

## 県内農家保有米の糸状菌汚染状況 (第1報)

山脇徳美\* 和田恵理子\* 茂木武雄\* 森田盛大\*

### I はじめに

糸状菌の有害代謝産物であるマイコトキシンの中で、*Aspergillus flavus*の産生するアフラトキシンに強い発ガン性のあることが明らかにされたこと<sup>1-3)</sup>から、食品の有害糸状菌による汚染が注目されるようになり、農産物特に貯蔵穀類や輸入穀類などの糸状菌汚染調査やマイコトキシン汚染調査<sup>4-10)</sup>が数多く行なわれてきた。今回、我々は、日本人の主食であり、秋田県の主要農産物である米への糸状菌着生実態を調査する目的で農家保有米の糸状菌汚染状況を調査したので、その成績を概略報告する。

### II 材料と方法

#### A. 検査材料

検査材料は、県内の農家から自家保有米として貯蔵している貯蔵期間2年(昭和60年産米)の精白米12, 玄米12, 貯蔵期間1年(昭和61年産米)の精白米52, 玄米18と貯蔵期間5ヶ月(昭和62年産米)の精白米7, 玄米9の合計110検体を採取し、検査に供した。また、玄米については、正常な米粒のほかに、青米と黒米を10~20粒選び同様に検査した。

#### B. 検査方法

検査方法は図1に示すとおりである。すなわち、正常な米粒を約120粒選び、表面殺菌した後、洗浄、水切りした米粒について検査した。分離培地は20%ブドウ糖および100 μg/mlクロラムフェニコール加ポテトデキストロース寒天培地を用い、この平板培地各2枚づつに合計100粒を接種した。25°Cで7~10日間培養後、集落数を測定するとともに、確認培養して菌種を決定した。また、米の水分含量は、ライスタL(ケット科学研究所)を用いて測定した。

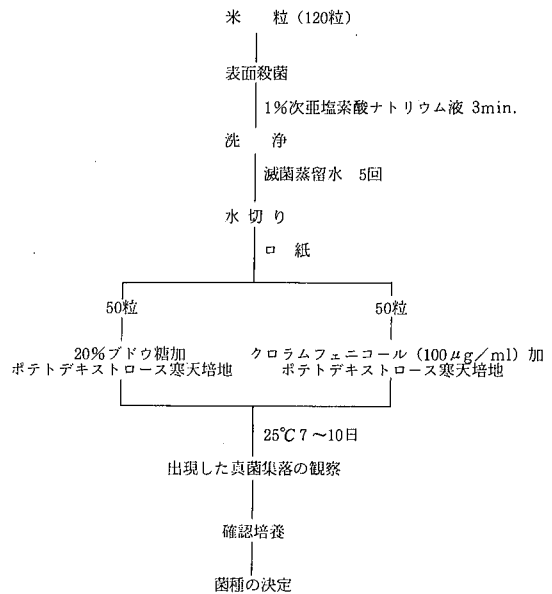


図1. 保有米の糸状菌検査方法

### III 成績

#### A. 水分含量

精白米と玄米の水分含量の平均値を貯蔵期間毎に示したのが表1である。まず、精白米についてみると、

表1 精白米と玄米の水分含量(%)

米別	貯蔵期間			平均
	2年	1年	5ヶ月	
精白米	13.8	13.7	14.9	13.8
玄米	14.0	14.7	15.4	14.6

貯蔵期間2年米は13.8%, 1年米は13.7%, 5ヶ月米は14.9%であり、平均13.8%の水分含量であった。一方、玄米についてみると、貯蔵期間2年米は14.0%, 1年米は14.7%, 5ヶ月米は15.4%であり、貯蔵期間が長

\* 秋田県衛生科学研究所

くなると水分含量が少なくなる傾向にあった。平均14.6%であり、精白米より高い水分含量であった。

### B. 保有米の糸状菌汚染状況

精白米と玄米の糸状菌汚染状況を表2に示した。まず、糸状菌の汚染状況を陽性検体率として定性的にみてみると、精白米は貯蔵期間に関係なく57～58%の陽性検体率であった。一方玄米は平均95%の陽性検体率であったが、貯蔵期間が長くなると陽性検体率が高くなる傾向がみられた。次に、汚染状況を陽性粒数（陽性粒率）として定量的にみてみると、精白米では貯蔵期間2年で4%、1

年で2%、5ヶ月で19%の陽性粒率であり、平均4%の陽性粒率であった。玄米では貯蔵期間2年で18%、1年で15%、5ヶ月で26%であり、平均19%の陽性粒率であった。また、保有米1件当りの陽性粒数を表3のように11段階に分けてみると、陽性粒数が1～10個の検体が50%と最も多かったが、1件当りの検査粒数（100粒）の半数（50粒）以上に糸状菌汚染の認められたものが4%あった。さらに、玄米中に混在する黒米と青米の糸状菌汚染状況を表4に示した。黒米の陽性検体率は97%、陽性粒率は66%であり、青米の陽性検体率は62%、陽性粒率は25%であった。

表2 精白米と玄米からの糸状菌検出成績

米 別		貯 蔵 期 間			計
		2 年	1 年	5 ヶ月	
精 白 米	検 体 数 (粒数)	12 (1200)	52 (5200)	7 ( 700)	71 (7100)
	陽性検体数 (%)	7 ( 58)	30 ( 58)	4 ( 57)	41 ( 58)
	陽 性 粒 数 (%)	45 ( 4)	80 ( 2)	131 ( 19)	39 ( 4)
玄 米	検 体 数 (粒数)	12 (1200)	18 (1800)	9 ( 900)	39 (3900)
	陽性検体数 (%)	12 ( 100)	17 ( 94)	8 ( 89)	37 ( 95)
	陽 性 粒 数 (%)	216 ( 18)	268 ( 15)	237 ( 26)	721 ( 19)

表3 精白米と玄米の陽性粒数（1件当り）分布

陽 性 粒 数	貯 蔵 期 間						計
	2 年		1 年		5 ヶ月		
	精 白 米	玄 米	精 白 米	玄 米	精 白 米	玄 米	
0	5 <sup>※</sup>		22	1	3	1	32 ( 29) <sup>※※</sup>
1 ~ 10	4	8	30	10	2	1	55 ( 50)
11 ~ 20	3	1		4		1	9 ( 8)
21 ~ 30		1				2	3 ( 3)
31 ~ 40		1		2		2	5 ( 5)
41 ~ 50						2	2 ( 2)
51 ~ 60							
61 ~ 70				1	2		3 ( 3)
71 ~ 80							
81 ~ 90		1					1 ( 1)
91 ~							
計	12	12	52	18	7	9	110 (100)

※一：検体数

※※一：分布率%

表4 玄米中の黒米と青米からの糸状菌検出成績

米 別		貯 蔵 期 間			計
		2 年	1 年	5 ヶ月	
玄米中の黒米	検体数(粒数)	10 (130)	17 (170)	4 ( 22)	31 (322)
	陽性検体数 (%)	9 ( 90)	17 (100)	4 (100)	30 ( 97)
	陽性粒数 (%)	59 ( 45)	137 ( 81)	17 ( 77)	213 ( 66)
玄米中の青米	検体数(粒数)	11 (120)	17 (180)	9 ( 90)	37 (390)
	陽性検体数 (%)	6 ( 55)	9 ( 53)	8 ( 89)	23 ( 62)
	陽性粒数 (%)	26 ( 22)	31 ( 17)	39 ( 43)	96 ( 25)

C. 検出糸状菌の菌種分布

まず、精白米と玄米から検出された糸状菌の菌種分布を表5に示した。精白米からは、貯蔵期間に関係なく、Aspergillus属とEurotium属の検出率が高く、合計するとEurotium属59%、Aspergillus属27%の検出率であった。検出糸状菌種数は貯蔵期間2年米から6種類、

1年米から最も多い14種類、5ヶ月米から3種類、合計16種類であった。一方、玄米についてみると、貯蔵期間2年米からはEurotium属が80%と最も高率に、次いでAspergillus属(8%)、Penicillium属(6%)が検出され、検出糸状菌種数は8種類であった。貯蔵期間1年米からはPenicillium属の検出率が22%と最も高

表5 精白米と玄米から検出された糸状菌

菌 名	貯 蔵 期 間						計	
	2 年		1 年		5 ヶ月			
	精白米	玄 米	精白米	玄 米	精白米	玄 米	精白米	玄 米
Aspergillus	※ ※※ 7( 16)	17( 8)	28( 35)		34( 26)		69( 27)	17( 2)
A. versicolor		2( 1)	6( 8)				6( 2)	2( 0)
A. candidus	4( 9)	5( 2)	1( 1)				5( 2)	5( 1)
A. spp	3( 7)	10( 5)	21( 26)		34( 26)		58( 23)	10( 1)
Eurotium spp.	31( 69)	173( 80)	25( 80)	1( 0)	96( 73)	82( 35)	152( 59)	256( 36)
Penicillium spp.	2( 4)	13( 6)	12( 15)	60( 22)	1( 1)		15( 6)	73( 10)
Cladosporium spp.			3( 4)	33( 12)		29( 12)	3( 1)	62( 9)
Nigrospora spp.			3( 4)	40( 15)		43( 18)	3( 1)	83( 12)
Fusarium spp.				12( 4)		65( 27)		77( 11)
Epicoccum spp.				35( 13)		7( 3)		42( 6)
Alternaria spp.				20( 7)		6( 3)		26( 4)
Curvularia spp.		1( 0)		6( 2)		2( 98)		9( 1)
Other fungi	5( 11)	12( 6)	9( 11)	61( 23)		3( 11)	14( 5)	76( 11)
計	45(100)	216(100)	80(100)	268(100)	131(100)	237(100)	256(100)	721(100)
検出菌種数	6	8	14	23	3	9	16	27

※一粒数 ※※一分布率%

く、次いでNigrospora属15%、Epicoccum属13%、Cladosporium属12%の順に検出され、検出糸状菌種数は23種類と最も多かった。貯蔵期間5ヶ月米からはEurotium属(35%)が最も多く、次いでFusarium属(27%)、Nigrospora属(18%)、Cladosporium属(12%)の順に検出され、検出糸状菌種数は9種類であった。合計すると、Eurotium属(36%)、Nigrospora属(12%)、Fusarium属(11%)、Penicillium属(10%)の順に検出され、検出糸状菌種数は27種類であ

た。次に玄米中に混在する黒米と青米から検出された糸状菌の菌種分布を表6に示した。すなわち、玄米とほぼ同様の菌種分布を示し、貯蔵期間2年米からはEurotium属、Aspergillus属、貯蔵期間1年米からはEpicoccum属、Nigrospora属、Curvularia属、貯蔵期間5ヶ月米からはEurotium属、Fusarium属、Nigrospora属の検出率が高かった。検出糸状菌種数は合計で18種類と玄米の菌種数より少なかった。

表6 玄米中の青米と黒米から検出された糸状菌

菌名	貯 蔵 期 間						計
	2 年		1 年		5 月		
	青 米	黒 米	青 米	黒 米	青 米	黒 米	
Aspergillus	※ ※※ 3( 12)	10( 17)					13( 4)
A. versicolor		1( 2)					1(0.3)
A. candidus	3( 12)	5( 8)					8( 3)
A. spp		4( 7)					4( 1)
Eurotium spp.	18( 69)	30( 51)	1( 3)		15( 38)	4( 24)	68( 22)
Penicillium spp.		1( 2)	10( 32)	6( 4)			17( 6)
Cladosporium spp.			4( 13)	9( 7)	1( 3)	1( 6)	15( 5)
Nigrospora spp.			10( 32)	19( 14)	9( 23)		38( 12)
Fusarium spp.	1( 4)		2( 7)	12( 9)	7( 18)	10( 59)	32( 10)
Epicoccum spp.			3( 10)	37( 27)	1( 3)	2( 12)	43( 14)
Alternaria spp.		3( 5)		4( 3)			7( 2)
Curvularia spp.	4( 15)	8( 14)		28( 20)			40( 13)
Other fungi		7( 12)	1( 3)	22( 16)	6( 15)		36( 12)
計	26(100)	59(100)	31(100)	137(100)	39(100)	17(100)	309(100)
検 出 菌 種 数	4	10	7	14	7	4	18

※一粒数 ※※一分布率%

#### IV 考 察

戦後、輸入米が黄色になる事件(黄変米事件)が発生したことから、その原因究明のため数多くの調査が行なわれ、糸状菌(主にPenicillium属)の着生によって引き起されたことが明らかにされた<sup>11)</sup>。それ以来、米に着生する糸状菌の調査研究がすすめられ、多種類の糸状菌が米に着生し、発ガン性を有するマイコトキシンを産生する有害糸状菌も着生していることが明らかにされた<sup>12~15)</sup>ことから、我々は本県の主要農産物である米の糸状菌着生実態を解明する目的で県内農家が貯蔵している自家保有米の糸状菌汚染状況を調査した。

まず、保有米からの糸状菌検出状況を見ると、玄米中の正常な米粒の平均陽性検体率が95%および平均陽性粒率が19%であり、さらに、玄米中に混在する黒米と青米からの糸状菌検出率は高く、青米の平均陽性検体率が62%、平均陽性粒率が25%であり、黒米の平均陽性検体率が97%、平均陽性粒率が66%と最も高率であった。また、貯蔵期間毎の陽性検体率および陽性粒率に有位差が認められなかったことなどから、貯蔵期間に関係なくほとんどの玄米が糸状菌に汚染されていることが判明した。一方、精白米の平均陽性検体率が58%および平均陽性粒率が4%であり、玄米のそれぞれの値よりかなり低率であったことから、糸状菌の汚染が玄米表層部に極在している

ことが示唆された。

次に、保有米からの検出糸状菌の菌種をみると、玄米の正常な米粒で、14.0%と水分含量が低かった貯蔵期間2年米からは好乾性糸状菌である *Aspergillus* 属と *Eurotium* 属などの貯蔵性糸状菌といわれる菌種の検出率が高かったが、水分含量が14.7%~15.4%と高い貯蔵期間1年と5ヶ月米からは *Nigrospora* 属、*Cladosporium* 属、*Fusarium* 属などの圃場性糸状菌といわれる菌種の検出率が高かった。また、玄米中に混在する黒米と青米からの検出糸状菌の菌種は、玄米の正常な米粒と同じ傾向を示し、貯蔵期間2年の黒米と青米からは *Eurotium* 属と *Aspergillus* 属などの貯蔵性糸状菌の検出率が高く、貯蔵期間1年と5ヶ月の黒米と青米からは *Epicoccum* 属、*Curvularia* 属、*Nigrospora* 属、*Fusarium* 属などの黒色や赤色胞子を有する圃場性糸状菌の検出率が高かった。これらのことから、玄米の汚染糸状菌が貯蔵期間中に圃場性糸状菌から貯蔵性糸状菌に変わっていくことが示唆された。精白米からの検出糸状菌の菌種は、平均水分含量が13.8%と低かったことから、貯蔵期間に関係なく、好乾性糸状菌である *Eurotium* 属、*Aspergillus* 属などの貯蔵性糸状菌といわれる菌種の検出率が高かった。

最後に、精白米と玄米1件当りの陽性粒数の分布をみると、陽性粒数1~10個のものが最も多かったが、分布が8段階に亘っており、しかも1件当りの検査粒数の半数以上の米粒から糸状菌が検出されているものが4%もあったことから、農家保有米の貯蔵環境が農家によりかなり異なっていることが示唆された。

今回の調査ではアフラトキシンを産生する可能性のある *Aspergillus flavus* は検出されなかったが、発ガン性を有するステリグマトシスチンを産生する可能性のある *Aspergillus versicolor* が9株、トリコテセンなどのマイコトキシンを産生する可能性のある *Fusarium* 属が109株も検出されていたことから、今後は、マイコトキシン産生能調査やアフラトキシンなどのマイコトキシン汚染調査も実施したいと考えている。

## V 結 論

県内農家が自家保有米として貯蔵している貯蔵期間2年、1年、5ヶ月の玄米と精白米110件の糸状菌汚染状況を調査した結果、次のような結論を得た。

1. 玄米の水分含量は貯蔵期間が長くなると少なくなる傾向にあったが、精白米の水分含量は貯蔵期間との相関は得られなかった。

2. 玄米の平均陽性検体率が95%および平均陽性粒率が19%であった。また、精白米の平均陽性検体率が58%

および平均陽性粒率が4%であった。

3. 玄米中に混在する黒米の平均陽性検体率が97%、平均陽性粒率が66%であり、最も糸状菌検出率が高かった。

4. 精白米からの検出糸状菌の菌種は、平均水分含量が13.8%と低かったことから、貯蔵期間に関係なく *Eurotium* 属、*Aspergillus* 属などの貯蔵性糸状菌の検出率が高かった。一方、玄米からの検出糸状菌の菌種は、水分含量が14.0%と低かった貯蔵期間2年米からは貯蔵性糸状菌の、水分含量が14.7%~15.4%と高かった貯蔵期間1年と5ヶ月米からは *Nigrospora* 属、*Cladosporium* 属、*Fusarium* 属などの圃場性糸状菌の検出率が高かった。

5. 玄米中に混在する黒米と青米から検出された糸状菌種は玄米と同様の傾向を示した。

6. 精白米と玄米の1件当りの陽性粒数の分布が8段階に亘っており、検査粒数の半数以上の米粒から糸状菌が検出された保有米が4%あったことから、保有米の貯蔵環境が農家によりかなり異なっていることが示唆された。

## 文 献

- 1) K. Sargeant, et al. : Toxicity Associated with Certain Samples of Groundnuts., *Nature*, 192, 1096—1097 (1961)
- 2) M. C. Lancaster : Comparative Aspects of Aflatoxin—induced Hepatic Tumors., *Cancer Research*, 28, 2288—2292 (1968)
- 3) G. N. Wogan, et al. : Dose—Response Characteristics of Aflatoxin B<sub>1</sub> Carcinogenesis in the Rat., *Cancer Research*, 27, 2370—2376 (1967)
- 4) 倉田浩たち : 食品中における有害糸状菌に関する研究, *食衛誌*, 8, 237—246 (1967)
- 5) 森實たち : 穀類ならびにその加工食品の糸状菌汚染と分離糸状菌のアフラトキシン産生能について, *食衛誌*, 15, 94—99 (1974)
- 6) 諸岡信一 : 穀類に寄生するカビ類のマイコトキシン, *食衛誌*, 12, 459—472 (1971)
- 7) 真鍋勝たち : 輸入peanut meal の aflatoxin について, *食衛誌*, 12, 364—369 (1971)
- 8) 久保和夫たち : 輸入及び国産ナチュラルチーズの Aflatoxin M<sub>1</sub> 汚染調査, *食衛誌*, 25, 543—548 (1984)
- 9) 栗飯原景昭たち : 輸入生落花生の保管とアフラトキシンの二次汚染について, *食衛誌*, 26, 234—242 (1985)

- 10) 齊藤和夫たち：市販ピスタチオナッツ，コーン及びコーンフラワーのAflatoxin及びAflatoxicol汚染調査，食衛誌，25，241—245（1984）
- 11) 角田広たち：黄変米特集，食品衛生研究，10，7—40（1954）
- 12) H. Kurata, et al. : Studies on the Population of Toxigenic Fungi in Foodstuffs Ⅲ. Mycoflora of Milled Rice Harvested in 1965., 食衛誌，9，23—28（1968）
- 13) H. Kurata, et al. : Studies on the Population of Toxigenic Fungi in Foodstuffs V. Acute Toxicity Test for Representative Species of Fungal Isolates from Milled Rice Harvested in 1965., 食衛誌，9，379—384（1968）
- 14) 宮本高明たち：米に着生する有害糸状菌の検索と分布について，食衛誌，11，373—380（1970）
- 15) 高橋治男たち：千葉県産農家保有玄米における糸状菌分布，千葉衛研報告，10，6—11（1986）

# ELISA法を用いたCoxsackievirus A群ウイルスの同定 (第2報)

佐藤 宏 康\* 安部 真理子\* 森田 盛大\*

## I 緒 言

前報では哺乳マウス (SM) で分離されたコクサッキー A 群ウイルス (CAV) 10 型の同定は二抗体法による ELISA 法で可能であることを報告した<sup>1)</sup>。

本報では同様の方法が CAV-6 型についても可能かどうかを検討した。さらに、既知のウイルス量を糞便乳剤中に添加し、糞便中の CAV を直接本 ELISA 法によって検出できるかどうかを検討した。最後に CAV-6 型と CAV-10 型を含む糞便から直接分離同定することを試みたので、その成績について報告する。

## II 材料及び方法

### A 材料

#### 1. 使用ウイルス株

CAV-6 型 (Gdula 株) は予研、腸内ウイルス部より分与を受けた。

#### 2. 組織培養細胞

青森衛研より分与された RD 細胞を用いた、FCS を 5% に含む MEM ハンクス液で培養した。

#### 3. 哺乳マウス (SM)

感染価測定、ウイルスの分離同定に使用した SM は当所で交配させた dd 系マウスで、生後 72 時間以内に使用した。

#### 4. 被検ウイルス株

昭和 61 年度の定点観測調査で、SM を用いて分離同定された CAV-6 型 32 株、その他の型 9 株の合計 41 株を使用した。

#### 5. 糞便材料

ヘルパンギーナの患者より採取した糞便材料のうち、SM で CAV-6 型と 10 型の存在が確認された材料、それぞれ 2 及び 1 検体を用いた。

## B 方法

### 1. ウイルス分離同定, 感染価測定法

分離は SM への腹腔内接種法により、また感染価測定及び同定の場合は SM への皮下接種法により行なった。

### 2. SM による免疫抗原の調整及び正常 SM 抗原の調製法

図 1 及び 2 に示した方法で行なった。分画は 10 本に分け採取した。

発症マウス 20% 乳剤

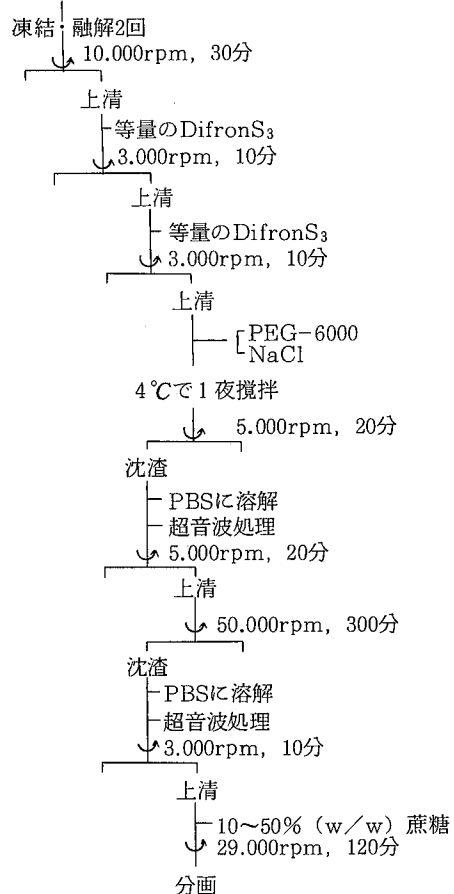


図 1. SM による免疫抗原の調製

\* 秋田県衛生科学研究所

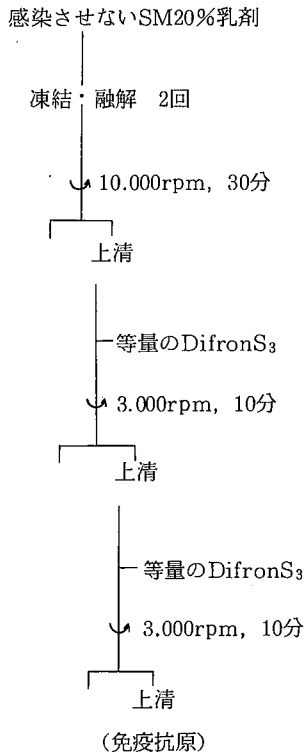


図2. 正常SM抗原の調製

### 3. RD細胞による免疫抗原の調整法

ルー氏型培養ビンを用いてRD細胞を単層に培養した。3日後PBSマイナスで2回洗浄したのち、RD細胞に3代馴化したGudula株5mlを接種、60分間吸着させた。さらにPBSマイナスで2回洗浄したのち、血清を含まないイーグルのMEM45mlを入れCPEが十分出現するまで37°Cで静置培養した。以下は図3により免疫抗原を精製した。分画は10本に分け採取した。

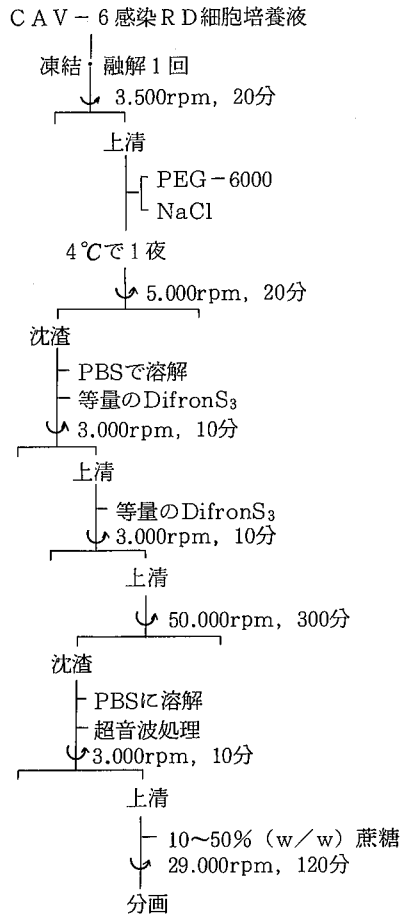


図3. RD細胞による免疫抗原の調製



4. 免疫方法, IgGの調整法, 蛋白の測定およびゲル内沈降反応

すべて前報<sup>1)</sup>に準じて行なった。

5. 被検ウイルス株の処理及びELISA法

処理方法は前報<sup>1)</sup>に準じて行なった。ELISA法は図4に示した。抗CAV-6型ウサギIgGの吸光度(O・D)から抗正常マウスウサギIgGのO・Dを差し引いたO・Dが0.1以上を陽性として判定した。

6. 糞便材料の濃縮処理

CAV-6型及び10型を含む糞便をPBSマイナスで10%乳剤としたのち, 10,000rpm30分間遠心し, その上清をダイフロンS3で2回処理した。PEG-6000とNaClにて濃縮した。CAV-10型を含む糞便材料については限外濾過(アミコン社, PM-10)にて再度濃縮した。

7. 予備実験

SMで増殖させたCAV-6型を $10^{7.5}$ ,  $10^{6.5}$ ,  $10^{5.5}$ ,  $10^{4.5}$  LD<sub>50</sub>/0.05mlに希釈し, 各々の2mlとCAVを含まない10%糞便乳剤198mlと混合した(表1)。これらを濃縮前10%乳剤とした。次にII-6により各々を濃縮処理した。それぞれの感染価はSMを用い, またO・DはELISA法で測定した。

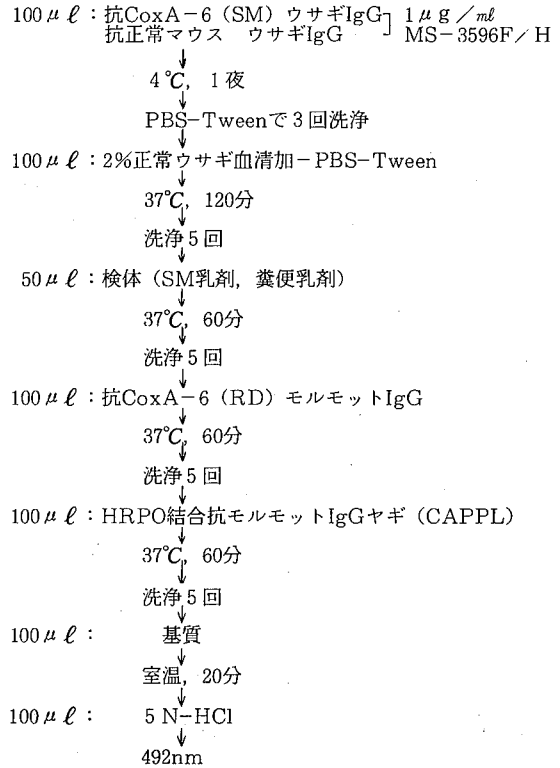


図4. ELISA法

表1 予備実験

実験No.	CAVを含まない10%糞便乳剤	CAV-6型 2ml添加 LD <sub>50</sub> /0.05ml	含まれる 予想ウイルス LD <sub>50</sub> /0.05ml	濃縮前10%乳剤	
				LD <sub>50</sub> /0.05ml	O・D
1-1	198ml	$10^{7.5}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$	0.150
2-1	198ml	$10^{6.5}$	$10^{4.5}$	$10^{4.0}$	0.043
3-1	198ml	$10^{5.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$	0.046
4-1	198ml	$10^{4.5}$	$10^{2.5}$	$10^{2.5}$	0.024

実験No.	濃縮後 (PEG-6000, NaCl)			
	沈 渣		上 清	
	LD <sub>50</sub> /0.05ml	O・D	LD <sub>50</sub> /0.05ml	O・D
1-2	$10^{6.5}$	0.404	$10^{3.5}$	0.073
2-2	$10^{5.5}$	0.234	$10^{2.0}$	0.036
3-2	$10^{5.0}$	0.054	$10^{1.5}$	0.034
4-2	$10^{4.0}$	0.023	$10^{1.0}$	0.016

### Ⅲ 成 績

#### A 免疫抗原, 免疫血清及びIgGの性状

##### 1. 免疫抗原

図1及び図3により10本に分画された免疫抗原はいずれの場合も最大感染価は分画3, 4に認められた。図1で精製された抗原はSMで $10^{9.0}LD_{50}/0.05ml$ , 図3で精製された抗原はRD細胞で $10^{7.5}TCID_{50}/0.1ml$ を示した。

##### 2. 免疫血清

Ⅲ-A-1の免疫抗原をウサギ及びモルモットに免疫して得られた免疫血清の抗体価はRD細胞で測定した場合, 抗CAV-6型ウサギ血清10,240倍, 抗CAV-6型モルモット血清160,000倍以上であった。

##### 3. IgGの性状

抽出された各IgGの性状は図5のとおりであった。すなわち, 抗CAV-6型ウサギIgGと抗CAV-6型モルモットIgGはCAV-6型粗抗原と1本のバンドを形成し, 正常SM抗原とは反応しなかった。

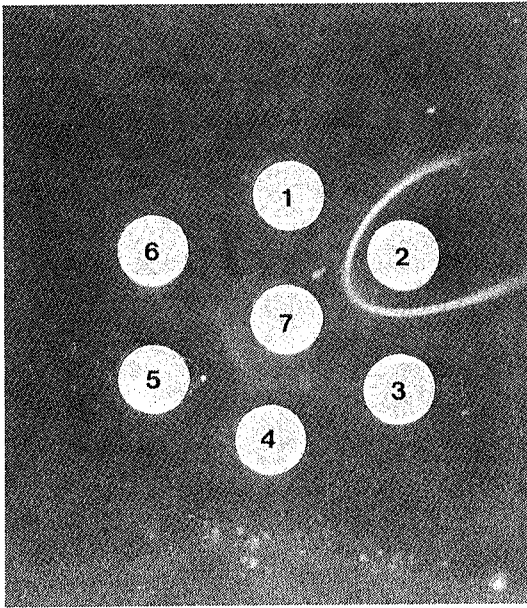


図5 IgGの性状

- 1, 4. 抗CAV-6 (SM) ウサギIgG
2. CAV-6 (SM) 粗抗原
- 3, 6. 抗CAV-6 (RD) モルモットIgG
5. 正常SM抗原
7. 抗正常 (SM) 抗原ウサギIgG

#### B IgGコーティング濃度の検討

イムノプレート (MS-3596F/H) を用いて抗CAV-6型ウサギIgGのコーティング濃度を検討した。0.5  $\mu g/ml$  から10  $\mu g/ml$  の範囲では1.0  $\mu g/ml$  の場合が, 抗原濃度希釈とO・Dの間に直線性が認められた (図6)。

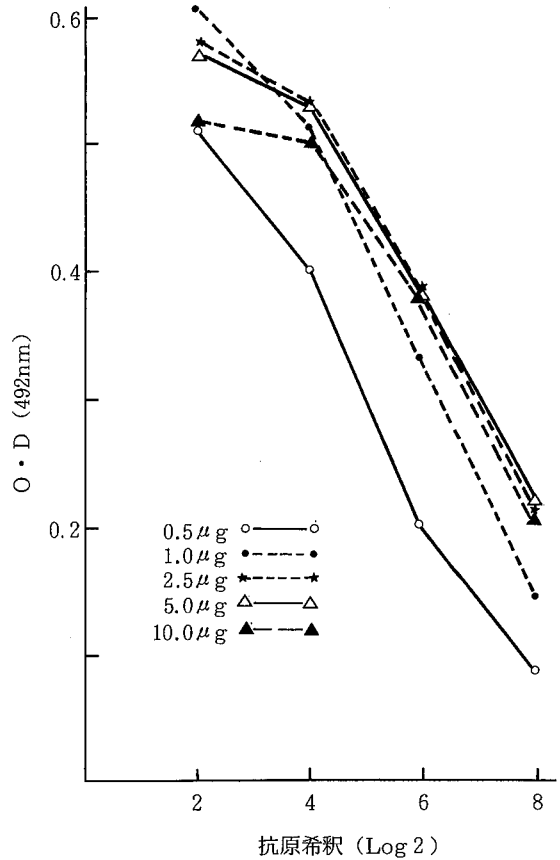


図6. IgGコーティング濃度の検討

#### C 特異性の検討

コーティングするIgG濃度を1.0  $\mu g/ml$  とした場合の特異性を検討した。すなわち, CAV-9型を除くCAV-1から10型 (SM継代株) を反応させた。成績は図7に示したとおり, 反応したのはCAV-6型のみで, 他の型はいずれもO・D0.1未満であった。

#### D ELISA法によるCAV-6型の同定

CAV-6型32株, その他の型9株を2倍階段希釈で反応させた成績を図8に示した。CAV-6型の場合は16倍希釈まで特異的に反応した。その他の株はいずれもO・D0.1未満であり, CAV-6型と明瞭に判別できた。

#### E 感染量(価)とO・Dの関係

両者の関係をIgGコーティング量 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ と $5.0\mu\text{g}/\text{ml}$ について検討した。いずれの場合も抗原希釈 $10^3$ で直線性を示したが, O・Dが0.1以上を示すのは $10^{5.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ 以上するときであった。すなわち, 感染マウス乳剤中のウイルス量が $10^{5.0}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ 以下では検出できないことを示していた(図9)。

#### F 予備実験

CAVが糞便中にいかなる濃度で含まれるとき検出可能かをさらに検討した。SMで増殖させたCAVをCAV

を含まない糞便に添加して, 感染価とO・Dを測定した(表1)。濃縮前の10%糞便乳剤では $10^{5.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ のときO・D0.150(実験No.1-1)であったが, 濃縮後では $10^{6.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ , O・D0.404(実験No.1-2)となりいずれも検出可能であった。一方濃縮前(実験No.2-1)では $10^{4.0}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ , O・D0.043の場合は濃縮後(実験No.2-2)  $10^{5.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ , O・D0.234となり濃縮後に検出可能であった。

#### G 糞便中のウイルス検出

濃縮前は破線, 濃縮後のO・Dは実線で図10に示した。CAV-6型の場合濃縮前 $10^{3.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ から濃縮後 $10^{5.3}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ となった場合はO・D0.1以上となり検出可能であった。濃縮後も $10^{3.0}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ の場合は検出できなかった。CAV-10型の場合は濃縮後さらに限外濾過を行ない $10^{5.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ まで濃縮した場合には検出可能であった。

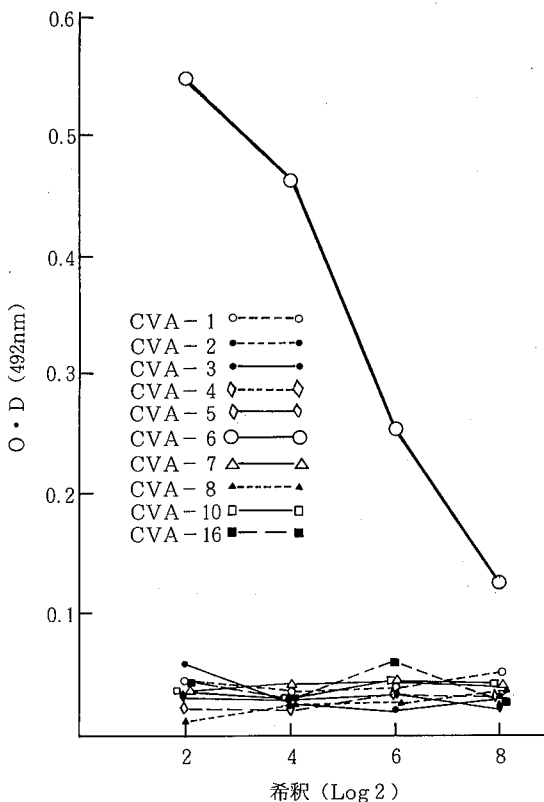


図7. 特異性の検討

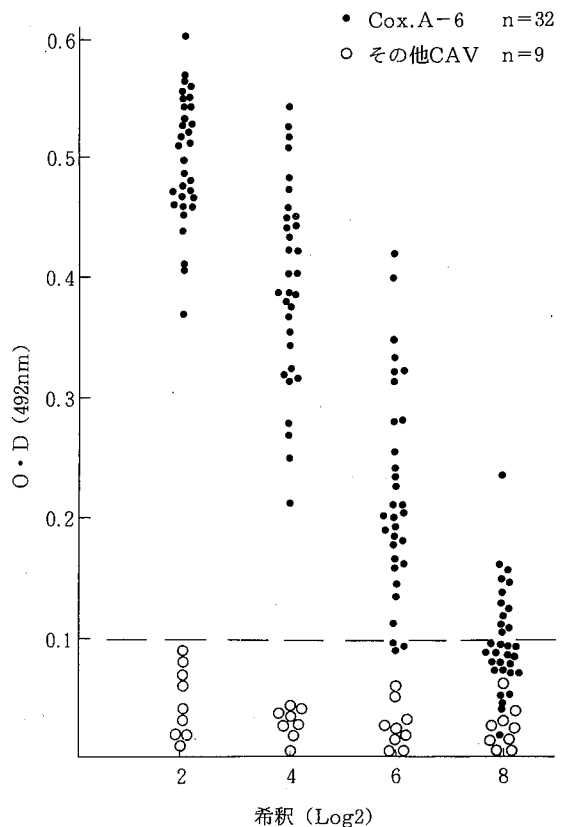


図8. ELISA法によるCAV-6型の同定

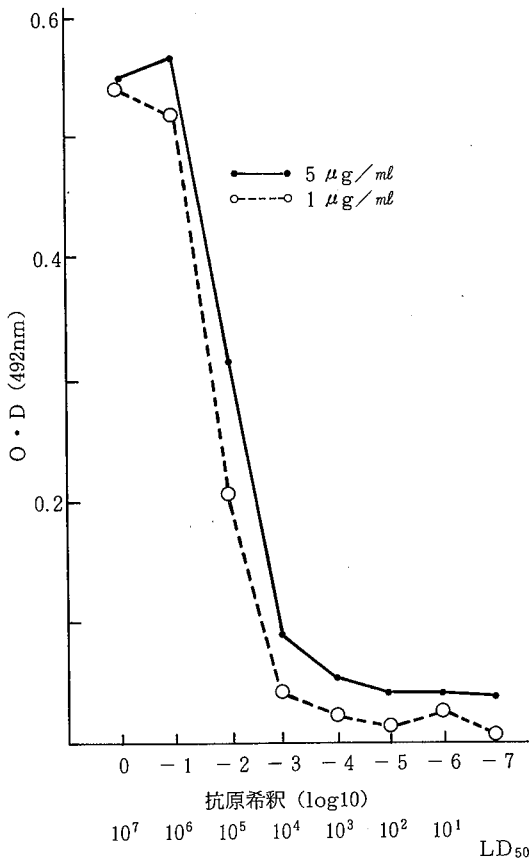


図9. 感染量とO・Dの関係

#### IV 考 察

前報<sup>1)</sup>ではCAV-10型を用い、ELISA法を二抗体法とサンドイッチ法で比較検討し、二抗体法で良好な成績が得られることを報告した。

本報では同様の方法を用いCAV-6型について検討した結果、SMを用いて分離されるCAV 1~4型、5~8型および10型には反応せずCAV-6型とのみ反応し、特異性が高いことが示された。また、CAV-6型同定のためのELISA法も特異性の高いことが示され、CAV-6型の同定に有用であると考えられた。

予備実験及び感染量とO・Dの関係から得られた成績では、O・D0.1以上で検出できる下限は $10^{5.5}LD_{50}/0.05ml$ 程度であった。しかし、患者の糞便10%乳剤中のウイルス量は $10^{2.5} \sim 10^{3.5}LD_{50}/0.05ml$ 程度である場合が多く、本ELISA法では検出不可能であると考えられたが、SMに接種、発症後のSM10%乳剤中には $10^{6.0} \sim 10^{7.5}LD_{50}/0.05ml$ 程度のウイルスが存在する。このような場合には本

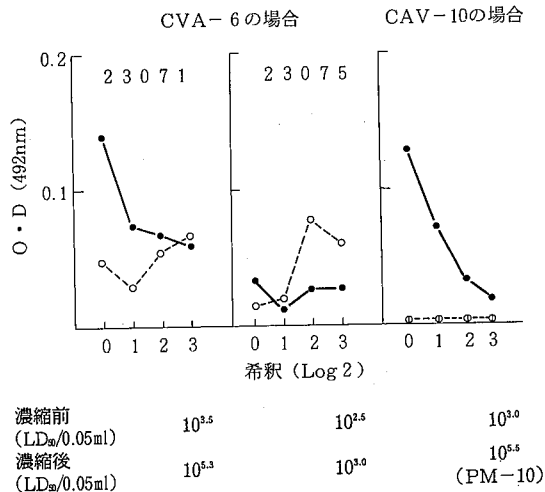


図10. 糞便中のウイルス検出

ELISA法で検出できるものと考えられた。

一方、糞便材料から直接ウイルスを検出する場合にはSMによるウイルス増殖過程の代わりに、何らかの方法を用いて検出可能なレベルまでウイルス濃度を上げる必要がある。試みとしてPEG6000とNaClによる濃縮法を用いた。この方法は濃縮に多量の糞便抽出液を処理する必要があること、また、 $10^{5.0}LD_{50}/0.05ml$ 以下のウイルス濃度ではさらに限外濾過法などで再濃縮する必要があるなど、実験室内診断法としては不利な点が多かった。

今後、糞便の少量処理で濃縮効果のよい方法をみい出すと同時に、ウイルス検出限界を $10^{3.0}LD_{50}/0.05ml$ 程度にまで感度と特異性を改善する必要があると考えられた。

#### V ま と め

1. 二抗体法によるELISA法を用いてCAV-6型の同定が可能であった。
2. 本ELISA法でのウイルス検出の下限は感染価として $10^{5.5}LD_{50}/0.05ml$ であった。
3. 糞便材料からウイルスを直接分離同定するためには多量の材料処理が必要であり、実験室内診断法としては改良の余地がある。

本論文の要旨は第36回日本感染症学会東日本地方部会総会(東京都, 1987)において発表した。

#### 文 献

- 1) 佐藤宏康たち: ELISA法を用いたCox.A群ウイルスの同定, 秋田県衛生科学研究所報, 30, 74-80 (1986)

## 手足口病病原ウイルスの多病原化傾向と 抗原変異について

佐藤 宏 康\*      安 部 真理子\*  
原 田 誠三郎\*    森 田 盛 大\*

### I はじめに

手足口病が新しい独立した疾患として報告されてから30余年を経過した<sup>1)</sup>。我国で最初に病原として分離されたのはコクサッキーA群ウイルス(CAV)16型であった<sup>2)</sup>。次いで、エンテロウイルス71型(EV-71)であった<sup>3)</sup>。秋田県内でもこの両者が流行の主役になってきた<sup>4-6)</sup>。最近になりCAV-10型による手足病も報告された<sup>7)</sup>。

一方、秋田県内において、昭和62年度内に検出された手足口病の病原ウイルスは、前述のCAV-16型、EV-71型、CAV-10型さらに新顔としてCAV-4型も検出され、本疾患が多病原化する傾向が認められた。このようなことから、原因解明の一つとして病原ウイルスの検索を行ない、昭和62年度の分離ウイルスと過去の流行株との抗原の比較を行なったので、その成績について報告する。

### II 材料と方法

#### A. 材 料

##### 1. 組織培養細胞

HEAJ細胞とRD細胞を使用した。すなわち、当所で樹立したヒト由来細胞HEAJ細胞は10%牛血清を含むイーグルのMEMで培養した。また、青森衛研より分与を受けたRD細胞は牛胎児血清を5%を含むハンクスMEMで培養した。

##### 2. 哺乳マウス(SM)

当所で交配生産した生後72時間以内のdd系SMを用いた。

##### 3. ウイルス分離材料

昭和62年5月から63年2月までの間に、微生物感染症定点観測病原検出調査で採取された25名の咽頭ぬぐい液14検体、水疱内容18検体の合計32検体を用いた。

##### 4. 被検ウイルス株

CAV-4型は標準株High point, 昭和62年度分離

株23872, CAV-10型は標準株Kowalik, 昭和62年度分離株24081, 24113, CAV-16型は標準株G-10, 昭和55年度分離株9344, 昭和59年度分離株10918, 昭和62年度分離株24123, 24253, 24632, EV-71は標準株Nagoya, 62年度分離株24593, 24726を用いた。分離株はすべて水疱由来である。CAV-4と10型はSMで分離後、RD細胞に1~2代馴化継代させた。CAV-16型とEV-71はHEAJ細胞に継代した。

#### 5. 免疫血清

表2に示したとおりである。すなわち、抗CAV-4型はHigh point, 抗CAV-10型はKowalik, CAV-16型はG-10, 9344, 10918, 21915, 24123, EV-71はNagoya, 21958, 24593の免疫血清で9344はモルモット, 他はすべてウサギを用いて作製した。

### B. 方 法

#### 1. ウイルスの分離法

マイクロ分離法によった。すなわち、フラット型96穴マイクロプレートに単層培養したHEAJ細胞をPBSマイナスで1回洗浄し、抗生物質、牛胎児血清を0.5%に含むMEM0.1mlで液交換を行なった。各検体につき0.1mlずつ2穴に接種し、37°Cの炭酸ガス培養器で分離培養を行なった。一方、SMによる分離では腹腔内に0.05mlずつ接種し発症の有無を2週間観察した。

#### 2. 分離ウイルスの同定法

37°Cの回転培養法により行なった。すなわち、10倍希釈の抗9344モット血清及び抗Nagoyaウサギ血清の各々と100TCID<sub>50</sub>/0.1mlの分離ウイルス液を等量混合し37°Cで60分間反応させたのち、HEAJ細胞培養試験管に接種し、CPE陰性を示した型を当該するウイルス型とした。

一方、SMを用いた中和同定法は、100LD<sub>50</sub>/0.025mlのウイルス液と抗High pointウサギ血清, 抗Kowalikウサギ各血清の100倍希釈液と等量混合し、37°Cで60分間

\* 秋田県衛生科学研究所

反応させたのち、SMの皮下に0.05mlずつ接種し、発症しなかった型を当該するウイルス型とした。

### 3. 免疫血清作製法

抗High point, 抗Kowalik血清は精製抗原を用いて作製した<sup>8)</sup>。抗G-10, 抗9344, 抗Nagoya血清は二層分配法<sup>9)</sup>にて濃縮した抗原を用いた。抗10918, 抗21915, 抗24123, 抗21958, 抗24593は8%ポリエチレングライコール6000とNaCl 2.1g/100mlにて濃縮<sup>10)</sup>したウイルス液を免疫抗原とした。いずれの場合もコンプリートアジュバントと等量混合し、皮下及び筋肉内に免疫した。1ヵ月後の追加免疫はウサギの場合は耳静脈内に4~5ml, モルモットの場合は腹腔内に5ml行なった。追加免疫7日後に全採血を行ない免疫血清を得た。

### 4. 交差中和試験法

マイクロ中和法により行なった。すなわち、各ウイル

スの100TCID<sub>50</sub>/0.025mlと40倍希釈から2倍階段希釈した血清とをトランスファプレート上で等量混合し、37℃の炭酸ガス培養器中で3時間、4℃一夜反応させた。翌日、マイクロプレート上に組織培養しておいたRDあるいはHEAJ細胞を牛胎児血清0.5%を含むMEMで液交換し、接種した。HEAJ細胞は液交換前にPBSマイナスで1回洗浄した。培養は33℃の炭酸ガス培養器中で行ないCPEが30から300TCID<sub>50</sub>/0.025mlで判定した。

## III 成績

### A. サーベイランス情報からみた患者発生状況とウイルス分離成績

患者発生状況とウイルス分離数を月別に図1に示した。

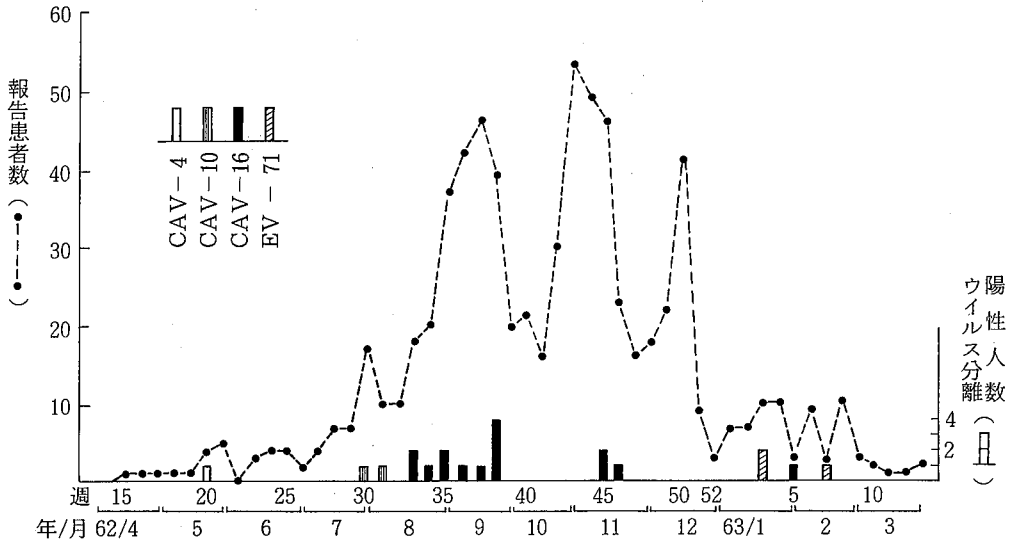


図1. 患者発生状況とウイルス分離数

患者発生は5月より散見され7月から増加し8~12月まで続いた。5月はCAV-4型が、7~8月にかけてはCAV-10型が病原ウイルスとして検出された。8月中旬以降11月まではCAV-16型のみが分離された。昭和63年1~2月にかけてはCAV-16型1株と新たにEV-71が3株分離された。一方、年齢別ウイルス検出数は図2に示した。すなわち、CAV-4, 10型は1才以下で分離され、CAV-16型は1~5才及び7才児からも分離され患者の年齢範囲が広く発生数も15名と多かった。また、EV-71は1才と3才児から分離された。

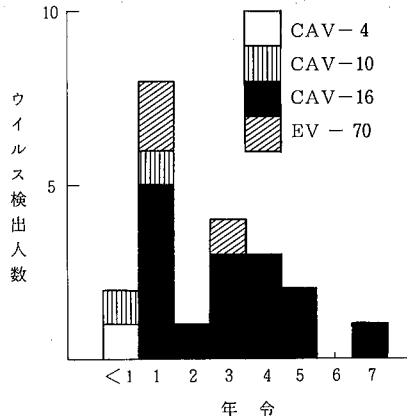


図2. 年齢別ウイルス検出数

### B. 分離培養宿主によるウイルス検出率の比較

EAJ細胞とSMの両宿主で同時にウイルス分離が実施できた咽頭液14検体、水疱18検体について両者の初代での検出成績を比較し表1に示した。CAV-4型とCAV-

表1 分離培養系によるウイルス検出率の比較

分離ウイルス	ウイルス分離培養	分離材料		計 (%)
		咽頭液	水疱	
CAV-4 CAV-10	HEAJ	0/1	0/3	0/4 (0.0)
	SM	1/1	3/3	4/4 (100.0)
CAV-16	HEAJ	10/13	12/15	22/28 (78.6)
	SM	3/13	3/15	6/28 (21.4)

表2 手足口病分離株交差中和試験

抗原		免疫血清									分離株由来	備考	
		抗CAV-4	抗CAV-10	抗CAV-16				抗Entero-71					
血清型	株名			G-10	9344	10918	21915 <sup>1)</sup>	24123	Nagoya	21958 <sup>2)</sup>	24593		
CAV-4	High Point	12,800	—	—	—	—	—	—	—	—	—		標準株
"	23872	12,800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	水疱	S62年分離
CAV-10	Kowalik	—	2,560	—	—	—	—	—	—	—	—		標準株
"	24081	—	640	—	—	—	—	—	—	—	—	水疱	S62年分離
"	24113	—	320	—	—	—	—	—	—	—	—	"	"
CAV-16	G-10	—	—	2560	2560	320	320	160	—	—	—		標準株
"	9344	—	—	—	80	40	80	—	—	—	—	水疱	S55年分離
"	10918	—	—	—	—	—	40	—	—	—	—	"	S59 "
"	24123	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"	S62 "
"	24253	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"	"
"	24632	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	"	"
Entero71	Nagoya	—	—	—	—	—	—	—	2,560	640	1,280		標準株
"	24593	—	—	—	—	—	—	—	320	320	1,280	水疱	S62年分離
"	24726	—	—	—	—	—	—	—	640	1,280	2,560	"	"

1) 抗体価40倍未満

2) S60年手足口病水疱からのウイルス抗血清

清に対しては、昭和55、59年の分離株は中和されるが昭和62年の分離株は中和されなかった。一方、EV-71分離株24593、24726は抗Nagoya血清に対しホモ価より2～3管低い抗体価を示した。

### D. 昭和62CAV-16型代表株24123の性状

この株はHEAJ細胞で分離されたがSMでは分離されなかった。細胞を用いた同定では昭和55年の代表株9344の抗血清250単位で中和されるが、抗G-10血清では中和されなかった。一方、細胞2代継代株をSMに接種すると1週間で発症が認められた。SM2代継代した株を用いて抗G-10、抗9344、抗10918の40倍希釈血清と中和反応させると、いずれの血清とも中和が成立した。しかし、抗Nagoya、抗21958血清の40倍希釈とは反応し

10型はSMでのみ分離された。一方、CAV-16型はHEAJ細胞で78.6% (22/28) であったのに対し、SMでは21.4% (4/28) であった。すなわち、昭和62年度流行のCAV-16型は細胞でよく分離されたが、SMを発症させ難い性状を有していた。

### C. 分離株の交差中和試験

昭和62年度の分離株を主体に各免疫血清との反応を表2に示した。CAV-4型分離株23872は標準株High pointの抗血清でよく中和された。CAV-10型分離株24081、24113は標準株Kowalikの抗血清に対し、ホモの価より2～3管低い抗体を示した。CAV-16標準株G-10はすべてのCAV-16型分離株抗血清により中和された。しかし、昭和55年以降の分離株は抗G-10血清で中和されなかった。昭和60年分離株で作製した抗21915血

清に於いては、昭和55、59年の分離株は中和されるが昭和62年の分離株は中和されなかった。一方、EV-71分離株24593、24726は抗Nagoya血清に対しホモ価より2～3管低い抗体価を示した。

## IV 考 察

手足口病の病原ウイルスとして、水疱から検出されたウイルスはCAV-16型、EV-71、CAV-10そしてCAV-6型が報告されている<sup>12)</sup>。今回、我々は生後10カ月の乳児の足部水疱からCAV-4型を分離同定した。したがって、本邦においてもCAV-16、10、EV-71以外の病原として今後CAV-4、6型による手足口病に注目する必要がある。県内でも昭和53～54年の流行時に手足口病患者の咽頭からCAV-4と7型が分離されている<sup>6)</sup>。昭和62年度の流行では水疱よりCAV-4、10、

16型そしてEV-71の4種類の病原ウイルスが検出され、本疾患が多病原化する傾向が観察された。

CAV-4型とCAV-10型はSMでのみ分離された。しかし、CAV-16型はHEAJ細胞での分離率が78.6%であるのに対し、SMのそれは21.4%と低かった。従来、CAV-16型の分離率は両者ではほぼ同程度であった<sup>9)</sup>。昭和62年度のCAV-16型分離株は従来の流行株に比較し、SMでの病原性が著しく低いことが推定された。また、交差中和試験による成績から、昭和62年度のCAV-16型分離株は昭和55、59年度の実験株と抗原的に異なっていることが推定された。このような変異が患者の発生年齢が1~7才と比較的広範囲に及んだ一因ではないかと考えられた。

一方、CAV-10型分離株と標準株Kowalikとは多少抗原が変異していることが示唆された。釜洞ら<sup>10)</sup>は分子生物学的研究から、CAV-10型は短期間にウイルス変異が認められることを報告している。EV-71についてもNagoya株と分離株間に変異が起きていることが推定された。しかし、CAV-4型についてはそのような現象は認められなかった。

秋田県という限定された地域においても、手足口病の病原ウイルスの多病原化傾向と病原ウイルスの変異が観察されたことから、今後、ますます病原ウイルスの種類が増加とウイルスの変異現象が全国規模で観察されるのではないかと考えられた。

## V ま と め

昭和62年度に分離された手足口病の病原ウイルスを、ウイルス分離と抗原分析の両面から調査し、以下の成績を得た。

1. 病原ウイルスが多病原化する傾向が認められた。
2. CAV-16型以外にCAV-10型、EV-71においても変異が起きていることが示唆された。

稿を終るに当たり、標準株を分与していただいた予研腸内ウイルス部、検体採取にご協力をいただいた秋田組合総合病院小児科、由利組合総合病院小児科、市立秋

田総合病院小児科、大館市立総合病院小児科、仙北組合病院小児科の諸先生方に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 渡辺悌吉：手足口病 (HFMD) の臨床像、臨床とウイルス、2(1)、76-80 (1974)
- 2) 芦原義守：疫学的にみた手足口病、臨床とウイルス、2(1)、81-84 (1974)
- 3) 萩原昭夫：エンテロウイルス71型、臨床とウイルス、7(1)、20-24 (1979)
- 4) 須藤恒久たち：水疱よりVero細胞でウイルスが分離されたHand-Foot and Mouth Disease、秋田県衛生科学研究所報、14、75-80 (1970)
- 5) 原田誠三郎たち：1978年、秋田県で流行した手足口病 (HFMD) の病原診断成績と血清疫学的研究、秋田県衛生科学研究所報、23、65-69 (1979)
- 6) 佐藤宏康たち：昭和53、54年度流行した手足口病患者からのウイルス分離成績について、秋田県衛生科学研究所報、24、85-89 (1980)
- 7) 板垣朝夫：Cox.A-10ウイルスによる手足口病の発生、病原微生物検出情報、28、1~2 (1982)
- 8) 佐藤宏康たち：ELISA法によるCox.A群ウイルスの同定、秋田県衛生科学研究所報、30、74-80 (1986)
- 9) 原田誠三郎たち：水性二層分配法 (ポリエチレングリコールとデキストランサルフェートナトリウム) を用いたエコー9ウイルスの分配組成系の比較検討について、秋田県衛生科学研究所報、24、101-103 (1980)
- 10) 厚生省レファレンスシステム研究班、コクサッキーA群ウイルスの補体結合反応試験および免疫粘着赤血球凝集反応試験による同定法 (1984)
- 11) 厚生省公衆衛生局保健情報課、伝染病流行予測検査術式、16-23 (1975)
- 12) 病原微生物検出情報、手足口病1986-87、91号、24 (1987)
- 13) 釜洞俊雄たち：1981年8月から12月の間に松江市で手足口病患者から分離されたコクサッキーA10型ウイルスの分子疫学、第33回日本ウイルス学会総会抄録、183、(1985)



## 脳卒中発症者の登録および予後調査にもとづく 循環器総合検診の評価に関する研究

児島三郎\* 大村外志隆\*\* 船木章悦\* 沢部光一\*  
高桑克子\* 小野洋子\* 飯田稔\*\*\* 小町喜男\*\*\*\*

### I 目的

最近のわが国における脳卒中の罹患および死亡の減少は、反面、罹患年齢の高齢化や脳梗塞割合の相対的増加などの新しい傾向を示しつつある。これに伴い、高齢者の寝たきりや老年期痴呆の問題が、脳卒中罹患との関連で重要と考えられて来ている。一方、日本国内における脳卒中死亡の地理的分布の特徴としては、高い死亡率を示す市町村が北関東から北陸、東北地方にかけて集積しており、全体としてはいわゆる東高西低の分布となっている<sup>1)</sup>。その中でも秋田県は最も脳卒中死亡の高い県として最近まで推移してきた<sup>2)</sup>。

著者らは秋田県内農業地区において、過去20年間、秋田県衛生科学研究所、大阪府立成人病センター、筑波大学との共同研究により、循環器総合検診と脳卒中登録を継続・実施してきた。

本研究では、これらの蓄積された資料にもとずき、登録された脳卒中発症者の予後調査を実施し、それらの予後を決定する因子として、性、年齢、病型などの基本的特性の他に、発症前の循環器検診の血圧を始めとする各項目について検討を行なうことにより、脳卒中発症者の予後に関連する因子の解明と、循環器総合検診の充実に資することを目的とした。

### II 方法

#### 1) 対象

秋田県内農村地区の井川町において、昭和38年より42年までの5年間に30歳以上の住民を対象として循環器検診を実施した。受診者は2,876名(男1,283名, 女1,593名)で、受診率は90.1%であった。これらの受診者を対象として、おおよそ5年毎に循環器検診を実施し、死亡

者については死因調査を行った。

循環器検診の項目は、家族歴、既往歴、嗜好(飲酒、喫煙)、身体計測(身長、体重、肥満度)、血圧測定、降圧剤の服用、心電図検査、眼底検査、尿検査(蛋白、糖)、血液検査(ヘモグロビン、血清蛋白、血清総コレステロール)である。

#### 2) 脳卒中登録

井川町における脳卒中発症者の登録は昭和38年に開始されたが、本研究では昭和50年より56年までに登録された者を解析の対象とし、発症後5年間の生存の有無と生存者については日常生活動作(ADL)を調査した。なお、昭和50年の井川町の人口は6,427名であった。

脳卒中登録の方法はWHO studyが示す方法<sup>3)4)</sup>に準じたが、登録センターは秋田県衛生科学研究所に置いた。脳卒中発症者の報告は地域の開業医及び病院、あるいはその地域を担当する保健婦より寄せられたが、また死亡個票や健康保険支払証などよりも情報が集められた。このようにして得られた登録者については研究グループの医師および保健婦により、訪問調査、病院記録、あるいは死亡診断書などにより診断の確認と脳卒中の病型、発症時の状況などが調査された。

さらに発症後5年間、それらの登録者について生存の有無と、死亡者については死亡診断書等による死因の調査を行ない、生存者については毎年ADLを調査した。

#### 3) 脳卒中発症者の発症前検診成績

登録された脳卒中発症者について、発症前の循環器検診記録を照合し、発症前5年以内に受診記録の得られた者について検診成績別の生存率を比較した。

検討した項目は、脳卒中発症の危険因子と考えられている肥満度、血圧、心電図所見(High-R, ST-T change),

\*秋田県衛生科学研究所 \*\*秋田大学医学部公衆衛生学教室 \*\*\*大阪府立成人病センター \*\*\*\*筑波大学社会医学系

眼底検査の高血圧性所見と動脈硬化性所見，尿蛋白，及び血清総コレステロールの8項目である。ここで，心電図のHigh-R所見とはMinnesota codeの3-1，3-3のいずれかが見られたものであり，ST-T所見は同codeの4-1，4-2，5-1，5-2のいずれかが認められた者である。また，眼底検査の高血圧性所見とはSheie分類のH2以上の所見があった者であり，動脈硬化性所見とは同分類のS2以上を認めた者である。

#### 4) 解析

得られた資料を基に生存率の算出を行ったが，予後に関連する因子の有無別比較を行うにあたって2群間の年齢調整をおこなうために相対生存率(RSR)を用いた。その計算方法は，基準生存率としてわが国の昭和50年の完全生命表を用い，それより各症例について発症より1年毎に5年後までの期対生存率を求めた。さらに各カテゴリー別の相対生存率は，観察された累積生存率を分子とし，期対生存率を分母として求めた。すなわち，

$$Pk = Pck / \overline{EX}k.$$

ここで，PKは相対生存率，Pckは累積生存率， $\overline{EX}k$ は期待生存率である。また，相対生存率の標準偏差は(Sk)は，次式で求められる。

$$SK = \sqrt{Pck \cdot (1 - Pck) / m} / \overline{EX}k.$$

ここでmは症例数である。さらに，2群間の相対生存率の差の検定は，二つの相対生存率と各標準偏差より下記の様式でZ値を算出して有意性を判定した。

$$Zk = (PAK - PBK) / \sqrt{(SAK)^2 + (SBK)^2}.$$

ここでPAKとPBKは二つの相対生存率であり，SAKとSBKはそれぞれの標準偏差である。

### III 結 果

#### 1) 脳卒中罹患率と病型分類

観察した7年間における脳卒中の初発者は109例で，年平均罹患率は人口10万対244.0であった。その内訳は表1に示したが，男女比は1.32と男に多く，65歳以上の割合は62.4%であった。また，発症時の平均年齢は男は63.3歳，女は71.4歳と男女間で平均8歳の差がみられ，その差は統計学的に有意であった(P<0.01)。

臨床診断に基づく病型分類では，脳梗塞は76例(69.7%)と最も多く，次いで脳出血は21例(19.3%)，くも膜下出血6例(5.5%)，分類不能6例(5.5%)であった(表2)。

また，これら109例のうち，発症前5年間までの循環

器検査成績が得られたのは81例(74.8%)であり，眼底検査について71例(65.1%)であった。

表1 性・年齢別発症者数と百分率

年 齢	男	女	合 計
~39	2(3.2)	0(0.0)	2(1.8)
40~49	8(12.9)	1(2.1)	9(8.3)
50~59	12(19.4)	5(10.6)	17(15.6)
60~69	15(24.2)	13(27.7)	28(25.7)
70~79	20(32.2)	18(38.3)	38(34.8)
80~	5(8.1)	10(21.3)	15(13.8)
合 計	62(100.)	47(100.)	109(100.)

表2 性・病型別発症者数と百分率

病 型	男	女	合 計
脳梗塞	43(69.3)	32(70.2)	76(69.7)
脳出血	14(22.6)	7(14.9)	21(19.3)
SAH	4(6.5)	2(4.3)	6(5.5)
その他	1(1.6)	5(10.6)	6(5.5)
合 計	62(100.)	47(100.)	109(100.)

#### 2) 脳卒中発症者の相対生存率

脳卒中発症者の相対生存率について，性，年齢，病型別に比較した。まず，男女間の差については(図1)，全経過を通して女の生存率は男より低く，発症より3年後と5年後についてはそれらの差は有意であった。これ

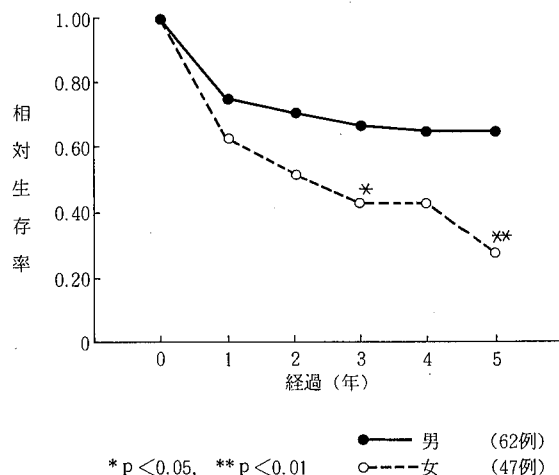


図1. 性別にみた相対生存率

を脳梗塞76例に限って観察したのが(図2)であるが、男女とも全脳卒中より生存率は改善するが、やはり女の生存率は男より低く、発症3年後と5年後はそれらの差は有意であった。

次に、発症年齢について30歳より64歳までと65歳以上の2群に分けて比較したところ(図3)、全期間において高年期発症群の生存率は中年期発症群より有意に低率であった。ここで、中年期発症群の男女比は2.73と男が多かったのに対して、高年期発症群では0.89と女が多く、その差は有意であった( $P < 0.05$ )。また、中年期発症群の脳梗塞割合は59%であったが、高年期発症群では76%であった。

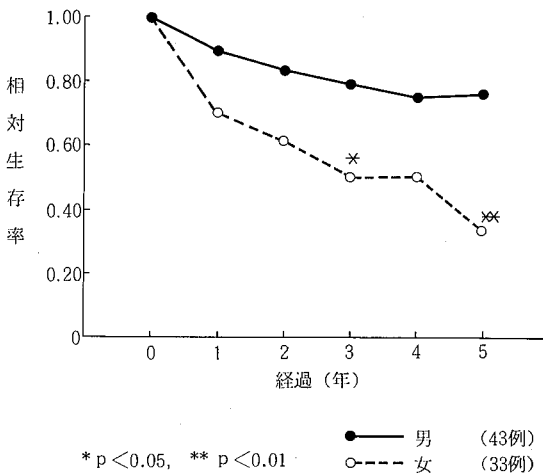


図2. 脳梗塞の性別相対生存率

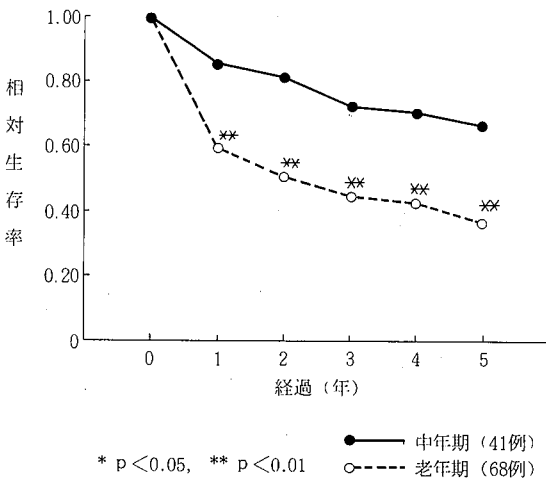


図3. 年齢別の相対生存率

一方、病型別の生存率については、クモ膜下出血については6例中1例が発症後3カ月で死亡したが、脳出血の生存率は脳梗塞より全期間で有意に低く、特に脳出血による死亡は発症後1年以内が大部分であることが強調される(図4)。すなわち、発症後1年以内の致命率は脳出血が67% (14/21)であり、脳梗塞は22%と顕著な差が認められた。

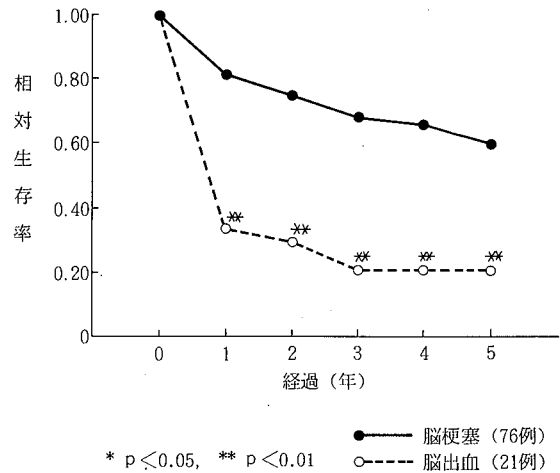


図4. 病型別の相対生存率

### 3) 循環器検診成績別にみた相対生存率

脳卒中発症者のうち発症5年前までの検診成績が照合できた81例について、肥満度、血圧、心電図所見(High-R, ST-T change)、眼底検査の高血圧性所見と動脈硬化性所見、尿蛋白、および血清総コレステロールの8項目について相対生存率を比較した。その結果は以下のとおりである。

- ① 箕輪法<sup>9)</sup>により求めた肥満度について、-10%以下を「やせ」とし、20%以上を「肥満」、その間を「普通」の3区分に分けて生存率を比較した(図5)。その結果「やせ」群は他の2群より生存率は低く、発症4年後と5年後ではそれらの差は有意であった。
- ② 血圧測定の結果をWHO分類<sup>6)</sup>に基づき正常、境界域、高血圧の3群に区分した。ここで降圧剤の服用状況についても調査したが、生存率の比較にあたっては降圧剤の服用の有無に拘わらず、血圧測定の結果により区分した。得られた結果を(図6)に示したが、3群間で生存率に有意の差は認めなかった。
- ③ 心電図のHigh-R所見の有無別に生存率を比較したが、両群間で有意の差は見られなかった(図7)。
- ④ 心電図ST-T所見の有無別の生存率については、発症4年後と5年後ではST-T所見を有した者は認

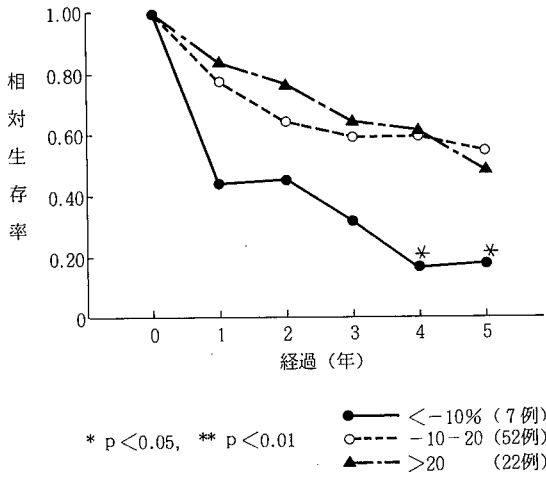


図5. 肥満度区別相対生存率

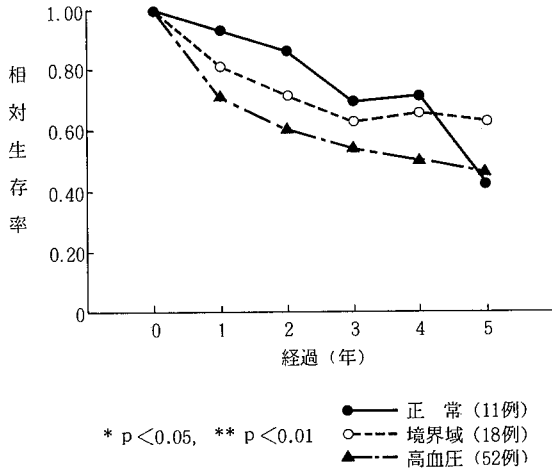


図6. 血圧区別相対生存率

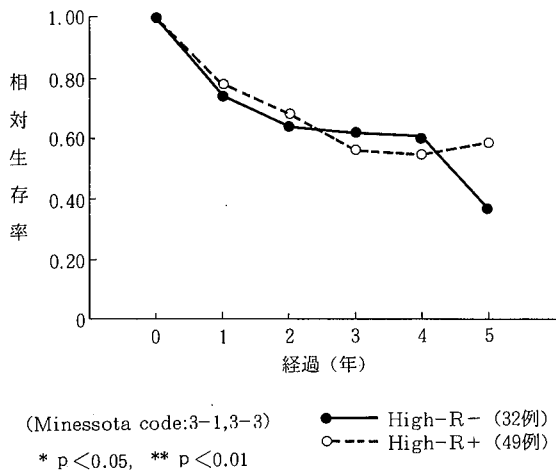


図7. High-Rの有無別相対生存率

めなかった者より有意に生存率は低かった(図8)。  
⑤ 眼底検査で高血圧性所見としてH2以上を示した者とそうでない者を比較した結果、両群間で生存率に有意の差は見られなかった(図9)。

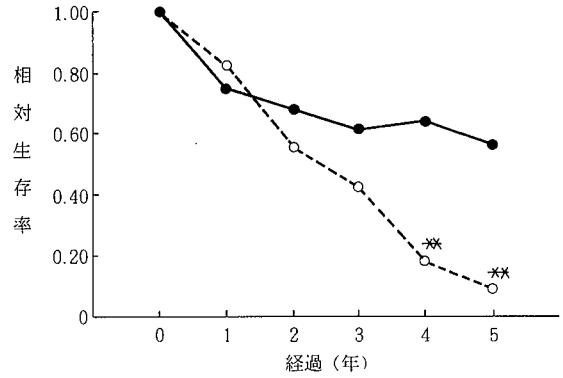


図8. ST-Tの有無別相対生存率

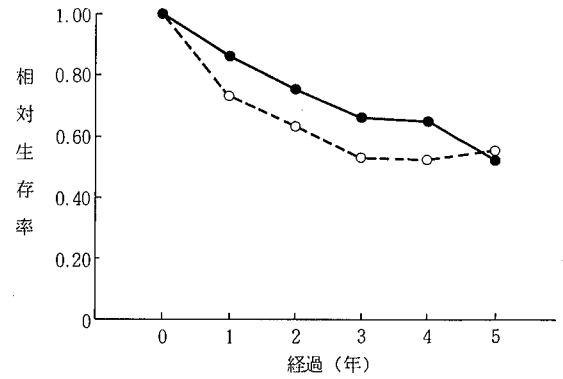
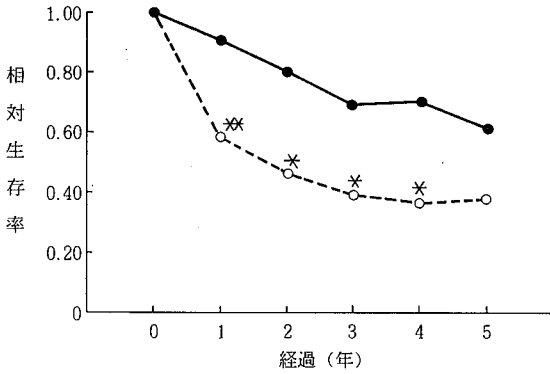


図9. 眼底H2の有無別相対生存率

⑥ 眼底検査における動脈硬化性所見(S2以上)については、有所見群は無所見群に対して観察した全期間を通して生存率は低く、発症5年後を除いてそれらの差は有意であった(図10)。

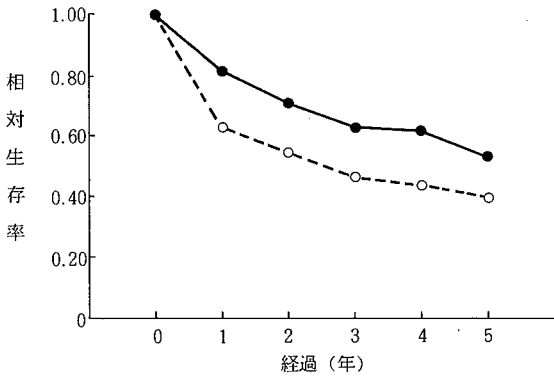
⑦ 尿蛋白の有無別の比較では、尿蛋白陽性群は陰性群より生存率は低い傾向を示したが、いずれの期間も有意ではなかった(図11)。

⑧ 血清総コレステロールについて150mg/dl未満と200mg/dl以上の2点により3群に分けて生存率を比



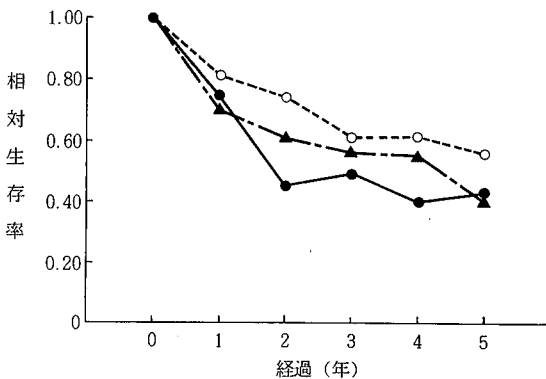
(Sheie分類S2以上) ● 眼底S2- (48例) ○ 眼底S2+ (23例)  
\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

図10. 眼底S2の有無別相対生存率



● 尿蛋白- (61例) ○ 尿蛋白+ (20例)  
\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

図11. 尿蛋白の有無別相対生存率



● <150 (10例) ○ 150-199 (43例) ▲ >200 (28例)  
\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

図12. 血清コレステロール別相対生存率

較したが、3群間に有意の差は見られなかった(図12)。

#### IV 考 察

本研究では秋田県内の農村地区において実施・継続されている脳卒中登録による記録と発症者の追跡調査より、脳卒中発症者の性、年齢、病型などの基本的特性の違いによる発症後5年間の生存率の比較と、発症前の循環器検診成績と生存率との検討も行った。

脳卒中発症者の性別にみた生存率の比較では、女の生存率は男より有意に低率であった。脳卒中を病型別に比較した場合、脳出血は脳梗塞よりはるかに致命率は高かった。よってこれを脳梗塞に限って男女間の比較をおこなったが、結果は同様であった。Abu-Zeidら<sup>7)</sup>およびEisenbergら<sup>8)</sup>は、本研究結果と同様に男の脳卒中発症者の生存率は女より良好であったことを報告している。しかし、脳卒中発症者の予後について男女間で差がないとする報告<sup>9)~11)</sup>や、またMarshallら<sup>12)</sup>のように女の方が男よりよいという報告もみられる。脳卒中発症者の予後を男女間で比較する時は、患者の配偶者の状況を考慮する必要があると思われる。すなわち、Abu-Zeidら<sup>7)</sup>は配偶者のいる脳卒中発症者の予後は単身者より良好であったことを報告している。本研究においては、脳卒中発症時に男の90%に妻が生存していたのに対して、女では夫の生存はわずか48%であった(P<0.01)。このような脳卒中発症時における婚姻状態の違いは、わが国における男女間の平均寿命と初婚年齢の違いで説明されよう。しかし、本研究において対象者を配偶者の生存していた症例に限って男女間の生存率を比較しても、やはり男の予後は女より良好であった。

発症時の年齢別にみた生存率については、高齢発症者群は中年期発症者群より有意に低率であった。ここで男の割合と病型別では脳出血の割合は、いずれも中年期発症者が高齢発症者より高率であった。脳卒中発症者の予後を考えると、年齢が重要な因子であることはこれまでの研究で一致している。これは高齢者はすべての慢性疾患で死亡率は高く、また脳卒中以外の合併症や基礎疾患を有している可能性が高いことによるのであろう。

一方、病型別にみた生存率の比較では脳出血群は脳梗塞群より生存率ははるかに低率であった。この違いは発症後3週間ですでに認められた。Ahoら<sup>13)</sup>は脳卒中発症後3週間以内の死亡を“initial mortality”と定義して重視している。本研究の対象者について、発症後3週間以上生存した者に限って脳出血と脳梗塞の生存率を比較したところ両群間に有意の差は認められなかった。

次に、脳卒中発症前の循環器検診成績と生存率の比較

をおこなった。検討した項目は脳卒中発症の危険因子と考えられているもののうち、肥満度、血圧、心電図のHigh-RとST-T所見、眼底検査のH2以上とS2以上、尿蛋白、および血清総コレステロールの8項目である。その結果、肥満度区分では「やせ」群、心電図のST-T異常のある群、眼底検査でS2以上を認めた群は、それを認めなかった群より有意に生存率は低率であった。また尿蛋白陽性群は陰性群より予後が悪い傾向が認められた。脳卒中の罹患に関する危険因子としては、性、年齢の他では高血圧が最も重視され、その他本研究で検討した項目や既往歴、家族歴などがあげられている。本研究で高血圧については生存率に有意な差は認められなかったが、これは血圧が正常域でも27% (3/11)、境界域では33% (6/18)が降圧剤の服用者であったことにも影響されていると思われる。しかし、降圧剤服用者を高血圧群として生存率の比較をおこなっても、やはり3群間で有意の差はみられなかった。これは高血圧者は脳卒中発症の危険因子ではあるが、発症者については測定値で64% (52/81)、降圧剤内服者を含めれば75% (61/81)が高血圧群であることより、生存率に関連する因子としてはその影響が検出しにくくなったとも考えられる。

このような脳卒中発症者の生存率について、発症前の循環器検診成績と比較した報告は他にみられず、文献的考察は行い得ないが、本研究結果は「やせ」や、動脈硬化症および心合併症の存在は脳卒中発症者の予後を悪くする因子として重要であることを示している。なお、本研究で対象とした例数は十分でなかったため、脳卒中発症者の性、年齢、病型別にみた循環器検診成績と生存率の比較は行えなかったが、今後はさらに例数を増やしてそれらの検討を行うことが必要と考えている。

## V 結 語

秋田県内の農村地区の住民を対象に昭和38年より循環器検診と脳卒中発症者の登録を行ってきた。本研究ではこれらのうち、昭和50年より昭和56年の7年間に発症した者を対象とし、発症後5年間の追跡調査と発症前5年以内の循環器検診成績の照合を行い、脳卒中発症者の生存率に関連する要因として、性、年齢、病型の他、発症前の循環器検診成績についても比較検討した。

上記期間中の脳卒中発症者は109例で、年平均発症者は人口10万対244.0であった。その内訳は、男/女比は1:32、65歳以上の割合は62.4%であった。病型分類では脳梗塞76例(69.7%)、脳出血21例(19.3%)、くも膜下出血6例(5.5%)、分類不能6例(5.5%)であった。

これらの脳卒中発症者について、性、年齢、病型別に予後を相対生存率で比較した。その結果、女の生存率は男より低く、これは、病型を脳梗塞に限って男女間で比較しても結果は同じであった。発症時年齢については、65歳以上の高齢発症者はそれ未満の中年期発症者より生存率は観察した全期間を通じて有意に低率であった。さらに、病型別の比較では、脳出血は脳梗塞より著しく生存率は低く、発症後1年でその差は明確であった。

次に、脳卒中発症前の循環器検診成績と生存率の比較として、肥満度、血圧、心電図のHigh-RとST-T所見、眼底検査のH2以上とS2以上、尿蛋白、および血清総コレステロールの8項目について検討した。その結果、肥満度区分では「やせ」群、心電図のST-T異常のある群、眼底検査でS2以上を認めた群は、それらを認めなかった群より有意に生存率は低率であった。また尿蛋白陽性群は陰性群より予後が悪い傾向が認められた。

以上、109例の登録された脳卒中発症者を5年間追跡調査を行い、また発症前の循環器検診成績について検討した結果、性、年齢、病型が予後に関連する因子として重要であることが指摘された。さらに、「やせ」や、動脈硬化症および心合併症の存在は、脳卒中発症者の予後を悪くする因子であることが示唆された。

## 文 献

- 1) 重松逸造, 小町喜男, 大村外志隆たち: 全国市町村別主要疾患死亡率の分布図, 健康づくり振興財団, 東京, (1981)
- 2) 厚生省大臣官房統計情報部: 昭和60年主要死因別訂正死亡率の概況, 厚生省, 東京, (1985)
- 3) WHO: Control of stroke and hypertension in the community. Report of WHO meeting, Geneva, WHO, (1971)
- 4) WHO: Community control of stroke and hypertension. Report of a WHO meeting, Goteborg, WHO, (1971)
- 5) 箕輪真一: 成人の標準体重に関する研究, 日本医事新報, 1988: 24~28, (1962)
- 6) WHO: Arterial hypertension and ischemic heart disease. Preventive aspect. WHO Technical Report Series, No231, (1962)
- 7) Abu-Zeid HAH, et al.: Prognostic factors in the survival of 1,484 stroke cases observed for 30 to 48 months. Arch. Neurol., 35: 121-125, (1978)
- 8) Eisenberg H, et al.: Cerebrovascular accidents. Incidence and survival rates in a defined population, Middlesex, County, Connecticut. JAMA, 189: 883-888, (1964)

- 9) Robinson RW, et al, : Life-table analysis of survival after cerebral thrombosis. Ten-year experience. JAMA, 169 : 1149-1152, (1959)
- 10) Wisnant JP, et al, : Natural history of stroke in Rochester, Minnesota, 1945 through 1954. Stroke, 2 : 11~22, (1971)
- 11) Aho K, et al, : Cerebrovascular disease in the community : results of a WHO Collaborative Study. Bulletin of the WHO, 58 : 113~130, (1980)
- 12) Marshall J, Shaw DA : Natural history of cerebrovascular disease. Brit. Med. J., I : 1614-1617, (1915)