

愛知県衛生研究所報

第 68 号 平成 30 年 3 月

目 次

調査研究

感染症発生動向調査により把握された愛知県における性感染症の現状 垣添寛和、中村瑞那、長瀬智哉、鈴木裕子、皆川洋子	1
麻疹・風疹疑い患者検体から検出されるパルボウイルス B19 安達啓一、尾内彩乃、齋藤友睦、廣瀬絵美、中村範子、 齋藤典子、伊藤 雅、安井善宏、松本昌門、皆川洋子	11
食中毒事例から検出された遺伝子組換え型ノロウイルスの解析 -2016/17 シーズン- 秦 眞美、中村範子、小林慎一 ¹ 、尾内彩乃、齋藤友睦、廣瀬絵美、安達啓一、 齋藤典子、伊藤 雅、安井善宏、松本昌門、皆川洋子 ¹ (現所属)一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センター	17
2007 年から 2015 年に愛知県の食品取扱者より分離されたサルモネラ属菌の 血清型別及びβ-ラクタマーゼ遺伝子保有状況 山田和弘、四本信輔、中根衣久美、青木美耶子、白鳥浩美、平山達也、小林慎一 ¹ 、 菅沼啓之助 ¹ 、北島直美 ¹ 、鈴木匡弘 ² 、松本昌門、皆川洋子 ¹ 一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センター ² (現所属)藤田保健衛生大学医学部微生物学講座	26
豚組織中のアセトアミノフェン残留分析法の検討 堀田沙希、後藤智美、市川義多加、猪飼誉友、渡邊美奈恵、小池恭子	33
固相抽出-GC/MS 法による水中のかび臭分析法の検討 服部靖子、加藤千佳、猪飼誉友、富田浩嗣、棚橋高志、小池恭子	41
他誌掲載論文抄録	49

Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health
(Aichi-ken Eisei Kenkyusyoho)

Volume 68, March 2018

Contents

Original Papers

Current situations of sexually transmitted diseases in Aichi Prefecture based on the data obtained from National Epidemiologic Surveillance of Infectious Disease (NESID) system	1
Hirokazu Kakizoe, Mizuna Nakamura, Tomoya Nagase, Hiroko Suzuki, Hiroko Minagawa	
Human Parvovirus B19 in patients suspected of having measles and rubella	11
Hirokazu Adachi, Ayano Onouchi, Tomochika Saito, Emi Hirose, Noriko Nakamura, Noriko Saito, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Masakado Matsumoto, Hiroko Minagawa	
Norovirus recombinant strains detected from foodborne outbreaks during the 2016-17 season in Aichi Prefecture	17
Mami Hata, Noriko Nakamura, Shinichi Kobayashi ¹ , Ayano Onouchi, Tomochika Saito, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Noriko Saito, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Masakado Matsumoto, Hiroko Minagawa ¹ Present affiliation: Aichi Food Hygiene Center	
Serotype and β -lactamase gene distribution of <i>Salmonella</i> isolated from food handlers between 2007 and 2015 in Aichi Prefecture, Japan	26
Kazuhiro Yamada, Shinsuke Yotsumoto, Ikumi Nakane, Miyako Aoki, Hiromi Shiratori, Tatsuya Hirayama, Shinichi Kobayashi ¹ , Keinosuke Suganuma ¹ , Naomi Kitajima ¹ , Masahiro Suzuki ² , Masakado Matsumoto, Hiroko Minagawa ¹ Aichi Food Hygiene Center ² Present affiliation: Department of Microbiology, Fujita Health University	
Determination of acetaminophen residues in swine tissues	33
Saki Hotta, Tomomi Goto, Yoshitaka Ichikawa, Yoshitomo Ikai, Minae Watanabe, Yasuko Koike	
Examination of the analysis of musty odor substances in water by solid-phase extraction gas chromatography mass spectrometry (SPE-GC/MS)	41
Yasuko Hattori, Chika Katou, Yoshitomo Ikai, Kouji Tomita, Takashi Tanahashi, Yasuko Koike	
Summaries of papers accepted to other journals	49

調 査 研 究

感染症発生動向調査により把握された 愛知県における性感染症の現状

垣添寛和、中村瑞那、長瀬智哉、鈴木裕子、皆川洋子

要 旨

感染症発生動向調査で把握される性感染症のうち全数把握対象となっている梅毒は、近年全国的に報告数が増加している。愛知県における梅毒の報告状況を解析したところ、2014年以降増加しており、男では40-44歳、女では20-24歳で報告数が多かった。そのうち2015年以降の増加は男女とも異性間性的接触によるものであった。年齢階級別に人口あたり届出患者数（人口調整数）を算出したところ、男で2017年に最も多かった年齢階級は25-29歳となり、調整前の報告数とは違いが認められた。本県における定点把握対象4疾患（性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ及び淋菌感染症）については、男女別年齢階級の解析において人口調整数を用いると、調整前の報告数とは異なるパターンを示す疾患が認められた。定点把握疾病の発生動向についても人口調整数活用の有用性が示唆され、感染予防を重点的に呼びかける対象集団の選定など性感染症対策立案にあたり有用な情報提供につながると考えられた。

キーワード：人口調整数、梅毒、性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ、淋菌感染症

序 文

わが国における性感染症の把握は、花柳病予防法を前身として1948年に施行された性病予防法により梅毒、りん病、軟性下かん、そけいりんば肉芽しゅ症が届出対象とされていたが、1999年4月からは、伝染病予防法、性病予防法、及び後天性免疫不全症候群の予防に関する法律を廃止して施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（以下、感染症法）に基づく「感染症発生動向調査事業」¹⁾のなかで実施されている。同事業は、1981年7月に18疾病を対象として開始され、「感染症の発生情報の正確な把握と分析、その結果の国民や医療関係者への迅速な提供・

公開により、感染症に対する有効かつ的確な予防・診断・治療に係る対策を図り、多様な感染症の発生及びまん延を防止するとともに、病原体情報を収集、分析することで、流行している病原体の検出状況及び特性を確認し、適切な感染症対策を立案する」ことを目的としている。2018年1月現在、診断した全ての医師が届け出を行う疾患（以下、全数把握疾患）は86疾患、定点に指定された医療機関の管理者が届け出を行う疾患（以下、定点把握疾患）は27疾患が指定され、報告は保健所を通じて感染症サーベイランスシステム（NESID）により行われている。愛知県衛生研究所には、県の基幹地方感染症情報センターが設置されてお

り、独自の保健所を設置する名古屋市、豊橋市、岡崎市、豊田市を含む全県（2017年10月1日現在の推計人口752万6911人）の感染症発生動向に関する情報提供に努めている。

性的接触により感染する疾患は多数あるが、「性感染症に関する特定感染症予防指針」²⁾では感染症発生動向調査事業の対象疾患ともなっている、性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ、梅毒及び淋菌感染症を性感染症としている。このうち梅毒は全数把握疾患、他の4疾患が定点把握疾患（以下、定点把握4疾患）に指定されている。

2010年以降、梅毒の報告数が全国的に増加しており³⁾、中でも若年女性における増加が懸念されている。そこで、愛知県内における梅毒及び定点把握4疾患の報告状況を、2006年以降のNESIDデータを用いて解析した。

年齢性別報告数の推移を検討するにあたり、各年齢階級別人口変動の影響を考慮した調整⁴⁾⁵⁾手法を活用した。本報では、梅

毒及び定点把握4疾患の各年齢階級における報告数を人口で調整した値について、男女別疾患別に年齢階級間及び年次推移を可視化し、人口調整前データとの比較検討を含む解析を行った。

資料と方法

梅毒はNESIDに登録された診断日を基準として、2006年から2017年に愛知県で診断及び届出のあった確定例を2018年1月5日に抽出した。なお、2006年のNESID全数データ収集対象は第13週以降となっているため、報告数の年次比較を行う際は2006年を対象から除外した。定点把握4疾患は、2006年から2016年の愛知県内定点医療機関からの報告数を2017年11月15日にNESIDから抽出した。調整に用いる人口データには人口動態統計⁶⁾⁻⁸⁾による各年10月1日現在の人口を用いた。男女別の各年齢階級における報告数を該当する年齢階級の人口で除し、100,000を乗じた値を人口調整数と定義した。

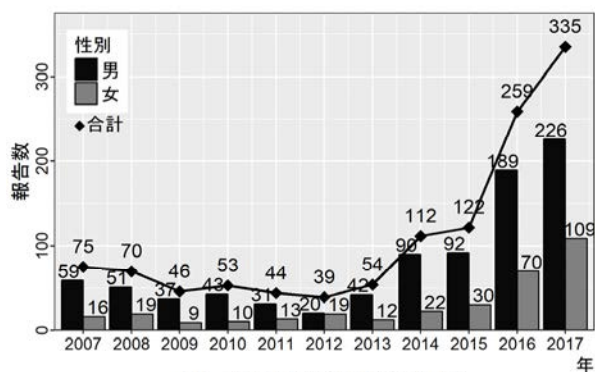


図1 梅毒報告数推移(愛知県)

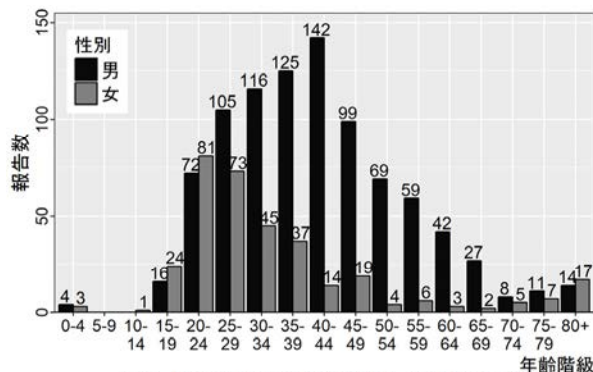


図2 梅毒累積報告数(愛知県・2006-2017)

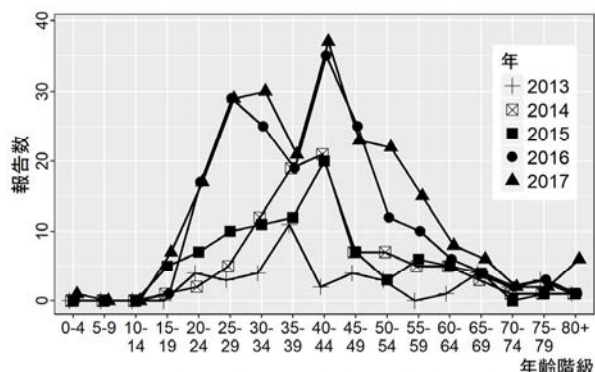


図3-1 梅毒報告数推移(愛知県・男)

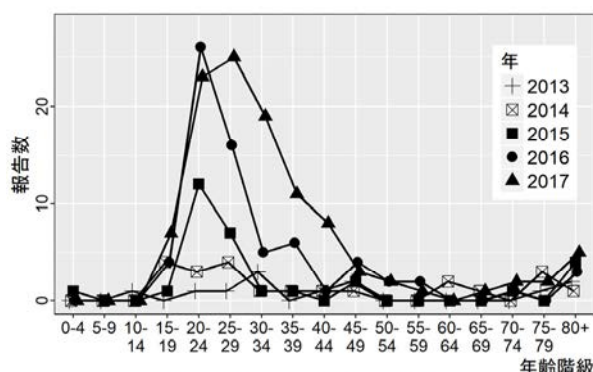


図3-2 梅毒報告数推移(愛知県・女)

結 果

1 梅毒

(1) 報告数等推移

本県における梅毒報告数は、2007年から2013年の平均が約50件であったが、2014年に112件と2倍以上に増加し、その後も増加傾向が続いている。2016年の報告数は259件(男189件、女70件)、2017年は335件(男226件、女109件)であった(図1)。2006年第13週以降の累積報告数における男の割合は72.7%であったが、2014年の80.4%以降、2015年から2017年にかけて75.4%、73.0%、67.5%と経年的に減少していた。

2007年以降、前年と比較して報告数が2倍以上の増加は、男では2013年(20→42)、2014年(42→90)、2016年(92→189)の計3回観察され、いずれも2.1倍に増加していた。また、女では2016年に2.3倍に増加していた(30→70)。累積報告数は、男で40-44歳が、女で20-24歳が最も多かった(図2)。

2013年から2017年の年齢階級別報告数を男女別に比較した。男では2013年は35-39歳が最も多かったが、2014年以降は40-

44歳が最も多かった。2016年から2017年にかけては、40-44歳に加えて20-34歳でも報告が増加し、2017年は25-34歳と40-44歳をピークとする二峰性となった(図3-1)。女では2015年から2016年にかけて20-24歳を中心とする年齢階級で増加したが、2017年に最も多かったのは25-29歳であった。また、30-34歳及び40-44歳も前年に比べて2倍以上に増加していた(図3-2)。

病型別で割合が高いのは、男は早期顕症(計68.0%)、女は無症候(54.7%)であり、男女間で病型に違いが認められた(図4)。なお、本県において先天梅毒は2006年第13週以降、計7例報告されている(2006、2008、2015、2017年各1例、2007年3例)。

病型別の年次推移は、男では2006年から2010年にかけて早期顕症の割合が減少し、無症候の割合が増加したが、2012年以降早期顕症の割合が増加に転じた(図5-1)。女は2006年から2010年までは早期顕症と無症候が同程度であったが、2011年に無症候の割合が90%を超え、その後は2016年を除き無症候が高い割合を占めていた(図5-2)。

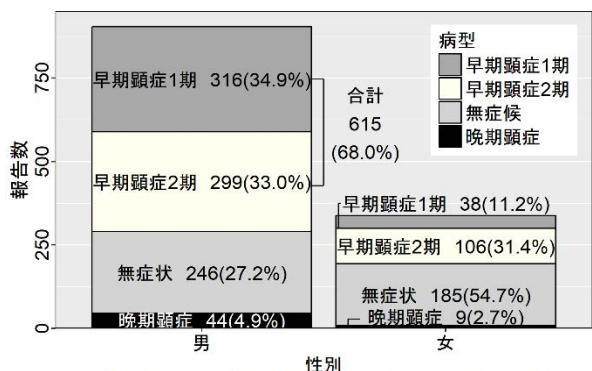


図4 梅毒病型別累積報告数(愛知県・2006-2017)

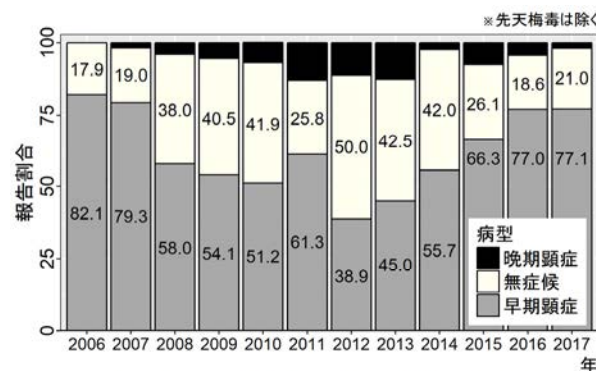


図5-1 梅毒病型別報告割合推移(愛知県・男)

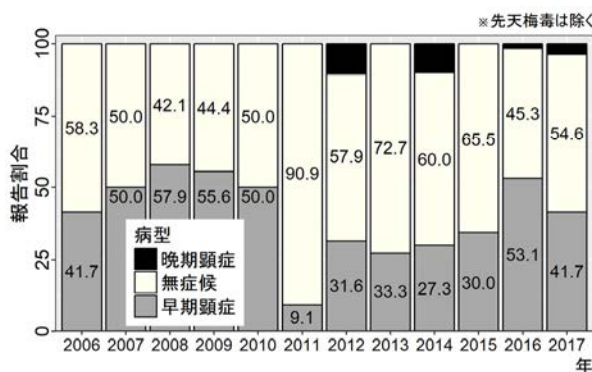


図5-2 梅毒病型別報告割合推移(愛知県・女)

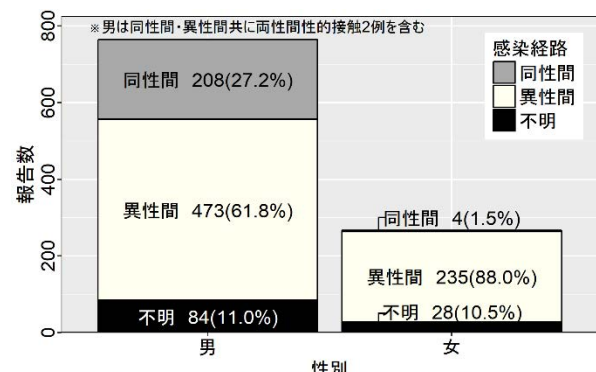


図6-1 梅毒感染経路別累積報告数(愛知県・2006-2017)

性的接触により感染した例として報告された1,032例について感染経路別に見ると、男女とも最も多いのは異性間性的接触であり、男で61.8%、女では88.0%であった。また、男では同性間性的接触が27.2%を占めた(図6-1)。

男の同性間性的接触は、2014年に報告数が急増した(9→47)が、2017年には前年の約57%(56→32)に減少した。2014年に特に増加したのは30代と40代で、合計の増加割合は9.3倍(4→37)であった。2015年から2016年は30代が減少し20代の割合が増加した。2017年は20代から40代の報告数がいずれも30%前後であった(図6-2)。

男の異性間性的接触は、2016年に報告数が急増した(28→94)が、特定の年齢階級

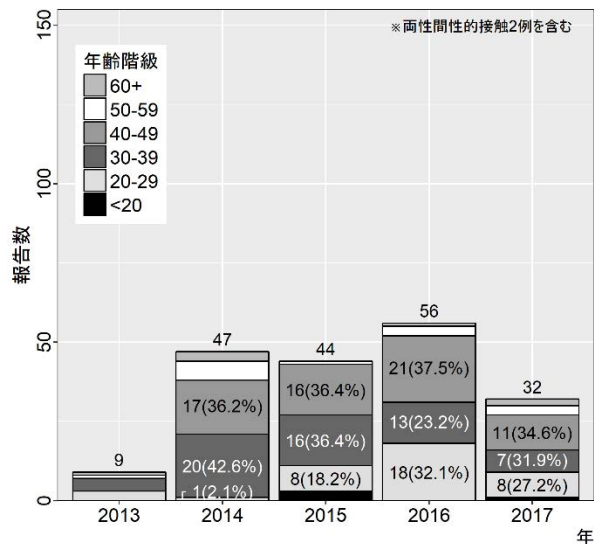


図6-2 梅毒年齢階級別報告数推移 (愛知県・男・同性間性的接触)

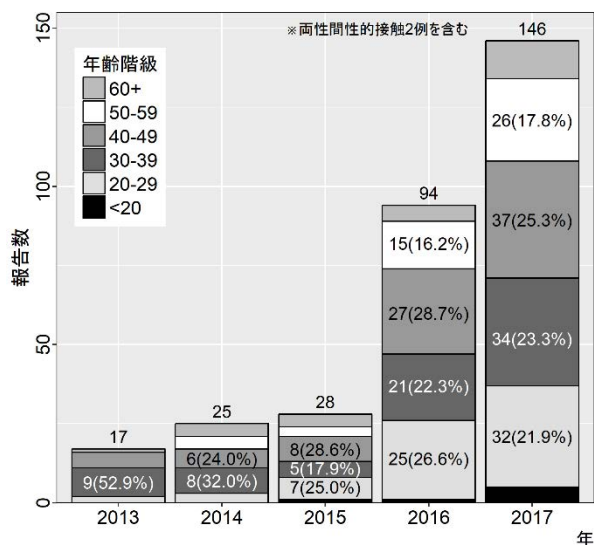


図6-3 梅毒年齢階級別報告数推移 (愛知県・男・異性間性的接触)

での増加は認められなかった。各年齢階級の割合は2017年においても2016年と同様であった(図6-3)。

女では、男の異性間性的接触と同様に2016年に報告数が増加した(30→70)。各年代の増加割合は、20代が2.2倍(19→42)、30代が5.5倍(2→11)、40代が2.5倍(2→5)であった。2016年に年齢階級別で最も割合が高かったのは20代で60.0%であった。2017年は20代の割合が44.0%に減少し、30代、40代及び60歳以上で増加していた(図6-4)。

(2)人口調整数による比較

2013年から2017年における梅毒の報告状況を実数と人口調整数で比較した。2017年の男は実数では40-44歳が最も多かったが、人口調整数では25-29歳及び30-34歳の報告数が40-44歳を上回り、最も多かったのは25-29歳であった(図7-1)。女は実数と人口調整数で明らかな違いは認められなかった(図7-2)。

2 定点把握4疾患

(1)報告数等推移

男における定点把握4疾患は性器クラミジア感染症、淋菌感染症の順に多く、4疾患とも2006年から2016年にかけて減少傾向だった(図8-1)。これに対し、女では性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症の順に多く、2006年から2008年にかけて4疾患とも増加傾向であった。

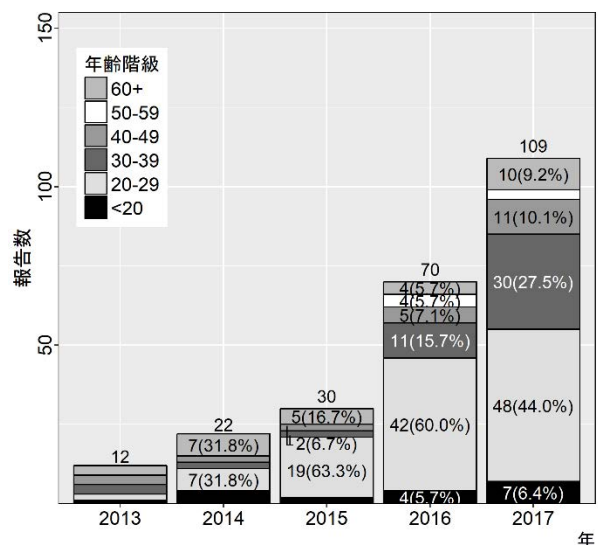


図6-4 梅毒年齢階級別報告数推移 (愛知県・女)

2008年以降は性器クラミジア感染症が減少傾向、他の3疾患は横ばいであった(図8-2)。

(2) 女における性器クラミジア感染症及び性器ヘルペスウイルス感染症の増加

性感染症定点の設定にあたっては、感染症発生動向調査事業実施要綱¹⁾により「産婦人科、産科若しくは婦人科(産婦人科系)、医療法施行令(昭和23年政令第326号)第3条の2第1項第2号ハ及びニ(2)の規定に

より性感染症と組み合わせた名称を診療科名とする診療科、泌尿器科又は皮膚科を標榜する医療機関(主として各々の標榜科の医療を提供しているもの)を性感染症定点として指定すること」とされている。本県においては、産婦人科、産科若しくは婦人科を標榜する医療機関(以下、産婦人科系定点)に比べて泌尿器科又は皮膚科を標榜する医療機関(以下、皮膚泌尿器科系定点)

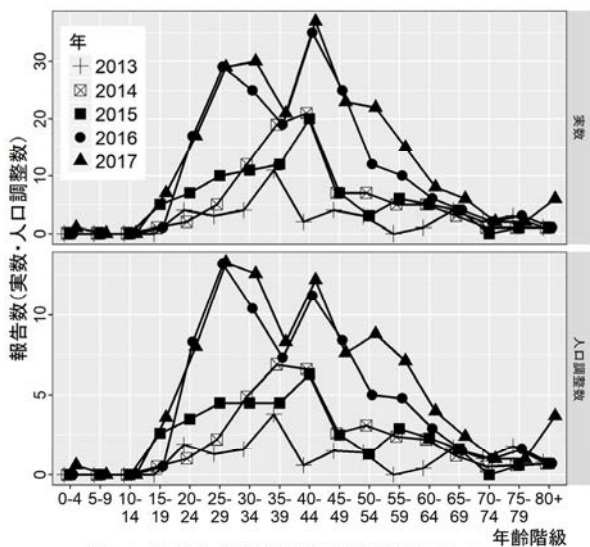


図7-1 梅毒年齢階級別報告数推移(愛知県・男)

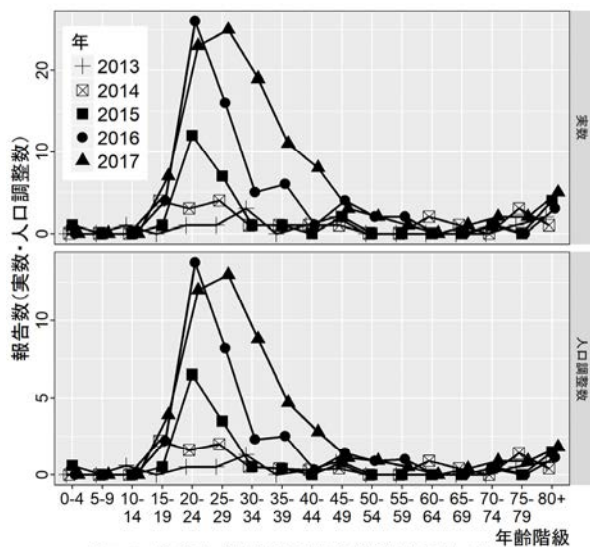


図7-2 梅毒年齢階級別報告数推移(愛知県・女)

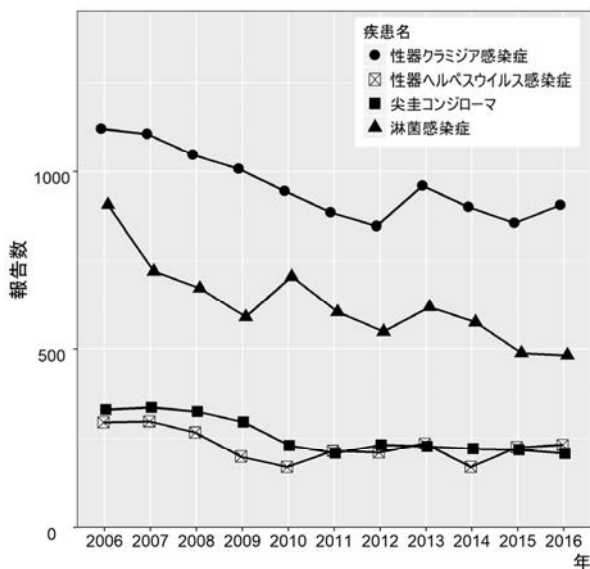


図8-1 定点把握4疾患報告数推移(愛知県・男)

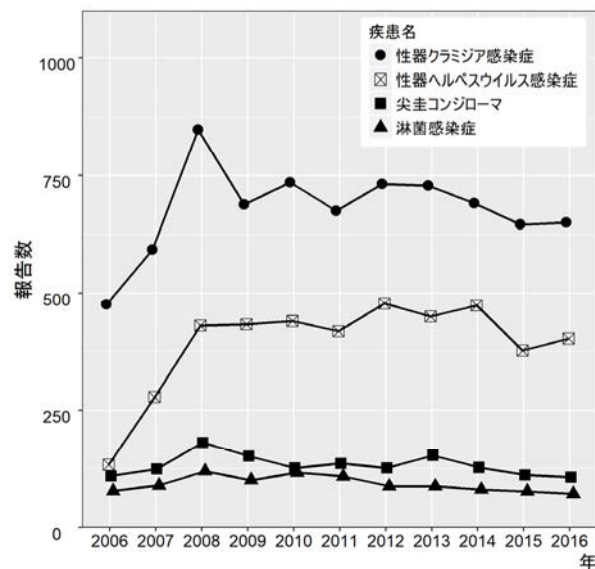


図8-2 定点把握4疾患報告数推移(愛知県・女)

表1 愛知県における標榜科別性感染症定点の延べ定点数推移(2006-2016)

標榜科	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
産婦人科系	203	272	312	308	310	312	312	312	312	312	312
皮膚泌尿器科系	488	463	453	456	456	456	456	456	466	468	468

延べ定点数は各月の定点医療機関数の和

の割合が高かったことから、2007年から定点の見直しが行われた。見直しに伴う定点内訳の推移は表1のとおりであり、この見直しにより、2006年から2008年の間に産婦人科系定点の割合が増加した。

報告数が多い性器クラミジア感染症及び性器ヘルペスウイルス感染症の2疾患を対象として、本県における2006年から2008年にかけての女の定点把握4疾患の報告数増加について、標榜科毎に報告数と定点数の比較により定点見直しの影響を解析した。

2006年から2010年の報告を産婦人科系定点からの報告と皮膚泌尿器科系定点からの報告に分類し、それぞれ延べ定点数と報告数を四半期毎に比較した。四半期単位の延べ定点数が10%程度以上変動したのは、産婦人科系定点では2006年、2007年、2008年のいずれも第1四半期から第2四半期の計

3回、皮膚泌尿器科系定点では2007年第1四半期から第2四半期の1回であった(図9-1、9-2)。

産婦人科系定点では、定点数の増加時期に2疾患とも報告数が増加していたが、2007年の性器ヘルペスウイルス感染症報告数の増加割合(5.1倍)は、定点数の増加割合(1.3倍)を大幅に超えていた。皮膚泌尿器科系定点では、性器ヘルペスウイルス感染症で定点数が減少したにもかかわらず報告数が増加していた(3.1倍)。増加の割合について延べ定点数と報告数を用いて適合度検定を行った結果は表2のとおりであり、産婦人科系定点では2007年と2008年の両疾患、皮膚泌尿器科系定点では性器ヘルペスウイルス感染症で有意な差が認められた。以上から、これらの時期における報告総数は、婦人科系定点割合の増加に加え、

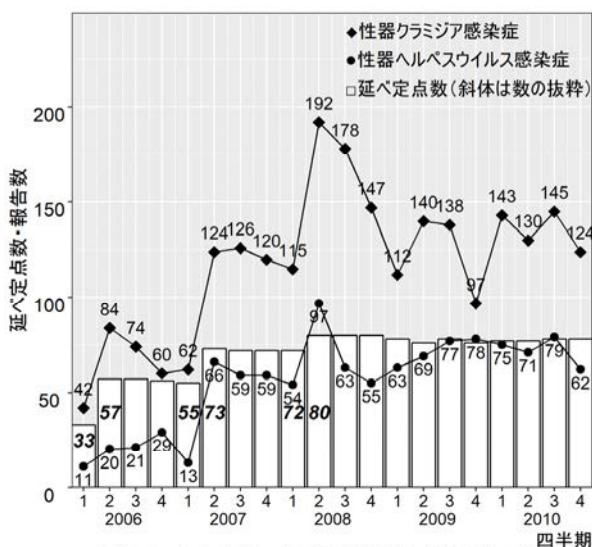


図9-1 定点把握4疾患報告数と延べ定点数の推移 (愛知県・女・産婦人科系定点)

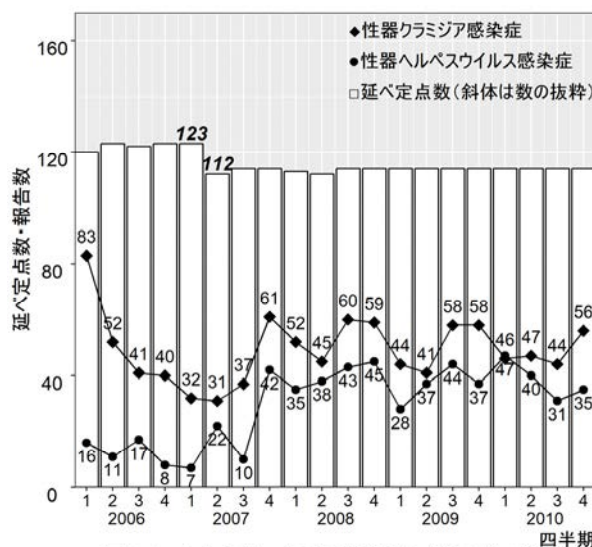


図9-2 定点把握4疾患報告数と延べ定点数の推移 (愛知県・女・皮膚泌尿器科系定点)

表2 愛知県における産婦人科系定点及び皮膚泌尿器科系定点の定点数と報告数の推移 (抜粋)

標榜科	年	定点数推移 (増加割合)	報告数推移 (増加割合)	
			性器クラミジア感染症	性器ヘルペスウイルス感染症
産婦人科系	2006	33→ 57 (1.7)	42→ 84 (2.0)	11→20 (1.8)
	2007	55→ 73 (1.3)	62→124 (2.0) **	13→66 (5.1) **
	2008	72→ 80 (1.1)	115→192 (1.7) **	54→97 (1.8) **
皮膚泌尿器科系	2006	123→112 (0.9)	32→ 31 (1.0)	7→22 (3.1) **

適合度検定 ** : p<0.01

一定点あたり報告数も増加していた。

(3)人口調整数による比較

定点把握4疾患について人口調整数により疾患別・男女別に報告数を比較したところ、以下の特徴がみられた。

性器クラミジア感染症は、2008年は男30-34歳、女25-29歳が最多だったが、人口調整数ではそれぞれ最大の年齢階級が25-29歳と20-24歳であった。また、男の報告数は2008年から2012年にかけて25-39歳の年齢階級で減少しているが、人口調整数では報告数ほどの減少傾向は見られなかった(図10-1、10-2)。

性器ヘルペスウイルス感染症は、男における2008年の報告数が30-34歳が最多であったが、人口調整数では40-44歳も同程度であった。また、2016年の人口調整数では55-59歳の年齢階級が30-34歳、25-29歳

に次いで高く、この年代でも罹患率が高いことが示唆された(図10-3)。女では、2008年から2016年にかけて、報告数は20代で減少し40代で増加していたが、人口調整数では40代で2008年から2012年にかけて増加した後、2016年に減少していた(図10-4)。

考 察

梅毒は1948年に性病予防法で全数報告を求める届出対象疾患⁹⁾、1999年4月からは感染症法に基づく全数把握疾患として、診断した医師に届出が義務付けられている。

届出制度の変更に留意する必要があるが、患者報告数は1948年以降大きく減少した。その後、全国的には1999年から2012年にかけて500-900例で推移していたが、2013年に1200例を超え、その後も増加が続いている⁹⁾。本県では全国に1年遅れて2014年か

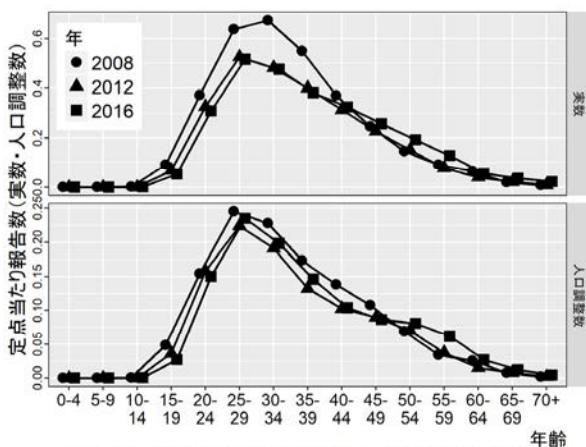


図10-1 性器クラミジア感染症年齢階級別報告数推移 (愛知県・男)

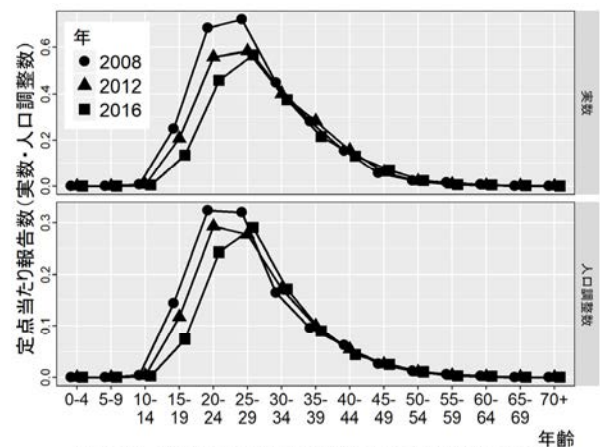


図10-2 性器クラミジア感染症年齢階級別報告数推移 (愛知県・女)

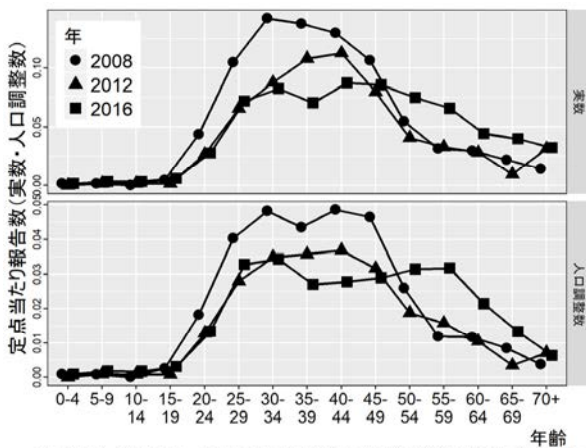


図10-3 性器ヘルペスウイルス感染症年齢階級別報告数推移 (愛知県・男)

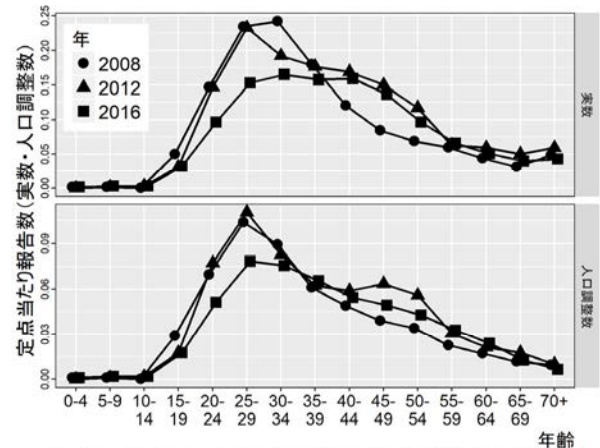


図10-4 性器ヘルペスウイルス感染症年齢階級別報告数推移 (愛知県・女)

ら増加している。

2014年以降、本県における性別梅毒報告数が前年の2倍以上に増加したのは、男では①2014年、②2016年、女では③2016年の計3回であった。年齢階級別及び感染経路別情報を併せた解析から、①は30代から40代の同性間性的接触による感染者の増加が主体であったが、②は異性間性的接触によるものであり、20代から50代にかけて増加していた。2017年の年齢階級割合も2016年とほぼ同様であり、男では2016年以降、20代から50代の各年齢階級で全体的に感染が拡大していた。③の女における2016年の倍増は前年に既に60%以上を占めていた20代の感染者数が更に増加したことが主な理由であるが、30代以上の年代でも増加していた。2015年から2016年にかけて60%以上だった20代の占める割合は、2017年には44.0%まで低下し、代わりに30代以上の年齢階級で報告が増加していた。また、報告全体に占める女の割合も2015年以降上昇傾向にある。

梅毒は近年、欧米先進国からも増加が報告されているが¹⁰⁾、米国疾病予防管理センター(Centers for Disease Control and Prevention: CDC)によると、米国で梅毒感染者が増加しているのは男性と性交をする男性(men who have sex with men: MSM)であり、女では減少傾向にある¹¹⁾。英国¹²⁾やカナダ¹³⁾、欧州連合(European Union: EU)圏内¹⁴⁾でも同様にMSM間での増加が報告されている。

本県における報告数の増加は、2013年から2014年にかけては男性の同性間性的接触によるものであったが、その後は男女とも異性間性的接触による感染者増加がみられており、MSMが増加の中心である欧米諸国とは傾向が異なっていた。なお、全国的にも2012年以降、男性において異性間性的接触による感染が増加している⁹⁾。

性感染症対策立案にあたっては、り患率の高い集団(性別・年齢別・感染経路別)の把握が重要であり、患者報告状況を比較する際に人口調整数の活用が適切と考えられた。本県の2017年における梅毒の男性年

齢階級別報告数は①40-44歳、②30-34歳、③25-29歳の順であったが、人口調整数では①25-29歳、②30-34歳、③40-44歳の順となった。全国の梅毒患者報告数は、男性では40代を中心とした幅広い年代で、女性では20代を中心に増加³⁾とされているが、本県において人口あたり報告数が多いのは、男女とも20代であることが明らかとなった。

定点把握4疾患は2008年以降、いずれも減少傾向であった。また、定点の見直し時期である2006年から2008年にかけて4疾患ともに増加していたが、標榜科毎に定点数と報告数の関係を解析した結果、報告数の増加は定点割合の変更に加えて一定点あたり患者報告数の増加によるものと考えられた。因みに全国の性器クラミジア感染症は、現行の定点把握が開始された2000年以降定点数の増加を上回る報告数の増加傾向が報告された¹⁵⁾。

CDCによると、米国における性器クラミジア感染症は2000年以降、男女ともゆるやかな増加傾向が続いており、さらに2000年以降概ね横ばいを示していた淋菌感染症は、2013年以降男女とも増加している¹¹⁾。これに対し、本県においては2008年以降、定点把握4疾患は男女とも増加しておらず、米国とは傾向が異なっていた。

梅毒と同様に定点把握4疾患を報告数の実数と人口調整数により比較したところ、年齢階級別分布や傾向の違いがいくつか認められ、定点把握疾患についても人口調整数を用いることの有用性が示唆された。

梅毒をはじめとする性感染症の拡大を防止し、り患率低下を図るためには、実際に感染が拡大している集団(性・年齢階級・性的指向等)に届く対策(啓発・検査機会及び医療アクセスの提供等)を講じる必要があるが、NESIDで把握される感染者は医療機関を受診し届け出られた人に限定され、実際の感染者集団と必ずしも一致しないことは踏まえつつ、今後も基幹地方感染症情報センターの立場で、報告数データ解析手法の検討等を通じて、重点的に対策を届けるべき集団の把握、ひいては性感染症り患

率低下や先天感染発生予防対策につながる情報発信に努めたい。

文 献

- 1) 厚生労働省：感染症発生動向調査事業実施要綱，平成 30 年 1 月 1 日最終改正
- 2) 厚生労働省：性感染症に関する特定感染症予防指針，平成 30 年 1 月 18 日最終改正
- 3) 国立感染症研究所：梅毒 2016 年第 1～47 週までの疫学的特徴，感染症発生動向調査週報 (IDWR) 2016 年第 48 週 (11 月 28 日～12 月 4 日)：8-9，<https://www0.niid.go.jp/niid/idsc/idwr/IDWR2016/idwr2016-48.pdf>
- 4) 山岸拓也、加納和彦、砂川富正、大石和徳、谷畑健生、岡部信彦：性感染症定点把握 4 疾患における年齢階級別の疾患負荷と発生率の推移．病原微生物検出情報 (IASR) 34(9)：271-273，2013
- 5) 村上邦仁子、小林信之、新開敬行、カエベタ亜矢、杉下由行、錦 信吾、有馬雄三、大西 真：東京都における梅毒の届出状況．病原微生物検出情報 (IASR) 38(3)：62-64，2017
- 6) 愛知県県民生活部統計課：愛知県統計年鑑 (平成 21 年度版、平成 25 年度版～28 年度版) 2-3 年齢・男女別人口 <http://www.pref.aichi.jp/toukei/jyoho/nhistory.html>
- 7) 愛知県県民生活部統計課：平成 27 年国勢調査人口等基本集計結果 第 3 表 <http://www.pref.aichi.jp/soshiki/toukei/kokuchou2015.html>
- 8) 愛知県県民生活部統計課：県及び市町村別男女別年齢別推計人口 (平成 28 年 10 月 1 日現在及び平成 29 年 10 月 1 日現在) <http://www.pref.aichi.jp/soshiki/toukei/0000088836.html>
- 9) 国立感染症研究所：＜特集＞梅毒 2008～2014 年，病原微生物検出情報 (IASR) 36(2)：1-3，<http://www0.nih.go.jp/niid/idsc/iasr/36/420j.pdf>
- 10) 高橋琢理、山岸拓也、有馬雄三、砂川富正：近年の梅毒の国外動向．病原微生物検出情報 (IASR) 36(2)：24-26，2015
- 11) Center of Disease Control and prevention：Sexually Transmitted Disease Surveillance 2016，https://www.cdc.gov/std/stats16/CDC_2016_STD_Report-for508WebSep21_2017_1644.pdf
- 12) Public Health England：Sexually Transmitted Infections and Chlamydia Screening in England，2016 https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/617025/Health_Protection_Report_STIs_NC_SP_2017.pdf
- 13) Public Health Agency of Canada：Report on Sexually Transmitted Infections in Canada:2013-2014 <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/diseases-conditions/report-sexually-transmitted-infections-canada-2013-14.html>
- 14) European centre for Disease Prevention and Control:Syphilis - Annual Epidemiological Report for 2015 https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2015-syphilis.pdf
- 15) 萩原敏且：性器クラミジア感染症とは，<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/423-chlamydia-std-intro.html>

Current situations of sexually transmitted diseases in Aichi Prefecture based on the data obtained from National Epidemiologic Surveillance of Infectious Disease (NESID) system

Hirokazu Kakizoe, Mizuna Nakamura, Tomoya Nagase, Hiroko Suzuki, Hiroko Minagawa

Syphilis is one of the major sexually transmitted diseases (STDs) and classified as a notifiable disease on the National Epidemiologic Surveillance of Infectious Disease (NESID) system. Since 2011, the number of notified syphilis cases has been rising in Japan, therefore we analyzed recent situation of notified syphilis in Aichi Prefecture. The annual number of notified syphilis cases in Aichi Prefecture is on the rise since 2014 and the largest proportion of age group is 40-44 years in male and aged 20-24 years in female. Since 2015 heterosexual transmission in both male and female considerably increased. Analysis by using age-group based, population-adjusted case numbers showed that the age group of 25-29 years was highest in population-adjusted numbers in male, which was different from notified case analysis. Furthermore, age and sex group based population-adjusted case number distribution was compared with the raw report numbers for the 4 STDs (genital chlamydial infection, genital herpes, condyloma acuminatum, and gonorrhea) reported by the sexually transmitted infections sentinel sites (STI sentinel sites), resulting in different patterns for genital chlamydial infection and genital herpes. These results indicate that applying population-adjusted numbers to the analysis of STI trends is useful both for notified syphilis cases and 4 sentinel STDs, and further implies that the analyses using population-adjusted numbers may reveal the most important target population groups to be advised for STI countermeasures by public health department of a local government.

Key words : population-adjusted numbers, syphilis, genital chlamydial infection, genital herpes, condyloma acuminatum, gonorrhea

調 査 研 究

麻疹・風疹疑い患者検体から検出されるパルボウイルス B19

安達啓一、尾内彩乃、齋藤友睦、廣瀬絵美、中村範子、
齋藤典子、伊藤 雅、安井善宏、松本昌門、皆川洋子

要 旨

パルボウイルス B19 (Human Parvovirus B19: B19V) は、麻疹及び風疹と鑑別診断を要する発疹症として知られる伝染性紅斑の病原体である。麻疹・風疹が疑われる症例への B19V 感染症の紛れ込みの検証は、麻疹排除状態の維持及び風疹の排除達成の上で不可欠である。そこで、麻疹・風疹疑い患者 461 例のうち麻疹ウイルス・風疹ウイルスとも陰性の 330 例について、B19V 遺伝子の検出を実施し、麻疹・風疹疑い症例への B19V 感染症の紛れ込み実態を検討した。その結果、麻疹・風疹への紛れ込みと考えられる B19V 陽性症例は 32 件のほり、麻疹・風疹疑い患者の 6.7% を占めた。今後も B19V をはじめとする紛れ込み症例の検証が重要である。

キーワード： パルボウイルス B19、伝染性紅斑、サーベイランス、麻疹、風疹

序 文

パルボウイルス B19 (Human Parvovirus B19: B19V) はパルボウイルス科エリスロパルボウイルス属に分類され、伝染性紅斑の病原体として知られている。エンベロープをもたず、その遺伝子は約 5.6 kb の一本鎖 DNA である^{1), 2)}。B19V は赤芽球前駆細胞等、分裂が盛んな細胞に感染するため、伝染性紅斑以外にも溶血性貧血患者に重症骨髄無形性クリーゼ (aplastic crisis) を誘発するほか、胎児水腫の原因ともなる^{2), 3), 4)}。主な感染経路はエアロゾルを介した呼吸器感染であるが、血液や血液製剤を介した感染及び母子感染もみられる。抗体保有率は年齢とともに上昇し、成人では 40~80% が抗体陽性である²⁾。

伝染性紅斑は、臨床症状や季節性において麻疹及び風疹と鑑別診断を要する^{2), 5)}。麻疹・風疹が疑われる症例中への B19V 等の紛れ込みの検証は、世界保健機関西太平洋

事務局 (WPRO) により 2015 年 3 月に認定された麻疹排除状態の維持、及び 2020 年達成を目標としている風疹の排除⁶⁾を目指すとき不可欠である。また流行に伴う B19V 陽性例紛れ込みの消長を把握することも排除状態の維持に有用な情報を提供する。

本研究は、麻疹・風疹疑いで当所に搬入されたが麻疹及び風疹感染を否定された患者検体について PCR 法を用いて B19V 遺伝子検出を試み、B19V 感染症の紛れ込み実態を明らかにすることを目的として実施した。

材料と方法

1. 検体

2010 年 8 月~2017 年 7 月に積極的疫学調査若しくは感染症発生動向調査の一環として当所に搬入された麻疹・風疹疑い患者検体 461 名分 1226 件のうち、麻疹ウイルス (Measles Virus; MeV) ・風疹ウイルス (Rubella virus; RUBV) とも検出されな

かった 330 名 859 件（血液 317 件、咽頭ぬぐい液 305 件、尿 234 件、唾液 2 件、結膜ぬぐい液 1 件）を用いた。

2. B19V 遺伝子検出

検体または Veal infusion broth にて乳剤にした検体 200 μ L から High Pure Viral RNA Kit (Roche, Switzerland) を用いて最終溶出量 50 μ L でウイルス遺伝子を抽出し、Salimans et al.⁷⁾ または Candotti et al.⁸⁾ の方法を参考に PCR 法にて B19V 遺伝子検出を行った。

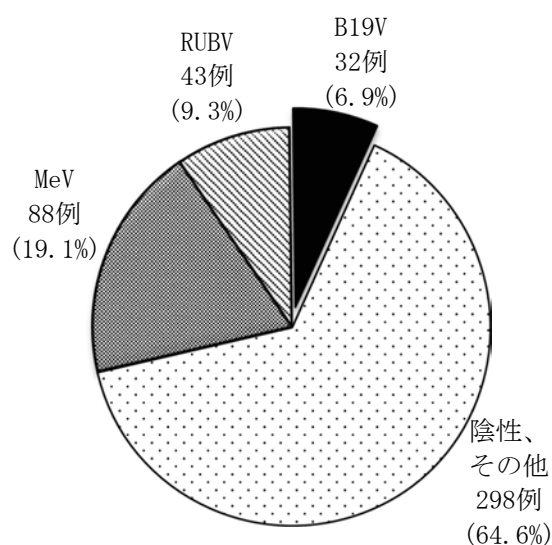


図 1 麻疹・風疹を疑われた 461 例からのパルボウイルス B19 検出状況

結果

MeV・RUBV とも検出されなかった麻疹・風疹疑い患者検体 330 名の 9.7% にあたる 32 名 74 検体から B19V 遺伝子が検出された (図 1)。B19V 陽性患者 32 名の検体別 B19V 検出状況は、血液 34 件 (89.5% : 34/38)、咽頭ぬぐい液 21 件 (75.0% : 21/28)、尿 19 件 (76.0% : 19/25)、計 74/91 (81.3%) であった (表 1)。血液検体から高率で検出されたが、咽頭ぬぐい液や尿からのみ B19V 遺伝子が検出された症例も認められた。

麻疹・風疹疑いで検体が搬入された症例全体でみると、MeV 陽性 19.1% (88/461 名)、RUBV 陽性 9.3% (43 名) であるのに対して、B19V 感染の紛れ込みと思われる症例の割合 (B19V 感染症の紛れ込み率) は 6.9% (32 名) であった (図 1)。年齢別では、1 歳未満の症例からは紛れ込みは検出されず、年齢が上がるにつれて紛れ込み率が上昇し、6 歳以上では 20 代を除き 12~13% 台であった (表 2)。

B19V は感染後長期間、血液検体等から遺伝子が検出されることがある^{2),9)} ため、B19V 遺伝子の検出が B19V 感染の遷延の結果にすぎず麻疹・風疹を疑われた症状とは関連がない (B19V 感染症の紛れ込みではな

表 1 パルボウイルス B19 陽性患者検体数及び陽性数

	検体数	陽性 (%)
血液	38	34 (89.5)
咽頭ぬぐい液	28	21 (75.0)
尿	25	19 (76.0)
総計	91	74 (81.3)

表 2 年齢別各ウイルス陽性患者数及び陽性率

年齢	総計	B19V (%)	MeV (%)	RUBV (%)
<1	56	0 (0.0)	12 (21.4)	1 (1.8)
1-5	140	5 (3.6)	24 (17.1)	0 (0.0)
6-10	49	6 (12.2)	10 (20.4)	2 (4.1)
11-20	63	8 (12.7)	22 (34.9)	2 (3.2)
21-30	61	1 (1.6)	11 (18.0)	15 (24.6)
31-40	53	7 (13.2)	8 (15.1)	13 (24.5)
40<	39	5 (12.8)	1 (2.6)	10 (25.6)
総計	461	32 (6.9)	88 (19.1)	43 (9.3)

い) 可能性も考えられる。そこで対照として、MeVあるいはRUBV陽性症例131名のうち、検証可能であった121名について血液検体を中心にB19Vの検出を試みたところ、MeV陽性患者1名(0.8%:1/121)からのみB19Vが検出された。

一般に伝染性紅斑は4~6年の周期で流行するが、2011年は全国的に流行がみられ、愛知県においても25週に定点あたり報告数が2.37と、警報レベルの2.0を超え、1999年以降の最高値を更新した¹⁰⁾。月別のB19V検出数と、愛知県における伝染性紅斑の週別定点あたり患者報告数を比較したところ(図2)、B19Vの多くは2011年から2012年前半、及び2015年から2016年にかけての伝染性紅斑の患者報告数が多い時期に採取された検体から検出されていた。一方で2013年から2014年の伝染性紅斑患者報告数が少ない時期にも散発的に検出された。

B19V感染症紛れ込み率を年別に比較すると(図3)、2011年が23.0%(14/61)と最も高く、次いで2015年が12.0%(3/25)であった。一方、2013年、2014年及び2017年の紛れ込み率は2%以下と低く、伝染性紅斑の流行時期には麻疹・風疹疑い症例へのB19V感染症の紛れ込みが増加する傾向が認められた。

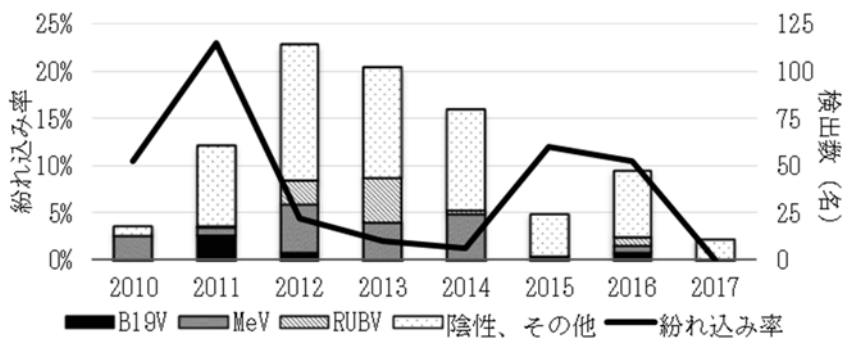


図3 年別紛れ込み率及び検出数

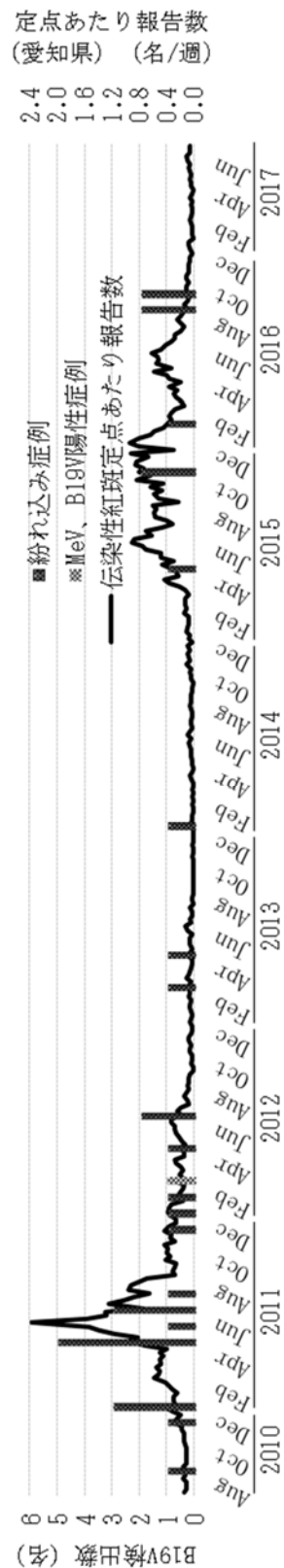


図2 パルボウイルスB19検出数と伝染性紅斑の患者報告数の推移

考 察

日本は 2015 年 3 月に WPRO により麻疹の排除状態にあることが認定され、風疹の排除についても、2020 年度を目標として掲げている⁶⁾。排除並びに排除状態の維持を示すためには、麻疹・風疹ウイルス検査や、伝染性紅斑等発疹症をはじめとする類似疾患の鑑別など、適切なサーベイランスの実施が不可欠である。そこで本研究では、2010 年 8 月～2017 年 7 月に麻疹・風疹疑いとして当所に搬入された患者検体 461 名分のうち、MeV 及び RUBV が検出されなかった 330 名分 859 件について B19V 感染症の紛れ込みを検証した。その結果、461 名の 6.9% に当たる 32 名の患者検体から B19V 遺伝子が検出され、麻疹・風疹疑い症例への B19V 感染症の紛れ込みが明らかとなり、B19V をはじめとする他疾患との鑑別の重要性が浮き彫りとなった。対照として実施した MeV 若しくは RUBV 陽性 121 症例の検体からは B19V は 1 件 (0.8%) 検出されたのみで、本研究において検出された B19V は概ね B19V 感染症の紛れ込みを示唆している。今後はリアルタイム PCR 法を用いてウイルス量を定量することで検証精度の向上が可能であると考えられる。

B19V 感染症の紛れ込みは伝染性紅斑の流行時期に増加する傾向が認められ、大流行した 2011 年には麻疹・風疹疑いで検体が搬入された症例のほぼ 4 件に 1 件が B19V 感染症の紛れ込みであった。一方で、非流行期にも散発的に B19V 感染症と考えられる事例の存在が明らかとなり、伝染性紅斑の流行期のみならず非流行期においても B19V 感染症の紛れ込みの検証が必要であると考えられた。

B19V は大きく 3 つの遺伝子型に分類されるが、多くの国で遺伝子型 1 が優勢であり、非常に近縁なウイルスが世界中で検出されている^{1), 2), 11), 12)}。本研究において麻疹・風疹疑い症例から検出された B19V も、同時期に伝染性紅斑等 B19V 感染疑い症例 5 件から検出された B19V と共に遺伝子型 1a の同一クラスターに属していた (安達ら、未発表)。

B19V 感染症の麻疹・風疹疑い症例への紛れ込みに関しては、ベラルーシに於ける ELISA 法による IgM の検出で 19.1% との報告がある¹³⁾。本研究における紛れ込み率は 6.9% であったが、調査地域や検出法によってはより高頻度に検出されることも考えられる。また、B19V 以外の感染症の紛れ込み報告¹⁴⁾もあり、本研究の対象となった患者検体からも主にウイルス分離により、エンテロウイルスやインフルエンザウイルス、アデノウイルス等が検出されている (愛知県衛生研究所 疾患別ウイルス検出状況: <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/prompt.html>)。今後も B19V をはじめとする紛れ込み症例の適切な鑑別が重要である。

謝 辞

本研究の一部は、平成 28 年度東海乳酸菌研究会による助成を受け実施した。また、愛知県内の定点医療機関はじめご協力いただいた医療機関、愛知県、豊田市、豊橋市及び岡崎市の各保健所、愛知県健康福祉部保健医療局健康対策課及び生活衛生課の皆様へ深謝致します。

文 献

- 1) Berns KI, Parrish CR: Parvoviridae. Fields Virology sixth edition (Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B eds), 1768-1791, 2015, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 2) Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS: Human Parvoviruses. Clinical Microbiology Reviews 30(1):43-113, 2017.
- 3) Valentin MN, Cohen PJ: Pediatric parvovirus B19: spectrum of clinical manifestations. Cutis 92(4):179-184, 2013.
- 4) 熊野浩太郎: ヒトパルボウイルス B19 感染症の様々な病態: 日本臨床免疫学会会誌 31(6):448-453, 2008.
- 5) Rezaei F, Sarshari B, Ghavami N,

- Meysami P, Shadab A, Salimi H, Mokhtari-Azad T: Prevalence and genotypic characterization of Human Parvovirus B19 in children with measles- and rubella-like illness in Iran. *Journal of Medical Virology* 88(6):947-953, 2016.
- 6) 風しんに関する特定感染症予防指針 (厚生労働省告示第百二十二号:平成26年3月28日・平成29年12月21日一部改正)
- 7) Salimans MMM, Holsappel S, van de Rijke FM, Jiwa AK, Raap AK, Weiland HT: Rapid detection of human parvovirus B19 DNA by dot-hybridization and polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 23(1):19-28, 1989.
- 8) Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain JP: Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *Journal of Virology* 78(22):12169-12178, 2004.
- 9) Lefrère JJ, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrère F, Girot R, Allain JP, Laperche S: Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood* 106(8):2890-2895, 2005.
- 10) 愛知県衛生研究所: 愛知県感染症情報 2011年25週 (6月4週 6/20~6/26) <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/kansen/2011/201125.pdf>
- 11) Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, Garbarg-Chenon A: Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *Journal of Virology* 76(18):912-934, 2002.
- 12) Hübschen JM, Mihneva Z, Mentis AF, Schneider F, Aboudy Y, Grossman Z, Rudich H, Kasymbekova K, Sarv I, Nedeljkovic J, Tahita MC, Tarnagda Z, Ouedraogo JB, Gerasimova AG, Moskaleva TN, Tikhonova NT, Chitadze N, Forbi JC, Faneye AO, Otegbayo JA, Charpentier E, Muller CP: Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *Journal of Clinical Microbiology* 47(11):3735-3738, 2009.
- 13) Yermalovich MA, Hübschen JM, Semeiko GV, Samoilovich EO, Muller CP: Human parvovirus B19 surveillance in patients with rash and fever from Belarus. *Journal of Medical Virology* 84(6):973-978, 2012.
- 14) Yermalovich MA, Semeiko GV, Samoilovich EI, Svirchevskaya EY, Muller CP, Hübschen JM: Etiology of maculopapular rash in measles and rubella suspected patients from Belarus. *Plos One* 9(10):e111541, 2014.

Human Parvovirus B19 in patients suspected of having measles and rubella

Hirokazu Adachi, Ayano Onouchi, Tomochika Saito, Emi Hirose, Noriko Nakamura, Noriko Saito, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Masakado Matsumoto, Hiroko Minagawa

Human Parvovirus B19 (B19V) is the type species of the *Erythroparvovirus* genus in *Parvoviridae* family. Clinical manifestations of erythema infectiosum, the most common disease caused by B19V infection are typically fever and rash, and are often difficult to differentiate from measles or rubella. Moreover, the seasonality of erythema infectiosum is also indistinguishable from measles and rubella. Differential diagnosis of B19V infection is critical for maintenance of measles elimination status and achieving rubella elimination in Japan. To investigate the prevalence of B19V infection in measles- and rubella-like illness, a total of 859 samples collected from 330 patients who were initially suspected of having measles or rubella and turned out to be negative for these viruses, were screened for presence of B19V by conventional PCR. Samples from 32 patients were positive for B19V viral DNA, which accounted for 6.7% of 461 cases suspected and tested in our laboratory for measles virus and rubella virus from August 2010 through July 2017. This study highlights the importance of testing for B19V (and other viruses) with measles/rubella suspected cases as an essential part of the surveillance programs aiming at eradication/elimination of measles and rubella.

Key words : human parvovirus B19, erythema infectiosum, surveillance, measles, rubella

調 査 研 究

食中毒事例から検出された遺伝子組換え型ノロウイルスの解析 —2016/17 シーズン—

秦 眞美、中村範子、小林慎一¹、尾内彩乃、齋藤友睦、廣瀬絵美、安達啓一、
齋藤典子、伊藤 雅、安井善宏、松本昌門、皆川洋子
¹(現所属)一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センター

要 旨

2016/17 シーズンは全国的にノロウイルス GII.2 が流行し、本県においても感染症発生动向調査事業で報告される散発事例及び食中毒等の集団事例から GII.2 が多数検出された。シーズン中に食中毒事例から検出されたノロウイルス陽性検体について、ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 領域及び Capsid 領域の遺伝子解析を実施した結果、GII.2 はすべて遺伝子組換え型ウイルス GII.P16-GII.2 であることが判明した。さらに GII.4 を検出した 2 事例のウイルスは GII.P16-GII.4 であった。GII.P16-GII.2, GII.P16-GII.4 とも愛知県で初めて確認した遺伝子型である。2016/17 シーズンに検出した GII.P16-GII.2 Capsid の推定アミノ酸配列解析では、抗原決定領域の P2 ドメインにおいて過去シーズンの GII.2 と比較して複数の変異が認められた。RdRp 領域のアミノ酸配列は、GII.P16-GII.2, GII.P16-GII.4 とも比較した範囲では一致しており、同一の P16 ウイルスが組換えを起こした可能性が推察された。

キーワード：ノロウイルス、遺伝子組換え型、Capsid 領域、RdRp 領域

序 文

ノロウイルス (NoV) は、感染性胃腸炎の原因ウイルスであると共にウイルス性食中毒の病原体として大勢を占めている。NoV は全長約 7.5kb のプラス 1 本鎖 RNA ウイルスで、カリシウイルス科ノロウイルス属に分類される。NoV は遺伝子配列の相同性に基づき GI~GVII の遺伝子グループに分類され、このうち GI と GII が主にヒトに感染する。さらに GI は 9 種類 (GI.1-9)、GII は 22 種類 (GII.1-22) の遺伝子型に分類されている¹⁾。NoV ゲノム上には 3 つの Open Reading Frame (ORF) が存在し、ORF1 には非構造タンパクが、ORF2 と ORF3 には、構造タンパ

ク VP1 と VP2 がそれぞれコードされている²⁾。NoV では、ORF1 と ORF2 の境界領域で異なる遺伝子型ウイルスと遺伝子組換えを起こした遺伝子組換え型ウイルスが出現することが報告されている³⁾。そのため、NoV の遺伝子型は ORF1 の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 領域と ORF2 の VP1 (capsid) 領域のそれぞれの遺伝子型を併記することが推奨されている⁴⁾。

当所では、平成 26-27 年度の主要な流行遺伝子群である NoV GII における遺伝子組換え型ウイルスの出現頻度及び遺伝子型の組合せなどの解析してきた。その結果、調査期間における NoV 陽性食中毒事例 33 事

例中で最も優勢であった遺伝子型は、平成 26 年に確認された新たな遺伝子型である GII.P17-GII.17 で、15 事例から検出された。近年検出される割合が高い GII.4 Sydney_2012 は、GII.P4 と GII.Pe の 2 種類の RdRp 領域遺伝子型が確認されているが、平成 26 年度の 4 事例が GII.P4-GII.4、平成 27 年度の 5 事例が GII.Pe-GII.4 であった。他に、GII.P12-GII.3 が 5 事例、GII.P7-GII.6 が 1 事例と組換え型ウイルスはいずれも大規模な流行には至らなかった。平成 28 年度は調査の結果、GII.Pe-GII.4、GII.P7-GII.6 の他、GII.P16-GII.2 及び GII.P16-GII.4 が初めて検出された。本稿では、2016/17 シーズンに新たに検出された GII.P16-GII.2 及び GII.P16-GII.4 を解析した結果を報告する。

材料と方法

1. 検体

2016/17 シーズン(2016 年 9 月から 2017 年 8 月)に愛知県で発生した食中毒事例から採取された糞便 341 検体を供試した。糞便検体は Veal infusion broth で 10%乳剤とし、10,000g、10 分間遠心分離した上清 200 μ L から High Pure Viral RNA Kit (Roche)を用いてウイルス RNA を抽出し、NoV の検出を行った。食中毒検査は Real-time PCR 法を用いる公定法(厚生労働省平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 514004 号「ノロウイルスの検出法」<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>)に準拠し、One-step RT-PCR 法(QIAGEN QuantiTect RT-PCR Kit)で、ABI7000 (Applied Biosystems, USA)を用いて検査を行った。NoV GII 陽性となった 155 検体について以下の遺伝子解析を行った。

2. NoV GII の遺伝子解析

食中毒検査で NoV GII 陽性と確認された検体から NoV の RdRp 領域(665 塩基)と Capsid N/S 領域(287 塩基)を semi nested RT-PCR (1st PCR: QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, 2nd PCR: TaKaRa ExTaq, primers: G2F1⁵⁾, G2F2⁵⁾, G2Rv[G2R1⁵⁾の一部改変、小

林], YuriFver2[Yuri22F⁶⁾の一部改変、小林], COG2R⁷⁾)で Thermal cycler (GeneAtlas, ASTEC)にて増幅した。増幅産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-up system(Promega)で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)-ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて塩基配列を決定した。得られた塩基配列から Norovirus Typing Tool Version 2.0: <http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/> で遺伝子型別を行った。系統樹解析は MEGA:ver.6.06 を用いた近隣結合法にて行った。さらに、一部の検体については、RdRp の部分領域(783bp)から Capsid 全領域(1626bp)にかけての約 2.4Kb を増幅し(1st PCR: SuperScript™ One-Step RT-PCR System for Long Templates, 2nd PCR: PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase, primers: COG2F⁷⁾, GV132⁸⁾)、塩基配列を決定して推定アミノ酸配列を解析した(The European Molecular Biology Open Software Suite: <http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>)。

結果

1. NoV 検出状況と遺伝子型

2016/17 シーズン(平成 28 年 9 月-平成 29 年 8 月)は食中毒事例 36 事例の検査を行い、そのうち 25 事例から NoV が検出された。24 事例から GII, 1 事例から GI が検出された。解析した GII の遺伝子型の内訳は 17 事例が GII.P16-GII.2, 4 事例が GII.Pe-GII.4, 2 事例が GII.P16-GII.4, 1 事例が GII.P7-GII.6 であった。

GII.P16-GII.2 は 2016/17 シーズン初頭の 2016 年 9 月に初めて検出した後、2017 年 4 月までに 17 事例から検出しており、本シーズンで最も優勢な型であった。GII.P16-GII.2 は全国的にも流行した遺伝子型である⁹⁾。2016 年 11 月には愛知県で初めて GII.P16-GII.4 を検出した。2017 年 5 月には 2 事例目の GII.P16-GII.4 を検出した。その他は過去シーズンにも検出している GII.Pe-GII.4, GII.P7-GII.6 であり、2016/17 シーズンに食中毒事例から検出し

た NoV GII はすべて遺伝子組換え型であった。

2. Capsid N/S 領域の遺伝子解析

2016/17 シーズンに愛知県で GII.2 が検出された食中毒事例 17 事例 17 株の Capsid N/S 領域の系統樹解析を図 1A に示した。今回愛知県で初めて確認された遺伝子型である GII.P16-GII.2 は大阪市で 2009/10 シーズンに既に検出されているため¹⁰⁾、大阪市の報告株 (AB682870, 80, 99)¹⁰⁾を参照して解析した。その結果、2016/17 シーズンの検出株はすべて過去の検出株とは異なるサブクラスターに分かれた。

GII.4 は RdRp 領域の遺伝子型が GII.Pe と GII.P16 の 2 種類の株がそれぞれ 4 事例と 2 事例から検出された。GII.4 が検出された 6 事例 6 株の Capsid N/S 領域の系統樹解析を行った結果、Pe 株と P16 株とも Sydney_2012 に属するものの異なるサブクラスターに分かれた (図 1B)。GII.P16-GII.4 は今回愛知県で初めて確認したが、2015/16 シーズンに大阪市で既に検出されている¹¹⁾。大阪市株 (LC53121-2)¹¹⁾は愛知県株と同一サブクラスターに含まれた。

3. RdRp 領域の遺伝子解析

RdRp 領域については GII.P16-GII.2 及び GII.P16-GII.4 を併せて解析し、図 2 に示した。2016/17 シーズンに検出された GII.P16-GII.2 の 17 株すべて過去シーズン株とは異なるクラスターを形成したが、GII.P16-GII.4 とは同一のクラスターに分類された。

4. GII.P16- GII.2 の Capsid 領域におけるアミノ酸変異

Capsid 全域の塩基配列を決定した 4 株について、推定アミノ酸配列 (542aa) を解析した。2009/11 シーズンの株¹⁰⁾と比較すると Capsid 全領域では 4 株に共通の 9 箇所に変異が認められた。そのうち 6 箇所は Capsid の抗原決定領域である P2 ドメインに位置した。図 3 に P2 ドメイン (279-405)¹²⁾のアミノ酸配列の比較を示す。解析した 4 株に共通して認められた変異は、V335I, K341R, T344S, A355G, N390K, D400E であったが、このうち、V335I と T344S は愛知

県で検出された 2016/17 シーズン株特異的変異で、K341R は他県の検出株でも共通して認められた変異であった⁹⁾。他は GII.2 のプロトタイプ Melksham 株 (X81879) の復帰変異であった。

5. GII.P16-GII.2 及び GII.P16-GII.4 の RdRp 領域におけるアミノ酸変異

塩基配列を決定した RdRp 部分領域の推定アミノ酸配列 (C 末端 238aa) について GII.P16-GII.2 株を比較したところ、2009/11 シーズンの株 (AB662899)¹⁰⁾とは複数箇所のアミノ酸変異が認められた (図 4)。また、2015/16 シーズンに大阪市で検出された GII.P16-GII.4 株 (LC53122)¹¹⁾と比較したところ、比較した領域のアミノ酸配列は全く同一であった。なお、愛知県で検出した GII.P16-GII.4 株 (F104_2016) は C 末端部分の 2 箇所のアミノ酸が異なるものの、その他のアミノ酸配列は同一であった。

考 察

愛知県における 2016 年 8 月以前の組換えウイルスの検出状況は、集団事例で年に数事例検出するものの、流行の主体となったことはない。ところが、2016/17 シーズンは全国的な流行 (11-12 月) より早い時期 (9 月) に、GII.P16-GII.2 の侵入を認め、その後、シーズンを通じて検出された。この組換え型ウイルスは愛知県のみならず全国で流行し、さらに海外の流行も報告されている^{13,14)}。GII.P16-GII.2 は他県では 2009/10 シーズンに出現していたが、愛知県では、同シーズンに GII.2 は検出されたものの、詳細な解析は実施していなかった。Capsid N/S 領域の配列から愛知県の 2009/10 シーズン株も RdRp 領域の型は P16 であった可能性が高い。GII.P16-GII.2 が出現した 2009/10 シーズンは GII.4 が流行の主体であった。ところが、2016/17 シーズンは GII.2 が GII.4 を上回る流行となった。両シーズンの GII.P16-GII.2 のアミノ酸配列の比較を行うと 2016/17 シーズンの検出株では Capsid、RdRp とも変異が認められた。Capsid の変異は抗原決定領域の P2 ドメインに多く位置していた。過去のシーズンと

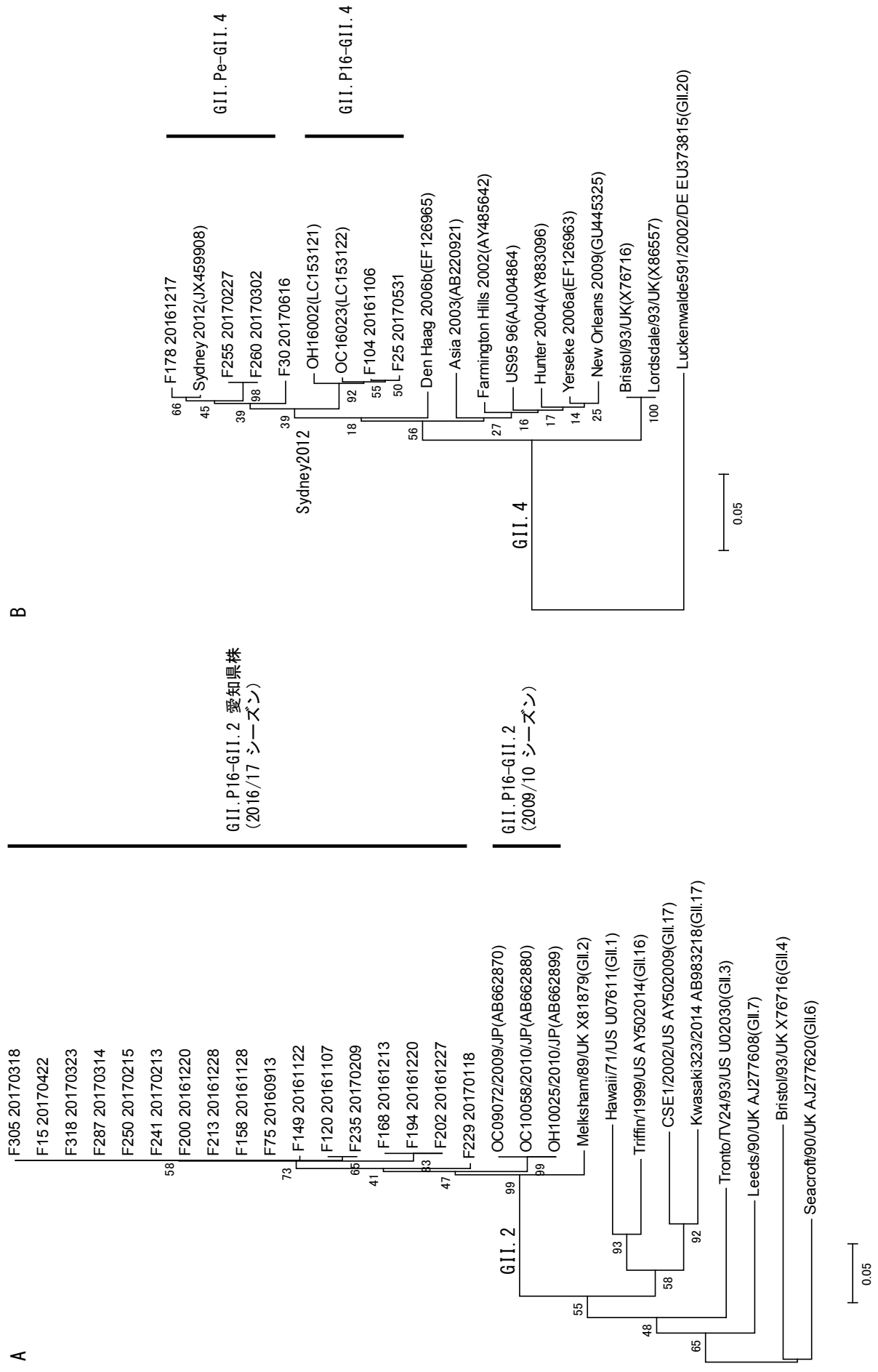


図 1 Capsid N/S 領域の系統樹解析 (A: GII.2, B: GII.4)

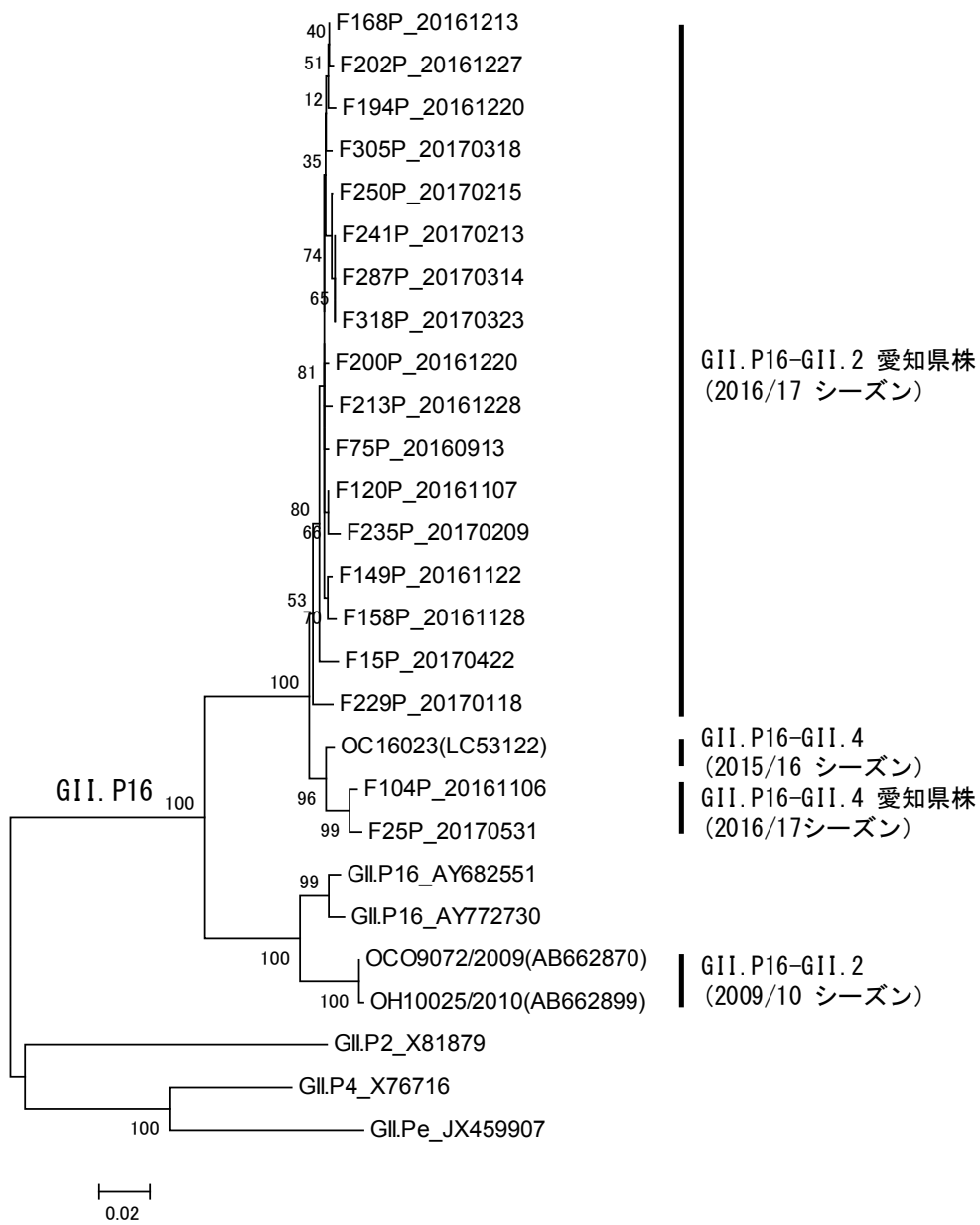


図 2 RdRp 領域 (665bp) の系統樹解析

282 292 302 312 322 332
 AB662899_2010 (G.II.2) QTVAE DLLAPSVVDV GDFK I S I N E G L P S G V P C T S Q M N S I S H M L L T L C A L S E V T N L S P D I V
 LG53122_2016 (G.II.4) . I T A K I
 F75_20160913 (G.II.2) . I T A K I
 F104_20161106 (G.II.4) . I T A K I

 342 352 362 372 382 392
 AB662899_2010 (G.II.2) Q A M S F S Y G D D E I V S T D I K L D P E K L T T K L R E Y G L K P T R P D K T E G P L I I S E D D L G L T F L R
 LG53122_2016 (G.II.4) Q . A . K N
 F75_20160913 (G.II.2) Q . A . K N
 F104_20161106 (G.II.4) Q . A . K N

 402 412 422 432 442 452
 AB662899_2010 (G.II.2) R T V S R D P A G W F G K L D O S S I L R Q M Y W T R G P N H E D P N E T M P H S Q R P I Q L M A L L G E A S L H G P
 LG53122_2016 (G.II.4) T I I
 F75_20160913 (G.II.2) T I I
 F104_20161106 (G.II.4) T I I

 462 472 482 492 502
 AB662899_2010 (G.II.2) S F Y S K I S K L V I T E L K E G M D F Y P R Q E P M F R W M R F S D L S T W E G R N L A P S F Y N E D G V E
 LG53122_2016 (G.II.4) N N
 F75_20160913 (G.II.2) N N
 F104_20161106 (G.II.4) R N L

図 4 G.II.P16 株 RdRp 領域 (C 末端 238aa) の ア ミ ノ 酸 変 異

279 288 298 308 318 328 338
 AB662899_2010 QVSGICAFKGEVTAHLHDNDHL YNVTI TNLNGSPFPDSEDIPAPLGVPDFGGRVFGVISO
 F75_20160913 I I
 F120_20161107 I I
 F149_20161122 I I
 F158_20161128 L . I L . I

 348 358 368 378 388 398
 AB662899_2010 RDKHNTPGHNEPANRAHDVPTTAAQYTPKLGQIQIGTWQTDLLTVNQPVNFPTVGLND
 F75_20160913 . . R . S G K
 F120_20161107 . . R . S G K
 F149_20161122 . . R . S G K
 F158_20161128 . . R . S G K

 405
 AB662899_2010 TDHFNQW
 F75_20160913 . E
 F120_20161107 . E
 F149_20161122 . E
 F158_20161128 . E

図 3 G.II.P16-G.II.2 株 Capsid P2 ドメイン領域 (279-405) の ア ミ ノ 酸 変 異

は異なった抗原性をもった変異ウイルスが出現し、流行に至ったと考えられる。一方、RdRp 領域は今回愛知県で検出された GII.P16-GII.4 型の RdRp 領域のアミノ酸配列とほぼ同一であった。GII.P16-GII.4 はすでに 2015/16 シーズンに大阪市で検出されており、アミノ酸配列も同一であった。GII.P16-GII.4 は GII.P16-GII.2 に先行して流行していたことから、GII.P16-GII.2 は GII.P16-GII.4 との間で遺伝子組み換えが生じた可能性が推察される。RdRp の変異はポリメラーゼの機能やウイルスの伝播に影響するという報告¹⁵⁾もあり、今回認められた RdRp の変異と Capsid の変異の組み合わせが流行ウイルスの出現をもたらしたと考えられる。今後、P16 株が他の Capsid 遺伝子型との組換えを生じ、新たな遺伝子型を出現する可能性もあり、この遺伝子型の動向には注意していく必要がある。

文 献

- 1) Vinjé J: Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 53(2):373-381, 2015.
- 2) Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK: Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195(1):51-61, 1993.
- 3) Bull RA, Tanaka MM, white PA: Norovirus recombination. *Journal of General Virology* 88:3347-3359, 2007.
- 4) Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M: Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology* 158(10):2059-2068, 2013.
- 5) Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Ishiko H, Kamata K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N. *Microbiology and Immunology* 44(8):637-693, 2000.
- 6) Saito H, Saito S, Kamada K, Harada S, Sato H, Morita M, Miyajima Y: Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. *Microbiology and Immunology* 42(6): 439-446, 1998.
- 7) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41(4):1548-1557, 2003.
- 8) Tu ETV, Bull RA, Greening GE, Hewitt J, Lyon MJ, Marshall JA, Mclver CJ, Rawlinson WD, White PA: Epidemics of Gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clinical Infectious Diseases* 46:413-420, 2008.
- 9) 藤井慶樹、則常浩太、八島加八、山本美和子、松室信宏、石村勝之：広島市で検出されたノロウイルス GII.P16-GII.2 の遺伝的解析 速報：病原微生物検出情報 38(1):17-20, 2017.
- 10) Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, Goto K, Ogura H, Seto Y; Increase of GII.2 Norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan. *Journal of Medical Virology* 84:517-525, 2012.
- 11) 入谷展弘、上林大起、改田厚、阿部仁一郎、中村廣海、山元誠司、久保秀幸：集団胃腸炎事例からのノロウイルス GII.P16-GII.4 Sydney_2012 の検出—大阪市、病原微生物検出情報 37(7):136-138, 2016.
- 12) Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK: X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286: 287-290, 1999.
- 13) Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, Eris-Hübinger AM, Hofmann J,

- Zimmermann O, Höhne M, Bock CT; Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. *Euro Surveillance* 22(4):pii=30447, 2017.
- 14) Lu J, Fang L, Sun L, Zeng H, Li Y, Zheng H, Wu S, Yang F, Song T, Lin J, Ke C, Zhang Y, Vinjé J, Li H, Association of GIIP16-GII.2 recombinant norovirus strain with increased norovirus outbreaks, Guangdong, China, 2016. *Emerging Infectious Diseases* 23(7):1188-1190, 2017.
- 15) Arias A, Thorne L, Ghurburrun E, Bailey D, Goodfellow I: Norovirus polymerase fidelity contributes to viral transmission in vivo. *mSphere* 1(5):3-11, 2016.

Norovirus recombinant strains detected from foodborne outbreaks during the 2016–17 season in Aichi Prefecture

Mami Hata, Noriko Nakamura, Shinichi Kobayashi¹,
Ayano Onouchi, Tomochika Saito, Emi Hirose, Hirokazu Adachi, Noriko Saito,
Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Masakado Matsumoto, Hiroko Minagawa

¹ Present affiliation: Aichi Food Hygiene Center

Norovirus (NoV) is recognized as one of the leading causes of acute gastroenteritis outbreaks. The RNA genome of NoV presents a high mutation rate and has led to a genome recombination. A recombination hot spot is present near the ORF1/ORF2 junction and a variety of recombinant strains have been detected worldwide.

During the 2016/17 season, the GII.2 was the most prevalent NoV genotype in Japan. Also in Aichi, the increase of GII.2 cases involved in the foodborne outbreaks and pathogen surveillance was recognized. In this study, we investigated the GII positive specimens obtained from foodborne outbreaks. The genetic analyses of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and the capsid revealed that all GII.2 viruses tested were the recombinant viruses, GII.P16-GII.2. Furthermore, GII.4 viruses detected from two cases turned out to be GII.P16-GII.2. GII.P16-GII.2 and GII.P16-GII.4 were the genotypes identified for the first time in Aichi. Putative amino acid sequences of the GII.2 capsid included several amino acid substitutions in the P2 domain known to be responsible for antigenic specificity. Putative amino acid changes in GII.P16 RdRp were consistent in both GII.2 and GII.4 capsid strains, indicating a common ancestor.

To understand the role of recombinant strains in the dynamics of NoV infections, continued pathogen surveillance including both RdRp and capsid gene characterization is essential.

Key words : Norovirus, recombinant, RdRp, capsid

調 査 研 究

2007年から2015年に愛知県の食品取扱者より分離されたサルモネラ属菌の血清型別及びβ-ラクタマーゼ遺伝子保有状況

山田和弘、四本信輔、中根衣久美、青木美耶子、白鳥浩美、平山達也、小林慎一¹、菅沼啓之助¹、北島直美¹、鈴木匡弘²、松本昌門、皆川洋子

¹一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センター

²(現所属)藤田保健衛生大学医学部微生物学講座

要 約

サルモネラ属菌は先進国を含む世界中で重要な食中毒原因菌であり、海外では薬剤耐性も問題となっている。当所では一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センターより、食品取扱者から分離されたサルモネラの分与を受け、血清型別を行っている。今回2007年から2015年に分与されたサルモネラの血清型の推移検討に加えて、β-ラクタマーゼ遺伝子の保有状況調査を行った。分与されたサルモネラ属菌891株は77血清型に分類され、*S. Litchfield* (139株、15.6%)が最も多く、さらに他県に比べ*S. Narashino* (55株、6.2%)が高頻度に分離されていた。型別不能の株では04:eh:-や04:i:-といった既存血清型の単相変異株と推察される株が多かった。また、891株のうち、β-ラクタマーゼ遺伝子が検出されたのは13株(1.5%)であり、全て*bla_{TEM}*遺伝子であった。愛知県で多く検出される血清型や、β-ラクタマーゼ遺伝子保有率の把握は、感染症等の予防対策を行う上で重要であるため、今後もサルモネラ属菌の血清型分布とともにβ-ラクタマーゼ遺伝子保有率を注視していく必要がある。

キーワード：サルモネラ属菌、食品取扱者、血清型別、β-ラクタマーゼ遺伝子

序 文

サルモネラ属菌はヒトに急性胃腸炎を引き起こす食中毒原因菌であり、日本の食中毒発生に占める原因物質として2000年以降減少傾向にはあるが、常に上位にランクされている^{1),19)}。また、サルモネラ属菌は海外において第三世代セファロsporinに対する耐性の増加が報告されており^{2),3),4)}、日本においてもカルバペネマーゼ遺伝子保有株や基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(extended-spectrum β-lactamase: ESBL)、AmpC type β-ラクタマーゼ(AmpC)産生

株が報告されている^{5),6),7)}。第三世代セファロsporinは腸管外サルモネラ症に対する第二選択薬として推奨されていること⁷⁾から、サルモネラ属菌が第三世代セファロsporinに対する耐性を獲得することは公衆衛生上の大きな問題となる。また、大腸菌等の他の腸内細菌科細菌では、ESBL遺伝子やAmpC遺伝子が院内からだけでなく、市中からも検出されている⁸⁾ため、サルモネラ属菌においても市中の薬剤耐性遺伝子保有率を調査することは重要である。

食中毒予防対策の一環として、愛知県は

「食品衛生に係る営業の基準に関する条例（平成12年3月28日 条例第10号）」により、「営業者は、食品取扱者に対し年2回以上の検便を受けさせるとともに、食品取扱者の食品衛生上必要な健康状態の把握に努めること」と定めており、食品取扱者は県内保健所や検査センター等において検便を受検している。当所では、2002年から一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センターにおいて食品取扱者検体から分離されたサルモネラ属菌の血清型別を行っている。そこで、今回2007年から2015年に分与されたサルモネラ属菌の血清型の推移をまとめると同時に、 β -ラクタマーゼ遺伝子の保有状況調査を行った。

材料と方法

供試菌：2007年から2015年に一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センターにて分離されたサルモネラ属菌 891株を使用した。

血清型別試験：サルモネラ免疫血清「生研」（デンカ生研）を用い、添付文書に従い、O血清型別及びH血清型別を行い、Kaufmann-White 抗原構造表により血清型を決定した。
薬剤耐性スクリーニング試験：供試菌 891株をセファゾリン添加（2 μ g/mL）トリプトソイ寒天（CEZ-T）培地に塗抹し、37°Cで一晩培養し、発育の有無を調べた。

β -ラクタマーゼ遺伝子型別：CEZ-T培地に発育した20株について Tris-EDTA buffer（pH8.0）100 μ L に供試菌を MacFarland 2 程度となるように懸濁し、95°Cで10分間加熱後 13,000 rpm で1分間遠心した上清をテンプレートとした。AmpC 遺伝子（*bla*_{MOX} type、*bla*_{CIT} type、*bla*_{DHA} type、*bla*_{ACC} type、*bla*_{MIR} type、*bla*_{FOX} type）は既報⁹⁾に従い PCR（GeneAmp® PCR System 9700、Applied Biosystems、USA）を行い、ESBL 遺伝子（*bla*_{CTX-M-1} group、*bla*_{CTX-M-2} group、*bla*_{CTX-M-8} group、*bla*_{CTX-M-9} group、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}）はシカジーニアス®ESBL 遺伝子型検出キット（関東化学）を使用して決定した。

結果

1. 血清型別試験

891株は77種類の血清型に分類された（表1）。2007年から2015年の9年間で最も多く分離された血清型は *S. Litchfield*（139/891、15.6%）で、次いで *S. Saintpaul*（94/891、10.5%）、*S. Thompson*（74/891、8.3%）*S. Enteritidis*（55/891、6.2%）*S. Narashino*（55/891、6.2%）の順に多く分離された。2007年から2015年までに共通して分離された血清型は7種類（*S. Litchfield*、*S. Saintpaul*、*S. Thompson*、*S. Enteritidis*、*S. Narashino*、*S. Infantis*、*S. Montevideo*）あり、この7血清型で全体の54.5%（486/891）を占めた。型別不能株（62/891、7.0%）うち37株（59.7%）はO4群であり、O4:eh:-が15株と最も多く、次いでO4:i:-が多かった（表1及び表2）。H血清型の決定できなかったサルモネラ属菌が22株（2.5%）あり、そのうち19株は運動性が微弱なサルモネラ属菌であった。

2. 薬剤耐性スクリーニング試験及び β -ラクタマーゼ遺伝子型別

CEZ-T培地を用いたスクリーニングを行ったサルモネラ属菌 891株のうち、発育がみられたのは20株（2.2%）であった。20株のうち血清型を決定できたのは15株あり、*S. Albany* 及び *S. Newport* がそれぞれ2株、*S. Derby*、*S. Duesseldorf*、*S. Enteritidis*、*S. Infantis*、*S. Litchfield*、*S. Manhattan*、*S. Minnesota*、*S. Montevideo*、*S. Rissen*、*S. Schwarzengrund* 及び *S. Stanley* がそれぞれ1株であった（表3）。CEZ-T培地に発育した20株のうち13株から β -ラクタマーゼ遺伝子が検出され、全て *bla*_{TEM} 遺伝子であった。残り7株からは検討したESBL遺伝子は検出されなかった。

考察

2007年から2015年の間毎年1株以上分離された血清型7種類（*S. Litchfield*、*S. Saintpaul*、*S. Thompson*、*S. Enteritidis*、*S. Narashino*、*S. Infantis*、*S. Montevideo*）のうち、*S. Saintpaul*、*S. Thompson*、*S. Enteritidis*、*S. Infantis* の4血清型は、

表1 2007年から2015年に愛知県の食品取扱者より分離されたサルモネラの血清型

菌型	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	総計
S. Litchfield	15	16	8	17	25	7	19	13	19	139
S. Saintpaul	11	6	5	8	14	2	15	16	17	94
S. Thompson	2	5	6	3	9	8	14	15	12	74
S. Enteritidis	4	10	16	5	8	2	2	4	4	55
S. Narashino	7	1	4	6	5	7	7	8	10	55
S. Infantis	4	2	3	3	5	1	7	7	6	38
S. Manhattan		1	4	4	5		7	4	7	32
S. Montevideo	2	8	3	2	5	1	7	2	1	31
S. Schwarzengrund	3	1		2	5		6	6	4	27
S. Stanley	4	1	1	2		2	2	5	7	24
S. Braenderup	2	1	1	2	4	2	2		1	15
S. Newport	1	2	3	3	1		1	4		15
S. Bareilly			2		2	2	2	5	1	14
S. Rissen	1	1	3	6			2		1	14
S. Agona		2		1		3	3	1	3	13
S. Weltevreden			6	3				2	2	13
S. Derby		1	3	1			1		5	11
S. Mbandaka				1	3	2	1	2	2	11
S. Schleissheim	1		2	3	2		1	1		10
S. Senftenberg		2		2		2		2	2	10
S. Corvallis	2						2	3	1	8
S. Hadar		4	1				2	1		8
S. Nagoya	1	3	1		1			1	1	8
S. Virchow	2	1	1	1	1			1		7
S. Anatum	1					1		3	1	6
S. Cerro	1				1			2	2	6
S. Chailey		2		1			2	1		6
S. Othmarschen		2		1			3			6
S. Tennessee	1		1		2				2	6
S. Typhimurium		2					1	3		6
S. Singapore	1		1			1	1	1		5
その他 (46血清型)	9	3	9	4	1	4	9	15	8	62
型別不能	3	7	6	4	14	2	6	13	7	62
合計	78	84	90	85	113	49	125	141	126	891

表2 型別不能だったサルモネラのO及びH血清型

血清型	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	総計
04:d:-		1		1			1		1	4
04:eh:-	1	1	3	1	7	1			1	15
04:i:-					2		1	6	1	10
04:1,2:-	1									1
04:1,7:-								1		1
04:-	1	2			1			2		6
07:eh:-								1		1
07:-		1	1	1		1		1		5
06,8:d:-		1							1	2
06,8:i:1,z6							1			1
06,8:L,v:-							1			1
06,8:1,5:-									1	1
06,8:-		1	2	1	2			1	1	8
08:-					1				1	2
09:-					1					1
013:a:1,z6							2	1		3
合計	3	7	6	4	14	2	6	13	7	62

表3 CEZ-Tに発育したサルモネラの血清型及びβ-ラクタマーゼ遺伝子保有状況⁽¹⁾

血清型	2008	2011	2012	2013	2014	2015	合計
S. Albany						2(1) ⁽²⁾	2(1)
S. Derby	1						1
S. Duesseldorf						1(1)	1(1)
S. Enteritidis		1(1)					1(1)
S. Infantis						1	1
S. Litchfield					1		1
S. Manhattan		1(1)					1(1)
S. Minnesota						1	1
S. Montevideo					1		1
S. Newport				1(1)	1(1)		2(2)
S. Rissen				1(1)			1(1)
S. Schwarzengrund					1(1)		1(1)
S. Stanley			1(1)				1(1)
04:i:-		2(2)			2(2)		4
06,8:d:-	1						1
合計	2	4(4)	1(1)	2(2)	6(4)	5(2)	20(13)

(1) *bla*_{MOX} type、*bla*_{CIT} type、*bla*_{DHA} type、*bla*_{ACC} type、*bla*_{MIR} type、*bla*_{FOX} type

*bla*_{CTX-M-1} group、*bla*_{CTX-M-2} group、*bla*_{CTX-M-8} group、*bla*_{CTX-M-9} group 及び *bla*_{SHV} 遺伝子は陰性

(2) 括弧内は *bla*_{TEM} 遺伝子保有株数

国立感染症研究所による全国の集計において2013年から2017年の5年間、毎年ヒトより分離されたサルモネラ血清型の上位15血清型¹⁰⁾に含まれていた。今回調査対象とした9年の間、最も高率に検出された*S. Litchfield*は、毎年分離株の約10-20%を占めており、全国での分離割合(2-3%)より高率であった。一方、全国では2013年から2015年の間、最も多く分離報告のあった¹⁰⁾*S. Enteritidis*の分離株に占める割合は、本調査では2010年以降10%以下に減少していた。このような全国と当県との分離割合の比較は、当県における食品衛生対策や食中毒リスクを評価する上で重要であると考えられた。また、食品取扱者から分離された菌株の血清型パターンが食中毒原因菌の血清型パターンと類似している部分があったことは、今後食中毒を予防する上で重要な情報となると考えられた。

今回の調査において、*S. Narashino*が高頻度に分離(55/891、6.2%)された。食品衛生センターは県内の24支部から検体を収集しているが、支部間での*S. Narashino*の分離率に偏りはなかった(データ非公表)。*S. Narashino*は爬虫類由来の血清型¹⁴⁾とされており、1964年の報告ではヒトからだけでなく、犬等からも検出され日本特有の血清型であると考えられていた¹⁵⁾。しかし、2000年以降の我が国のサルモネラ属菌の分離報告^{11), 12), 13)}では*S. Narashino*の記載はなかった。本県において*S. Narashino*が高頻度に分離されたことに加え、平成27(2015)年に東京都で食中毒の原因菌として分離されたこと¹⁶⁾や、岐阜県において、食中毒の調査の際にふきとり検体から分離されたこと¹⁷⁾からも*S. Narashino*は、今後も積極的に調査対象として認識することが重要であると考えられた。

型別不能の株のうち、04:i:-は全国的に増加している¹⁰⁾*S. Typhimurium*(04:i:1,2)の単相変異株であると推察された。また、本県では*S. Saintpaul*(04:eh:1,2)の単相変異株と推察される04:eh:-も多く検出されていたが、他県におけるサルモネラ属菌の分離報告等^{10), 11), 12), 13)}には記載がな

く、遺伝子型別等を利用して確認する等、さらなる調査を行うことが必要であると考えられた。

今回調査した891株は全て*bla*_{CTX-M} group遺伝子やAmpC遺伝子は保有しておらず、*bla*_{TEM}遺伝子のみ検出された。サルモネラ属菌の*bla*_{TEM}遺伝子はこれまでも鶏肉から分離されており¹⁸⁾、ヒトにおいても注意が必要となると考えられた。

今回、愛知県における食品取扱者における血清型分布や薬剤耐性遺伝子の保有率の調査では、全国的に食中毒を引き起こしている血清型も多く分離されている一方で愛知県に特有の血清型(*S. Narashino*)も存在することや、サルモネラ属菌の薬剤耐性遺伝子保有率が明らかとなった。血清型分布や薬剤耐性遺伝子保有率の把握は、感染症等の予防対策を行う科学的根拠の一端を担うものであり、今後もサルモネラ属菌の血清型分布や薬剤耐性遺伝子保有率を注視していきたい。

謝 辞

長年にわたり菌株の分与を通じてサルモネラ調査研究に協力いただいている一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センターに深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター: サルモネラ特集 病原微生物検出情報 30(8):206-207, 2009.
- 2) Whichard JM, Gay K, Stevenson JE, Joyce KJ, Cooper KL, Omondi M, Medalla F, Jacoby GA, Barrett TJ: Human Salmonella and concurrent decreased susceptibility to quinolones and extended-spectrum cephalosporins. *Emerging Infectious Diseases* 13(11): 1681-1688, 2007.
- 3) Mataseje LF, Xiao J, Kost S, Ng LK, Doré K, Mulvey MR; Canadian Public Health Laboratory Network (CPHLN): Characterization of Canadian cefoxitin-resistant non-typhoidal Salmonella

- isolates, 2005-06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(4):723-730, 2009.
- 4) Su LH, Wu TL, Chia JH, Chu C, Kuo AJ, Chiu CH. Increasing ceftriaxone resistance in *Salmonella* isolates from a university hospital in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55(6):846-852, 2005.
 - 5) Hosoda T, Wakuda M, Ishii J, Tsuge I, Matsui M, Suzuki S, Yamada K, Suzuki K, Ishikawa K, Yoshida S: Emergence of *Salmonella* strain that produces IMP-1-type metallo- β -lactamase in a Japanese patient. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 68(1):75-76, 2015.
 - 6) Saito S, Koori Y, Ohsaki Y, Osaka S, Oana K, Nagano Y, Arakawa Y, Nagano N: Third-Generation Cephalosporin-Resistant Non-Typhoidal *Salmonella* Isolated from Human Feces in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 70(3):301-304, 2017.
 - 7) 藤田拓司, 小松 方, 岡田潤平, 加藤貴代子: ナリジクス酸耐性および基質拡張型 β -lactamase 産生 *Salmonella* の分離状況に関する調査成績. *感染症学雑誌* 85(4):355-359, 2011.
 - 8) Doi Y, Park YS, Rivera JI, Adams-Haduch JM, Hingwe A, Sordillo EM, Lewis JS 2nd, Howard WJ, Johnson LE, Polsky B, Jorgensen JH, Richter SS, Shutt KA, Paterson DL: Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 56(5):641-648, 2013.
 - 9) Pérez-Pérez FJ, Hanson ND: Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40(6):2153-2162, 2002.
 - 10) 国立感染症研究所感染症情報センター: サルモネラ血清型割合 2013~2017年 病原微生物検出情報; <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/1524-iasrgb.html>
 - 11) 金子通治, 野田裕之, 大沼正行: 1985~2006年の22年間に山梨県で分離された散発下痢症患者由来サルモネラの血清型推移と疫学的特徴. *感染症学雑誌* 81(4):394-402, 2007.
 - 12) 久高 潤, 糸数清正, 中村正治, 平良勝也, 安里龍二, 古謝幸恵, 玉城勝利, 川田 勤: 沖縄県における散発下痢症及び食中毒由来サルモネラの血清型. *沖縄県衛生環境研究所報* 36:43-48, 2002.
 - 13) 河村真保, 柴田幹良, 高橋正樹, 横山敬子, 松下秀, 仲真晶子, 甲斐明美: 東京都において分離されたサルモネラの血清型について(2000年-2008年). *東京都健康安全研究センター研究年報* 60:39-44, 2009.
 - 14) Kuroki T, Ishihara T, Furukawa I, Okatani AT, Kato Y: Prevalence of *Salmonella* in wild snakes in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 66(4):295-298, 2013.
 - 15) 坂崎利一, 中谷林太郎: 日本における *Salmonelleae* の疫学と生態. *長崎大学風土病紀要* 6(3):167-173, 1964.
 - 16) 東京都福祉保健局:平成 27 年 東京都の食中毒概要 2 食中毒統計表-2; http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/foods_archives/index.html
 - 17) 岐阜県健康福祉部生活衛生課: 平成 27 年岐阜県食中毒事件録. 41-49.
 - 18) Noda T, Murakami K, Etoh Y, Okamoto F, Yatsuyanagi J, Sera N, Furuta M, Onozuka D, Oda T, Asai T, Fujimoto S: Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan. *PLoS One* 10(2):e0116927, 2015.
 - 19) 厚生労働省: 食中毒統計調査資料; http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html

Serotype and β -lactamase gene distribution
of *Salmonella* isolated from food handlers
between 2007 and 2015 in Aichi Prefecture, Japan

Kazuhiro Yamada, Shinsuke Yotsumoto, Ikumi Nakane, Miyako Aoki,
Hiromi Shiratori, Tatsuya Hirayama, Shinichi Kobayashi¹, Keinosuke Suganuma¹,
Naomi Kitajima¹, Masahiro Suzuki², Masakado Matsumoto, Hiroko Minagawa

¹ Aichi Food Hygiene Center

² Present affiliation: Department of Microbiology, Fujita Health University

Salmonella enterica is globally recognized as a major cause of foodborne disease. To determine serotype and β -lactamase gene distribution of *Salmonella* species isolated from food handlers between 2007 and 2015 in Aichi Prefecture, a total of 891 *Salmonella* isolates were examined. As a result, these isolates were classified into 77 different serotypes. The most predominant serotype was *S.* Litchfield (139/891, 15.6%). Of note, *S.* Narashino, which has been an unfrequently reported serotype from other prefectures, was ranked fifth (55/891, 6.2%) among 77 serotypes. The serological characteristics of most of the 62 untypeable isolates were such as O4:i:- and O4:i:- and seemed to derive from the mutation from existing two H phases to single H phase. Screening by CEZ-T medium and β -lactamase gene typing by PCR of these isolates revealed that 13 (1.5%) isolates carried *bla*_{TEM} gene. This study highlights the importance of continuous determination of serotype and β -lactamase gene distribution to prevent spread of Salmonellosis.

Key words : *Salmonella enterica*, food handlers, serotype, β -lactamase gene

調 査 研 究

豚組織中のアセトアミノフェン残留分析法の検討

堀田沙希、後藤智美、市川義多加、猪飼誉友、渡邊美奈恵、小池恭子

要 旨

豚組織中に残留するアセトアミノフェンの HPLC-UV を用いた分析法を検討した。試料をアセトニトリルとヘキサンで分配抽出後、Oasis HLB カートリッジにより精製した試験溶液を HPLC-UV で測定したところ、基準値レベルのアセトアミノフェンを良好なピーク形状で分離・検出することができた。この方法を用いて豚肝臓及び筋肉について添加回収実験を行ったところ、回収率は 78.8 及び 75.1%、変動係数は 3.6 及び 2.3% と良好な結果が得られた。以上より本法は、豚におけるアセトアミノフェンの残留分析法としての有用性が示唆された。

キーワード：アセトアミノフェン、豚、残留分析、HPLC-UV

はじめに

非ピリン系の中枢性解熱鎮痛薬アセトアミノフェン (AAP) (図 1) は、消化性潰瘍や腎障害などの副作用が少ないため医療用や一般用医薬品として広く用いられており、動物用医薬品としても、日本において平成 23 年に豚の経口投与剤として承認されている^{1)、2)}。食品中の残留に関しては、平成 23 年 2 月に豚の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分の基準値として 0.01 ppm が設定されたが³⁾、平成 25 年 7 月には、豚の筋肉 0.6 ppm、脂肪 0.3 ppm、肝臓、腎臓、その他の食用部位 2 ppm と残留基準値が緩和された⁴⁾。この緩和により、AAP は豚に対し一層使用しやすい医薬品となった一方で、

高濃度に残留した食品が市場に流通する危険性も懸念されることとなった。しかし、食品中の AAP の残留分析法は未だ示されていない (平成 29 年 12 月現在)。

AAP は極めて安定な化合物であり、環境中に放出されても分解・消失しにくいことから、河川等に常在する医薬品成分としてしばしば分析、調査等の対象になっている^{5)、6)}。環境中に残留することで、使用が許可されている豚だけでなく、治療や予防の目的では使用されることのない魚介類やハチミツ等にも取り込まれて残留や濃縮する可能性があり、それらをヒトが摂取し続けた際の健康への影響が懸念される¹⁾。よって、様々な食品中の AAP の分析法を検討することは重要であり、と畜場や一般の検査所等でも適用可能で、迅速かつ簡便な分析法の開発が望まれる。そこで今回、使用が許可されている豚に残留する AAP 分析法として、汎用分析装置である HPLC-UV (High performance liquid chromatograph/Ultraviolet absorption detector、液体クロマトグラフ/紫外部吸

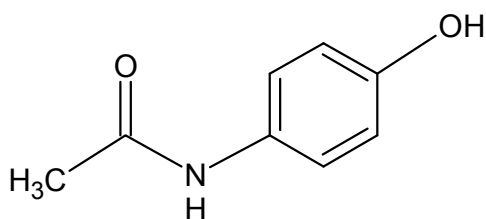


図 1 アセトアミノフェンの構造式

収検出器)を用い、豚肝臓を試料として、抽出法、精製法、測定条件等を最適化し、豚筋肉を含めた添加回収実験を行ったので報告する。

方 法

1. 試料

試料は、愛知県内の小売店で購入した豚肝臓、豚筋肉を用いた。

2. 試薬及び標準品

試薬は和光純薬工業(株)または関東化学(株)の特級を用いた。

AAP 標準品は(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の日本薬局方標準品を用い、メタノールに溶解して1 mg/mL 標準原液とし、これを適宜希釈して用いた。

セチルトリメチルアンモニウムクロリドは東京化成工業(株)を用いた。

固相カートリッジはOasis HLB(150 mg/6 mL、Waters、USA)を用いた。

3. 装置及び測定条件

(1) HPLC 装置

送液ポンプ(LC-10ADVP、島津製作所)、UV 検出器(SPD-10A、島津製作所)、カラムオープン(CTO-10ASVP、島津製作所)、オートインジェクタ(SIL-10ADVP、島津製作所)、システムコントローラ(SCL-10ADVP、島津製作所)、インテグレータ(C-R6A、島津製作所)。

(2) HPLC 条件

カラム:X-Bridge C18(内径4.6 mm、長さ100 mm、粒子径3.5 μ m、Waters、USA)、移動相:0.01 M ホウ酸ナトリウム水溶液-アセトニトリル(4:1) 含0.01 M セチルトリメチルアンモニウムクロリド混液、カラム温度:40°C、流速:1.0 mL/min、測定波長:244 nm、注入量:5 μ L。

4. 分析操作

(1) 抽出

試料10 gを秤量し、無水硫酸ナトリウムを30 g加え、*n*-ヘキサン20 mL及びアセトニトリル40 mLを加えて1分間ホモジナイズした後、毎分3000回転で5分間遠心分離した。有機溶媒層を別の遠心分離管に分取後、残渣に*n*-ヘキサン20 mL及びアセトニ

トリル20 mLを加えて1分間ホモジナイズし、毎分3000回転で5分間遠心分離した。得られた有機溶媒層と前操作で分取した有機溶媒層を合わせ1分間振とうし、毎分3000回転で5分間遠心分離後、*n*-ヘキサン層を除去した。残ったアセトニトリル層に*n*-ヘキサン20 mLを加えて1分間振とうし、毎分3000回転で5分間遠心分離後に*n*-ヘキサン層を除去した。この操作を3回繰り返した後、得られたアセトニトリル層を40°C以下で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。

(2) 精製及び試験溶液の調製

上記濃縮残渣に5%メタノール水溶液を10 mL加えて超音波槽内で溶解した。その溶解液を遠心分離管に移し、容器を水10 mLで洗浄、洗浄液も同じ遠心分離管に移した。これを毎分3000回転で5分間遠心分離し、上澄液をあらかじめメタノール及び水各10 mLでコンディショニングしたOasis HLBカートリッジに負荷した。負荷後、10%メタノール水溶液5 mLでカートリッジを洗浄し、さらに毎分3000回転で5分間遠心分離してカートリッジ内の水分を除去した。カートリッジに窒素を10分間通気して乾燥させた後、保持されたAAPを酢酸エチル5 mLで溶出し、溶出液を40°C以下で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。得られた残渣に水10 mLを加え、超音波槽内で溶解し試験溶液とした。

5. 添加回収試験

豚肝臓及び筋肉にAAPがそれぞれ1 μ g/g、0.3 μ g/gとなるように標準溶液を添加した後、本法に従って分析した。

結果及び考察

本研究は以下のような方針で進めた。検討対象試料には、まず一般的に胆汁等夾雑成分が多く分析が難しいとされる豚肝臓を選択し^{7)、8)}、抽出、精製、測定等の残留分析に必要な諸条件を検討・最適化する。その後適用範囲を豚筋肉、腎臓、脂肪等の組織、さらに牛筋肉や鶏筋肉などの他の食品に拡大し、必要に応じて方法の修正・変更を行う。測定機器については、第一選択

を HPLC-UV とし、十分な感度が得られない、あるいは夾雑成分の影響が大きいなど、確認が必要な場合を考慮してより高感度、高選択性を持つ質量分析計の適用を併せて検討する。定量下限は、基準値が設定されている豚についてはそれぞれの基準値の 1/10 とするが、その他の食品については一律基準である 0.01 ppm を目標とする。

1. HPLC 条件の検討

分析カラムに C18 系を、移動相に水とアセトニトリルを用いたところ、AAP は 2 分付近に良好なピーク形状で分離したが、非常に保持が弱く、試料の分析において、ソルベントフロント付近に溶出する試料由来の夾雑物が妨害ピークとなり、精度の高い測定が困難になることが懸念された。そこで、AAP の保持の増強を目的に、イオンペア試薬を用いる分離条件を検討した。その結果、AAP の保持は移動相の pH が 8 以上で最も強くなったため、C18 系のカラムのうち耐塩基性に優れた X-Bridge C18 を、移動相にはその液性が pH9 付近である 0.01 M ホウ酸ナトリウム水溶液-アセトニトリル (4:1) 含 0.01 M セチルトリメチルアンモニウム

クロリド混液を、それぞれ選択した。本条件で図 2 (A) に示すように AAP は約 4 分付近に良好なピーク形状で分離した。クロマトグラム上での AAP の定量下限は 0.10 ng (S/N>10) であり、この分析法を豚組織に適用した場合、10 g の試料から 10 mL の試験溶液を調製し、その 5 μ L を注入した際の試料中濃度で 0.02 μ g/g に相当する。これは、豚組織の基準値で最も低い 0.3 ppm の 1/10 より低濃度であるため、豚については適用可能であった。この条件における AAP の検量線は 0.03~3 μ g/mL の濃度範囲で $r^2 \geq 0.999$ の良好な直線性を示した。

2. AAP 抽出条件の検討

2-1. 抽出溶媒

アセトン、*n*-ヘキサン及びアセトニトリル・*n*-ヘキサン (1:1) の 3 種類を用い、抽出条件を検討した。1 μ g/g となるよう標準溶液を添加した豚肝臓試料 10 g に各溶媒を 20 mL 入れホモジナイズし、遠心分離後、得られた抽出液を減圧濃縮した。アセトニトリル・*n*-ヘキサン (1:1) による抽出で、アセトニトリルと *n*-ヘキサン層の間にエマルジョン層の形成が認められ

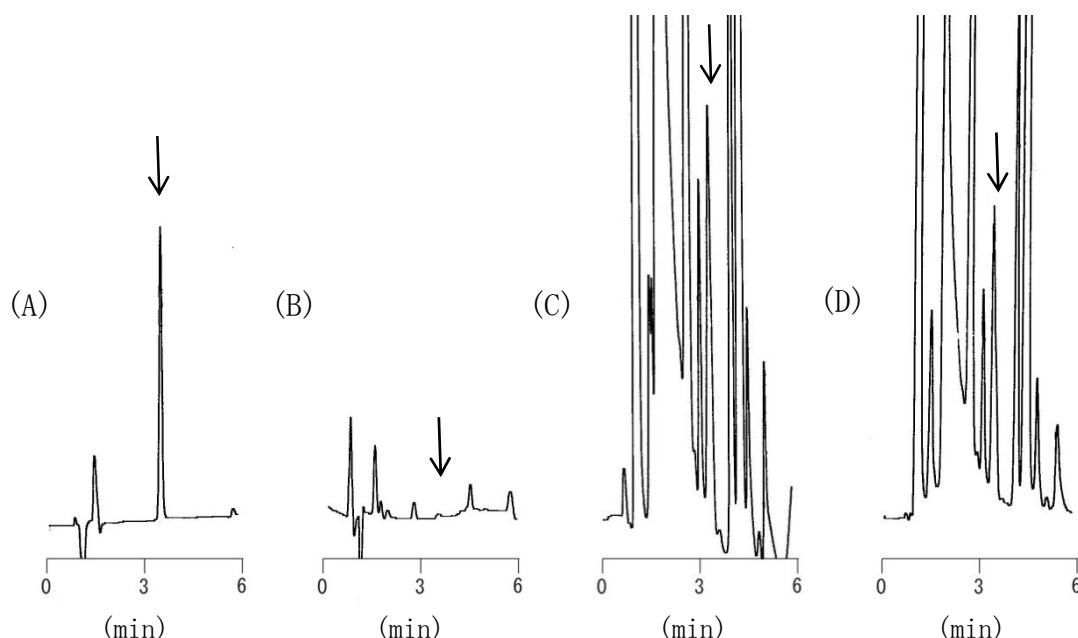


図 2 HPLC-UV により得られたクロマトグラム :

- (A) アセトアミノフェン標準溶液 (1 μ g/mL)
- (B) *n*-ヘキサンを用いた抽出法の検討 (1 μ g/g 添加)
- (C) アセトンを用いた抽出法の検討 (1 μ g/g 添加)
- (D) アセトニトリル・*n*-ヘキサン (1:1) を用いた抽出法の検討 (1 μ g/g 添加)

たため、アセトニトリル層のみを分取し抽出液とした。濃縮残渣に水を加え溶解し、HPLC-UVで測定したところ、図2(B)に示すように *n*-ヘキサン抽出液中に AAP のピークは確認できなかった。残り2種類の抽出液からは AAP のピークが確認できたが、両者のクロマトグラムを比較した結果、図2(C、D)に示すようにアセトニトリル・*n*-ヘキサン(1:1)の方が夾雑ピークが少なかったため、これを用い詳細な検討を行った。この抽出溶媒を用いる上で最も大きな問題はエマルジョン形成であった。そこで、両成分の混合比率を変え抽出を試みたところ、アセトニトリル・*n*-ヘキサン(2:1)でのみエマルジョンの形成が認められなかったため、これを抽出溶媒とした。

2-2. 抽出回数

抽出溶媒にアセトニトリル・*n*-ヘキサン(2:1)60 mLを用い、抽出回数ごとの HPLC クロマトグラムを比較した結果、2回目まで AAP のピークが認められたため、抽出回数は2回とした。また、2回目以降の抽出においては、アセトニトリル・*n*-ヘキサン(1:1)40 mLでもエマルジョン形成が認められなかったため、これを2回目の抽出溶媒とした。2回の抽出操作で得られた有機溶媒層を合わせ、振とう後遠心分離し、分離したアセトニトリル層を分取して抽出液とした。

2-3. 抽出液の洗浄

上述の抽出液を減圧濃縮したところ、残

渣に少量の油分が含まれていた。このような油分などの低極性成分は、次に行う精製操作の妨害となるだけでなく、HPLC カラムの劣化等を招くことが知られており、できる限り除去しておくことが望ましい。AAP は水溶性が非常に高く、*n*-ヘキサンなどの低極性溶媒にはほとんど溶けない。この特徴を利用した洗浄方法として、上述のアセトニトリル抽出液に *n*-ヘキサン 20 mL を加え振とう、遠心分離後、*n*-ヘキサン層を除くという操作を3回、抽出手順に追加した。この操作により濃縮残渣から油分はほぼ完全に除去でき、かつ、AAP の回収率に低下は認められなかった。

3. 精製法の検討

3-1. 固相カートリッジ及び溶出溶媒の選択

豚肝臓の抽出液濃縮残渣を水に溶解し HPLC 分析したところ、AAP のピーク付近に多くの夾雑ピークが認められたため、固相抽出法による精製を検討した。

まず、水、メタノール水溶液(5、10及び20%)、メタノール、アセトニトリル及び酢酸エチルで調製した AAP 標準溶液を各種固相カートリッジに負荷し、通過液を HPLC 分析した。この溶液中に AAP が認められなければ、AAP は固相カートリッジに保持されたと判断し、通過液のピーク面積値と通液前のピーク面積値を比較して、それぞれの固相カートリッジへの保持率を算出し表1に示した。この中から、水で調

表1 固相カートリッジの比較

タイプ	商品名	規格・充填量	保持率 (%)						
			水	5% メタノール	10% メタノール	20% メタノール	メタノール	アセト ニトリル	酢酸 エチル
逆相シリカゲル	Sep-Pak C18	500 mg/3 mL	100	100	87	49	0	9	2
	Bond Elut C18	500 mg/3 mL	100	97	72	37	0	7	0
逆相ポリマー	Oasis HLB	150 mg/6 mL	100	100	100	97	0	33	68
	InertSep PLS-2	270 mg/6 mL	100	100	96	84	19	15	3
ゲラファイトカーボン	ENVI-Carb	0.25 g/3 mL	100	100	100	100	43	40	24
陰イオン交換	Bond Elut SAX	500 mg/3 mL	19	-	-	-	0	100	89
	Sep-Pak QMA	500 mg/3 mL	23	-	-	-	0	86	100
シリカゲル	Sep-Pak Silica	500 mg/3 mL	24	-	-	-	0	33	29

- : 未実施

製した標準溶液の保持率が良好であった Oasis HLB 及び ENVI-Carb を、アセトニトリルで調製した標準溶液の保持率が良好であった Bond Elut SAX を、酢酸エチルで調製した標準溶液の保持率が良好であった Sep-Pak QMA をそれぞれ選択した。

ついで、保持に対する試料マトリックスの影響について検討をした。豚肝臓 10 g 抽出液の濃縮残渣に水、アセトニトリル及び酢酸エチルで調製した AAP 1 μ g/mL 標準溶液 5 mL をそれぞれ加え溶解し、各カートリッジに負荷して、通過液を HPLC 分析した。その結果、Bond Elut SAX 及び Sep-Pak QMA ではいずれの溶液中の AAP もほぼ保持されずカートリッジを通過した。その一方で Oasis HLB 及び ENVI-Carb は、濃縮残渣を水で調製した標準溶液で溶解したものを負荷した場合のみ、AAP が保持された。通液後、これら 2 種類のカートリッジに保持された AAP をメタノール、アセトニトリル及び酢酸エチルで溶出し HPLC 分析を試みたところ、全ての溶出溶媒において、より夾雑ピークが少なく、精製効果が高かった Oasis HLB を選択した。また、カートリッジからの回収率はいずれの溶出溶媒においても 80% 程度と同等であったため、次の濃縮操作を容易にする酢酸エチルを溶出溶媒として選択した。

3-2. カートリッジへの保持及び洗浄

豚肝臓抽出液の濃縮残渣に水を加えて溶解を試みたところ、超音波処理を行っても残渣を完全に溶解させることが困難であった。その原因として、上記濃縮残渣にはアセトニトリル等の溶媒に溶けやすく、水に溶けにくい中極性のマトリックスが含まれていることが考えられ、それらが AAP の回収を抑制するだけでなく、測定上の妨害となるなどの影響が懸念された。そこで、濃縮残渣の溶解を助長する溶解溶媒、カートリッジに保持されたマトリックス成分を除くための洗浄溶媒を検討した。豚肝臓 10 g の抽出液を方法の項 4 (2) に従って調製した残渣に 5、10、20、30 及び 50% メタノール水溶液で調製した AAP 1 μ g/mL 標準溶液 5 mL を加えて超音波処

理し、遠心分離により残渣を除いた溶液をカートリッジに負荷し、通過液を HPLC 分析した。その結果、濃縮残渣については、メタノール含量が増えるに従い溶解量が増えたが、完全に溶解することはできなかった。また、メタノール含量が 20% を超えるとカートリッジから AAP の漏出が認められた。以上の結果より、5% メタノール水溶液を用いて濃縮残渣を溶解し、溶解溶液負荷後のカートリッジを 10% メタノール水溶液 5 mL で洗浄するという操作条件を採用した。この操作により、水で溶解した溶解液を負荷する場合と比べ、回収率に大きな変化はないものの、クロマトグラム上の夾雑ピークが減少し、精製能力に向上が認められた。

3-3. カートリッジの乾燥

先述したようにカートリッジからの AAP の溶出には酢酸エチルを用いることとしたが、洗浄水がカートリッジ内に残った状態で溶出を行うと回収率が安定しないため、乾燥させる操作が不可欠であった。窒素通気により乾燥した場合 30 分程度を要したため、遠心分離によりカートリッジ内の水分を除いた後に窒素通気を行うことにより、所要時間を 10 分に短縮することが可能となった。

以上の操作により得られた 1 μ g/g 添加豚肝臓のクロマトグラムを図 3 に示した。AAP のピーク付近に妨害ピークはほとんど認められず、良好な精製効果が確認できた。

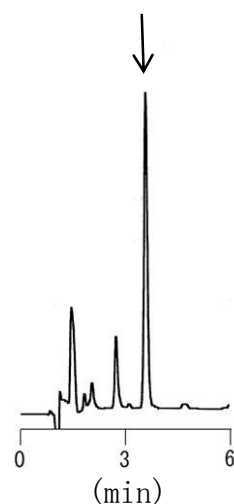


図 3 豚肝臓を用いた試験溶液 (1 μ g/g 添加)

4. 添加回収試験

豚肝臓及び筋肉に、AAP の試料中濃度がそれぞれ $1.0 \mu\text{g/g}$ 、 $0.3 \mu\text{g/g}$ となるように添加し回収率を求め、その結果を表 2 に、クロマトグラムを図 4 に示した。回収率はそれぞれ 78.8 及び 75.1%、変動係数は 3.6 及び 2.3% と良好な結果が得られた。なお、豚肝臓は、試料によっては AAP のピーク付近に妨害ピークが認められたため、AAP 定量値は試験溶液から得られた値から、ブランク溶液から得られた値を差し引いたものとした。以上の結果より、豚組織については HPLC-UV で十分測定可能であった。

まとめ

豚組織中に残留する AAP の分析法について検討した。試料をアセトニトリルと *n*-ヘキサンでホモジナイズした後、得られたアセトニトリル層を *n*-ヘキサンで洗浄した。

表2 アセトアミノフェンの豚肝臓及び筋肉からの回収率

	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	変動係数 (%)
豚肝臓	1.0	78.8	3.6
豚筋肉	0.3	75.1	2.3

n=3

洗浄後、アセトニトリル層を減圧濃縮し、残渣を 5%メタノールで溶解後 Oasis HLB カートリッジに負荷し、その後 10%メタノールで洗浄した。カートリッジ内の水分を除いた後、酢酸エチルで溶出し、減圧濃縮後、残渣を水で溶解し調製した試験溶液を HPLC-UV で分析した。本分析法の定量下限値は試料中濃度で $0.03 \mu\text{g/g}$ であり、豚肝臓及び筋肉を用いて添加回収実験を行ったところ、回収率 78.8 及び 75.1%、変動係数は 3.6 及び 2.3% と良好な結果が得られたことから、基準値が設定されている豚組織の分析法として、有用性が示唆された。その一方で、肝臓のような夾雑成分が多い試料では、それらが定量値に影響する場合があります。確認法が不可欠である^{7),8)}。また、豚以外の一律基準 0.01 ppm が適用される食品の分析においては、UV 検出器では選択性や感度等が不十分である。そのため、厚生労働省より示されている、「残留農薬等試験法検討実施要領」に従って、選択性や感度等が十分である質量分析計を検出器として用いた、より感度の高い分析法を開発する必要性が示唆された。

本研究は「厚生労働省医薬食品局食品安全部残留農薬等に関するポジティブリスト制導入に関わる分析法開発事業」により実施した。

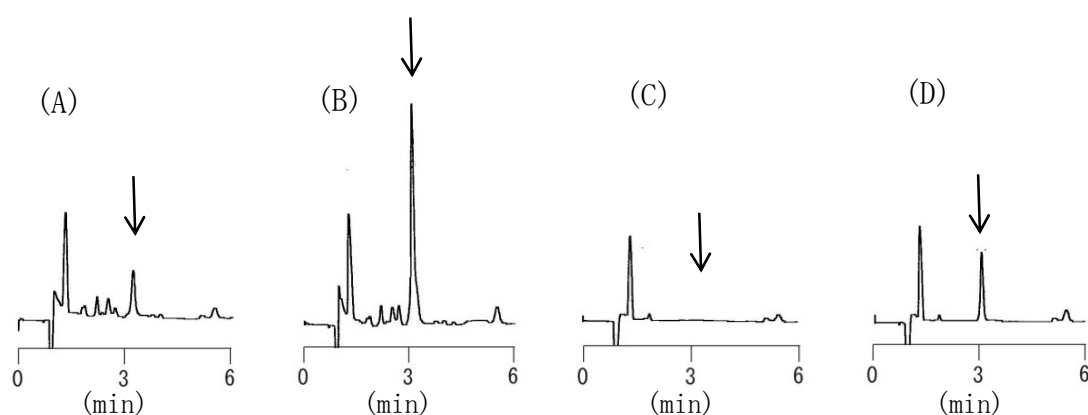


図 4 添加回収実験によるクロマトグラム (豚肝臓 $1 \mu\text{g/g}$ 添加、豚筋肉 $0.3 \mu\text{g/g}$ 添加) :

- (A) 豚肝臓の試験溶液 (ブランク)
- (B) 豚肝臓の試験溶液 ($1 \mu\text{g/g}$ 添加)
- (C) 豚筋肉の試験溶液 (ブランク)
- (D) 豚筋肉の試験溶液 ($0.3 \mu\text{g/g}$ 添加)

参考文献

- 1) 第十七改正日本薬局方:平成 28 年 3 月 7 日
付け厚生労働省告示第 64 号
- 2) 食品安全委員会:動物用医薬品評価書
アセトアミノフェン 第 2 版 2011.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知
“食品、添加物等の規格基準の一部を改
正する件について”平成 23 年 2 月 16 日
付け食安発 0216 第 1 号
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知
“食品、添加物等の規格基準の一部を改
正する件について”平成 25 年 7 月 2 日付
け食安発 0702 第 1 号
- 5) 中島純夫, 南部佳弘, 柏原 守, 矢野公一:
札幌市内河川水及び下水放流水中の医薬
品等調査結果について. 札幌市衛生研究
所年報 36:67-74, 2009.
- 6) 鈴木俊也:水環境中のヒト用医薬品の存
在実態及び環境中濃度の予測. 東京都健
康安全研究センター研究年報 63:69-81,
2012.
- 7) 濱田寛尚, 山本理世, 村川 弘:畜産物内
蔵中残留動物用医薬品の一斉分析法の検
討. 熊本県保健環境科学研究所報 42:50-
59, 2012.
- 8) 堀江正一:畜産物中に残留する動物用医
薬品の規制と分析法. モダンメディア
61(5):20-27, 2015.

Determination of acetaminophen residues in swine tissues

Saki Hotta, Tomomi Goto, Yoshitaka Ichikawa, Yoshitomo Ikai, Minae Watanabe,
Yasuko Koike

A determination method using HPLC-UV for residual acetaminophen in swine tissues was developed. Acetaminophen concentration of extracts obtained by precipitation with acetonitrile and *n*-hexane following cleaning-up by Oasis HLB SPE cartridge was determined using HPLC-UV. Satisfactory separation was observed on the chromatogram of the test solution obtained from swine liver, which is one of the most difficult animal tissues containing various interfering substances for analysis. The method was further evaluated for recovery test from swine liver and muscle at the maximum residue limit allowed for each tissue. The results were 78.8-75.1% and 3.6-2.3%, respectively, as the ranges of recovery and coefficient of variance, suggesting that the method is applicable to the routine analysis of residual acetaminophen in swine tissues.

Key words : acetaminophen, swine, residue analysis, HPLC-UV

調 査 研 究

固相抽出—GC/MS 法による水中のかび臭分析法の検討

服部靖子、加藤千佳、猪飼誉友、富田浩嗣、棚橋高志、小池恭子

要 旨

かび臭物質の検査法として告示により通知されている、固相抽出—GC/MS 法による水道水中のジェオスミン及び 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 試験法の改良を検討した。主な変更点は、固相カートリッジの脱水に窒素ガス通気を採用したことと、固相カートリッジからかび臭物質を溶出する溶媒に酢酸エチルを用いたことである。この改良法を用いて、妥当性評価を行ったところ、ジェオスミンは真度 100.6%、併行精度 5.7%及び室内精度 7.1%、2-MIB は真度 105.8%、併行精度 1.4%及び室内精度 3.5%と良好な結果が得られ、かび臭物質の検査法として有用であることが示唆された。

キーワード：ジェオスミン、2-メチルイソボルネオール (2-MIB)、固相抽出、GC/MS

序 文

かび臭物質であるジェオスミン及び 2-メチルイソボルネオール (以下、2-MIB という) は、水道における異臭防止の観点から水道水質基準項目に位置付けられている¹⁾。これらの物質は、極微量で人が不快と感ずることから、いずれも 0.000001 mg/L 以下と低い基準値が設定されており、その検査には試料を高倍率で濃縮することが必要である。

告示法²⁾で規定されているかび臭物質の検査方法には、ページ・トラップ—GC/MS (Gas chromatograph Mass spectrometer) 法、ヘッドスペース—GC/MS 法及び固相抽出—GC/MS 法があり、それぞれ異なった濃縮過程を経て微量分析を可能としている。これらのなかで、固相抽出—GC/MS 法は、時間のかかる煩雑な前処理を必要とするものの、汎用の GC/MS 装置のみで測定が可能であるという特徴がある。一方、ページ・トラップ—GC/MS 法及びヘッドスペース—GC/MS 法は、固相抽出—GC/MS 法と比べ、前

処理工程が少なくコンタミネーションが生じにくい優れた方法であるが、高価な専用の濃縮装置を必要とするため、トラブル等で装置が使えない場合には、採水から測定開始まで 72 時間以内という告示法の規定を遵守できない危険性がある。このような事態に備えて、ページ・トラップ—GC/MS 法やヘッドスペース—GC/MS 法を採用している施設では、固相抽出—GC/MS 法についても条件検討や妥当性評価を実施し、いつでも適用できる準備をしておくことが望ましい。

告示に示された固相抽出—GC/MS 法は、検水を固相カートリッジに通水して、かび臭物質を保持・濃縮後、ジクロロメタンで溶出し、溶出液を濃縮して GC/MS により測定する方法である。溶出の際に固相カートリッジ内部に水分が残っているとかび臭物質を効率よく回収できないため、脱水が不可欠であり、告示法では遠心分離により水分を除去し、水分除去が十分でない場合に脱水カートリッジを用いるとされている。しかし、ほとんどの場合、遠心分離のみで

は固相カートリッジ内部の水分を十分に除去できないため、脱水カートリッジを用いる必要があり、操作が増えることによる再現性への悪影響、及び脱水カートリッジから溶出する夾雑物が定量下限値付近の定量性に及ぼす影響などが懸念される。固相抽出-GC/MS 法におけるもう一つの問題点は、固相カートリッジからかび臭物質を溶出するのに使用するジクロロメタンである。ジクロロメタンは、人体への悪影響や環境汚染のみならず、水質基準項目であることから、水質検査では極力使用を控える必要がある。

本研究では、固相カートリッジの脱水方法及び溶出溶媒について検討することにより固相抽出-GC/MS 法によるかび臭分析法の改良を行うと共に、その方法の妥当性評価を実施した。

装置及び方法

1 試薬

ジクロロメタン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用（和光純薬工業(株)）、アセトン及びメタノールは残留農薬試験・PCB 試験用（関東化学(株)）を用いた。メチル-*tert*-ブチルエーテル（以下、MTBE という）

及びヘキサンは水質試験用（関東化学(株)）を用いた。

精製水は NANOpure Diamond UV（サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)）を用いて調製したものを使用した。

固相抽出カートリッジは Sep-Pak Plus C18（日本ウォーターズ(株)）を用いた。脱水カートリッジはハイドロ・カラム（(株)ユニフレックス）を用いた。

2 混合標準液及び内部混合標準液

混合標準原液は水質試験用ジェオスミン及び 2-MIB 混合標準原液（関東化学(株)）を用いた。これをメタノールで希釈し、1 mg/L に調製したものを混合標準液とした。

ジェオスミン- d_3 及び 2, 4, 6-トリクロロアニソール- d_3 は水質試験用（和光純薬工業(株)）を用いた。それぞれメタノールで希釈し、ジェオスミン- d_3 及び 2, 4, 6-トリクロロアニソール- d_3 を 0.5 mg/L 及び 2 mg/L に調製し、内部混合標準液とした。

3 装置及び測定条件

固相抽出装置はアクアローダー SPL698T 及び SPL698（ジーエルサイエンス(株)）を用いた。GC/MS の装置及び測定条件は表 1 に示した。

表 1 装置及び測定条件

装置：GC/MS (Agilent 5975B、アジレント・テクノロジー(株)製)
カラム：ENV-5MS (0.25 mm i.d. × 30 m、0.25 μm、関東化学(株)製)
昇温条件：60°C (1 min) → 10°C/min → 160°C → 20°C/min → 280°C (5 min)
注入方式：スプリットレス注入
キャリアガス（流量）：ヘリウム (1.0 mL/min 定流量制御)
イオン化法：電子イオン化法 (70 eV)
測定法：選択イオン測定法
注入量：1 μL
注入口温度：250°C
インターフェイス温度：250°C
モニターイオン：ジェオスミン
定量イオン： m/z 112
確認イオン： m/z 111
内部標準定量イオン： m/z 115
2-MIB
定量イオン： m/z 95
確認イオン： m/z 107
内部標準定量イオン： m/z 213

4 分析操作

(1) 脱水方法

告示法に従い、活性化した固相カートリッジに精製水 500 mL を通水した後、流量を変えて窒素ガスを通気し、乾燥に要した時間を測定した。乾燥終了は、図 1 に示す自家製の器具により判断した。

(2) 溶出溶媒

告示法に従い、溶出溶媒、メタノール、精製水各 5 mL で活性化した固相カートリッジに、ジェオスミン及び 2-MIB を各 0.0005 mg/L、内部標準物質としてジェオスミン- d_3 を 0.5 μ g/L、2,4,6-トリクロロアニソール- d_3 を 2 μ g/L をそれぞれ含む試験溶液 5 mL を通水した。通水後のカートリッジに窒素ガスを 1 L/min で 30 分間通気して乾燥させた後、保持されたかび臭物質等を溶出溶媒 2 mL で溶出した。溶出液を窒素気流下で 0.5 mL 以下まで濃縮後、溶出溶媒を加えて 0.5 mL とし、GC/MS により両かび臭物質濃度を測定し回収率を求めた。

(3) 妥当性評価

精製水にジェオスミン及び 2-MIB を

0.000001 mg/L になるように添加した試料 500 mL に内部混合標準液 5 μ L を加え、妥当性評価用の試料とした。

この試料を予め酢酸エチル 5 mL、メタノール 5 mL 及び精製水 5 mL を順次注入し、活性化した固相カートリッジに、固相抽出装置を用いて毎分 15 mL で通水した。その後、窒素ガス 1 L/min で 30 分間通気して水分を除去し、保持されたかび臭物質等を酢酸エチル 2 mL で溶出した。その溶出液を窒素気流下で 0.5 mL 以下まで濃縮した後、酢酸エチルを加えて 0.5 mL とし、GC/MS により両かび臭物質濃度を測定し回収率を求めた。検査員 2 名で 2 併行 3 日間の測定を行った。図 2 にその概要を示した。

結果及び考察

1 前処理条件の検討

(1) 脱水方法の改良

固相カートリッジの脱水方法として、脱水カートリッジを用いる方法以外にも溶出前に窒素ガス通気によりカートリッジを乾燥させるという方法がある。これは、水道水や水道原水の農薬やフェノールなどの分

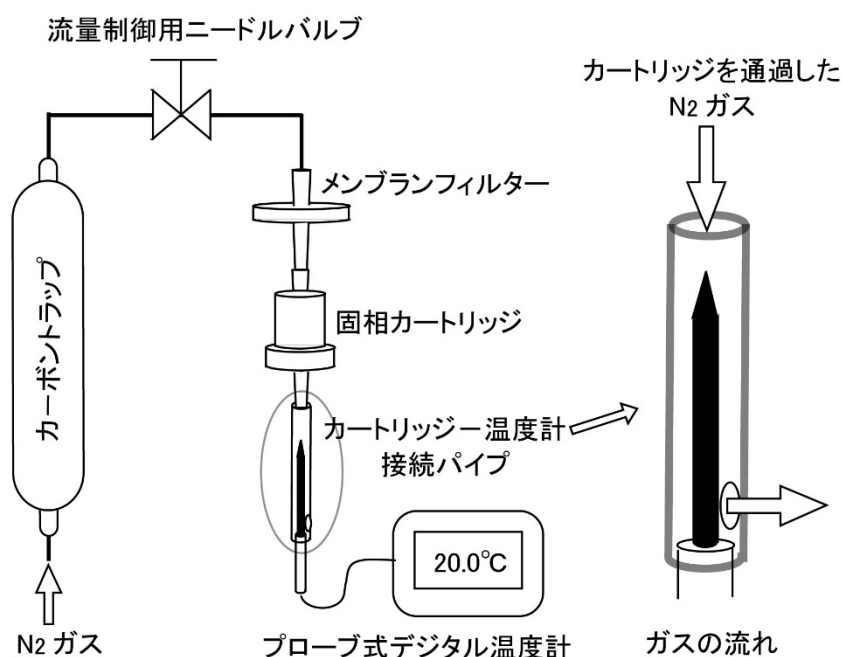


図 1 脱水装置

析にも用いられている優れた方法であるが、時間がかかるといった問題がある。かび臭分析に適用した越智ら³⁾によると、60分の通気時間により、妨害ピークの出現が報告されている。我々は、窒素ガス通気乾燥法の問題点は、乾燥終了の見極めが難しい点にあると考えた。すなわち、それを超過しても固相カートリッジからの目的物の溶出性には変わりはないどころか、窒素ガスや時間の無駄になるだけでなく、窒素ガスに含まれる微量の夾雑物質がカートリッジ中に蓄積し、それらが目的物とともに溶出された場合、分析の妨害ともなりうるからである。しかしながら、カートリッジの種類や水分の量、通気流量などで乾燥に要する時間は変化するものの、その終了を明確に判断する方法がないため、十分な余裕を持たせた時間を設定することが一般的である。

上述の問題を解決する方法として、我々は図1に示す簡単な器具を考案した。これは固相カートリッジを通過するガスの温度をモニターして、固相カートリッジ中に水分が残留している間通過するガスは、気化熱を奪われ温度が下がるが、水分がなくなれば常温に戻ることから、乾燥が終了したことを知ることができる器具である。この

器具を用い、告示法に従って処理した固相カートリッジの乾燥所要時間を測定した結果を表2に示した。現在、当所では固相カートリッジを6個同時に窒素ガス通気させており、その際のガス流量は1 L/minが上限である。そのため、固相カートリッジの乾燥時間を窒素ガス流量1 L/minで30分とし、その条件で0.0005 mg/Lに調製した試料を検査した結果を表3に示した。回収率はジェオスミンが94.0%、2-MIBが95.1%、変動係数(CV)はジェオスミンが1.5%、2-MIBが3.1%となった。脱水カラムを用いた場合と比較して窒素ガス通気は、よりバラツキの少ない良好な結果を得ることができた。また、上記器具を用いればカートリッジが乾燥したことを客観的に判断でき、それに要する時間を必要最小限にできると考えられた。

表2 窒素ガスの流速と乾燥時間 (n=3)

流速 (L/min)	時間 (min)
0.5	21~27
1	19~22
2	13~15
5	9~12

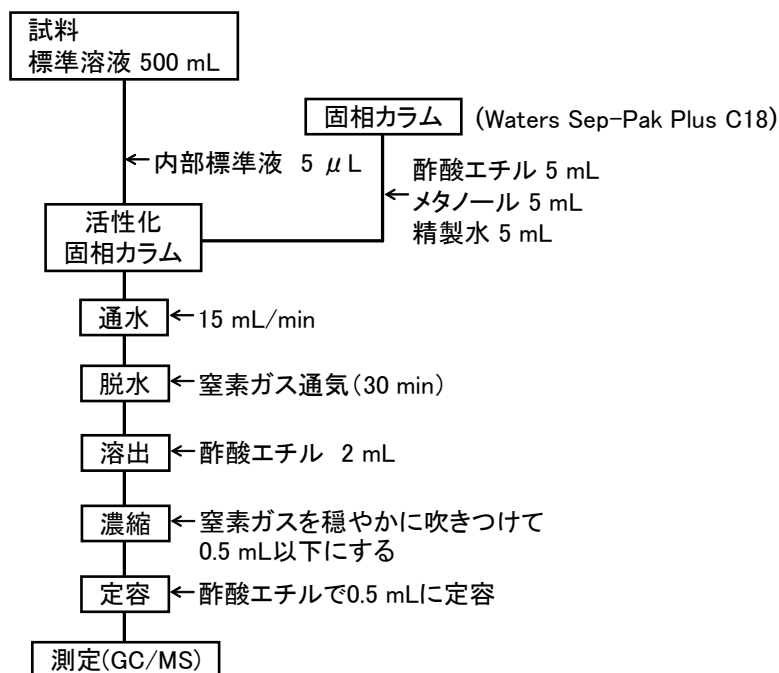


図2 試験溶液の調製方法

(2) 溶出溶媒の検討

ジクロロメタンに代わる固相カートリッジの溶出溶媒として、溶出後の濃縮操作を考慮し、処理のしやすい溶媒としてアセトン、酢酸エチル、MTBE、ヘキサンを選択し検討を行った。表4に示すとおり、アセトン、酢酸エチル及びMTBEでは、回収率が90%以上であり、固相に保持したかび臭成分を十分に溶出可能であることが示唆された。しかし、水質管理目標設定項目⁴⁾として測定を行っているMTBEは揮発性が高く、日常的な使用はその測定に悪影響を及ぼす可能性が考えられた。そのため、溶出溶媒としてアセトン及び酢酸エチルを用いて、検量線の直線性の検討を行った。

検量線の濃度範囲を0.00005 mg/L～0.001 mg/Lとし、カートリッジからの溶出溶媒にアセトン及び酢酸エチルを用いて5回繰り返し実験を行った。その結果、アセトンを用いた検量線の決定係数(r^2)はジェオスミンが0.996～0.999、2-MIBが0.997～0.999、酢酸エチルを用いた検量線の決定係数(r^2)はジェオスミンが0.995～0.999、2-MIBが0.994～0.999と、いずれの溶媒においても良好な直線性が認められ

た。しかしながら、アセトン溶出した2-MIBの検量線において、測定ごとのレスポンス値が大きく変動し、傾きにばらつきが認められた(図3及び図4)。以上より、溶出溶媒には酢酸エチルを用いることとした。

2 妥当性評価

妥当性評価にあたり、ジェオスミン及び2-MIBの添加濃度を定量下限値である0.000001 mg/Lとし、真度、併行精度及び室内精度を算出した。妥当性評価の実施中、ジェオスミンのピーク付近に妨害ピークが現れることがあった(図5)。このような妨害ピークは比較的新しい固相カートリッジ使用時には見られず、長期間保存したものを使用した場合にみられることが多いことから、カートリッジの包装を開封した後の室内空気による汚染が原因と考えられた。そのため、開封後のカートリッジは活性炭デシケータに保存して用いることとした。

妥当性評価の結果、表5のとおり、ジェオスミンは、真度100.6%、併行精度5.7%及び室内精度7.1%、2-MIBは、真度105.8%、併行精度1.4%及び室内精度3.5%となり、いずれも妥当性評価ガイドラインの目標⁵⁾を満たし、良好な結果が得られた。

表3 脱水の検討結果

	添加濃度 (mg/L)	ジェオスミン (n=3)		2-MIB (n=3)	
		回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)
脱水カラム	0.0005	98.7±0.5	0.5	104.4±11.7	11.2
窒素通気(30分)		94.0±1.4	1.5	95.1±2.9	3.1

表4 抽出溶媒による検討結果

溶媒	添加濃度 (mg/L)	ジェオスミン (n=3)		2-MIB (n=3)	
		回収率(%)	CV(%)	回収率(%)	CV(%)
ジクロロメタン	0.0005	98.7±0.5	0.5	104.4±11.7	11.2
アセトン		97.4±0.7	0.7	107.5±6.2	5.8
酢酸エチル		95.6±3.1	3.2	91.2±7.5	8.2
MTBE		96.4±1.9	2.0	118.2±3.4	2.8
ヘキサン		0±0	0	0±0	0

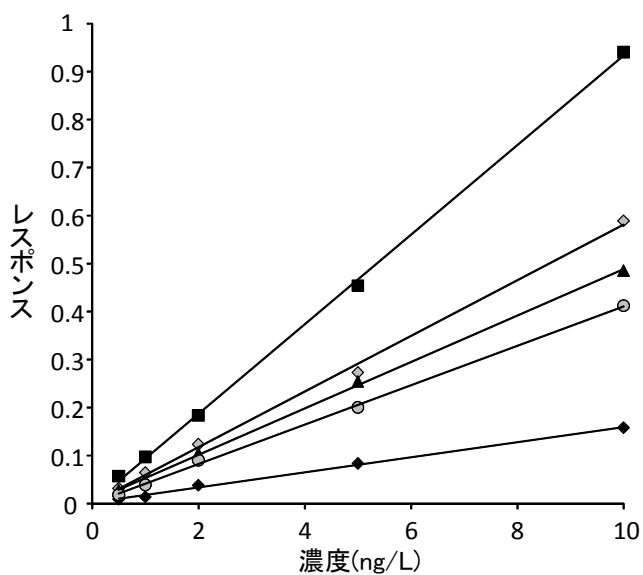


図3 2-MIBの検量線（アセトン）

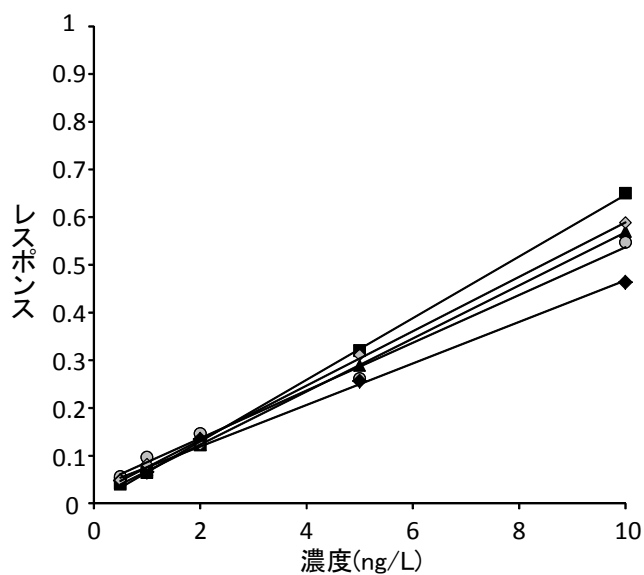


図4 2-MIBの検量線（酢酸エチル）

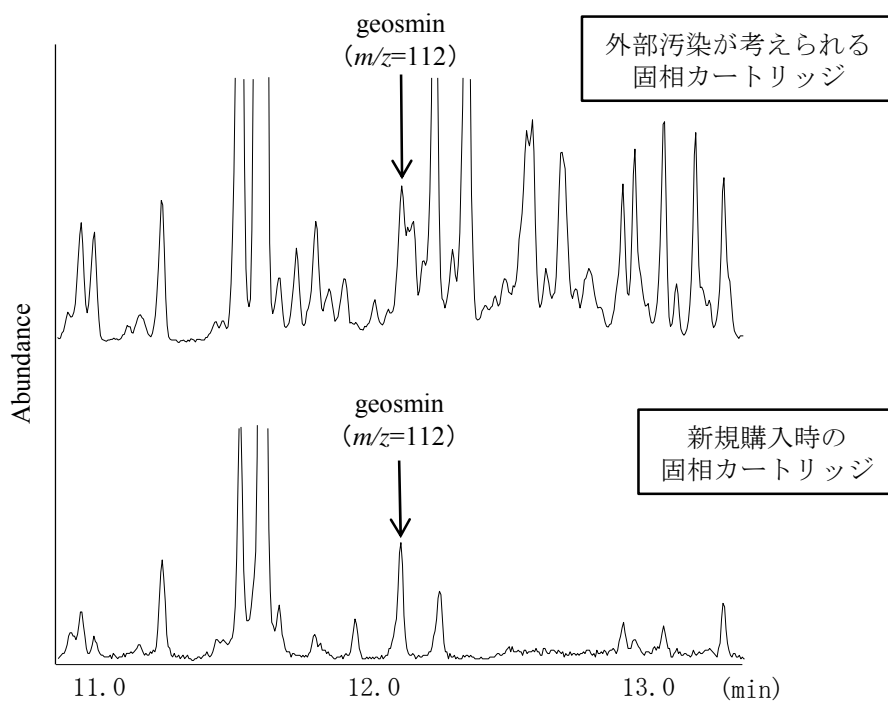


図5 ジェオスミン (0.000001 mg/L) のクロマトグラム

表5 妥当性評価結果

	ジェオスミン	2-MIB	目標
真度(%)	100.6	105.8	70-120
併行精度(%)	5.7	1.4	<25
室内精度(%)	7.1	3.5	<30

まとめ

固相抽出-GC/MS 法によるカビ臭物質 ジェオスミン及び 2-MIB の測定について改良を検討した。固相カラムの水分を除去する方法として 30 分間の窒素通気を、溶出溶媒には、酢酸エチルをそれぞれ採用した。その結果、ジェオスミンでは、真度 100.6%、併行精度 5.7% 及び室内精度 7.1%、2-MIB では、真度 105.8%、併行精度 1.4% 及び室内精度 3.5% と良好な結果が得られた。以上の結果は、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしており、本改良法は水道中のかび臭物質の検査法として有用であることが示唆された。

文 献

1) 水質基準に関する省令：平成 15 年 5 月

30 日付け厚生労働省令第 101 号

2) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法：平成 15 年 7 月 22 日付け厚生労働省告示第 261 号

3) 越智雄基，田坂由里，宮本紫織，吉田紀美，西原伸江，大倉敏裕：ページ・トラップ GC/MS 等水道法告示 3 法による水中かび臭物質分析法の妥当性評価．愛媛県立衛生環境研究所年報 17:7-11，2014.

4) 水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について：平成 15 年 10 月 10 日付け健水発第 1010001 号厚生労働省通知

5) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラインについて：平成 24 年 9 月 6 日付け健水発 0906 第 1 号厚生労働省通知

Examination of the analysis of musty odor substances in water by solid-phase extraction gas chromatography mass spectrometry (SPE-GC/MS)

Yasuko Hattori, Chika Katou, Yoshitomo Ikai, Kouji Tomita, Takashi Tanahashi,
Yasuko Koike

Improvement of official method for musty odor substances, geosmin and 2-methylisoborneol (2-MIB) in drinking water was conducted, and the resultant proposed method was validated in this study. In the original method, the two analytes were eluted from solid phase extraction (SPE) cartridge by use of dichloromethane and the eluate was applied to GC/MS after elimination of water by dehydration column. In the proposed method, the SPE procedure was altered: namely the two analytes were eluted from the cartridge with ethyl acetate after drying-up the cartridge by aeration of nitrogen gas. The results of validation revealed that average recovery, intermediate precision and repeatability were 100.6%, 5.7% and 7.1%, respectively, for geosmin and 105.8%, 1.4% and 3.5%, respectively, for 2-MIB, confirming high-precision of the method.

Key words : geosmin, 2-methylisoborneol(2-MIB), solid-phase extraction, GC/MS

 他誌掲載論文抄録

Molecular Epidemiology of Rubella Virus Strains Detected Around the Time of the 2012-2013 Epidemic in Japan.

Mori Y¹, Miyoshi M², Kikuchi M³, Sekine M⁴, Umezawa M⁵, Saikusa M⁶, Matsushima Y⁷, Itamochi M⁸, Yasui Y, Kanbayashi D⁹, Miyoshi T¹⁰, Akiyoshi K¹¹, Tatsumi C¹², Zaito S¹³, Kadoguchi M^{14,15}, Otsuki N¹, Okamoto K¹, Sakata M¹, Komase K^{1,16}, Takeda M¹

¹Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, ²Hokkaido Institute of Public Health, ³Sapporo City Institute of Public Health, ⁴Sendai City Institute of Public Health, ⁵Ibaraki Prefectural Institute of Public Health, ⁶Yokohama City Institute of Public Health, ⁷Kawasaki City Institute for Public Health, ⁸Toyama Institute of Health, ⁹Osaka Prefectural Institute of Public Health, ¹⁰Sakai City Institute of Public Health, ¹¹Kobe Institute of Health, ¹²Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ¹³Fukuoka City Institute of Health and Environment, ¹⁴Kumamoto City Environmental Research Center, ¹⁵Kumamoto City Hospital, ¹⁶Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases

Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/fmicb.2017.01513, 2017

A nationwide rubella epidemic occurred from 2012 to 2013 in Japan, resulting in around 17,000 rubella cases and the birth of 45 infants with congenital rubella syndrome. The aim of this study was to genetically characterize the rubella viruses (RVs) circulating around the time of the epidemic in Japan. In total, 221 RV strains detected from 14 prefectures in Japan between 2010 and 2014 were sequenced in the 739 nucleotide-window region within the E1 gene. The virus strains were chronologically and geographically characterized into groups based on phylogenetic analysis. Among the 221 strains analyzed, 192 (87%), 26 (12%), and 3 (1%) strains were classified into genotypes 2B, 1E, and 1J, respectively. The majority (n D 184) of

the genotype 2B strains belonged to lineage 2B-L1 and shared nucleotide homology with the strains detected in Southeast and East Asian countries. Phylogenetic analyses demonstrated that at least six distinct clusters of RV strains (clusters 1–6) induced outbreaks in Japan between 2010 and 2014. Among them, strains from clusters 3, 4, and 6 circulated almost simultaneously during 2012–2013. The cluster 3 strains circulated locally, whereas strains from cluster 4 spread nationwide. The findings suggest that RVs were introduced into Japan many times from neighboring countries. The 2012–2013 epidemic was a complex of outbreaks induced by at least three clusters of RV strains.

あまり知られていない食中毒 アイチウイルスとサポウイルスによる集団食中毒

山下照夫¹、皆川洋子

¹現 修文大学

公衆衛生 81(6):500-504, 2017

アイチウイルスとサポウイルスによる集団食中毒について、当所が関わった事例を含む国内外事例の概要・特徴、疫学、原因

食品、病原体、臨床症状、病原体診断、治療法・予防法等の項目別に、簡潔に特徴を概説した。

麻疹の抗体保有状況—2016年度感染症流行予測調査（暫定結果）

多屋馨子¹、佐藤弘¹、大石和徳¹、駒瀬勝啓²、竹田誠²、愛知県衛生研究所他（麻疹感受性調査実施都道府県）

¹国立感染症研究所感染症疫学センター、²国立感染症研究所ウイルス第三部
病原微生物検出情報 38(3):54-55, 2017

感染症流行予測調査における麻疹の感受性検査は1978年度からほぼ毎年実施されている。乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層を対象とし、予防接種状況ならびに抗体保有状況について調査を行っている。2016年度はわが国における麻疹排除認定（2015年3月）1年後の調査となり、抗体保有状況調査は今後の麻疹対策および麻疹排除の維持を継続していく上で重要である。

2016年度の調査において、麻疹の抗体保

有率は2015年度調査に続き2歳以上のすべての年齢／年齢群で95%以上を示し、高い抗体保有率が維持されていた。一方、すべての年齢層にPA抗体価1:128未満の低い抗体価の者が存在することから、麻疹の排除状態を維持するため、引き続き麻疹患者が1人発生した時の迅速な感染拡大予防策に加え、渡航前の麻しん含有ワクチンの接種ならびに高い予防接種率・抗体保有率の維持が重要である。

Allele-specific RT-PCR 薬剤耐性マーカー検出法にエスケープ変異を持ったA(H1N1)pdm09分離株—愛知県

安井善宏、齋藤典子、尾内彩乃、松本昌門、皆川洋子

病原微生物検出情報 38(5):22, 2017

2016/17シーズンに分離されたAH1pdm09ウイルス株について、インフルエンザ診断マニュアル第3版に記載のAllele-specific RT-PCR法にて薬剤耐性編の検出を行ったところ、薬剤感受性（275H）と薬

剤耐性（275Y）の両方とも検出されない株が存在した。この株では検出プローブ領域に相当する831番目の塩基にGからAへの置換が存在したため、検出プローブのアニールリングに影響したと考えられた。

2007～2016 年度のヒトの日本脳炎中和抗体保有状況ならびに日本脳炎ワクチン接種状況

新井智¹、佐藤弘¹、奥野英雄¹、森野紗衣子¹、多屋馨子¹、大石和徳¹、林昌宏²、田島茂²、西条政幸²、愛知県衛生研究所他（感染症流行予測調査事業日本脳炎感受性調査実施都府県）

¹国立感染症研究所感染症疫学センター、²国立感染症研究所ウイルス第一部

病原微生物検出情報 38(8):159-161, 2017

2016 年度感染症流行予測調査事業に基づき報告された日本脳炎ワクチン接種率は 53.6%であった。年齢別では 7 歳をピーク（96.6%）として加齢とともに減少が認められた。2016 年度感染症流行予測調査では 6 都府県の合計 1,599 名について日本脳炎中和抗体価が測定され、1:10 以上の抗体保有率は、0～5 か月齢 50.0%、6～11 か月齢 5.9%、1 歳 8.0%、2 歳 15.5%、3 歳 68.0%、4 歳 87.1%、5 歳 89.3%であった。日本脳

炎ワクチンの定期予防接種の積極的勧奨の再開により高い接種率が維持され、抗体保有率も高く維持されていることが推察される。抗体保有率の最も低い年齢群は年代とともに高齢者側へ移動しており、2016 年度の調査では 55～59 歳群まで移動している。高齢者の日本脳炎発症予防のために、今後は高齢者の抗体保有率の推移を注視していく必要がある。

わが国のブタにおける日本脳炎に対する HI 抗体保有状況（2016 年感染症流行予測調査より）

佐藤 弘¹、新井 智¹、森野紗衣子¹、奥野英雄¹、多屋馨子¹、大石和徳¹、林 昌宏²、田島 茂²、西条政幸²、愛知県衛生研究所他（日本脳炎感染源調査実施都道府県）

¹国立感染症研究所感染症疫学センター、²国立感染症研究所ウイルス第一部

病原微生物検出情報 38(8):161-162, 2017

2016 年度は 33 道県の合計 3,537 頭について、日本脳炎感染源調査[ブタにおける日本脳炎ウイルスに対する赤血球凝集抑制抗体（HI 抗体）保有状況調査]が実施された。2016 年の 9 月末までに 26 道県で HI 抗体価 1:10 以上（抗体陽性）のブタが確認され、そのうち 17 県（17/26:65.4%）で抗体陽性率が 50%

を超えた。これは 2014 年度及び 2015 年度と同様の傾向であった。また、九州及び四国では抗体陽性のブタが確認されたすべての地域で 80%以上の高い抗体陽性率が確認された。北海道では 2 年連続の HI 抗体が確認された。引き続きワクチン接種や蚊対策等による感染・発症予防対策が必要である。

エンテロウイルス検査の信頼性確保について

吉田 弘¹、高橋雅輝²、濱崎光宏³、山下育孝^{4,5}、四宮博人⁴、山下照夫⁶、皆川洋子、岸本剛⁷、調 恒明⁸

¹国立感染症研究所、²岩手県環境保健研究センター、³福岡県保健環境研究所、⁴愛媛県立衛生環境研究所、⁵現 愛媛県宇和島保健所、⁶現 修文大学、⁷埼玉県衛生研究所、⁸山口県環境保健センター

病原微生物検出情報 38(10):199-200, 2017

感染症発生動向調査は 1981 年より国の予算事業として始まり、1999 年の感染症法制定に伴い法定化された。感染症法では疾患を類型で分類し、主にエンテロウイルス感染が起因となる疾患は、2 類感染症として急性灰白髄炎（ポリオ）、5 類定点把握対象疾患には手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎が含まれている。5 類定点把握対象疾患は、患者数が多く全数把握が困難なため、定点報告にて発生動向を把握し、病原体定点医療機関より提供を受けた検体に対して検査を行いウイルスの流行状況を監視してきた。2014 年の感染症法改正では感染症の情報収集強化を目的とし、病原体サーベイランスに法的根拠が付与された。改正ではポリオを含む 2 類感染症の検査は、迅速な危機管理対応が必要となり、知事による検体の提出要請、採取措置などが新たに規定され、入手した検体に対する検査の質確保の取り組みが省令で定められた。また、検査施設における病原体等検査の業務

管理要領では感染症法に基づき検査を行う地衛研等を対象とした業務管理が規定された。要領には、各種標準作業書（SOP）の作成、組織として検査の質を確保するための必要な項目が記載された。ポリオウイルス検査の場合、まん延防止の観点から偽陰性対策を念頭に置きつつ、要領に基づき各種技術文書の整備、検査の信頼性評価、内部監査体制等の検査体制を整備する必要がある。他方、エンテロウイルス血清型等の情報収集を主目的とする検査には、必要最小限の技術文書を作成し、自治体の調査目的に合致した検査体制を各地衛研等に整備することとしている。病原体検査の業務管理要領で検査結果の質を担保し、実施要綱で病原体定点の選定、報告時期など、一定の基準を示すことで、起因ウイルスの流行像をより適切に把握できるよう内容が変更されている。こうして得られた結果は疫学的な解析により自治体の感染症対策に用いられることが期待されている。

2016/17シーズンのインフルエンザ分離株の解析

中村一哉¹、藤崎誠一郎¹、高下恵美¹、白倉雅之¹、岸田典子¹、桑原朋子¹、佐藤彩¹、秋元未来¹、三浦秀佳¹、小川理恵¹、菅原裕美¹、渡辺佳世¹、渡邊真治¹、小田切孝人¹、**地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ（安井善宏他）**

¹国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

病原微生物検出情報 38(11):212-218, 2017

2016/17 シーズンのインフルエンザは、2016 年第 46 週に定点当たりの報告が 1 を超え、流行期に突入した。これは前シーズンより 7 週早い流行入りであった。国内のインフルエンザウイルスの流行は A(H1N1)pdm09、A(H3N2)および B 型の混合流行であったが、A(H3N2)ウイルスが 2014/15

シーズン以来 2 シーズンぶりに流行の主流であった。国立感染症研究所では 2016/17 シーズンに全国の地方衛生研究所で分離および型・亜型同定されたウイルスの約 10% について分与を受け、ヘマグルチニン遺伝子系統樹解析、抗原性解析および抗インフルエンザ薬耐性の検出と性状解析を行った。

2015/16 シーズンのインフルエンザ予防接種状況および 2016/17 シーズン前のインフルエンザ抗体保有状況－2016 年度感染症流行予測調査より

佐藤 弘¹、多屋馨子¹、大石和徳¹、渡邊真治²、小田切孝人²、愛知県衛生研究所他（インフルエンザ感受性調査・予防接種歴調査実施都道府県）

¹国立感染症研究所感染症疫学センター、²国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

病原微生物検出情報 38(11):221-223, 2017

インフルエンザ感受性調査はインフルエンザの全国的流行が始まる前にインフルエンザに対する国民の抗体保有状況を把握し、抗体保有率が低い年齢層に対する注意喚起等を目的としている。調査の結果、A(H1N1)pdm09 亜型では 5 歳～20 代、A(H3N2)

亜型では 5 歳～10 代、B 型（山形系統）では 20 代の抗体保有率が他の年齢層と比較して高い傾向が見られた。また、0～4 歳群および 60 代以上の年齢群における抗体保有率は A(H3N2)亜型を除き相対的に低い傾向が見られた。

Specific *bla*CTX-M-8/*IncI1* plasmid transfer among genetically diverse *Escherichia coli* Isolates between humans and chickens

Norizuki C¹, Wachino JI², Suzuki M, Kawamura K¹, Nagano N³, Kimura K², Arakawa Y²

¹Department of Pathophysiological Laboratory Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine, ²Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, ³Department of Health and Medical Sciences, Shinshu University Graduate School of Medicine

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 61(6):e00663-17. doi: 10.1128/AAC.00663-17, 2017

We investigated the genetic backbones of 14 *bla*CTX-M-8-positive *Escherichia coli* isolates recovered from human stool samples and chicken meat. All isolates carried IncI1 plasmids with *bla*CTX-M-8 (*bla*CTX-M-8/IncI1), and most (9/14) belonged to a specific genetic lineage, namely, plasmid sequence type 113

(pST113). The genetic contexts of the nine *bla*CTX-M-8/IncI1 pST113 plasmids were similar, regardless of the source. These results suggest the probable local transfer of *bla*CTX-M-8/IncI1 between humans and chickens with genetically diverse *E. coli*.

A case study of rat bite fever caused by *Streptobacillus moniliformis*

Hayakawa Y¹, Suzuki J², Suzuki M, Sugiura W³, Ohkusu K⁴

¹Department of Clinical Laboratory, ²Division of General Internal Medicine, ³Department of Immunology and Infectious Diseases, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, ⁴Department of Microbiology Tokyo Medical University

Japanese Journal of Infectious Diseases 70(3):323-325, 2017

We report a case of rat bite fever, diagnosed based on positive cultures of *Streptobacillus moniliformis* from blood and synovial fluid. The patient was a 45-year-old man who presented with history of a rat bite and alcoholic liver cirrhosis. He had been bitten on his third finger by a rat, which was caught in a mousetrap installed in his house. Over the course of approximately 2 weeks after the bite, the patient developed fever, rash, and arthralgia. The patient was admitted to our hospital and treated with a combination of ampicillin-sulbactam, vancomycin (VAN), and minocycline

(MIN) antibiotics. Initial culture findings from the Anaerobic/F resin blood culture were positive for gram-negative bacillus after overnight incubation. Thus, *S. moniliformis* infection was suspected, and administration of VAN and MIN was ceased. On hospital day 8, the treatment was switched to oral amoxicillin-clavulanic acid, and the patient was discharged from the hospital. Subsequently, the pathogen was also detected in synovial fluid and identified as *S. moniliformis* using 16S rRNA sequencing analysis.

Detection of *Escherichia coli* producing CTX-M-1-group extended-spectrum β -lactamases from pigs in Aichi Prefecture, Japan, between 2015 and 2016.

Norizuki C¹, Kawamura K¹, Wachino JI², Suzuki M, Nagano N³, Kondo T¹, Arakawa Y²

¹Department of Pathophysiological Laboratory Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine, ²Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, ³Department of Health and Medical Sciences, Shinshu University Graduate School of Medicine

Japanese Journal of Infectious Diseases 71(1):33-38, 2017

We investigated the prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from Japanese pigs. A total of 345 pig fecal specimens were collected from 30 farms in Aichi prefecture, Japan, between June 2015 and April 2016, and 22 unique ESBL-producing *E. coli* were isolated from 16 samples of eight farms. The ESBL types included CTX-M-15 (54.5%), CTX-M-55 (27.2%), CTX-M-3 (0.9%), and CTX-M-14 (0.9%). The predominant plasmid replicon type was IncN, and they carried bla_{CTX-M-55}. Nine STs, including ST117, ST1706, ST38, and ST10 were detected in ESBL-producers, but no B2-O25-ST131 was found. ESBL producers were highly resistant to cefotaxime, ceftiofur, and tetracycline

but susceptible to imipenem, amikacin, and fosfomycin, although two ST354 isolates showed resistance to ciprofloxacin. All 11 chloramphenicol-resistant isolates, including ST117 (n = 6) and ST38 (n = 3), harbored floR, and two fosfomycin-resistant ST38 isolates harbored fosA3. Our results suggested that pigs may not act as a direct reservoir in the transmission of ESBL genes in humans. However, ST117 *E. coli* carrying IncN-type plasmids mediating bla_{CTX-M-55} was isolated from several different farms, predicting a potential future spread in Japan. Therefore, plasmid sequence analyses and continuous surveillance are necessary from an epidemiological point of view and are required to better prepare against ESBL-producer transmission.

百日咳の抗体保有状況および乳幼児の百日咳予防接種状況の推移—感染症流行予測調査より

佐藤 弘¹、多屋馨子¹、大塚菜緒²、蒲地一成²、2013年度百日咳感受性調査実施都道府県：北海道 東京都 福井県 愛知県 愛媛県 高知県 福岡県

¹国立感染症研究所感染症疫学センター、²国立感染症研究所細菌第二部
病原微生物検出情報 38(2):31-33, 2017

2013 年度の百日咳感受性調査において、抗 PT IgG 抗体および抗 FHA IgG 抗体の保有率は 0-5 か月児から 6-11 か月児に上昇がみられた。これは百日せき含有ワクチンの 1 回以上接種率の上昇に加え、第 1 期初回 3 回接種の完了者が増加したためと考えられた。また、4~7 歳でみられた抗体保有率の低下については、ワクチン接種後の抗体価の減衰が考えられた。以降の年齢で抗体保有率が上昇しているが、自然感染による抗体保有率の上昇が考えられた。一方、百日せき含有ワクチン接種状況の年次推移

について、2011 年度の 0-5 か月児でみられた接種歴有の割合の増加は、百日せき含有ワクチンの最低接種月齢である生後 3 か月からの接種開始者が増加したためと考えられた。また、2013 年度以降でみられた 0-5 か月児における 3 回接種者の割合の増加は、2013 年 4 月に Hib ワクチン、小児用肺炎球菌ワクチンが定期接種に導入され、百日せき含有ワクチンとの同時接種者が増加したことで 0 歳早期での接種者が増加した可能性が考えられた。

編集情報運営委員会

委員長 : 鈴木 正弘 (研究監)
委員 : 石川 潔 (総務課)
鈴木 裕子 (企画情報部)
中村 瑞那 (企画情報部・健康科学情報室)
安達 啓一 (生物学部・ウイルス研究室)
山田 和弘 (生物学部・細菌研究室)
長谷川晶子 (生物学部・医動物研究室)
戸塚 昌子 (衛生化学部・医薬食品研究室)
尾内 彩乃 (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第 68 号

平成 30(2018)年 3 月 発行

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6

愛知県衛生研究所

所長 皆川洋子

愛知県衛生研究所ウェブサイト：<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>

電話：ダイヤルイン

所長 052-910-5604

次長 052-910-5683

研究監 052-910-5684

総務課 052-910-5618

企画情報部長
健康科学情報室 052-910-5619

生物学部長 052-910-5654

ウイルス研究室 052-910-5674

細菌研究室 052-910-5669

医動物研究室 052-910-5654

衛生化学部長 052-910-5638

医薬食品研究室 052-910-5639

生活科学研究室 052-910-5643

FAX： 052-913-3641

e-mail: eiseiken@pref.aichi.lg.jp

Published by

AICHI PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
7-6 Nagare, Tsuji-cho, Kita-ku, Nagoya, 462-8576 Japan

(この刊行物は再生紙を使用しています)