



技術情報

VOL.10 NO.1 1986

パラチルスBの取扱い変更について

*Salmonella paratyphi B*と*S. java*との鑑別について技術的な問題のあることは従来から指摘されてきた。本県においては当分の間、D-酒石酸の性状にもとずいてこの問題に対処し、現在に至っている。

このたび厚生省保健医療局長から、各都道府県知事および指定都市市長あてに、*S. paratyphi B*による感染症はチルス、パラチルスの範疇からはずし、サルモネラ症として取り扱うことによる旨の通知が出されたので、以下にこれを紹介する。

各{都道府県知事}殿
指定都市市長

昭和60年11月14日
健医発第1359号

厚生省保健医療局長

伝染病予防法第1条第1項の「パラチルス」の病原体について

伝染病予防法におけるパラチルスの取扱いについては、公衆衛生審議会における検討の結果、パラチルス感染例の臨床像、疫学像等からみて、同法に定める「パラチルス」の起因菌はパラチルスA菌に限定することが適当である旨の結論が得られたところである。

この検討結果を踏まえ、今後は、パラチルスA菌による感染症を伝染病予防法の「パラチルス」として取り扱うこととしたので、関係機関への周知徹底等遺漏のないようお願いする。

これに伴い、パラチルスB菌、C菌による感染症は、今後はサルモネラ症として取り扱うこととされたい。

なお、この件については、生活衛生局とも協議済みである。

おって、「伝染病予防法第1条の疑義について」(昭和34年11月27日付け、衛発第1175号)は廃止する。

なお、近年本菌による胃腸炎は必ずしも減少していない。従来から国立予防衛生研究所で実施されている*S. paratyphi B*のフェージ型別は流行像の分析や、感染経路・感染源の追求に有効である。本県では現在まで、*S. paratyphi B* d-tartrate

(-)の菌株にかぎり、国立予防衛生研究所フェージ型別室にとどけ、フェージ型別を行ってきた。しかし今後は*S. paratyphi B*のすべての菌株についてフェージ型別を実施するので、従来同様菌株の送付をお願いします。

【参考】

パラチルスBの取扱い変更について

感染症対策室

昭和60年11月14日伝染病予防法におけるパラチルスの取扱いについて、厚生省保健医療局長より、各都道府県知事および指定都市市長宛に通知が出された(病原微生物検出情報月報・70号参照)。

本通知は、伝染病予防法に定める「パラチルス」の起因菌をパラチルスA菌に限定するというもので、今後はパラチルスB菌およびパラチルスC菌が検出されても伝染病としての取扱いはいしない

ことになる。ここでは、上記局長通知が出されるに至った背景と経緯について概説する。

パラチフス患者の発生数は1950年には1700余であったが、その後急激な減少を続け、1968～1977年には、100以下に抑えられていた。しかし、1978年以降再び増加傾向を示し、保菌者を加えた

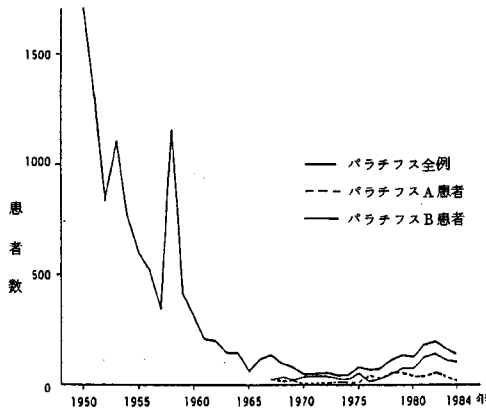


図1 パラチフス患者発生数の推移
(厚生省・伝染病及び食中毒統計より)

発生数は500を超えるに至った。これはパラチフスの中でもパラチフスB菌による患者または保菌者の増加によるものであった(図1)

この頃から各地の防疫担当者や細菌検査室あるいは担当医師との間でパラチフスB患者の取り扱いをめぐって混乱が生じ、その解決を求める声が高まった。*S. paratyphi B*と*S. java*の鑑別に問題のあることがクローズアップされたのである。予研フェージ型別室はチフス菌、パラチフス菌のレファレンス・ラボとしての立場から鑑別上の問題点を整理し、いくつかの知見を得た。中でもパラチフスB菌の特性とされていたD-酒石酸塩利用性陰性から陽性への集落の解離が容易に起こり、本性状はきわめて不安定であることを明らかにした(表1)。

公衆衛生審議会の下部組織である腸チフス小委員会はこれを受けて1980年以降数度にわたり検討を重ねた。そして1984年6月22日その結果を腸チフス小委員会報告にまとめ、同12月3日の公衆衛生審議会伝染病予防部会に提出した(3ページ・〈資料〉参照)。小委員会報告は審議会で検討、了承され今回の局長通知となったものである。

表1 パラチフスB菌のD-酒石酸塩利用性について
陽性集落の解離率

試験菌株	フェージ型	解離率 陽性集落数/検査集落数	KP培地での成績
フェージ型1 標準株	1	1/106 = 0.94%	-
770559	1	0/190 = 0	-
810688	1	1/106 = 0.94	-
811490	1	0/96 = 0	-
811491	1	0/96 = 0	-
760908	1	121/190 = 64	+
800552	1	32/96 = 33	+
800628	1	113/190 = 59	+
810944	1	57/106 = 54	+
800623	3a	0/286 = 0	-
810952	3a	0/106 = 0	-
780313	3b	0/190 = 0	-
781182	3b	100/190 = 53	+
771160	Taunton	0/190 = 0	-
760282	BAOR	0/190 = 0	-
781186	BAOR	58/190 = 31	+
780227	Dundee	0/190 = 0	-
800332	Dundee	1/190 = 0.53	-
781551	Dundee	44/190 = 23	+
800552(E1)	1	190/190 = 100	+

註：解離率の測定は単独コロニーをKP培地に接種、37℃ 72時間後に酢酸鉛溶液を加え、沈澱の有無で判定した。

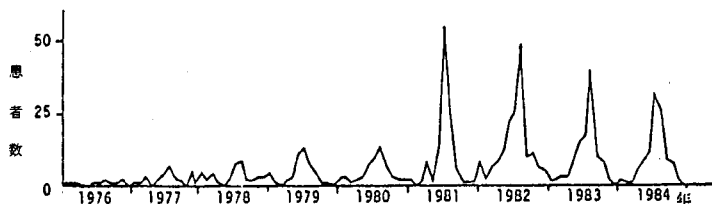


図2 パラチフス B 患者の月別発生状況(発病月による分布)
(腸チフス中央調査委員会資料)

腸チフス小委員会での検討と時を同じくしてサルモネラの国際分類に変更があり、*S. java*は*S. paratyphi B*のD-酒石酸塩利用性陽性変異株として*S. paratyphi B*に包含されることになった。

パラチフス B の発生届出数が1981年以降急増した理由の1つでもある。

表2 パラチフス B 菌の分離状況

(D-酒石酸塩利用性陽性株を含む)
—病原微生物検出情報より—

年	由来	ヒト	動物	食品	環境	合計
1979		235	2	7	51	295
1980		386	9	8	79	482
1981		502	3	6	115	626
1982		501	2	7	159	669
1983		364	6	13	182	565
1984		368	1	5	190	564
合計		2356	23	46	776	3201

表3 パラチフス B 菌のフェージ型とD-酒石酸塩利用性

年	1975-1981	1982	1983	1984	合計
フェージ型					
1	33(84)	11(181)	10(108)	8(71)	62(444)
2	1	-	-	-	1
3a	66	25	19	24	134
3b	6(32)	2(32)	2(34)	1(47)	11(145)
Jersey	-	-	-	-	-
Beccles	9	-	-	-	9
Taunton	11	-	-	2	13
BAOR	7(3)	-	1	-(1)	8(4)
Dundee	20(7)	6(5)	5	4(5)	35(17)
Workshop	-(1)	-(2)	-(11)	-(20)	-(34)
Untypable	6(4)	1(22)	2(7)	5(20)	14(53)
合計	159(131)	45(242)	39(160)	44(164)	287(697)

()内はD-酒石酸塩利用性陽性の菌株数を別掲した。

腸チフス小委員会ではパラチフスの臨床像、疫学についても検討し、パラチフス B および C は一般のサルモネラ症として扱うことが妥当であるとの結論に達した。パラチフス B 患者の発生が7~8月の夏期に集中し食中毒発生のパターンにきわめて近いこと(図2)、パラチフス B 菌は動物、食品、環境などから相当数分離され(表2)、パラチフス A とは大きく異なることも明らかになった。パラチフス B 菌のフェージ型の中にはD-酒石酸塩利用性と相関の高いものがあり(表3)、細菌学的に興味ある問題を残している。なお、フェージ型はサルモネラ感染症の対策上疫学調査のマーカーとして有用なので、パラチフス B 分離株のフェージ型別は従来通り奨励されるべきである。

<資料>

パラチフスの伝染病予防法上の取り扱いについて

公衆衛生審議会伝染病予防部会
腸チフス小委員会委員長
福見秀雄

当小委員会は、パラチフスの伝染病予防法上の取り扱いについて検討を重ねてきた結果、昭和59年6月22日、下記のごとく伝染病予防法に定めるパラチフスの起原菌は、パラチフス A 菌に限定するのが適当である結論に達した。

記

パラチフスの伝染病予防法上の取り扱いについて

(腸チフス小委員会報告)

パラチフスは、伝染病予防法の対象疾病の1つであるが、近年の細菌学の進歩に伴って、その病原体の検出、同定が広く実施されるようになった。その結果、パラチフスB菌の同定をめぐる問題、特にサルモネラ・ジャバとの鑑別がクローズアップされるに至った。そしてこの問題は、伝染病予防法において定めるパラチフスの定義に関係なしとしない。そこで、腸チフス小委員会では、昭和55年以降今日まで数次にわたり、パラチフスの取り扱いを適切なものとするため、その病原、臨床像、疫学等について検討を重ねてきた結果、次の結論に達した。

1) パラチフスB菌とサルモネラ・ジャバ菌の

鑑別性状として従来から提唱されているD-酒石酸塩利用性、酢酸ナトリウム利用性、粘液堤形成および抗原構造を検討した結果、両者を区別するのは困難であり、ともにパラチフスB菌とするのが適当である。

2) パラチフスA菌による感染例の臨床像および疫学は、腸チフスと区別することが困難であり、一方パラチフスB菌およびC菌によるものは一般のサルモネラ症に相当すると考えられる。このことから伝染病予防法に定めるパラチフスはパラチフスA菌による感染に限るのが適当である。

(病原微生物検出情報 第71号より転載)
(細菌部 船橋 滴)

アメーバ赤痢の検査について

はじめに

人の原虫性疾患のうちでもアメーバ赤痢は広く世界に分布しており、特に熱帯、亜熱帯地域での発症例が多い。わが国でも戦中および戦後の混乱期に大阪などの大都市においてさえも多くの患者が見られたり、また病院や療養施設で集団発生が起きたこともあった。しかし、上水道、下水道等の環境がしだいに改善されるにつれて、ほとんど患者が見られなくなり、1970年代中頃には厚生省への届出数は年間10例程度にまで減少した。

ところが1979年頃からは再び発症例が増加しており、1981年には52例、1984年には100例以上の届出数を見るまでにいたっている。同様な傾向は先進諸外国、ことにアメリカにおいても観察され、ランブル鞭毛虫症とともに性行為感染症(STD: Sexually transmitted disease)の一つとして注目をあびてきている。

ここ数年来、本県でも海外旅行(とくに東南アジア方面)からの帰国者に散発的に見られており、最近では土着の赤痢アメーバ症の発症例が学会などで二・三報告されているので、赤痢アメーバについての概要、検査法などを御紹介します。

赤痢アメーバ症(amebiasis)

赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* の感染によりひきおこされる疾患で、通常はほとんど大腸が冒されて、いわゆる赤痢症状を現わしてくる。

急性期には腹痛とともに一日数十回もの粘血便の排泄が見られる。通例は細菌性赤痢に見られるような発熱はともなわない。粘血便の性状には特徴があり、イチゴゼリー状で腐敗した魚のはらわたのような悪臭がある。このような腸アメーバ症には腸壁に潰瘍を多発し、下痢を繰り返して衰弱して行くものから、ほとんど無症状に過ごす嚢子保有者 Cyst carrier に至るまでさまざまな病像がある(表1)。腸アメーバ症の重篤なものは、腸潰瘍が破れて穿孔性腹膜炎をおこしたり、隣接する臓器へ炎症が波及したり、癒着をおこしたりすることがある(腸管周囲アメーバ症)。また、アメーバが血流やリンパ流によってあちこちの臓器へ転移し、そこで増殖して病変をおこすことがある。最も有名なのはアメーバ性肝膿瘍、ついで肺、脳などにも膿瘍を作ることがある。

感染経路と生活史

人への感染は経口感染で、体外に排泄されたシストが、水、野菜、食物などを汚染し、これらの飲食物とともに体内に侵入する。しばしばハエが食物汚染の役割を演ずることがある。シストは抵抗力が強く、外界での生存期間は、便中または水中では長く、ハエやゴキブリの腸をすどおりし感染力を保有している。湿潤な便中では12日間、水中では9~30日間生存する。ただし高温や乾燥には弱い。シストは経口感染して腸管内に入ると胃

表1 アメーバ赤痢と細菌性赤痢との臨床上的主な鑑別法

鑑別点	アメーバ赤痢	細菌性赤痢
発病	多くの場合、緩徐に発病する	急激に発病する
発熱	平熱のことが多い	発熱する
全身状態	比較的侵されない	侵される
テネズムス	比較的弱い	強い
便の量	多い	あまり多くない
便の性状	粘液および血液が便に混和し、イチゴゼリー状を示し、ときに魚の腸の腐敗したような臭気がある。	粘液や膿状物に新鮮血が線状、点状に付着し、精液臭がある。
病原体	赤痢アメーバ	赤痢菌
治療剤に対する反応	抗生剤で症状が改善しても根治しない。フラジール、塩酸エメチン、カルバルソロンが有効である。	抗生剤は有効、抗原虫剤は無効である。

液および膀胱などの作用を受けたあとに脱糞し、4コの母核が分裂して8コの小アメーバができる。この8コの小アメーバが漸次発育して栄養型となり、次に体内から溶解酵素を分泌して大腸粘膜の組織を溶解して侵入する。栄養型も便とともに排泄されるが外界では弱くほとんど死滅する。たとえば経口的に侵入しても胃酸のために死滅する(図1. 赤痢アメーバの生活史)。

赤痢アメーバの分布と性状

赤痢アメーバは人類・猿・犬・猫・豚などの大腸に自然感染し、実験的にはウサギ・モルモット・ラット・マウスにも感受性がある。

赤痢アメーバは嫌気・好気の生理条件下のいずれにおいても生存でき、また原始時代の細胞が持っているピロリン酸を多量に持っており、生物発生のごく初期に現れた生物であろうと考えられている。

栄養型には組織型と前被嚢型との2種類に分かれる。

組織型は急性期の粘血便中に見られ、大きさ20~30 μ 、円形または西洋梨状で、多くの細い偽足をだして活発に運動する。強く光を屈折する透明な外質と顆粒状の内質とを判別することができる。内質中には偏在する円形の核を有し、核小体が中心にあり、しばしば赤血球を入れている(細菌その他微生物を入れることはまれである)。

前被嚢型は亜急性期または慢性期の糞便中であり、大きさ6~20 μ 、外質は狭くおおむね偽足の部分にのみ見られ、不活発に運動する。原形質内には多数のグリコーゲン胞と類染色質体とを有する。

シストは、大きさ11~14 μ 、蜂巢状の原形質と4コの核と索状の類染色質体とを有し、慢性期に見られる。なおアメーバ赤痢の糞便中にはしばしばCharcot-Leydenの結晶(気管支喘息の発作の際に喀痰中に見られる黄緑色または灰白色六方稜形結晶で本体は不明)および多数の好酸球を見る。

鑑別を要するのは大腸アメーバ *Entamoeba coli*で、これは腸管上部に非病原性原虫として寄生し、大きさ12~26 μ 、葉状の広い偽足をだして緩慢に運動する。外質と内質との境界は判然としない。おおむね細菌その他微生物を含有し、血球を有することはない。核は比較的大きく境界明瞭で核小体は中心よりはずれている。シストは、大きさ14~25 μ 、円形でその成熟したものは8コの核を有する(表2 アメーバの形態による鑑別)。

赤痢アメーバの検査

1 検査材料の取扱い

腸寄生原虫類は時間が経つと速やかに変形、消失する。ことに栄養型は死滅が速やかなので、排便直後の糞便で粘液膿性または血性の部分を検査する。

栄養型が排泄されていると考えられる下痢便では、採便後なるべく速く検査を行う。栄養型は時間が経つと次第に運動性が失われてついには検出不能になる。気温の低い時期では、糞便容器・スライドグラス等をあらかじめ暖めておくなどの注意が必要である。

シストが排泄されていると考えられる有形便では、なるべくその日のうちに検査する。翌日検査する場合には室温下で保存する。

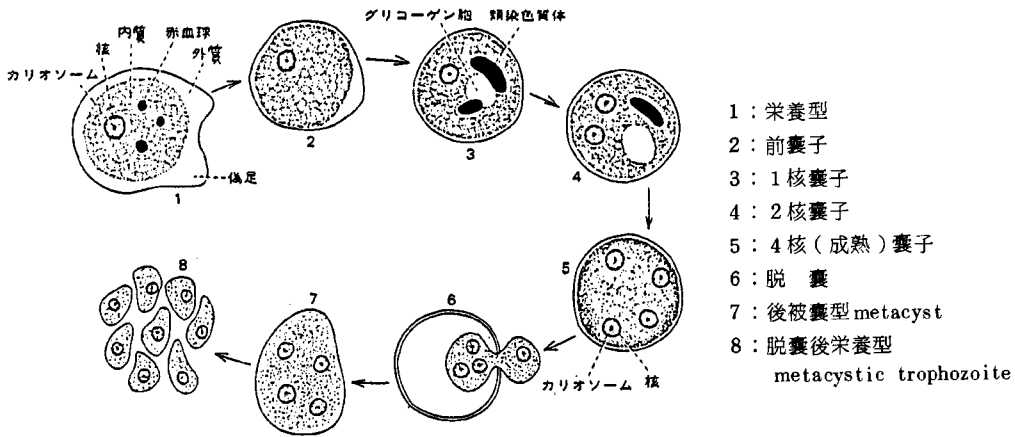


図1 赤痢アメーバの生活史

表2 赤痢アメーバ・大腸アメーバの形態による鑑別

種別		赤痢アメーバ	大腸アメーバ
生鮮時栄養型	大きさ	10~60 μm	15~50 μm
	運動	活発	不活発
包蔵核	偽足	指状早く突出	短くはっきりしない
	物	赤血球をとり入れ細菌はない。	細菌その他をとり入れ赤血球なし。
染色栄養型 (マトキシリン)	核膜	繊細で内壁に1層の小さい染色顆粒。	厚く内壁に粗な染色質点状にみられる。
	核小体	小さく中央に存在。	非常に大きく中央をそれて存在。
	核中の染色質	核小体と核膜の間になし。	核小体と核膜の間に染色粒
ヨード染色嚢子	大きさ	6~20 μm	10~33 μm
	形	普通球形	普通球形
	細胞質	はっきりした緑黄色	黄褐色
	グリコーゲン塊	散在し赤褐色。	暗褐色はっきりした塊でない。
核	核小体	1~4個で小さい核小体が中央に存在。	1~8個またはそれ以上あり、核小体は中心をはずれて存在。
	核	顆粒状でしばしば空胞あり。 卵形または両端の丸い棍棒状。	顆粒状で空胞あり。 線状。糸状、四角やとがった端をもつ破片状。
ヘマトキシリン	核	1~4個。核膜は繊細で内壁に小さい染色顆粒あり。核小体は中央にあって小型	1~8個。またはそれ以上。染色質粒が内壁にみられ厚い核膜あり、核小体は大きく中心をはずれて存在する。

2 直接塗抹法（新鮮標本検査法）

原虫検査法のうちで最も容易に原虫を検出し得る方法で、栄養型、シストともに検出することができる。鏡検の際、原虫は小さいという先入感からいきなり強拡大しがちであるが、前にも述べたようになりに大きいので、必ず弱拡大から探した方が検査能率が上り、さらに光るシストを探すのに良い。糞便の2～3ヶ所からサンプルを取るようにする。

〔手技〕

(1) スライドグラスに生理食塩水を一滴とる。
(2) これに爪楊子などでごく少量の糞便を（粘血部があればそれを）とりよく混和する。糞便の量は虫卵検査の場合よりもはるかに少なくし、糞便の色がわずかに認められる程度とする。

(3) 弱拡大で絞りを調節し、視野をやや暗くして探す。またシストを探す場合には対物レンズを標本面からすこし遠ざけるようにしてわずかに視野をばかして鏡検すると良い（シストは球形であるので円くにぶく光る）。

栄養型：大きい幅の広い偽足をだして活発に運動し、赤血球を捕食している虫体を認められれば赤痢アメーバの栄養型として診断して良いが、通常は後記の固定染色検査法を行い正確を期した方が良い。

シスト：核が認められなくて、両端が鈍円なクロミジアが認められれば赤痢アメーバのシストと診断して良いが、後期のヨード染色法、固定染色検査法を行い正確を期した方が良い。

3 集虫法

塗抹標本でシストの数が少なく、判断が困難な場合は大量の便をとって集虫法を行う。種々の方法があるが、寄生虫卵検査の時用いるホルマリン・エーテル法（MGL法）が能率が良く、沈渣をヨード染色法にて検査する。

4 ヨード染色法

シストの核の数、グリコーゲン胞などを観察する時に行う（栄養型には用いない）。

〔手技〕

生食水の代わりにヨード・ヨードカリ液を用いて、前記の直接塗抹法と同様な操作で標本を作り鏡検する。

ヨード・ヨードカリ液の組成：ヨード1g、ヨードカリ2g、蒸留水100ml、作り方はまず少量の蒸留水で濃いヨードカリ液を作る。これにヨード1gを溶かしたのち、残りの蒸留水を加える。

5 固定染色検査法

固定染色検査法（ヘマトキシリン染色法）としてはシャウジン固定を行ったのち、ハイデンハイン鉄ヘマトキシリン染色を行う。

〔特徴〕

栄養型、シストともに核の構造などが明瞭に染め分けられて診断を確実にすることができ永久標本として長く保存することができる。しかし操作が複雑でやや長時間かかる欠点がある。

〔薬液の調製〕

(1) シャウジン固定液：飽和昇永水（蒸留水100mlに7g）2容に95%アルコール1容を加えてよく混和する。

(2) ヨードアルコール：70%アルコールにごく少量のヨードを加え、ビール色にしたもの。

(3) ヘマトキシリン液：0.5%ヘマトキシリン水溶液をガラスびんに作り、口をガーゼでおおい（栓をしない）明るい場所におき、ときどき振って4週間熟させる。

(4) 2.5%鉄明ばん水溶液：新鮮なものがよいので少量ずつ使用のつど作る。

〔手技〕

(1) 塗抹：きれいにみがいたカバーグラスに少量の糞便を爪楊子で手早く薄く塗抹する。糞便が固い時はあらかじめ生食水を少量加えて泥状にしておく。この標本の作製中は少しでも乾燥させてはいけない。

(2) 固定：シャーレに入れたシャウジン液に、塗抹面を下に向けて浮かせる。約30秒後、竹製のピンセット（金属性のピンセットは昇永でさびる）で塗抹面を上にしてシャウジン液中に静かに沈め、約20分間固定する。

(3) 脱昇永：ヨードヨードアルコールの中へ移し昇永を除く（約15分間）。

(4) 脱ヨード：70%アルコール、50%アルコール中でヨードを除く（各々数分間）。

(5) 水洗：流水中で数分間水洗する。

(6) 媒染：2.5%鉄明ばん液に2～4時間つける。

(7) 水洗：水道水をシャーレに入れておき、こ

の中を通過させる(数秒間)。

(8) 染色: 0.5%ヘマトキシリン液に6~12時間(通常一夜)つける。

(9) 水洗: 水道水で数秒間。

(10) 脱色: 2.5%鉄明ばん液で過染色されている標本を脱色する。

(11) 水洗: 弱い流水で30分~2時間洗う。

(12) 脱水・封入: 50%→70%→80%→90%→95%→無水アルコールに順次うつし(各2~3分間)完全に脱水して、最後にキシロールで透徹しバルサムで封入する。

6 培養法

種々の培養法が報告されているが、わが国では田辺・千葉培地がいっばんに広く使われている。

(1) 糞便15mg、液状、粘液状便なら0.2~0.5mlを培地に入れ、30℃で培養する。有形便の時には *Blastocystis hominus* や細菌類を殺すために0.2%塩酸で乳剤様として2時間放置する。次に遠心沈澱後上澄をすて、沈渣に生食水を入れ混和し、さらに遠心して塩酸がなくなるまで繰り返し、その沈渣を培地に植える。

(2) 3日目および7日目にピペットで液の底部(米粉のふきん)をとって数枚標本を作り、ていねいに鏡検して栄養型を探す。アメーバは米粉をとりこんでいることが多い。継代培養は、我々の経験から2ヶ月おきぐらいが良い。

[田辺・千葉培地]

固形部: リンゲル液(食塩9.0g、塩化カリ0.42g、塩化カルシウム0.25g、蒸留水1,000ml)に寒天10gとアスパラギン1.0gを混じ加熱溶解し(湯煎で)中試験管に分注して100℃で1時間蒸気滅菌後斜面とする。

液体部: 滅菌不活性化馬血清をリンゲル液で1:7に希釈したものを固形部の斜面の高さまで入れる。培養直前に滅菌した米粉を白金耳で少量入れ、37℃に保温して使用する。またこの中に抗生物質としてストレプトマイシン50 μ /ml、カナマイシン50 μ /mlを加え細菌の繁殖を抑える。

7 血清診断法

Diamondによる赤痢アメーバの無菌培養化の成功により、1970年代から種々の方法が確立された。間接赤血球凝集反応(IHA)、ゲル内沈降反応

(GDP)、カウンター電気泳動(CIE)、間接蛍光抗体法(IFA)およびenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)がそれぞれである。これらの血清診断法はどれも一長一短があるが、単独でも90%以上の陽性率が得られるといわれている。しかし現在のわが国のアメーバ症の血清学的方法による診断体制はまだ充分とはいえない。現在慶応義塾大学医学部寄生虫学教室のグループを中心として被血清の抗体価測定(GDP、CIE、IFA)の研究がなされている。

治療および予防

治療には吐根のアルカロイド、Oxyquinolineの誘導体、ヒソの製剤などを用いるが、法定伝染病であるので都道府県の法規に従って地区の感染症センターや隔離設備のある施設に依頼をする必要がある。

各種の消毒剤は殺菌に用いられる濃度では無効であることが多く、1%フェノール、5%ホルマリンまたは遊離塩素4ppmの水中などで30分以内にシストが死ぬ。

おわりに

最近欧米やわが国で増加傾向にあるアメーバ症の性状と検査法について概説した。STDが増加している現在、また輸入感染症が増えている今日に於て赤痢アメーバ症がさらに広がるものと考えられ、この方面への注意が必要と思われる。また診断に際してもアメーバの形態的同定のみならず血清学的診断も重要となるであろう。

追記: 現在衛生研究所・生物部にて赤痢アメーバの継代培養を行っていますので興味のある方は勉強においでください。

(生物部: 山田靖治・奥村正直・伊藤正夫)

参考文献

新寄生虫病学

森下哲夫 監修 南山堂

基本人体寄生虫学

長花 操 編集 医歯薬出版

人体寄生虫ハンドブック

松林久吉 編集 朝倉出版

臨床寄生虫学カラーアトラス

山口富雄 編集 南江堂

Salmonella の新しい分類と血清型リスト (Kauffmann-White Schema) の変更について

1934年、国際サルモネラ委員会において、*Salmonella* 属はKauffmann-Whiteの様式により血清型に分類することが決議され、以来約50年間、日常の検査や各種の調査研究に支障なくとり入れられてきた。しかし、この分類様式は属から直接血清型への区分であって、分類学上の種概念は全くとり入れられていない。さらに、血清型は1,600種類以上に及び、現在O血清群はアルファベット(A~Z)とOグループ番号(51~66)で呼ばれ、今後とも単に血清型を追加していくだけでは、無理と矛盾が生じてくるようになった。

このため、1983年、国際腸内細菌委員会の中のサルモネラ小委員会において、*Salmonella* 属の分類、命名に関し、現状で最も妥当な結論が得られ、これにより、*Salmonella* のO血清群の呼称変更と一部O血清群及びこれに伴う血清型名の削除が行われたので、その大要をお知らせします。

1 *Salmonella* 属の新しい分類

細菌の分類は表現型にもとづく統計学的解析とDNA相関性の両面から検討されるのが近代分類学の常道である。*Salmonella* の各血清群及び各亜属(生物群)間のDNA相関性は相互に密接に関係しており、これをもとにして区別することができず、したがって、*Salmonella* は1菌種のみ存在と結論づけられた。このためその type species は *S. choleraesuis* であり、これは本菌が Salmon & Smith により1885年に *Salmonella* の中で最初に発見、命名されたことによるものである。

サルモネラ小委員会の委員長である Le Minor は1982年に生化学性状とDNA相関性にもとづいて、従来のI~IVの亜属(生物群)を *S. choleraesuis* の中の亜種とする提案を行った。この案は腸内細菌委員会で討議され、現状でもっとも妥当な分類として賛同が得られ、*Salmonella* の分類が一つの結論に達した。下記にそれを示しました。

- a) *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (亜属I)
- b) *S. choleraesuis* subsp. *salamae* (亜属II)
- c) *S. choleraesuis* subsp. *arizonae* (亜属IIIa)
- d) *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae* (亜属IIIb)

e) *S. choleraesuis* subsp. *houtenae* (亜属IV)

f) *S. choleraesuis* subsp. *bongori* (亜属V)

ヒト、家畜及び家禽の病例から分離されるほとんどの *Salmonella* の菌株は、亜種 "*choleraesuis*" 及び亜種 "*arizonae*" であり、日常の検査は分類が変更されても何ら影響を受けないが、菌名の記載方法を変更しなければならないことに問題がある。例えば、*S. typhi*、*S. typhimurium* 等の血清型を現在の分類にそって正式に記載するようになる。

Salmonella choleraesuis subsp. *choleraesuis* serovar *typhi*,

Salmonella choleraesuis subsp. *choleraesuis* serovar *typhimurium*

しかし、日常の検査などでこのような長い菌名は書いてはられない。日本サルモネラセンターでは型別依頼の回答をつぎのように記載している。

Salmonella sp (1) serovar *typhi*

Salmonella sp (1) serovar *typhimurium*

()内の数字は亜種を示し、1は subsp. *choleraesuis*、2は subsp. *salamae* ……である。

しかし、血清型名の記載はまた、従来どおり *S. typhi*、*S. typhimurium* などとしてもよいことになっている。ただしその場合にはこれらはイタリック体やアンダーラインを用いず、通常の活字とすることが勧告されています。

2 Kauffmann-White Schema の変更

Salmonella の新しい分類をもとにして、Kauffmann-White Schema の呼称変更と、一部血清型名の削除がサルモネラ小委員会で決定されたので、下記にO血清群の削除、表1にO血清群名の変更を示した。

(1) O血清群の削除

- ① C₄群を削除し、C₁に併合する。
- ② C₃群を削除し、C₂に併合する。
- ③ E₂群およびE₃群を削除したE₁群に併合する。
- ④ G₂群を削除し、G₁に併合する。
- ⑤ H₂群を削除し、H₁に併合する。

(2) O血清群の呼称変更

表1 O血清群名の変更

新呼称	旧呼称	新呼称	旧呼称
O 2	A	O 13	G ₁ , G ₂
O 4	B	O 6, 14	H ₁ , H ₂
O 7	C ₁ , C ₄	O 16	I
O 8	C ₂ , C ₃	O 17	J
O 9	D ₁	O 18	K
O 9, 46	D ₂	O 21	L
O 9, 46, 27	D ₃	O 28	M
O 3, 10	E ₁ , E ₂ , E ₃	O 30	N
O 1, 3, 19	E ₄	O 35	O
O 11	F		

以上、一部のO血清群の削除と変更により、S. java、S. sofia、S. newington等はほぼ250種類の血清型が削除されることになる。

(細菌部 船橋 満)

参考文献

坂崎利一、田村和満：*Salmonella*の新しい分類と、血清型リスト(Kauffmann-White Schema)の変更、メディアサークル、Vol 30. No. 4 198 - 205、1985

高級ワインのジエチレングリコール混入事件

はじめに

近年の食生活の多様化にともなって、わが国では外国産ワインに関心がたかまって来ていた昨年7月25日のことである。各新聞紙上で大々的に今回のワイン事件、すなわち西ドイツ産ワイン中に有害物質“ジエチレングリコール(以後DEG)”が混入されていた、という報道がなされた。この事件の経過はすでに昨年の衛生部ノート(第30巻、第24号1985年)に紹介されているのでここでは省略するが、全国の衛生研究所とともに、我々もその大きな渦にまき込まれる結果となった。食品薬品部でもスタッフを総動員してこのDEGの分析法の検討を開始した。あるスタッフは標準品についてのガスクロマト分析(以後GC)、そしてあるスタッフは部長から差し入れられた市販西ドイツ産ワインを用いた添加回収実験、GC-質量分析計(以後MS)による確認方法など分担して行ったが、この事件の我々の対応した経過について振り返ってみることとした。

ジエチレングリコールについて

DEGはエチレングリコール(HOCH₂CH₂OH)2分子から脱水縮合した化合物で甘味を有する多価アルコールで、表1に示すような物理的・化学的性質及び毒性を有している。

ジエチレングリコールの分析法

DEGは1分子に2個の水酸基を有しており、

表1 DEGの物理的・化学的性質及び毒性

化学式：HOCH₂CH₂OCH₂CH₂OH
 分子量：106.12
 比重：1.118 (20°C/20°C)
 融点：-6.5°C 沸点：244.5°C
 引火点：124°C(密閉) 137.8-143.3°C(開放)
 発火点：229°C 危険物第4類第3石油類
 溶解性：水、アルコール、エーテル、アセトンに可溶
 ベンゼン、トルエン、四塩化炭素に不溶
 致死量(LD₅₀)：経口・人 1,000 mg/kg
 経口・イヌ 9,000 mg/kg
 経口・ネコ 3,300 mg/kg
 静脈・ウサギ 2,000 mg/kg
 (参考：産業中毒便覧、医歯薬出版社ほか)

水やアルコールなどの極性溶媒に可溶であるが、ベンゼンなどの無極性溶媒には不溶である。これは現在食品添加物の品質保持剤としてめん類などに使用が認められているプロピレングリコールと性質が類似しており、当初DEGも大した問題もなく分析出来るものと考えていた。事実DEG標準品はGCでもきれいなピークとして分析することが可能である(図2-1)。ところが検体がワインとなると様相は一変する。

ワインはぶどう果汁を発酵させて造られるため、その中には発酵生成物であるエタノールは勿論、多種類の有機酸類や揮発性香気成分などを含有している。これらに加えてGC分析において最も扱

いにくい成分として多量の糖質を含有している。ワインを減圧濃縮すると約5%のアメ状物質が得られる。この大部分を占める糖質は不揮発性であって加熱分解によりカラメル様物質が生成し、GCカラムの性能を著しく劣化させてしまう。

一般に糖質は水以外の溶媒には難溶であるため濃縮溶液をエタノールやアセトン等の極性溶媒を用いて処理すると不溶性物質として除去することが出来、一方DEGはこれらの極性溶媒部分に溶解してくる。そこで我々は図1に示すようなDEG分析法を作成した。

図1の方法に従って早速収去搬入された西ドイツ産ワインのDEG分析を開始してしばらく後、厚生省事務連絡(昭和60年7月27日及び8月20日)によりDEG分析法(GC分析条件など表2)が示された。

これらの分析法に従って、DEGの混入のないワインを用いてDEGが正確に定量出来るかを比較検討したところ、DEGの位置には何ら妨害するピークを認めないが、このワインにDEGを一定量添加したものでは、相当するピークが認められる。

収去ワインのDEG検査

事件発生と同時に、県下一斉に外国産ワインの実態調査が行われたが、厚生省から発表された有毒ワインリストにある銘柄はすでに見当たらず、やむなくその他の西ドイツなどの外国産ワイン検体がDEG検査の対象とされ、収去搬入された。

各検体は、それぞれ我々の作成した方法及び厚

- 検体：ワイン10.0g 100ml ナス型フラスコ
- ↓ ← セライト545 2g
 - 濃縮乾固(エバポレータ)
 - ↓ ← メタノール 10ml
 - 全体を均一に攪はん
 - ↓
 - 濃縮乾固(エバポレータ)
 - ↓ ← アセトン 20.0ml
 - 攪はん抽出(超音波洗浄機)
 - ↓
 - 上澄液(GC検液)*1

*1 DEG濃度が低い場合はこの上澄液8mlを1mlに濃縮してGC検液とする。

図1 DEG分析法(愛知衛研法)

生省から示された方法に従って詳細に分析した結果、まず1検体についてDEG混入の疑いのあるワインが見つかった。含有量は0.03g/lであり、これはさらにGC-MSによってDEGであることを確認(後述)した。昨年8月5日に発表した1983年産のIllmitzer Kaisergarten Beerenau-sleseがそれで、それまでの有毒ワインリストにはない種類で、国内で検出されたものはこれで合計18銘柄となった。

ひきつづき、イタリア産ワインについても検査を行ったところ、新たに2銘柄(8月13日に発表した1982年産FRESCOBALDI CHIANTI及び1977年産CASTELLO DI NIPOZZANO CHIANTI RUFINA)から、共に0.01g/lのDEG含有ワインが見つかった。これらDEG検出ワインについてのGCチャートを図2-2に示した。

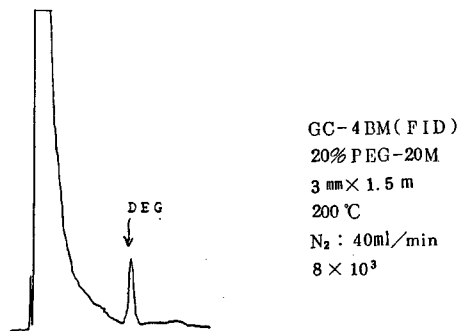


図2-1 DEG標準品のGC

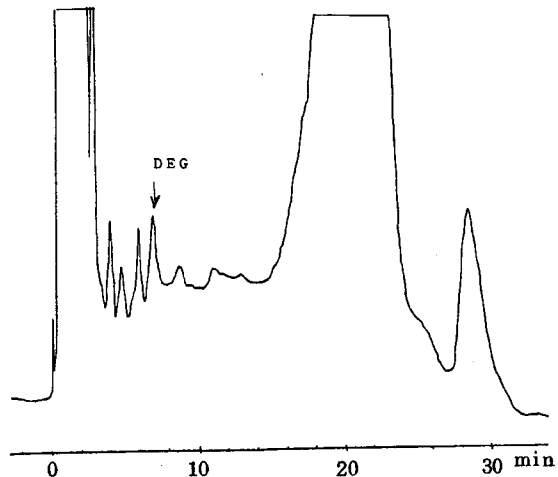


図2-2 DEG検出ワインのGC(PEG-20M)

GC-MSによるDEGの確認

有機化合物をGCによって同定するとき、通常GCカラムを2種類以上用い分析条件を変えて行われる。これはGC検液中に、混在する他の物質のピークと偶然にピークが一致することがあるかもしれないからである。今回の厚生省事務連絡でもDEGのGC分析は、PEG 20M及びThermon 3000を用いて確認するか、GC-MSによる確認を行うように指示(表2)されている。

表2 厚生省事務連絡によるGCの分析条件

GCの条件

カラム	20%PEG 20M
ガラス管	3mm×1.5m~2m
オープン	180~200℃
注入口	230~250℃
検出器	230~250℃
DEGが10分間で流出	

DEGが検出された場合は、他のカラム条件(5%~10%サーモン3000、20%FFAPなど)で確認するか、GC-MSで確認すること。

DEGは分子量106.12であり、EI-MSで m/z 106に分子イオンピーク(M^+)を与えるはずである。ところが、分子内に水酸基を有するものは M^+ が検出されないことがある。このためこの種の化合物の検出のために、CI-MSが用いられ、アンモニアあるいはブタンなどがよく用いられる。今回のDEG確認にはアンモニアを用い、 $(M+NH_4)^+$ すなわち m/z 124 ($106+18$)のピークを確認することにした。

DEGの標準品によるCI-MSを図3-1に示したが、 m/z 124に親ピークが認められる。GC-MSでは、MSをGCの検出器として用いることが出来る。すなわちこの m/z 124をモニターとしてGC分析を行うと、保持時間(RT)約4分のところに単独ピークとして確認することができる。

図3-2は、DEGが検出されたワインのCI-MSであるが、 m/z 124に強いシグナルを有している。このほか数本のやや強いシグナルが認められるが、これらはいずれもワイン中に含まれている成分によるバックグラウンドによるものと思われる。

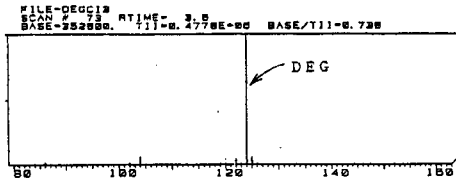


図3-1 DEG標準品のCI-MS

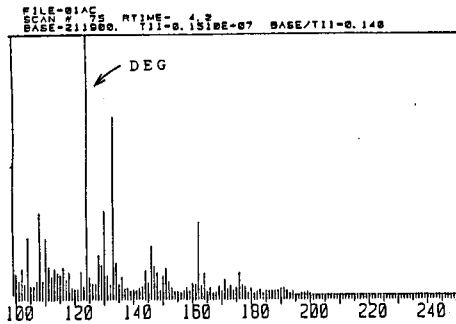


図3-2 DEG検出ワインのCI-MS

後記

昨年7月末に発生した有毒ワイン事件は8月中旬までに外国産ワイン3銘柄からDEGが混入されていたことを確認し、報告するに至り、大きいヤマ場を越えた。幸いなことに、その後収去された外国産及び国内産ワインからはDEG混入ワインは検出されなかった。

この事件が発生した時期は丁度夏の最も暑い時期であり、部を挙げての検査に明け暮れ、夏休みも殆どとれなかった。しかし、この事件を通じ、我々はこの種の難問題に直ちに対処すべく体制を作っておく必要があり、このために常日頃から学会報告に目を通し、分析技術を身につけて、いつでも対処出来るようにしておかなくてはならないことを改めて痛感した。今後はより安全な食品を確保するために、輸入食品はもとより、日頃食用に供される食品についても、絶えず注意を払い、また検査結果についても冷静に判断し、評価出来るように心掛ていなければならない。

(食品薬品部 河村典久)