

# 愛知県衛生研究所報

第72号 令和4年3月

## 目次

### 調査研究

愛知県で検出されたRSウイルスの分子疫学解析	1
安達啓一、廣瀬絵美、中村範子、新美 瞳、皆川洋子、齋藤典子、伊藤 雅、 安井善宏、佐藤克彦	
腸管出血性大腸菌におけるホスホマイシンの薬剤感受性試験法の比較検討	11
白鳥浩美、山田和弘、都築秀明、佐藤克彦	
2021年シーズン愛知県においてマウス試験法規制値を超えた麻痺性貝毒の分析	18
土方悠希、山本奈緒、長谷川晶子、小林哲也、佐藤克彦	
乾燥植物片からのエフェドリンの検出事例と構成植物の推定	27
富田浩嗣、服部靖子、小林俊也、森 久人、上野英二、棚橋高志	
夏季における羽布ダムの生物相の実態調査	35
尾内彩乃、長谷川真照、山本優子、青木梨絵、原田知美、堀田沙希、續木洋一、 棚橋高志	
他誌掲載論文抄録	43

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

Volume 72, March 2022

Contents

Original Papers

Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus detected in Aichi Prefecture  
.....1

Hirokazu Adachi, Emi Hirose, Noriko Nakamura, Hitomi Niimi, Hiroko Minagawa,  
Noriko Saito, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Katsuhiko Sato

A Comparative evaluation of antimicrobial susceptibility testing for Fosfomycin  
against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* .....11

Hiromi Shiratori, Kazuhiro Yamada, Hideaki Tsuzuki, Katsuhiko Sato

Analysis of Paralytic Shellfish Toxins exceeding the official regulatory standard  
level in bivalves collected in Aichi Prefecture during 2021 season  
.....18

Yuki Hijikata, Nao Yamamoto, Akiko Hasegawa, Tetsuya Kobayashi, Katsuhiko Sato

Detection of ephedrine in dried plant products and estimation of constituent plants  
.....27

Koji Tomita, Yasuko Hattori, Shunya Kobayashi, Hisato Mori, Eiji Ueno,  
Takashi Tanahashi

Survey on the biota of Habu Dam in summer  
.....35

Ayano Onouchi, Masateru Hasegawa, Yuko Yamamoto, Rie Aoki, Tomomi Harada,  
Saki Hotta, Hirokazu Tsuzuki, Takashi Tanahashi

Summaries of papers accepted to other journals .....43

---

## 調 査 研 究

---

# 愛知県で検出されたRSウイルスの分子疫学解析

安達啓一、廣瀬絵美、中村範子、新美 瞳、皆川洋子、  
齋藤典子、伊藤 雅、安井善宏、佐藤克彦

### 要 旨

RSウイルス（respiratory syncytial virus: RSV）は乳幼児の呼吸器感染症の主要な病原ウイルスである。従来RSVは初冬に流行していたが、近年流行時期の早期化が認められる。また、新型コロナウイルス流行の影響により2020年にはRSVの検出は激減し、2021年には大流行がみられた。2014年1月から2021年8月の期間に愛知県において検出されたRSVの分子疫学解析を実施したところ、流行ごとの優位な遺伝子型の変遷が明らかとなった。一方で、Gタンパク質遺伝子第二可変領域の解析において、流行の早期化前後で検出されるウイルスに差異は認められず、流行時期の変化はウイルスの変異によるものではなく、気候変動等、ウイルス以外の要因によるものと推測された。また、2021年にRSVが検出された患者全体に占める2歳以上の割合は例年に比べ高い傾向にあり、流行がなかった2020年に免疫を得られなかった幼児が多いことが影響したと考えられた。RSVが検出された患者の臨床診断名は気管支炎、肺炎等の下気道炎が最も多かったが、急性脳症や劇症型心筋炎患者からも検出されており、今後のサーベイランスの継続と発生予防に関する注意喚起の重要性が改めて示された。

キーワード：感染症発生動向調査、RSウイルス、呼吸器感染症、分子疫学解析

### 序 文

RSウイルス感染症は乳幼児の主要な呼吸器感染症であり、感染症法において5類感染症（小児科定点疾患）に定められている。病原ウイルスはRSウイルス（respiratory syncytial virus: RSV）であり、生後1歳までに50%以上、さらに2歳までにほぼ100%の人が初感染を受ける。初感染の場合、発熱、鼻汁などの上気道症状を呈し、うち約20～30%に気管支炎や肺炎などの下気道症状が出現するとされる。乳幼児における肺炎の約50%、細気管支炎の約50～90%がRSV感染症によるとされている。早産の新生児や乳児、免疫不全や先天性心疾患等を有する乳幼児は重症化のリスクが高い。初感染後も感染防御に十分な免疫は得られ

ず、再感染によるRSV感染症が生涯を通じて認められるが、年長の児童や成人における再感染例では重症となることは少ない。ただし、慢性呼吸器疾患等の基礎疾患を有する高齢者においては肺炎を併発し重症化することがあり、高齢者施設での集団発生や死亡事例も認められる<sup>1,2,3)</sup>。

現在のところワクチンや抗ウイルス薬は実用化されておらず、早産児、気管支肺異形成症や先天性心疾患等を持つハイリスク児を対象に、重症化予防のためにヒト化抗RSV-Fタンパク質モノクローナル抗体であるパリビズマブの公的医療保険の適応が認められている。ワクチン開発が進行中であり、2021年9月現在、数種類の製剤が第3相臨床試験の段階である<sup>4)</sup>。

RSV の主な感染経路は患者の咳やくしゃみなどによる飛沫感染と、ウイルスの付着した手指や物品等を介した接触感染である。従来、日本では主に初冬に、季節性インフルエンザに先行して流行がみられていたが、2017 年以降は患者発生が早まり、2019 年までの 3 年間は夏から秋にピークが認められた<sup>5)</sup>。新型コロナウイルス感染症の世界的流行が起きた 2020 年は全国的に目立った流行が認められず、小児科定点医療機関からの報告数は 18,096 人と、前年の 140,093 人と比べて 87% 減少した<sup>6,7)</sup>。しかしながら、2020 年第 49 週から鹿児島県、宮崎県、沖縄県を中心に徐々に定点報告数の増加が認められ、その後流行が広がり、2021 年は第 28 週をピークに全国で RSV 感染症の大流行が発生した<sup>8,9)</sup>。

RSV はニューモウイルス科(Pneumoviridae)のオルトニューモウイルス属(Orthopneumovirus)に分類され、学名はヒトオルトニューモウイルス(Human orthopneumovirus)である。G タンパクの性状の差から 2 つのサブグループ(RSV-A、RSV-B)に大別され、それぞれさらに複数の遺伝子型に分類される<sup>10)</sup>。

本稿では流行の早期化がみられる以前の 2014 年に遡り、2021 年 8 月までの期間に本県において検出された RSV の分子疫学解析を行い、流行動態との関連を考察するのに加え、今後ワクチンが導入された際の影響を検証する基礎データとすることを目指した。

## 材料と方法

### 1. 調査対象

愛知県感染症発生動向調査等により、2014 年 1 月から 2021 年 8 月の期間に名古屋市を除く県内全保健所管内の病原体定点医療機関を受診した呼吸器ウイルス感染が疑われる患者 1,195 名(インフルエンザと診断された者を除く)から得られた臨床検体(咽頭ぬぐい液、尿、脳脊髄液、血清等)1,552 件を対象とした。臨床診断名等は行政検査依頼票(患者個票)に記載されたデータを用いた。不明であった 19 名を除き患者年齢は 0~87 歳で、年齢中央値は 2 歳であっ

た。また、10 歳未満の患者が 88.9% を占めた。患者の性別は、不明であった 6 名を除き男女比 57:43 であった。

### 2. 培養細胞によるウイルス分離

臨床検体の遠心上清 50  $\mu$ L を、96 ウェルプレートに培養した VeroE6 細胞及び HEp-2 細胞に接種し、2 週間培養し細胞変性効果(CPE)を観察した。CPE が観察されなかった細胞は上清を新しい細胞に継代接種し、更に 2 週間の観察を行った。CPE が観察された細胞については 24 ウェルプレートに培養した細胞に継代し、CPE を確認した後に培養上清を回収し、遺伝子検査に供した。

### 3. RS ウイルス遺伝子の検出

臨床検体の遠心上清または培養上清 200  $\mu$ L から High Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany) を用いてウイルス RNA を抽出し、遺伝子検出のテンプレートとした。RSV の G 遺伝子の第二可変領域を増幅する既報のプライマー<sup>11)</sup>を用いて nested RT-PCR 法による遺伝子検出を行った。1st PCR には QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Netherlands) を、2nd PCR には TaKaRa Ex Taq (Takara Bio, 滋賀県) をそれぞれ用いた。

### 4. 塩基配列の決定及び分子疫学解析

PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) を用いて精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いたダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。遺伝子解析には Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 7 を用いた。系統樹作成は最尤法(ML: Maximum likelihood 法)を用いて行い、Bootstrap test は 1,000 回行った。

## 結果

### 1. RSV 検出状況

1,195 名の検体のうち、164 名(13.7%) 166 件から RSV が検出された。RSV が検出された検体の種類は、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液及び喀痰のいずれかで、尿、血液、髄液などから検出された症例はなかった。166 件のうち 51 件(30.7%) は、ウイルス分離も陽性であった。

RSV が検出された患者は、年齢不明であった 3 名と 85 歳の 1 名を除いた 160 名が 10 歳未満で、中央値は 1 歳であった。また 1 歳以下が 68.8%、5 歳以下が 96.3% を占めた。2021 年（1～8 月）に RSV が検出された患者のうち 2 歳以上の患者は 40.5% であり、それまで（2014～2020 年）の 28.6% より高い傾向がみられた。RSV が検出された患者の男女比は 58：42 であった。

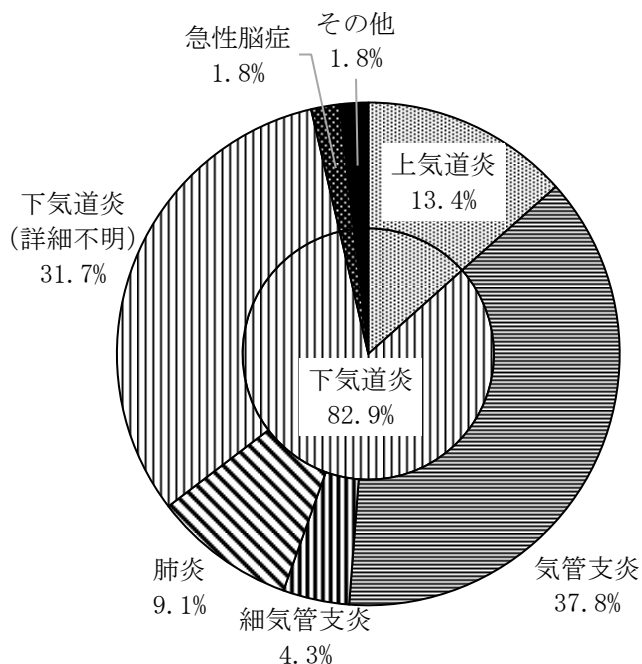


図1 RSVが検出された患者の臨床診断名

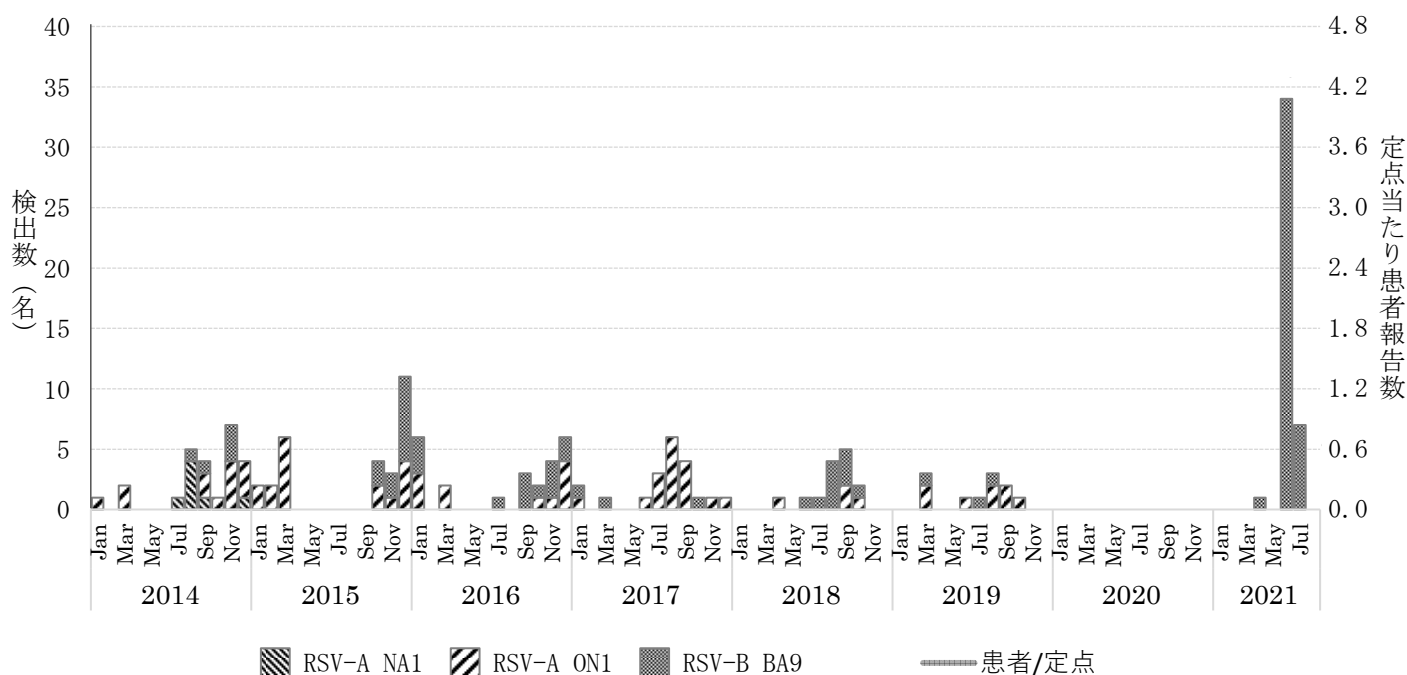
RSV と同時に他のウイルスが検出された重複検出例が 8 件あり、検出されたウイルスはヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (HPIV-3)、コクサッキーウイルス B5 型が各 2 件、ヒトメタニューモウイルス (HMPV)、HPIV-4、アデノウイルス、ライノウイルスが各 1 件であった。

## 2. RSV 陽性者の臨床診断名

RSV 陽性者 164 名の臨床診断名は、気管支炎 62 名 (37.8%)、下気道炎 (詳細不明) 52 名 (31.7%)、上気道炎 22 名 (13.4%)、肺炎 15 名 (9.1%)、細気管支炎 7 名 (4.3%)、急性脳症 3 名 (1.8%)、熱性けいれん・クループ、劇症型心筋炎及び記載なしが各 1 名であった。下気道炎症状 (気管支炎、細気管支炎、肺炎、詳細不明) を呈する患者が 136 名 (82.9%) であった。(図 1)。

## 3. RSV 感染症発生動向と RSV 検出状況

愛知県における RSV 感染症の定点当たり患者報告数のピークは、2014 年及び 2015 年は 12 月であったが、2016 年は 10 月、2017～2019 年は 9 月であった。流行動態を反映し、RSV の検出数は 2014 年及び 2015 年は冬季に、2017～2019 年は夏・秋季に増加していた (図 2)。



新型コロナウイルス感染症の世界的流行が発生した2020年は、RSV感染症の患者報告数は低値のまま推移し、流行は認められなかった。本研究が対象とする検体の搬入も、2014～2019年に平均176名の患者検体が搬入されたのに対し、2020年は58名と少なく、RSVは検出されなかった。また、HMPVやHPIV等の他の呼吸器ウイルスも検出されなかった。

一方、2021年に入ると徐々に患者報告数の増加がみられ、25週（6月後半）には定点当たり4.24と、2003年の調査開始以降で最も高い値となった。RSV感染症の大流行を受け、医療機関に対し重ねて検体の提出を依頼したこともあり、2021年6月及び7月はRSVが多く検出された。その後患者報告数は低下し、9月以降、本稿執筆中の12月上旬まで、2017～2019年、あるいはそれ以前にみられた時期の流行は確認できなかった。

#### 4. RSV 遺伝子系統解析

RSVが検出された164件について、Gタンパク質C末端の第二可変領域遺伝子配列による系統解析を行った。その結果、RSV-Aが94件（57.3%）、RSV-Bが70件（42.7%）であった。RSV-Aのうち7件はNA1に、87件はON1に分類され、RSV-BはすべてBA9系統であった。RSV-Aは、2014年にはNA1とON1の両方が検出されていたが、2015年以

降は検出されるRSV-AはすべてON1であった（図2）。

RSV感染症の発生動向と検出状況から、便宜的に6月から翌年5月を流行のシーズンとし、10件以上RSVが検出されたシーズンについて遺伝子型別の検出割合を図3に示した。2014/15、2017/18及び2019/20シーズンはRSV-Aが、2015/16、2016/17、2018/19及び2021/22シーズンはRSV-Bが流行の主流であった。しかし、これらのシーズンのうち2021/22以外はRSV-A及びRSV-Bの両方が検出された。

同一配列の株を除いた系統樹を図4（RSV-A）、図5（RSV-B）に示す。多くのシーズンでRSV-A、RSV-Bともに同じ遺伝子型の中で複数のクラスターに属する株が検出されていた。一方、2021年に検出されたRSV-BはBA9の中でまとまったクラスターを形成し、同年に東京で検出された株に近縁であった。また、流行の早期化がみられた2016年以降の株と、2015年以前の株について、系統樹上において大きな変化は認められなかった。

脳症患者3名から検出されたRSVの遺伝子型はRSV-A ON1が2件、RSV-B BA9が1件であり、劇症型心筋炎患者からはRSV-A ON1が検出された。いずれもGタンパク質遺伝子第二可変領域の系統解析においては、呼吸器症状患者から検出された株との差異は認められなかった。

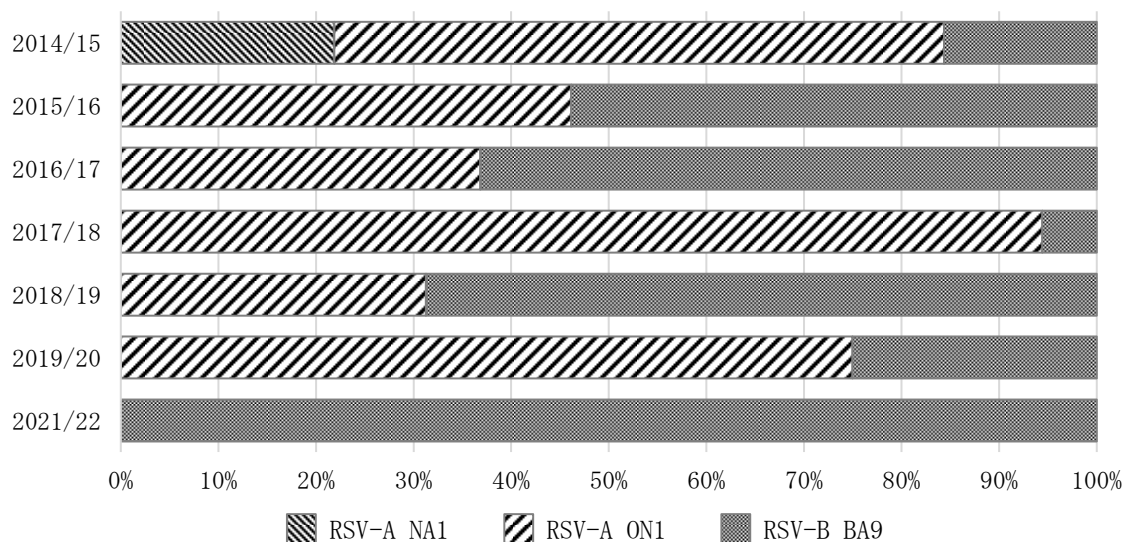


図3 シーズン別検出RSV遺伝子型割合



図4 RSV-A Gタンパク質遺伝子の第二可変領域における系統樹（最尤法）

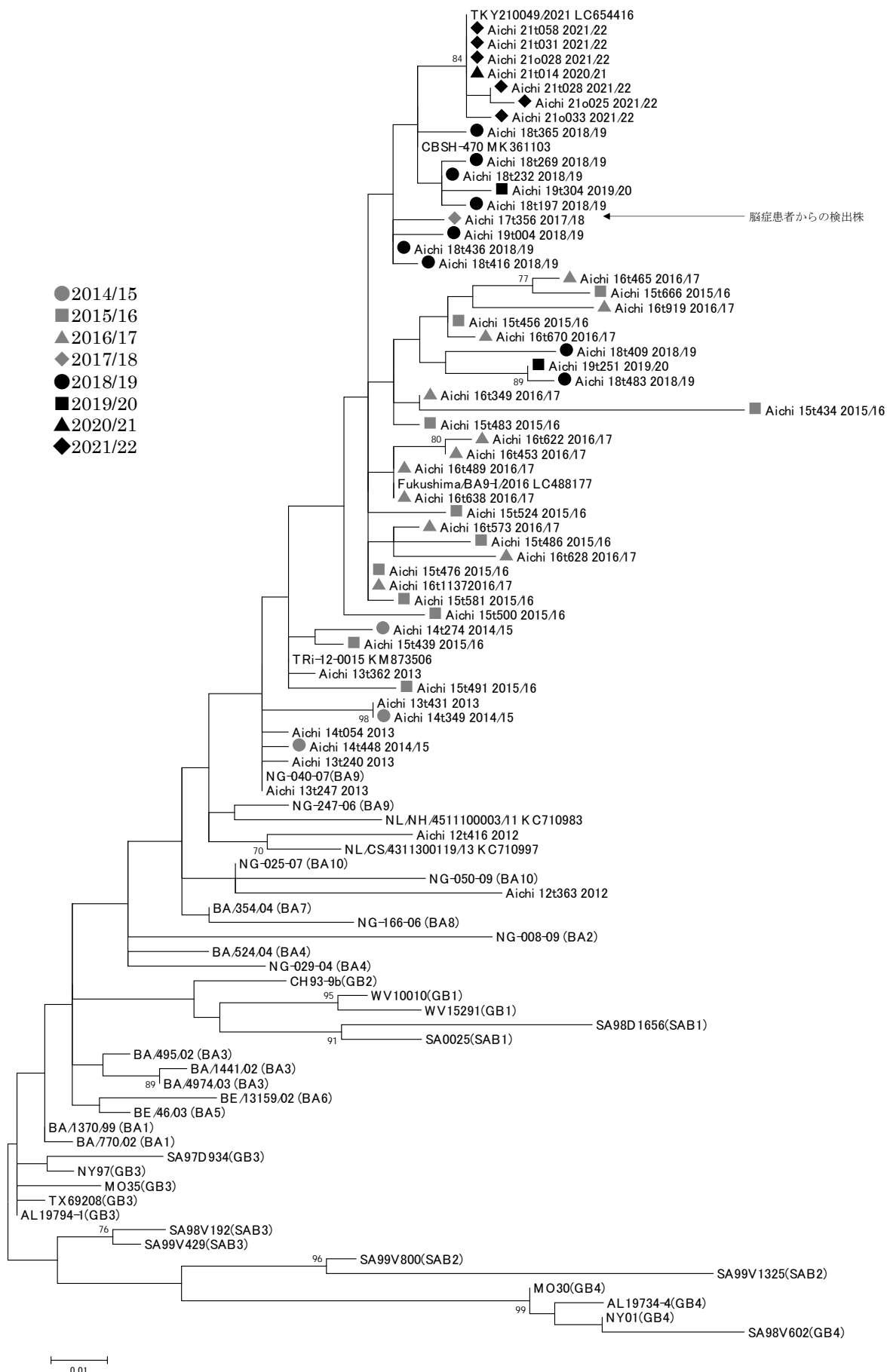


図5 RSV-B Gタンパク質遺伝子の第二可変領域における系統樹（最尤法）



## 考 察

RSVの流行は、従来、日本の多くの地域において初冬にみられてきたが、近年は流行の時期が早まる傾向が報告されている<sup>5)</sup>。2020年は新型コロナウイルス感染症の影響もあり、他の多くのウイルス感染症と同様にRSV感染症の報告数は著しく減少した。しかし、2020年第49週(12月初旬)から鹿児島県、宮崎県、沖縄県を中心に定点当たり患者報告数は徐々に増加し、2021年第28週(7月上旬)をピークに全国各地でRSV感染症の大流行が発生した<sup>8,9)</sup>。本研究では流行の早期化が認められる以前から本年までに、愛知県において検出されたRSVの分子系統解析を実施した。

サブグループ別の検出状況では、主流となるサブグループは1,2シーズン毎に遷移するものの、多くのシーズンでRSV-AとRSV-Bが同時に流行していたことが明らかとなった。一方、各サブグループの中で検出される遺伝子型は、2014/15シーズンにNA1とON1が検出されたのを除き、RSV-AはON1、RSV-BはBA9のみであった。ON1は、NA1の第二可変領域に72塩基の繰り返し配列が挿入された遺伝子型であり、2010年にカナダで初めて検出され<sup>12)</sup>、その後世界中で流行の主流となっている。愛知県では2012年12月に初めて検出されており、2014/15シーズンを境にNA1と完全に入れ替わり、流行の主流となっていたことが明らかとなった。

2021年に検出された株は全てRSV-Bであったが、これはRSVの流行を受け、医療機関に検体の提出を特に依頼し、同一保健所管内の2医療機関から1か月程度の短期間に提出された検体を調べた結果である。2021年の流行においてはRSV-A及びRSV-Bの両方が検出されたという報告があり<sup>13,14)</sup>、愛知県においても他の地域・時期においてRSV-Aの流行があった可能性も考えられる。

2021年は2019年以前と比べRSVが検出された患者に占める2歳以上の患者割合が高い傾向が認められた。2021年は全国的にも乳幼児症例における感染年齢層が高い傾向が報告されており、その要因として、例

年RSウイルス感染症に多く罹患する2歳未満の小児が、2020年に罹患せず免疫を獲得しなかったことが推察されている<sup>9,13)</sup>。

愛知県においては2016年頃からRSVの流行時期の早期化がみられ、以前は12月であった流行のピークが2017~2019年は9月であった。2016/17シーズンから2019/20シーズンまでは優位なサブグループが毎年遷移しており、この期間に検出された株と以前の株は系統解析において大きな差異が認められなかった。一部の領域の解析ではあるが、流行時期の早期化はウイルスの変異によるものではなく、それ以外の要因による可能性が考えられた。夏期のRSV流行には、気温が高く、かつ相対湿度が高いことが条件であるという報告があることや<sup>15)</sup>、熱帯・亜熱帯アジアでは雨季にRSVが流行することから、気候変動や海外との往來の増加の影響が考えられる。2021年は全国においてこれまでにない時期にRSVが流行したこともあり、今後の流行動態をより注視する必要があると考えられる。

今回RSVが検出された患者の臨床診断名は気管支炎、肺炎等の下気道炎が8割以上を占め、RSV感染による下気道炎症状の出現割合とされる20~30%を大きく上回った。これは、下気道炎症状の出現により医療機関を受診するケースや、感染症を疑うケースが多くあったのではないかと推測する。

また、急性脳症患者3例の咽頭ぬぐい液からRSVが検出された。3名の年齢はそれぞれ1歳5か月、1歳11か月、2歳5か月であった。これら3名からは咽頭ぬぐい液以外にも糞便検体が採取されており(RSV検索実施せず)、1名からは更に尿及び髄液も採取されていた(RSV陰性)。咽頭ぬぐい液及び糞便が提出された患者のうち1名は、糞便検体からアデノウイルス41型が検出された。他2名の患者検体からは当所におけるウイルス検索においてRSV以外のウイルスは検出されなかった。

更に本研究では劇症型心筋炎患者1例からもRSVが検出された。患者は1歳7か月齢の女児で、医療機関において簡易診断

キットを用いた検査により鼻腔ぬぐい液の RSV 抗原が陽性であったため、当所においても RSV を含めたウイルス検索を実施したところ、咽頭ぬぐい液及び喀痰から RSV が検出された。糞便、尿、血清検体も提出されたが、ウイルスは検出されなかった。

急性脳症及び劇症型心筋炎患者から検出された RSV は、今回解析した領域においては呼吸器症状のみを示す患者検体から検出された株との差異が認められなかった。一部の領域の解析ではあるが、症状の違いはウイルス側よりも宿主側の要因によることが示唆された。急性脳症患者のうちの 1 名からは別のウイルスも検出されていることや、いずれの検体からも RSV の分離はできなかったことから、臨床症状との関連は必ずしも確定的ではないものの、急性脳症は RSV 感染症の合併症として知られており<sup>16, 17, 18)</sup>、心筋炎患者からも RSV の検出が報告されている<sup>19, 20, 21)</sup>。これらの疾患では後遺症が残る症例や死に至るケースもあることから、RSV 感染症の流行時には呼吸器外症状の可能性も含めて注意喚起していく必要があると考えられた。

本研究において、愛知県における 2014 年から 2021 年の RSV の流行動態の解析を行ったところ、流行時期の変化や優位な遺伝子型の変遷が明らかとなった。また、新型コロナウイルス感染症の世界的流行下において RSV 感染症の大流行がみられたことや、脳症等の重篤な症状を示す患者検体からも検出されていたことは、RSV 感染症サーベイランスの重要性や流行時における注意喚起の必要性を改めて示す結果であった。近い将来のワクチン導入も見据え、継続した RSV の検出・解析が求められる。

## 謝 辞

愛知県内の定点医療機関、愛知県並びに豊橋市、岡崎市、一宮市、豊田市保健所、愛知県感染症対策局感染症対策課の皆様へ深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Collins LP, Karron AR: Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. Fields Virology 6th edition (Knipe MD, Howley MP eds):1086-1123, 2015.
- 2) 西村秀一、高橋 洋：高齢者の RS ウイルス感染. 病原微生物検出情報 39:212-213, 2018.
- 3) 米田哲也ら：介護老人保健施設におけるヒト RS ウイルスの集団感染事例-富山県. 病原微生物検出情報 39:216-217, 2018.
- 4) RSV Vaccine and mAb Snapshot: <http://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/> (2021 年 12 月現在)
- 5) Miyama T, Iritani N, Nishio T, Ukai T, Satsuki Y, Miyata H, Shintani A, Hiroi S, Motomura K, Kobayashi K: Seasonal shift in epidemics of respiratory syncytial virus infection in Japan. *Epidemiology and infection* 149:e55, 2021.
- 6) 国立感染症研究所, 感染症発生動向調査週報 速報データ 2020 年第 53 週: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/data/10103-idwr-sokuho-data-j-2053.html>
- 7) 国立感染症研究所, 感染症発生動向調査年別報告数一覧 (定点把握): <https://www.niid.go.jp/niid/ja/ydata/10071-report-jb2019.html>
- 8) 国立感染症研究所, 感染症発生動向調査週報 2020 年第 52・53 週 (第 52・53 合併号): <https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/idwr/IDWR2020/idwr2020-52-53.pdf>
- 9) 国立感染症研究所, 感染症発生動向調査週報 2021 年第 29 週 (第 29 号): <https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/idwr/IDWR2021/idwr2021-29.pdf>
- 10) Hibino A, Saito R, Taniguchi K, Zaraket H, Shobugawa Y, Matsui T, Suzuki H, for the Japanese HRSV Collaborative Study Group: Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus among children in Japan during three

- seasons and hospitalization risk of genotype ON1. PLOS ONE 13(1):e0192085, 2018.
- 11) Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A, Shobugawa Y, Gejyo F, Suzuki H: Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *Journal of Clinical Microbiology* 43(1):36-40, 2005.
- 12) Eshaghi A, Duvvuri RV, Lai R, Nadarajah TJ, Li A, Patel NS, Low ED, Gubbay BJ: Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. PLOS ONE 7(3):e32807, 2012.
- 13) 江川和孝ら: 2021年春のRSウイルス感染症流行—大阪市. 病原微生物検出情報 42:195-197, 2021.
- 14) 糟谷 文, 森 功次, 原田幸子, 熊谷 遼太, 鈴木 愛, 天野有紗, 小杉知宏, 鈴木 淳, 貞升健志: 東京都におけるRSウイルス感染症の流行とRSVの遺伝子解析(2021年第1週~第31週). 病原微生物検出情報 42:261-263, 2021.
- 15) Shobugawa Y, Takeuchi T, Hibino A, Hassan RM, Yagami R, Kondo H, Odagiri T, Saito R: Occurrence of human respiratory syncytial virus in summer in Japan. *Epidemiology and infection* 145(2): 272-284, 2017.
- 16) 河島尚志: RS脳症. 病原微生物検出情報 29:275-277, 2008.
- 17) 国立感染症研究所: 急性脳炎 2007~2018年. 病原微生物検出情報 40:93-94, 2019.
- 18) Bohmwald K, Gálvez MSN, Ríos M, Kalergis MA: Neurologic Alterations Due to Respiratory Virus Infections. *Frontiers in cellular neuroscience* 12:386, 2018.
- 19) Esposito S, Salice P, Bosis S, Ghiglia S, Tremolati E, Tagliabue C, Gualtieri L, Barbier P, Galeone C, Marchisio P, Principi N: Altered cardiac rhythm in infants with bronchiolitis and respiratory syncytial virus infection. *BioMed Central infectious diseases* 10:305, 2010.
- 20) Miura H, Hattori F, Uchida H, Hata T, Kudo K, Sato M, Yoshikawa T: Case report of severe myocarditis in an immunocompromised child with Respiratory Syncytial Virus infection. *BioMed Central pediatrics* 18(1):51, 2018.
- 21) Erdoğan S, Yakut K, Kalın S: Acute encephalitis and myocarditis associated with respiratory syncytial virus infections. *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation* 47(4): 348-351, 2019.

# Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus detected in Aichi Prefecture

Hirokazu Adachi, Emi Hirose, Noriko Nakamura, Hitomi Niimi, Hiroko Minagawa,  
Noriko Saito, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Katsuhiko Sato

RS virus (respiratory syncytial virus: RSV) is a major pathogenic virus that causes respiratory tract infections in infants. RSV used to be prevalent in early winter, but in recent years, the prevalence period has become earlier. Molecular epidemiological analysis of RSV detected in Aichi Prefecture during the period from January 2014 to August 2021 revealed a transition in the predominant genotype for each epidemic. On the other hand, in the analysis of the second variable region of the G-protein gene, no difference was observed in the virus detected before and after the seasonal shift of the epidemic, suggesting that the change in the epidemic onset was not due to virus mutation but to factors other than the virus, such as climate change. The proportion of patients aged 2 years or older in whom RSV was detected in 2021 tended to be higher than in previous years, which may have been due to the large number of young children who did not acquire immunity in 2020 when there was no epidemic. The most common clinical diagnoses of patients with RSV were bronchitis, pneumonia, and other lower respiratory tract infections, but RSV was also detected in patients with acute encephalopathy and fulminant myocarditis, reiterating the importance of continued surveillance and reminder for outbreak prevention.

Key words : surveillance, respiratory syncytial virus, respiratory infection,  
molecular epidemiology

## 調 査 研 究

# 腸管出血性大腸菌における ホスホマイシンの薬剤感受性試験法の比較検討

白鳥浩美、山田和弘、都築秀明、佐藤克彦

### 要 旨

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli* : EHEC) 感染症の治療には、第一選択薬としてホスホマイシンが使用されることが多い。ホスホマイシンに対する薬剤感受性試験法は、25  $\mu$ g/mL のグルコース-6-リン酸 (glucose-6-phosphate : G6P) 存在下での寒天平板希釈法が標準法となっている。寒天平板希釈法は、薬剤に対する感性・耐性という結果だけでなく、最小発育阻止濃度 (MIC) の測定が可能であるが、一般に薬剤感受性試験に使用されるディスク拡散法に比べ時間を要し煩雑という問題点がある。

そこで今回、寒天平板希釈法とディスク拡散法を比較し、ディスク拡散法が EHEC のホスホマイシンに対する薬剤感受性試験のスクリーニング法として利用可能か検討した。また、ディスク拡散法に使用するディスクのホスホマイシン含有量及び G6P の影響についても検討した。当所保存の EHEC 112 株は寒天平板希釈法、ディスク拡散法の両方において、111/112 株 (99.1%) が感性、1/112 株 (0.89%) が耐性となり、感性・耐性の結果は一致していた。また、ディスクのホスホマイシン含有量及び G6P の添加の有無による感性・耐性の変化はなかった。

ホスホマイシンの最終的な薬剤感受性試験は、寒天平板希釈法を利用することを念頭に置く必要があるが、国内で購入可能な薬剤感受性ディスク (ホスホマイシン 50  $\mu$ g 含有) を用いたディスク拡散法が EHEC におけるホスホマイシンに対する薬剤感受性試験のスクリーニング法として使用できることが示唆された。

キーワード：腸管出血性大腸菌、ホスホマイシン、寒天平板希釈法、ディスク拡散法

### 序 文

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli* : EHEC) 感染症は、Vero 毒素 (Vero toxin : VT または Shiga toxin : Stx) を産生する大腸菌で汚染された食物等の経口摂取によって起こる感染症であり、腹痛、水溶性下痢、血便を臨床的特徴とし、溶血性尿毒症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) を引き起こすことがある<sup>1)2)</sup>。

EHEC 感染症の治療には、第一選択薬としてホスホマイシンが使用されることが多い<sup>3)</sup>。ホスホマイシンは、グリセロール-3-リン酸

輸送系やグルコース-6-リン酸等の糖リン酸輸送系を介して菌体内に取り込まれた後、細胞壁合成に関与する UDP-GlcNAc エノールピルビン酸の合成を阻害することにより細胞壁合成を阻害する。この細胞壁合成阻害の機序は他の抗菌薬と異なっているため、他の抗菌剤に対する耐性とは交差しにくいと考えられている<sup>4)</sup>。ホスホマイシンの耐性機序としては、これまでに輸送系に関係する遺伝子 (*gltT* 遺伝子、*uhpT* 遺伝子) の変異、UDP-GlcNAc エノールピルビン酸トランスフェラーゼをコードする遺伝子 (*murA* 遺伝子) の変異に

よるホスホマイシンとの親和性の低下及びプラスミド上のホスホマイシン耐性遺伝子の存在(*fosA*遺伝子)が報告されている<sup>4)5)</sup>。これまでに、日本におけるホスホマイシン耐性 EHEC の報告は多くはないが、そのほとんどが国内で最も検出割合の高い 0157 以外の血清型となっている<sup>6)7)8)9)</sup>。

大腸菌のホスホマイシンに対する薬剤感受性試験法は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) や European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) から示されており、両機関ともに 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のグルコース-6-リン酸 (glucose-6-phosphate: G6P) 存在下での寒天平板希釈法が標準法となっている<sup>10)11)</sup>。寒天平板希釈法は、薬剤に対する感性・耐性という結果だけでなく、最小発育阻止濃度 (MIC) の測定が可能であるため、詳細な薬剤耐性菌の情報を得られる一方で、一般に薬剤感受性試験に使用されるディスク拡散法に比べ迅速性や簡便性に劣るといった問題点がある<sup>12)</sup>。ディスク拡散法についても、両機関から方法が示されているが、使用ディスクが G6P 50  $\mu\text{g}$  及びホスホマイシン 200  $\mu\text{g}$  含有ディスクで規定されており、国内流通の市販品はない。そのため、ホスホマイシンに対するディスク拡散法を実施する場合は、薬剤ディスクを自家調製する必要がある。さらに、CLSI では、ホスホマイシンのディスク拡散法は尿路感染症大腸菌のみに適応可能とされており、EHEC に対してはディスク拡散法の規定はない。

EHEC 感染症は病原性が高く、集団感染発生時の社会的影響が大きいとため、治療の幅が狭まってしまうホスホマイシン耐性 EHEC の動向を調査することは公衆衛生上重要である。そこで今回、これまで国内で検出されたホスホマイシン耐性 EHEC において最も多い血清型であった 026 を中心とした 0157 以外の当所保存 EHEC を用いて、寒天平板希釈法とディスク拡散法を比較し、ディスク拡散法が EHEC のホスホマイシンに対する薬剤感受性試験のスクリーニング法として利用可能か検討した。また、ディスク拡散法に使用するディスクのホスホ

マイシン含有量及び G6P の影響についても検討した。

## 材料及び方法

供試菌株: 2012 年から 2020 年の間に愛知県において分離された 0157 以外の EHEC 112 株 (026: 66 株、0103: 15 株、0111: 10 株、0121: 9 株、0145: 12 株) を用いた。薬剤感受性試験 (寒天平板希釈法): 寒天平板培地は 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G6P 及びホスホマイシン (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加したミュラーヒントン寒天培地 (MERCK、ドイツ) を使用した。McFarland 0.5 から生理食塩水でさらに 10 倍希釈した菌液を、MIC 測定用装置マイクロプランター (MIT-P、佐久間製作所、日本) を用いて寒天表面にスポットし、37°C で 16~18 時間培養した。MIC は、目に見える成長を阻害する最低の抗生物質濃度として定義した。また、1 株について 3 回実施し、その 2 つ以上が一致して発育抑制されている濃度を各株の代表値とした。薬剤感受性試験 (ディスク拡散法): ディスクは BD センシ・ディスク™ ホスホマイシン 50 (FOM50) (Becton, Dickinson and Company、アメリカ) 及び自家調製したホスホマイシン 200  $\mu\text{g}$  含有ディスク (FOM200) を使用した。McFarland 0.5 に調製した菌液をミュラーヒントン S 培地 (栄研化学、日本) へ 3 方向から塗抹し、FOM50 及び FOM200 をそれぞれ 2 枚ずつ、間隔を 24 mm 以上離すように置いた。FOM50 及び FOM200 それぞれ 1 枚ずつに 5 mg/mL G6P を 10  $\mu\text{L}$  添加し、37°C で 16~20 時間培養した後、完全阻害領域の直径 (阻止円径、mm) を測定した。判定方法: 寒天平板希釈法、ディスク拡散法ともに、CLSI M100-ED31:2021 に従い、感性 (S)・耐性 (R) を判定した (表 1)。なお、寒天平板希釈法、ディスク拡散法ともに、*Eshcherichia coli* ATCC25922 を精度管理株として用いて、薬剤感受性試験の精度確認を行った。

## 結果

寒天平板希釈法 (表 2): EHEC 112 株の寒天平板希釈法による MIC は、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下が 87 株、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  が 1 株、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  が 5 株、

16  $\mu\text{g/mL}$  が 18 株、1024  $\mu\text{g/mL}$  以上が 1 株であり、111/112 株 (99.1%) が感性、1/112 株 (0.89%) が耐性であった。MIC が 2  $\mu\text{g/mL}$  以上であった血清型は全て 026 であり、0103、0111、0121 及び 0145 においては全ての株で MIC が 0.5  $\mu\text{g/mL}$  以下であった。  
 ディスク拡散法 (表 3) : EHEC 112 株は尿路感染症から分離された大腸菌に対する基準 (FOM200+G6P) では、111/112 株 (99.1%) が感性、1/112 株 (0.89%) が耐性となり、

耐性になった 1 株は 026 であった。また、他のディスク (FOM200、FOM50+G6P 及び FOM50) においても、同様に耐性となったのは 1/112 株 (0.89%) であった。  
 寒天平板希釈法とディスク拡散法の比較 : ディスク拡散法の全てのディスク (FOM200+G6P、FOM200、FOM50+G6P 及び FOM50) において、寒天平板希釈法における感性・耐性の結果と一致した。また、全ての方法において、耐性となった株は同一株であった。

表 1 ホスホマイシンの寒天平板希釈法及びディスク拡散法における判定基準

寒天平板希釈法 ( $\mu\text{g/mL}$ )				ディスク拡散法 (mm)			
S	I	R	<i>Eshcherichia coli</i> ATCC25922	S	I	R	<i>Eshcherichia coli</i> ATCC25922
$\leq 64$	128	$\geq 256$	0.5-2	$\geq 16$	13-15	$\leq 12$	22-30

S:感性 I:中間 R:耐性

表 2 ホスホマイシンの寒天平板希釈法判定結果

血清型 (株数)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )												
	$\leq 0.5$	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	1024	$\geq 1024$
026 (66)													1
0103 (15)													
0111 (10)													
0121 (9)													
0145 (12)													

 感性  中間  耐性

表 3 ホスホマイシンのディスク拡散法判定結果

血清型 (株数)	FOM200 + G6P			FOM200			FOM50 + G6P			FOM50		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
026 (66)	65		1	65		1	65		1	65		1
0103 (15)	15			15			15			15		
0111 (10)	10			10			10			10		
0121 (9)	9			9			9			9		
0145 (12)	12			12			12			12		

S:感性 I:中間 R:耐性

ディスク拡散法におけるホスホマイシン含有量及び G6P 添加の影響：ディスクのホスホマイシン含有量及び G6P の添加の有無による感性・耐性の変化はなかった。感性株（111 株）の阻止円径の平均は FOM200+G6P で 33.2 mm、FOM200 で 31.0 mm、FOM50+G6P で 29.9 mm、FOM50 で 27.3 mm であった（表 4）。また、感性株における血清型毎の阻止円径の直径平均は、ホスホマイシンの含有量に

かかわらず、全ての株において、G6P を添加したディスクの方が大きかった（FOM200 vs FOM200+G6P、FOM50 vs FOM50+G6P）。血清型毎の阻止円径の直径平均は、026、0103、0111 及び 0121 においては FOM200+G6P、FOM200、FOM50+G6P、FOM50 の順に大きかったが、0145 においては、FOM200+G6P、FOM50+G6P、FOM200、FOM50 の順となり、G6P を添加したディスクの方が、阻止円径が大きくなった（表 4、図 1）。

表 4 感性株の阻止円形の直径 (mm) の平均及び標準偏差

血清型 (株数)		FOM200 +G6P	FOM200	FOM50 +G6P	FOM50
026 (65)	平均	33.0	31.3	29.4	27.3
	標準偏差	2.81	3.26	3.34	2.82
0103 (15)	平均	32.5	29.9	29.3	25.8
	標準偏差	1.65	1.71	1.29	1.65
0111 (10)	平均	35.1	33.0	32.0	29.4
	標準偏差	0.84	1.55	0.89	0.89
0121 (9)	平均	36.1	33.1	32.8	29.3
	標準偏差	1.63	1.92	1.81	2.49
0145 (12)	平均	31.6	27.2	29.8	25.6
	標準偏差	1.08	1.62	1.11	0.67
総計 (111)	平均	33.2	31.0	29.9	27.3
	標準偏差	2.60	3.15	2.92	2.65

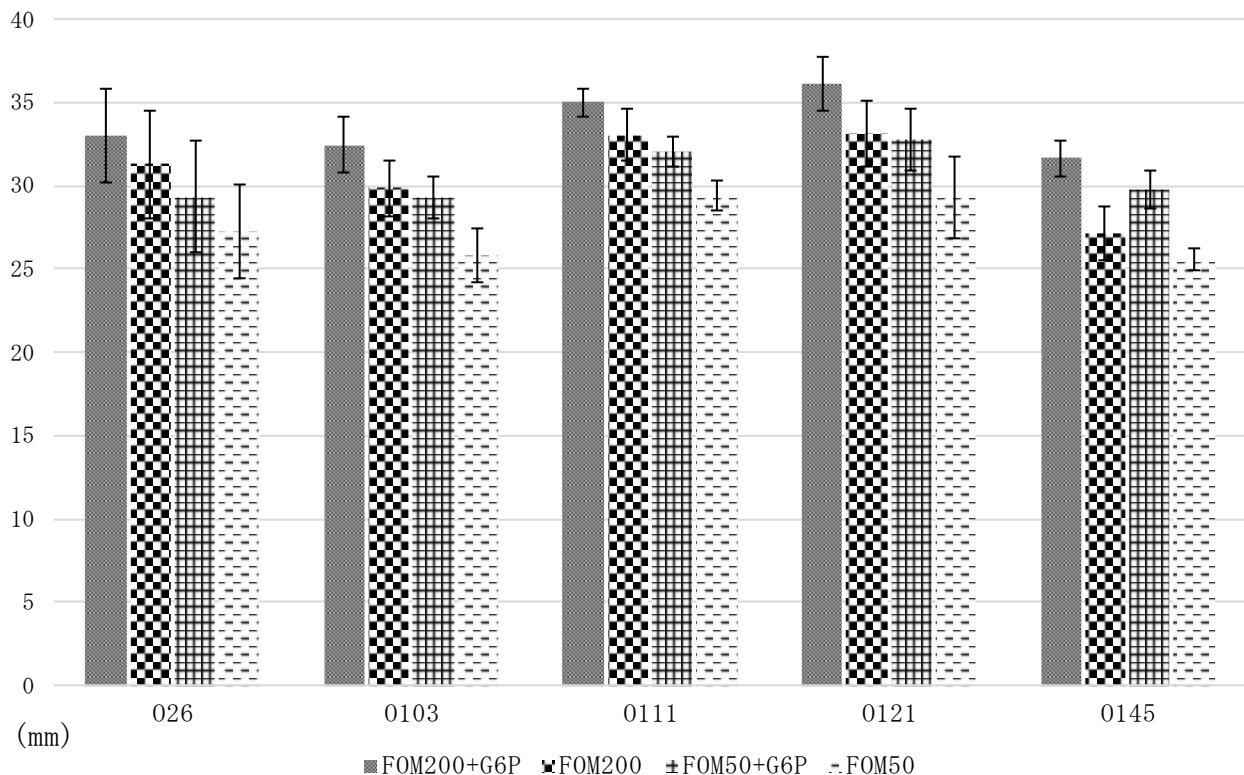


図 1 感性株における血清型毎の阻止円径の直径



## 考 察

寒天平板希釈法は MIC の測定が可能であるが、ディスク拡散法に比べ手間がかかるため、日常検査ではあまり実施されない。しかし、ホスホマイシンに対する薬剤感受性試験法は、寒天平板希釈法が標準法となっている。今回、寒天平板希釈法とディスク拡散法との比較では、両法で同等の結果が得られており、EHEC においてもディスク拡散法によるホスホマイシンの薬剤感受性試験が利用可能であることが示唆された。ただし、今回の判定においては、CLSI の判定基準を適用したが、薬剤感受性試験の判定基準を提示しているもう一つの機関である EUCAST の判定基準(寒天平板希釈法において MIC 16  $\mu$ g/mL 以上を耐性、ディスク拡散法において阻止円形 24 mm 以下を耐性)を適用すると、寒天平板希釈法においては 19 株が、FOM50 を用いたディスク拡散法においては 6 株が耐性(データ非表示)となった。また、今回は両法で同等の結果が得られたが、これまでに EHEC のホスホマイシンに対するディスク拡散法において耐性の株が、MIC 測定では感性となる不一致事例の報告がある<sup>8)</sup>。そのため、判定基準及び試験方法により感性・耐性の判定が異なる株が存在することを理解している必要があると考えられた。

尿路感染症から分離された大腸菌に対するディスク拡散法では、使用するディスクのホスホマイシン含有量を 200  $\mu$ g と規定されているが、今回供試した EHEC においては、ディスク拡散法に使用したディスクのホスホマイシン含有量による感性・耐性の変化はなかった。そのため、EHEC に対しては、国内で購入可能な薬剤感受性ディスク(FOM50)を用いたディスク拡散法が利用可能であると考えられた。また、ホスホマイシンのトランスポーターの一つである UhpT は、G6P の存在下で誘導される。G6P の添加の有無により、ホスホマイシンの薬剤感受性試験の判定結果が大きく異なることが知られており、ホスホマイシンの薬剤感受性試験法では、G6P の添加が推奨されている。今回、G6P の有無によるディスク拡散法の

比較では、阻止円径の大きさに差は見られたが、感性・耐性の変化はなかった。しかし、血清型毎の比較では、G6P の影響を大きく受ける血清型(0145)もあるため、可能な限り G6P を添加する方が良いと考えられた。

判定基準により感性・耐性の判定が異なる株が存在すること、G6P の影響を受けやすい血清型が存在すること及び最終的な薬剤感受性試験は寒天平板希釈法を利用することを理解しておく必要があるが、国内で購入可能な薬剤感受性ディスク(FOM50 又は FOM50+G6P)を用いたディスク拡散法が、EHEC におけるホスホマイシンの薬剤耐性状況を把握する上でスクリーニングとして使用できることが示唆された。

また、今回の調査ではホスホマイシン耐性 EHEC の割合は低かったが、EHEC の治療薬であるホスホマイシンに対する薬剤耐性状況については、今後も調査を継続し、薬剤耐性菌の動向について注視していく必要がある。そのため、寒天平板希釈法を含む薬剤感受性試験の方法や、判定基準及び使用する試薬における結果の変化等の技術・知識の継承が重要になると考えられた。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：腸管出血性大腸菌感染症．病原微生物検出情報 42(5):87-89, 2021
- 2) 感染症発生動向調査感染症週報：腸管出血性大腸菌感染症．通巻第 4 巻(6):8-10, 2002
- 3) 溶血性尿毒症症候群の診断・治療ガイドライン：EHEC 感染症の治療．7-10, 2014, 東京医学社、東京．
- 4) 渡部宏臣：見直される抗菌剤ホスホマイシン-小さな分子に隠された大きな可能性．有機合成化学協会誌 55(3):229-234, 1997
- 5) Ya Li, Bo Zheng, Yun Li, Sainan Zhu, Feng Xue, Jian Liu: Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Fosfomycin Resistance in Clinical *Escherichia coli* Isolates in Mainland

China. Public Library of Science ONE  
10(8):e0135269. 2015

- 6) 内村眞佐子, 江下倉重, 小岩井健司: 千葉県における腸管出血性大腸菌検出状況と下痢患者の血清学的診断 (1996-2002年). 千葉県衛生研究所研究報告 26:29-36, 2002.
- 7) 北川恵美子, 小坂 恵, 加藤真美, 木村恵梨子, 崎田敏晴: 2007~2015年に石川県で分離された腸管出血性大腸菌について - 026, 0111の発生状況及び細菌学的性状-. 石川県保健環境センター研究報告書 53:25-29, 2016.
- 8) 津曲洋明, 水流奈己, 阿波野祥司, 吉野修司, 元明秀成: 宮崎県で分離された腸管出血性大腸菌(EHEC)026, 0157の薬剤感受性と分子生物学的解析. 宮崎県衛生環境研究所年報 29:59-64, 2017.
- 9) 黒澤 肇, 安中秀幸, 坂野智恵子, 横田陽子, 小畑 敏: 群馬県において分離された腸管出血性大腸菌. 群馬県衛生環境研究所年報 42:62-65, 2010.
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31<sup>st</sup> Edition (M100-ED31), 2021, Wayne PA.
- 11) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 11.0, 2021
- 12) 家畜共済における抗菌性物質の使用指針: 第4章薬剤感受性試験. 47-58, 2014, 農林水産省.

# A Comparative evaluation of antimicrobial susceptibility testing for Fosfomycin against Enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Hiromi Shiratori, Kazuhiro Yamada, Hideaki Tsuzuki, Katsuhiko Sato

In the treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections, fosfomycin is often used as a first-line agent. The agar dilution method (ADM) in the presence of 25 µg/mL glucose-6-phosphate (G6P) is the standard method for fosfomycin susceptibility testing. ADM determines not only the fosfomycin susceptibility/resistance, but also the minimal inhibitory concentration (MIC). However, the agar dilution method is more time-consuming and complicated than the disk diffusion method (DDM) commonly used for antimicrobial susceptibility testing. In the present study, we compared ADM with DDM and evaluated whether DDM could be used as a screening method for fosfomycin susceptibility testing of EHEC. In addition, the effects of fosfomycin content and presence of G6P in the disks were also investigated. Among the 112 EHEC repository stock isolates, 111/112 (99.1%) were fosfomycin-sensitive and 1/112 (0.89%) was resistant in both ADM and DDM, and all results were consistent. There was no change in sensitivity dependent on the fosfomycin content of the discs tested (50 µg and 200 µg) or whether G6P was added or not. It is important to bear in mind that the only definitive drug susceptibility test for fosfomycin is ADM. However, the results shown here suggested that using those drug susceptible disks (containing 50 µg of fosfomycin) available in Japan could be used as a screening method for antimicrobial susceptibility testing for fosfomycin against EHEC.

Key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Fosfomycin, agar dilution method, disk diffusion method

## 調 査 研 究

# 2021年シーズン愛知県においてマウス試験法規制値を超えた 麻痺性貝毒の分析

土方悠希、山本奈緒、長谷川晶子、小林哲也、佐藤克彦

### 要 旨

麻痺性貝毒 (Paralytic Shellfish Toxins) は *Alexandrium* 属等の有毒渦鞭毛藻が産生する強力な神経毒であり、プランクトンフィーダーである二枚貝類の毒化の原因になっている。アサリの主要生産地である愛知県で原因プランクトンの発生時期に実施している貝毒検査において、2021年シーズン (令和3年3月～5月) に出荷規制値 (4 MU/g MU:マウスユニット) を上回る麻痺性貝毒が検出され、4年ぶりの出荷自主規制が行われた。

毒化したアサリにおける麻痺性貝毒組成及び毒化・減毒について解析することを目的として、マウス試験法を実施したアサリ 48 検体を高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) により分析した。解析の結果、アサリの毒組成における主成分は、低毒性の C 群であった。また、12 検体において C1、C2、GTX1、GTX2、GTX3、GTX4、dc-GTX2、dc-GTX3、neoSTX の 9 成分の濃度及び比毒性から算出される MU 値とマウス試験法値に乖離が認められ、クロマトグラム上で上記 9 成分とは異なる未知ピークが認められた。LC-MS/MS による分析の結果、STX 類縁体である M-toxin (M1) と同定することができ、MU 値に大きく寄与している可能性が考えられた。

キーワード：麻痺性貝毒、HPLC、アサリ、M-toxin

### 序 文

麻痺性貝毒 (Paralytic Shellfish Toxins) (以下 PST) は *Alexandrium* (アレキサンドリウム) 属等の有毒渦鞭毛藻が主に産生する強力な神経毒であり、プランクトンフィーダーである二枚貝の毒化の原因となっている<sup>1)2)</sup>。渦鞭毛藻は日本全国の沿岸に分布しており国内ではホタテガイ、アサリ、カキなどの二枚貝の毒化が問題となっており、また、PST は食物連鎖を介して肉食の貝類、甲殻類等も毒化させることが知られている<sup>1)2)</sup>。毒化した二枚貝類をヒトが喫食すると、口唇、四肢の麻痺、運動失調などの典型的な神経性の症状を呈し、重症の場合、呼吸麻痺により死亡することもある。有効な治療法はなく、人工呼吸器による呼吸の確保が

唯一の救助法である。成人の致死量はサキシトキシン換算で約 2.0 mg と考えられており<sup>2)3)</sup>、厚生労働省では食品衛生法に基づく規制値 (麻痺性貝毒: 4 MU/g MU:マウスユニット) を設定し<sup>4)</sup>、農林水産省は生産海域において規制値を超えた場合、出荷の自主規制を指導している。

PST は現在サキシトキシンを基本骨格にもつ 60 種近くの類縁体の存在が確認されており<sup>5)</sup>、これらはナトリウムチャンネルに対する親和性の差から毒力が大きく異なり、また、容易に変換が起きることが特徴である<sup>1)2)3)6)</sup>。海域により生息する渦鞭毛藻の種類は異なっており<sup>6)</sup>、含有する PST に違いがある。加えて、貝種により PST の代謝経路に特異性があり、同じ海域に生息する

二枚貝でも PST 組成は異なる<sup>7)</sup>。そのため地域および漁獲される貝種に合わせた対策を講じる必要がある。

愛知県はアサリの年間漁獲量が 3,880 t (令和元年) で全国の約 50% を占めており、アサリは県を代表する水産物の一つである。愛知県では昭和 54 年度から、アサリ等貝類の安全性を確保するため、「愛知県貝類安全対策指導要領」に基づき、貝毒原因プランクトンの分布調査 (愛知県の海域では主に *Alexandrium tamarense species complex* 属 (以下 *At complex*) が発生<sup>8)</sup>) 及び貝毒原因プランクトンの発生時期 (通常 3 月～5 月) にアサリを検査対象とした貝毒検査を実施し、規制値を上回る貝毒が検出された場合には漁業関係者等に対して出荷自主規制の指導を行っている。このうち当所の医動物研究室では、県農業水産局から依頼を受け、麻痺性貝毒検査を担当している。検査は公定法であるマウス試験法及び HPLC による PST 成分の分析・解析を実施している。

2021 年シーズン (令和 3 年 3 月～5 月) に三河湾内の 1 海域 (蒲郡・豊橋海域) で採取されたアサリ検体から出荷規制値 (4 MU/g) を上回る 22.61 MU/g を示す PST が検出され、4 月 13 日から 4 月 28 日までの 15 日間にわたり出荷自主規制が行われた。また、

その他 2 海域 (一色・衣浦海域および幡豆海域) において、出荷規制値より値は低いものの、PST が検出された。(海域については図 1 を参照)

本研究では、愛知県内で採取されたアサリにおける PST 組成及び毒の蓄積 (毒化) 及び排出 (減毒) のメカニズムの解明を目的として、2021 年シーズンに県内海域で採取されたアサリ検体の PST を HPLC (高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography)) により分析し、毒量と毒組成の解析を行った。

## 材料と方法

### 1. 試料

2021 年シーズン (令和 3 年 3 月～5 月) に愛知県内で採取されたアサリ 48 検体

### 2. 方法

#### 1) マウス試験法による毒性試験

厚生労働省から示された公定法のマウス試験法により実施した<sup>3)</sup>。貝のむき身をホモジナイズ後、100 g を採取し 0.1 N 塩酸 100 mL を加えて pH3 に調整し、沸騰水中で 5 分間加熱後、室温に冷却し pH3 に調整し蒸留水で 200 mL に定容した。3000 rpm・10 分間の遠心分離を行った上清を試料とし、1 mL を体重 19～20 g の ddY 系雄マウス 5 匹の腹腔内に投与し、中央致死時間を求め、マウ



図 1 愛知県海域図

ス単位 (MU) 換算表により毒力を算出した。

## 2) HPLC による麻痺性貝毒成分の分析

HPLC による分析には国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所 (以下「(国研) 水産研究・教育機構 水産技術研究所」という。) 令和 2 年度貝毒分析研修会で示された方法<sup>9)</sup>を用いた。マウス試験法に用いた試験液を SepPakC18 カートリッジ (Waters) 及び遠心チューブ型限界ろ過膜 (分画分子量 10,000 Ultrafree-MC, Millipore) に通過させ、50 mM 塩酸で適宜希釈の後検液とした。

麻痺性貝毒標準品は (国研) 水産研究・教育機構 水産技術研究所から配布された gonyautoxin1 (GTX1)、GTX2、GTX3、GTX4、*N*-sulfocarbamoyl gonyautoxin2 (C1)、*N*-sulfocarbamoyl gonyautoxin3 (C2)、neosaxitoxin (neoSTX) 及び National Research Council Canada 社の製品である decarbamoyl GTX2 (dc-GTX2)、dc-GTX3 の計 9 成分を用いた。また、PST 毒力計算の比毒性数値は Oshima<sup>10)</sup> が報告した数値を用いた。HPLC 分析装置は、島津製作所製の LC10A を使用し、分析カラムは Develosil (野村化学, 4.6 mm id×250 mm)、Inertsustain C8 (GL サイエンス, 4.6 mm id×250 mm) を用いた。また、PST 毒力は次式により求めた。

各 PST 成分毒力 = 検出量 (nmol/g) × 比毒性数値

Total PST 毒力 = 9 成分毒力の和

ポストカラム蛍光誘導化法<sup>10)</sup>における測定は以下の条件で行った。

カラム温度：35℃. 反応温度：65℃. 移動相：(1) C 群, テトラブチルアンモニウムリン酸塩 (2 mM) pH6.0 (2) GTX 群, 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (2 mM)/10 mM リン酸アンモニウム, pH7.1 (3) neoSTX, 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (2 mM)/30 mM リン酸アンモニウム, pH7.1-アセトニトリル (100:5, v/v)

## 3) LC-MS/MS による麻痺性貝毒成分の分析

LC-MS/MS による分析・解析については、東北大学にて単離・精製された M-toxin (M1) 標準品を用い、(国研) 水産研究・教育機構 水産技術研究所で実施した。

## 結果

### 1. アサリの麻痺性貝毒組成

アサリはマウス試験法にて貝毒を検出した検体を陽性、不検出検体を陰性として解析を行った (表 1)。陽性検体において、neoSTX を除く 8 成分における各平均毒量は、陰性検体における各平均と比較すると、4.8 倍 (dcGTX2) ~ 23.8 倍 (C2) を示した。PST 組成について、陽性検体では C1 (39%) < C2 (57%) だが、反対に陰性検体では C1 (58%) > C2 (36%) であり、両検体間における C1+C2 の含有率に差はなく、全体の約 95% を占めた。

陽性検体については  $\beta$ -epimer の貝毒 (C2, GTX4, GTX3, dcGTX3) を  $\alpha$ -epimer の貝毒 (C1, GTX1, GTX2, dcGTX2) に比べて多く含有しており、陰性検体は反対の傾向を示した。

図 2 に PST を検出したアサリの採取された 2 海域の PST 毒量の推移を、図 3 にその PST 組成の推移を示した。蒲郡・豊橋海域では 4 月 13 日に毒量のピーク (73.1 nmol/g) を示し、1 週間後に 11.4 nmol/g と急激に減少した。一方、一色・衣浦海域では、4 月 13 日に毒量のピーク (7.3 nmol/g) を示し、1 週間後の毒量は 5.3 nmol/g で、蒲郡・豊橋海域と比較すると、緩やかな減少であった。PST 組成については、両地点で C1+C2 の含有率が 90% 以上を占めており、特に C1、C2 比に着目すると、毒量がピーク時には C2 が増加し C2 > C1 であるが、ピーク後徐々に C2 < C1 へと平衡化が進む傾向が確認された。

### 2. *At complex* の出現数とアサリの毒力推移

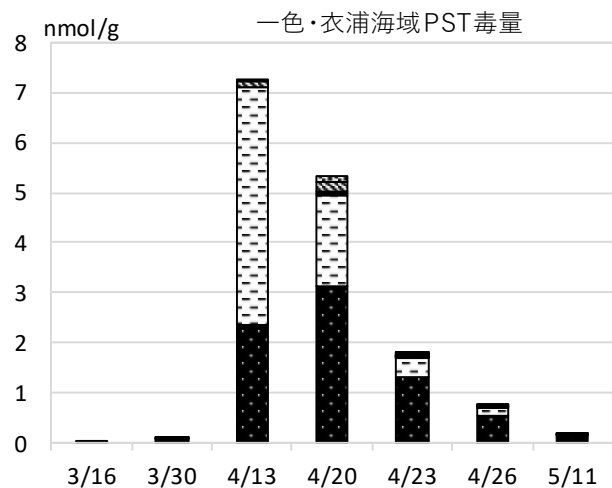
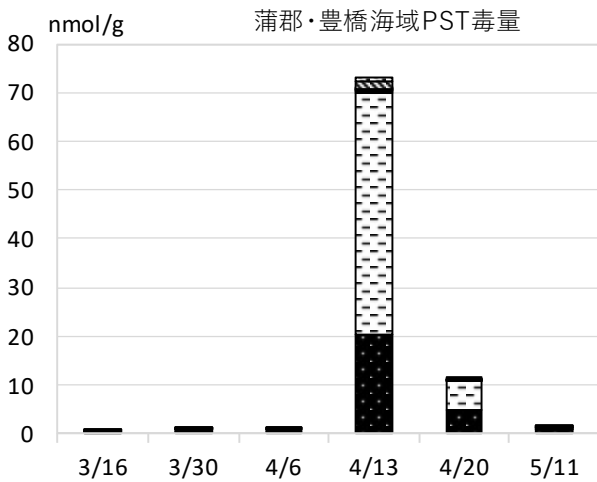
#### (1) 蒲郡・豊橋海域

*At complex* 出現数とアサリの PST 毒力推移の関係を図 4 に示した。*At complex* 出現数には貝毒プランクトン調査結果の数値を用いた<sup>11)</sup>。蒲郡・豊橋海域では 3 月 15 日に初めて *At complex* の出現が確認され (1 cells/mL)、徐々に増加し 4 月 6 日にピーク 263 cells/mL を示した。その後速やかに減少し、4 月 26 日以降は検出されていない。

アサリの毒力については、*At complex* が出現して 2 週間後の 3 月 30 日 (2.28 MU/g) に、PST がマウス試験法にて検出され、*At*

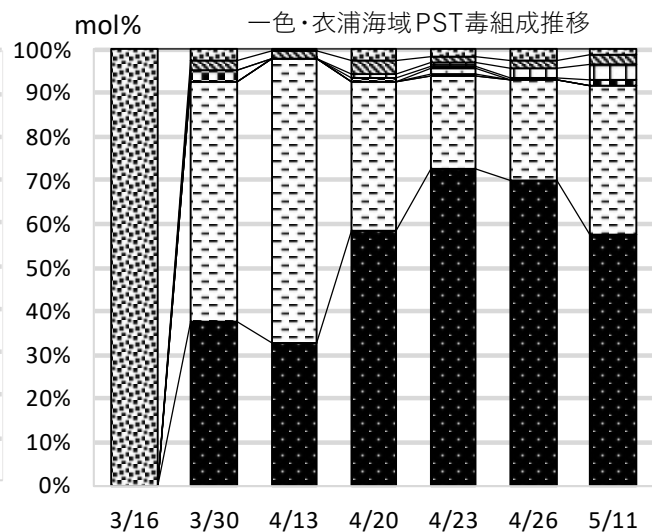
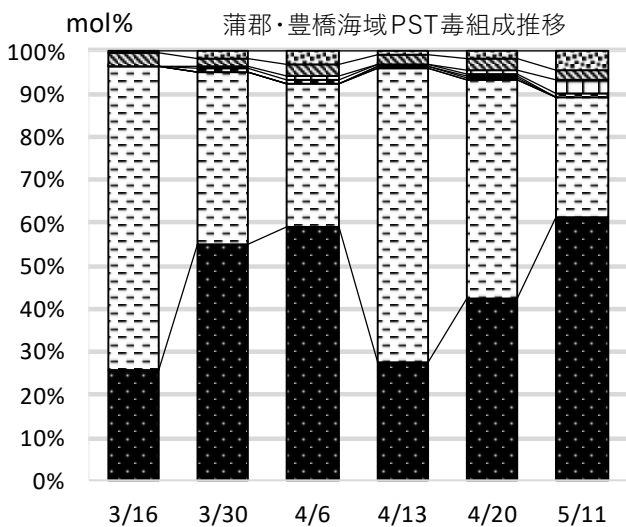
表 1 愛知県のアサリ麻痺性貝毒組成 2021年シーズン

貝種(検体数)		陽性アサリ(12)		陰性アサリ(36)	
	比毒性	平均毒素量	(%)	平均毒素量	(%)
C1	15	4.453	38.826	0.439	58.017
C2	239	6.494	56.621	0.273	36.118
GTX4	1803	0.028	0.244	0.001	0.117
GTX1	2468	0.016	0.141	0.001	0.073
dcGTX3	1872	0.059	0.517	0.005	0.690
dcGTX2	1617	0.041	0.357	0.008	1.108
GTX3	1584	0.246	2.145	0.013	1.747
GTX2	892	0.132	1.148	0.016	2.129
neoSTX	2295	0.000	0.000	0.000	0.000
合計 (nmol/g)		11.469	100	0.757	100



- GTX2
- GTX3
- dcGTX2
- dcGTX3
- GTX1
- GTX4
- neoSTX
- C2
- C1

図2 各海域におけるアサリ PST 毒量推移



- GTX2
- GTX3
- dcGTX2
- dcGTX3
- GTX1
- GTX4
- neoSTX
- C2
- C1

図3 各海域におけるアサリ PST 毒組成推移

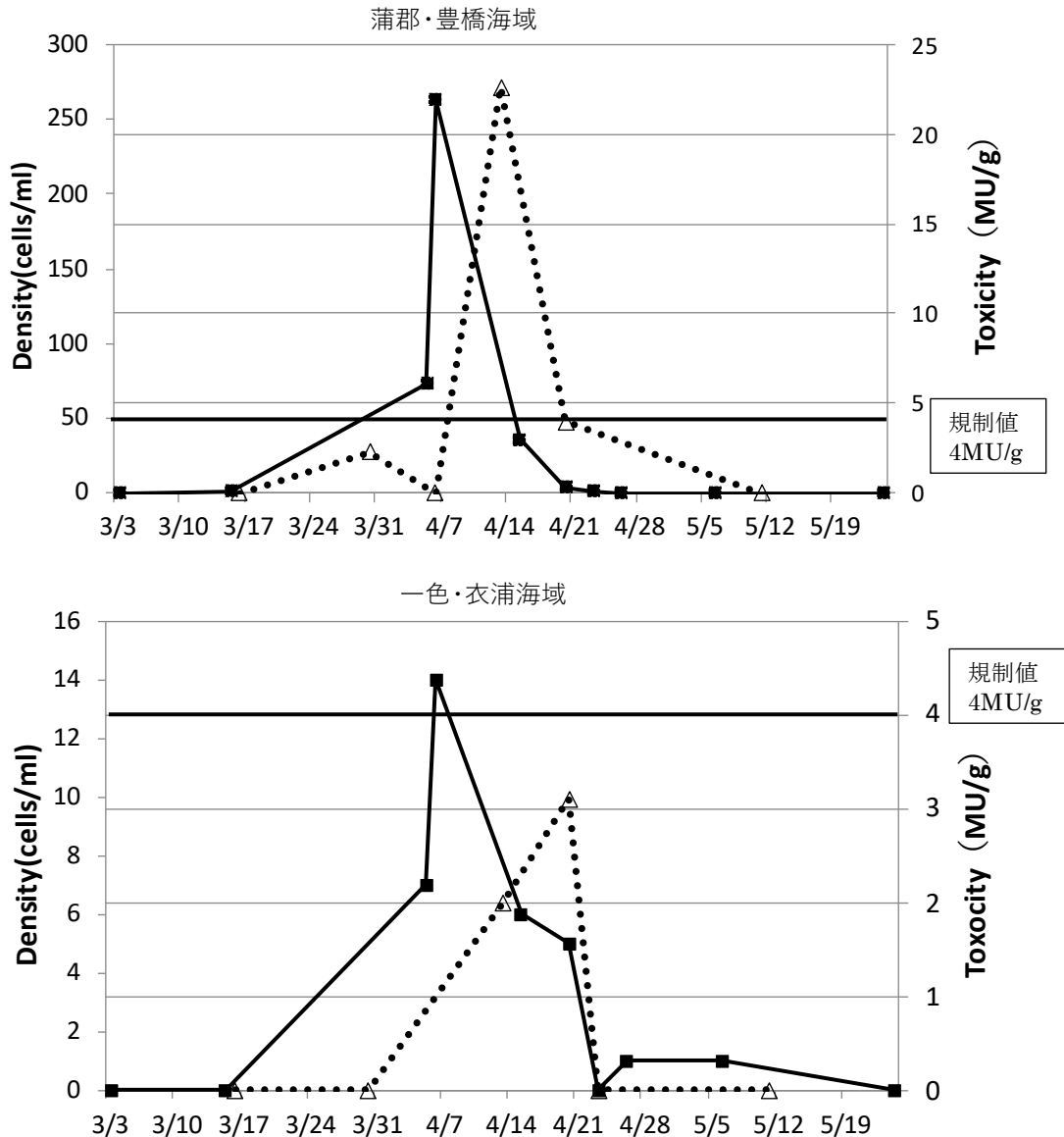


図4 プランクトン出現数とアサリの毒力推移

(同日に海域内の複数地点でプランクトンを採取している場合は最大値を使用、また表層と低層を調査している場合はその和を使用) ■, プランクトン出現数 (cells/g) ; △, アサリの毒力 (MU/g)

*complex*の出現数がピークに達してから1週間後の4月13日に最高値 (22.61 MU/g) を示した。

#### (2) 一色・衣浦海域

4月6日に *At complex* の出現数がピーク 14 cells/mL を示した。4月23日に一度 0 cells/mL を示したが、2週間後の5月6日に *At complex* (1 cells/mL) が確認されており、5月24日以降は検出されていない。また、*At complex* の出現数がピークに達してから2週間後の4月20日に PST 毒力が最高値 (3.1 MU/g) を示し、*At complex* の出現数が 0 cells/mL となった4月23日以降は不検出 (<1.75 MU/g) であった。

#### 3. マウス試験法と HPLC 法における PST 毒力の比較

マウス試験法と HPLC 法における PST 毒力の関係を図5に示した。マウス試験法で得られた値 1.88~22.61 MU/g の範囲で強い相関性 ( $r^2=0.98$ , 12点) が得られた。2法による測定値を比較すると、すべての検体で HPLC 法値 < マウス試験法値であり、0.4~5.8 MU/g の範囲において値の乖離がみられ、マウス試験法値における HPLC 法値の占める割合は 12.3~93.2% であった (図6)。更に、この値の乖離について、マウス試験法にて貝毒を検出した検体の HPLC クロマトグラムを詳細に検討したところ、すべて



の検体において同じ保持時間に標準品 9 成分とは一致しない未知ピークが確認された。

このピークは、GTX1 に近接した保持時間に検出されるが、GTX4 との比率などを考慮して、未知ピークと同定した。マウス試験法値とこのピーク面積には強い相関がみられ、相関係数は  $r^2=0.96$  であった(データ非掲載)。

#### 4. LC-MS/MS による麻痺性貝毒成分の分析

未知ピークを同定するため、マウス試験法にて貝毒を検出した 2 検体について、M-

toxin (M1) 標準品を用いて LC-MS/MS による測定を実施したところ、両検体から STX 類縁体である M-toxin (M1) が検出された。(データ非掲載)

#### 考 察

2021 年シーズンに愛知県三河湾の二海域においては、*At complex* の出現および増加が確認され、採取されたアサリが毒化した。いずれの海域においても *At complex* の出現数が 4 月 6 日にピークに達し、アサリにおける PST 毒力は豊橋・蒲郡海域においては 4 月 13 日に 22.61 MU/g、一色・衣浦海域では 4 月 20 日に 3.1 MU/g を示した。両海域から採取されたアサリにおいて、*At complex* の出現数がピークに達してから 2 週間以内に調査期間中最も高い PST 毒力を検出した。*At complex* が減少し始めると、アサリの毒力も急激に低下し、規制値を超えた豊橋・蒲郡海域のアサリは、1 週間以内に規制値以下、一色・衣浦海域は 3 日後に不検出となった。HPLC による解析では、マウス試験法の結果に関わらず毒組成は C 群が主成分であり、これは 2014 年に愛知県で規制値を超えた際の毒組成と同様<sup>12)</sup>の結果であった。 $\alpha$ -epimer である C1 と  $\beta$ -epimer であ

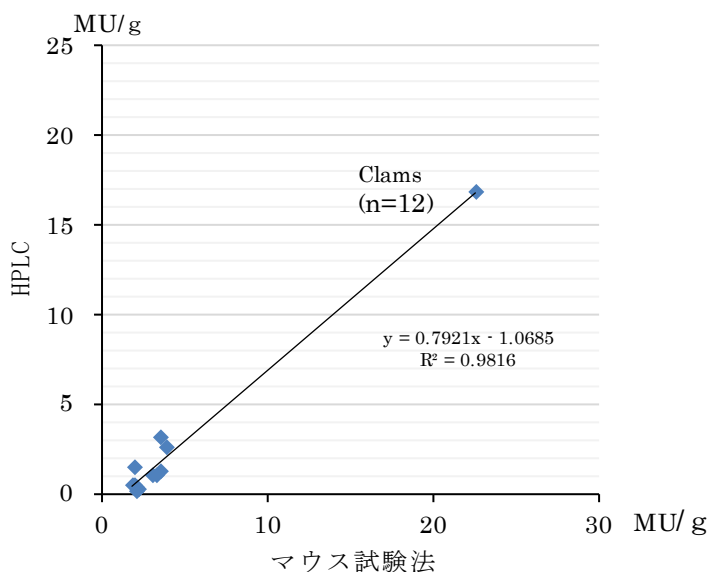


図 5 マウス試験法と HPLC 法による毒力の比較

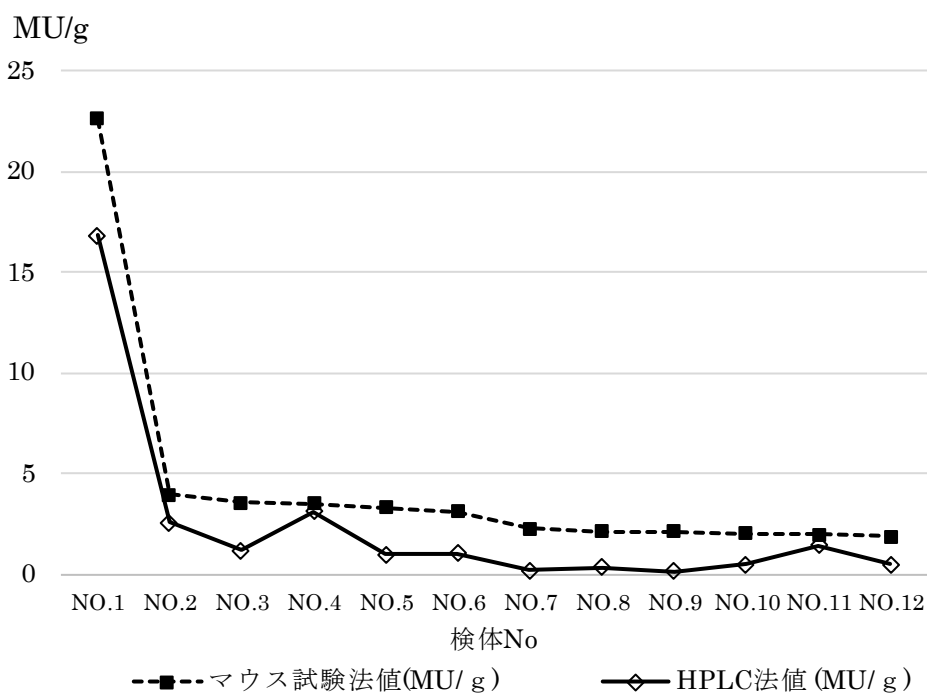


図 6 マウス試験法と HPLC 法における毒力値

る C2 の含有率に着目すると、マウス試験法で貝毒が検出された陽性アサリにおける平均毒組成は  $C1 < C2$  であり、毒量のピークを境に  $C1 < C2$  から  $C1 > C2$  へと徐々に変化していた。また、その他の貝毒についても毒量のピークを境に  $\alpha$ -epimer  $<$   $\beta$ -epimer から  $\alpha$ -epimer  $>$   $\beta$ -epimer への変化が確認された。 $\alpha$ -epimer の貝毒(C1, GTX1, GTX2, dcGTX2)と  $\beta$ -epimer の貝毒(C2, GTX4, GTX3, dcGTX3) の平衡到達点における存在比は約 3 : 1 であり、渦鞭毛藻は  $\beta$ -epimer の貝毒を生合成することが知られている<sup>2) 6)</sup>。また、愛知県の海域で主に発生する *Alexandrium* 属に属する有毒プランクトンが産生する PST の主成分は C 群である<sup>13)</sup>。同プランクトンの出現・増加に遅れてアサリの毒化が始まり、アサリに取り込まれた毒はプランクトンの毒組成を反映して、 $\alpha$ -epimer と比べ、毒性の強い  $\beta$ -epimer の含有率が高くなっていると推察された。また、減毒時には毒量の減少と、毒組成の変化による毒力の減少が同時に起きていたと考えられた。

マウス試験法と HPLC 法における PST 毒力については、強い相関関係が得られたが、マウス試験法で貝毒が検出された 12 検体すべてにおいて HPLC 法値  $<$  マウス試験法値となった。マウス試験法値における HPLC 法値の占める割合は 12.3 ~ 93.2% であり、値の乖離率は検体ごとに差がみられた。マウス試験法では不純物等の影響により毒性の発現が遅れることで HPLC 法値  $>$  マウス試験法値となる報告<sup>10) 14)</sup> は多く、県内でも同様の報告<sup>12)</sup> がされているが、今回これとは異なる結果となった。HPLC クロマトグラフの解析から標準品 9 成分とは一致しない未知ピークがマウス試験法にて貝毒を検出したすべての検体で認められ、共通した未知ピーク面積とマウス試験法値には正の相関がみられたことから、未知ピークが PST 類縁体であることを疑い、原因物質について同定を試みた。

M-toxin(M1) 標準品を用いた LC-MS/MS による解析の結果、未知ピークは M-toxin(M1) と同定され、これが 2 法の測定値差に大きな影響を与えていると推察された。また、

M-toxin(M1) が愛知県産アサリに含まれていることが初めて明らかとなった。

機器分析には標準品が必須であるが、現在、M-toxin 類を含め多くの PST 類縁体については、標準品が市販されていない。PST 関連化合物には多くの成分の存在が確認されており<sup>15)</sup>、M-toxin 類はその代表例であり PST の代謝物群(11-hydroxySTX, M toxins)と考えられている<sup>16) 17) 18)</sup>。M-toxin(M1) については C2 の代謝物と報告されており<sup>19) 20)</sup>、化学構造等から M-toxin 類は比較的毒力が弱い貝毒に分類されると考えられているが<sup>19)</sup>、明確な毒力数値は不明である。今回マウス試験法と HPLC 法における PST 毒力に最大 5.8 MU/g の差がみられたことから、出荷規制値(4 MU/g)を上回る高濃度の M-toxin(M1) が含まれている可能性が考えられた。国内でのアサリにおける M-toxin 類の検出例は報告されておらず、アサリを含む二枚貝の毒組成や代謝経路の解明のために単離・精製による標準品の作製が急務である。

今後は M-toxin(M1) の単離・精製を行い、毒力数値の算出等毒成分の詳細な解析を行うとともに、愛知県における過去のアサリ検体および採取された *At complex* の毒組成について同成分をターゲットとして再調査する予定である。

## 謝 辞

M1 標準品を御恵与くださいました東北大学大学院農学研究科 山下まり教授ならびに沼野聡博士に御礼申し上げます。アサリ試料の LC/MS/MS 測定を実施していただきました、(国研)水産研究・教育機構 水産技術研究所の渡邊龍一博士に感謝申し上げます。また、御指導及び御協力いただきました愛知県水産試験場及び水産課の皆様にも感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 塩見一雄、長島裕二：海洋動物の毒（新訂版）、1-15、2006、成山堂書店、東京。
- 2) 後藤哲久、佐藤吉朗、吉田満監修：食品危害要因 その実態と検出法。463-468、2014、テクノシステム、東京。

- 3) 厚生労働省監修:食品衛生検査指針理化学編、673-680, 2005, 社団法人日本食品衛生協会, 東京.
- 4) 厚生労働省:昭和55年7月1日環乳第29号厚生省環境衛生局長通知(2021年11月30日現在); [https://www.mhlw.go.jp/web/t\\_doc?dataId=00tc0777&dataType=1&pageNo=1](https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc0777&dataType=1&pageNo=1)
- 5) Wiese M, Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan B: Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs* 8:2185-2211, 2010.
- 6) 村上りつ子、野口玉雄:麻痺性貝毒—最近の知見を中心に—. *食品衛生学雑誌* 41(1):1-10, 2000.
- 7) 高田久美代、妹尾正登、東久保靖、高辻英之、高山晴義、小川博美:マガキ、ホタテガイおよびムラサキイガイにおける麻痺性貝毒の蓄積と減毒の差異. *Nippon Suisan Gakkaishi* (4):598-606, 2004.
- 8) 令和元年度愛知県水産試験場業務報告、120-121, 2018(2021年12月30日現在); <https://www.pref.aichi.jp/soshiki/suisanshiken/r01gyouhou.html>
- 9) 大島泰克:国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所令和2年度貝毒研修会「麻痺性貝毒HPLC分析法」テキスト.
- 10) Oshima Y: Postcolumn Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins. *Journal Of AOAC International* 78(2):528-532, 1995.
- 11) 愛知県水産課:貝毒プランクトン調査結果(2021年12月30日現在); <https://www.pref.aichi.jp/soshiki/suisan/000000879.html>
- 12) Hasegawa A, Hayakawa D, Nakamura M, Hata M, Yamashita T, Minagawa H: Analysis of Paralytic Shellfish Poison exceeding the official regulatory standard level in bivalves collected in Aichi Prefecture during 2014 season. *愛知県衛生研究所所報* 65:23-30, 2015.
- 13) Okumura M, Yamada S, Oshima Y, Ishikawa N: Characteristics of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins Derived From Short-Necked Clams (*Tapes japonica*) in Mikawa Bay. *Natural Toxins* 2:141-143, 1994.
- 14) 今井一郎、福代康夫、広石伸互 編 社団法人日本水産学会監修:貝毒研究の最先端—現状と展望、19-29, 2007, 恒星社厚生閣、東京.
- 15) Minowa T, Cho Y, Oshima Y, Konoki K, Yotsu-Yamashita M: Identification of a Novel Saxitoxin Analogue, 12 $\beta$ -Deoxygonyautoxin 3, in the Cyanobacterium, *Anabaena circinalis* (TA04). *Toxins* 11:539, 2019.
- 16) Dell'Aversano C, Walter JA, Burton IW, Stirlin DJ, Fattorusso E, Quilliam MA: Isolation and Structure Elucidation of New and Unusual Saxitoxin Analogues from Mussels). *Journal of Natural Products* 71:1518-1523, 2008.
- 17) Li A, Ma J, Cao J, Wang Q, Yu R, Thomas K, Quilliam MA: Analysis of paralytic shellfish toxins and their metabolites in shellfish from the North Yellow Sea of China: Food Additives and Contaminants 29:1455-1464, 2012.
- 18) Che Y, Ding L, Qiu J, Ji Y, Li A: Conversion and stability of new metabolites of paralytic shellfish toxins under different temperature and pH conditions: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68:1427-1435, 2020.
- 19) Ding L, Qiu J, Li A: Proposed biotransformation pathways for new metabolites of paralytic shellfish toxins based on field and experimental mussel samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:5494-5502, 2017.
- 20) Qiu J, Meng F, Ding L, Che Y, McCarron P, Beach DG, Li A: Dynamics of paralytic shellfish toxins and their metabolites during timecourse exposure of scallops *Chlamys farreri* and mussels *Mytilus galloprovincialis* to *Alexandrium pacificum*. *Aquatic Toxicology* 200:233-240, 2018.

# Analysis of Paralytic Shellfish Toxins exceeding the official regulatory standard level in bivalves collected in Aichi Prefecture during 2021 season

Yuki Hijikata, Nao Yamamoto, Akiko Hasegawa, Tetsuya Kobayashi, Katsuhiko Sato

Paralytic shellfish Toxins (PST) is a group of potent neurotoxins produced by a number of toxic dinoflagellate species, e.g. , *Alexandrium* , and causes food-poisoning if accumulates in bivalves by predatory behavior.

In the 2021 season (March to May 2021), PST infestation in Mikawa Bay was observed for the first time in four years in Aichi Prefecture.

The toxic level exceeding the official regulatory standard of 4 mouse units (MU)/g was observed by the mouse bio assay (MBA) in a course of PST monitoring of bivalves in Mikawa Bay.

The toxin profile was further analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). As a result of the analysis, the main component in the toxic composition of clams was the low toxicity group C( C1 and C2).

And in 12 samples, there was a discrepancy between the MU values calculated from the concentrations and specific toxicities of 9 components (C1, C2, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, dc-GTX2, dc-GTX3, neoSTX) and them from MBA.

In addition, an unknown peak with the same retention time, which is different from the above 9 components, was observed in the chromatogram.

The results of LC-MS/MS analysis suggested that M-toxin (M1), an analogue of STX, was present in clams.

Key words : Paralytic Shellfish Toxins,

High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Clam, M-toxin

---

## 調 査 研 究

---

# 乾燥植物片からのエフェドリンの検出事例と構成植物の推定

富田浩嗣、服部靖子、小林俊也、森 久人、上野英二、棚橋高志

### 要 旨

薬物乱用による健康被害を未然に防止するため、インターネットを通じて試買した指定薬物等の含有が疑われる製品を検査した。その結果、乾燥植物片 2 製品から、医薬品成分のエフェドリン及びプソイドエフェドリンを同定した。また、メントール、メントン及び酢酸メンチル等、ハッカの精油成分を検出した。製品にマオウ及びハッカが含まれるか確認するため、構成植物の推定を試みた。LC-MS/MS を用いて、マオウ及びハッカの抽出液と、形態学的特徴から試料を分割した抽出液を測定し、ピーク面積を変数とした主成分分析を行った。その結果、第 1 主成分の寄与率は 48.5%、第 2 主成分の寄与率は 30.4%であった。各試料の第 1 主成分及び第 2 主成分の主成分得点をプロットした結果、2 製品は類似の植物から構成されており、これらの製品にハッカは含まれないが、マオウは含まれると考えられた。

キーワード：乾燥植物片、エフェドリン、LC-MS/MS、主成分分析

### 序 文

危険ドラッグは、麻薬、覚せい剤、大麻等と類似の化学構造、作用を持つ化学物質を含有するものであり、平成 10 年頃からその流通や乱用が社会問題となっている。

「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」による指定薬物制度の導入や、規制と取締りの強化により、平成 27 年 7 月には販売実店舗が消滅し、危険ドラッグによる健康被害や新規出現は減少している<sup>1-3)</sup>。しかし、インターネットやスマートフォンなどの普及拡大により、消費者が容易に危険ドラッグ製品等入手できるため、規制や監視体制の維持、強化が必要である。

愛知県では、薬物乱用による健康被害を未然に防止するため、「薬物の濫用の防止に関する条例」を制定し、知事指定薬物に

よる規制強化や、指定薬物等の含有が疑われる製品の買い上げ検査による監視強化を継続して行っている。当所では、買い上げされた製品について、LC-MS/MS (Liquid chromatograph-Mass spectrometry)、GC-MS (Gas chromatograph-Mass spectrometry) などを用いて検査を実施しており、これまでに多くの規制成分等を検出し、報告してきた<sup>4)</sup>。

インターネットを通じて買い上げた 6 製品を検査したところ、いずれの製品からも指定薬物成分は検出されなかったが、乾燥植物片 2 製品から医薬品成分エフェドリンを検出した。本報では、その検出事例について報告するとともに、LC-MS/MS 測定データの主成分分析により、構成植物の推定を試みた結果について報告する。

## 方 法

### 1. 試料

令和2年12月に県保健医療局生活衛生部医薬安全課がインターネットを通じて試買した、乾燥植物片2製品(No.1及びNo.2)を試料とした(図1(A)及び(B))。

### 2. 試薬、標準品及び生薬

メタノールは特級グレードを、アセトニトリル及びギ酸はLC-MSグレードを用いた。エフェドリンの標準品として、生薬試験用エフェドリン塩酸塩・プソイドエフェドリン塩酸塩混合標準液(各100 mg/L、メタノール(1→2)溶液)及び生薬試験用エフェドリン塩酸塩標準液(50 mg/L、メタノール(1→2)溶液)を用いた。試薬及び標準品はいずれも富士フイルム和光純薬(株)製を用いた。局方マオウ及び局方ハッカは、それぞれ(株)ウチダ和漢薬及び(株)栃本天海堂から入手した。

### 3. 試料溶液、標準溶液及び生薬抽出液の調製

#### (1) 試料溶液

試料No.1及びNo.2をそれぞれ粉砕して約50 mgを精密に量り、メタノールを正確に1 mL加えて10分間超音波抽出(UT-306、SHARP、300 W、37 kHz)した。抽出液を3000 rpmで10分間遠心分離(Model 3520、KUBOTA)し、孔径0.20 µmのメンブランフィルター(DISMIC-13HP、アドバンテック東洋(株))でろ過したろ液をメタノールで10倍希釈して試料溶液No.1及びNo.2とした。

#### (2) 標準溶液

エフェドリン塩酸塩・プソイドエフェドリン塩酸塩混合標準液をメタノールで10倍希釈し、エフェドリン・プソイドエフェドリン混合標準溶液とした。エフェドリン塩酸塩標準液をメタノールで5倍希釈し、エフェドリン標準溶液とした。

#### (3) 試料溶液(S)及び(L)

試料を内容物の形状から、茎(S)とそれ以外(L)に分割した(図1(C)及び(D))。

分割した試料をそれぞれ粉砕し、(1)試料溶液の調製方法に従って処理し、茎の部分を試料溶液No.1(S)及びNo.2(S)、それ以外を試料溶液No.1(L)及びNo.2(L)とした。各試料溶液は粉砕から3併行で調製した。

#### (4) 生薬抽出液

2社から入手した局方マオウ及び局方ハッカ(図1(E)及び(F))をそれぞれ粉砕し、(1)試料溶液の調製方法に従って処理し、マオウ(1)、(2)及びハッカ(1)、(2)抽出液とした。各抽出液は粉砕から3併行で調製した。

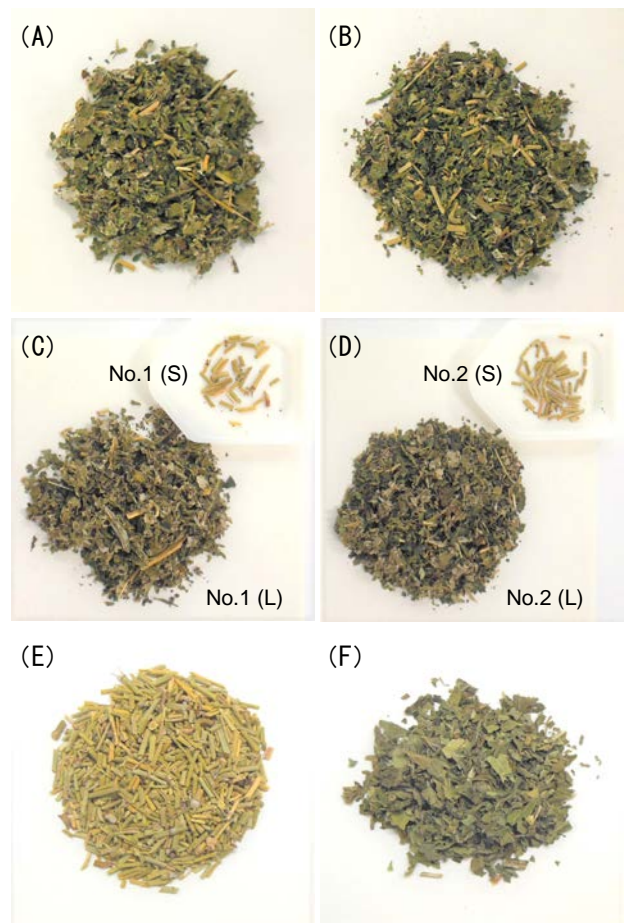


図1 試料及び生薬の画像

- (A) 試料 No. 1、(B) 試料 No. 2、  
(C) 試料 No. 1(S)及び(L)、  
(D) 試料 No. 2(S)及び(L)、  
(E) マオウ、(F) ハッカ

## 4. 測定及び解析

### (1) 試料溶液

試料溶液を GC-MS 及び LC-MS/MS に注入して測定した。得られたピークの保持時間、マススペクトル、精密質量等から製品中の含有成分を推定した。また、エフェドリン・プソイドエフェドリン混合標準溶液を LC-MS/MS で測定し、試料溶液のデータとの一致を確認することにより同定した。

### (2) 試料溶液 (S)、(L) 及び生薬抽出液

試料溶液 (S) 及び (L)、マオウ及びハッカ抽出液は LC-MS/MS に注入して測定した。得られたデータから Compound Discoverer 3.2 ソフトウェア(以下、CD 3.2)を用いてピーク検出した。検出されたピークのうち、高分解能マススペクトルライブラリの精密質量及び MS/MS スペクトルとの一致度が高い 95 種類のピークを保持時間順にリストにし、各溶液でのそれらのピーク面積を変数として、統計解析ソフト R を用いて主成分分析を行った。

## 5. 測定条件

### (1) GC-MS

装置は 7890B-7000D GC-MS システム (Agilent Technologies) を用い、カラムは Rxi-5Sil MS (0.25 mm×30 m、0.25  $\mu$ m、Restek) を用いた。カラム温度は、80°C (1分) → 5°C/分 → 190°C (15分) → 10°C/分 → 310°C (10分) に設定した。その他の条件は、キャリアーガス：ヘリウム、0.7 mL/min、注入量：1  $\mu$ L、スプリットレス、注入口温度：200°C、イオン化法：EI、検出器温度：280°C とした。

### (2) LC-MS/MS

装置は Ultimate3000 UHPLC-Q Exactive Focus LC-MS システム (Thermo Fisher Scientific) を用いた。カラムは ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm、1.8  $\mu$ m、Waters) に、Van Guard column (2.1 mm×5 mm、1.8  $\mu$ m、Waters) を接続して用いた。移動相は、A 液：0.1 %ギ酸、B 液：0.1 %ギ酸含有アセトニトリルを用い、試料溶液の測定では、グラジエント条件：(A:B) [(95:5) → (80:20)] 20分 → [(80:20)

→ (20:80)] 30分 → 5分保持とし、試料溶液 (S)、(L) 及び生薬抽出液のグラジエント条件は、(A:B) [(95:5) → (5:95)] 18分 → 5分保持とした。カラム温度は 40°C、流速は 0.3 mL/min、注入量は 1  $\mu$ L とした。MS/MS 条件は、イオン化法：ESI (+)、スプレー電圧：4.00 kV、キャピラリー温度：300°C、シーガス：50 arb、Aux ガス：12 arb、ベーパーライザー温度：300°C、S-Lens レベル：50、Full MS 分解能：70000、測定範囲： $m/z$  50~750、Data Dependent Scan 分解能：17500、コリジョンエネルギー：20、60 及び 100 eV (Stepped CE)、ループカウント：2 とした。

## 結果及び考察

### 1. 試料溶液の測定

#### (1) GC-MS によるハッカ精油成分の検出

試料溶液を測定し、検出されたピークのマススペクトルを NIST 2017 ライブラリにより検索した。その結果、2 試料とも保持時間 8.4 分付近にメントン、8.9 分付近にメントール、11.6 分付近に酢酸メンチルとスペクトルパターンがよく一致するピークをそれぞれ検出した (図 2)。これらはハッカの精油成分であることから、試料の一部にハッカが含まれる可能性が考えられた。

#### (2) LC-MS/MS によるエフェドリンの検出と同定

試料溶液を測定し、CD 3.2 によりピーク検出及びデータ解析した結果、2 試料とも保持時間 4.6 分及び 4.8 分付近に 2 本のピーク (peak 1 及び peak 2) を検出した。これらのピークのプロダクトイオンスペクトル及び精密質量は、高分解能マススペクトルライブラリのエフェドリンのデータとよく一致したことから、これらはエフェドリン及びエフェドリンの光学異性体であるプソイドエフェドリンと考えられた。エフェドリン・プソイドエフェドリン混合標準溶液を測定して保持時間及びスペクトルパターンを確認するとともに、エフェドリン標準溶液を測定することにより、エフェドリンの保持時間を確認し、

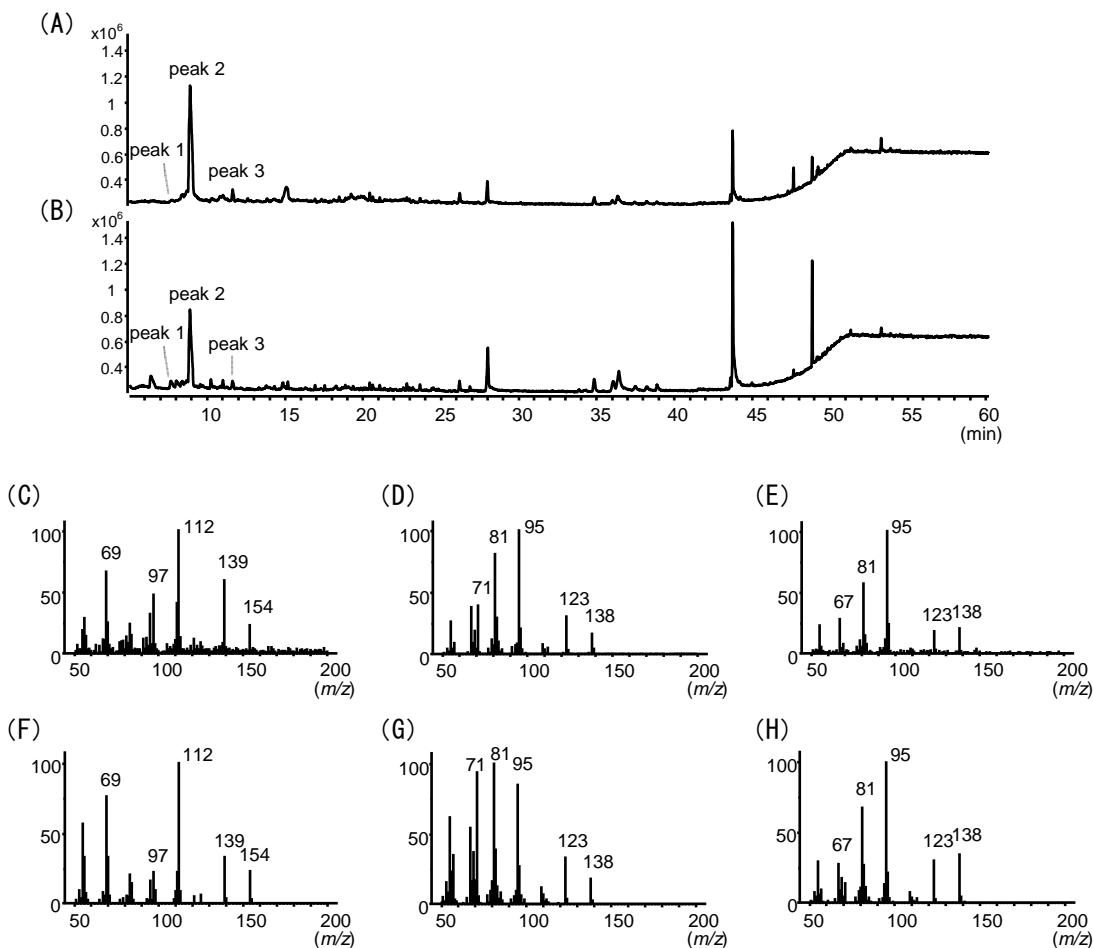


図2 GC-MSクロマトグラム及びマススペクトル

試料溶液 トータルイオンクロマトグラム (A) 試料溶液 No. 1、(B) 試料溶液 No. 2、  
 試料溶液 No. 1 マススペクトル (C) peak 1 (8.4分)、(D) peak 2 (8.9分)、(E) peak 2 (11.6分)、  
 NIST 2017 Library マススペクトル (F) メントン、(G) メントール、(H) 酢酸メンチル

試料溶液から検出された peak 1 をエフェドリン、peak 2 をプソイドエフェドリンと同定した (図 3)。

## 2. 主成分分析による構成植物の推定

試料溶液の GC-MS 測定によりハッカの精油成分を検出し、LC-MS/MS 測定によりエフェドリン及びプソイドエフェドリンを同定した。また、試料は 2 試料とも、マオウの性状とよく似た茎状の物と細切された葉の混合物であった。試料にマオウ及びハッカが含まれるか確認するため、試料を茎とそれ以外に分割し、構成植物の推定を試みた。

試料溶液 No. 1 (S) 及び No. 2 (S)、No. 1 (L) 及び No. 2 (L)、マオウ (1)、(2) 及びハッカ (1)、(2) 抽出液を LC-MS/MS により測定した。試料溶液 No. 1 (S) と No. 2 (S) のトータルイオンクロマトグラム (TIC) は、保持時間 3~4 分付近に特徴

的なピークが認められ、マオウ (1)、(2) 抽出液の TIC に類似していた。一方、No. 1 (L)、No. 2 (L) 及びハッカ (1)、(2) 抽出液は、特徴的な TIC を示さなかった。得られたデータを CD3.2 により解析し、検出されたピークの MS/MS スペクトルを高分解能 MS/MS スペクトルライブラリと比較した。各溶液における保持時間及び精密質量が一致したピークは同一成分とみなした。試料溶液 No. 1 (S)、No. 2 (S) 及びマオウ (1)、(2) 抽出液において、保持時間 3.6~3.7 分にエフェドリン及びプソイドエフェドリンが検出されたほか、3.1~3.3 分にノルエフェドリン及びノルプソイドエフェドリンが、4.0 分付近に N-メチルエフェドリンまたは N-メチルプソイドエフェドリンが検出された (図 4)。

検出されたピークのうち、精密質量及びスペクトルパターンの一貫度が高い 95 種



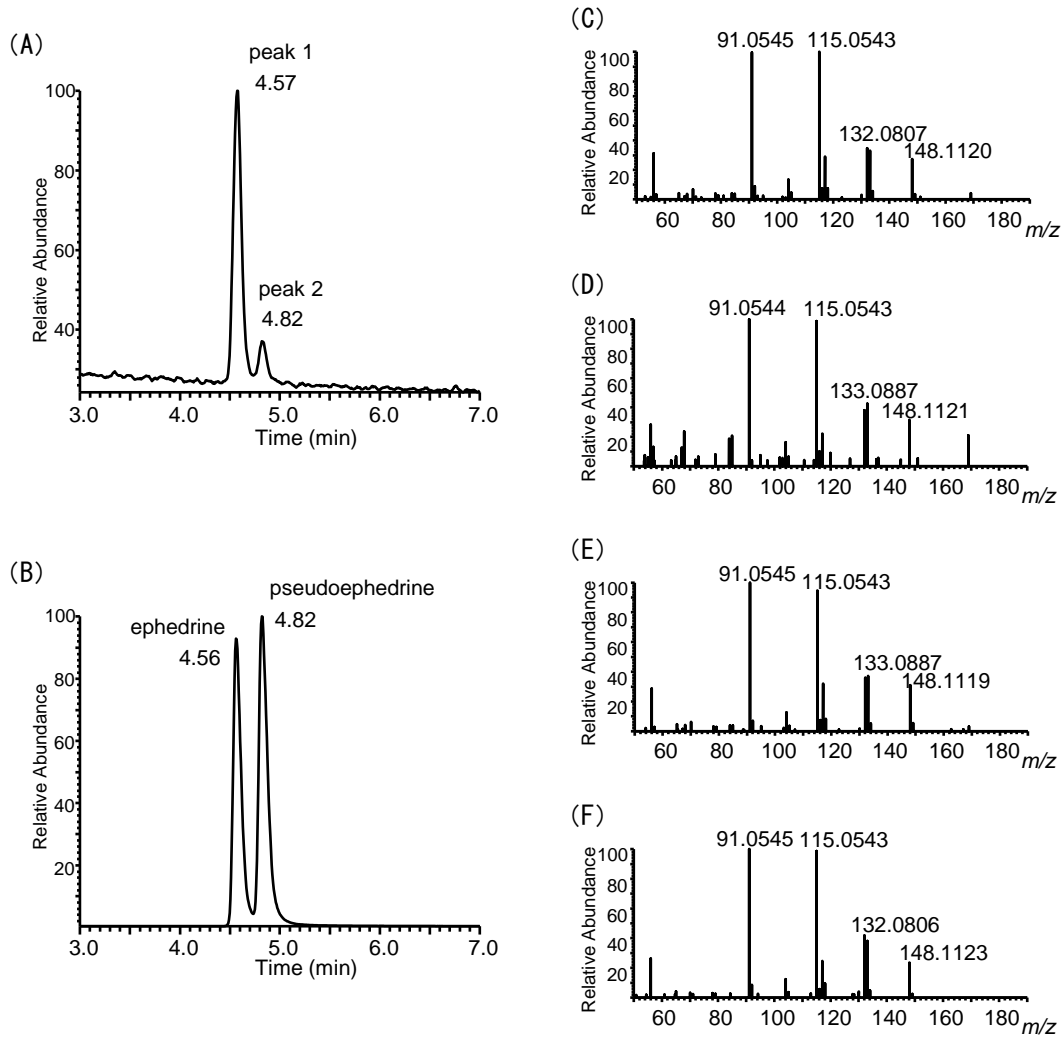


図3  $m/z$  166.1224のマスククロマトグラム及びプロダクトイオンスペクトル

マスククロマトグラム (A) 試料溶液 No. 1、(B) エフェドリン・プソイドエフェドリン混合標準溶液、  
 プロダクトイオンスペクトル (C) peak 1、(D) peak 2、(E) エフェドリン、(F) プソイドエフェドリン

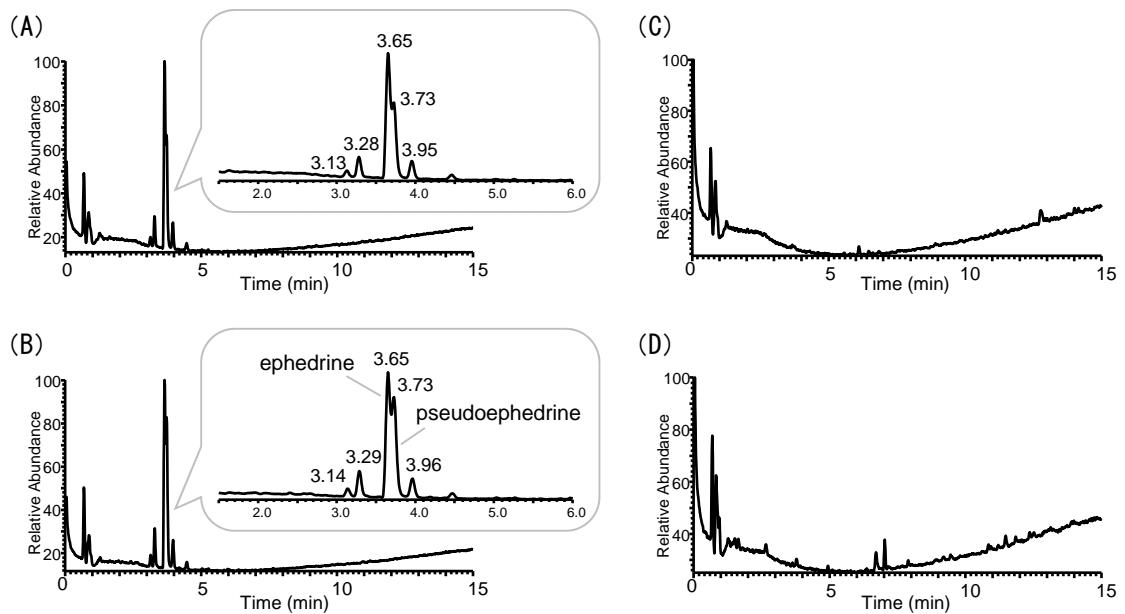


図4 試料(S)、(L)、マオウ及びハッカ抽出液のトータルイオンクロマトグラム

(A) 試料溶液 No. 1(S)、(B) マオウ(1)、(C) 試料溶液 No. 1(L)、(D) ハッカ(1)

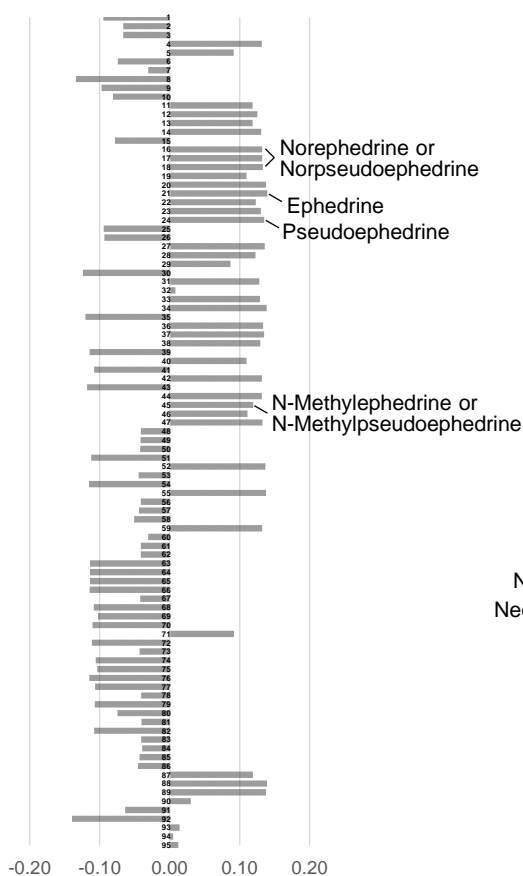
類のピークを保持時間順にリストにし、各溶液でのピーク面積を変数として、Rによる主成分分析を行った。その結果、第1主成分の寄与率は48.5%、第2主成分の寄与率は30.4%であった。第2主成分までの累積寄与率が78.9%となることから、この2つの成分でデータ全体の約8割を説明できることになる。また、各ピークの因子負荷量から、第1主成分はエフェドリン類、第2主成分はフラボノイド類が主成分に寄与していると考えられた(図5)。各溶液の第1主成分及び第2主成分の主成分得点をプロットすると(図6)、試料溶液 No. 1(S)及び No. 2(S)とマオウ(1)、(2)抽出液は近接しており、類似性が認められた。一方、試料溶液 No. 1(L)及び No. 2(L)は互いに類似と考えられたが、ハッカ(1)、(2)抽出液とは近接しておらず、ハッカとの類似性は認められなかった。

以上のことから、乾燥植物片 No. 1 及び No. 2 は、構成植物が類似しており、マオウが含まれる可能性が高いと考えられた。また、GC-MSによりメントール等の精油成分が検出されたが、LC-MS/MS のデータを用いた主成分分析の結果、製品にハッカは含まれないと考えられ、精油成分はハッカ油など液体として製品に加えられた可能性が示唆された。本報で用いた主成分分析は、その植物に含まれる複数の特徴的な成分を縮約して比較できる手法であり、形態学的な識別結果と組み合わせることにより、植物の推定に有用であると考えられた。

### まとめ

指定薬物等の含有が疑われる製品を検査した結果、乾燥植物片2製品から、医薬品成分のエフェドリン及びプソイドエフェドリンを同定した。また、メントール、

(A) 第1主成分



(B) 第2主成分

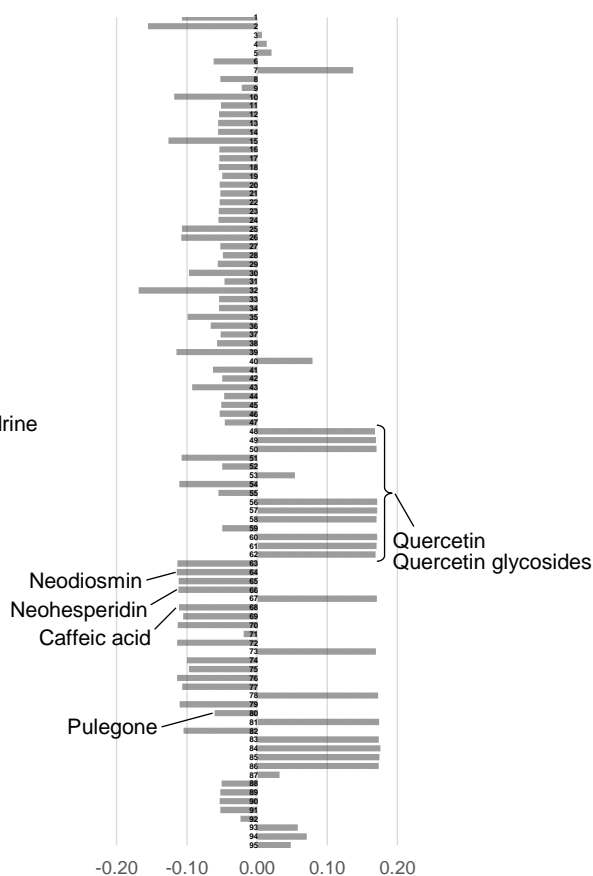


図5 各ピークにおける (A) 第1主成分及び (B) 第2主成分の因子負荷量

メントン及び酢酸メンチル等、ハッカの精油成分を検出した。さらに、試料内容物の形態学的な特徴から試料を分割して調製した試料溶液と、マオウ及びハッカ抽出液のLC-MS/MS測定データから、構成植物の推定を試みた。その結果、2製品の構成植物は類似しており、製品にハッカは含まれておらず、マオウは含まれると推定された。

検出されたエフェドリン及び含有が疑われたマオウは、どちらも医薬品成分であり、使用により予期せぬ健康被害が生じる可能性がある。今後も科学的根拠に基づく検査を実施するとともに、健康被害防止のため、指定薬物等の検査を継続していく必要がある。

## 文 献

- 1) 鈴木 勉：危険ドラッグの乱用と規制．日本薬理学雑誌 150:124-128, 2017.
- 2) 花尻（木倉）瑠理：危険ドラッグの法規制と流通実態の変化．日本薬理学雑誌 150:129-134, 2017.
- 3) 厚生労働省：薬物乱用防止に関する情報（2021年12月17日現在）；[http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/iyakuhin/yakubutu\\_ranyou/index.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iyakuhin/yakubutu_ranyou/index.html)
- 4) 棚橋高志，安藤麗香，大野春香，猪飼誉友，皆川洋子：愛知県における危険ドラッグ製品の分析調査．愛知県衛生研究所報 66:34-42, 2016.

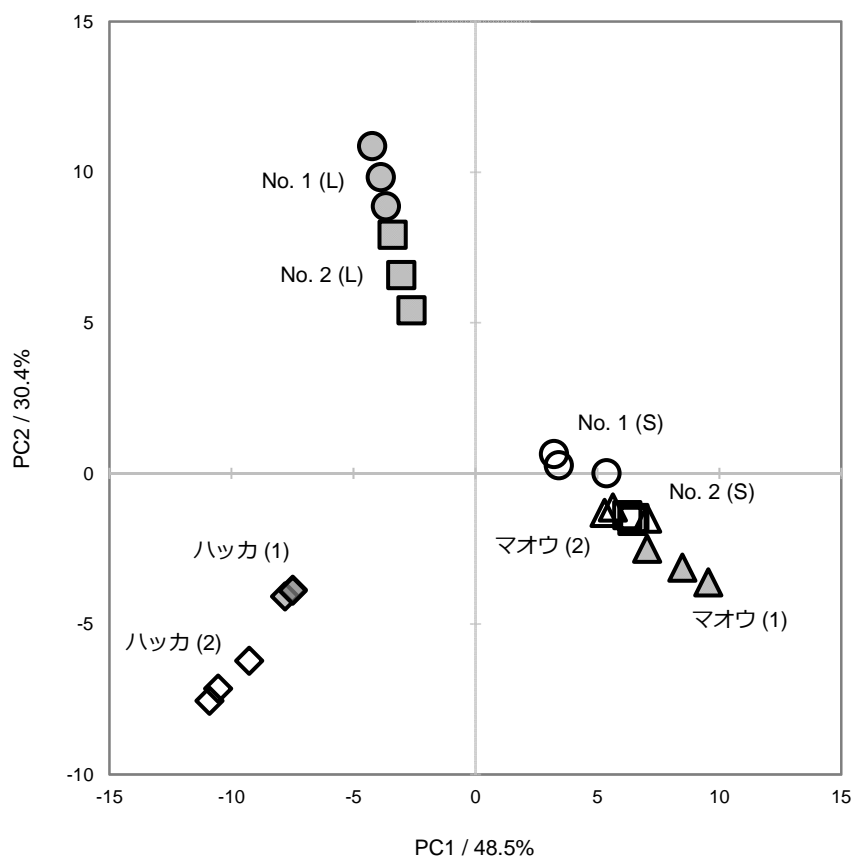


図6 主成分得点のプロット

# Detection of ephedrine in dried plant products and estimation of constituent plants

Koji Tomita, Yasuko Hattori, Shunya Kobayashi, Hisato Mori, Eiji Ueno,  
Takashi Tanahashi

In order to prevent health hazards caused by drug abuse, we analyzed products suspected of containing designated drugs that were purchased from the internet site. As a result, ephedrine and pseudoephedrine, which are pharmaceutical ingredients, were identified in two dried plant products. In addition, essential oil components of Mentha Herb such as menthol, menthone and menthyl acetate were detected. In order to confirm the consist of Ephedra Herb and Mentha Herb in the products, we attempted to estimate the constituent plants. LC-MS/MS was used to measure the extracts of Ephedra Herb and Mentha Herb, as well as the extracts from which the samples were divided based on morphological characteristics, and conducted a principal component analysis using peak area as a variable. As a result, the contribution of the first principal component was 48.5%, and that of the second principal component was 30.4%. Plotting the first and second principal component scores of each sample, the two dried plant products consisted of similar plant constituents. In addition, it was conceivable that these products contained Ephedra Herb but not Mentha Herb.

Key words : Dried plant products, Ephedrine, LC-MS/MS, Principal component analysis

---

## 調 査 研 究

---

# 夏季における羽布ダムの生物相の実態調査

尾内彩乃、長谷川真照、山本優子、青木梨絵、原田知美、堀田沙希、續木洋一、棚橋高志

### 要 旨

当研究室では、愛知県の水道水等水質調査実施計画の1つとして、水道水源に影響を及ぼすおそれのある羽布ダムにおける水質調査を6月から8月にかけて行っている。

本研究では、羽布ダムの水質調査の中でも生物障害を引き起こす植物プランクトン（藻類）の生物相に着目した。生物障害の原因となる藻類の増殖と水質環境要因の関連性を明らかにすることは、羽布ダムの水質管理に重要であると考え、2010年から2021年までに得られた生物相及び理化学調査等の水質調査結果について解析を行った。その結果、6月から8月にかけて、優占藻類の遷移が確認された。また、水質調査結果について多変量解析を行ったところ、藍藻と珪藻の増殖には負の相関関係が認められ、増殖条件に水温、有機態窒素、アンモニア態窒素が関与していることが示唆された。今後、調査期間を夏季以外の季節へ拡大することで、より詳細な藻類の増殖傾向及び、それに関わる水質環境要因の傾向を把握できると考えられる。

キーワード：藻類、ダム湖、水質調査、多変量解析

### 序 文

羽布ダムは、愛知県西三河地方を流れる矢作川の支流巴川の上流に位置し、農業用ダムとして昭和38年に建設された。愛知県では、昭和54年の夏に羽布ダムの下流域の水道水でかび臭が発生したことから、水道水等水質調査の1つとして、毎年水道水源に影響を及ぼすおそれのある羽布ダムを対象とした水道原水水質調査を行っている<sup>1)</sup>。

羽布ダム等のダム湖では、植物プランクトン（藻類）の大量発生によるかび臭等の生物障害が問題となっている<sup>2)</sup>。藍藻はかび臭などの異臭味障害等の原因となり、珪藻はろ過障害等の原因となることが明らかとなっている<sup>3)</sup>。特にかび臭は、発生が確認され次第、浄水場において分解・除去する必要があるため、水道水源におけるかび臭発生 of 早期確認及び予防が大切である。また、水道水に影響を及ぼす程度ではない

が、羽布ダムにおいてもかび臭の発生及び原因となる藻類の増殖が確認された年がある<sup>4)</sup>。

そのため、生物障害の原因となる藍藻や珪藻の増殖と水質環境要因の関連性を確認するとともに、藻類間の関係性を見ることは、羽布ダムの水質管理を行う上で重要であると考えられる。

本研究では、2010年から2021年までの羽布ダムの水質調査結果から、生物相の中でも生物障害の原因になりやすい藻類の計測結果について解析を行った。また、藻類の増殖と水質環境要因の関連性を明らかにすることを目的に、水質調査結果に対して解析を試みた。

### 方 法

2010年から2021年まで、6,7,8月に羽布ダムで採水し、生物相及び理化学調査項目

(表 1)について水質調査を行った。理化学調査項目については、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(告示法)又は上水試験法(公益社団法人日本水道協会編)に従って測定した<sup>3)5)</sup>。生物相の調査は、上水試験法に従い、採水した検水 1 mL 中の植物及び動物プランクトンの細胞数及び群体数(以下、細胞数)について顕微鏡を用いて計測し、さらに種の同定を行った<sup>3)</sup>。

表 1 理化学調査項目

	項目名	試験方法の規格
検査項目	気温	上水試験法
	水温	上水試験法
	外観	-
	臭気	上水試験法
	pH値	上水試験法
	電気伝導度	上水試験法
	アンモニア態窒素	上水試験法
	亜硝酸態窒素	告示法
	硝酸態窒素	告示法
	全窒素	上水試験法
	全リン	上水試験法
	有機物等(過マンガン酸消費量)	上水試験法
	全有機炭素(TOC)	告示法
	クロロフィル a	上水試験法
	ジェオスミン	告示法
	2-メチルイソボルネオール	告示法
	マイクロキスティン-LR	上水試験法
その他	水位	-
	流入量	-
	流出量	-
	湖色	-

## 1. 藻類の増殖傾向

羽布ダムで観察される生物相のうち、藻類を藍藻・珪藻・緑藻・その他の藻類の4グループに分け、解析を行った、これら4グループの細胞数の総数及び、グループ毎の細胞数を集計し、細胞数の総数に対するグループ毎の細胞数の割合を算出することで解析した。

## 2. 生物相と理化学調査項目との関連性

上記4グループの細胞数、表1で示した理化学調査項目及び有機態窒素(Org-N)に対して、Sartorius Stedim Biotech(Germany)の多変量解析ソフト SIMCA を用い多変量解析を行った。解析手法は、直交部分最小二乗法(orthogonal partial least squares, OPLS)

を使用し、藻類の増殖傾向と水質環境要因との関連性を調査した。

多変量解析によって藻類の増殖と相関の見られた項目について、発生した細胞数との関係を藻類別にプロットし、各項目と藻類との関連性を確認した。

なお、有機物等(過マンガン酸消費量)及び全有機炭素(TOC)については、どちらも有機物に関する指標であることから、精度・感度が高く実質的な全有機炭素を計測できる TOC を解析対象として採用した。また、理化学調査項目には設定されていないが、栄養塩類との相関を確認するために全窒素の数値から無機態窒素(亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、アンモニア態窒素)の数値を引いたものを Org-N として解析対象に追加した。ダムの水位に関しては、増減を明確にするために、12年分の平均値(464 m)を引いた増減値を用いることとした。また、理化学調査項目のうち、数値で表すことのできない項目は解析対象から除外した。

## 結果と考察

### 1. 藻類の増殖傾向

羽布ダムで観察される藍藻・珪藻・緑藻・その他の藻類の細胞数について、それぞれの合計数と藻類全体の総数を集計し、総数に対する各藻類の細胞数割合を算出した。その結果を図1と表2に示し、主に観察された藍藻及び珪藻の優占種を図2に示した。

① 6月は藻類の総数が3か月の中で最も多く観察され、総数の平均は2679 cells/mLであった。藻類の中では、珪藻の優占率が高く90%を超える年も多く認められており、*Asterionella formosa*が最も多かった。

② 7月は藻類の総数が6月に比べて減少しており、総数の平均は932 cells/mLであった。藻類の中では珪藻が優位を占めるものの、その割合は6月に比べると低くなっていた。珪藻の優占種は *Asterionella formosa* であった。一方で、藍藻、緑藻及びその他の藻類の割合は増加傾向にあり、藍藻及びその他の藻類が優位となる年も確認され、特に2017年に増殖した藍藻の優占種は *Aphanizomenon* sp. であった。

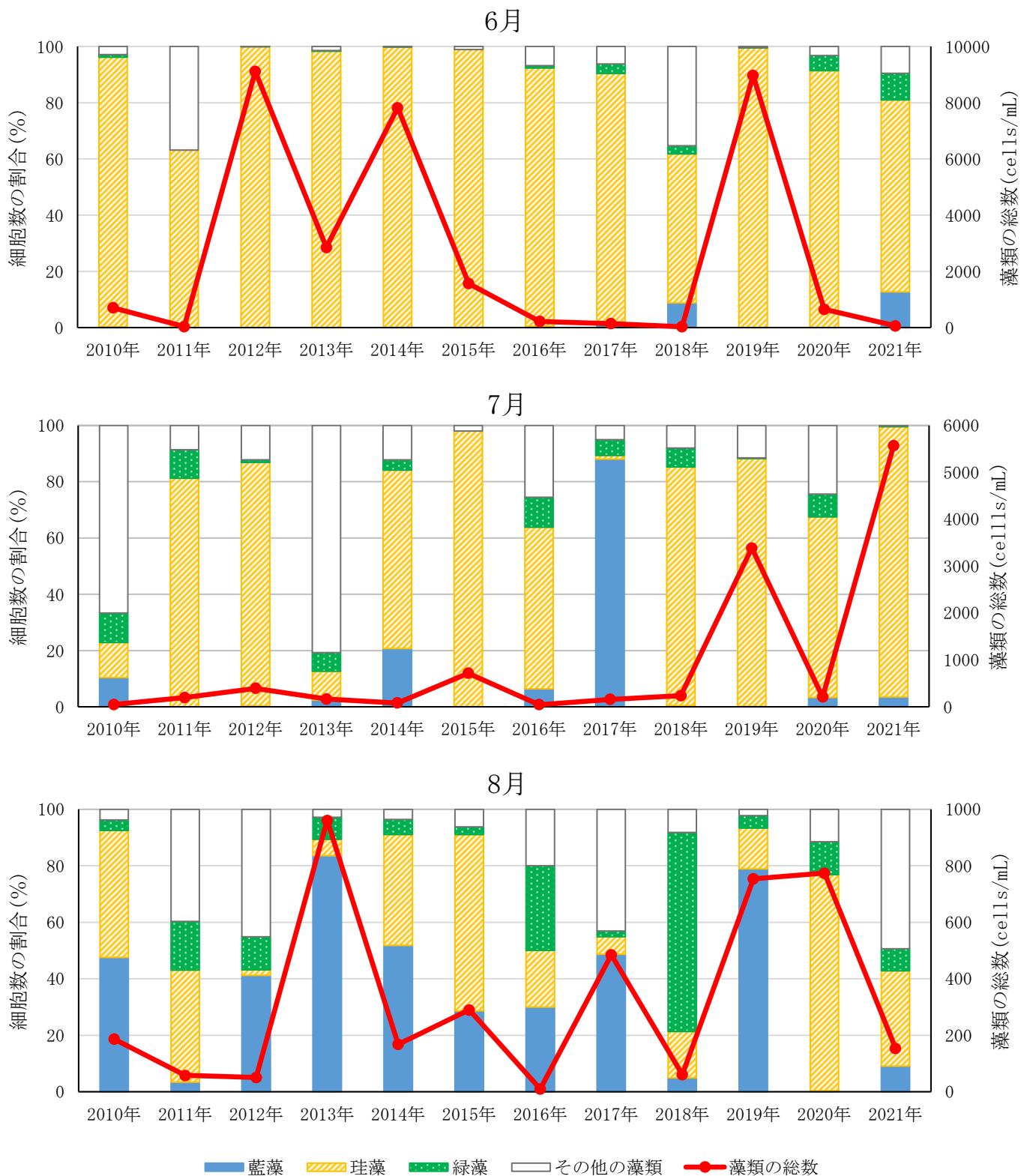


図1 藻類の総数及び、それに対する各藻類の割合

表2 各月の藻類の総数

	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	2017年	2018年	2019年	2020年	2021年	平均値
6月	703	38	9113	2855	7821	1567	221	145	34	8932	652	62	2679
7月	48	197	391	164	82	715	47	157	236	3376	207	5567	932
8月	186	57	51	961	168	288	10	483	59	753	770	151	328

(cells/mL)

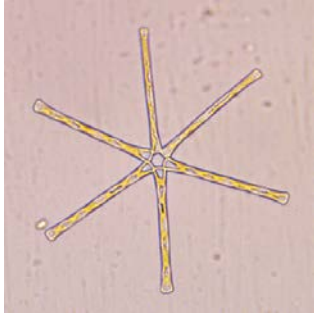



珪藻	藍藻
種名： <i>Asterionella formosa</i> 優占種となった月： 6, 7, 8月 	種名： <i>Aphanizomenon</i> sp. 優占種となった月： 7, 8月 
種名： <i>Aulacoseira</i> sp. 優占種となった月： 8月 	種名： <i>Anabaena</i> sp. 優占種となった月： 8月 

図 2 藍藻及び珪藻の優占種

③ 8月は6, 7月に比べて藻類の総数は大きく減少しており、総数の平均は328 cells/mLであった。また、6, 7月よりも藍藻の割合が多くなり、2013年、2017年に高い割合を示した。藍藻の種類としては、2013年に *Aphanizomenon* sp.、2019年に *Anabaena* sp. が優占種となっていた。一方で、2015年及び2020年は珪藻の優占率が高くなっており、2015年は *Asterionella formosa*、2020年は *Asterionella formosa* 及び *Aulacoseira* sp. が優占種となっていた。

これらの結果から、6月から8月にかけて藻類の総数は減少していく傾向が確認され、これは珪藻の発生が徐々に減少していくためであると考えられた。また、6月から8月にかけて珪藻から藍藻へと徐々に優占藻類が遷移することが確認され、何らかの水質環境要因の関与が考えられた。さらに、藻類の中でも優占種となる種類は数種類であり、優占藻類以外の藻類は増殖しにくいことが示唆された。今回の調査では藻類を4つのグループに分けて解析したが、藻類の増殖を明らかにするためには、今後は優占種となりうる種類に焦点を絞り、継続的な調査を行っていくことも必要であると考えられた。

## 2. 生物相と理化学調査項目との関連性

上記の結果より、6月から8月の間で優占藻類が遷移することが示唆された。そこで、優占藻類の増殖と水質環境要因との関連を明らかにするために、4グループに分けた各藻類の細胞数と表1で示した理化学調査項目等に対して多変量解析を行った。

各藻類の細胞数を第1軸となるように、各藻類の細胞数と理化学調査項目等に対してOPLSを行ったところ(図3)、珪藻と藍藻・緑藻・その他の藻類の細胞数の間には負の相関関係が認められた。さらに、藍藻は水温、ジェオスミン、気温、Org-N及びpH値に、珪藻はアンモニア態窒素(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)及び硝酸態窒素(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)に対して正の相関が認められ、これらの項目と藻類の増殖が関連している可能性が示唆された。なお、かび臭の1つである2-メチルイソボルネオールに関しては今回の解析においては藻類との相関が認められなかった。

上記の結果を基に、藍藻及び珪藻と相関の認められた項目について、発生した細胞数との関係を藻類別にプロットし、各項目と藍藻及び珪藻との関連性を確認した。その結果、藍藻と珪藻の細胞数が水温24℃付近を境目に変動しており、24℃以上では藍



藻が、24℃以下では珪藻が増殖しやすい傾向が示唆された(図 4a)。Org-Nにおいては、0.5 mg/L付近で同様の変動がみられ、0.5 mg/L以上で藍藻が、0.5 mg/L以下で珪藻が増殖しやすい傾向が示唆された(図 4b)。また、藍藻のみ、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が 0.02 mg/L以下で増殖しやすく(図 4c)、藍藻の増殖と共にジェオスミンが増加しやすい傾向が確認された(図 4d)。なお、今回の解析では pH 値、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>及び気温に対して明確な関連性を認めることはできなかった。

これらの結果から、藍藻と珪藻の増殖は負の相関関係にあり、増殖の要因として NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、水温、Org-N の関与が示唆された。ジェオスミンの増加については、ジェオスミンを産生する藍藻の種類が増加したことが原因であると示唆された。しかし、図 4 の結果から藍藻と珪藻の増殖に影響すると考えられる環境において、藍藻と珪藻の増殖がみられない年も確認された。これらについては、別の水質環境要因の関連性について、引き続き調査を進める必要がある。

### まとめ

羽布ダムで観察される藍藻・珪藻・緑藻・その他の藻類の細胞数について解析した

ところ、増殖しやすい藻類の種類が 6 月では珪藻、8 月では藍藻と遷移していることが明らかとなった。特に、優占種となる藻類が生物障害の原因となる藍藻(主に *Aphanizomenon* sp.、*Anabaena* sp.)及び、珪藻(主に *Asterionella formosa*)であった。また、各藻類の細胞数及び、理化学調査項目等の調査結果に対して多変量解析を行ったところ、藻類の増殖に水温、Org-N、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の関与が示唆された。さらに、藍藻増殖時はジェオスミンが増加する傾向が確認された。今後、優占種となる藻類の増殖傾向の詳細な調査と発生する藍藻の中でジェオスミンを産生する種類の特定が必要であると考えられる。

本研究では、羽布ダムにおける夏季の藻類の増殖傾向及び、それに関わる水質環境要因の解析を行った。これら藻類の増殖傾向及び、それに関わる水質環境要因を把握することは、生物障害の原因となる藻類の増殖の予測や、生物障害が起こった際の対処など、羽布ダムの水質管理を行う上で重要である。今後、調査期間を夏季以外の季節へ拡大することで、より詳細な藻類の増殖傾向及び、それに関わる水質環境要因の傾向を見ることができると考えられる。

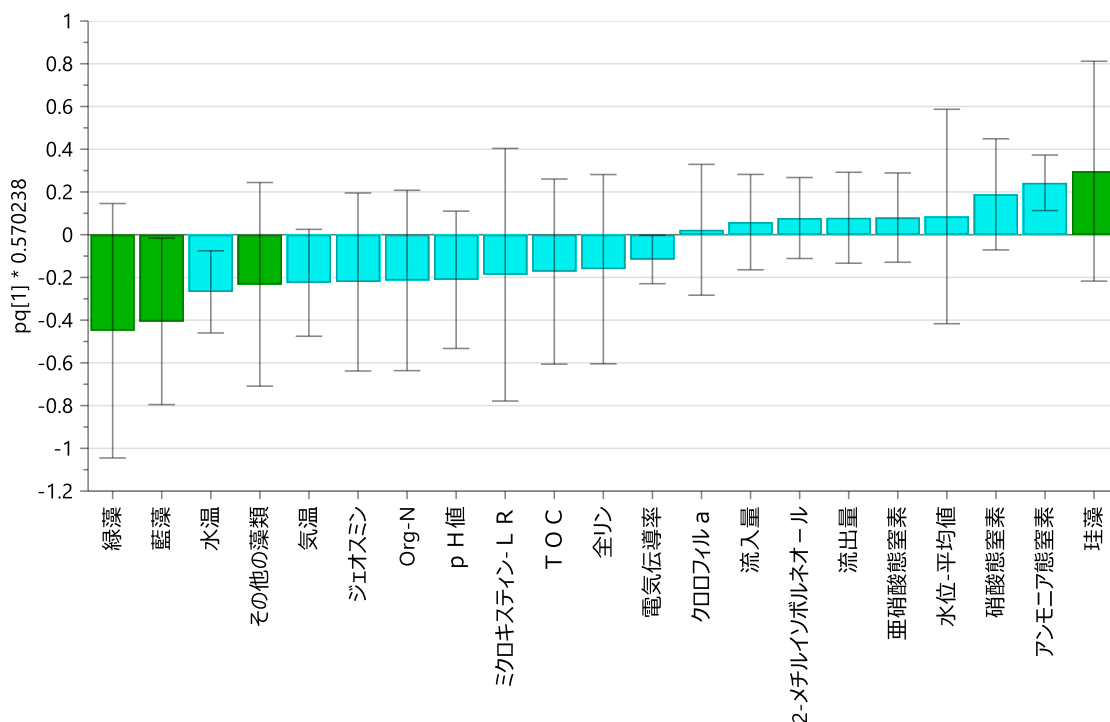


図 3 藻類と理化学調査項目の関連性

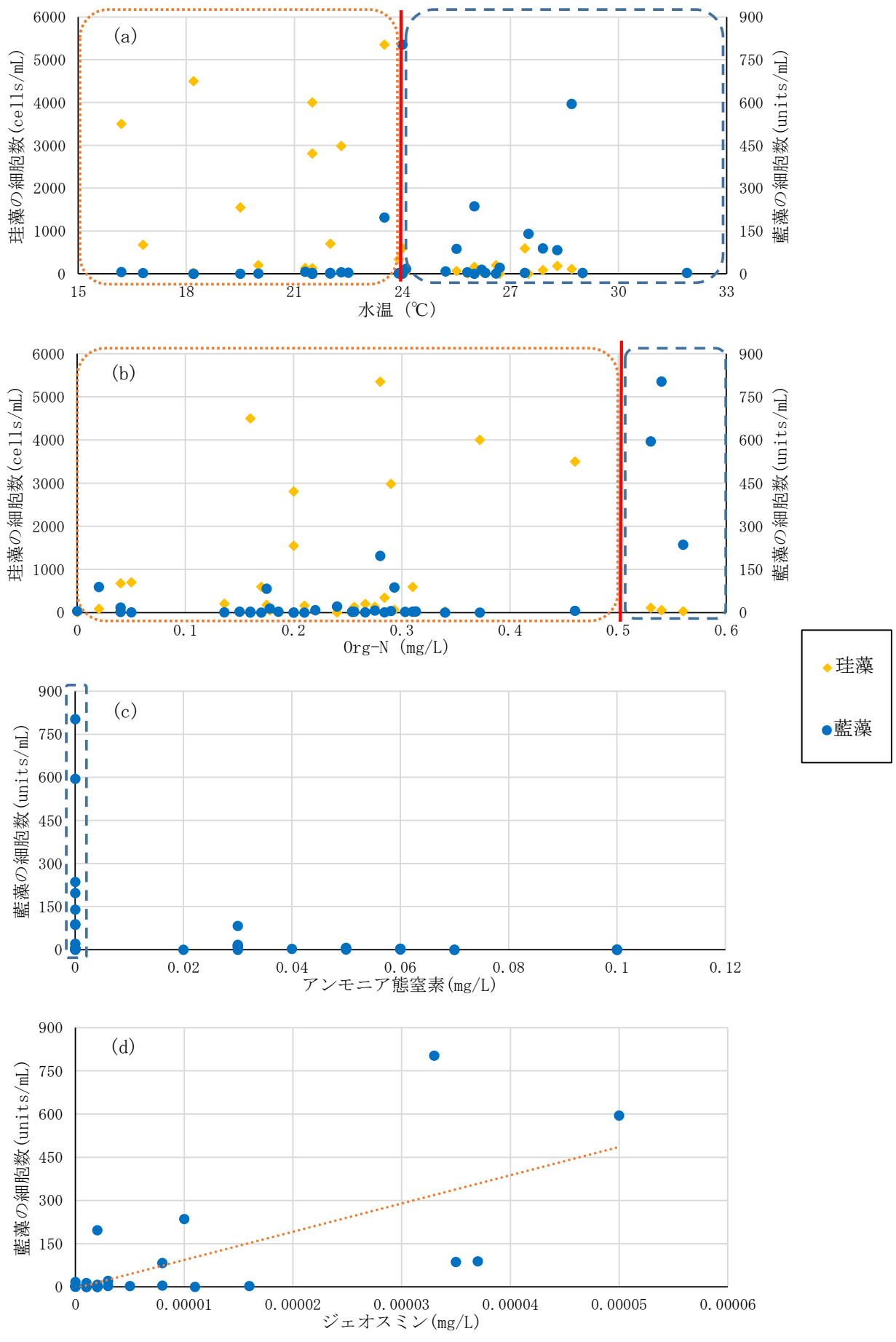


図4 藍藻及び珪藻と理化学調査項目の関係性  
 (a. 水温と藻類、b. 有機態窒素と藻類、c. アンモニア態窒素と藍藻、d. ジェオスミンと藍藻)

## 文 献

- 1) 愛知県水道水質検査等実施要領
- 2) 北村壽朗：相模川水系における異臭味障害．におい・かおり環境学会誌 49(1)：21-28, 2018.
- 3) 上水試験方法：日本水道協会，2010.
- 4) 愛知県衛生研究所年報 46:78-79, 2018.
- 5) 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 年厚生労働省告示第 261 号

# Survey on the biota of Habu Dam in summer

Ayano Onouchi, Masateru Hasegawa, Yuko Yamamoto, Rie Aoki, Tomomi Harada,  
Saki Hotta, Hirokazu Tsuzuki, Takashi Tanahashi

As part of the Aichi Prefecture's water quality survey plan, our laboratory is conducting a water quality survey from June to August at the Habu Dam, which may affect the water supply source. In this study, we focused on the phytoplankton (algae) biota causing biological disturbance among the water quality survey of Habu Dam. It is important for the water quality management of Habu Dam to clarify the relationship between algal growth, which causes biological disturbance, and water quality environmental factors.

For this reason, we analyzed the results of water quality surveys, including biota and physical and chemical surveys, obtained from 2010 to 2021. The results showed that the dominant algae changed from June to August. Multivariate analysis of the water quality survey results suggested that there was a negative correlation between cyanobacteria and diatom growth. And, it suggested that water temperature, organic nitrogen, and ammonia nitrogen were related to those growth conditions. By expanding the survey period to seasons other than summer in the future, it will be possible to understand the trends of algae growth and related environmental factors in water quality in more detail.

Key words : algae, dam, water quality survey, multivariate analysis

---

 他誌掲載論文抄録
 

---

## A rapid screening assay for L452R and T478K spike mutations in SARS-CoV-2 Delta variant using high-resolution melting analysis

 Akira Aoki<sup>1</sup>, Hirokazu Adachi, Yoko Mori<sup>1</sup>, Miyabi Ito, Katsuhiko Sato, Kenji Okuda, Toru Sakakibara, Yoshinori Okamoto<sup>1</sup>, Hideto Jinno<sup>1</sup>
<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Meijo University

The journal of toxicological sciences 46(10):471-476, 2021

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) transmission has been reported worldwide and novel SARS-CoV-2 variants continue to emerge. A novel SARS-CoV-2 strain, the Delta variant (B.1.617.2), is spreading worldwide. The Delta variant has reportedly high infectivity and immune evasion potency. In June 2021, the World Health Organization categorized it as a variant of concern (VOC). Therefore, it is vital to develop tests that can exclusively identify the Delta variant. Here, we developed a rapid screening assay to detect characteristic mutations observed in the Delta variant using high-resolution melting (HRM) analysis. In this assay, we determined L452R and T478K, among which T478K is an identifier of the Delta variant

since L452R is seen in other strains (Kappa and Epsilon variants). Additionally, nested PCR-based HRM analysis, which involved RT-PCR (1st PCR) and HRM analysis (2nd PCR), was developed to improve the specificity and sensitivity. Our method discriminated between the L452R mutant and wild-type L452. In addition, HRM analysis distinguished the T478K mutant from the wild-type T478. Seven clinical samples containing the Delta variant were successfully identified as L452R/T478K mutants. These results indicate that this HRM-based genotyping method can identify the Delta variant. This simple method should contribute to rapid identification of the Delta variant and the prevention of infection spread.

## ヒトアデノウイルス 89 型と 5 型の新規組換え型株の検出-愛知県

 廣瀬絵美、中村範子、皆川洋子、安達啓一、安井善宏、伊藤 雅、佐藤克彦  
 病原微生物検出情報 42(4):78-79, 2021

近年、国内外から組換え型アデノウイルス (Ad) の検出が報告されている。2014~2019 年に当所で分離され、中和試験により C 種 (Ad1, 2, 5, 6) に型別された 65 株を材料とし、構造蛋白質 3 領域 (penton base:P, hexon:H, fiber:F) の遺伝子解析により組換え型 Ad を探索した。その結果、3 領域すべてを解析できた株は 65 株中 62 株であり、各領域について系統解析を実施した。hexon 及び fiber 領域では、血清型別と同じ Ad5 に分類され、一

方で、penton base 領域では、Ad89 [P89/H2/F2] と高い相同性のみられた 6 株に着目した。Ad89 は C 種に属し、penton base 領域に独自の配列を有する Ad2 との組換え型 Ad である。この 6 株は penton base の RGD loop 領域のアミノ酸配列に、Ad89 に特徴的な A363E 及び P364del がみられ、RGD loop 領域のアミノ酸配列は Ad89 と 100% 一致した。このことから、これら 6 株は Ad89 と Ad5 の新規組換え型 Ad [P89/H5/F5] である可能性が示唆された。

## 愛知県内で初めて検出された重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) 感染症の 1 例

伊藤 雅、安達啓一、廣瀬絵美、宮本真由歌、中村武靖、齋藤典子、佐藤克彦、増山勝俊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>知多厚生病院

病原微生物検出情報 42(10):232-233, 2021

重症熱性血小板減少症候群は、ダニ媒介感染症で、感染症法に基づく 4 類感染症である。今回、愛知県で初めて SFTSV 感染事例が確認されたので報告する。

患者概要：70 歳代男性、県内在住で職業は農業。基礎疾患なし。発症に先立って県外への旅行歴なし。刺し口あり。発熱、発疹、血小板減少、腎肝機能障害等の症状より SFTS 疑い症例として入院治療となり、検査依頼があった。

PCR 検査：血清及び皮膚病巣から核酸を抽出し、One-Step RT-PCR 法で SFTSV NP 遺伝子の検出を行った。血清検体から増幅産物が

得られ塩基配列を決定し BLAST 検索したところ、SPL010A (Nagasaki 2005) 株の配列に最も類似性が高く、SFTSV 由来の塩基配列であることを確認した。分子系統解析では国内で最も多く確認されている genotype J1 に分類された。これにより本症例は SFTS と病原診断された。

SFTS は急激に重症化し極めて致死率の高い疾患であり、患者から医療従事者への二次感染も起こり得るため、早期診断は重要である。県外への旅行歴はなく、動物飼育接触の歴もないことから、県内におけるダニ咬傷による SFTSV 感染が強く疑われる。

## 2020/21 シーズンのインフルエンザ分離株の解析

岸田典子<sup>1</sup>、中村一哉<sup>1</sup>、藤崎誠一郎<sup>1</sup>、高下恵美<sup>1</sup>、佐藤 彩<sup>1</sup>、秋元未来<sup>1</sup>、三浦秀佳<sup>1</sup>、森田博子<sup>1</sup>、永田志保<sup>1</sup>、桑原朋子<sup>1</sup>、白倉雅之<sup>1</sup>、菅原裕美<sup>1</sup>、渡邊真治<sup>1</sup>、長谷川秀樹<sup>1</sup>、**地方衛生研究所インフルエンザウイルス株サーベイランスグループ（齋藤典子他）**

<sup>1</sup>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 42(11):247-252, 2021

2020/21 インフルエンザシーズンは、新型コロナウイルスの流行への対策の影響と思われるが、日本を含め多くの国でインフルエンザの流行は大変小さいものであった。その少ない中ではあったが A 型・B 型ウイルスともに検出され、B 型ウイルスの検出数の方が A 型ウイルスの検出数よりも多かった。B 型ウイルスは、ほぼ Victoria 系統であり、山形系統はほとんど検出されなかった。A 型

ウイルスは、A (H3N2) の流行が A (H1N1) pdm09 より大きかった。国立感染症研究所では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株総数の約 10% について分与を受け、ヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) 遺伝子系統樹解析および抗原性解析を行い、個々の成績は毎週地衛研に還元されている。

## 国内の *Campylobacter jejuni* 血清型別に対応した改良 Penner PCR 型別法

今野貴之<sup>1</sup>、山田和弘、赤瀬悟<sup>2</sup>、坂田淳子<sup>3</sup>、尾羽根紀子<sup>4</sup>、森美聡<sup>5</sup>、横山敬子<sup>2</sup>、山本章治<sup>6</sup>、朝倉宏<sup>7</sup>

<sup>1</sup>秋田県健康環境センター、<sup>2</sup>東京都健康安全研究センター、<sup>3</sup>大阪健康安全基盤研究所、<sup>4</sup>山口県環境保健センター、<sup>5</sup>熊本県保健環境科学研究所、<sup>6</sup>国立感染症研究所、<sup>7</sup>国立医薬品食品衛生研究所

日本食品微生物学会雑誌 38(3):123-128, 2021

*Campylobacter jejuni* は食中毒の原因菌として特に重要な菌種である。近年、Polyらによって Penner PCR 型別法が開発された。Penner PCR 型別法は、従来の血清型別法に比べて型別率の向上が期待できるが、PCR 増幅断片の判定が難しい等の課題も見受けられた。そこで、簡易で国内の *C. jejuni* の疫学解析に適した改良 Penner PCR 型別法を再編し、検討した。

血清型別法で型別された 228 株のうち、220 株 (96.5%) が改良 Penner PCR 型別法で血清型別法と同様の血清群の Penner 遺伝子型に分類できた。また、血清型が型別不能で

あった 178 株のうち、166 株 (93.3%) はいずれかの Penner 遺伝子型に型別できた。改良 Penner PCR 型別法と血清型別法との型別結果の比較では、一致率は全体で 95% を超え、高い相関を示した。

本研究で検討した改良 Penner PCR 型別法は、国内で疫学解析に利用されてきた主要な血清型を網羅しており、効率的に型別することが可能である。今後、本法を用いて *C. jejuni* の Penner 遺伝子型を把握することによって、*C. jejuni* の疫学解析や食中毒調査における感染源および感染経路の究明に役立つことが期待される。





愛知県衛生研究所報

第 72 号

令和 4(2022)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

電話：052-910-5618（代表）

FAX：052-913-3641

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

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

電話（ダイヤルイン）

総務課	052-910-5618
企画情報部	
健康科学情報室	052-910-5619
生物学部	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	052-910-5638
医薬食品研究室	052-910-5639
生活科学研究室	052-910-5643

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)