

## イオンクロマトグラフィーによる 環境水中の各種イオンの定量

### 1 イオンクロマトグラフィーとは

従来、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Na}^+$ 、有機酸をはじめとする無機、有機イオンの定量は、吸光度法等の手分析で行われてきたが、検出感度が低く、また操作が複雑であること等から簡便で、かつ高感度な分析法の開発が要望されていた。

1975年、米国 Dow Chemical 社の H Small らは、交換容量の小さいイオン交換樹脂をつめた分離カラムの後に除去カラムをつなぎ、溶離液のバックグラウンドを低下させ、分析対象イオンを電気伝導度検出器で高感度に測定する方法を発表した。この方法はイオンクロマトグラフィー (Ion Chromatography IC) となづけられた。

一方、1979年 Gjerde らは、除去カラムを用いずに低電導度の溶離液を用いて、直接分析対象イオンの電気伝導度を測定する方法を発表した。

さらに、1982年 H Small らは、電気伝導度検出器の代わりに紫外吸光検出器を用いる間接吸光検出 (Indirect photometric detection IPD) 法を発表した。

IC はもともと H. Small らが、社内の工場排水管理をすることを目的に開発したもので、すでに1975年の発表前から、米国 EPA の J. B. Mulik らと大気汚染などのフィールド調査などへの実用化の検討が行わ

れている。従って、IC は環境分野の管理と調査研究の必要性から生まれたものともいえる。

IC はイオンを迅速に、しかも多成分を同時に分析できる方法として画期的なものである。これまでそれぞれのイオン種を個別に分析していたものが、10分程度で同時分析できるようになった。今後、環境水中の各種イオンの分析方法として IC が広く使用されるものと考えられるので、その原理と応用例を紹介する。

### 2 イオンクロマトグラフィーの装置と原理

先にも述べたように、IC には大きく分けて3つのタイプのものがある。除去 (サブレッサー) システムを用いるものと、除去システムを用いないノンサブレッサー型のもの及び間接吸光検出法である。

#### 2.1 サブレッサー型 IC

サブレッサー型 IC (図-1) では、分離カラムと電気伝導度検出器の間のサブレッサーが溶離液

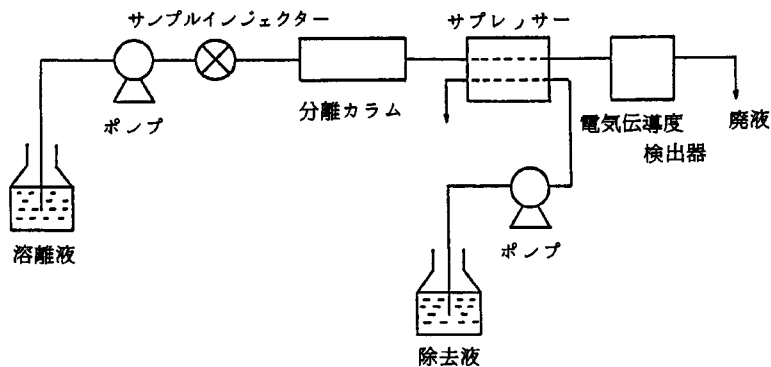


図-1 サブレッサー型 IC

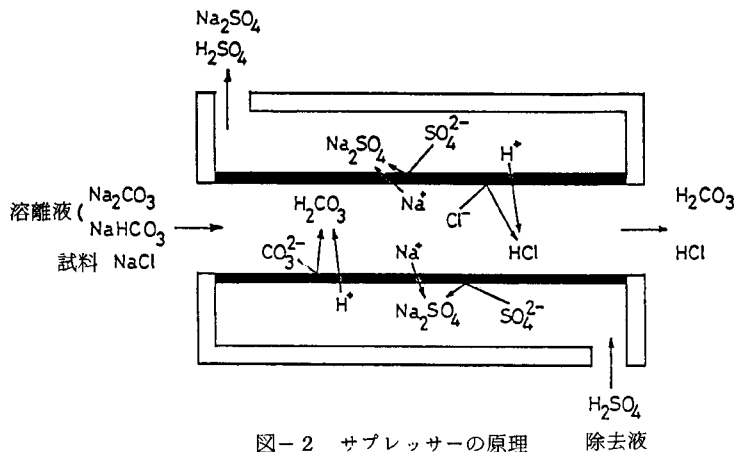


図-2 サプレッサーの原理

の酸又は塩基性塩を除去し、溶離液の電気伝導度を低くするとともに、分析対象イオンが高電導度の酸またはアルカリになる。サプレッサーの原理を図-2に、またその効果を図-3に示した。溶離液 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ) と分析対象イオン (例えば  $\text{Cl}^-$ ) がサプレッサーでイオン交換を受け、溶離液は低電導度の炭酸に変換され、バックグラ

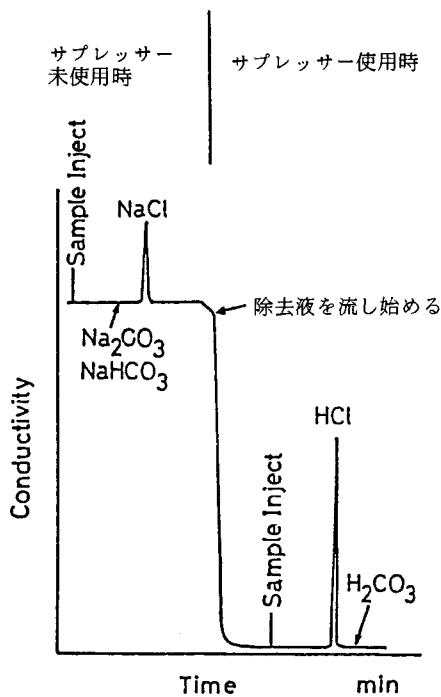


図-3 サプレッサーの効果

ンドは著しく小さくなる。また分析対象イオン  $\text{Cl}^-$  は、対イオンが  $\text{Na}^+$  から  $\text{H}^+$  となり、高電導度の  $\text{HCl}$  となる。従って、サプレッサーは単にベースラインを下げるだけでなく、S/N比も向上させることがわかる。

### 2.2 ノンサプレッサー型 IC

ノンサプレッサー型 IC (図-4) はサプレッサーを用いずに、溶離液に希薄なフタル酸等の電気伝導度の低いものを用いている。さらに、電気伝導度計の高感度化及びカラムと検出器の温調により外部ノイズを低減化し、サプレッサーなしでも高感度に分析できるようになった。

### 2.3 IPD法

一方、電気伝導度検出器の代わりに紫外吸光検出器を用いる間接吸光検出法 (図-5) は、汎用の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システムでそのまま分析できるという利点がある。

この方法は、あらかじめ溶離液の吸光度を高くしておき、紫外吸収のない分析対象イオンの溶出による溶離液の吸光度の減少を検出するものである。

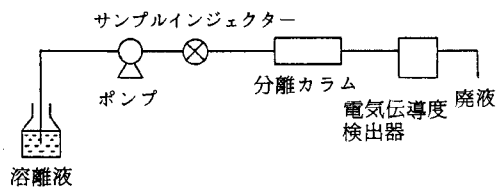


図-4 ノンサプレッサー型 IC

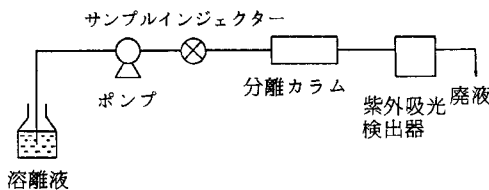


図-5 間接吸光検出法

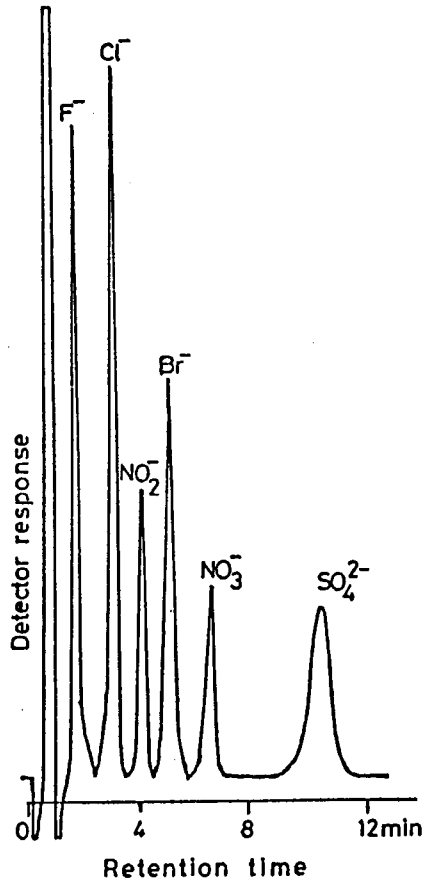


図-6 標準無機陰イオンの分析例

カラム：島津製作所製 Shim-pack IC-A2 (内径 5.0 mm、長さ 50 mm)  
 ガードカラム：島津製作所製 Shim-pack IC-GA2 (内径 5.0 mm、長さ 10 mm)  
 ポンプ：島津製作所製 LC-6A  
 検出器：島津製作所製 SPD-6AV  
 溶離液：0.5 mM フタル酸 (pH 4.6, NaOH)  
 カラム温度：40 °C  
 流量：1.5 ml/min  
 検出：UV 260 nm  
 注入量：50 μl  
 各イオンの濃度：F<sup>-</sup> 1.5 mg/l, Cl<sup>-</sup> 0.6 mg/l,  
 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 0.6 mg/l, Br<sup>-</sup> 1.5 mg/l,  
 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 0.6 mg/l, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0.6 mg/l

### 3 イオンクロマトグラフィーの応用例

ICは開発以来10年余の間に急速な普及を見せされており、その応用範囲も大気、水質などに代表される環境試料のみならず、食品、生体試料、医薬品、地球化学分野の試料、元素分析、工場の品質管理分析、又原子力発電所における極微量イオンの自動分析にと、多方面な分野へと発展しつつある。

#### 3.1 環境試料

環境試料中のイオン分析は、当生活環境部においても、河川水、地下水、温泉水、飲料水、し尿処理水等様々な試料について行っている。そこで、これをイオンクロマトで分析できないかを検討した。

図-6は標準液を用いて調製した無機陰イオン標準溶液をIPD法で分析した例である。各イオンのピークは良好に分離しており、約12分で分析が可能である。本法の感度は良好であり、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を除いて従来法による感度が十分に得られていた。図-7は実際の水道水の無機陰イオンをIPD法で分析した例である。その結果、この水道水中にはCl<sup>-</sup>が6.6 mg/l、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が11.8 mg/l含まれていた。

このようにICを用いることにより、環境中の各種イオンを少量の試料(10~100 μl程度)で、しかも簡便、迅速に同時分析することが可能である。

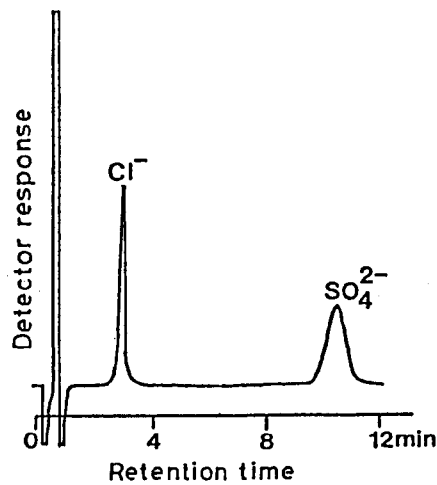


図-7 水道水の分析例

分析条件：図-6に同じ

また、最近大気中に放出される窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>)や硫黄酸化物 (SO<sub>x</sub>)により、雨のpHが3~4に低下する酸性雨現象が政治的・社会的問題になっている。ICはこの分野の酸性物質の分析を最も得意とし、酸性雨研究の大きな戦力となっている。

### 3.2 その他

#### 1) 食品化学

食品中の成分分析は、食品の安全性はもちろん、その食品の栄養及び品質管理という点から大変重要である。ワイン、コーヒー抽出液、清酒中の有機酸分析や乳幼児用食品中の無機イオン分析等にICが使われている。

また、「食品中の食品添加物分析法」(厚生省環境衛生局 食品化学課編)中にも、品質改良剤として用いられる臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>)の分析法としてICが収載されている。

#### 2) 医学、医薬品分野

尿や血清及びその他生体試料中のイオンの分析は臨床医学的に重要である。臨床化学分析においては、迅速性、微量、正確さ、精密さが要求される。ICは、いままで複雑な前処理後に個別に分析されていた各イオン種を、ほとんど前処理無しに迅速、高感度、正確かつ同時に分析できることから、極めて有効な方法として注目されている。

また、栄養輸液、注射液などの医薬品中の不純物チェックや、保存中の品質管理においてもイオン分析は欠くことができない。

#### 3) 原子力発電

原子力発電は、半導体工業と並んで最も高純度の水を必要とする産業である。原子炉では水は冷却材、減速材として用いられるので、非常に高純度のものが要求される。特に一次冷却水は、直接放射線にさらされるので、不純物が多いと核分裂が妨げられたり、腐食性物質を生成させたりするので、その水質基準は非常に厳しく、常にモニターされねばならない。ICは、24時間の自動運転によるイオンのモニタリングに利用され、その威力を発揮している。

## 4 イオンクロマトグラフィーの展望

初期のイオンクロマトグラフィーは、分離カラムと除去カラムと電気伝導度検出器とを組み合わせた装置によって、イオンを分析する方法と定義

されていて、そこに独特の性格があった。しかし、その後除去カラムを用いないノンサプレッサー型ICや、汎用のHPLCシステムをそのまま使うIPD法が開発されるに至って、ICはHPLCとほとんど差がなくなりつつある。ただ現在の段階では、イオンを測定するクロマトグラフであるという点は変わっていないといえる。

ICが最初に発表されてから10年以上たち、この間に様々な技術の進歩があり、特にここ数年の進歩には目を見張るものがある。その結果色々な分離モードと検出モードの組合せで、分析可能な成分が、無機イオンだけでなく、アミノ酸、有機酸、金属イオン等広範囲にわたり分析できるようになった。

この装置の優秀さから言って、単にイオンのみでの測定にとどまらず、多くの無機、有機の化合物の分析が可能になって行くと思われる。

## 5 おわりに

今回はICの基礎的な話に限定して述べたので紹介できなかったが、多くの成分の同時分析、陰イオンと陽イオンの同時分析、アミノ酸分離、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>などの遷移金属や希土類等も容易に分析できるグラジェント型ICの開発は、1975年にICが出現したときには想像もしなかったことである。

最後に、ICは各種の公定分析法としてすでに採用あるいはその検討が進んでいることを付け加えておく。米国のStandard Methodには水及び排水の陰イオンの分析法として収載されている。

また、わが国でも、日本水道協会水試験法における参考法、環境庁大気汚染物質測定法指針、及び日本薬学会衛生試験法における水質試験法と空気試験法などにおいてICの公定法化への動きが急である。

### 【参考文献】

- 武藤義一、及川紀久雄編：イオンクロマトグラフィー、講談社、1986。
- 及川紀久雄、斉藤浩子、ぶんせき、94-99、1982。
- 花岡護、ぶんせき、162-168、1986。
- 島津製作所、APPLICATION REPORT イオンクロマトグラフィー、No.8。

(生活環境部 近藤 文雄)

# 最近注目のウイルス感染症

## —伝染性紅斑とその病理ウイルスについて—

### 1 はじめに

伝染性紅斑 (erythema infectiosum : EI) は第5病 (fifth disease) とも呼ばれ、また顔面に出現する特徴的な発疹から、英国では slapped cheek disease、わが国ではリンゴ病という俗称で一般にも知られている。

EIでは流行的発生、季節的発性、家族内発生がみられることから、ウイルス感染が示唆されていたが、長い間その病原体は不明であった。

1983年英国のAndersonらはロンドンの小学校でEIが流行した際、その患者血清中にヒトパルボウイルスB19 (HPVB19)に対するIgM抗体を証明した。

また、EIは感染症サーベイランスの調査対象疾病に加えられており、調査開始以来、地域的な小流行を散発的に少数認める程度であったが、1986、1987年には全国的な流行になった。

以下、EIの概要、HPVB19病因説の根拠、パルボウイルスの一般性状を述べたあと、このウイルス感染が起す種々の疾患、病像について紹介したい。

### 2 EIの臨床、疫学

1799年英国の皮膚科医Robert willanの報告に始まるといわれ、1899年Stickerによって伝染性紅斑(EI)と命名された。わが国では、1912年大多和、三浦による姉妹例の報告が最初といわれる。臨床像としては両頬部の軽く隆起した蝶形様紅斑の出現を特徴とし、通常1~2日遅れて四肢を中心に紅色斑状丘疹が現れ、次第にレース状、網目状になる。発熱はないか、あっても軽微である。成人では関節の腫脹、疼痛がしばしばみられ、発疹部位の痒みを訴える場合が多い。血清中の抗体の検索が可能になってくると、HPVB19感染を起こした個体すべてに発疹がでるとは限らないこと、更に発疹自体もかなり多彩な像を示すことも明らかになってきた。従って日常臨床では、風疹、不明発疹症、アレルギー性発疹、猩紅熱等と診断されている例もあり、特に風疹との鑑別は両者が同

時流行している場合は必ずしも容易でないとされる。EIの好発時期は冬から初夏にかけてであり、風疹の流行パターンと類似している。好発年齢は5~14歳で、家族内での感染率が高い。英国での一般成人の抗体保有率は対向免疫電気泳動法(CIE)で約40%、更に感度の良いラジオイムノアッセイ(RIA)で60%程度であり、加齢と共に陽性率が上昇する。ジャマイカ、カナダ、米国、日本などでも同様の数値となっている。

### 3 パルボウイルス(科)の一般性状

このウイルスは、①パルボウイルス属、②ディペンドウイルス属、③デンソウイルス属に分類されており、前2者は脊椎動物に感染するウイルスであるが、デンソウイルスは昆虫のウイルスである。ディペンドウイルス(アデノ随伴ウイルス)はヘルパーウイルスの存在下でのみ増殖するが、ヒトの疾患との関連が明らかなものはない。EIの病因とされるウイルスはこの中のパルボウイルス属に所属し、1975年にCossartらが健康供血症者血清につき、オーストラリア抗原(HBs)の検出を行っていた際、偶然に発見されたものである。

### 4 HPVB19病因説の根拠

1975年HPVB19が血液中に検出されたヒトの中に発疹が認められた例が報告されたが、特定の発疹症との関連づけはできなかった。冒頭で述べたように、AndersonらはEIの症状をもつ36名について検討し、全員にHPVB19に対するIgM抗体が検出され、また患者の家族17例のうち、すでにIgG抗体を保有していた16例は感染から免れたなどを報告し、EIのHPVB19病因説を提唱した。しかし、上記症例からウイルスは検出されていない。その後、布上らは典型的EI患者98例の発疹期の血清中の1例にウイルスDNAを検出した。現在のところ、EI患者からHPVB19関連抗原が検出されたのはこの1例だけである。引き続き、Andersonら(1985)は健康成人に対してHPVB19の感染実験を行った。ヒト血清中から精製された

HPVB19を経鼻的に接種したところ、1週後よりウイルス血症が始まり4～5日間持続した。そして、この時期に一致して発熱、全身倦怠、頭痛などのかぜ様症状を示した。更に末梢血の網状赤血球が減少消失し、ヘモグロビン濃度が軽度低下した。同時に白血球、血小板の減少もみられている。接種後10～14日よりIgM抗体が上昇し、続いてIgG抗体が出現する。17～18日目に発疹と関節痛を主訴とする病像が出現した。この実験により、HPVB19感染が発熱性疾患、赤血球産生の停止（後述する慢性溶血性患者におけるAplastic crisis）、発疹症など多彩な病像を示すことが確認されたことになる。一方接種前に十分なIgG抗体を保有する個体では感染が成立せず、低い抗体を保有していた個体では極く軽度のウイルス血症を示しただけで臨床的には無症状であった。更にウイルス血症を示した症例では、その時期の咽頭ぬぐい液中にウイルス抗原が認められており、感染実験の成功と共に上気道を介した感染経路が想定されている。また従来からEIとして提示された病像を示した時にはすでにウイルス血症は消失し抗体が出現する。これがウイルス抗原が検出されにくかった理由かもしれない。

#### 5 HPVB19が惹起するその他の疾患、病像

溶血性貧血患者におけるAplastic crisis（無形成発作）：1981年Aplastic crisisで入院した鎌状赤血球症の小児血清中にHPVB19が発見され、またジャマイカで鎌状赤血球症患者間で流行したAplastic crisisの経過中、患者血清中に

HPVB19抗原、抗HPVB19抗体の陽転、IgM抗体陽性がみられ、HPVB19と本疾患との関連が明らかになった。HPVB19は赤血球系の前駆細胞に感染し、宿主細胞の増殖を止める。そのため赤血球の産生が停止する。溶血性貧血患者では赤血球の寿命が極端に短縮されており、急激な貧血が起きる。これがAplastic crisisの発生機序と考えられている。その他遺伝性球状赤血球症、ビルビン酸キナーゼ欠損症、 $\beta$ サラセミアなどの慢性溶血性貧血患者にもHPVB19によるAplastic crisisが報告されている。

胎児水腫：妊娠豚がブタパルボウイルスの感染を受けると、胎児のミイラ化、死産、流産が起こることは以前より知られていた。1983～84年BrownらはEI流行後に発生した死、流産症例を検討し、妊婦のHPVB19感染による胎児水腫死亡例を報告した。その後各国から同様の報告がなされ、HPVB19がヒト胎児にも影響を与えることが明らかになりつつあるが、頻度が低く報告数が限られており、今後の検討が必要であろう。

#### 6 おわりに

EIの病因としてHPVB19の関与がほぼ確実となり、またEI以外の種々疾患との関連も次第に明らかになりつつある。しかし、未だにウイルスを試験管内で培養出来ず、感染者の血液などを利用して研究が行われている現状である。このウイルスの培養系が確立され、関与している疾患の全容が一日も早く解明されることを期待したい。

（ウイルス部 三宅恭司）

## 腸管アデノウイルスによる下痢症

### I はじめに

1973年にBishopらが急性胃腸炎患者の十二指腸粘膜上皮の生検材料を電子顕微鏡（電顕）で観察し、ロタウイルスを発見し、当時ロタウイルスは組織培養法では分離出来なかったため（現在では組織培養による分離は可能となっているものもある）、下痢便材料からの電顕によるウイルス検出が盛んに行われた。その結果、下痢便中にしばしば多量のアデノウイルス（アデノ）が見られた。しかしこれらのアデノは既知のアデノと異なり組織培養法では、増殖がみられなかった。そのため、

下痢を起こすアデノは特に腸管アデノとし、従来のアデノ（1～39型）と区別されていた。1981年になり継代細胞（Graham 293細胞）が作られ、腸管アデノの増殖、分離が可能となった。そして腸管アデノは新しいアデノで2つの血清型が存在し、アデノ40、41型と決められ、互いにウイルスDNAの相同性が高いことから共に新しいアデノF群として分類されている（1985）。このアデノ40、41型は世界各地に広く分布していることが多くの研究者によって直ちに報告され、わが国でもアデノ40、41型が存在しており、小流行例がい

くつか報告されている。現在これら腸管アデノは乳幼児の急性胃腸炎の4~14%を占めると考えられており、ロタウイルスに次いで重要な病因ウイルスとして位置づけられている。

## II 腸管アデノウイルスの形態

アデノ粒子は径70 nm位の正20面体で、表面は252個のカプソメアで被われ(写真№1)、内部に内部タンパクと2本鎖DNAを内蔵するDNAウイルスである(図1)。カプソメアの主なものはヘクソンと呼ばれ、ウイルス粒子の面および線を形成し240個ある。さらに12個のペントンと呼ばれるカプソメアが正20面体の各頂点に介在し、ペントンはウイルス粒子内部にペントンベースと外部に突出したファイバーとからなる。アデノ40、41型は互いに中和する共通抗原を持っている。制限酵素を用いたウイルスDNAの分析によりアデノ40、41型共にゲノムの変異を示す株が報告されている。

## III 腸管アデノウイルスの疫学

1. 感染経路: ヒトからヒト、ふん便から口への感染が主経路と考えられている。さらに上気道の症状を伴うことがあり、気道感染も考慮されている。
2. 好発年齢: アデノ40、41型共に乳幼児が感染発病する。特に3歳以下が多くを占める。学童、成人、老人についてはよく分かっていない。
3. 好発時期: 腸管アデノ感染症は年間を通じて見られ、冬期から春期にやや多い。
4. 症状: 主症状は下痢で100%に認められ、

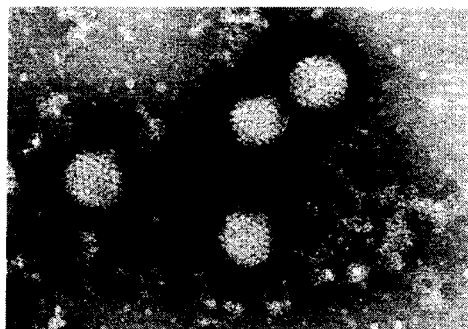


写真1. アデノウイルス41型電顕写真(12万倍)

発熱は37.5~38.9℃で約50%に見られ、39℃以上は希である。嘔吐は80%に、上気道症状は21%に伴うことがある。下痢は8~12日間位持続するのに対し、発熱、嘔吐は2日間多くが消失する。ウイルスの排泄は10~14日間位続く。

## IV 血清疫学調査成績

当部では1986年1~11月に採取した0~15歳の404名の血清について、アデノ40、41型に対する中和抗体を調べた。その成績は図2に示した。

アデノ40型に抗体を保有していたのは404名中97名(24.0%)と低く、年齢階層別に見ると、0.5~2歳では28.3%で、3~5歳は26.7%、6~10歳は22.0%と年長になるにつれ低下した。

アデノ41型に抗体を保有していたのは404名中208名(51.5%)で、0.5~2歳は34.2%、3歳以上は50%以上の保有率であった。

この成績からアデノ40型は2歳、アデノ41型は5歳までに感染するものが多いと考えられた。しかし、アデノ40、41型のどちらかの抗体価が32倍

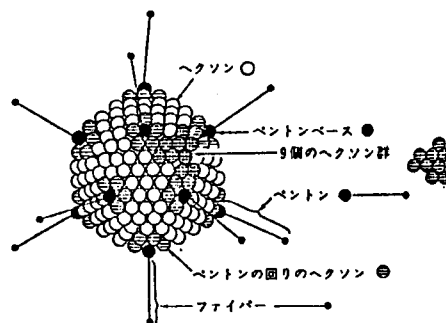


図1. アデノウイルス構造模式図

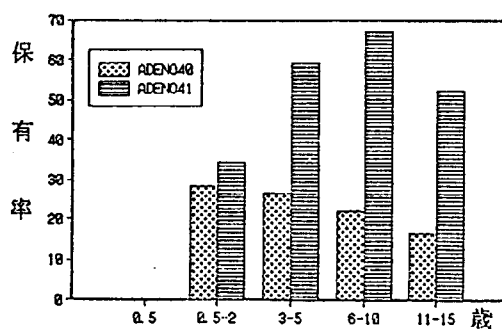


図2 アデノ40、41型に対する抗体保有状況

以上のときには両方のウイルスの抗体を保有し、どちらのウイルスに感染して獲得した抗体か、あるいは両方に感染したのか判定に困難なものも多くに見られた。いずれにしても、アデノ40型は広い小児の年齢層で、アデノ41型は乳幼児の間で胃腸疾患の流行する危険性が高いと予測される。

さらに、1986年から当部ではGraham 293細胞を用いて、急性胃腸炎患者のふん便からの腸管アデノの分離を行っており、5名からアデノ41型を分離しているが、40型ははまだ分離していない。抗体調査成績と考え合わせると、当地方ではアデノ41型がより多く分布しているように思われる。

#### V 腸管アデノウイルス感染の診断

一般的にはGraham 293細胞による分離が行われる。この方法は手間と時間を要する。そこで腸管アデノ感染の場合ウイルス粒子が大量に排泄され、多い時にはふん便1g当たり $10^{11}$ 個の粒子が存在する。したがって、ふん便材料から直接DNAの電気泳動法による泳動型を求め、それから型別を決定する方法も行われている。当部では更に簡便な方法として、アデノ40、41型に対する型特異

モノクローナル抗体を作製し、酵素抗体法でふん便から直接型別を行う方法の確立に努めており、近いうちに日常の検査に用いることが出来るであろう。

また、血清学的診断としてペア血清による中和抗体の測定も行われる。

#### VI おわりに

腸管アデノはやっと培養が出来るようになったところで、ウイルスの性状を始め不明な点が多く、今後の研究が強く望まれており、当部でもこれらの解明に努めて行きたいと考えている。

(ウイルス部 西尾 治)

## 愛知衛研技術情報目次 (VOL. 11 No. 1~4)

No.	頁	記 事	執 筆 者 名
1	1	サルモネラO8群の血清型別について	細菌部 斎藤 眞
	3	シロアリ防除剤クロルデン(1)	食品薬品部 斎藤 勲
	5	水道水水質基準に未規制の物質について - 飲料水の安全性とWHO飲料水水質ガイドラインの関係 -	生活環境部 茶谷邦男 青山 幹
2	1	新しい検査法 - AIDS抗体測定法のなかのWestern Blot法とゼラチン凝集法について -	ウイルス部 三宅恭司
	5	病理学のすすめ(VII) - 病理組織標本の見方4 -	生物部 伊藤正夫
	8	愛知衛研技術情報総目次(VOL. 6~10)	
3	1	細菌によるバイオハザードとその対策(1)	細菌部 船橋 満
	4	シロアリ防除剤クロルデン(2)	食品薬品部 斎藤 勲
4	1	結核・感染症サーベイランスの共通ティプルファイルの利用法	ウイルス部 清水通彦
	6	水のpH値測定 - 比色法と電極法のpH値の比較および電極法での留意点 -	生活環境部 富田伴一