以外には、1994年7月にコクサッキーB2型が1例だけ分離された。CA16は小流行のみられた1994年10月から12月と、本格的な流行をみた1995年5月から8月に集中していた。このことから、本流行はCA16によるものと考えられた。

検体別のウイルス分離状況を表2に示した。水疱内容液からの分離率が高く74%であった。細胞別では、FL細胞で最も良く分離され、Vero, RD-18S細胞では、ほとんど分離されなかった。今回の分離検体には、無菌性髄膜炎を併発した例はなかった。

3 分離ウイルスの抗原性

本年の流行株は、中和し難いといわれていたので、表3のように本年のCA16分離株と以前の分離株を用いて、それぞれの抗原性を比較するため、各ウイルスに対する免疫血清で交差中和試験を行った。

本年の流行株、95-838, 95-1076に対し、1975年の分離株75-2952の抗血清は、ホモ抗体価の4分の1から8分の1に低下しており、若干の抗原変異が示唆された。

また、1980, 1985年の分離株80-321, 85-548の抗血清では、ホモ抗体価と同程度の中和抗体価を示し、これらの株からの抗原変異はほとんど認められなかった。

表1 手足口病患者からのウイルス分離状況

年 月	被検患者数	ウイルス型別陽性数	
		CA16	CB2
1994. 7	4	1	1
8	1		
9	0		
10	4	2	
11	9	8	
12	7	5	
1995. 1	0		
2	6	5	
3	3		
4	0		
5	5	4	
6	16	10	
7	4	2	
8	1	1	
計	60	38	1

表2 手足口病患者からの材料別ウイルス分離数

材料名	検体数	CA16陽性	CB2陽性
咽頭ぬぐい液	45	19 (42.2%)	1 (2.2%)
水疱内容液	31	23 (74.2%)	
直腸ぬぐい液	1		
計	77	42 (54.5%)	1 (1.3%)

表3 CA16分離株間の交差中和試験

ウイルス株	各抗血清の中和抗体価					
	抗G-10	抗75-2952	抗80-321	抗85-548	抗95-838	抗95-1076
75-2952	80	10240	1280	5120	20480	640
80-321	160	5120	1280	1280	40960	2560
85-548	160	2560	1280	2560	40960	1280
95-838	40	2560	1280	2560	20480	1280
95-1076	40	1280	640	2560	10240	1280

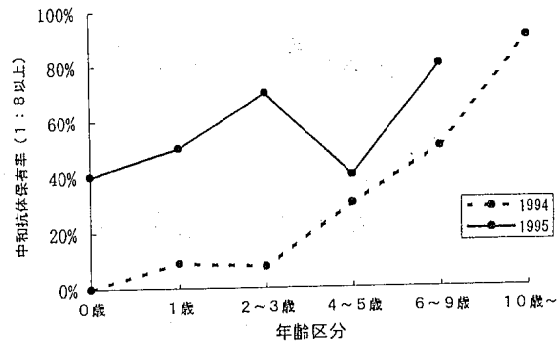


図4 年齢区分別CA16中和抗体保有状況

4 流行前後の住民の抗体保有状況

本年の分離株95-838を用いた8倍スクリーニングによる年齢別抗体保有状況を図4に示した。流行前である1994年は、3歳以下の抗体保有率が10%以下と低く、6歳~9歳で50%が保有していた。

また、流行後には1歳~3歳に50%~70%にもおよぶ著しい抗体保有率の上昇がみられ、3歳以下に広範なCA16感染があったことが確認された。

考 察

今回の手足口病の流行は、CA16によるもので1993年以來の大きな流行であり、5月から8月まで続くほぼ定型的な流行であった。³⁻⁵⁾

この流行の要因の一つとして、大きな抗原変異が考えられていたが、ウイルスの抗原性を交差中和試験で比較してみると、1995年の分離株の抗原変異は、それほど大きいものではなかった。今回の流行での患者発生は、4歳以下に集中していた。また流行後のCA16の抗体保有率が3歳以下で大きな上昇がみられた。これらのことから、今回の流行が1990年のCA16による手足口病流行後に蓄積した感受性者を浸淫したことが示唆された。

また、本年のCA16分離株が同定され難かったことに関しては、抗原性が変異したためではなく、CA16特有の難中和性が著しかったためと考えられた。

ま と め

- 1 1995年5月から8月にかけて愛媛県では手足口病の大流行がみられた。
- 2 ウイルス分離検査や、血清検査の結果から今回の手足口病の流行は、CA16によるものであることが確認された。
- 3 交差中和試験の結果、1995年の分離株の抗原性は、1975年の分離株からは若干の変異が認められたが、1980年以降の分離株からは、変異が認められなかった。
- 4 今回の流行は、1990年のCA16による手足口病流行後に蓄積した感受性者を浸淫したことが示唆された。

本報告の要旨は、第65回日本感染症学会西日本地方総会にて発表した。

文 献

- 1) 国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報16 243-244 (1995)
- 2) 奥山正明他：愛媛衛研年報41, 17-19 (1980)
- 3) 国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報15 217-218 (1994)
- 4) 国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報14 241-242 (1993)
- 5) 服部昌志他：愛媛衛研年報55, 11-14 (1994)

愛媛県における麻疹ウイルスの血清疫学的研究

呼石弘子 大瀬戸光明 高橋一博 森 正俊 井上博雄
松浦章雄*¹ 真鍋豊彦*¹

Sero - epidemiological Study on Measlesvirus in Ehime

Hiroko YOBISHI, Mitsuaki OSETO, Kazuhiro TAKAHASHI, Masatoshi MORI,
Hiroo INOUE, Akio MATSUURA *¹, Toyohiko MANABE *¹

Recently, several outbreaks of measles in junior high school were reported. And secondary vaccine failures were noted.

Therefore, we conducted to measure neutralization (NT) antibodies and hemagglutination inhibition (HI) antibodies to measles of students of a junior high school and inhabitants in Matsuyama city. The positive rates of NT antibodies of age-groups over 3 years old were 90% or more. The positive rates of NT and HI antibodies of 150 students were 95% and 83% respectively. And 5 out of 8 seronegative students have not received measles vaccine.

It was shown that NT test is appropriate for sero-epidemiological investigation than HI test.

Keywords : measles virus, neutralization (NT) antibody titer,
hemagglutination inhibition (HI) antibody titer

はじめに

麻疹は感染力の強い急性疾患で、高熱・上気道炎・結膜炎・発疹等を主徴とする小児の代表的な感染症であるが、1978年に麻疹弱毒生ワクチンが定期接種に移行してから患者数は明らかに減少してきている。しかし、最近、麻疹ワクチンの無効例、特にワクチンによって一度獲得した免疫力がしだいに低下して麻疹に罹患する例¹⁾ (Secondary Vaccine Failure, SVF) や小中学校での麻疹の集団発生^{2,3)} が報告され、ワクチンの接種方法を含めた予防対策の見直しに関心が示されている。また、麻疹ウイルスはウイルス学的に変異が少ないとされていたが、近年流行している野生株はアフリカミドリザル赤血球凝集能を喪失しており、さらに遺伝子の塩基配列の変異箇所が多くなってきている⁴⁾ 等、流行ウイルス側の要因もワクチンの無効の原因として検討されている。

今回は、麻疹に対する免疫状況の現状を把握するた

め、抗体価の低下が危惧されている年齢の中学1年生と地域住民の血清抗体の測定を行い、とくに中学1年生については麻疹ワクチン接種歴や罹患歴の詳細な調査を実施した。

対象と方法

中学1年生の血清は1993年新居浜市立S中学校生徒150名から採取し、同市小児科医会においてアンケート調査およびカルテや母子手帳による確実なワクチン接種歴や罹患歴の調査を実施した。地域住民の血清として1994年の伝染病流行予測調査用に採取した松山市の0歳から40歳以上層の年齢区分別血清230例を用いた。

麻疹ウイルス中和(NT)試験は、国立予研の小船博士から分与された麻疹ウイルス豊島株とB95a細胞⁵⁾ (EBウイルスでトランスフォームしたマーモセットB細胞由来)を用い、マイクロプレートでの細胞まき込み法で行った。麻疹赤血球凝集抑制(HI)検査は、デンカ生研製の麻疹HA抗原(豊島株)を用い、添付のマニュアルに準じて実施した。

愛媛県立衛生研究所 松山市三番町8丁目234番地

*¹ 新居浜市小児科医会

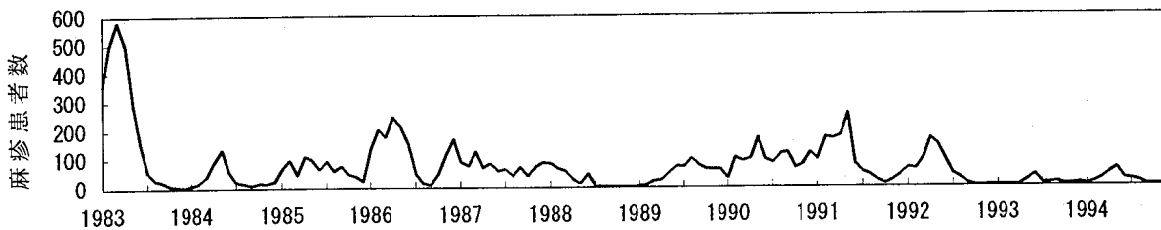


図1 愛媛県感染症サーベイランスの月別麻疹患者報告数(1983-1994年)

結 果

1. 麻疹の患者発生状況

1983年以降の愛媛県感染症サーベイランス情報による麻疹様疾患発生数の報告数を図1に示した。数年間隔で患者発生が多い年があるが全体としては減少傾向である。1983年の総報告数が2494名に対し、1993年は流行の閑期にあたっており109名の報告しかなかった。

2. 最近の麻疹患者の年齢分布(図2)

報告された患者の約4分の3は4歳以下で、1歳児の患者が最も多かったが、最近10歳以上の高年齢小児の割合が増加しており、特に1990年から15歳以上の患者の増加が目立っている。

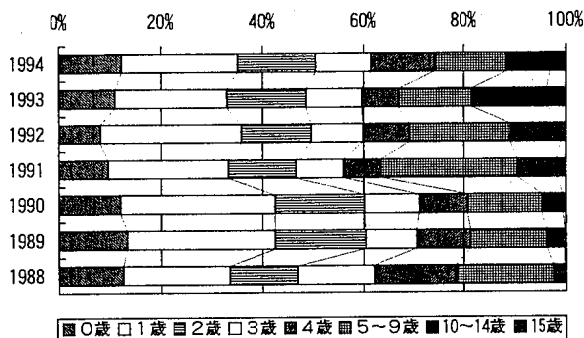


図2 年齢区分別麻疹様疾患患者発生状況

3. S中学校1年生のワクチン接種歴、罹患歴と抗体保有の関係

S中学校におけるワクチン接種歴、罹患歴調査および抗体検査の結果を表1に示した。調査した1年生150名のうちワクチン接種者が106名で、接種なし、接種歴不明がそれぞれ30名、14名であった。この集団のワクチン接種率は不明の14名を除くと78%となり非常に高かった。ワクチン未接種の30名中21名が罹患歴を有し、また、罹患歴なしの8名中3名が抗体陽性であることからワクチン未接種者の80%は麻疹に自然感染していたことが推測された。ワクチン接種者で罹患歴有りが8名あったが、そのうち4名はワクチン接種の前あるいは同じ年に罹患していた。ワクチン無効例と考えられるものは4例だけであった。この集団全体ではNT抗体保有率が95%、HI抗体でも83%と高い免疫レベルを保っているため、現時点ではこの集団で麻疹が流行する余地はほとんどないと考えられた。

図3はこの集団のワクチン接種と麻疹罹患の時期を表したもので、年毎にワクチン接種と麻疹罹患により免疫群が増加する様子が良く分かった。図中の白抜き部分がワクチン未接種かつ未罹患の者の割合の推移を示しており、ほぼ感受性者の割合とみなすことができる。1983年すなわち対象群が2-3歳の時に感受性者が全体の40%を割り、6-7歳までに約90%がワクチンあるいは自然感染により免疫を獲得していたと推測された。それ以後は感受性者がほとんど減少せず、長期間そのまま残されること

表1 S中学1年生の麻疹ワクチン歴、罹患歴および抗体保有状況

ワクチン歴	人数	罹患歴	人数	NT抗体価		HI抗体価	
				陽性	陰性	陽性	陰性
有	106	有	8	8	0	8	0
		不明	18	18	0	14	4
		無	80	78	2	66	11
無	30	有	21	21	0	19	2
		不明	1	1	0	1	0
		無	8	3	5	2	6
不明	14	有	7	7	0	5	2
		不明	6	5	1	5	1
		無	1	1	0	1	0
計			150	142	8	124	26

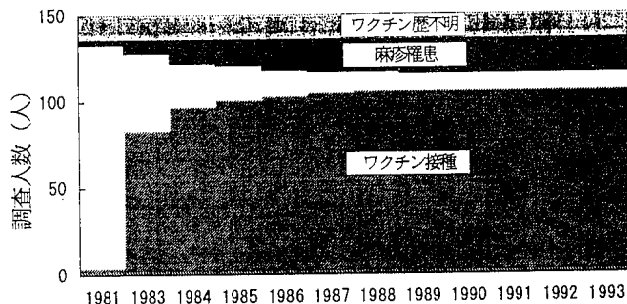


図3 S中学1年生のワクチン接種と麻疹罹患の時期

がわかった。

4. NT抗体価とHI抗体価の相関 (表2)

S中学校1年生150名のNT抗体価とHI抗体価は良く相関していたが、NT抗体価のほうがHI抗体価より約4倍高く、血清疫学にはNT抗体価測定が適していると思われた。

5. 松山市の年齢区分別麻疹抗体保有状況

1994年の松山市内の住民、各年齢区分約20名計230名のNT, HI抗体保有率曲線を図4に示した。NT抗体は4-6歳層以上ではほぼ90%以上が陽性で、高い免疫状態にあることが示された。一方、HI抗体では、4-6歳層から20-29歳層が80%前後の保有率を維持しているが、30歳以上の年齢層で抗体保有率の明かな低下がみられた。今後さらに低下傾向が持続するようであれば、ワクチンの追加接種等の対策が必要になるかも知れない。

考 察

今回は、地域の小児科医会が組織的にカルテの調査まで行って、ワクチン接種歴や麻疹罹患歴について、信頼性の高いデータの収集に努めた。そのためワクチン未接種者が麻疹に罹患する経過や、集団としての免疫の獲得の経過等が良く把握できた。麻疹の予防対策を論じるうえで非常に有用であると考えられる。

S中学校1年生は現時点では非常に高い免疫状況にあった。しかし、同中学校がある新居浜市は都市型の生活圏で、かつ麻疹ワクチンの接種率が高く、最近の麻疹患者の発生が極めて少ない状況にある。このような状態が今後も続いた場合、現在は免疫状態にある集団であっても抗体価がしだいに低下し、麻疹の感受性者が蓄積してくることが危惧される。そのため麻疹に対する長期的な監視体制が必要である。

従来麻疹の抗体測定にはHI検査が一般的であったが、アフリカミドリザル赤血球の入手が困難になってきている。B95a細胞を用いるNT試験は大変簡単に実施できるのもっと普及してよい方法である。今回の結果からも血清疫学的な調査にはNT抗体を基準にするのが適していることが示唆された。

表2 S中学1年生のHIとNT抗体価の相関

計	26	34	42	27	3	15	3			150
≥1024						1	1			2
1024						3	2			5
512					1	10				11
256	1	1	9	9		1				21
128		1	6	14	2					23
64		10	19	4						33
32	6	13	6							25
16	6	7	2							15
8	3	2								5
4	2									2
<2	8									8
<8	8	16	32	64	128	256	512	1024	計	

(NT抗体価)

(HI抗体価)

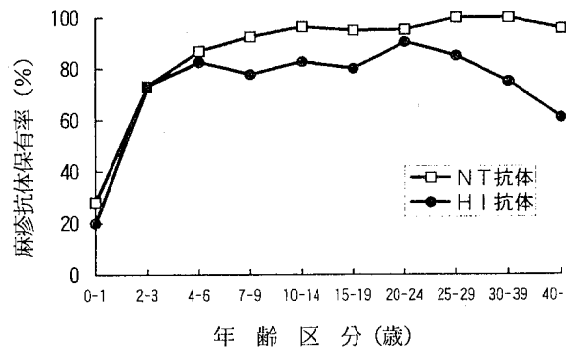


図4 年齢区分別麻疹抗体保有状況 (1994年)

文 献

- 1) 広瀬瑞夫他：日本医事新報, 3570, 46-49 (1993)
- 2) 永井和重他：日本感染症誌, 62, 717-721 (1988)
- 3) 松岡伊津夫他：日本医事新報, 3523, 43-48 (1992)
- 4) 小船富美夫：臨床とウイルス, 233-245 (1994)
- 5) Kobune, F. et al : J. Virol. 64, 700-705 (1990)

ELISA法によるアストロウイルス迅速検出法の開発

大瀬戸光明 高橋一博 呼石弘子 森 正俊 井上博雄
中野省三*¹ 石丸啓郎*¹

Development of Rapid Method for Astrovirus Detection by using of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mitsuaki OSETO, Kazuhiro TAKAHASHI, Hiroko YOBIIISHI, Masatoshi MORI,
Hiroo INOUYE, Shozo NAKANO *¹ Yoshiro ISHIMARU, *¹

A monoclonal antibody (MAb-3A3) to the astrovirus group antigen was prepared to develop a rapid detection method. Then an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was designed for the direct detection of astrovirus in stool specimens by using MAb-3A3 as capture antibody and anti-astrovirus type-2 rabbit IgG as detector. This method showed relatively high sensitivity (70.1%) when compared with direct electron microscopy method (EM). Of the 60 stools containing other viruses, including rotaviruses, small round structured viruses, adenoviruses and picornavirus-like particles, 2 were positive in the astrovirus ELISA. And only 2 out of 220 EM negative stools were positive. These 4 positives in the ELISA were confirmed by cell culture method on CaCo-2 cells. These results indicate that our ELISA is efficient for screening large numbers of stool samples.

Keywords : astrovirus, detection of antigen, ELISA, monoclonal antibody

はじめに

アストロウイルスは主に小児の急性胃腸炎の原因の一つとして認められており、われわれが継続的に実施している小児急性胃腸炎の病原検索においても、毎年1-2%の患者から検出されている¹⁾。また、本ウイルスは時に患者数が1000人以上の大規模な食中毒様集団発生の原因として報告されている^{2, 3)}。しかし、アストロウイルスの診断法として専ら電子顕微鏡法が用いられるため、検査が一般的に普及してなく、本ウイルスの流行の実態は明らかとはいえない。

最近、アストロウイルスの診断法として、CaCo-2細胞によるウイルス培養法⁴⁾、アストロウイルス群特異的モノクローナル抗体を用いたELISA法⁵⁻⁷⁾、ドットブロットハイブリダイゼーション法⁸⁾さらに最も鋭敏なPCR法⁹⁻¹¹⁾等が開発されている。疫学的な調査研究には、簡

便性と迅速性からELISAが適しているが、抗体の入手が困難で、わが国ではUtagawaら¹²⁾の報告のみである。そのため、アストロウイルス検出ELISAの開発を試みたので報告する。

材料と方法

アストロウイルス標準株は、米国CDCの安東、Glass両博士から分与された1型から7型の血清型株を用いた。ウイルスの培養はCaCo-2細胞を用い細胞維持液にtrypsinを5 µg/ml加えて行った。

モノクローナル抗体 (MAb) は、アストロウイルス3型を免疫したBalb/cマウスの脾細胞とSP/2-0ミエローマ細胞を融合し、HAT培地で抗体産生細胞を選択して作製した。ポリクローナル抗体は、精製ウイルス粒子をウサギに免疫して作製した抗アストロウイルス2型ウサギIgGを用いた。

下痢症患者の糞便材料は、1981年以降松山市の石丸小児科外来で採取し、電顕検査をした後-20℃で保存して

愛媛県立衛生研究所 松山市三番町8丁目234番地
*1 石丸小児科医院

いたものを用いた。

今回用いたELISAの手順を図1に示した。ポリスチレン製のマイクロプレートは、ヤンク製のマキシソープを使用した。まず最初にプレートの全ウェルに捕獲抗体として抗アストロウイルスMabを炭酸重炭酸バッファー(pH 9.6)で希釈したものを、4°Cで一晩コーティングした。次いでブロッキングとして3%ウシ血清アルブミンと2.5%スキムミルクを加えたPBS-tween20で37°C、1時間静置した。次に抗原を加えるが、糞便は5-10%の抽出液を、培養上清は10倍希釈液を50 μ l加えてプレートミキサーの上で60分軽く振とうした。検出抗体として抗アストロウイルス2型ウサギIgGまたは、検出抗体の対照として正常ウサギIgGを加えミキシング30分、さらにペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGを30分反応後、発色基質液を加え、450nmの吸光度を測定した。発色剤としてはテトラメチルベンジジンを使用した。各操作段階の間はPBS-tweenで3回の洗浄を行い、発色の前段階だけは5回洗浄した。糞便抽出液は1検体につき4ウェル使用し、片側の2ウェルに対照として正常ウサギIgG、他の2ウェルに抗アストロウイルス2型ウサギIgGを検出抗体として反応させた。判定は検出抗体を加えたウェルの吸光度から対照ウェルの吸光度を引いた値が0.1以上をアストロウイルス陽性とした。

結 果

作製したMabの反応の特異性を図2に示した。Mabをコーティングした各ウェルに1型から7型までの各血清型ウイルス標準株の培養上清を反応させ、抗アストロウイルスウサギIgGで検出したもので、Mabそれぞれの各血清型株との反応の程度を吸光度で示した。Mab-3A3は全ての血清型株と良く反応し、3A3がアストロウイルス群に特異的であることがわかった。一方、3B1と4D11は3型株培養上清にのみ反応し、これらがアストロウイルス3型特異Mabであることが示された。

次に金コロイド法によって、Mabがウイルスのどの部分に結合しているかを調べた。グリッドメッシュに固相化した3型のウイルス粒子にMabを室温で30分反応後、金コロイド標識抗マウスIgGを室温30分後、電子顕微鏡下で金コロイドの結合部位を観察した。3A3を反応させた場合は金コロイドの特異的な結合はみられなかった。4D11では金コロイドがウイルスの周辺部に集中しており、4D11がウイルスキャプシドの外側部分と結合していることが示された(図3)。Mabの性状のまとめを表1に示した。3A3はイムノグロブリンサブクラスはG2aで、アストロウイルス群特異的で反応をもつが、その結合部位は不明で、ウイルス粒子の凝集能も認められなかった。

群特異抗体3A3を捕獲抗体として用いたアストロウイルス検出ELISAで、各血清型株の培養上清の抗原力価測定をした。その結果、図4のとおりすべての型に対して

- 1) 捕獲抗体 (Mab-3A3) のコーティング (1:3000/CBB)
100 μ l/well 4°C overnight (プレートシールをする)
洗浄 3回 (PBST)
- 2) ブロッキング (3%BSA-2.5%SM-PBST)
200 μ l/well 37°C 2hrs.
洗浄 3回
- 3) Diluent, 陽性抗原, 糞便抽出液を加える (4 ウェル/検体)
50 μ l/well 振とう 60min.
洗浄 3回
- 4) 検出抗体 (抗Ast2 Rabbit IgG) : 3, 4, 7, 8, 11, 12列
検出抗体対照 (正常Rabbit IgG) : 1, 2, 5, 6, 9, 10列
↓
50 μ l/well 振とう 30min.
洗浄 3回
- 5) ペルオキシダーゼ標識抗Rabbit IgG (1:3000)
↓
50 μ l/well 振とう 30min.
洗浄 5回
- 6) 発色基質液
↓
100 μ l/well 静置 10min.
- 7) 反応停止液 (2M H₂SO₄)
↓
50 μ l/well
- 8) 吸光度測定 (波長: 450nm/630nm)

図1 アストロウイルス検出ELISAの手順

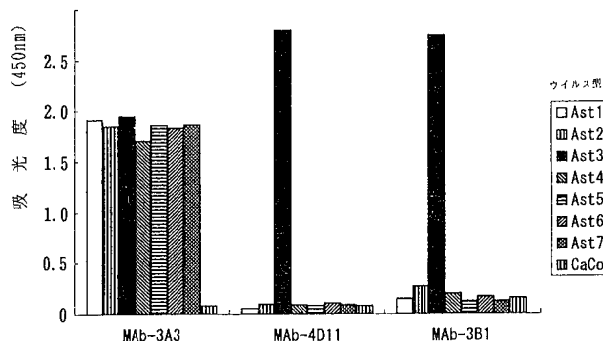


図2 モノクローナル抗体の特異性

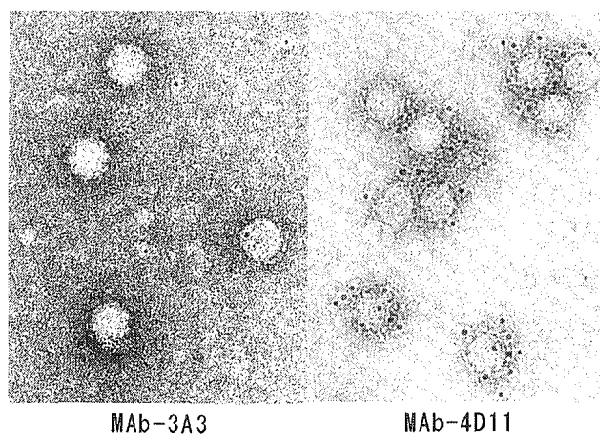


図3 金コロイド法によるモノクローナル抗体の結合部位の検討

表1 モノクローナル抗体の性質のまとめ

MAbクローン	サブクラス	特異性	結合部位	凝集能
3A3	IgG2a	アストロウイルス群	?	-
3B1	IgG2a	アストロウイルス3型	粒子外縁	+
4D11	IgG1	アストロウイルス3型	粒子外縁	++

高い値が得られ、本ELISAがアストロウイルス検出法として用い得ることが確認された。しかし、2型、1型、3型、6型では2560倍希釈でも陽性を示したが、4型と7型ではせいぜい640倍で、血清型によって差がみられた。本ELISAでは捕獲抗体としてMAb-3A3を、検出抗体として抗アストロウイルス2型ウサギIgGを用いているが、ふたつの抗体の組み合わせを逆にした場合には、感度が著しく低下した。

このアストロウイルス検出ELISAを糞便材料に適用してみると、電顕法でアストロウイルス陽性でもELISAで陰性の例があった。そこで、糞便抽出液を尿素やチオシアン酸ナトリウム、塩酸グアニジンの3種の変性剤で処理して、ウイルス粒子を種々の程度に壊した状態で反応をみた。糞便抽出液4検体とアストロ6型の培養上清について、それぞれの処理液の0.2Mから6Mの溶液を等量加えて、10分間室温に置いた後ELISAを行った。その結果図5に示したとおり3Mの尿素で明らかに吸光度が上昇し、同様にチオシアン酸ナトリウムでも0.4Mから0.8Mで吸光度が上昇したが、塩酸グアニジンでは明かな上昇は見られなかった。以上のことから、今回のELISAでは、糞便抽出液の3M尿素での処理を適用した。

今回開発したアストロウイルス検出ELISAの実用性を検討するため、急性胃腸炎患者の糞便材料を用いアストロウイルスの検出を試み、その結果を図6、7に示した。縦軸が抗アストロウイルス2型ウサギIgGの吸光度で、横軸に対照ウェルの吸光度を表した。図6の白丸は電顕法でアストロウイルス陽性例を示し、黒丸は電顕検査陰性例を示した。曲線はその線より上のプロットがELISAで陽性であることを示しており、電顕法でアストロウイルスが陽性であった74検体中45検体(60.8%)がELISAで陽性となり、29検体が陰性と判定された。一方、電顕法で陰性であった123検体は2検体を除いて全て陰性域に入った。非常に高い蛋白濃度のブロッキング液を用いたにも関わらず、糞便抽出液の一部には相変わらず高い吸光度を示す例があり、正常ウサギIgGを用いた対照ウェルを必ず置いておく必要があった。

図7は電顕法でアストロウイルス以外のウイルスが検出された糞便材料のELISAの結果を示している。粒子の直径が25-30nmのいわゆるSRFVの範疇のピコルナウイルス様粒子と、アデノウイルス各10検体とロタウイルス、ノーウォークウイルス様ウイルス(SRSV)各20検体の合計60検体の吸光度がプロットされており、ほとんどの検体の吸光度が0.01以下で本ELISAがアストロウイルス以

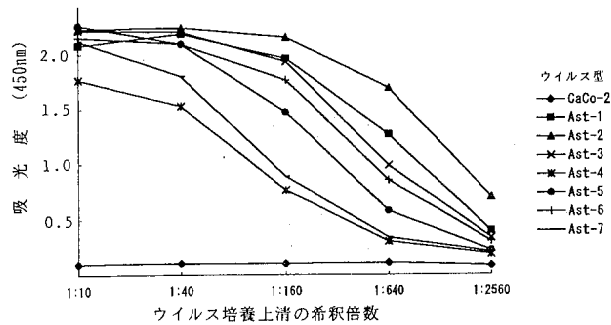


図4 アストロウイルス標準株のCaCo-2細胞培養上清の吸光度の比較

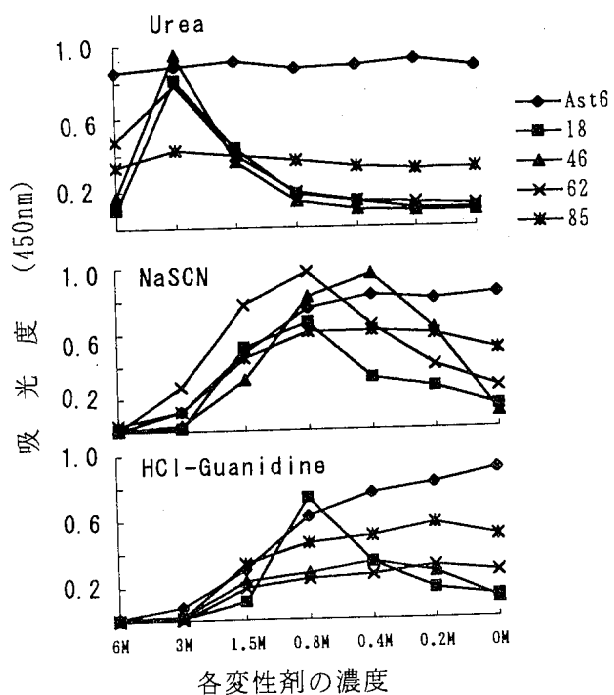


図5 3種の変性剤の効果の検討

外の糞便中のウイルスと交差反応が認められないことがわかった。ロタウイルスとSRSV陽性例から1例ずつ、ELISAで陽性に判定された。

図6と図7でみられた電顕法で陰性またはその他のウイルス陽性でELISAではアストロウイルス陽性と判定された4例については、糞便抽出液からCaCo-2細胞を用いたウイルス培養を試みた結果、4例すべてからアストロウイルスが分離され、ELISAの特異性が確かめられた。

ELISAの結果と培養の結果を比較してみると、培養できた検体では71%がELISAで陽性であったが、培養できない例ではほとんどELISAも陰性であった(表2)。電顕陽性例は通常100%近く培養が可能であることから、培養できなかった検体は、1986年以前の検体で-20℃の冷凍保存中にウイルス粒子が失活したためELISAでも陰性になったと考えられた。

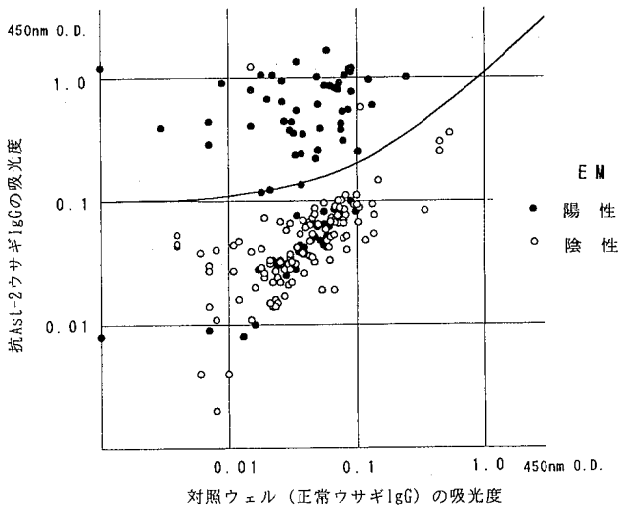


図6 糞便材料からのELISA法によるアストロウイルスの検出(1)

さらに現在我々が開発中のアストロウイルス血清型別法によって型別し、ELISA検出率を血清型との関連で検討した。その結果、表3に示したように1型、3型では80%以上の高い検出率が得られたが、4型の検出率は50%でしかなかった。4型の検出数は1型に次いで多いため全体のELISA検出率を著しく引き下げていることがわかった。

考 察

アストロウイルスを検出する検査法は、直接電子顕微鏡法が最も一般的に用いられているが、その他にはELISA、ドットプロットハイブリダイゼーション法、培養細胞法およびPCR法等が報告されている。急性胃腸炎の集団発生例や散发例からのアストロウイルスの検出頻度は低いので、日常的な検査法としてドットプロットハイブリダイゼーション法やPCR法を用いることは効率的ではないと考えられる。また、CaCo2細胞を用いるウイルス分離法は検出感度は高いが時間がかかりすぎるという短所がある。その点ELISAは必ずしも特殊・高価な機器を必要とせず、急げば1日以内に結果が得られる迅速性も持つ非常に優れた方法である。アストロウイルス検出ELISAは、すでにHerrmannら⁵⁾が作製したアストロウイルス群特異Mab-8E7を用いた方法が報告されている。今回われわれはアストロウイルス3型を免疫したマウスから群特異Mab-3A3を作製し、独自に検出ELISAを開発した。この方法を国内に普及させることにより、わが国におけるアストロウイルスの流行の実態が明らかにされることが期待できる。

ELISAのフォーマットは今回用いた組み合わせが最もよく、データは示さなかったが捕獲抗体と検出抗体を逆にして、抗アストロウイルス2型ウサギIgGを捕獲抗体と

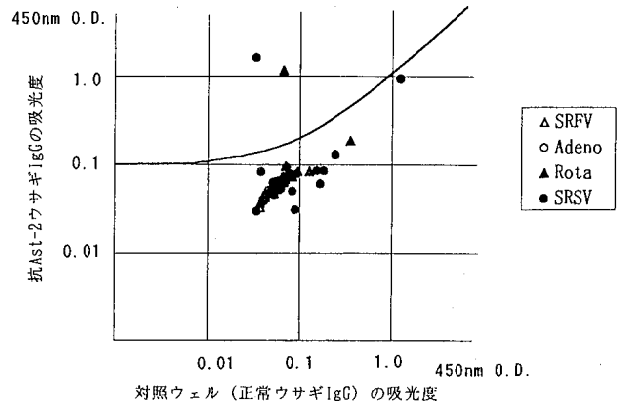


図7 糞便材料からのELISA法によるアストロウイルスの検出(2)

表2 アストロウイルス検出ELISA法とウイルス分離法の比較

ウイルス分離	CaCo-2細胞での アストロウイルス検出ELISA法		
	陽 性	陰 性	合 計
陽 性	44 (71.0%)	18	62
陰 性	1	11	12
合 計	45 (60.8%)	29	74

表3 アストロウイルス検出ELISA法の血清型別検出率

ウイルス型	検査糞便数*	アストロウイルス検出ELISA法	
		陽 性	陰 性
1 型	34	28 (82.4%)	6
2 型	1	1	
3 型	5	4 (80.0%)	1
4 型	18	9 (50.0%)	9
5 型	4	2 (50.0%)	2
6 型	1	1	
合 計	63	45 (71.4%)	18

*ウイルス分離法またはELISA法でアストロウイルスが陽性の糞便

し、Mab-3A3を検出抗体とした場合は著しく感度が低下した。また、ビオチン標識Mab-3A3を用いた1抗体サンドイッチ法ではほとんど反応が見られなくなった。

本ELISAの検出感度は保存中のウイルスの失活がなければ、約70%は示すものと考えられた。また、血清型により感度の差異が認められ、1, 3型の80%以上に比べて4型では50%と低かった。このことからMab-3A3の反応性が4型に対しては幾分低いものと考えられた。したがって本ELISAの検出感度をより高くするには、4型を免疫したマウスからアストロウイルス群特異Mabを作製して、Mab-3A3と混合して用いる必要があると考えられる。

今回本ELISAを用いて糞便材料から直接アストロウイルスを検出したところ、アストロウイルスの全7種の血清型のうち7型を除いてすべての型を検出できた。上述したように本ELISAは4型について改良の余地が残されているが、電子顕微鏡法と比較して70%の検出感度はELISAとしては十分実用の域にあると考えられる。特に多くの検体の処理が必要な疫学的調査研究には極めて効果的な方法であるといえる。

本論文の要旨は第43回日本ウイルス学会総会（岡山市、1995年10月）において発表した。

文 献

- 1) 山下育孝他：愛媛衛研年報, 50, 21-25(1989)
- 2) 川本尋義他：最近5年間の食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生全国実態調査総合報告書, (1995)
- 3) Oishi, I. : J. Infect. Diseases., 170, 439-443(1994)
- 4) Willcocks, M. M. et al. : Arch. Virol., 113, 73-81(1990)
- 5) Herrmann, J. E. et al. : J. Infect. Diseases., 158, 182-185(1988)
- 6) Herrmann, J. E. et al. : J. Infect. Diseases., 161, 226-229(1991)
- 7) Moe, C. L. et al. : J. Clin. Microbiol., 29, 2390-2395(1991)
- 8) Willcocks, M. M. et al., : Epidemiol. Infect., 107, 405-410(1991)
- 9) Noel, J. S. et al. : J. Clin. Microbiol., 33, 797-801(1995)
- 10) Jonassen, T. O. et al. : J. Virol. Methods, 52, 327-334(1995)
- 11) Saito, K. et al. : Microbiol. Immunol., 39, 825-828(1995)
- 12) Utagawa, E. T. et al. : J. Clin. Microbiol., 32, 1841-1845(1994)

愛媛県における神経芽細胞腫マス・スクリーニングの 現況 (第3報)

今西利花 橋本彰夫 永井雅子 浅野由紀子 森 正俊
井上博雄

Current Status of the Mass Screening for Neuroblastoma in Ehime Prefecture

Rika IMANISHI, Akio HASHIMOTO, Masako NAGAI, Yukiko ASANO,
Masatoshi MORI, Hiroo INOUYE

In Ehime Prefecture, mass screening for Neuroblastoma (NB) using the vanillylmandelic acid (VMA) spot test in 6-month-old infants was started in January 1985. And we have been measuring urinary VMA and homovanilic acid (HVA) values by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) from December 1989.

Up to March 1996, 137138 urine samples were screened and eight cases of NB were detected. The incidence of NB in Ehime Prefecture was 1/17100. All cases were treated with surgery and chemotherapy. One of the cases was died of intestinal torsion, but the other seven cases are alive and have been disease free. And also, eleven cases of NB were detected after the introduction of mass screening.

Keywords : mass screening, neuroblastoma, VMA, HVA

はじめに

神経芽細胞腫は、小児期の代表的な固形腫瘍で全小児悪性新生物の約10%を占めている。予後は、極めて不良だが1歳までに早期発見治療すると、大部分が治癒すると言われている。また、この腫瘍のほとんどがカテコールアミンを産生し、その代謝産物であるVanillylmandelic acid (以下VMA) やHomovanilic acid (以下HVA) の尿中への排泄増加がみられる。NBマス・スクリーニングは、これらのVMA, HVAの量を指標に早期発見を目的として昭和59年から全国的に実施されている¹⁾。愛媛県においても昭和60年1月より、6~7カ月児を対象に行っている。

今回は、平成8年3月までの実施状況および症例について報告する。

材料と方法

1 対象者

図1に検査フローを示す。検体採取セットは、3~4カ

月検診時に保健所および市町村から保護者に配布される。保護者は、生後6~7カ月時に採尿し当所まで郵送する。当所において、スクリーニング陽性となった乳児については、精密検査を受診するよう保護者に通知する。

2 検査方法

昭和60年1月より平成元年11月までは1次検査にdip法を用い、VMA定性を行っていた。しかし非VMA排泄型のNBは発見できずまた食事の影響により疑陽性が多くなるなどの問題があったため、平成元年12月より高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)によるVMAおよびHVAの定量を行っている。クレアチニンはヤッフエ法で測定している(図2)。

現在の判定規準は、VMA 18 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{cre}$ 、HVA 30 $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{cre}$ 以上を疑陽性とし、クレアチニン5mg/dl以下、120mg/dl以上を判定不能としている。

結 果

1 実施状況

愛媛県立衛生研究所 松山市三番町8丁目234番地

昭和60年1月から平成8年3月末までに137138名について検査結果を行った結果、疑陽性者はdip法によるものが3860名(疑陽性率6.3%)、HPLCによるものが1366名(疑陽性率1.8%)、の合計5226名であった。また、スクリーニング陽性者は30名であり、そのうち8名が精密検査の結果NB患児と診断された。

患児発見率は1/17100であった(表1)。

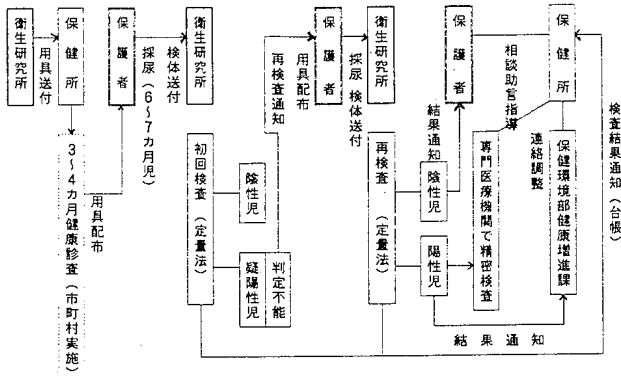


図1 神経芽細胞腫検査フロー

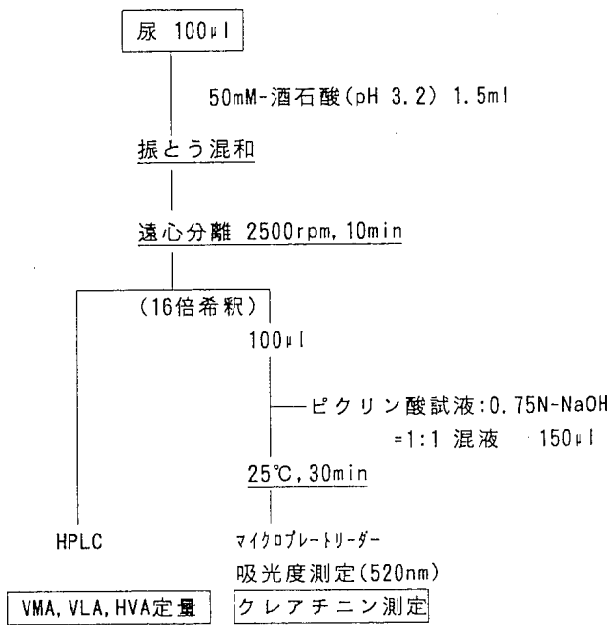


図2 神経芽細胞腫検査手順

2 発見症例

愛媛県において発見されたスクリーニング症例8例中、男児5例女児3例、発見月齢は6カ月から11カ月であった。病期別では5例がStage I・IIの早期に発見され、他3例はStage III・IV A・IV Bであった。原発部位は、副腎4例・後腹膜2例・後縦隔1例・腹腔交感神経節1例であった。全例について手術が施され1例が部分摘出、7例が全摘出であった。予後については、Stage IV Bで発見された1例が腸軸捻転のため死亡したが、他7例は再発も認めず良好に経過している(表2)。

3 スクリーニング陰性群からの症例

生後6~7カ月の時点では発症しておらず、その後NBと診断された症例が11例見られた。発見月齢は10カ月から73カ月であり、病期別では3例がStage I・IIの早期であったが、他8例はStage III・IV A・IV Bであった。予後については、4例は腫瘍死及び化学療法死であったが、他7例は良好に経過している(表3)。

考 察

昭和60年よりNBマス・スクリーニングが開始されて、10年間に8名の患児発見ができ大きな成果を得ることができた。しかしながら、澤田ら¹⁾はスクリーニング開始前の年齢分布をみると現行のマス・スクリーニング実施により1歳までに65%のNBは発見できるが、残り35%はその後発症すると推定している。このことから報告した11例にみられるように、スクリーニング陰性群からの発症は避けられないと思われる。また、今回スクリーニング時期に発見されなかった理由としては、

- ① スクリーニング当時NBがまだ発生していなかった。
- ② 腫瘍が尿中のVMA, HVAが異常高値を示すほどの大きさに達していなかった。
- ③ NBはあったが、代謝産物の排泄がみられなかった、などが考えられる⁴⁻⁶⁾。スクリーニング陰性群からの発症

表1 神経芽細胞腫マス・スクリーニングの実施状況

実施年度	初回検査数	患者数	患者発見率
昭和59~63	52949	3	1/17600
平成 元	12661	1	1/12661
2	11873	2	1/ 5900
3	11922	0	-
4	12101	1	1/12101
5	11762	0	-
6	12000	0	-
7	11870	1	1/11870
合 計	137138	8	1/17100

表2 愛媛県におけるスクリーニング発見症例

症例	月齢	検査値	原発部位	病期	腫瘍重量	手術	予後	死因
1	8	VMA 44.8 μ g/mg \cdot cre HVA 73.3 μ g/mg \cdot cre	左後腹膜	IV B	触知 (+) 15g	亜全摘	死亡	腸軸捻転
2	7	VMA 44.8 μ g/mg \cdot cre HVA 73.3 μ g/mg \cdot cre	右後腹膜	III	触知 (+) 10g	全摘	良好	
3	7	VMA 44.8 μ g/mg \cdot cre	左副腎	I	触知 (-) 12g	全摘	良好	
4	7	VMA 44.8 μ g/mg \cdot cre HVA 73.3 μ g/mg \cdot cre	左副腎	I	触知 (+) 38g	全摘	良好	
5	11	VMA 44.8 μ g/mg \cdot cre HVA 73.3 μ g/mg \cdot cre	左副腎	II	触知 (-) 40 \times 35 \times 30mm	全摘	良好	
6	6	VMA 44.8 μ g/mg \cdot cre HVA 73.3 μ g/mg \cdot cre	左後縦隔	II	触知 (-) 10g	全摘	良好	
7	6	VMA 44.8 μ g/mg \cdot cre HVA 73.3 μ g/mg \cdot cre	右副腎	I	触知 (+) 40g	全摘	良好	
8	7	VMA 44.8 μ g/mg \cdot cre HVA 73.3 μ g/mg \cdot cre	腹腔交感神経節	IV A	触知 (-)	全摘	良好	

表3 スクリーニング陰性群からの症例

症例	月齢	スクリーニング時		診断時		病期	予後	死因
		VMA	HVA	VMA	HVA			
1	62			278	197	IV B	死亡	腫瘍死
2	68					I	良好	
3	36			23	27.6	II	良好	
4	68					III	死亡	腫瘍死
5	18					III	良好	
6	15			27.3	24.6	III	良好	
7	21	6.5	16.9	10.4	169.8	IV A	死亡	腫瘍死
8	30	12.2	20.3	2.6	13.9	IV B	良好	
9	10	16.3	14.8	20.0	21.4	I	良好	
10	33	19.9	26.1	362	205	IV A	良好	
11	73	16.9	11.9	124.6	257.3	IV A	死亡	化学療法死

(愛媛大学医学部 社会医学実習調査による)

例は、スクリーニングによる発見症例と異なり予後が悪いとされていることもあり⁵⁾、発症時期の一定していない疾患を対象としているNBマス・スクリーニングには、

問題点も多く残されている。

今後、NBマス・スクリーニングを実施していくうえで、こうした陰性群からの発症例に対するスクリーニングの方法や検査時期、検査精度の向上など検討していく必要があると思われる。

文 献

- 1) 澤田 淳他：神経芽細胞腫スクリーニング精度管理, 10~21 (1994)
- 2) 厚生省児童家庭局母子衛生課：特殊ミルク情報 29, 62~63 (1994)
- 3) 三好雅子他：愛媛衛研年報, 54, 17~20 (1993)
- 4) 高杉信夫他：医学のあゆみ, 150, 559~560 (1989)
- 5) 武田武夫他：医学のあゆみ, 164, 628~634 (1993)
- 6) 沢田 淳：KARKINOS, 7, 369~377 (1994)

PCR - SSCP 法を用いた HLA - DR4 抗原のサブタイピング

鳥谷竜哉 奥山正明 坂本尚穂*¹ 井上博雄

Usefulness of PCR - SSCP Method to distinguish heterozygous combinations of HLA - DR4 alleles

Tatsuya KARASUDANI, Masaaki OKUYAMA, Hisaho SAKAMOTO *¹
Hiroo INOUE

It is often difficult to distinguish heterozygous combinations of DRB1*04 (HLA - DR4) alleles by using PCR - RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) method, because different DRB1*04 alleles share sequence motifs. To identify DNA polymorphism more efficiently, analysis of mobility shift of single strand DNAs on polyacrylamide gel electrophoresis, that called SSCP (single strand conformation polymorphism) method, has been developed. We investigated the polymorphisms of DRB1*04 alleles by PCR - SSCP method without using thermal control equipment and silver staining visualization. Most heterozygous combinations were easily identified by single SSCP run, but only two alleles (*0403 and *0404) were difficult to distinguish. In this case, RFLP was supplementary analyzed by using endonuclease Sac II. Since PCR - SSCP method is technically simple and rapid, the technique is particularly useful for resolving DRB1*04 combinations which are indistinguishable by PCR - RFLP subtyping.

Keywords : HLA - DRB1*04, DNA typing, PCR - RFLP, PCR - SSCP, LIS - DCP, heteroduplex

はじめに

組織適合性検査 (HLA 型別検査) は臓器移植時のドナーとレシピエント間の組織適合性を調べる際に実施され、HLA 型の一致は移植の予後を決定する重要な要因の一つであるとされている。この HLA 型の一致は、従来血清学的タイピングにより評価されてきたが、最近クラス II 分子については DNA タイピング法が開発され、従来の血清学的方法では区別できない遺伝子レベルでの適合症例が良好な移植成績を示すことから、DNA タイピングの重要性が指摘されている^{1), 2)}。

HLA 遺伝子には多くの対立遺伝子 (アレル) の存在が明らかにされており、移植成績に最も影響すると言われる DRB1 遺伝子は 1995 年 3 月の時点で 124 のアレルが公

認されているが³⁾、今後も解析が進むにつれて益々増加していくものと考えられる。

HLA 遺伝子の遺伝的多型性を DNA レベルで検出する方法としては、PCR - SSOP 法⁴⁾、- RFLP 法⁵⁾、- SSP 法⁶⁾、SBT 法⁷⁾などが用いられており、当所では PCR - RFLP 法を中心に HLA 遺伝子の解析を行っている。アレルの増加への対応として、定期的に新しいアレルの塩基配列を解析して制限酵素の組み合わせを検討後、解析プログラムを変更しているが、多型性を有する部位を認識する制限酵素がない場合など、区別の困難なアレルが少なからず存在するのも事実であり、今後のアレルの増加に伴って、この傾向はますます強くなる可能性がある。特に、日本人において比較的出現頻度が高い上、多型性に富む抗原として DR4 抗原が挙げられるが、この DR4 抗原ヘテロ接合体のアレルタイピングは最も判定が困難な組み合わせの一つとなっている。

愛媛県立衛生研究所 松山市三番町8丁目234番地
* 1 現 松山中央保健所

そこで、我々は、判定が困難な組み合わせの場合に容易に多型性が検出できる手段として、すべてのスラブ型電気泳動装置に利用可能なPCR-SSCP法を確立して良好な結果を得ているので報告する。

方 法

1. 試料

当所に検査依頼のあった腎移植希望者、骨髄移植希望者とその家族及び健常者の中から、PCR-RFLP法あるいはINNO LiPA HLA DNA タイピングキット (INNOGENETICS: Reverse brot hybridization法) にてDRB1*04アレルが確定できた症例及び、腎移植タイプ会議が実施するDNA exchangeで配付されたアレル既知のDNAをパネルとして使用した。

2. PCR-RFLP法

猪子らのmodified PCR-RFLP法⁵⁾に従って行った。すなわち、リンパ球分離後の有核細胞から、salting-out法によりDNAを抽出し、PCR buffer, dNTP, group specific primer (5'R4: GTTTCTTGG AGCAGGTTAAAC, 3'R: CCGCTGCACTGTGAAG CTCT), Taq DNA polymeraseを加えて全量を60 μ lとし、Perkin-Elmer Gene-Amp System 9600にて96 $^{\circ}$ C 20sec, 62 $^{\circ}$ C 20sec, 72 $^{\circ}$ C 30secを30 cycles

を行い、DRB1遺伝子を増幅した。なお、増幅遺伝子がヘテロ接合体の場合は、判定に影響を及ぼすヘテロデュプレックスを解消するため、98 $^{\circ}$ C 10minの後、70 $^{\circ}$ Cまで1分間に1 $^{\circ}$ Cずつ低下させる後処理を行った。次に、増幅DNAにSac II, Ava II, Hinf I, Hae II, Hph I, Mnl Iの各種制限酵素を作用させて、その切断の有無と切断片のサイズからDRB1アレルを決定した。なお、1992年以降に認定されたアレルについては、表1に示した判定表に基づいて解析を行った。

3. PCR-SSCP法

(1) 検体の調整

丸屋らのLIS-DCP (low ionic strength - DNA conformation polymorphism) 法⁹⁾によると、DNA溶液のイオン強度を下げ、95 $^{\circ}$ C加熱変性後55 $^{\circ}$ Cでアニールすることで、mismatch hybridizationによるheteroduplex formation (HDF) と熱変性によるsingle strand conformation polymorphism (SSCP)の両方を形成し持続させ、同時に検出できるとしている(図1)。この原理を利用し、上記PCR産物3 μ lに滅菌蒸留水を4.5 μ l加えて、Perkin-Elmer Gene-Amp System 9600にて98 $^{\circ}$ C 5min, 55 $^{\circ}$ C 1minの加熱処理後25 $^{\circ}$ Cまで冷却し、1 μ lの泳動マーカー (100mM EDTA-2Na, 0.25% SDS, 50%グリセロール, 0.25

表1 DRB1*04アレルのPCR-RFLP法による判定表

アレル	Sac II	Ava II	Hinf I	Hae II	Hph I				Mnl I							
					143	120	110	72	184	148	115	113	107	79	77	71
0421	1	1	1	0			+	+				+		+		+
0419	1	1	1	0			+	+				(+) ^b	+	+	(+)	+
* 0410	1	1	0	1		+		+				(+)	+	+	(+)	+
0409	1	1	0	1			+	+				+		+		+
* 0405	1	1	0	1			+	+				(+)	+	+	(+)	+
0413	1	1	0	0		+		+				+		+		+
* 0404	1	1	0	0		+		+				(+)	+	+	(+)	+
* 0401 ^a	1	1	0	0			+	+				+		+		+
0416 ^a	1	1	0	0			+	+				+		+		+
0408	1	1	0	0			+	+				(+)	+	+	(+)	+
1122	1	0	0	0	+	+				+	+					
0402	1	0	0	0		+		+		+						+
0414	1	0	0	0			+	+		+						+
0415	1	0	0	0			+	+			+	+				
* 0406	0	1	1	0		+		+				(+)	+	+		+
0420	0	1	1	0			+	+				(+)	+	+		+
0411	0	1	0	1		+		+				(+)	+	+		+
0417	0	1	0	1			+	+				(+)	+	+		+
1410	0	1	0	0	+		+					(+)	+	+		+
0422	0	1	0	0		+		+				+		+		+
* 0403	0	1	0	0		+		+				(+)	+	+		+
* 0407	0	1	0	0			+	+				(+)	+	+		+
0412	0	0	0	1		+		+	+					+		
0418	0	0	0	0		+		+	+					+		

a) 0401と0416はBsr Iで区別可能

b) (+)は認識部位と切断部位が重複するために現れるバンド

*) 日本人に検出されるアレル

% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol) を加えて試料とした。なお、ヘテロ接合体のSSCPパターンの解析には、アレル既知のホモ接合体PCR産物を1.5 μ l づつ等量混合したものを試料として用いた。

(2) 電気泳動

5%グリセロールと0.5 \times TBE (45mM トリス, 45mM ホウ酸, 1.4mM EDTA : pH8.2) を含んだ8%ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド : ビスアクリルアミド = 50 : 1, ゲルサイズ = 90mm \times 80mm \times 1mm) を作成し, ATTO AE-6400 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽を用いて, 200V 定電圧で90分間室温にて電気泳動を行った。

(3) DNA の検出

電気泳動後のゲルを, 500 μ g/ml のエチジウムブロミド溶液で20分間染色後, 254nm のUV 照射下写真撮影を行った。銀染色は, 第一化学の銀染色キットを説明書に従い使用した。

結 果

1. DRB1*04 アレルのPCR-RFLP法による解析

表1に, DRB1*04 アレル22種のホモ接合体の切断パターンを示す。日本人に検出されるアレルは, 0401, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0410の7種であり⁹⁾, そのうち, 0406, 0407, 0410の3種は, Sac II, Ava II, Hinf I, Hae II, Hph Iの5つの制限酵素を用い, 残りの5種のアレルについてもMnl Iを追加することで日本人由来のすべてのアレルが判定できるとしている⁹⁾。ところが, 実際にMnl Iで処理したRFLPパターンを図2に示すが, 71bpと67bpのバンドの分離は可能であるものの, 113bpのバンドはほとんどのアレルにおいて107bpのバンドと共に観察されている。これは, コドン68から71の間でMnl Iの酵素認識部位と切断部位が重複するために現れるバンドと考えられ, ホモ接合体においては, 0401と0408, 0404と0413, 0405と0409の区別には注意を要する(表1)。さらに, DRB1*04ヘテロ接合体では, Mnl Iによる113bpのバンドが判定の決め手となり得ないため, Sac II + Hph I, Hae II + Hph Iを用いたdouble digestionを追加してもなお, 日本人に検出されるヘテロ接合体21組のうちの16組に区別不能な組み合わせが存在する。

2. DRB1*04 アレルのPCR-SSCP法による解析

(1) エチジウムブロミドによるSSCPバンドの検出

電気泳動後のポリアクリルアミドゲルをエチジウムブロミドで染色した結果は, その後同一のゲルで銀染色を行った結果と一致するとともに, 感度も銀染色と比較して劣るものではなく, エチジウムブロミドで十分SSCPバンドが検出可能であることが分かった(図3)。なお, PCR産物に滅菌蒸留水を加えただけの試料と, 熱処理を加えた試料とを同時に泳動後, エチジウムブロミド及び

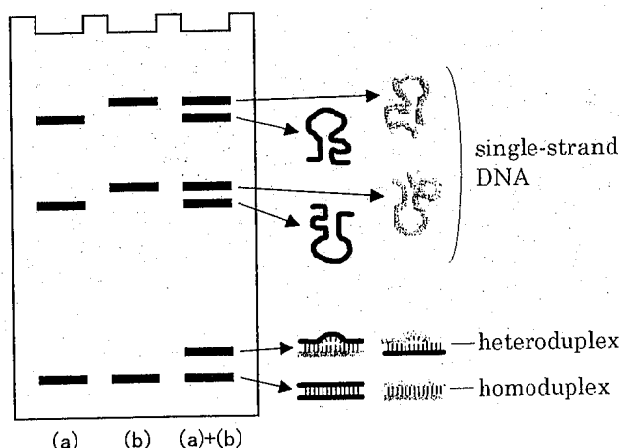


図1 PCR-DCP法の原理

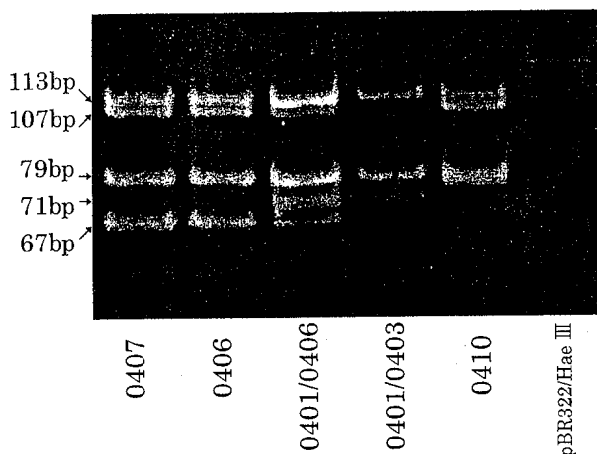


図2 DRB1*04 アレルのMnl I処理

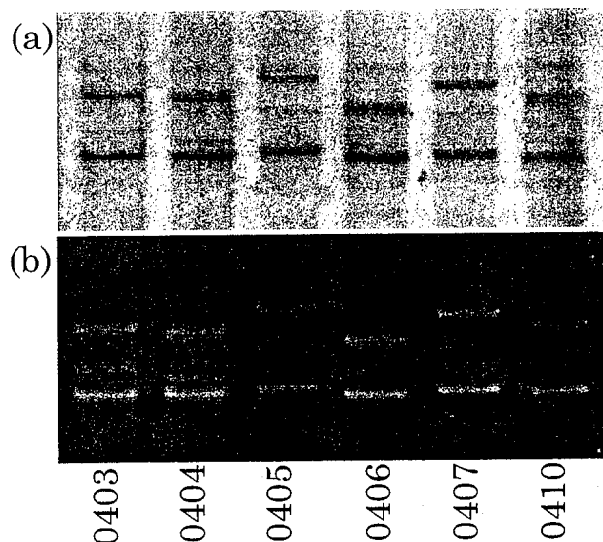


図3 エチジウムブロミドと銀染色との比較
(a) 銀染色, (b) エチジウムブロミド染色

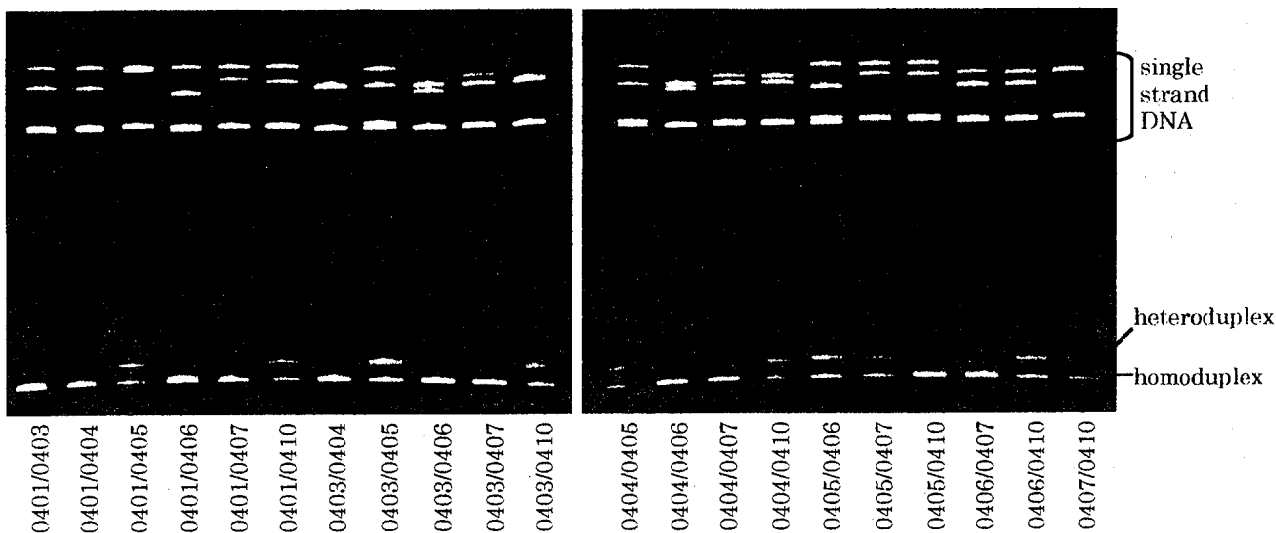


図4 ヘテロ接合体のSSCPパターン

銀染色で染色した結果、熱処理後の試料にのみ新たなバンド (SSCPバンド) が検出されることを確認した。

(2) グリセロール濃度の検討

ポリアクリルアミドゲル中にそれぞれ最終濃度10%, 5%のグリセロールを添加したゲルと、添加していないゲルの3種類を用いてSSCPパターンの比較を行った。10%と5%添加の場合は互いにほとんど同様のパターンを示したが、無添加のゲルではアリルによってバンドのパターンが異なるものがあり、検査の対象となるアリルに応じてグリセロール無添加のゲルを使用するとより明瞭な判定が可能となる場合がある。

(3) SSCPパターンの解析

種々のアリルのPCR産物を任意に等量混合し熱処理を行った電気泳動パターンを図4に示した。この結果から、DRB1*0403と0404はほとんど同様のパターンを示すため、両者の区別は難しいが、それ以外のアリルは図5に示すようなそれぞれ固有のSSCPパターンを持ち、他のアリルのSSCPバンドが同時に存在しても互いに影響されないことが分かる。

(4) ヘテロデュプレックスバンドの解析

図4から、ヘテロデュプレックスバンドはDRB1*0405あるいは0410とそれ以外のアリルとの組み合わせの場合にのみ観察されることがわかる。これは、それぞれのアリルの塩基配列と比較すると(表2)、コドン57がAGC(0405, 0410)とGAT(0401, 0403, 0404, 0406, 0407)で異なる組み合わせの際、すなわち3塩基連続したミスマッチの存在下でのみヘテロデュプレックスが検出されることを示している。

(5) SSCP法によるDRB1*04サブタイピング

PCR-RFLP法で確定できない16組のヘテロ接合体を解析するため、検体PCR産物と予想されるアリル既知

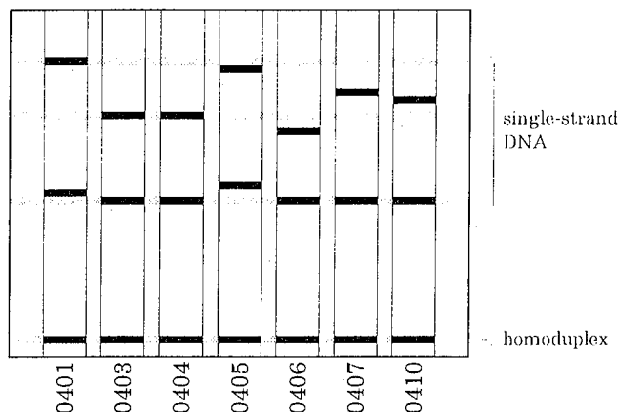


図5 DRB1*04アリルのSSCPパターン

表2 DRB1*04アリルの塩基配列

DRB1	allele frequency ^a	Codon No.				
		37	57	71	74	86
0401	1.16	TAC	GAT	AAG	GCG	GGT
0403	3.00	---	---	-G-	-A-	-TG
0404	0.22	---	---	-G-	---	-TG
0405	15.51	---	AGC	-G-	---	---
0406	3.22	-C-	---	-G-	-A-	-TG
0407	0.44	---	---	-G-	-A-	---
0410	1.82	---	AGC	-G-	---	-TG

a:橋本らの文献⁹⁾から引用

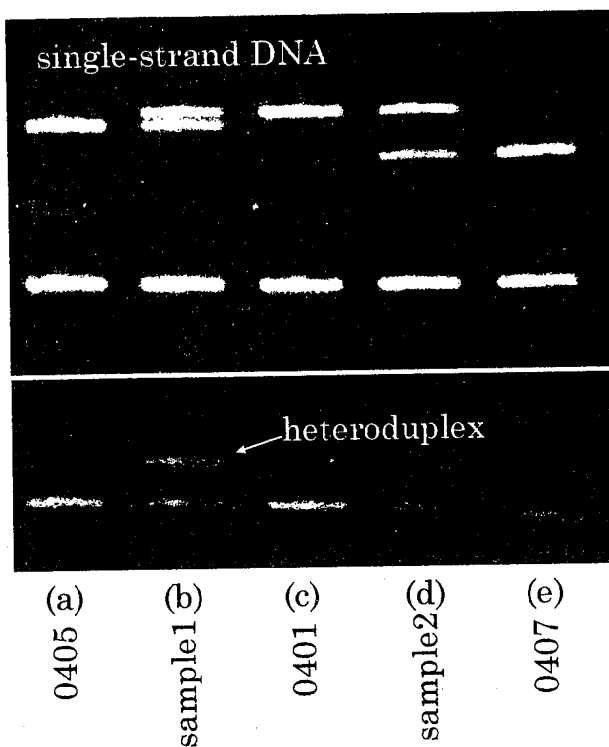


図6 DRB1*04アリのサブタイピング

のパネルPCR産物とを同時にSSCP法で解析した結果を図6に示した。レーン(b)のサンプル1は、PCR-RFLP法ではDRB1*0401/0405, 0401/0409, 0405/0408, 0408/0409の4通りの組み合わせが考えられるが、0401, 0405のパネルDNAと同時に解析することで0401/0405のヘテロ接合体であることが確認できる。同様に、レーン(d)のサンプル2は、RFLP法で0401/0407, 0407/0408の2通りの組み合わせが考えられるが、0401, 0407のパネルDNAとの解析により0401/0407であることが確認できる。その他の組み合わせについても同様な解析で容易に確認が可能であった。

次に、PCR-SSCP法を用いたDRB1*04サブタイピングの可能性を検討するため、検体PCR産物に内部マーカーとしてDRB1*0404を等量混合した試料と、検体PCR産物みの2通りのSSCPパターンを同時に解析する方法を試みた。図5に示したSSCPバンドと、ヘテロデュプレックスバンドの有無を判定の指標として解析を行った結果、本法のみではDRB1*0403と0404の区別ができなかったが、補助的に制限酵素Sac IIを使用すると、0404は切断され、0403は切断されないことで明確に区別できることが分かった。

考 察

HLA遺伝子の多型性を解析する手段として種々の方法が開発されており、当所ではPCR-RFLP法を中心に

解析を行ってきた。最近のDRB1アリの増加に伴い、判定表の追加等の改善を行い対応してきたが、特にDRB1*04アリのヘテロ接合体の解析では多型性を認識する制限酵素が限られていることから判定に困難を伴うことが多い。このことは、当所が参加しているDNAエクステンションの結果からも示唆され、DRB1*0401/0403, 0401/0405, 0405/0407, 0405/0410等のヘテロ接合体に誤判定が見受けられる。そこで、当所ではRFLP法を補完し確認検査として使用可能な方法として、容易に多型性を解析できるSSCP法に注目して検討を行った。

通常のSSCP法は、一本鎖DNAを効率よく生成させるためにPCR産物をホルムアミド色素と混合して加熱処理を加える方法)が一般的であるが、この方法では一本鎖DNAが不安定なため、電気泳動の際の温度変化は1°C以内に抑える等の厳密な温度管理が不可欠であり、専用の電気泳動装置が必要となる。また、泳動後の一本鎖DNAの検出は銀染色でなければ感度が悪いとされ、判定までには時間と労力を要する特殊な方法である。

これらの欠点を解消し、すべての検査室で容易に検出可能な方法を確立するため、一本鎖DNAの生成に丸屋らが提唱するLIS-DCP法⁹⁾の原理を応用した。実際は、PCR増幅産物を1.5倍の滅菌蒸留水で希釈するという簡単なものであるが、この方法で生成された一本鎖DNAは室温で通常のミニスラブ電気泳動槽を用いても再現性のある結果が得られることが分かった。なお、種々の条件を検討した結果、本法の電気泳動パターンに最も影響を与える因子としては、アクリルアミドの濃度やビスとの比率あるいはグリセロールの濃度以上に、×10 TBEバッファの組成やpHが重要と考えられ、今回はpH8.2で最も良好な結果が得られた。また、一本鎖DNAの検出には銀染色を用いるのが一般的であるが、図3に示したようにエチジウムブロミドでもほとんど同様の感度が得られ、エチジウムブロミドの使用によってかなりの時間短縮が可能となった。

そこで、従来よりも簡略化されたSSCP法を用いて、RFLP法のみでは区別できなかった16組のヘテロ接合体の解析を行った。これは、PCR-RFLP法である程度アリを絞り込んだ後、追加の制限酵素処理やdouble digestionを行う代わりに、検体PCR産物と予想されるアリ既知のパネルPCR産物とを同時にSSCP法で解析するというものであるが、2時間以内に判定が終了し、得られた結果もきわめて明瞭であった。厳密に言えば、DRB1*0403と0404がほとんど同じパターンを示すことから、今回検討していないすべてのアリについてSSCPパターンを解析して違いを明らかにすることが必要であるが、日本人での検出例がほとんどないことや、区別できない0403と0404がコドン74の1塩基ミスマッチでしかない(表2)こと、当所では本法の併用開始以降精度管理での誤判定はないことなどから本法で得られた

結果は妥当なものと考えられる。

また、本法のみによるサブタイピングの可能性を検討したが、SSCPで区別できなかったDRB1*0403と0404は、補助的に制限酵素 Sac II を使用すると0404は切断され0403は切断されないこと、SSCPパターンがよく似ているDRB1*0407と0410は、内部マーカーとして用いる0404との間のヘテロデュプレックスバンドが0410の場合のみ観察されることから容易に区別が可能である。なお、今回の検討ではSSCP法単独でのアレルタイピングについては、その可能性を述べるにとどまったが、電気泳動の条件やバッファの組成等をより詳細に検討することで十分改善の余地があると考えている。

まとめ

1. PCR産物を1.5倍の滅菌蒸留水で希釈して熱処理を加えた試料を、通常のスラブ型電気泳動槽で電気泳動後、エチジウムブロミドで染色するだけで明瞭なSSCPパターンが検出できることが分かった。
2. 各アレルのSSCPパターンを比較すると、DRB1*0403と0404はほとんど同じで区別が困難であったが、その他のアレルはヘテロデュプレックスバンドを同時に解析することで明確な判定が可能であった。
3. RFLP法とSSCP法を併用することで、RFLP法単独では区別できなかったヘテロ接合体が簡単かつ迅速に判

定でき、本法がRFLP法を補完する確認検査として有効であることが分かった。

文 献

- 1) Opelz G. et al : Transplantation, 55, 782 - 785 (1993)
- 2) 骨髄移植調査研究事業報告書 (平成6年度), (1994)
- 3) Bodmer JG. et al : Tissue Antigens, 46, 1 - 18 (1995)
- 4) Kimura A. et al : HLA 1991 vol. 1., Oxford University Press, Oxford, 397 - 419 (1992)
- 5) Ota M. et al : Tissue Antigens, 39, 187 - 202 (1992)
- 6) Olerup O et al : Tissue Antigens, 39, 225 - 235 (1992)
- 7) Santamaria P. et al : Hum Immunol, 37, 39 - 50 (1993)
- 8) 丸屋悦子他 : 今日の移植, 8, 417 - 423 (1995)
- 9) Hashimoto M et al : Tissue Antigens, 44, 166 - 173 (1994)
- 10) Nishimoto T et al : Tissue Antigens, 42, 497 - 501 (1993)

水処理副生成物に関する基礎的研究

石丸尚志 武智拓郎*¹ 大倉敏裕*² 青野 眞 森 喜一

A Study on the Byproducts of Water treatment

Takashi ISHIMARU, Takuro TAKECHI *¹, Toshihiro OHKURA *²,
Makoto AONO, Yoshikazu MORI

Volatile organic compounds such as THMs (Trihalomethans) were standardized in water quality standard, moreover halo-acetonitriles and halo-acetic acids were specified as monitoring indices in the guideline. An investigation was undertaken to observe the levels of these organic compounds in water of several water supply facilities in Ehime prefecture. As a result, levels of these chemicals were all within standard and guideline values.

THMs were more produced by surface raw water than by ground water or reservoir water, and are more produced in summer than in other three seasons. Further, THMs products increased with an increase of the distance between distributing reservoir and water tap at each consumer's house.

These results show that temperature, concentration of organic compounds and reaction time influence the concentration of disinfection byproducts much more.

Moreover, bromated products were more detected from raw water which contained bromide ion such as deionized plant water than from fresh land water. Mechanism of bromated products production were experimentally examined, that showed bromated products are not yielded from the chlorinated products by means of transforming process under bromide and chloride ions co-existence.

Keywords : disinfection byproducts, trihalomethane formation potential, bromated trihalomethans,

はじめに

水を塩素処理する際に、トリハロメタン等の副生成物が生ずることはよく知られ、その発ガン性等の健康影響のため、1993年の水道水質基準改正においてクロロホルム等のトリハロメタンは水質基準項目に、ハロ酢酸、ハロアルデヒド類は監視項目に制定された。

基準設定の際の実態調査において、都市部の水道では検出状況が把握されていた¹⁾²⁾が、愛媛県内では単発的に把握された例³⁾があるのみで、系統だって把握されていない。

そこで、まず、水源の状態の異なる3系統の水道について、原水から末端の給水栓に至るまでの、副生成物の挙動について季節毎に調査を行い水温等との関係を検討する一方、THM生成能と比較検討を行った。さらに、原水の水質がTHM類の生成に及ぼす影響を検討する²⁾⁴⁾ために、水源の種類が異なる(ダム水、地下水、渓流水)水道施設から採水し生成に及ぼす因子を検討した。

次いで、各水道施設毎に原水から末端の給水栓までのTHM類の挙動を調査し、塩素接触時間と生成量との関係を検討した。

さらに、水中に臭素イオンが存在する場合、添加された塩素により活性化され臭素化THMの生成が考えられており、昨今渇水対策等に利用される海水淡水化水⁵⁾や、海水の影響を受ける地表水や地下水については、海

愛媛県立衛生研究所 松山市三番町8丁目234番地

*1 現愛媛県保健環境部業務課

*2 現西条地方局衛生指導課

水由来の臭素イオンが共存することから THM 前駆物質の濃度によっては、臭素化 THM の多量の生成が予想される^{6) 7)}。

そこで、臭素イオン共存下における消毒副生成物の生成、挙動等に関し実験的にも検討を行った⁸⁾。

調査及び実験方法

1. 水道水中の THM 等水処理副生成物の経時変化及び常在値の把握

検体採取場所及び調査実施時

検体採取は、各季節毎に実施し水温等との関係について検討する。

県下の東・中・南予の水道施設における原水・浄水・給水を採水しその差について考察する。

採水地点等を表 1 に示す。

表 1 系統別水道水採取地点

	水源の種類	採水地点原水	浄水	給水	備考
東予	地下水	U 水源地	U 浄水場	K 公園	
	ダム水	K 浄水場	K 浄水場	T 保育所	T ダム
	ダム水	N 浄水場	N 浄水場	2 ヶ所	Y ダム
中予	渓流水	R 浄水場	R 浄水場	KHC	
南予	ダム水	K 浄水場	K 浄水場	N 企業団	S ダム N ダム
	ダム水	L 浄水場	L 浄水場	T 役場	Z ダム

2. 水道水中の THM 等水処理副生成物の生成に及ぼす因子の検討

1) において、次の項目の違いから生成因子を検討する。

- ・水源の種類（ダム水、地下水、渓流水）の異なる水道施設から採水し、生成に及ぼす因子を検討する。

- ・温度の違い－季節毎に採水することにより、温度の要因を検討する。

3. 給水地点の距離による THM の消長の検討

同一条件の処理がなされた場合、THM 生成には時間の影響が大きいことは明らかである。そこで、1) においての浄水から給水への THM の増加を見る一方、2) 市において同一配水系統内で配水池からの距離の異なる給水栓から採水し、その消長を検討した。

- ・配水区域の広い給水栓中 THM 調査

A 市ではダム水の系統、伏流水の系統が 3、その混合と大きく 5 つの配水系統に分かれ、水温の高く塩素との接触時間による差異の最も大きくなる夏期に採水した。B 市では、ダム水の系統、地下水の系統、ダム水と地下水

の混合した系統と大きく 3 つの配水系統に分かれ、同じく夏期に採水測定した。それぞれ、配水池での値と原水の生成能とから、生成割合を算出し接触時間との関係を検討した。

4. 海水淡水化プラント水の分析による生成の検討

平成 6 年夏、本県を襲った異常渇水のため島しょ部等では、臨時または恒久対策として海水淡水化プラントを設置し、当所に於いて給水開始前検査を実施した。海水の場合、特徴的に臭素イオンが含まれており、淡水化処理を行った後も、通常の原水以上に臭素イオンが含まれており、臭素化 THM の生成が予想される。そこで、依頼のあった水質試験をもとに、臭素化 THM 生成の検討を行った。試験は原水及び浄水について実施した。

5. 臭素イオン共存下における水処理副生成物の生成挙動等に関する基礎的実験

(1) 臭素イオンの THM 生成に及ぼす影響

臭素化 THM の生成量は、水中の臭素イオンの濃度と密接な関係のあることが報告されていることから、海水淡水化水等では海水由来の臭素イオンの影響により生成する新たな臭素化 THM と THM 生成量の増加が危惧される。

このため、臭素イオン濃度と生成する THM の種類及び THM 生成量との関係について検討するため、臭素イオン濃度の異なる条件下で THM 生成能 (THMFP) 試験を実施した。試験は上水試験方法に準じ、水温 20℃、pH7、反応時間 24 時間で塩素処理を行った。

(2) THM の生成機構に関する実験

塩素化及び臭素化により、生成されたクロロホルムやプロモホルムの安定性について検討するため、臭素イオン存在下でクロロホルム溶液を塩素処理しクロロホルム濃度の変化について測定し、安定同位体¹³C でラベルしたクロロホルムからの臭素化等を検討した。

結 果

1. 水道水中の THM 等水処理副生成物の経時変化及び常在値の把握

表 2 に調査結果を示す。

T - THM 濃度に関して、今回調査した浄水中の T - THM 濃度は水源別に見るとダム水が渓流水及び地下水に比較し高濃度であった。給水中の T - THM 濃度に関しても浄水同様ダム水が渓流水及び地下水に比較し高濃度であった。このことから、ダム水は滞留水であるため渓流水や地下水に比較しトリハロメタン前駆物質の含量が高いことが考えられる。T - THM 濃度の最も高い検体はダム水を原水とする 8 月に採水した給水で 22.0ppb であったが今回設定された基準値 100ppb を下回っており、また、同時採水の原水による生成能の 50% 程度の生

成であった。

ホルムの最も高い検体は15ppbで今回設定された基準値

T-THMの構成成分のうち、ダム水と渓流水ではクロロホルムが特に高く、50~80%を占めている。クロロホルムの最も高い検体は15ppbで今回設定された基準値60ppb以下である。

表2 愛媛県下水道水中のTHM等水処理副生成物の経時変化

N水道企業団 (原水)	C- KMnO4	THMFP CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	5.3	22.6	6.4	1.3	0.0	30.3	4.0	25.9	2.0	20.7	
8月	4.2	38.7	7.1	1.2	0.0	47.0	30.1	35.2	5.8	23.0	
10月	2.3	16.2	7.1	1.9	0.0	25.2	12.8	13.9	1.8	17.9	
1月	2.9	23.5	6.7	1.5	0.0	31.7	11.0	20.0	2.2	9.5	

N水道企業団 (浄水)	C- KMnO4	THM CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	0.5	8.3	3.5	0.9	0.0	12.7	0.0	11.0	0.0	20.5	0.6
8月	1.2	10.4	4.6	1.0	0.0	16.0	11.4	14.4	2.3	22.0	0.5
10月	0.5	7.4	3.9	1.9	0.0	13.2	3.7	5.0	1.4	17.2	0.7
1月	2.5	2.2	1.9	0.8	0.0	4.9	4.2	2.2	0.0	8.8	0.4

N水道企業団 (給水)	C- KMnO4	THM CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	0.7	11.1	4.0	1.1	0.0	16.2	0.0	13.0	0.0	22.0	0.3
8月	1.2	15.1	5.6	1.3	0.0	22.0	11.0	16.1	4.2	25.2	0.4
10月	0.5	9.1	4.7	2.1	0.0	15.9	4.2	5.3	1.9	17.8	0.4
1月	1.9	2.9	2.4	1.0	0.0	6.3	4.4	4.2	0.0	8.2	0.4

T水道企業団 (原水)	C- KMnO4	THMFP CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	4.9	21.8	5.2	0.9	0.0	27.9	4.1	28.7	7.0	17.5	
8月	2.5	21.5	7.6	1.9	0.0	31.0	18.6	19.7	3.1	22.5	
10月	1.9	10.0	5.2	1.4	0.0	16.6	5.0	9.0	1.4	16.3	
1月	2.3	16.7	5.3	1.5	0.0	23.5	5.9	10.4	0.0	7.5	

T水道企業団 (浄水)	C- KMnO4	THM CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	0.4	2.1	1.3	0.0	0.0	3.4	0.0	4.6	0.0	19.0	0.4
8月	1.0	2.2	1.5	1.1	0.0	4.8	1.2	0.0	0.0	21.2	0.4
10月	0.4	3.7	2.7	2.0	0.0	8.4	0.0	0.0	0.0	17.0	0.4
1月	1.5	1.9	1.8	0.8	0.0	4.5	2.5	2.0	0.0	7.5	0.5

T水道企業団 (給水)	C- KMnO4	THM CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	0.4	4.5	3.0	1.6	0.0	9.1	0.0	5.6	0.0	19.0	0.2
8月	0.8	5.1	4.2	2.0	0.0	11.3	5.0	1.9	0.0	23.5	0.2
10月	0.5	5.3	3.3	2.2	0.0	10.8	1.0	0.0	0.0	17.2	0.3
1月	1.6	3.2	2.9	1.2	0.0	7.3	4.3	4.4	0.0	9.2	0.4

Tダム (原水)	C- KMnO4	THMFP CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	5.2	35.6	4.4	0.0	0.0	40.0	7.4	26.7	4.4	21.0	
8月	3.1	30.9	5.7	1.1	0.0	37.7	14.0	22.4	5.2	20.7	
10月	1.9	16.2	4.8	0.8	0.0	21.8	5.0	9.3	2.5	12.8	
1月	3.0	18.5	4.2	0.6	0.0	23.3	5.2	12.8	1.2	6.7	

Tダム (浄水)	C- KMnO4	THM CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	1.7	3.0	1.2	0.0	0.0	4.2	0.0	4.8	0.0	20.5	0.2
8月	1.1	3.0	1.1	0.0	0.0	4.1	5.6	2.5	0.0	20.2	0.3
10月	0.8	3.5	0.9	0.0	0.0	4.4	2.5	1.0	0.0	12.2	0.2
1月	1.8	1.2	0.7	0.0	0.0	1.9	1.4	0.0	0.0	6.8	0.2

Tダム (給水)	C- KMnO4	THM CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	1.7	6.0	2.4	0.0	0.0	8.4	0.0	5.7	0.0	20.1	0.2
8月	1.3	6.1	2.5	0.8	0.0	9.4	5.0	5.1	0.0	22.2	0.2
10月	0.8	3.9	1.6	1.1	0.0	6.6	2.2	1.6	0.0	16.5	0.2
1月	2.0	2.6	1.4	0.0	0.0	4.0	2.7	1.9	0.0	6.7	0.2

KM浄水場地 下水(原水)	C- KMnO4	THMFP CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	TTHM	CHCl2COOH	CCl3COOH	抱水クロラール	水温	RES-CI
6月	1.0	3.2	3.5	1.8	0.0	8.5	0.0	4.7	0.0	20.0	
8月	0.9	4.0	4.1	1.7	0.0	9.8	4.2	2.5	0.0	21.8	
10月	0.7	2.9	2.8	1.6	0.0	7.3	0.9	5.3	0.0	17.8	
1月	1.4	7.5	2.7	1.5	0.0	11.7	0.0	1.1	0.0	12.0	

KM浄水場地下 水(浄水)	C- KMnO4	THM				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
6月	1.2	0.5	1.2	0.9	0.0	2.6	0.0	4.1	0.0	20.1	0.3
8月	0.7	0.0	0.5	0.8	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	22.8	0.3
10月	0.6	2.3	0.5	1.1	0.0	3.9	0.0	0.0	0.0	18.0	0.4
1月	1.7	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	11.5	0.2

KM浄水場地下 水(給水)	C- KMnO4	THM				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
6月	1.4	1.2	2.3	1.8	0.0	5.3	0.0	4.1	0.0	20.1	0.3
8月	0.7	1.0	1.3	1.6	0.0	3.9	0.0	0.0	0.0	23.8	0.2
10月	0.7	2.7	1.0	1.8	0.0	5.5	0.9	0.0	0.0	17.8	0.2
1月	1.3	0.0	0.9	1.2	0.0	2.1	0.0	0.0	0.0	11.5	0.2

K町溪流水 (原水)	C- KMnO4	THMFP				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
6月	5.6	25.1	3.6	0.0	0.0	28.7	10.3	31.1	1.3	13.8	
8月	2.7	30.4	6.0	1.2	0.0	37.6	33.5	31.7	5.7	16.8	
10月	1.9	13.6	4.1	0.9	0.0	18.6	5.0	10.8	1.6	9.5	
1月	1.7	13.6	3.4	0.7	0.0	17.7	6.4	11.5	0.0	3.5	

K町溪流水 (浄水)	C- KMnO4	THM				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
6月	2.3	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	4.1	0.0	15.2	0.4
8月	1.8	1.0	0.6	0.0	0.0	1.6	1.5	0.0	0.0	16.0	0.6
10月	0.9	2.4	0.3	0.0	0.0	2.7	0.9	0.0	0.0	8.5	0.5
1月	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	0.3

K町溪流水 (給水)	C- KMnO4	THM				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
6月	2.5	6.0	1.5	0.0	0.0	7.5	0.0	5.0	0.0	17.5	0.05
8月	1.3	2.6	1.6	0.0	0.0	4.2	4.7	2.8	0.0	18.0	0.2
10月	0.9	2.5	0.8	0.0	0.0	3.3	1.2	0.0	0.0	11.0	0.2
1月	0.7	1.5	0.9	0.0	0.0	2.4	2.1	1.2	0.0	6.0	0.2

Yダム (原水)	C- KMnO4	THMFP				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
5月	2.1	10.4	2.6	0.0	0.0	13.0	3.9	15.8	3.8	13.0	
8月	1.8	16.0	5.0	0.9	0.0	21.9	9.4	13.1	2.4	25.0	
11月	2.7	13.4	3.1	0.0	0.0	16.5	4.4	15.7	3.9	14.0	
2月	2.0	7.8	3.0	0.8	0.0	11.6	3.2	10.0	2.4	6.0	

Yダム (浄水)	C- KMnO4	THM				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
5月	0.9	6.0	2.3	0.0	0.0	8.3	3.9	3.5	1.2	12.5	0.4
8月	0.6	10.1	4.4	1.1	0.5	15.6	8.7	3.6	2.4	24.7	0.5
11月	0.8	8.8	2.9	0.0	0.0	11.7	1.9	3.7	2.2	14.1	0.5
2月	1.0	3.7	2.4	0.7	0.0	6.8	0.0	1.0	0.0	6.0	0.4

Yダム (給水S)	C- KMnO4	THM				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
5月	0.5	6.9	2.8	0.5	0.0	10.2	3.0	3.2	2.3	15.0	0.4
8月	0.5	12.8	5.0	1.3	0.0	19.1	6.7	5.2	2.0	28.4	0.4
11月	0.9	10.2	3.4	0.5	0.0	14.1	2.6	4.5	2.6	15.8	0.4
2月	0.8	4.3	2.6	0.8	0.0	7.7	1.9	1.6	0.0	7.5	0.3

Yダム (給水T)	C- KMnO4	THM				TTHM	CHC12COOH CC13COOH 抱水クロール			水温	RES-C1
		CHC13	CHC12Br	CHC1Br2	CHBr3						
5月	0.5	8.4	3.0	0.6	0.0	12.0	2.9	3.6	2.5	14.0	0.3
8月	0.5	14.8	5.8	1.6	0.0	22.2	4.7	5.7	2.7	27.5	0.3
11月	0.7	11.5	3.8	0.6	0.0	15.9	1.7	5.3	2.9	14.8	0.3
2月	0.9	4.9	3.0	1.0	0.0	8.9	1.7	1.3	1.2	6.5	0.3

(単位: C-KMnO₄: mg/l, RES-C1: ppm, 水温: °C, 以外はppb)

浄水と給水の濃度を比較するといずれも給水中の濃度が高く水温が高いことや、塩素添加後の経過時間が長いことが原因と考えられる。

各採水時期における濃度を比較すると最も水温の低い1月が最低の値を示し、明らかに水温が生成に影響を及ぼしていることが考えられる。

2. 水源の違いによるTHM生成量の違い

ダム水、渓流水、地下水、の3区分でTHM生成量の比較を行う。

水源別THM生成量

図1に水源別T-THM濃度を、図2に水源別T-HOX(総親水性有機ハロゲン化合物)濃度を示す。原水の生成能はダム水、渓流水の順に高いが、生成能に対する生成の割合は渓流水が低く、塩素注入量が少ないこと、また水温が他の水源より低いことが原因と考えられる。図3~8には水源別に季節別のT-THM濃度及びT-HOX濃度を示した。図3、4には地下水中のT-THM濃度及びT-HOX濃度を示し、図5、6には渓流水中の、図7、8にはダム水中のT-THM濃度及びT-HOX濃度を示した。

今回調査したTHM生成能は水源別に見るとダム水及び渓流水は地下水に比較し高濃度であった。

THM生成能に対するT-THM濃度の生成割合は水源別に見るとダム水が最も高く、その割合は23.1%であった。渓流水では4.7%と低い割合であった。これは浄水過程の違いによる、塩素添加後の経過時間の違いによるものと考えられる。

T-HOX濃度

今回調査した浄水中のT-HOX濃度は水源別に見るとダム水が渓流水及び地下水に比較し高濃度であった。今回調査した給水中のT-HOX濃度は水源別に見ると浄水同様ダム水が渓流水及び地下水に比較し高濃度であった。このことから、ダム水は滞留水であるため、渓流水や地下水に比較し、HOX前駆物質の含量が高いことが考えられる。T-HOX濃度の最も高い検体は、ダム水を原水とする8月に採水した給水で31.3ppbであった。

T-HOXの構成成分としては、トリクロロ酢酸(指針値300ppb)16.1ppb、ジクロロ酢酸(指針値40ppb)11.0ppb、抱水クロラール(指針値30ppb)4.2ppbが最も高い値であったが指針値に比較し低い値であった。浄水と給水中のT-HOX濃度を比較すると何れも給水中の濃度が高かった。この原因は、給水は浄水に比較し水温が高いことや塩素添加後の経過時間が長いことによるものと考えられる。HOX生成能は、水源別に見るとダム水及び渓流水は地下水に比較し高濃度であった。

HOX生成能に対する浄水中のT-HOX生成割合は水源別に見ると、ダム水が最も高く、その割合は、28.0%であった。

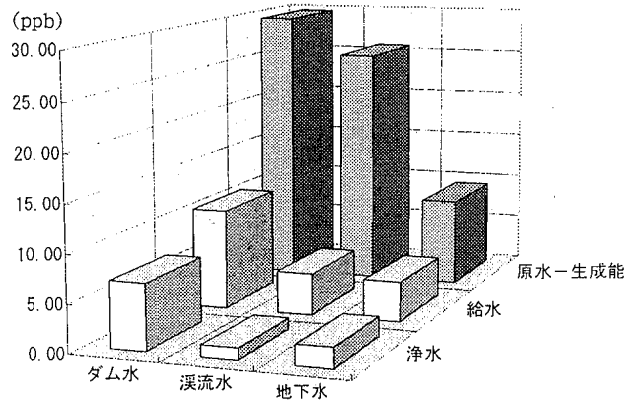


図1 水源別のT-THM濃度

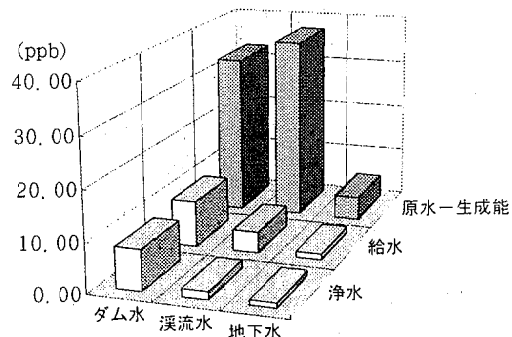


図2 水源別のT-HOX濃度

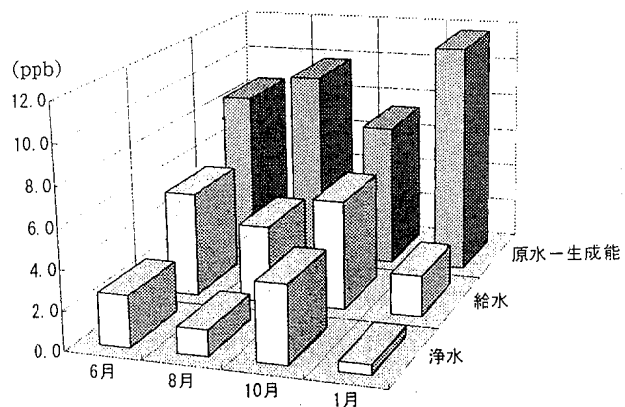


図3 地下水のT-THM濃度

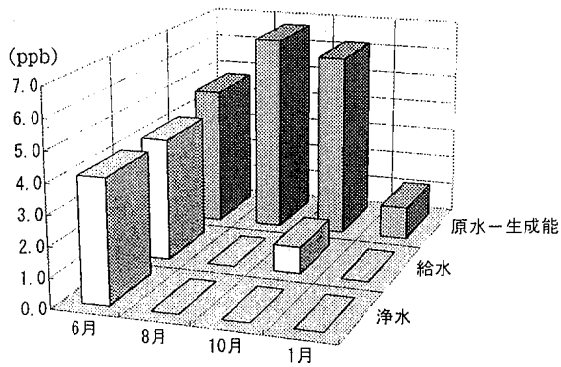


図4 地下水中のT-HOX濃度

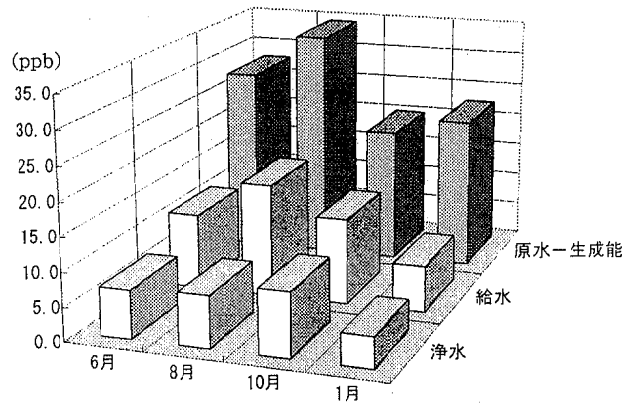


図7 ダム水中のT-THM濃度

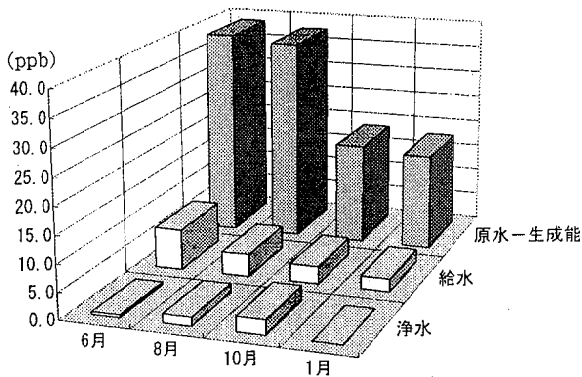


図5 渓流水中のT-THM濃度

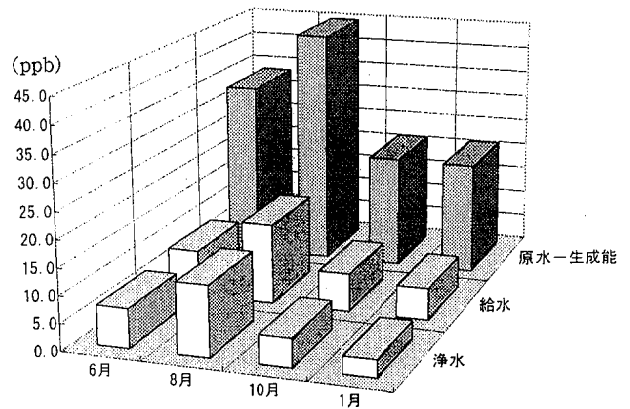


図8 ダム水中のT-HOX濃度

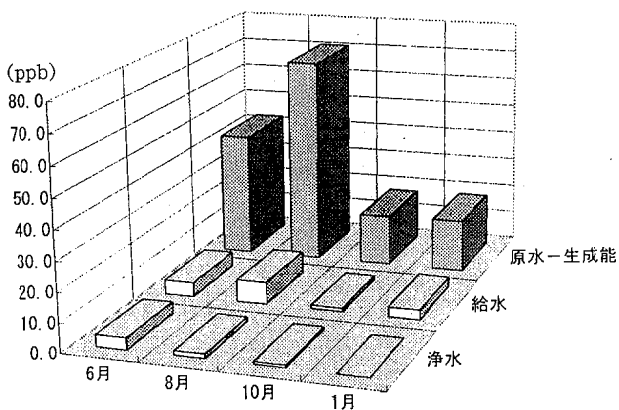
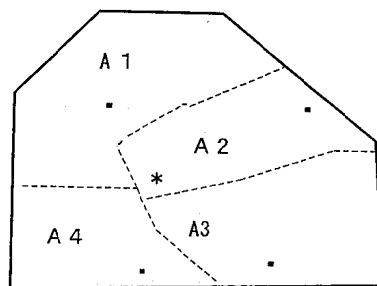


図6 渓流水中のT-HOX濃度

3. 給水地点別THM生成量の違い

A市, B市における, 配水池からの距離別THM生成量は, 塩素との接触反応時間を反映するものであり, 同時に実施した原水による生成能との比で評価できる。

図9, 10にA市, B市の配水区域別給水区域を模式化して示す。図中, 各給水区域内の点は浄水場及び配水池を示す。



A2区域内*印の浄水場はA1区域に給水している

図9 A市の配水区域別給水区域

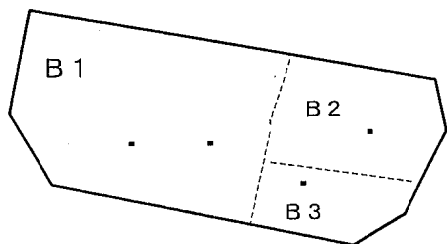


図10 B市の配水区域別給水区域

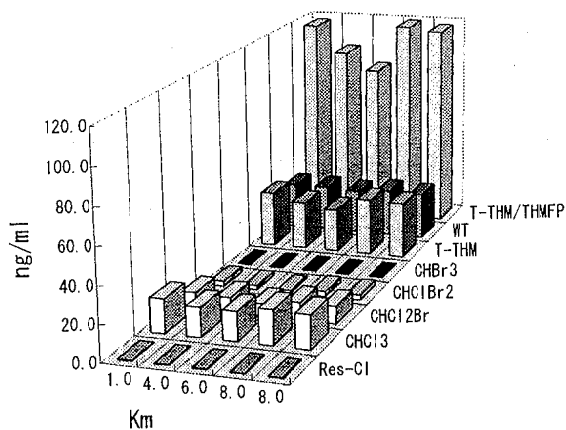


図13 距離別 THM 生成量 (A2 区域)

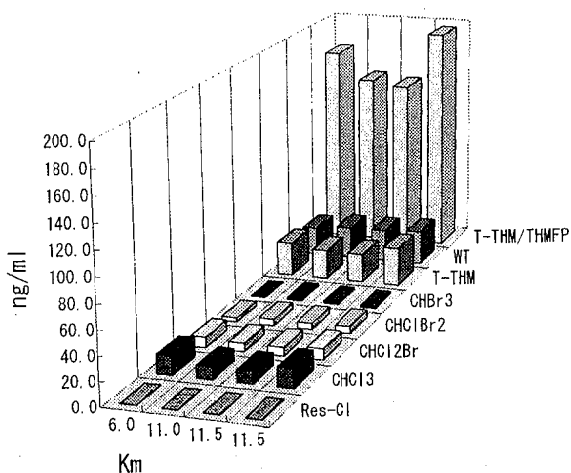


図11 距離別 THM 生成量 (A1 - 1 区域)

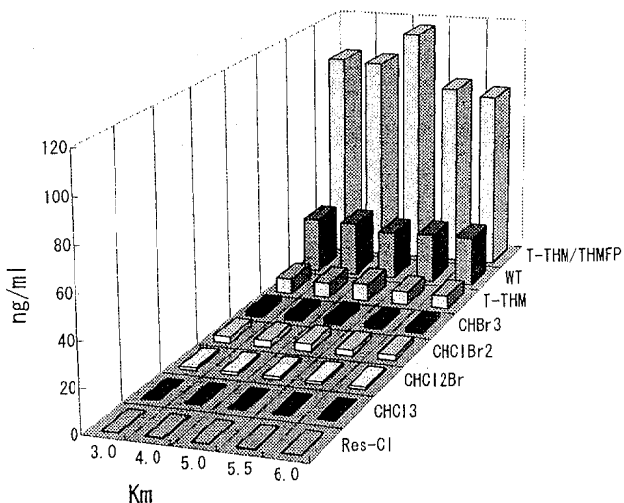


図14 距離別 THM 生成量 (A3 区域)

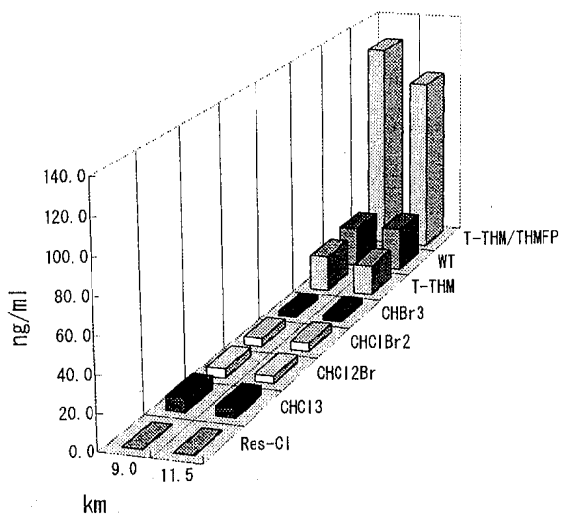


図12 距離別 THM 生成量 (A1 - 2 区域)

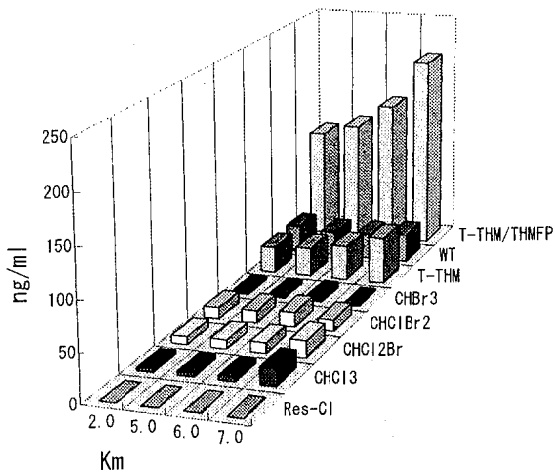


図15 距離別 THM 生成量 (A4 区域)

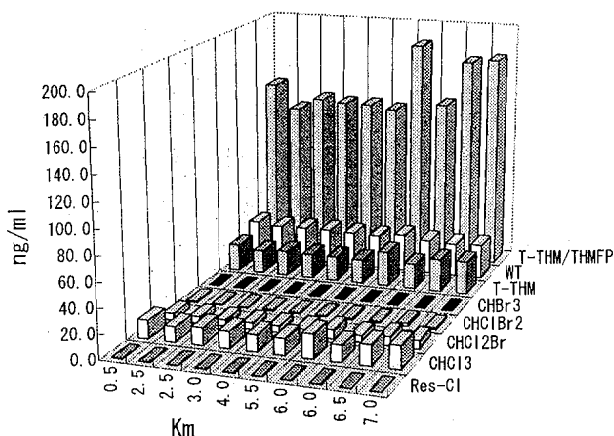


図16 距離別 THM 生成量 (B1 - 1 区域)

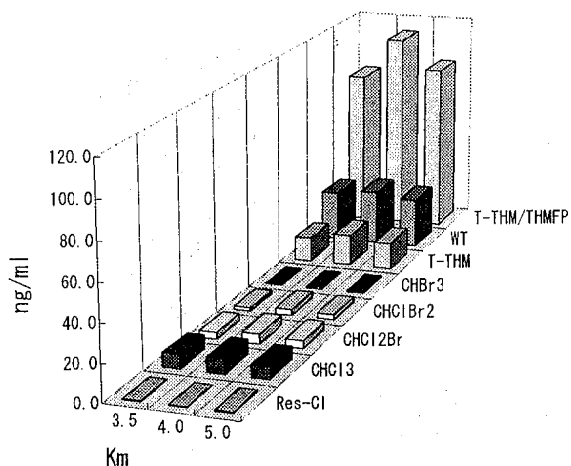


図17 距離別 THM 生成量 (B1 - 2 区域)

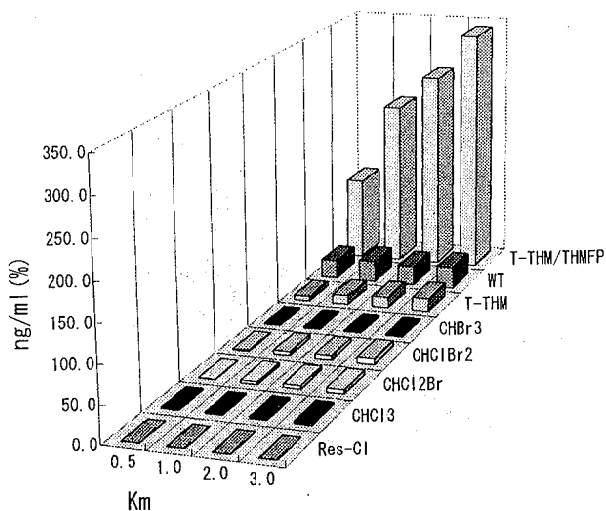


図18. 距離別 THM 生成量 (B2 区域)

図11~18には、浄水場からの距離別のTHM等の生成量を示した。図中T-THM/THMFPは%で、WT(水温)は℃で示し、その他はppbで示した。A4とB2地区で顕著に距離による生成量の増大が見られたが、B1やA1のように原水が混合されている区域では、その混合比率が給水担当者にも明確に把握されていないため、実験的に求めるTHMFPの値が必ずしも実態を反映しているものでないため、距離との関係が明瞭にはでなかった。(原水の種別に(A1-1, A1-2, B1-1, B1-2)と表示した)

4. 海水淡水化プラント水の分析結果

表3には、I市、U村で実施した海水淡水化プラント水の分析結果を示す。

海水そのものの生成能は、I市、U村共に瀬戸内海の海水を使用しているため同程度で、臭素化THMを中心に70ppb程度の生成能を示している。

しかし実際の生成量は、海水そのものの生成能の1/10以下程度であり、淡水化装置に導入する前に、フィルターを通過させることにより、有機物を除去していることが原因と考えられる。

表3 海水淡水化プラント水の分析結果

U村海水淡水化処理水THM生成結果 (ng/ml)								
	CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	T-THM	EC(μS/cm)	硬度(mg/l)	蒸発残留物(mg/l)
海水(生成能)	0.6	0	2.6	70.6	73.8	40700	5960	34440
10月浄水	0	0	0.7	2.9	3.6	397	1.8	217
8月浄水	2.0	3.0	5.0	4.0	14.0		4.0	168.0

I市海水淡水化処理水THM生成結果 (ng/ml)								
	CHCl3	CHCl2Br	CHClBr2	CHBr3	T-THM	EC(μS/cm)	硬度(mg/l)	蒸発残留物(mg/l)
海水(生成能)	0.9	0.0	3.9	63.6	68.4	40000		34300
処理水(浄水)	0.0	0.0	1.6	2.8	4.4	410		212
処理水(生成能)	0.5	0.0	1.2	3.0	4.7			212

5. 臭素イオン共存下における水処理副生成物の生成挙動等に関する基礎的実験

(1) 図19は、フミン酸ナトリウム溶液(260nmでの吸光度0.02)に臭素イオンを添加後、実施したTHM生成能試験の結果を示している。結果は、共存する臭素イオンの濃度の上昇と共にクロホルム濃度は減少した。プロモジクロロメタン及びジプロモクロロメタンについては、臭素イオンの上昇と共に増加したが、ある一定の濃度に達するとその後は減少し、プロモホルムについては顕著にその増加が見られた。

また、図20に示すようにTHM類の各成分割合(モル比:%)についても同様な結果が認められた。

次に、フミン酸ナトリウム溶液の濃度を2.5倍に調整し、同一条件でTHM生成能試験を実施したところ、図21,22に見られるように同様な傾向を示した。これらのことから、THM生成濃度はフミン酸濃度及び臭素イオン濃度とは明らかに正の関係のあることが認められた。

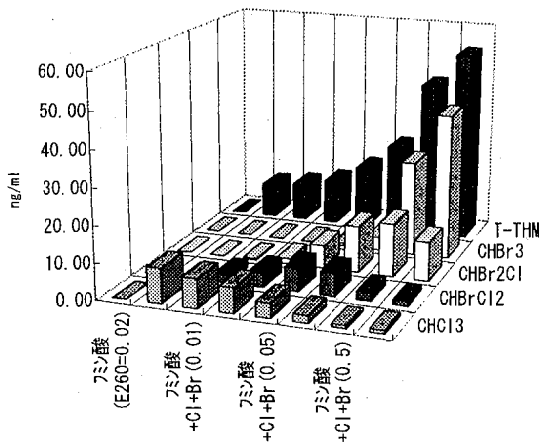


図19 THM生成能試験 (フミン酸ナトリウム溶液 $E_{260} = 0.02$ に Br イオン添加)

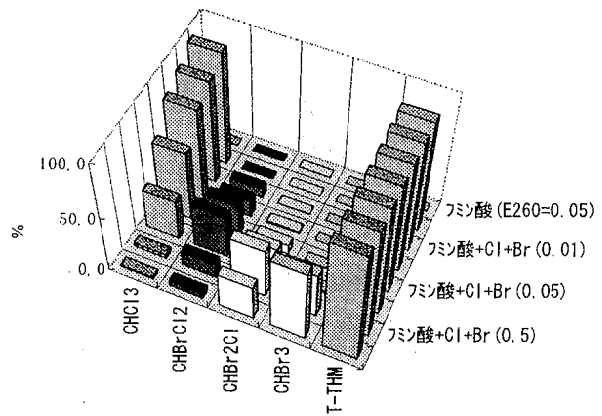


図22 THM 類の各成分割合 (フミン酸ナトリウム溶液 $E_{260} = 0.05$ に Br イオン添加)

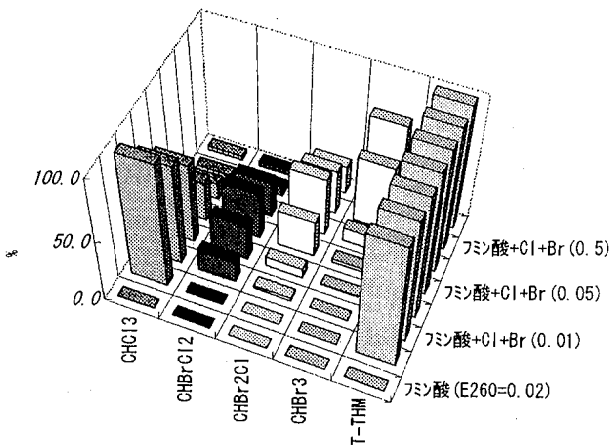


図20 THM 類の各成分割合 (フミン酸ナトリウム溶液 $E_{260} = 0.02$ に Br イオン添加)

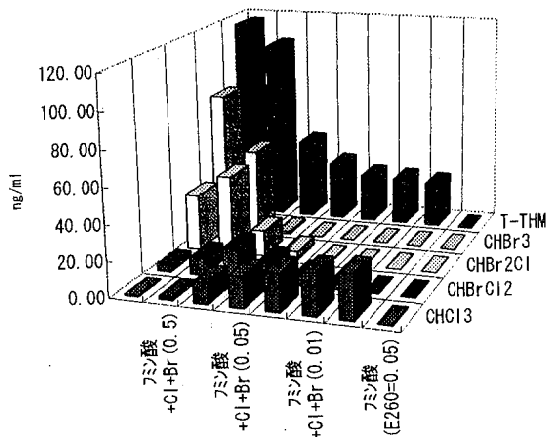


図21 THM生成能試験 (フミン酸ナトリウム溶液 $E_{260} = 0.05$ に Br イオン添加)

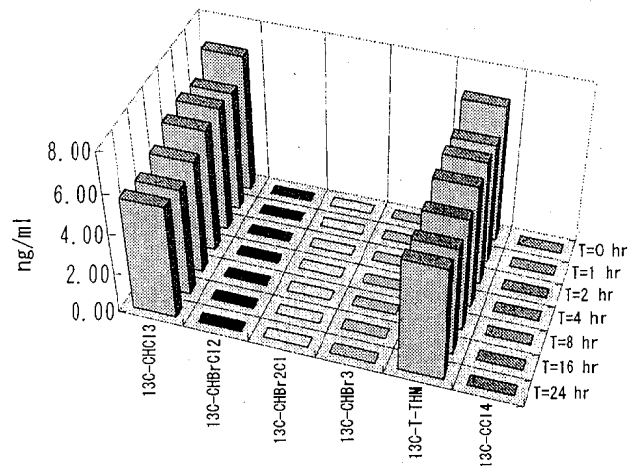


図23 THM生成能試験 (Br イオン存在下 ^{13}C クロロホルム塩素処理)

(2) THMの生成機構に関する実験

塩素化及び臭素化により、生成されたクロロホルムやブromoホルムの安定性について検討するため、臭素イオン存在下安定同位体 ^{13}C を含むでクロロホルム ^{13}C 溶液を塩素処理しクロロホルム濃度の変化について測定した。

その結果、図23に示すように24時間後にクロロホルム ^{13}C の濃度はわずかに減少したが、臭素化THMは、全く生成されていなかった。また、ブromoホルム溶液を塩素処理し24時間後の濃度変化を測定したところ、ブromoホルム濃度は、わずかに減少したが、ブromoホルム以外のTHMは全く検出されなかった。

さらにクロロホルム ^{13}C 溶液にフミン酸ナトリウムと臭素イオンを添加し塩素処理を行い、THMの生成量を測定した。その結果、図24に示す様に ^{13}C を含む臭素化THMは全く生成されていなかったが、添加したフミン酸を前駆物質とする塩素化及び臭素化THMの生成が認められた。

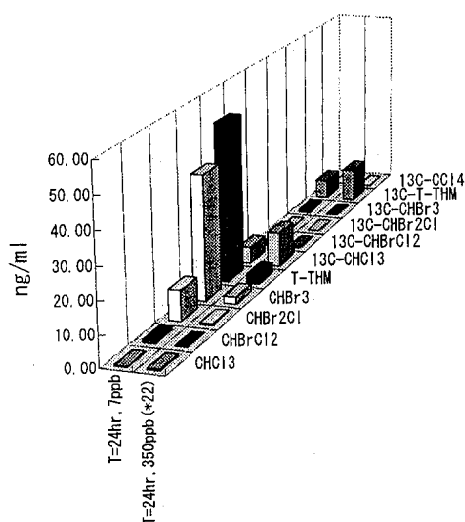


図24 THM生成能試験(クロロホルム¹³C + フミン酸ナトリウム + Brイオンを塩素処理)

考 察

THM生成の予想

水道水中のTHM生成機構に関する報告は、モデル化合物を用いた実験により数多く報告されているが、その機構は複雑なため明確にはされていない。THMの生成量は、一般に前駆物質質量、反応時間、pH値、水温、有効塩素等によって影響を受けることが知られているが、臭素イオンが共存する場合は生成するTHMの種類にも影響を受ける。一方、その機構については、臭素イオンを含有する水を塩素処理した場合、臭素イオンは次亜塩素酸により酸化され次亜臭素酸となる。海水淡水化プラント水の臭素イオンは、0.5mg/lで、元の海水の約60mg/lに対し約1/100である。しかし通常の水道水の原水となる天然水では臭素イオンは数十～数百ppbの濃度範囲で存在するため、次亜臭素酸イオンと次亜塩素酸イオンが共存することになる。このためTHM前駆物質に対し塩素化及び臭素化の競合反応が生じ、順次ハロゲン化、加水分解の段階を経てTHMを生成する。

今回のフミン酸を用いたモデル実験の結果から、塩素化により生成したクロロホルムが臭素化されプロモジクロロメタン、ジプロモクロロメタン及び、プロモホルムとなる反応経路は認められなかった。また、この逆となるプロモホルムからの塩素化も認められないことから塩素化又は臭素化された最終生成物は安定であり、再度塩素や臭素による置換反応を受けないことが分かった。

また、前駆物質のフミン酸には、塩素化と臭素化反応を同時に受ける部位及び臭素化のみの反応部位を持つこ

とが考えられ、さらに塩素化よりも臭素化の方が反応性が高いため、共存する臭素イオン濃度が高くなるとクロロホルムの生成量は減少するが、それ以上に臭素化THMの生成量及び生成割合が増加し、結果として総THMが増加することが示唆された。

ま と め

1. 県下の水道水中の消毒副生成物の実態調査の結果、新しく制定された水質基準を越えるものはなく、総て基準内であった。
2. 水道水源の種類によって生成する副生成物の種類と量に差があり、前駆物質の存在量を反映するものであった。
3. 臭素化THMの生成機構について実験的に検討したところ、塩素化THMからの生成は認められず、塩素から臭素への置換反応は認められなかった。

本研究は、平成5, 6, 7年度衛生研究所特別研究として実施した。

参考文献

- 1) 市橋啓子他：兵庫県下の水道水中のトリハロメタンの測定と解析，用水と廃水，34，12，36-40
- 2) 惣名史一他：消毒副生成物の生成に及ぼす原水水質と臭素イオンの影響，第45回全国水道研究発表会講演集，526-527 (1994)
- 3) 岡 裕三他：愛媛県における水道水中のトリハロメタン量と河川水中のトリハロメタン生成能，愛媛衛研年報42，35-38 (1981)
- 4) 相沢貴子：塩素処理による消毒副生成物の生成特質，水環境学会誌，16，12，2-7 (1993)
- 5) 小島康成他：逆浸透法による海水淡水化実験：第45回全国水道研究発表会講演集，128-129 (1994)
- 6) 山中 勝：原水の臭素イオンとトリハロメタン生成量，第45回全国水道研究発表会講演集，528-529 (1994)
- 7) Aizawa T, et al: Effect of Bromide ion on Trihalomethane Formation in water, Aqua 38, 165-175 (1989)
- 8) 幸喜 稔他：海水淡水化に伴う臭素系消毒副生成物の挙動，第46回全国水道研究発表会講演集，72-73 (1995)
- 9) 小瀬洋喜：河川水等のTHM生成特性，環境庁環境保全研究成果集，10-9 (1981)