

愛知県衛生研究所報

第 59 号 平成 21 年 3 月

目 次

調査研究

麻しん患者における麻しんの予防接種歴と症状との関係
—愛知県感染症対策協議会事業「麻しんに関するアンケート調査」から— ……1

山口通代 広瀬かおる 續木雅子 櫻井博貴 竹内一仁
木村 隆 増井恒夫 皆川洋子

愛知県におけるヒトメタニューモウイルス感染の状況 ……11

秦 眞美 田中正大 伊藤 雅 山下照夫 皆川洋子

抗梅毒トレポネーマ *Treponema pallidum* -IgM 抗体陽性血清にみられた
STS 法不一致例について ……19

山崎 貢 青木日出美 松本昌門 平松礼司 遠山明人 皆川洋子

In vitro enzymatic transformation of paralytic shellfish poisoning toxins
in the digestive process, with an emphasis on C1 and C2 as *N*-sulfocarbamoyl toxins ……25

Masanao Okumura, Akiko Hasegawa, Hideaki Tsuzuki, Akito Tohyama

ICP-MS による農産物中微量元素の一斉分析法の検討 ……35

大島晴美 椛島由佳 棚橋高志 上野英二 大野 勉

他誌掲載論文抄録 ……43

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

Volume 59, March 2009

Contents

Original Papers

Measles patients' symptoms in relation to vaccination history -Results from measles questionnaire surveillance conducted by Aichi Prefectural Infectious Disease Control Council-	1
Michiyo Yamaguchi, Kaoru Hirose, Masako Tsuzuki, Hiroki Sakurai, Kazuhito Takeuchi, Takashi Kimura, Tsuneo Masui, Hiroko Minagawa	
Characterization of Human Metapneumovirus Infection in Aichi Prefecture	11
Mami Hata, Seidai Tanaka, Miyabi Ito, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa	
Disagreement of the results between VDRL and RPR tests in sera containing anti- <i>Treponema pallidum</i> (Tp)-IgM antibodies	19
Mitsugu Yamazaki, Hidemi Aoki, Masakado Matsumoto, Reiji Hiramatsu, Akito Tohyama, Hiroko Minagawa	
<i>In vitro</i> enzymatic transformation of paralytic shellfish poisoning toxins in the digestive process, with an emphasis on C1 and C2 as <i>N</i> -sulfocarbamoyl toxins	25
Masanao Okumura, Akiko Hasegawa, Hideaki Tsuzuki, Akito Tohyama	
Application of Simultaneous Analysis by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) to Trace Elements in Agricultural Products	35
Harumi Oshima, Yuka Kabashima, Takashi Tanahashi, Eiji Ueno, Tsutomu Ohno	
Summaries of papers accepted to other journals	43

調 査 研 究

麻しん患者における麻しんの予防接種歴と症状との関係

— 愛知県感染症対策協議会事業

「麻しんに関するアンケート調査」から—

山口 通代¹ 広瀬 かおる 續木 雅子 櫻井 博貴
竹内 一仁 木村 隆² 増井 恒夫³ 皆川 洋子

¹ 現 健康福祉部健康担当局健康対策課 ² 現 江南保健所

³ 現 精神保健福祉センター

要 旨

2001年及び02年に、愛知県感染症発生動向調査の患者情報定点（計191）を対象に実施された「麻しんに関するアンケート調査」の資料を用い、麻しんの予防接種歴の有無と症状等との関係について比較検討した。対象定点のうち132施設（69.1%）から回答があり、1,280例の報告があった。そのうち、年齢、予防接種歴ともに記載のある1,252例を対象に、症状（発熱、有熱期間、発疹、咳、コプリック斑、結膜炎、および入院・合併症の有無）との関係を年齢階層別に比較検討した。患者は予防接種の既接種群7.7%、未接種群76.4%、接種不明群15.8%と、未接種群が約3/4を占めた。年齢階層別では、1歳児が23.6%と高率を占めていた。また、接種不明者の割合は年齢とともに増加し、15歳以上では63%と顕著に高率となっていた。高度/長期発熱、咳、コプリック斑、結膜炎の出現率や入院・合併症の割合は既接種群で有意に少なく予防接種による症状軽減効果が確認された。今後、麻しんワクチンの推進がなされていくなかで、麻しん患者の実態把握はより重要であると思われるため、個人の予防接種記録の徹底や、近年増加している10代から20代の麻しん患者調査の実施など、麻しん患者の発生をより厳密に把握するための調査が必要であると思われる。

キーワード：麻しん、予防接種、サーベイランス、症状、愛知県

序 文

近年、麻しんは諸外国において、患者数
ゼロにむけての排除対策が進められており、

多くの先進国では主に輸入症例を発端とす
る一部地域での限局した流行など、年間数
十例程度の発生にとどまるまでに対策が進

んでいる。2005年9月、世界保健機関（WHO）は日本を含む西太平洋地域の麻疹排除（elimination）の目標を2012年と設定し、各国の麻疹対策強化を求めている。¹⁾

わが国では、1976年の予防接種法改正時に麻疹が予防接種の対象疾患に加えられたが、任意接種時には接種率は約30%にすぎなかった。その後は定期接種へと変更され2005年度の接種率は、1歳児では75.7%と低いものの、2歳以上20歳未満の年齢層では95%以上と高くなった²⁾。

しかし、1998年から2001年にかけての沖縄県における流行³⁾など、主としてワクチン接種率の低い地域を中心とした流行に加え、2007年には首都圏はじめ日本各地で若年成人を中心に麻疹が流行するなど社会的問題になった⁴⁾。このことは麻疹排除に関する対策強化の必要性を広く社会に認識させることにもなった。

2001年から02年にかけて愛知県の感染症発生動向調査においては麻疹患者の報告数が多く、2002年の定点あたり報告数は全国に比べて3倍以上の高値を記録した。そのような状況の下、愛知県では、麻疹対策の基礎資料を得ることを目的として、2001年および02年に「麻疹に関するアンケート調査」を実施した。

今回は、このアンケート調査の結果を用い、ワクチンの2回接種など、麻疹排除を目的とした麻疹予防接種啓発にかかる資料とするため、麻疹の予防接種歴の有無と症状等との関係について比較検討した。

対象と方法

本調査は愛知県感染症対策協議会が愛知県医師会の協力を得て、愛知県内の感染症発生動向調査患者情報小児科定点および内科定点の医療機関（計191医療機関）を調査対象として実施した。調査期間は2001

年4月～6月および02年4月～6月であり、各年それぞれ3か月間に発症した症例について報告を求めた。調査項目は性、年齢、予防接種歴（保護者からの聞き取り）、症状等のほか、医師による自由記載欄としてその他特記事項欄を設けた。届出基準については調査票に記載はなく、感染症発生動向調査の届出基準をもとにした担当医の判断に任された。届出は医師会を窓口として郵送で行われた。

対象医療機関のうち132（69.1%）施設から回答があり、1,280例の患者が報告された。このうち、年齢、予防接種歴ともに記載があった1,252例を解析対象とした。それらのうち予防接種歴有り群（以下、既接種群）と予防接種歴無し群（以下、未接種群）の2群間で、罹患時における症状{発熱（37.5度以上）、有熱期間、発疹、咳、コプリック斑、結膜炎の有無}、および特記事項に記載された入院・合併症の有無との関係を年齢階層別（0歳、1歳、2-5歳、6-9歳、10-14歳、15歳以上）に比較検討した。また、調査項目の1つであった抗体価測定については、EIA法、HI法などの測定方法の混在や、測定方法の記載がなく数値のみの報告もあるなど、報告形式の統一がなされていなかったことから、解析対象からは除外した。

なお、調査票上回答が不明の場合は欠損データとした。発熱および有熱期間の検定にはWilcoxon順位和検定、頻度の分布に関する有意性の検定にはカイ二乗（ χ^2 ）検定を行い、期待度数5未満の場合はFisherの直接法を用いた。

本調査では個人に関する情報は記載されておらず、解析にあたっては集団としてのみ数値を用い、個人のプライバシー保護を確保した。

Table 1 Age distribution of measles patients by vaccination history

history of vaccination	number of patients*						Total
	0y	1y	2-5y	6-9y	10-14y	15y-	
+	3 [3.1] (1.3)	12 [12.4] (4.1)	21 [21.6] (8.5)	20 [20.6] (12.3)	27 [27.8] (16.0)	14 [14.4] (9.1)	97 [100] (7.7)
-	220 [23.0] (98.2)	272 [28.4] (92.2)	197 [20.6] (79.4)	122 [12.7] (75.3)	103 [10.8] (60.9)	43 [4.5] (27.9)	957 [100] (76.4)
not known	1 [0.5] (0.4)	11 [5.6] (3.7)	30 [15.2] (12.1)	20 [10.1] (12.3)	39 [19.7] (23.1)	97 [49.0] (63.0)	198 [100] (15.8)
Total	224 [17.9] (100)	295 [23.6] (100)	248 [19.8] (100)	162 [12.9] (100)	169 [13.5] (100)	154 [12.3] (100)	1,252 [100] (100)

*[] : % age distribution, () : % history of vaccination

成績

1 麻疹患者の発症時年齢と予防接種歴

各年齢における予防接種歴の内訳を Table1 に示した。対象者 1,252 例の内訳は既接種群 97 例(7.7%)、未接種群 957 例(76.4%)、接種不明群 198 例(15.8%)と、未接種群の割合が高かった。発症時平均年齢は既接種群 8.7±7.4 歳、未接種群 4.0±3.7 歳、接種不明群 15.7±13.8 歳と接種不明群で最も高かった。年齢階層別での割合は、1 歳の患者が全体の 23.6%と最も高く、0 歳(17.9%)と合わせると全患者の 41.5%が 2 歳未満の乳幼児であった。

また、15 歳以上の年齢内訳は、10 代(5.0%)、20 代(6.1%)、30 代(1.2%)、40 代(0.1%)であった。

接種歴について年齢階層別に比較すると、患者に占める未接種群の割合は 0 歳児が 98.2%、1 歳児が 92.2%と、2 歳未満児では 90%以上を占めていた。

一方、調査票に予防接種歴ありの記載があった患者が最も多かった年齢層は 10-14 歳で、当該年齢層の患者の 16.0% (27/169) を占めていた。また、接種不明者の割合は年齢とともに増加し、2~9 歳では 12%程度であったものが、10~14 歳では 23%、15 歳以上では 63%と顕著に高率となっていた。既接種群 97 例の中で予防接種日の記載があった 37 例(38.1%)について接種から罹患までの期間を検討したところ、その期間が 1 か月未満であった患者が 29.7%

と最も多かった。年齢別では 2 歳未満において予防接種と罹患までの期間が 1 か月未満であった患者が 63.6% (7/11) と、予防接種直後に罹患していた例が多かった。また、接種から罹患までの期間の平均値は、0 歳では 1 か月、1 歳では 3.8 か月程度であったものが、2~5 歳は 2.5 年、6~9 歳では 4.5 年、10~14 歳では 8.5 年、15 歳以上では 14.5 年と長期間が経過していた。

2 予防接種歴と症状

(1) 発熱

発熱の程度について予防接種歴の有無で比較した結果を Fig.1 に示した。発熱の程度は、「39.0~39.4 度」の割合が既接種群(38.9%)、未接種群(39.8%)

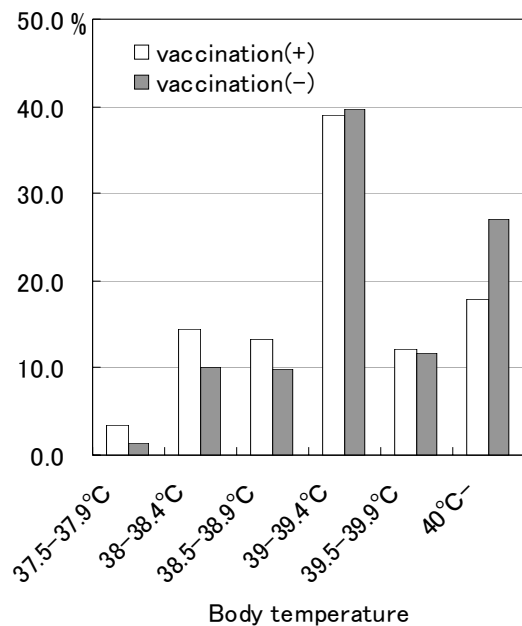


Fig. 1 Body temperature in measles patients with or without vaccination

とも最も高率であった。

発熱温度の平均値は、既接種群が 39.1 ± 0.7℃、未接種群が 39.2 ± 0.7℃と有意差を認めた (P<0.05)。

また既接種群と未接種群で、40.0 度以上と 39.0 度未満の割合を年齢層別に比べると、全年齢層において既接種群での 40.0 度以上の割合が低く、1 歳では有意差を認めた (P<0.05)。

(2) 有熱期間

最高体温が 38 度以上であった患者の有熱期間について予防接種歴の有無で比較した結果を Fig. 2 に示した。

既接種群では有熱期間が 5 日間の割合が最も高く全体の 25.6%を占めていたのに対し、未接種群では 7 日間の割合が 26.3%と最も高かった。有熱期間が 5 日以下であった症例の割合は、既接種群では 66.7%であったのに対し未接種群では 29.6%と、既接種群において有熱期間が短い者の割合が有意に高かった (P<0.001)。また、有熱期間が 8 日以上割合は、既接種群が 6.5%であったのに対し、未接種群では 18.1%と有意に高かった (P<0.01)。

有熱期間の平均値についても、既接種群 (4.8 ± 2.1 日) が未接種群 (6.3 ± 1.7 日) に比べて有意に短いことが示された (P<0.001)。

また、年齢階層別でも既接種群は未接

種群に比べて 0.6~2.0 日有熱期間が短く、0 歳を除く年齢層において有意差が認められた。

次に、麻疹予防接種歴と発疹、咳、コプリック斑、結膜炎との関係について、年齢階層別に比較した結果を Table 2 に示した。

(3) 発疹

発疹出現率は、全体では既接種群 (99.0%) と未接種群 (98.4%) で有意差

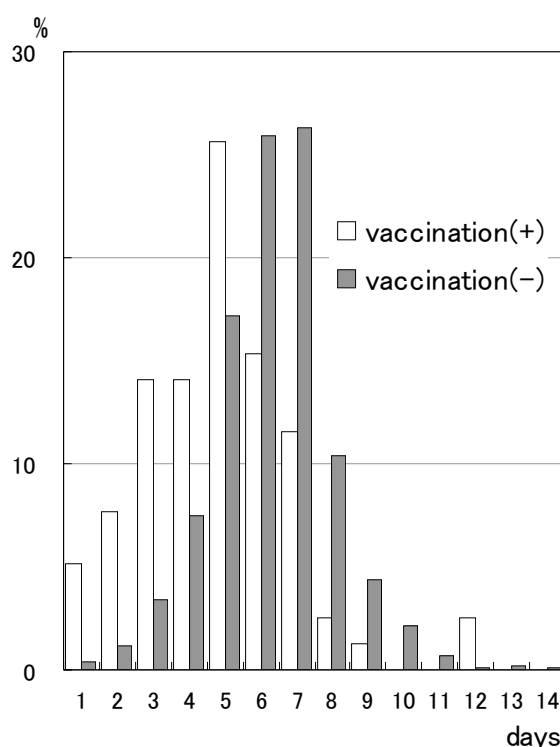


Fig. 2 Duration of fever in measles patients with or without vaccination

Table 2 Percentage of measles symptoms in patients with or without vaccination history (Age distribution)

Signs and symptoms	history of vaccination	0y	1y	2-5y	6-9y	10-14y	15y-	Total
Eruption (%)	(+)	100	100	100	100	100	92.9	99.0
	(-)	97.7	99.2	99.0	98.3	97.0	97.6	98.4
Cough (%)	(+)	100	91.7	90.5	85.0	81.5	78.6	85.6
	(-)	98.6	99.6	98.5	97.5*	97.1**	88.1	98.1***
Koplik spots (%)	(+)	100	83.3	50.0	73.7	53.8	69.2	64.5
	(-)	87.6	87.9	91.6***	86.4	92.1***	66.7	87.9***
Conjunctivitis (%)	(+)	100	36.4	38.1	42.1	36.0	28.6	38.0
	(-)	60.0	66.5	67.2*	66.9*	76.6***	55.3	65.9***

* P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

はみられず、年齢階層別でも、既接種群で 92.9～100%、未接種群で 97.0～99.2%と接種の有無による有意差はみられなかった。

(4) 咳

咳を伴う割合は、全体では既接種群 (85.6%) が未接種群 (98.1%) に比べ有意に低かった (P<0.001)。年齢階層別にみると、6-9 歳および 10-14 歳の年長小児においては、咳を伴う割合が既接種群では有意に低かった。

(5) コプリック斑

コプリック斑の出現報告率は、全体では既接種群 (64.5%) が未接種群 (87.9%) に比べて有意に低かった (P<0.001)。また、年齢階層別にみると、2-5 歳および 10-14 歳の年齢群において既接種群でのコプリック斑の出現報告率が有意に低かった (P<0.001)。

(6) 結膜炎

結膜炎の出現率は、全体では既接種群 (38.0%) が未接種群 (65.9%) に比べて有意に低かった (P<0.001)。年齢階層別でも既接種群患者の占める割合数が少ない 0 歳 (1.3%、n=3) を除く年齢層で、既接種群では未接種群に比べ結膜炎の出現率は低く、このうち 1 歳以下および 15 歳以上の階層を除く年齢層では有意差を認めた。

3 予防接種歴と入院および合併症

アンケート調査の特記事項項目に記載があったのは対象者全体 (1,252 例) の 22.8%

にあたる 286 症例であった。記載内容には、入院、合併症のほか、推定感染源 (親、兄弟、友人、同僚等)、臨床経過、γグロブリン投与、C 反応性タンパク質 (CRP)、末梢血白血球数 (WBC) 検査結果などの記載も含まれていた。

予防接種歴別に記載数を比較すると、既接種群での記載は 32 例 (既接種群の 33.0%)、未接種群では 227 例 (未接種群の 23.7%)、接種不明群では 27 例 (接種不明群の 13.6%) と、既接種群では未接種群に比し記載率が有意に高かった。

(1) 入院

入院症例について予防接種歴の有無で比較したところ、既接種群に入院例は 1 例もみられなかったのに対し、未接種群においては 56 例の入院症例が記載されていた。したがって、既接種群での入院率は 0%、未接種群での入院率は 5.9% となり、未接種群で有意に入院率が高かった (Table3)。

また、入院症例について年齢階層別に検討したところ、未接種群で 1 歳児の入院割合が 10.7% と最も高く、ついで 0 歳児 (7.7%)、15 歳以上児 (7.0%) の順であった。

(2) 合併症

「特記事項」の項目に合併症の記載があったのは 37 例 (全体の 3.0%) であった。その内訳をみると、肺炎・気管支炎が 12 例 (34.3%) と最も多く、ついで肝炎・肝機能障害が 7 例 (20%)、中耳

Table 3 Numbers of hospitalization and complications in patients with or without vaccination

	vaccination(+) (N=97)	vaccination(-) (N=957)	Total (N=1054)
Number of patients with special notes	32 (33.0%)	227 (23.7%)	259 (24.6%)
Number of hospitalization	0 (0.0)	56 (5.9)**	56 (5.3)
Number of complications	3 (3.1)	32 (3.3)	35 (3.3)

**P<0.01

炎 6 例 (17.1%) の順であった。また、脳炎の記載は 15 歳以上の年齢層で 1 例みられ、予防接種歴は不明であった。

合併症報告について接種歴の有無で比較すると、既接種群での合併症割合は 3.1%と未接種群 3.3%との間に有意差は認められなかった (Table3)。しかしながら、既接種群で合併症が報告されたのは 3 例のみ、いずれも 15 歳以上の年齢層の患者で、その内容は肝炎・肝機能障害であり、入院には至っていない。未接種群における合併症の割合を年齢階層別に検討したところ、1 歳での合併症の割合が 6.6%と最も高く、ついで 0 歳が 2.7%、2-5 歳が 1.5%と、未接種の 1 歳児における合併症発症率がその他の年齢層に比し高率であった。

考 察

愛知県の感染症発生動向調査における麻しん患者報告数は、全国流行の見られた 2001 年及び、全国流行はほぼ終息した 02 両年に多い状態 (2,017 例、2,163 例) が続いたが、2003 年 (186 例) 以降著しく減少している。愛知県内の麻しん予防接種率は、1978 年度は僅か 26.7%であったものが、2005 年度には 85.8%と上昇しており、愛知県の年少児における麻しん流行は、2002 年が最後となる可能性も高い。

2006 年麻しん風しん混合 (MR) ワクチン及び 2 回接種導入後の接種率は、第 1 期 92.1%、第 2 期 85.4%と、第 2 期の MR 接種率が第 1 期に比べかなり低く、今後、麻しん患者に年長児及び若年成人の占める割合がますます高まるおそれがある。麻しん根絶のためには疫学上 94~97%の予防接種率が求められており⁵⁾、また、第 1 期、第 2 期とも 95%以上の高い接種率が維持されることにより、最終的には流行が排除可

能とされているが⁶⁾⁷⁾、この様に第 2 期の接種率が低い状況が続くようであると、今後、更なる麻しん流行が危惧される。また、今回の調査で予防接種歴不明者の割合は年齢とともに増加する傾向がみられており、麻しんの予防接種に対する意識の不足は否めず、指導の強化だけではなく、個人の予防接種記録の方法について再考する必要があると思われる。

今回の解析結果から、麻しんの予防接種は、予防接種後に罹患・発症した場合でも発熱、有熱期間、咳、コプリック斑、結膜炎などの臨床症状を伴う割合を減少させることが確認された。一方、発疹出現率について、予防接種歴の有無による差がみられなかった理由として、定型的発疹を伴わない修飾麻しんの診断及び届出は低率に留まっていた可能性が考えられた。また、合併症・入院については、その記載を義務付けたものではないため、その全容を把握したものとは言い難いものの、麻しんの予防接種は合併症・入院といった重症例の割合についても減少させる効果があることを窺わせる結果となっていた。しかし、15 歳以上の年齢層については、既接種群においても肝機能障害の合併症がみられるなど、他年齢に比べて重症例を減少させる効果が顕著でなかった。今回の調査では、15 歳以上では予防接種不明者の割合が高く、十分な解析が出来なかったため、今後は、近年増加している 10 代から 20 代の麻しん患者についての調査が必要である。

麻しんの合併症出現率は高く、脳炎は 1,000~2,000 例に 1 例、中耳炎は 7~9%、肺炎は 1~6%といわれている⁸⁾。本研究においても脳炎は 1,252 例中 1 例とほぼ同割合にみられたが、中耳炎は 8 例 (全体の 0.6%)、肺炎は 12 例 (同 1%) とかなり低いものであった。この原因として、本調査

における合併症の記載は義務付けられていなかったことから、本調査においては入院及び合併症の記載率が、未接種群で既接種群より低い結果となり、特記事項への合併症記載漏れの可能性も考えられた。しかしながら、自由記載欄から抽出するという調査法の限界はあったものの、15歳未満の年齢層では予防接種により入院等重症化への進展を抑制していた可能性が示唆される。

本調査の限界として、麻しんの診断基準や特記事項への記載方法が明確に記されていないことが挙げられる。

診断に関しては、調査対象医療機関は感染症発生動向調査の定点医療機関であり、その診断基準は周知徹底されていることから、修飾麻しんを除く診断の信頼性は高いものであると考えられる。また、今回の解析から除外した抗体価測定については、コプリック斑等麻しん特有な症状がみられなかった症例や年長群に対しては60%程度の高い確率で実施されていた。一方、回答率が70%程度であったことに関しては「予防接種歴、抗体価測定、特記事項の記載」等の細部にわたる記載内容の調査であった事を考慮すると、その症例数からも今回の解析に十分耐えられるものと考えられた。しかし、麻しん排除に向けた基礎資料の作成という観点からみると、今後の調査においては、抗体価測定方法の統一や義務付け等登録精度の向上をめざすことが重要であり、予防接種歴の正確な把握については乳児期からの母子健康手帳等への予防接種歴、罹患歴等の正確な記入、入園・入学時の予防接種記録の確認を徹底する必要がある。更に、10代および20代の患者に対しても調査を実施するなど、麻しん患者の発生をより厳密に把握するための調査が必要であると思われる。感染症発生動向調査事業における麻しん患者発生報告は、2008年1月

から従来の定点報告にかわり全数報告疾患となった。本調査報告は麻しんが感染症発生動向調査の全数把握対象疾患に指定される以前に実施された全県規模の調査であり、今後の麻しん全数把握の本格的な取り組みに当たってのいくつかの課題を提供できたと考えられる。愛知県では2007年2月より、全ての麻しん症例を迅速に把握し、流行の兆しを確実に探知するため、医師会と行政機関が連携して独自に「愛知県麻しん患者調査事業」⁹⁾を実施している。本事業は、愛知県内の全ての麻しん症例を迅速に把握し、麻しん発生の基礎資料を得るとともに、ホームページ等を活用して患者情報を迅速かつ的確に情報提供することにより、適切かつ有効な感染拡大防止対策を講じることが目的としている。今後は同事業で得られる資料をもとに、麻しん根絶の目標達成に向けた効果的な対策を行うとともに、本研究では予防接種歴不明群の割合が多く検討不能であった15歳以上の年齢層に着目し、解析を進めたい。

謝辞：稿を終えるにあたり、愛知県感染症対策協議会および愛知県医師会をはじめ、アンケート調査にご協力頂きました感染症発生動向調査定点医療機関の諸先生方、ならびに論文執筆にあたり、御教示いただいた愛知県衛生研究所宮崎 豊前所長、愛知県中央児相・障害者相談センター前田清先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 岡部信彦：WHO 西太平洋地域事務局 (WPRO) における麻疹対策. 病原微生物検出情報 2007 ; 28 : 261-2.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：平成 17 年度感染症流行予測調査報告書 2005 ; p. 143-62.
- 3) 知念正雄：沖縄県における麻疹ゼロ作戦

- はしか 0 プロジェクト委員会の活動. 小児感染免疫 2003 ; 15 : 87-94.
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター : IDWR(感染症発生動向調査週報) 2007 ; 16 : 5-10.
- 5) 梯 正之 : 数理モデルによる麻疹予防接種の効果分析. 日公衛誌 1990 ; 37 : 481-90.
- 6) 国立感染症研究所・厚生労働省健康局結核感染症課 : <特集>麻疹 2006~2007年. 病原微生物検出情報 2007 ; 28 : 239-40.
- 7) 庵原俊昭 : 小児感染症の基本的考え方. 日小児皮会誌 2006 ; 25 : 93-6.
- 8) 中山哲夫 : ワクチンの最新事情と渡航者の接種(25 麻疹および風疹ワクチン). 日本医事新報 2008 ; 4368 : 69-75.
- 9) 愛知県衛生研究所(麻しん患者調査事業) <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/2f/msl/msl.html>

Measles patients' symptoms in relation to vaccination history -Results from measles questionnaire surveillance conducted by Aichi Prefectural Infectious Disease Control Council-

Michiyo Yamaguchi ¹, Kaoru Hirose, Masako Tsuzuki, Hiroki Sakurai, Kazuhito Takeuchi,
Takashi Kimura ², Tsuneo Masui ³, Hiroko Minagawa

¹ Department of Health and Public Welfare, Health Office, Health Promotion Division

² Aichi Prefectural Kohnan Health Center

³ Aichi Prefectural Mental Health Welfare Center

In order to investigate the effects of measles vaccination on symptoms and severity of the illness, measles questionnaire surveillance was conducted in 2001 and 2002, targeting 191 sentinel clinical institutions according to the Japanese Infectious Disease Prevention Law.

From a total of 1,280 cases reported from 132 (69.1%) institutions, 1,252 cases with complete description were further analyzed for the relationship between vaccination history and symptoms (fever, rash, cough, Koplik's spots, conjunctivitis) and factors indicative of severity of the disease (hospitalization or development of complications). The results showed that 76.4% of measles patients were without vaccination history compared to patients with (7.7%) or unknown (15.8%) vaccination history. Among age groups of the patients, the one-year-old group was the highest (23.6%).

The percentage of the patients with unknown vaccination history increased with age, and reached 63% in patients over 15 years old.

The appearance of symptoms including high and/or prolonged fever, cough, Koplik's spots, or conjunctivitis, and the ratio of hospitalization or development of complications were significantly lower in vaccinated patients, confirming the alleviating effects of the measles vaccination on symptoms and severity of the illness.

From now on, in the process of promoting the measles vaccination, accurate surveillance of measles patients, especially in the 10's and 20's, along with the promotion of through recording of individual inoculation history would be necessary.

Key words : measles, immunization, surveillance, symptom, Aichi Prefecture

調 査 研 究

愛知県におけるヒトメタニューモウイルス感染の状況

秦 眞美 田中正大 伊藤 雅 山下照夫 皆川洋子

要 旨

ヒトメタニューモウイルス (HMPV) は 2001 年に発見されたウイルスで、その疫学や病態については未だ不明な点が多い。そこで、感染が疑われる患者の検体から HMPV の検出を試み、愛知県における HMPV 感染の状況を調査した。2006 年 5 月～2007 年 7 月に感染症発生動向調査のため採取された 296 件の検体を対象とした。検体の RNA から RT-PCR 法で HMPV の F 遺伝子領域を増幅、検出した。さらに増幅産物の塩基配列を決定し、分子系統樹解析により遺伝子型を調べた。検体から検出された HMPV は 25 件 (8.4%) であった。診断名では上気道炎が 12 件 (48%) と最も多く、他に不明熱、下気道炎、無菌性髄膜炎、けいれん重積、急性脳症等の検体からも検出された。患者年齢は 5 歳以下が 21 名と 84% を占めた。また、2006 年 5 月に県内の福祉施設で発生した呼吸器感染症の集団発生事例の検体 9 件 (患者年齢: 35～73 歳) を調べたところ、3 件から HMPV が検出された。ウイルスの遺伝子型は、発生動向調査から検出された 25 件のうち、17 件が A2 型で、8 件が B2 型であった。集団発生事例の 3 件も B2 型であった。HMPV は主に気道感染症患者から検出されたが、脳症等重篤な中枢神経系症状との関連も示唆された。さらに、HMPV は集団感染の病因ウイルスとなる可能性もあり、HMPV 感染症の発生動向については今後とも注意を払う必要があると思われた。

キーワード：ヒトメタニューモウイルス、呼吸器感染症、遺伝子解析、急性脳症、集団発生事例

序 文

ヒトメタニューモウイルス (human metapneumovirus: HMPV) は 2001 年に初めて報告されたウイルスである。オランダで小児の急性呼吸器感染症患者の鼻咽頭から分離された¹⁾。パラミクソウイルス科ニューモウイルス亜科メタニューモウイルス属に分類される 1 本鎖 (-) RNA ウイルスである。8 個の遺伝子を保有し、ウイルス表面には、

F, G, SH の 3 種類の蛋白質が存在する。メタニューモウイルス属には HMPV のほかにトリメタニューモウイルス (AMPV) が知られていたが、HMPV はヒトに感染する初めてのメタニューモウイルスである²⁾。血清疫学調査に基づく抗体保有状況から、少なくとも 50 年前にはヒトの間で流行していたウイルス¹⁾と考えられ、世界中の呼吸器感染症患者から HMPV が同定されており^{3,4)}、

普遍的に存在することが明らかになってきた。わが国でも 2003 年に初めての分離例⁵⁾が報告され、その後も複数の検出事例^{6,7,8,9)}が報告されている。小児の呼吸器感染症と関連づけられることが多く、臨床症状は Respiratory Syncytial (RS) ウイルスとの類似が指摘されているが^{2,3)}、研究の歴史が浅く、その疫学や病態には依然不明な点も多い。そこで、愛知県における HMPV 感染症の発生動向を把握する目的で、感染が疑われる患者の検体からウイルス検出を試みた。本稿では、2006～2007 年までに得られた解析結果を報告する。

材料と方法

1. 検体

2006 年 5 月～2007 年 7 月の期間に感染症発生動向調査における病原体定点医療機関において採取された検体のうち、患者の臨床診断名が、上気道炎、下気道炎等の呼吸器感染症及び不明熱、髄膜炎、脳炎・脳症等、呼吸器系ウイルス感染の可能性のある全ての検体 296 件を検査した。検体は主に咽頭拭い液であるが、髄液、尿も含まれていた。

さらに 2006 年 5 月に愛知県内で発生した呼吸器感染症の集団発生事例から 9 件の咽頭拭い液を検査した。

2. 遺伝子検出及び解析

検体から HMPV の F 遺伝子を Semi-nested PCR 法¹⁰⁾で検出した。High Pure Viral RNA kit (Roche Applied Science, Germany)によりウイルス RNA を抽出し、高尾らのプライマー⁶⁾を用いて、RT-PCR (Superscript One-step RT-PCR Kit, Invitrogen, USA)、2nd PCR (LA Taq polymerase, Takara, Japan) を行った。PCR 産物はダイレクトシーケンシング (Model-4200, Li-cor, USA)、得られた 339 塩基の配列について

neighbor-joining (NJ) 法による系統樹解析 (GENETYX software, Ver7; GENETYX Corp, Japan) を行うとともに、各検体に含まれていた HMPV の遺伝子型を決定した。

3. ウイルス分離

遺伝子検査により陽性であった全ての検体を LLC-MK2 細胞に接種し、ウイルス分離を試みた。24 穴プレートに単層培養した細胞に、検体を 100 μ l 接種した。維持培地は 0.2%BSA/DMEM (+trypsin 5 μ g/ml, Penicillin 100U/ml, Streptomycin 100 μ g/ml, Fungizone 1 μ g/ml) を用い、10 日毎に 3 代まで継代して観察した。

結果

1. 感染症発生動向調査における HMPV の検出 (表 1)

RT-PCR 法による HMPV の検出を行った結果、感染症発生動向調査の検体のうち、HMPV 陽性であったのは 296 件中 25 件 (8.4%) であった。陽性症例は全て咽頭拭い液から検出されたが、1 例は髄液から、脳症患者 1 例 (表 1, No. 8) からは尿からも検出された。4 例は咽頭拭い液や糞便から他のウイルス (アデノウイルス 2 型、3 型、5 型、コクサッキーウイルス B4 型) も同時に検出されていた。

(1) ウイルス分離成績

PCR 陽性検体 25 件中 LLC-MK2 細胞で HMPV 分離に成功したのは 4 件 (16%) のみであった。

(2) 系統樹解析 (図 1)

HMPV の遺伝子型には A, B の 2 型があり、さらにそれぞれがサブグループ 1, 2 を形成しているため、現在 4 型 (A1, A2, B1, B2) に型別される²⁾。感染症発生動向調査で得られた陽性検体 25 件の他、2006 年 5 月に発生した呼吸器感染症集団発生事例 (後述) から得られた 3 件を解析した結果、2006

表1 発生動向調査におけるHMPV検出

No.	診断名	地域	性別	年齢	発病年月日	採取年月日	ウイルス 分離	遺伝子型	ウイルスID	備考
1	ウイルス感染症	豊橋市	女	1ヶ月	2006/4/30	2006/5/3		A2	JPAI 06-180	髄液(+)
2	痙攣重積	豊田市	男	2	2006/5/20	2006/5/22		B2	JPAI 06-168	
3	上気道炎	小牧市	女	8	2006/5/23	2006/5/24		B2	JPAI 06-126	
4	上気道炎	小牧市	女	5	2006/5/23	2006/5/25		B2	JPAI 06-128	Adeno-5(咽頭)
5	上気道炎	小牧市	男	35	2006/5/24	2006/5/24		B2	JPAI 06-124	
6	上気道炎	小牧市	男	15	2006/5/24	2006/5/25		B2	JPAI 06-132	
7	無菌性髄膜炎	豊田市	女	4	2006/5/29	2006/5/30		A2	JPAI 06-160	
8	急性脳症	豊橋市	女	6ヶ月	2006/5/31	2006/5/31	○	A2	JPAI 06-181	尿(+)
9	下気道炎	小牧市	女	3	2006/6/4	2006/6/10		A2	JPAI 06-141	
10	不明熱	小牧市	男	2ヶ月	2006/6/8	2006/6/8		B2	JPAI 06-139	
11	不明発疹症	豊橋市	女	11ヶ月	2006/6/8	2006/6/13		A2	JPAI 06-314	
12	上気道炎	岡崎市	男	1	2006/6/10	2006/6/15		B2	JPAI 06-158	Adeno-2(咽頭)
13	不明熱	豊田市	男	1ヶ月	2006/6/11	2006/6/15		A2	JPAI 06-161	
14	下気道炎	豊田市	男	1	2006/6/11	2006/6/22		B2	JPAI 06-166	Adeno-3(咽頭)
15	上気道炎	豊橋市	男	5	2006/6/30	2006/7/3	○	A2	JPAI 06-309	
16	不明熱	豊橋市	男	5	2006/7/10	2006/7/13		A2	JPAI 06-299	
17	不明熱	豊橋市	男	5	2006/7/11	2006/7/12		A2	JPAI 06-296	CoxB4(便)
18	上気道炎	碧南市	男	11	2006/7/17	2006/7/18	○	A2	JPAI 06-281	
19	脳脊髄炎	岡崎市	男	3	2006/7/24	2006/7/24		A2	JPAI 06-295	
20	上気道炎	岡崎市	女	4	2006/9/28	2006/9/29		A2	JPAI 06-374	
21	不明熱	豊橋市	女	5ヶ月	2006/11/20	2006/11/27		A2	JPAI 06-455	
22	上気道炎	豊橋市	男	3	2007/4/24	2007/4/24	○	A2	JPAI 07-108	
23	上気道炎	豊橋市	女	3	2007/5/7	2007/5/9		A2	JPAI 07-171	
24	上気道炎	豊橋市	男	3	2007/5/8	2007/5/9		A2	JPAI 07-173	
25	上気道炎	小牧市	女	1	2007/7/11	2007/7/12		A2	JPAI 07-273	

年5月及び6月の8件と同年5月の集団発生事例3件がB2型、2006年5月～12月の13件と2007年4月～7月の4件はA2型であった。A1型とB1型は検出されなかった。

(3) HPMV陽性患者の臨床診断名(図2)

診断名では上気道炎が12件と最も多く(48%)、不明熱5件(20%)、下気道炎2件、不明発疹症、無菌性髄膜炎、けいれん重積、脳脊髄炎、急性脳症、その他ウイルス感染症が各1件であった。

(4) 年齢別検出数(図3)

患者年齢は0歳が最も多く6名(24%)、1歳以上5歳以下は15名(60%)と5歳以下(21名)が84%を占めた。6歳以上15歳以下は3

名、成人は35歳の1名のみであった。

(5) 月別検出数(図4)

月別の検出数は2006年5月に8件、6月に6件、7月に5件であった。その後9月、11月に検出された。12月から翌年4月までは検出されなかった。遺伝子型では5月にはB2型が優勢であったが、6月には両者が同数で、7月以降はすべてA2型であった。2007年は5月に3件、7月に1件すべてがA2型であった。

2. 脳症死亡事例について

表1のNo.8の患者は6ヶ月の女児で、2006年5月下旬に発症し、急性脳症と診断され、翌月死亡している。入院時に採取さ

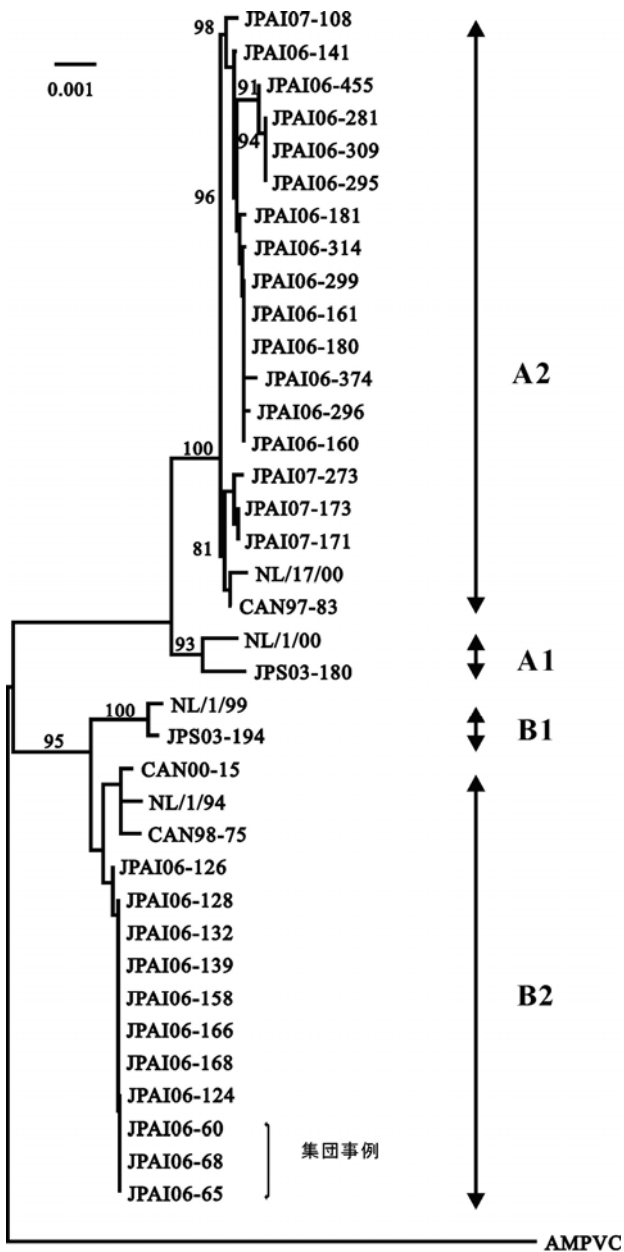


図1 HMPV F 遺伝子の系統樹解析

愛知県株：

JPAI (AB302895, AB474921-AB474947),

参照ウイルス株：

NL/17/00 (AY304360), CAN97-83 (AY145296),
 NL/1/00 (AF371337), JPS03-180 (AY530092),
 NL/1/99 (AY304361), JPS03-194 (AY530094),
 CAN00-15 (AY145300), NL/1/94 (AY304362),
 CAN98-75 (AY145289), AMPVC (AY579780)

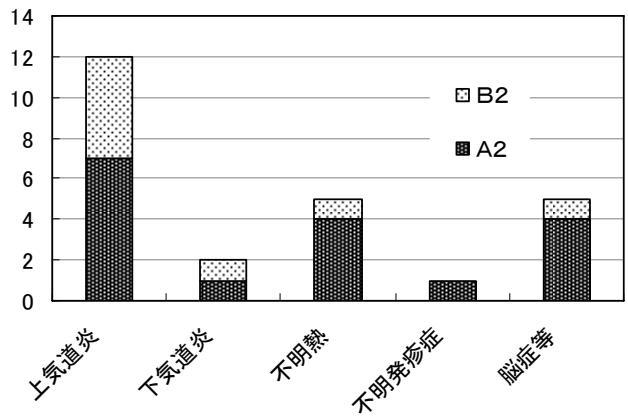


図2 HMPV陽性患者の臨床診断
 (脳症等には脳症、脳脊髄炎、髄膜炎を含む。)

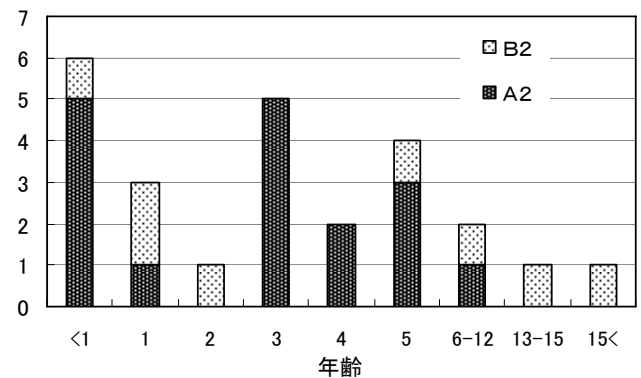


図3 HMPV陽性患者の年齢分布

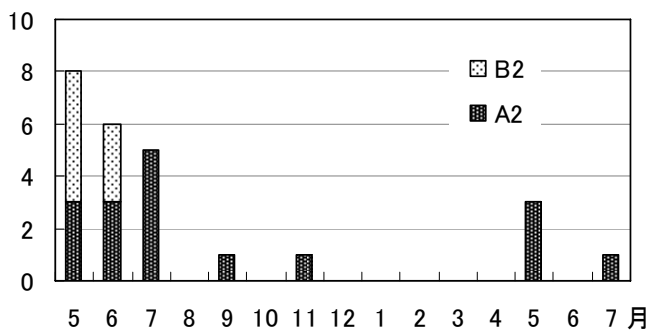


図4 HMPV陽性検体の採取時期

れた咽頭拭い液、髄液、血清、尿を発生動向調査の検体として検査した。

検査の結果、咽頭拭い液と尿から HMPV 遺伝子が検出され、咽頭拭い液からはウイルスも分離された。咽頭拭い液から検出したウイルス遺伝子と分離ウイルスの遺伝子は一致した。尿検体から検出したウイルス遺伝子については、ダイレクトシーケンスの結果、複数分子種の存在が示唆され

表2 呼吸器感染症集団発生事例におけるHMPV検出

診断名	地域	性別	年齢	発病年月日	採取年月日	ウイルス分離	遺伝子型	ウイルスID
上気道炎	新城	男	56	2006/5/14	2006/5/17		B2	JPAI 06-65
下気道炎	新城	女	35	2006/5/16	2006/5/17	○	B2	JPAI 06-60
上気道炎	新城	女	60	2006/5/16	2006/5/17		B2	JPAI 06-68

たため、クローニングして解析したところ、quasispecies（擬似種）が認められた。詳細は別報に記載した¹⁰⁾。

3. 集団発生事例（表2）

2006年5月に県内の福祉施設で呼吸器感染症の集団発生事例が発生した。患者9名（年齢：35～73歳、男3名、女6名、上気道炎8名、下気道炎1名）の咽頭拭い液検体について、HMPVの遺伝子検査を試みたところ、3件が陽性であった。下気道炎を発症した1名の検体からはウイルスも分離された。遺伝子型は3件全てB2型であった。

考 察

HMPV陽性患者の臨床診断はこれまでの報告^{3, 6, 11, 12)}によると、下気道炎が多い。今回の調査ではHMPV陽性例の約半数にあたる12件が上気道炎症例であり、下気道炎は2件(8%)のみであった。一方、今回の調査では、髄膜炎、脳脊髄炎、痙攣、脳症等の神経症状を呈する症例合計4件からも検出されており、HMPV陽性検体の16%を占めた。このような症例からの検出報告は数例のみである^{8, 13, 14)}。今回HMPVが検出された脳症死亡例では、尿検体からウイルス遺伝子が検出されており、患者がウイルス血症を起こしていたと推察される。尿検体から検出されたHMPVにquasispeciesが認められたことも、血中の免疫細胞による免疫応答からの回避により、多変異ウイルスが生じていたことを示唆する。尿からのHMPV検出及びquasispeciesの検出報

告は、世界初である。また、ドイツからの脳炎死亡例からのHMPV検出報告¹³⁾も、HMPVが神経系に重篤な障害をもたらす可能性を示唆している。

HMPVが検出された患者年齢は5歳以下が84%を占めた。感染症発生動向調査の検体採取は主に小児患者から行われており、成人からの検出は1件のみであったが、福祉施設における集団発生事例では成人患者3名からHMPVが検出されている。HMPVを原因とする呼吸器感染症の集団発生は老人施設の事例も報告されており^{15, 16)}、成人呼吸器感染症の病因としても警戒すべきウイルスと考えられる。

HMPVの検出時期は5月～7月に多く、12月～3月には検出されなかった。日本など温帯地域では冬から春にかけて流行するとの報告があるが^{2, 3)}、今回の調査結果から愛知県においては春から夏にかけても流行していると考えられた。他県からの報告^{9, 11)}でも3月～5月をピークとして8月まで検出されている。

遺伝子型解析の結果は、17件がA2型、8件がB2型であった。脳炎等神経症状を呈した症例4例のうち、3例から検出されたHMPVはA2型であった。他にも脳炎症例^{8, 13)}からA型が検出されていることなどから、A型の方がB型よりも病原性が高い可能性も示唆されるが、さらに症例を集積して調査する必要があると思われる。患者年齢はA2型については94%が5歳以下であったが、B2型は5歳以下が63%であった。成人の集団感染事例もB2型であり、年齢と遺

伝子型の関連性が疑われる。HMPV 感染は乳幼児で重症化するとされることから¹⁶⁾、HMPV 遺伝子型と患者年齢及び臨床症状の関係については、さらに多くの症例を検討する必要があると考えられた。検出月については、B2 型は 2006 年 5 月と 6 月に検出され、7 月以降では検出されていないが、A2 型は 7 月以降も検出され、翌年 2007 年はすべて A2 型であった。愛知県では 2006 年 6 月までは A2 型と B2 型が同時流行し、7 月以降は A2 型が流行していたと考えられる。

文 献

- 1) Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*, 7: 719-724, 2001.
- 2) 菊田英明: ヒト・メタニューモウイルス、ウイルス、56: 173-182, 2006.
- 3) Kahn JS: Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev*, 19: 546-557, 2006.
- 4) Bovin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, Shemer-Avni Y, Ludewick H, Gray GC, LeBlanc E: Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis*, 10: 1154-1157, 2004.
- 5) 後藤郁男、山木紀彦、植木洋、佐藤千鶴子、渡邊節、秋山和夫、鈴木陽、西村秀一、大友弘美: インフルエンザ様患者からの Human metapneumovirus の分離—宮城県、病原微生物検出情報、24: 64-65, 2003.
- 6) 高尾信一、下菌広行、柏弘、松原啓太、坂野堯、池田政憲、岡本尚子、吉田弘、島津幸枝、福田伸治: 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的、疫学的解析、感染症学会雑誌、78: 129-137, 2004.
- 7) Ishigro N, Ebihara T, Endo R, Ma X, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K: High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol*, 42: 3406-3414, 2004.
- 8) Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Murakami T: Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol*, 35: 394-399, 2006.
- 9) Abiko C, Mizuta K, Itagaki T, Katsushima N, Ito S, Matsuzaki Y, Okamoto M, Nishimura H, Aoki Y, Murata T, Hoshina H, Hongo S, Ootani K: Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell line in isolates collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005. *J Clin Microbiol*, 45: 1912-1919, 2007.
- 10) Hata M, Ito M, Kiyosawa S, Kimpara Y, Tanaka S, Yamashita T, Hasegawa A, Kobayashi S, Koyama N, Minagawa H: A fatal case of encephalopathy possibly associated with human metapneumovirus infection. *Jpn J Infect Dis*, 60: 328-329, 2007.
- 11) Hara M, Takao S, Fukuda S, Shimazu Y, Miyazaki K: Human metapneumovirus infection in febrile children with lower respiratory diseases in primary care settings in Hiroshima, Japan. *Jpn J Infect Dis*, 61: 500-502, 2008.

- 12) Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, Peret TCT, Erdman DD, Anderson LJ: Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: A new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis*, 186: 1330-1334, 2002.
- 13) Schildgen O, Glatzel T, Geikowski T, Scheibner B, Matz B, Bindl L, Born M, Viazov S, Wilkesmann A, Knopfle G, Roggendorf M, Simon A: Human metapneumovirus RNA in encephalitis patient. *Emerg Infect Dis*, 11: 467-470, 2005.
- 14) Glaser CA, Honanmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, Schuster FL, Christie LJ, Tureen JH: Beyond viruses: Clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis*, 43: 1565-1577, 2006.
- 15) Honda H, Iwabashi J, Kashiwagi T, Imamura Y, Hamada N, Anraku T, Ueda S, Kanda T, Takahashi T, Morimoto S: Outbreak of human metapneumovirus infection in elderly inpatients in Japan. *J Am Geriatr Soc*, 54: 177-180, 2006.
- 16) 原好勇、渡邊浩：ヒト・メタニューモウイルス感染症、臨床検査、53: 92-95, 2009.

Characterization of Human Metapneumovirus Infection in Aichi Prefecture

Mami Hata, Seidai Tanaka, Miyabi Ito, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

The human metapneumovirus (HMPV) is an emerging human respiratory pathogen first reported in 2001. To study the prevalence of HMPV infections in patients in Aichi Prefecture, 296 respiratory specimens from the infectious agent surveillance during the period from May 2006 to July 2007, were evaluated for the presence of HMPV RNA, which was present in 25 (8.4 %) of these samples. Sequence analysis revealed that A2 and B2 genotypes have circulated in Aichi during the study period. The most frequent diagnoses were upper respiratory tract disease (48%), whereas some cases were associated with neurological disorders including a fatal case of encephalopathy. Children aged <5 years represented 84% of HMPV-positive cases. HMPV was also detected from the specimens of elderly patients from an outbreak of acute respiratory infection occurred at a nursing institution in Aichi Prefecture in May 2006.

Key words: human metapneumovirus, respiratory tract infection, phylogenetic analysis, encephalopathy, outbreak

調 査 研 究

抗梅毒トレポネーマ *Treponema pallidum* -IgM 抗体

陽性血清にみられた STS 法不一致例について

山崎 貢 青木日出美 松本昌門 平松礼司 遠山明人 皆川洋子

要 旨

抗梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*: Tp) -IgM 抗体は Tp 感染初期及び未治療梅毒の指標とされている。血清 1,495 検体を STS (serologic test for syphilis) 法であるガラス板法及び RPR カードテスト (rapid plasma reagin card test、以下 RPR 法と略)、さらに Tp 菌体成分を用いる TPHA (Tp hemagglutination) 法を用いてスクリーニングしたところ 134 検体が少なくとも 1 法に陽性若しくは判定保留を示した。これら 134 検体のうち FTA-ABS 法による確認試験で抗 Tp-IgM 抗体陽性を示したのは 27 検体 (1.8%、27/1,495) であった。抗 Tp-IgM 抗体陽性検体の大部分 (25/27) は STS 法 (定性法) 2 法とも陽性であったが、2 検体に不一致がみられた。不一致 2 例のうち、1 例はガラス板法陰性・RPR 法陽性であったが定量法では 2 法とも陽性、他の 1 例もガラス板法陽性・RPR 法陰性であったが定量法では 2 法とも陽性となった。希釈血清における“反応の強さ”を検討し、STS 法 (定性法) 不一致 2 例の 1 法陰性はいずれも抗体過剰による「地帯現象」と判断した。抗 Tp-IgM 抗体保有者の見落としを避けるためには、STS 法における定量法の併用が有用と考える。

キーワード：梅毒抗体検査、抗 Tp-IgM 抗体、ガラス板法、RPR カードテスト、地帯現象

序 文

2006 (平成 18) 年に一部改正された「性感染症に関する特定感染症予防指針」¹⁾ は、性感染症のうち梅毒、性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ及び淋菌感染症について、治療及び感染拡大防止の必要性から「都道府県等は、保健所における性感染症の検査の機会確保に努めるとともに、住民が受診しやすい体制を整えることが重要」と述べている。国内の梅毒報告数は 2004 年を境に減少から増加に転じており²⁾、愛知県の保健所及び衛生研究所の試験検査 (以下、愛知県試験検査と略) にお

いても精度の高い梅毒抗体検査を提供する必要がある。

梅毒抗体検査は、ウシ心筋由来のリン脂質であるカルジオリピン-レシチン (以下、CL-Lec と略) 抗原を用い抗 CL-Lec 抗体を検出する serologic test for syphilis (STS) 法と、梅毒トレポネーマ *Treponema pallidum* (Tp) の菌体成分を用い抗 Tp 抗体を検出する Tp 法に大別され、スクリーニング検査には、通常 STS 法と Tp 法各々 1 つ以上を含む複数の方法が実施される^{3,4)}。STS 法には CL-Lec 抗原・コレステロールの懸濁液を用いるガラス板法、CL-Lec 抗原を吸着させた

カーボン粒子を用いる RPR カードテスト (rapid plasma reagin card test、以下 RPR 法と略) 等がある^{3,4)}。Tp 法には梅毒血球凝集反応 (Tp hemagglutination test: TPHA 法)、梅毒蛍光抗体吸収法 (fluorescent treponemal antibody absorption test: FTA-ABS 法) 等がある^{3,4)}。TPHA 法には、Tp 菌体成分を吸着させたヒツジ赤血球を用いる原法の他に担体を原法 TPHA 法におけるヒツジ赤血球からゼラチン粒子に置き換えて操作を簡便にした TPPA (Tp particle agglutination) 法等がある^{3,4)}。FTA-ABS 法はスライドグラスに塗抹固定した Tp を用いる方法であり感度・特異性に優れるが、高価な蛍光顕微鏡と熟練を要することから確認検査法として用いられる^{3,4)}。また、FTA-ABS-法には IgG 法と IgM 法とがあり、FTA-ABS-IgG 法は梅毒感染既往を鋭敏に検出する方法であるのに対し、FTA-ABS-IgM 法は Tp 感染初期に産生され第 1 期梅毒と第 2 期梅毒では治療により急速に消失する抗 Tp-IgM 抗体を標的とした検査法であり³⁾、陽性者は Tp 感染初期若しくは未治療梅毒患者の可能性が考えられる。

2009 年 3 月現在、愛知県試験検査の梅毒検査体制 (図 1) においては一次検査として STS 法 2 法、すなわちガラス板法と RPR 法、

二次検査として TPPA 法を行い、さらに STS 法の不一致例などに必要に応じて FTA-ABS-IgG 法及び FTA-ABS-IgM 法の確認検査を実施している。

1999 年 4 月～2008 年 12 月に当衛生研究所で梅毒抗体検査を行った血清 1,495 検体の全成績を解析したところ、抗 Tp-IgM 抗体陽性血清検体の中に STS 法 (定性法) の不一致例を見出したので報告する。

方 法

1. 被検血清

1999 年 4 月～2008 年 12 月、愛知県保健所及び衛生研究所において住民の依頼に基づき後述する梅毒抗体スクリーニング検査を行った 1,495 名由来血清 1,495 検体を対象とした。

2. 検査方法

ガラス板法、RPR 法、TPPA 法、FTA-ABS-IgG 法及び FTA-ABS-IgM 法は微生物検査必携³⁾ に準じて実施した。検査キットは、ガラス板法には“ガラス板法抗原”大日本住友製薬 (株)、RPR 法には“RPR テスト”三光純薬 (株)、TPPA 法には“セロディア-TP・PA”富士レビオ (株) をそれぞれ用い、TPHA 法 (定量法) には“HA 抗原”富士レビオ (株) を用いた。FTA-ABS-IgG 法及び FTA-ABS-IgM

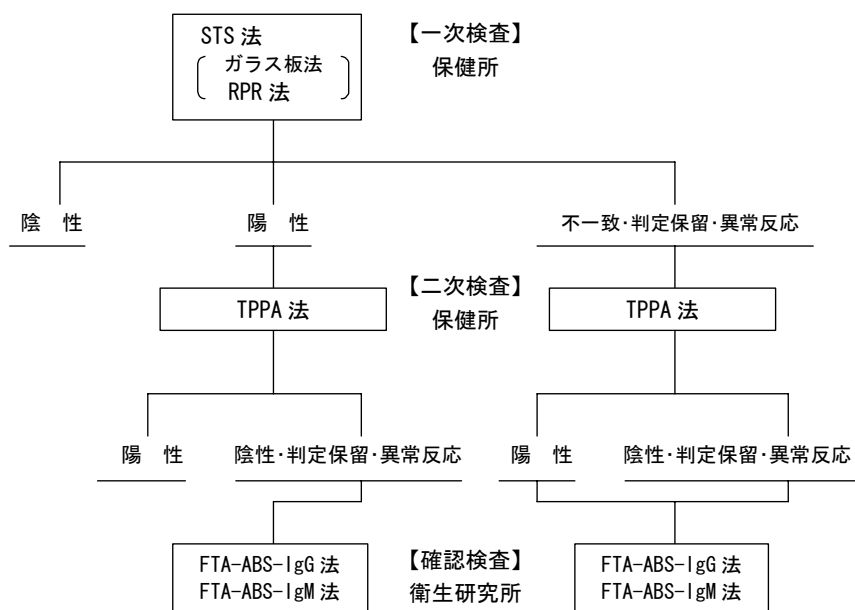


図 1 愛知県試験検査における梅毒抗体検査体制

表1 確認検査を実施した134検体の梅毒抗体検査成績

FTA-ABS-IgM法	STS法*	TPPA法	FTA-ABS-IgG法	例数	STS法(2法)	
					一致	不一致
陽性(+)	+	+	+	25	23	2
	+	-	+	2	2	0
	計			27 (20%)	25	2
判定保留(±)	+	+	+	3	2	1
	+	+	±	1	0	1
	+	±	+	1	1	0
	+	-	-	1	1	0
	-	+	+	1	1	0
	計			7 (5%)	5	2
陰性(-)	+	+	+	25	11	14
	+	-	+	1	1	0
	+	-	±	3	0	3
	+	-	-	46	12	34
	±	+	+	2	2	0
	-	+	+	8	8	0
	-	±	+	1	1	0
	-	+	-	1	1	0
	±	-	-	13	13	0
	計			100 (75%)	49	51
合計				134 (100%)	79	55

注) * ガラス板法とRPR法の1法若しくは2法陽性をSTS法陽性とし、2法とも陰性をSTS法陰性とした。

法には“FTA-ABS テスト-SG-KIT (KW)” 日本凍結乾燥研究所(株)を用い、FTA-ABS-IgM法を行う際にはFTA-ABS-IgG法の抗ヒトIgG FITC 標識抗体に換えて“抗ヒトIgM(μ 鎖)FITC 標識抗体”日本凍結乾燥研究所(株)を用いた。

検査は、該当年度の愛知県試験検査標準的業務分担に従って分担された。即ち、梅毒検査体制(図1)のとおり保健所において一次検査としてSTS法2法(定性法、一部は定量法も実施)を行い、STS法2法陽性、不一致、判定保留及び異常反応の場合は二次検査としてTPPA法(定性法及び定量法)が行われた。保健所においてSTS法2法陽性・TPPA法陽性に基づき梅毒陽性血清と判定された検体を除き、一次検査において梅毒陰性血清と判定された検体を除く全ての検体について、確認検査としてFTA-ABS-IgG法とFTA-ABS-IgM法を衛生研究所で実施した。

なお1999年4月～2003年3月の被検血清1,410検体中の1,379検体(98%)は、当時衛生研究所が梅毒抗体検査に関し保健所機能の一部を兼務していたことから衛生研究所でSTS法とTPPA法(定量試験の一部ではTPHA法を実施)とを同時に検査した。

結果

1. STS法、TPPA法、FTA-ABS-IgG法及びFTA-ABS-IgM法の成績

表1に、血清1,495検体のうち確認試験を実施した134検体について、FTA-ABS-IgM法はじめ検査法別の梅毒抗体検査成績を示した。なお、STS法は、ガラス板法及びRPR法のいずれか1法若しくは2法陽性の場合を陽性とした。FTA-ABS-IgM法の検査成績は陽性27検体(20%)、判定保留7検体(5%)及び陰性100検体(75%)であった。Tp感染初期若しくは未治療のTp感染が疑われるFTA-ABS-IgM法陽性27検体(全1,495検体中1.8%)のうち、25検体はSTS法(定性法)のガラス板法とRPR法2法いずれも陽性であったが、残り2検体(全1,495検体中0.1%)はガラス板法とRPR法の成績が一致していなかった。この他にSTS法不一致例は、FTA-ABS-IgM法判定保留7例中2例、陰性100例中51例に認められた。その内、FTA-ABS-IgM法判定保留2例はTPPA法陽性(FTA-ABS-IgG法陽性1例、判定保留1例)であり、FTA-ABS-IgM法陰性51例にはTPPA法及びFTA-ABS-IgG法両陽性の14例が含まれていた。なお、FTA-ABS-IgM法の判定保留及び陰性計107検体のなかにSTS法陰性かつ

表2-1 FTA-ABS-IgM法陽性血清におけるSTS法(定性法)不一致例

検体番号	検査年	ガラス板法		RPR法		TPPA法		TPHA法	FTA-ABS-IgG法
		定性法	定量法 (抗体価)	定性法	定量法 (抗体価)	定性法	定量法 (抗体価)	定量法 (抗体価)	定性法
No. 12242	2001年	+	128倍	-	128倍	+	20,480倍	81,920倍	+
No. 12750	2002年	-	128倍	+	256倍	+	NT	81,920倍	+

注:NT 実施せず。

表2-2 STS法(定量法)における2倍階段希釈血清における“反応の強さ”

検体番号	検査法	血清希釈倍数									
		×1	×2	×4	×8	×16	×32	×64	×128	×256	×512
No.12242	ガラス板法	1+	1+	2+	4+	4+	3+	3+	1+	-	-
	RPR法	-	-	±	2+	2+	2+	2+	1+	-	-
No.12750	ガラス板法	-	-	-	1+	3+	3+	3+	1+	-	NT
	RPR法	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	-

注:NT 実施せず。

FTA-ABS-IgG 法陽性 10 検体が含まれていたが、衛生研究所が STS 法と TPPA 法とを同時に行っていた 1999 年 4 月から 2003 年 3 月までの期間における STS 陰性 1,346 検体の 0.7% (10/1,346) を占めていた。

2. FTA-ABS-IgM 法陽性血清における STS 法(定性法) 不一致例

表 2-1 に FTA-ABS-IgM 法陽性かつ STS 法(定性法) 不一致を示した 2 検体について、梅毒血清検査結果の詳細を示した。検体 No. 12242 は、定性法ではガラス板法陽性・RPR 法陰性であったが血清を希釈し定量法を行うと 2 法陽性(共に抗体価 128 倍)を呈した。また、TPPA 法抗体価は 20,480 倍(TPHA 法 81,920 倍)と高値であった。一方検体 No. 12750 は、定性法ではガラス板法陰性・RPR 法陽性であったが定量法では 2 法とも陽性(抗体価:各 128 倍、256 倍)を呈した。また TPPA 法抗体価は調べていないが TPHA 法抗体価は 81,920 倍と、検体 No. 12242 と同様に高値であった。

表 2-2 に STS 法(定量法)におけるガラス板法及び RPR 法の 2 倍階段希釈血清の“反応の強さ”を示した。表のとおり、検体 No. 12242 では RPR 法が 8 倍希釈血清から陽性となり、検体 No. 12750 ではガラス板法が 8 倍希釈血清から陽性となった。

考 察

厚生労働省感染症発生動向調査による愛知県の梅毒患者報告数をみると、2004~2007 年 4 年間の総報告数(207 例)は都道府県別全国 2 位(参考:東京都 452 例、大阪府 205 例)を占め、年次別では 2004 年(36 例)、2005 年(46 例)、2006 年(50 例)、2007 年(75 例)と増加²⁾していた。また、愛知県感染症発生動向調査によれば 2008 年報告数も 68 例と多く、Tp 感染者の治療及び感染拡大防止のために愛知県試験検査においてはひきつづき精度の高い抗体検査の必要性が再認識された。

ガラス板法には試薬調製の良否が検出感度に影響することが知られている⁶⁾が、市販試薬には陽性管理血清が添付されていないので愛知県試験検査では管理血清を作製して検査技術の精度管理を行っている。また、本法は抗 CL-Lec 抗体の力価が高い場合は反応が弱くなることも知られている⁶⁾。

一方、RPR 法は、試薬調製が不要で陽性管理血清も添付されており、ガラス板法よりも簡便な検査法である。本法の高い信頼性は広く認められているところである³⁾が、臨床的に確実な梅毒患者での RPR 法陰性例の報告^{3, 7)}や、同一 TPHA 陽性血清を用い製造会社の異なる 5 種類の RPR 法キットの陽性率を比較して差がみられたとの報告もある⁸⁾。

今回抗 Tp-IgM 抗体陽性血清 27 検体の解析で見つかったガラス板法陰性 1 例と RPR 法陰

性 1 例はいずれも、STS 法（定量法）における高い抗体価及び希釈血清の“反応の強さ”の変動から抗 CL-Lec 抗体過剰による地帯現象（zone phenomenon）⁶⁾と判断された。

現在、STS 法（ガラス板法）実施の際毎回衛生研究所の準備した対照血清を用いて県統一的な内部精度管理を実施していること、STS 法不一致例が 1,495 検体中 2 検体(0.1%)と低率であったことを考慮すれば、現行の愛知県試験検査システムにおける抗 Tp-IgM 抗体陽性者見落としリスクは極めて小さいと推測されるが、今後、抗 Tp-IgM 抗体を保有し、かつ地帯現象を呈するほど高力価の抗 CL-Lec 抗体を保有する要治療感染者由来検体を一次検査でふるい落とすことのないよう、梅毒一次検査に定量的 STS 法を加える必要性について検討の余地があると考えます。

文 献

1)厚生労働省健康局結核感染症課長通知、健感発第 1130004 号、性感染症に関する特定感染症予防指針の一部改正について、平成 18 年 11 月 30 日

- 2)国立感染症研究所感染症情報センター：性感染症 2007 年現在、病原微生物検出情報、**29**、239-241、2008
- 3)厚生省監修：微生物検査必携 細菌・真菌検査、第 3 版、H20-H91、(財)日本公衆衛生協会、東京、1987 年
- 4)国立感染症研究所、地方衛生研究所全国協議会：病原体検出マニュアルー梅毒検査マニュアルー<http://www.nih.go.jp/niid/reference/index.html>、677-695、2003 年
- 5)熊本悦明、島田馨他編：性と感染症 (STD)ー性感染症学、242-248、医薬ジャーナル社、大阪・東京、1990 年
- 6)金井正光編著：臨症検査法提要、改訂第 32 版、912-919、金原出版、東京、2005 年
- 7)太田朝子、永山三千代他：RPR 陰性の顕性梅毒、日本性感染症学会誌、**1**、27-27、1990
- 8)山崎 貢、梅田 徹他：市販 RPR circle card test の比較検討、愛知衛所報、**43**、7-10、1993

Disagreement of the results between VDRL and RPR tests in sera containing anti-*Treponema pallidum* (Tp)-IgM antibodies

Mitsugu Yamazaki, Hidemi Aoki, Masakado Matsumoto, Reiji Hiramatsu,
Akito Tohyama, Hiroko Minagawa

The fluorescent Tp antibody absorption (FTA-ABS)-IgM test is to detect Tp-specific IgM antibodies and is a useful serological marker of primary or untreated syphilis. The test was carried out for 134 syphilitic sera screened from 1,495 serum specimens as follows: initial screening was performed by serologic test for syphilis (STS) tests, i.e., Venereal Diseases Research Laboratory (VDRL) test and Rapid plasma reagin card (RPR) test, followed by the secondary screening using Tp hemagglutination (TPHA) test. By FTA-ABS confirmatory tests, anti-Tp-IgM antibodies were detected in 27 out of 134 sera (20%). The STSs (VDRL and RPR tests) results of 27 sera were as follows: 25 sera were positive in both tests, the remaining 2 sera were discordant between the two tests. In these 2 sera, one serum was VDRL test negative and RPR test positive, and the other was VDRL test positive and RPR test negative. Since the negative results turned out positive following dilution over 8 folds in quantitative VDRL or RPR test, these negative results of the STSs were false, and were due to zone phenomenon by the excess antibodies to cardiolipin-lecithin.

In conclusion, we propose addition of quantitative tests to the qualitative tests in STSs to avoid overlooking the carriers of anti-Tp-IgM antibodies.

Key words: serological diagnosis of Syphilis, anti-Tp-IgM antibody, VDRL, RPR, zone phenomenon

調 査 研 究

In vitro enzymatic transformation of paralytic shellfish poisoning toxins in the digestive process, with an emphasis on C1 and C2 as *N*-sulfocarbamoyl toxins

Masanao Okumura, Akiko Hasegawa, Hideaki Tsuzuki, Akito Tohyama

Abstract

We investigated the kinetics of paralytic shellfish-poisoning (PSP) toxins, especially *N*-sulfocarbamoyl toxins of C1 and C2, in the digestive process to assess whether toxicity by enzymatic transformation would occur when using toxin-rich bivalve extracts affected with digestive enzymes *in vitro*. Following treatments with pepsin or trypsin at 37°C for 3 hours, the average toxicities increased about 1.5-times with pepsin and decreased about 0.5-times with trypsin when compared with the pre-treatment, whereas toxicity was elevated by about 2-times by heating at a pH of 1. PSP-toxins analyzed by HPLC revealed that the dominant toxins were *N*-sulfocarbamoyl toxins of C1 and C2 in the pretreated samples, and carbamate toxins of gonyautoxin (GTX) 2 and GTX3 in the samples treated with pepsin. In addition, the ratios of these structural conversions were correlated with the pepsin concentrations. The results of the present study indicate that the elevation in PSP toxicity could result from an enzymatic transformation in the gastric organ from *N*-sulfocarbamoyl toxin to carbamate toxin.

Key Words: Paralytic Shellfish Poisoning, *N*-sulfocarbamoyl toxin, Carbamate toxin, Gonyautoxin, Enzymatic transformation, Mouse-bioassay

Introduction

Paralytic shellfish-poisoning (PSP) occurs commonly following the ingestion of shellfish contaminated with PSP-toxins ¹⁾. Short-necked clams (*Ruditapes philippinarum*) in Mikawa Bay, Aichi Prefecture are an important bivalve fisheries product and are occasionally contaminated by

PSP-toxins contained within the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (*A. tamarense*). The PSP-toxins in this region are dominantly C1 and C2 as *N*-sulfocarbamoyl toxins ^{2) 3)}, which have low lethal potency but are readily transformed to highly potent carbamate toxins by hydrolysis ⁴⁾. We also experimentally demonstrated the elevation of PSP toxicities, which is well known as the proctor enhancement ⁵⁾, in bivalves collected in this region ²⁾. In terms of enzymatic transformation, Harada et al. ⁶⁾ demonstrated in their *in vitro* experiment that gonyautoxin V (GTX5) is readily transformed to saxitoxin (STX) in incubation time-dependent conditions of up to 5 hours under the existence of gastric juice (pH 1.1) at 37°C, but there is no report about the fate of C1 and C2 as *N*-sulfocarbamoyl toxins.

In the present study, we investigated the possibility that the enzymatic transformation of PSP-toxins occurs under the presence of digestive enzymes (pepsin or trypsin). We used extracts of shellfish contaminated by *N*-sulfocarbamoyl toxins to demonstrate quantitative changes in the PSP toxicities as well as the toxin profiles by high-pressure liquid chromatography (HPLC).

Materials and Methods

1. Sample Preparation

Short-necked clams (*Ruditapes philippinarum*), Japanese oysters (*Crassostrea gigas*), and purple Washington clams (*Saxidomus purpurata*) contaminated by PSP-toxins were harvested in 2002 from Mikawa Bay, Aichi Prefecture, and routinely processed and assayed for PSP toxicities using mouse-bioassay according to the standard official method of the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan ⁷⁾. All the extracts were stored at -30°C until analysis.

Five milliliters of each extract was diluted with the same volume of artificial gastric juice at a pH of 2, 0.25% trypsin solution at a pH of 6 (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA), and 0.1 M hydrochloric acid (HCl, Wako Chemical Co. Ltd., Osaka) at a pH of 1 as a control in 15 mL conical tubes (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, USA). The tubes were incubated at 37°C for 3 hours except for hydrochloric acid treatment at 100°C for 5 minutes. For samples treated with artificial gastric juice, sample extracts were mixed with the same volume of gastric juice and diluted stepwise at a common ratio of 2 with 0.01 M HCl (final dilution factor: X2–X16). After the incubation step, all of the extracts were immediately dipped into ice-cold water to prevent further enzymatic activity. Eight milliliters of each extract was kept at 4°C for the mouse assay and the remaining 2 mL of each sample was passed through a column of Sep-Pak C-18 (Millipore Co., Bedford, MA, USA) and filtered with an ultra-filtration kit (C3-LGC, Ultrafree-MC, Millipore) for high-pressure liquid chromatography (HPLC). Likewise, PSP-causative plankton of *A. tamarense* collected from the same region were sonicated (VP-5S, TAITEC Co. Ltd., Saitama) for 5 minutes with 0.1 mol acetic acid before being refined in the same way as that described above for HPLC analysis.

2. Mouse-bioassay

Mouse-bioassay conforming to the official Japanese method ⁷⁾ was performed to estimate PSP

toxicity using male ddY mice weighing 19–21 g (Japan SLC Co. Ltd., Shizuoka).

3. Post-column Derivatization Liquid Chromatography

All of the shellfish extracts refined as described above were applied to HPLC according to the method described by Oshima⁸⁾. Briefly, HPLC was performed using ion-pair chromatography and post-column derivatization analysis. The system comprised a pump (LC10ATVP, Shimadzu Corp., Kyoto) with an extract auto-injector (SIL-10ADVP, Shimadzu), a reversed-phase column (InertsilC8-5, 4.6 x 150 mm, GL Science, Tokyo), a reagent pump (LC10ATVP, Shimadzu), a water bath (Thermominder EX, TAITEC), a fluorescence detector (RF-10AXL, Shimadzu), and a recorder (C-R6A, Shimadzu). Ten microliters of aliquots from each extract were subjected to an analysis for C-toxins, the GTX group, and the STX group. Mobile phases containing 2 mM tetrabutylammonium in acetate buffer at pH 6.0 were used for analysis of the C-toxins; 2 mM sodium 1-heptanesulfonate in 10 mM ammonium phosphate buffer at pH 7.1 was used for the GTX group, and 2 mM sodium 1-heptanesulfonate in 30 mM ammonium phosphate buffer at pH 7.1, acetonitrile (100 + 5) was used for the STX group. The reference solution of GTX1-4 (GTX1, 3.50 μ M; GTX2, 1.00 μ M; GTX3, 0.35 μ M; and GTX4, 1.14 μ M), decarbamoyl (dc) GTX2, 3 (dcGTX2, 0.242 μ M and dcGTX3, 0.074 μ M), C1, 2 (C1, 1.26 μ M and C2, 0.334 μ M) and neoSTX (1.22 μ M) used for HPLC analysis was supplied by the Fisheries Agency of Japan.

Results

1. Characterization of PSP toxins (Experiment 1)

To elucidate the characteristics of PSP-toxins in Mikawa Bay, three kinds of bivalves (short-necked clam, purple Washington clam, and Japanese oyster) and PSP-causative plankton of *A. tamarense* were analyzed by HPLC to determine PSP toxicities via mouse-bioassay. The results are summarized in Table 1. The *N*-sulfocarbamoyl toxin of C1 and C2 was dominant in all shellfish extracts (60.4–91.9 mol% in total of C1 and C2), with exclusively higher contents of these toxins observed in short-necked clams. In contrast to the results for C-toxins, the relative contents of GTX-toxins were 7.5 mol% in short-necked clams, 5.9 mol% in purple Washington clams, and 36.2 mol% in Japanese oysters. Decarbamoyl GTX-toxins occurred in small amounts in short-necked clams (0.6 mol%) and Japanese oysters (1.3 mol%), with relatively higher amounts in purple Washington clams (20.8 mol%). NeoSTX were present in trace amounts in oysters and not detected in other samples. PSP-toxins in the plankton of *A. tamarense* also dominantly consisted of C-toxins (91.8 mol%), with values comparable to or slightly higher than those recorded in the shellfish. PSP toxicities determined from mouse-bioassays were 24.3, 10.4, and 4.3 mouse unit (MU)/g in short-necked clams, purple Washington clams, and Japanese oysters, respectively.

Table 1 Contents of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins analyzed by HPLC (nmol/ml) in three kinds of shellfish and a causative plankton (*Alexandrium tamarense*) harvested from Mikawa Bay

Toxins	Short-necked clam		Purple Washington clam		Japanese oyster		<i>A. tamarense</i>
	μmol/L	(mol%)	μmol/L	(mol%)	μmol/L	(mol%)	(mol%)
C1	11.77	(33.8)	9.09	(44.3)	4.30	(28.1)	(2.5)
C2	20.18	(58.1)	5.95	(29)	4.97	(32.3)	(95.3)
GTX2	0.78	(2.2)	0.71	(3.5)	2.10	(13.7)	(nd ^a)
GTX3	1.12	(3.2)	0.49	(2.4)	3.44	(22.5)	(1.4)
GTX4	0.74	(2.1)	nd	–	nd	–	(nd)
dcGTX2	nd	–	1.95	(9.5)	0.07	(0.5)	(nd)
dcGTX3	0.21	(0.6)	2.32	(11.3)	0.12	(0.8)	(0.8)
neoSTX	nd	–	nd	–	0.32	(2.1)	(nd)
Total	34.80	(100.0)	20.51	(100.0)	15.32	(100.0)	(100.0)

Table 2 Changes in PSP toxicities determined by mouse-bioassay for short-necked clam samples treated with HCl, pepsin (artificial gastric juice), and trypsin. (MU/g)

Sample	pre-	Treatment					
		100°C with HCl at pH 1		37°C with pepsin at pH 2		37°C with trypsin at pH 7	
1	30.8	68.6	(2.2) ^a	42.5	(1.4)	18.9	(0.6)
2	7.0	13.2	(1.9)	10.0	(1.4)	nd ^b	–
3	56.6	104.0	(1.8)	100.0	(1.8)	27.0	(0.5)
4	10.8	20.0	(1.9)	15.5	(1.4)	4.6	(0.4)

a Figures in parentheses indicate the ratio (post/pre treatment) of the PSP-toxicity.

b Not detected.

2. Influence of enzymatic digestion/ acid treatment of PSP (Experiment 2)

To evaluate the enzymatic reaction that affects PSP toxicity, a mouse-bioassay was performed to determine the toxicity of extracts from four samples of short-necked clams processed by the official Japanese method ⁷⁾. Each extract was subjected to further treatment with hydrochloric acid, artificial gastric juice (pepsin), or trypsin to estimate whether enzymatic catalysis occurred. The results are shown in Table 2. The PSP toxicity of each extract is expressed as the original concentration of toxic value (MU/g) determined by the mouse-bioassay. Comparing the PSP-toxicities prior to and following treatment with HCl, pepsin, and trypsin, treatment by HCl and pepsin resulted in elevated toxicities in the ranges 1.8–2.2 and 1.4–1.8, respectively, while treatment with trypsin resulted in a decrease to within the range of not detected–0.6. Treatment with HCl resulted in elevated levels of toxicity that are higher than those resulting from treatment with pepsin.

The obtained data were compared to clarify the relationship between the concentration of gastric juice (pepsin) and the PSP-toxin profiles with respect to *N*-sulfocarbamoyl (C) toxins and carbamoyl (GTX) toxins. In terms of C toxins and GTX toxins in the extracts of short-necked clam as shown in Figure 1, the quantitative change of chromatograms of C toxins, especially C2 was

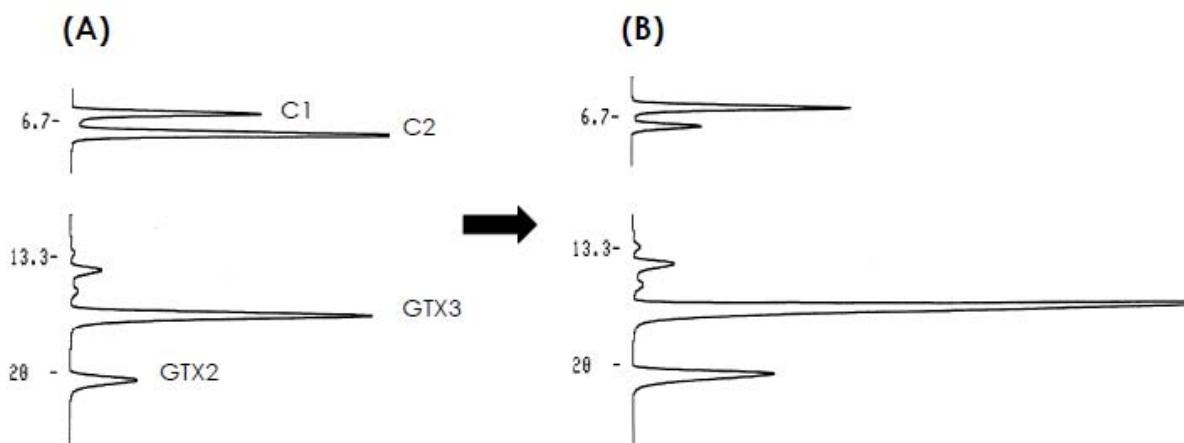


Fig. 1 Chromatograms of the extract of PSP contaminated short-necked clam. Arrow (→) means the treatment with artificial gastric juice. The charts of the left side (A) and the right side (B) show the original extract and the artificial gastric juice (pepsin) treated extract of C toxins (upper half, dilution rate X50) and GTX toxins (under half, dilution rate X10), respectively.

drastically decreased by the artificial gastric juice (pepsin) treatment (Flow from (A) to (B)). On the contrary, the change of chromatograms of GTX toxins, especially GTX 3 increased according to the flow described above. Therefore, these chromatograms demonstrated the structural changes of C1 to GTX2 and C2 to GTX3 clearly transferred by the treatment of the artificial gastric juice (pepsin). Figure 2 shows the ratio of each toxin component being treated with various concentrations of artificial gastric juice (pepsin). The ratios of GTX2 in extracts of short-necked clams gradually increased from 5.0% to 12.2% with increasing pepsin content, whereas this trend was not observed in the original solution (mean of 0 in the relative contents of pepsin). In contrast, the ratios of C1 initially decreased by 27.2%, in line with the pepsin-dose from 18.1% to 6.6%. As with the relation between C1 and GTX2, the ratio of C2 initially valued at 70.0% decreased from 52.5% to 15.2%, whereas GTX3 initially valued at 2.8% increased from 25.6% to 66.0%. Ultimately, all of the transforming rates for catalyzing hydration are dependent on the pepsin content. Comparison of the PSP-toxin profiles among different treatments revealed that the percentiles of C1 + GTX2 and C2 + GTX3 are approximately constant. These data therefore indicate that the hydration from *N*-sulfo-carbamoyl toxins to carbamoyl toxins dominantly proceeds via treatment with artificial gastric juice (pepsin).

Discussion

In the present study, the results for bivalves in Mikawa Bay containing approximately 60–90 mol% of C-toxins, are significantly higher than those for bivalves in other areas in Japan^{9) 10)}. The results presented here are consistent with the results of previous studies in the same area, and the accumulation of C-toxins in bivalves in Mikawa Bay is assumed to relate to the presence of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* enriched in C-toxins (over 90 mol%)^{2) 3)}. Generally, after the accumulation of PSP-toxins originally within plankton, the toxins are partially transformed in the digestive glands of shellfish, resulting in a variety of PSP-toxin profiles among PSP-causative

plankton and PSP-contaminated shellfish ^{4) 5)}. The variation in PSP toxin profiles is attributed to the existence of shellfish-specific enzymes such as carbamoylase I or II ¹²⁾ that provide their own catalytic activity. Asakawa et al.¹⁰⁾ reported that during feeding experiments, the toxin profile of oysters changed substantially, showing marked differences from the proportions found in the toxigenic dinoflagellate used as food. Regarding the transformation of *N*-sulfocarbamoyl toxins in bivalves, the presence of carbamoylase, which catalyzes hydrolysis of the carbamoyl (*N*-sulfocarbamoyl) moiety of PSP, has been recognized in little-necked clams (*Protothaca staminea*) ⁴⁾ and in scallops (*Placopecten magellanicus*) ¹³⁾. In contrast, PSP-toxin compositions in Mikawa Bay are comparatively constant between PSP-causative plankton (*A. tamarensis*) and short-necked clam ^{2) 3)}, although the profile of PSP-toxins in oysters within the same area is different from that of short-necked clams. Details of the enzymatic transformation of PSP-toxins following accumulation in bivalve tissue remain unclear.

The transformation of PSP-toxins from *N*-sulfocarbamoyl to carbamoyl toxins results in an increase in toxicity under mildly acidic hydrolysis conditions ⁴⁾. In the present study, we aimed to determine whether the enzymatic transformation of catalysis occurs in the digestive process *in vitro*. Significant increases in PSP-toxicities were recorded when short-necked clam extracts were incubated with artificial gastric juice for 3 hours at 37 °C and a pH of 2. These increases were slightly less than those resulting from treatment with HCl for 5 minutes at 100°C and a pH of 1. As the chemical function of pepsin is hydration in the digestive process ¹⁴⁾, pepsin in artificial gastric juice is able to stimulate the proctor enhancement at the body's temperature of 37°C. As shown in Figure 1, as the proportions of (C1+GTX2)/(C2+GTX3) were comparably constant, pepsin would mainly catalyze the transformation from C- toxins to GTX- toxins. In fact, pepsin in the artificial gastric juice (1 g/L) acted even at a very low content under suitable conditions of temperature and

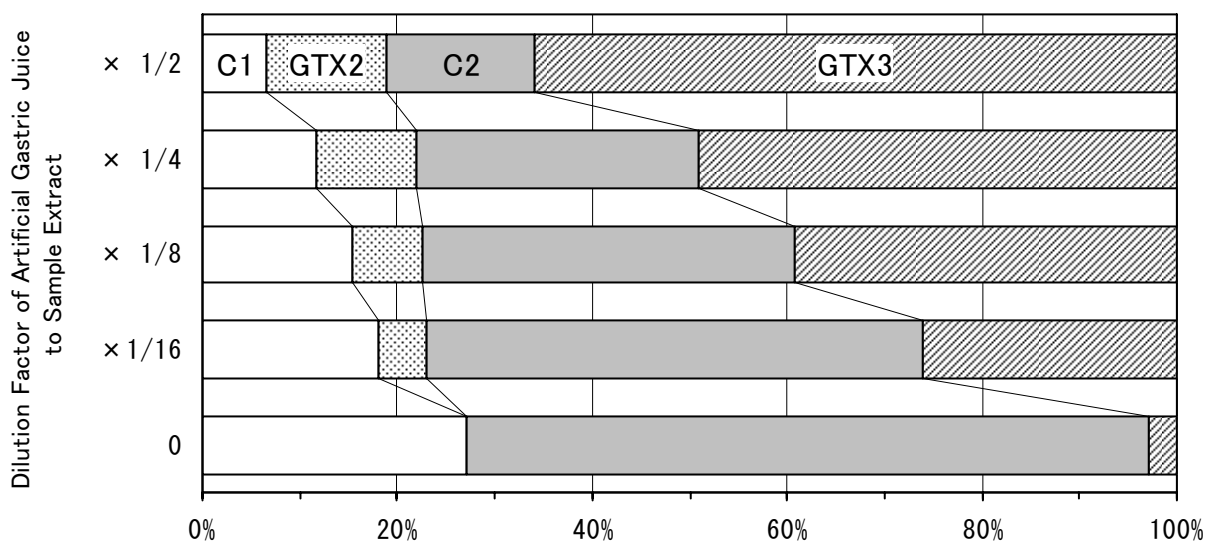


Fig. 2 Changes in average PSP-toxin profiles for short-necked clams (*Ruditapes philippinarum*) with respect to *N*-sulfocarbamoyl toxin (C1, C2) and carbamoyl toxin (GTX2, GTX3) treated with various concentrations of artificial gastric juice for 3 hours at 37°C.

acidity. This fact suggests that an increase in PSP toxicity in the gastric organ might pose a severe threat to health. As PSP-toxins are readily absorbed through the gastrointestinal mucosa, the average rate of onset varies from about 30 minutes to several hours, and there is no specific antidote for PSP¹⁾. Thus far, the current official method estimates a value of PSP toxicity that reflects the original toxin profile, but not the content of each of the PSP toxins in the sample extract. This fact suggests that we must be cautious for several hours after the ingestion of PSP-suspicious food. Within the intestinal organ, however, PSP-causative toxins are approximately degraded as half as the pretreated toxic-values by trypsin, as shown in the present experiments. As there is little knowledge of the metabolism of PSP-toxins in mammals^{15) 16) 17)}, the results obtained in the present study suggest that C-toxins contained in shellfish are easily converted to GTX-toxins in the presence of a hydration-accelerating agent. Therefore, the enzymatic transformation of PSP- toxins *in vivo* requires further investigation.

Acknowledgements

We acknowledge the staff of the Aichi Fisheries Research Center for supplying shellfish samples. Reference solutions for HPLC analysis were supplied by the Fishery Agent of Japan.

Reference

- 1)Kao, C. Y. Paralytic Shellfish Poisoning. In: Falconer, I. R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 75-86, 1993.
- 2)Okumura, M., Yamada, S. et al. Characteristics of paralytic shellfish poisoning toxins derived from short-necked clams (*Tapes japonica*) in Mikawa bay, *Natural toxins*, 2, 141-143, 1994.
- 3)Hayashi, R., Saito, H. et al. Cell bioassay for paralytic shellfish poisoning (PSP) comparison with postcolumn derivatization liquid chromatographic analysis and application to the monitoring of PSP in shellfish, *J. Agri. Food Chem*, 54(2), 269-273, 2005.
- 4)Sullivan, J. J., Iwaoka, W. T. et al. Enzymatic transformation of PSP-toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*), *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 114, 465-472, 1983.
- 5)Hall, S. and Reichardt, P. B. Cryptic Paralytic Shellfish Toxins. In: Ragelis, E. (Ed.), *Seafood Toxins ACS Symposium Series*, American Chemical Society, Washington DC, pp. 113-123, 1984.
- 6)Harada, T., Ohshima, Y. et al. Assessment of potential activation of gonyautoxin V in the stomach of mice and rats, *Toxicon*, 22, 476-478, 1984.
- 7)Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare of Japan *Official Analytical Methods for Paralytic Shellfish Poisoning*, Tokyo, Japan (in Japanese), 1980.
- 8)Oshima, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins, *J. AOAC Int.*, 78(2), 528-532, 1995.
- 9)Murakami, R., Yamamoto, K. et al. Difference in PSP composition among various parts of surf clam, *J. Food Hyg. Soc.*

- Jpn., 40(1), 55-61, 1999.
- 10) Asakawa, M., Takayama, H. et al. Occurrence of paralytic shellfish poison (PSP)-producing dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan, during 1993-2004 and its PSP profiles, J. Food Hyg., Soc. Jpn., 46(6), 246-250, 2005.
 - 11) Lu, Y. H. and Hwang, D. F. Effects of toxic dinoflagellates and toxin biotransformation in bivalves, Natural Toxins, 11(4), 315-322, 2002.
 - 12) Lin, H. P., Cho, Y. Purification and characterization of paralytic shellfish toxin transforming enzyme from *Macrta chinensis*, Toxicon, 44, 657-668, 2004.
 - 13) Shimizu, Y. and Yoshida M. Transformation of paralytic shellfish poisoning as demonstrated in scallop homogenates, Science, 212, 547-549 1981.
 - 14) Ganong, W. F. (Ed.) Review of Medical Physiology 4th Ed., Lange Medical Publications, Los Altos, CA, USA, pp. 347-351, 1969.
 - 15) Gessner, B. D., Bell, P. et al. Hypertension and identification of of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks, Toxicon, 35(5), 711-722, 1997.
 - 16) Hong, H., Lam, P. K. S. et al. Interactions of paralytic shellfish toxins with xenobiotic-metabolizing and antioxidant enzymes in rodents, Toxicon, 42, 425-431, 2003.
 - 17) García, C., Lagos, M. et al. Human intoxication with paralytic shellfish toxins: Clinical parameters and toxin analysis in plasma and urine, Biol. Res., 38, 197-205, 2005.

麻痺性貝毒成分 C1 及び C2 の消化過程における

酵素変換に関する実験的検証

奥村正直 長谷川晶子 都築秀明 遠山明人

愛知県三河湾の二枚貝（とりわけアサリ）に発生する麻痺性貝毒の特徴は、弱毒成分である *N*-sulfocarbamoyl toxin に分類される C1 及び C2 を主成分とすることである。一方、麻痺性貝毒のうち *N*-sulfocarbamoyl toxin は加熱処理などによる加水分解により、強毒成分である Carbamate toxin のうち gonyautoxin に変換される事実が報告されている。そこで、麻痺性貝毒の動態を研究するために、弱毒成分である C1 及び C2 について、これらの成分を多量に含む 2 枚貝の抽出液を用いて、ヒトの消化過程で強毒化が起こるか否かについて実験的な検証を試みた。麻痺性貝毒の抽出液に対して、ペプシンあるいはトリプシンを添加し 37°C で 3 時間加熱処理すると、処理前の毒力と比較した場合、ペプシン処理では約 1.5 倍増強したが、トリプシン処理ではほぼ半減した。一方、pH 1 の強酸加熱では約 2 倍の増強であった。HPLC 分析による主な毒成分は、酵素処理前の抽出液においては弱毒成分の C1 及び C2 であったが、ペプシン処理後では強毒成分の gonyautoxin (GTX)2 及び GTX3 であった。加えて、C 群から GTX 群への変換の割合は、ペプシンの濃度に依存していた。本研究で、麻痺性貝毒の毒力の増強には、ヒトの胃酸に含まれる酵素が強毒化に関与する可能性が示された。

キーワード：麻痺性貝毒、*N*-sulfocarbamoyl toxin、Carbamate toxin、Gonyautoxin、酵素変換、マウス試験法

調 査 研 究

ICP-MS による農産物中微量元素の一斉分析法の検討

大島晴美 梶島由佳 棚橋高志 上野英二 大野 勉

要 旨

誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) による一斉分析法を農産物中の微量元素分析に応用し、標準試料を用いて酸分解法、スペクトル干渉、定量法などについて検討した。試料を硝酸および過酸化水素水を用いて分解後、外部検量線法による定量法において、17 元素 (V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Rb、Sr、Cd、Cs、Ba、Tl、Pb、U) の回収率 (71 ~ 117%) および変動係数 (0.3 ~ 14%) はともに良好であった。C および Cl から生成するスペクトル干渉は、測定溶液中濃度を測定し、適宜希釈することにより低減化できた。本法は、農産物中微量元素の一斉分析法として有用であると考えられた。

キーワード：農産物、微量元素、ICP-MS、一斉分析

はじめに

我国では、ヒ酸鉛をはじめとするヒ素化合物が殺虫剤や殺菌剤として野菜、果実などに使用されてきた (Table 1)。

Table 1. 日本におけるヒ素含有農薬の使用期間

農薬名 (登録名)	日本農薬登録 取得年 - 失効年
ヒ酸鉛	1948 - 1978
ヒ酸石灰	1948 - 1976
ヒ酸鉄	1949 - 1952
Urbazid (ウルバジッド)	1957 - 1978
MAS (アソジン)	1959 - 1974
MALS (モン)	1961 - 1976
DTAS (モンガレ)	1963 - 1975
メチルアルソン酸ガドミウム	1964 - 1968

食品衛生法¹⁾には 11 品目の野菜及び果実について、鉛 (Pb : 1.0 ~ 5.0 μ g/g) およびヒ素 (As : 1.0 ~ 3.5 μ g/g) として農薬残留

基準が設定され、分析法はジチゾン法およびグトツァイト法が採用されている (以下公定法)。公定法は、多くの試薬類を必要とし、操作が煩雑で熟練を要するので、より簡便かつ精度の良い原子吸光光度法を用いた元素ごとの個別分析が行われている²⁾。

我々は、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) を用いた一斉分析を玄米および魚介類 (8 元素)³⁾、清涼飲料水 (4 元素)⁴⁾、ろ過助剤 (28 元素)⁵⁾ に応用し、その有用性を報告してきた。最近 ICP-MS による食品中微量元素の一斉分析法が標準的な分析法として認められるようになり^{6)、7)}、我国においても寒天中のホウ素の通知分析法として ICP 法が採用された^{8)、9)}。

今回、農産物中の微量元素分析に ICP-MS

を用い、できるだけ多くの元素の分析を目指して一斉分析法の検討を行った。微量元素の分析では、試料の酸分解が最も重要であり、公定法では硝酸と硫酸による分解法が用いられている。有機物を完全に分解する方法として知られているが、ICP-MSを用いた分析では報告が少なく、硫酸使用の影響については不明である。そこで、酸の種類を変えて試験溶液の調製を行い、測定におけるスペクトル干渉、定量法などについて検討を行った。その結果、硝酸と過酸化水素水により分解後、希釈のみで Pb、Asをはじめ 17 元素の一斉分析が可能であり、スクリーニング法としての有用性が認められたので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬等

標準試料はポーランド核化学技術研究所製 Tea Leaves (INCT-TL-1) および米国標準局製 Spinach Leaves (NIST SRM 1570a) を用いた。標準液は SPEX 社製 XSTC-331 および CL-INT-A2 (干渉チェック用) の混合標準液を用いた。検量線用標準液は、用時 0.1 mol/L 硝酸で希釈調製した (0, 0.1~100 ng/mL)。内部標準液は、SPEX 社製 1000 μ g/mL ロジウム (Rh) およびホルミウム (Ho) を用い、測定時の試験溶液中の濃度が 10 ng/mL となるように添加した。硝酸は関東化学製の電子工業用 (EL) および微量分析用、過酸化水素水は和光純薬製 30% 溶液、硫酸およびフッ化水素酸 (40%) はメルク社製微量分析用、水は超純水を用いた。分解容器は、ガラス製平底ソックスレーフラスコおよび分解キャップ¹⁰⁾、フッ化水素酸を用いる分解では、テフロン製ビーカーおよび時計皿を用いた。加熱器具はホットプレートを用いた。

2. 装置および測定条件

Table 2. Typical ICP-MS operating conditions

Instrument	Agilent 7500 i
Sample introduction	
Nebulizer	Babinton type
Plasma	
Rf generator	Frequency: 27MHz power outlet: 1500W
Ar flow rate, L/min	Plasma: 15, auxiliary: 1, carrier: 1.17
Solution uptake rate	0.4mL/min
Sampling depth	6 mm
Interface	
Sampling cone	Nickel, T-mode
Skimmer cone	Nickel, T-mode
Data acquisition	Dwell time 0.33 sec, points/mass 3, No. of replicates 3
Internal standard (m/z)	Rh (103), Ho (165)
Analytical isotopes of elements (m/z)	Ti (47, 49), V (51), Cr (52, 53), Mn (55), Fe (56, 57), Co (59), Ni (60), Cu (63), Zn (66), Ge (72), As (75), Se (77, 78, 82), Rb (85), Sr (88), Cd (111, 113), Sb (121), Ba (137), Pb (206, 207, 208), U (238)
Monitored isotopes for appropriate correction of interferences (m/z)	Na (23), Mg (24), Al (27), P (31), S (34), K (39), Ca (43), Mo (95), C (13), Cl (37)

ICP-MS: 四重極型 ICP-MS (Agilent 7500 i 環境仕様) を用い、直接導入法により測定した。定量は内部標準法により、外部検量線法を用いた。マトリックスの影響の検討には標準添加法を用いた。測定条件を Table 2 に示した。なお、検出限界を測定溶液中濃度で 0.1 ng/mL とした。

3. 試験溶液の調製

硝酸のみによる分解 (A 法): 試料 (5.0 g、標準試料 1.0 g) を分解容器にとり、硝酸 5 mL を加え、ホットプレート上 (100~130°C) で加熱して水分を蒸発させた後、分解キャップを装着して温度を 180°C まで徐々に上げ、適宜硝酸を追加して分解した後、0.1 mol/L 硝酸で一定容 (50 mL) とした。

硝酸と過酸化水素水による分解 (B 法): A 法と同様に操作し、分解キャップを装着した後、過酸化水素水を 1 mL 加え、A 法と同様に操作した。

硝酸と硫酸による分解（C法）：A法と同様に操作し、分解キャップを装着した後、硫酸を0.5 mL加え、温度を300°Cまで徐々に上げ、適宜硝酸を追加して分解した。硫酸の白煙が生じたら、30分間以上加熱した後、加熱を終了し、0.1 mol/L硝酸で一定容（50 mL）とした。

硝酸とフッ化水素酸による分解（D法）：試料（5.0 g、標準試料1.0 g）をテフロン製ビーカーにとり、硝酸5 mLとフッ化水素酸を1 mL加え、テフロン製時計皿でカバーし、ホットプレート上（100~130°C）で加熱分解後時計皿をはずし、温度を180°Cまで上げてフッ化水素酸を蒸発させた後、0.1 mol/L硝酸で一定容（50 mL）とした。

測定時に各分解溶液を0.1 mol/L硝酸で希釈し、試験溶液とした（最終100倍~1000倍希釈）。

結果および考察

1. 分解方式の選択

公定法に定められたPbの分解法は乾式であり、電気炉を用いて高温加熱（500~550°C）し、灰化する。元素の揮散損失を防ぐために飽和硝酸マグネシウム溶液を灰化補助液として用いる。AsはPbよりも揮散しやすいので、加熱温度の調節が可能な湿式分解法が採用されている。これらの方法では高濃度の試薬や酸を多量に使用し、分解に長時間を要するので、それらによる元素汚染の恐れがある。最近では、前処理操作中の汚染や元素の損失を低減化できる密封式のマイクロウェーブ分解法（MW法）が用いられている。しかし、分解容器の容量が小さいため、試料の採取量を少量化（0.3~1 g）できる分析に限られており、農産物の分析ではサンプリング誤差を招く恐れがある。今回は湿式分解法を用い、

酸の種類や使用量などについて検討を行うこととした。

2. 酸化剤の選択

ICP-MSによる測定には、妨害の少ない硝酸溶液での測定が適しており、分解に硝酸を用いる報告が多い^{3), 6)~9)}。しかし、有機物の分解が不十分である場合に、未分解物由来の多原子イオンが測定目的元素の質量と重なり（スペクトル干渉）、誤差を生じることがある。それを改善するために硝酸と強酸化剤を併用した分解法があり、フッ化水素酸^{5), 11)~13), 15)}や過酸化水素水¹⁴⁾など、特に植物性試料の分解にはフッ化水素酸が適していると報告¹⁵⁾されている。また、公定法²⁾では硝酸と硫酸で分解し、必要に応じて過塩素酸が用いられている。今回は、A法：硝酸のみ、B法：硝酸と過酸化水素水、C法：硝酸と硫酸、D法：硝酸とフッ化水素酸の4法を比較することとした。

3. スペクトル干渉

ICP-MSによる測定では、使用した酸および試薬類はすべて試験溶液中に残存するので、それらから生成する多原子イオンのスペクトル干渉に注意が必要である（Table 3）。

4法の空試験溶液（100倍希釈）を比較したところ、A法、B法およびD法ではス

Table 3. Spectral interferences arising from major constituents of food matrices

m/z	Element	S	C	Cl
49	Ti	³³ S ¹⁶ O		
51	V			³⁵ Cl ¹⁶ O
52	Cr		⁴⁰ Ar ¹² C	³⁵ Cl ¹⁶ O ¹ H
53	Cr		⁴⁰ Ar ¹³ C	³⁷ Cl ¹⁶ O
72	Ge	⁴⁰ Ar ³² S		
75	As			⁴⁰ Ar ³⁵ Cl
55	Mn			³⁷ Cl ¹⁸ O
66	Zn	³⁴ S ¹⁶ O ₂		
82	Se	³⁴ S ¹⁶ O ₃	¹² C ³⁵ Cl ₂	

Table 4. Analytical results of Tea Leaves (INCT-TL-1, *reference value)

Element	Recovery (%) and CV %				Certified Values mg/kg
	Method A	Method B	Method C	Method D	
Ti	38.2 (9.5)	59.6 (7.3)	266 (5.7)	278 (3.9)	30*
V	72.2 (1.0)	82.3 (3.8)	77.9 (3.7)	95.1 (1.6)	1.97 ± 0.37
Cr	96.4 (4.5)	98.0 (3.8)	71.5 (6.4)	102 (13)	1.91 ± 0.22
Mn	91.7 (2.0)	95.5 (1.0)	81.0 (0.9)	93.6 (4.4)	0.157 ± 0.011
Fe	94.2 (2.0)	104 (3.2)	94.3 (2.4)	106 (2.5)	432*
Co	82.5 (6.5)	84.6 (0.8)	71.4 (3.3)	86.9 (3.7)	0.387 ± 0.042
Ni	90.8 (1.4)	93.6 (1.6)	74.8 (2.6)	85.6 (5.2)	6.12 ± 0.52
Cu	98.6 (3.9)	105 (5.2)	81.0 (3.7)	94.8 (6.1)	20.4 ± 1.5
Zn	89.3 (0.3)	91.8 (0.5)	81.7 (0.8)	91.6 (3.5)	34.7 ± 2.7
As	112 (14)	117 (7.5)	72.0 (15)	104 (8.8)	0.106 ± 0.021
Rb	93.6 (2.4)	97.0 (1.3)	84.6 (0.7)	93.4 (3.4)	81.5 ± 6.5
Sr	98.4 (2.5)	102 (0.9)	85.1 (0.6)	96.9 (3.5)	20.8 ± 1.7
Cd	80.1 (1.5)	88.1 (7.0)	85.9 (6.8)	82.3 (6.9)	0.03 ± 0.004
Sb	32.0 (4.0)	63.6 (5.2)	94.5 (15)	75.4 (7.7)	0.050*
Cs	98.6 (0.8)	101 (1.0)	91.9 (1.0)	97.7 (3.0)	3.61 ± 0.37
Ba	98.5 (0.8)	102 (4.5)	5.2 (3.7)	99.6 (2.7)	43.2 ± 3.9
Tl	86.4 (0.1)	83.0 (2.0)	88.2 (0.6)	- -	0.063 ± 0.005
Pb	74.2 (10)	71.9 (14)	8.1 (28)	67.2 (7.0)	1.78 ± 0.24

Each value represents average of recovery (%) and CV% of 5 determinations.

Method A: digestion with nitric acid.

Method C: digestion with nitric acid and sulfuric acid.

Method B: digestion with nitric acid and hydrogen peroxide soln.

Method D: digestion with nitric acid and hydrofluoric acid.

ペクトル干渉は見られなかった。C法において硫酸が残存しており、その濃度はイオウ(S)として0.1%程度であった。S由来と推定される影響がチタン(Ti:約90 ng/mL)およびゲルマニウム(Ge:約1 ng/mL)に見られた。これらの影響は、空試験値を差引くことで補正が可能であるが、正確な分析は困難であると考えられた。

炭素(C)および塩素(Cl)のスペクトル干渉が出現する濃度について干渉チェック標準液を用いて検討したところ、測定溶液中のCが200 μg/mL、Clが1000 μg/mL以上で影響が現れやすいことがわかった。試料の測定でこれらの濃度を超える場合は、希釈して測定することとした。今回用いた標準試料の測定溶液中のCおよびCl濃度は、A法、D法>B法>C法の順に低くなっており、強い酸化剤を用いる方法ほど有機物が分解されていた。特にC法ではA法の20~30%と低く、これらの多原子イオンの影響を受けやすい¹⁶⁾とされるバナ

ジウム(V)やクロム(Cr)の分析に適していると考えられた。

4. 4法による標準試料 Tea Leaves の分析値

標準試料 Tea Leaves を用いて、4法で繰返し分析(n=5)を行い、保証値(参考値を含む)の示されている18元素について、平均回収率(内部標準Ho)と変動係数(%)をTable 4にまとめた。

Ti、アンチモン(Sb)、バリウム(Ba)およびPb以外の14元素では、4法の回収率は71~117%であり、変動係数はAsが一部14~15%とやや高かったが、その他は10%以下であった。A法、B法およびD法の3法では、B法がほとんどの元素において他法より回収率が高かった。一方、C法の回収率は多くの元素において他法より10%程度低い傾向が見られた。特に、Baが5.2%、Pbが8.1%と回収率は極めて低かった。その原因として、標準試料 Tea Leaves はBa濃度が43.2 μg/gと比較的高く、分

Table 5. Analytical results of Spinach Leaves (NIST SRM 1570a, * reference value)

Element	Recovery (%) and CV%					Certified Values mg/kg
	Standard Addition	External Calibration				
	Method C (n=1)	matrix matching	nitric acid solution			
		Method C	Method C	Method A	Method B	
V	91.8	100 (1.0)	82.2 (1.0)	91.7 (2.9)	98.6 (1.2)	0.57 ± 0.03
Mn	92.0	96.3 (1.0)	83.8 (1.0)	95.7 (1.9)	101 (1.2)	75.9 ± 1.9
Co	85.1	89.6 (2.4)	74.9 (2.4)	90.7 (0.6)	95.8 (1.0)	0.39 ± 0.05
Ni	97.4	96.3 (3.7)	76.7 (3.7)	89.9 (2.8)	94.4 (0.3)	2.14 ± 0.10
Cu	98.1	101 (2.0)	80.2 (2.0)	96.2 (1.9)	102 (1.6)	12.2 ± 0.6
Zn	80.4	92.1 (0.8)	77.4 (0.8)	88.2 (1.9)	93.5 (0.9)	82 ± 3
As	99.0	93.9 (4.6)	88.4 (4.6)	97.1 (5.4)	102 (1.6)	0.068 ± 0.012
Rb	96.2	98.9 (0.7)	86.9 (0.7)	93.2 (2.0)	101 (1.9)	12.7 ± 1.6
Sr	86.4	91.4 (0.5)	82.4 (0.5)	91.7 (1.7)	96.2 (1.2)	55.6 ± 0.8
Cd	94.2	91.4 (0.6)	84.5 (0.6)	90.9 (1.2)	95.2 (0.8)	2.89 ± 0.07
Pb	75.8	72.7 (6.3)	68.0 (6.3)	77.3 (0.6)	73.0 (3.9)	0.2*
U	93.0	97.8 (0.7)	90.4 (0.7)	80.2 (0.7)	83.6 (0.8)	0.155 ± 0.023

Each value represents average of recovery (%) and CV% of 5 determinations.

解操作中に難溶性の硫酸バリウムが形成されて沈殿し、Pb もその影響をうけ共沈したためではないかと推察された。(なお、後で述べる標準試料 Spinach Leaves では、Ba は 6.0 $\mu\text{g/g}$ であり、Pb の回収率の低下は見られなかった。)

Sb では、A 法 < B 法 < D 法 < C 法と回収率が高くなり、強い酸化剤を併用した C 法による分解が適していると考えられた。Ti についても Sb と同様の傾向が見られ、C 法と D 法の分析値はほぼ一致したが、参考値と比較して高値であった。その理由は不明であり、分析値の信頼性は認められなかった。

D 法ではフッ化水素酸が植物中のケイ酸塩類 (V、Cr、コバルト (Co)、ニッケル (Ni) など) の分解に有効であると報告¹⁵⁾されているが、得られた分析値は、V が 95.1% で他法より優れていたが、その他の元素は他法と大きく変わらなかった。

5. 操作性の比較

A 法および B 法は操作が簡便であった。C 法は公定法において用いられてきた方法であり、有機物をほとんど分解できるが、高温での加熱操作が必要であった。D 法はフッ化水素酸の腐食性が強いいためガラス

器具が使用できず、毒性も高いことから使用には充分注意を払う必要があった。したがって、D 法はケイ酸塩類を多量に含む試料の分解に適しており、農産物の日常分析には適さないと判断した。

6. 硫酸の影響

C 法の回収率が全体的に低い理由として、試験溶液が導入されるときに噴霧過程での物理的な影響が考えられた。また、ICP 発光分析では、硫酸濃度が 1% 以上の場合にネブライザーの吸引力が低下し、噴霧量が減少することが報告されている¹⁷⁾。そこで、C 法で標準試料 Spinach Leaves の試験溶液を調製 (n=5) し、外部検量線法と標準添加法による定量法を比較し、硫酸の影響を調べた。また、A 法および B 法も比較のため同様に実施した。結果をまとめ、保証値 (参考値を含む) の示されている 12 元素について、回収率 (内部標準 Ho) と変動係数 (%) を Table 5 に示した。

最初に、通常硝酸溶液で調製した検量線用標準液による外部検量線法と標準添加法 (n=1) を比較した。標準添加法でマトリックスの影響が補正された検量線による定量ができ、C 法ではすべての元素で

分析値が高くなり、回収率が大きく改善された。A法およびB法では標準添加法による回収率の大きな変化はなく、マトリックスの影響はなかった。

続いて、検量線用標準液の硫酸濃度をC法の空試験溶液と一致させた外部検量線法により測定したところ、分析値は標準添加法で得られた値と同様の結果であった。したがって、C法の回収率の低値は主に硫酸による影響と考えられ、正確な値を求めるには硫酸濃度を一致させた検量線を用いる外部検量線法が簡便であり、一斉分析に適していると考えられた。

このようにして得られたC法の分析値は、A法およびB法による分析値と大きな違いはみられなくなった。ただし、C法では、調製直後と2～3日後の測定値ではPbの値が低くなる傾向が見られ、できるだけ速やかに分析することが必要であった。

まとめ

ICP-MSによる農産物中の多元素一斉分析を目的として酸分解法、スペクトル干渉、定量法について検討を行った。2種類の標準試料の分析結果から信頼性が認められた元素は以下のとおりである。

1) 硝酸のみ(A法)および硝酸と過酸化水素水による分解(B法)では、外部検量線法による定量で、17元素(V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Rb、Sr、Cd、Cs、Ba、Tl、Pb、U)の一斉分析が可能であった。A法よりB法において、有機物がよく分解され、回収率は高い傾向であった。

2) 硝酸と硫酸による分解(C法)では、硫酸濃度を一致させた外部検量線による定量で、16元素(V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Rb、Sr、Cd、Sb、Cs、Tl、U)の一斉分析が可能であった。BaとPbは難溶解性の硫酸塩形成の恐れがあった。

以上の結果に加え、操作性およびスペクトル干渉を考慮すると、B法で分解後、外部検量線法により定量する方法が一斉分析に適していると考えられた。

本論文の概要は、第44回全国衛生化学技術協議会年会(2007年11月)において発表した。

文献

- 1) 昭和34年12月28日厚生省告示第370号、食品、添加物の規格基準。
- 2) 社団法人日本食品衛生協会、厚生労働省監修、食品衛生検査指針理化学編、pp. 416-428、2005。
- 3) 大島晴美、上野英二、斎藤 勲、松本浩：玄米および魚介類中カドミウム、鉛、水銀、セレン、マンガン、銅および亜鉛の分析における誘導結合プラズマ質量分析法と原子吸光光度法の比較、食衛誌、45：270-276、2004。
- 4) 大島晴美、椛島由佳、上野英二、松本浩：清涼飲料水中のヒ素、鉛、カドミウムおよびスズのICP-MSによる一斉分析について、愛知衛所報、56：25-30、2006。
- 5) 大島晴美、椛島由佳、上野英二、大野 勉、岡 尚男、伊藤誉志男、中澤裕之：誘導結合プラズマ質量分析法による既存添加物・不溶性鉱物性物質の元素分析、日本食品化学学会誌、14：113-120、2007。
- 6) Julshamn K, Maage A M, Norli H S, Grobecker K H, Jorhem L, Fecher P: Determination of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead by Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry in Foods after Pressure Digestion: NMKL Interlaboratory Study, J. AOAC Int. 90: 844-856, 2007.
- 7) Noel L, Dufailly V, Lemahieu N, Vastel C, Guerin T: Simultaneous Analysis of

- Cadmium, Lead, Mercury, and Arsenic Content in Foodstuffs of Animal Origin by Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry after Closed Vessel Microwave Digestion: Method Validation, J. AOAC Int. 88: 1811-1821, 2005.
- 8) 平成 20 年 10 月 21 日食安発第 1021001 号、寒天のホウ酸の試験法.
- 9) 長岡(浜野)恵、松田りえ子、米谷民雄：寒天中ホウ酸の ICP-AES および ICP-MS による試験法の開発とその評価、食衛誌、49：333-338、2008.
- 10) Saito I, Kawamura N, Arakawa S, Oshima H, Uno K: Rapid and simple determination of heavy metals in foods - application of wet digestion and iodide-MIBK extraction. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 24: 295-300, 1983.
- 11) Hokura A, Oguri S, Matsuura H, Haraguchi, H: Multielement determination of major-to-ultratrace elements in vegetable samples by ICP-MS and ICP-AES after acid digestion. BUNSEKI KAGAKU, 49: 687-396 , 2000.
- 12) Matsuura H, Hokura A, Haraguchi H: Multielement determination and speciation of major-to-ultratrace elements in green tea leaves by ICP-MS and ICP-AES. BUNSEKI KAGAKU, 49: 397-404, 2000.
- 13) Feng X B, Wu S, Wharmby A, Wittmeier A: Microwave digestion of plant and grain standard materials in nitric and hydrofluoric acids for multielemental determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom., 14: 939-946, 1999.
- 14) Cubadda F, Raggi A, Testoni A, Zanasi F: Multielemental analysis of food and agricultural matrixes by inductively coupled plasma-mass spectrometry. J. AOAC Int., 85: 113-121, 2002.
- 15) Cubadda F: Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry for the Determination of Elements and Elemental Species in Food: A Review, J. AOAC Int. 87: 173-204, 2004.
- 16) Haraguchi H, Teramae N, Furut N, Saruwatari H: "Biryogenso bunseki no jissai (Modern methods for trace element determination)", Tokyo, Maruzen, pp. 183-193, 1995, (ISBN 4-621-04082-0).
- 17) ICP 発光分析の基礎と応用、p. 117、講談社、Haraguchi H、東京、1988.

Application of Simultaneous Analysis by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP–MS) to Trace Elements in Agricultural Products

Harumi Oshima, Yuka Kabashima, Takashi Tanahashi, Eiji Ueno and Tsutomu Ohno

The suitability of ICP-MS for multielemental analysis of agricultural products following open acid digestion of samples was evaluated. Test solution was prepared by open digestion with nitric acid and hydrogen peroxide solution, 17 trace elements (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Cd, Cs, Ba, Tl, Pb, U) were determined in 2 reference materials (INCT-TL-1 Tea Leaves and NIST SRM Spinach Leaves) using method of external calibration. Spectral interferences caused by C and Cl content of digestates were quantitated and corrected by dilution. The recoveries (71-117%) and repeatability (0.3-14%) of the reference materials for each element were satisfactory. Therefore, it was considered that this method is acceptable for the simultaneous analysis of trace elements in agricultural products.

Key words: agricultural products, trace elements, ICP-MS, simultaneous analysis

 他誌掲載論文抄録

愛知県における平均寿命 —現状と将来予測—

広瀬かおる、櫻井博貴、増井恒夫¹

¹精神保健福祉センター

現代医学, 56(1): 189-195, 2008.

生命表は、一定期間におけるある人口集団について死亡状況を、死亡率、生存数、定常人口、平均余命などによって表現したものであり、0歳の平均余命である「平均寿命」は、その人口集団の保健福祉水準を示す重要な総合的指標として活用されている。平成14年～18年の平均寿命の全国値は男78.80年、女85.65年、愛

知県はそれぞれ79.22年、85.52年であった。国立社会保障・人口問題研究所が行った平均寿命の将来予測によると平成42(2030)年～47(2035)年における全国の推計平均寿命は男82.09年、女88.86年、愛知県のそれは82.23年、88.54年と予測されている。

Effect of soybean on breast cancer according to receptor status: a case-control study in Japan

Takeshi Suzuki¹, Keitaro Matsuo², Nobuyuki Tsunoda², Kaoru Hirose, Akira Hiraki¹, Takakazu Kawase¹, Toshinari Yamashita², Hiroji Iwata², Hideo Tanaka¹, Kazuo Tajima¹

¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

²Department of Breast Oncology, Aichi Cancer Center Central Hospital

Int J Cancer, 123(7):1674-1680, 2008.

The possible association of high soy food consumption with low incidence of breast cancer in Asian countries has been widely investigated, but findings from epidemiologic studies have been inconsistent. Breast cancers defined by receptor status, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) may have distinct etiologic factors. Here, we conducted a case-control study to clarify associations

between intake of soybean products and breast cancer risk according to receptor status. A total of 678 breast cancer cases and 3,390 age- and menopausal status-matched noncancer controls were included. Odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were estimated using conditional logistic models adjusted for potential confounders. On analysis according to receptor status, we observed a significantly reduced risk of ER-positive

(ER+) (top tertile OR = 0.74; 95%CI, 0.58-0.94; trend p=0.01) and HER2-negative (HER2-) tumors (top tertile OR=0.78; 95%CI, 0.61-0.99; trend p=0.04). Further, when the 3 receptors were jointly examined, a reduced risk was observed only in patients

with ER+/PR+/HER2- tumor (top tertile OR 0.73; 95%CI, 0.54-0.97; trend p=0.03).

These findings indicate that the protective effect of soy against breast cancer risk differs by receptor status.

Reduced risk of endometrial cancer from alcohol drinking in Japan

Satoyo Hosono¹, Keitaro Matsuo², Hiroaki Kajiyama¹, Kaoru Hirose, Takeshi Suzuki², Akira Hiraki², Takakazu Kawase², Kumiko Kidokoro¹, Toru Nakanishi³, Nobuyuki Hamajima⁴, Fumitaka Kikkawa¹, Kazuo Tajima², Hideo Tanaka²

¹Department of Gynecology and Obstetrics, Nagoya University Graduate School of Medicine

²Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

³Department of Gynecologic Oncology, Aichi Cancer Center Central Hospital

⁴Department of Preventive Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine

Cancer Sci, 99:1195-1201, 2008.

The role of alcohol consumption in the etiology of endometrial cancer has not been clarified. To examine the association between alcohol consumption and endometrial cancer risk, we conducted a case-control study with 148 histologically diagnosed incident endometrial cancer cases and 1468 matched non-cancer controls. Median consumption of alcohol was only 19.3g/week among cases who drank and 28.2g/week among controls who drank. These values are lower than in Western countries. Relative risk was analyzed in subjects classified into four groups according to weekly alcohol consumption (non-drinkers, 1-24 g/week, 25-175 g/week, and >175 g/week). Confounder-adjusted odds ratios for those consuming alcohol at <25 g/week, 25-175 g/week, and >175 g/week

compared to non-drinkers were 0.79 (95% confidence interval (CI), 0.49-1.28), 0.42 (95%CI, 0.23-0.79), and 0.47 (95%CI, 0.14-1.58), respectively. Further analysis was conducted concerning self-reported physical reaction to alcohol. Among women without flushing after drinking, a significant inverse association between risk and alcohol intake was seen (trend P=0.001). In contrast, no protective effect of alcohol was seen among women who experience flushing after drinking. These results suggest the presence of an inverse association between alcohol drinking and endometrial cancer risk among Japanese women, and that this association is evident among those without flushing. Further investigation of these findings is warranted.

Soy consumption reduces the risk of non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor mutations among Japanese

Keitaro Matsuo¹, Akira Hiraki¹, Hidemi Ito¹, Takayuki Kosaka², Takeshi Suzuki¹, Kaoru Hirose, Kenji Wakai³, Yasushi Yatabe,² Tetsuya Mitsudomi², Kazuo Tajima¹

¹ Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

² Department of Pathology and Molecular Diagnostics, Aichi Cancer Center Central Hospital

³ Department of Preventive Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine

Cancer Sci, 99:1202-1208, 2008.

Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations play substantial roles in genesis and proliferation of non-small-cell lung cancers (NSCLCs). We recently found that reproductive factors have a substantial impact on risk of development of NSCLCs featuring such EGFR mutations. Therefore, we explored the influence of dietary habits on NSCLC risk with reference to the EGFR mutation status. We conducted a case-control study using 353 patients with NSCLCs (122 EGFR mutated and 231 EGFR wild-type) and 1765 age-sex matched non-cancer control subjects. Dietary exposure was based on a semiquantitative food frequency questionnaire and impact of major food items,

like meats, seafoods, vegetables and soybean products was assessed by multivariate logistic regression. Soybean products demonstrated a protective association with EGFR mutated, but no EGFR wild-type NSCLCs, with multivariate-adjusted odds ratios and 95% confidence intervals for the 2nd and 3rd tertile of soybean product consumption of 0.79 (0.50-1.27) and 0.56 (0.34-0.93) relative to those in the lowest tertile (trend P=0.023). In conclusion, soy consumption may exert a protective association against the development of NSCLCs with EGFR mutations, providing possible insights into mechanisms of their genesis.

Effect of familial history and smoking on common cancer risks in Japan

Takeshi Suzuki¹, Keitaro Matsuo¹, Kenji Wakai², Akira Hiraki¹, Kaoru Hirose, Shigeki Sato³, Ryzo Ueda³, Kazuo Tajima¹

¹ Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute

² Department of Preventive Medicine/Biostatistics and Medical Decision Making, Nagoya University Graduate School of Medicine

³ Department of Internal Medicine and Molecular Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Science

Cancer, 109:2116-2123, 2007.

Inherited genetic predispositions are important risk factors for the development of cancer in general. To determine genetic susceptibility for 14 common cancers, a case-control study of the impact of a family history of cancer in first-degree relatives was conducted. The authors further evaluated the effect modification by habitual smoking with adjustment for other confounding environmental factors. The associations between family history and risk of cancer were generally stronger at the same sites than across cancer sites. Risks to first-degree relatives were found to be significantly elevated with 8 of 14 cancer

sites; especially high ORs were found for prostate and thyroid cancers. Some across-site associations were observed; in particular, a reciprocal association between breast and prostate cancer was found. The interaction between family history and smoking history for breast cancer was found to be statistically significant. The results of the current study support the hypothesis of a genetic susceptibility to cancers in family members. For breast cancer, the interaction between family history and smoking history was observed to be significant.

Norovirus GII/4 Epidemic Population by Genome-wide Tracing of Evolutionary History

Kazushi Motomura ¹, Tomoichiro Oka ¹, Masaru Yokoyama ¹, Hiromi Nakamura ¹, Hiromi Mori ¹, Hirotaka Ode ¹, Grant S. Hansman ¹, Kazuhiko Katayama ¹, Tadahito Kanda ¹, Tomoyuki Tanaka ², Naokazu Takeda ¹, Hironori Sato ¹, and the Norovirus Surveillance Group of Japan ³

¹ National Institute of Infectious Diseases

² City Institute of Public Health, Osaka 590-0953, Japan

³ Shima Yoshizumi, Toshiyuki Mikami, Hiroyuki Saito, You Ueki, Takenori Takizawa, Kiyoko Uchino, Mamoru Noda, Reiko Kondo, Yumiko Matsuoka, Sadayuki Funatsumaru, Shinichi Kobayashi.

J Virol, 82(22):11247-11262, 2008.

Our norovirus (NoV) surveillance group reported a more than four-fold increase in NoV infection in Japan during winter 2006/2007 compared to the previous winter. Because the increase was not linked to changes in the surveillance system, we

suspected the emergence of new NoV GII/4 epidemic variants. To obtain information on viral changes, we conducted full-length genomic analysis. Stool specimens from 55 acute gastroenteritis patients of various ages were collected at 11 sites in Japan

between May 2006 and January 2007. Direct sequencing of long PCR products revealed 37 GII/4 genome sequences. Phylogenetic study of viral genome and partial sequences showed that the two new GII/4 variants in Europe, termed 2006a and 2006b, initially coexisted as minorities in early 2006 in Japan, and that 2006b alone had dominated over the resident GII/4 variants during 2006. A combination of phylogenetic and entropy analyses revealed for the first time the unique amino acid substitutions in all 8 proteins of the new epidemic strains. These

data and computer-assisted structural study of NoV capsid protein are compatible with a model of antigenic drift with tuning of the structure-functions of multiple proteins for the global outgrowth of new GII/4 variants. The availability of comprehensive information on genome sequences and unique protein changes of the recent global epidemic variants will allow studies of diagnostic assays, molecular epidemiology, molecular biology, and adaptive changes of NoV in nature.

Genetic Analysis on HA1 Gene of Influenza A (H3N2) Viruses Isolated from Returning Travelers at Chubu International Airport in Aichi Prefecture

Mami Hata, Seidai Tanaka, Norimichi Kumagai¹, Manabu Noma¹, Kunihiro Ichinohe¹, Michiko Hashimoto¹, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa.

¹ Chubu International Airport Quarantine Branch Office

Japanese Journal of Infectious Diseases, 62(1):78-80, 2009.

The analysis of the influenza viruses isolated from travelers during the period of 2006 to 2008 was presented. The results suggest that the viruses carried by

returning travelers have important public health implications in terms of predicting the following season's influenza virus strains.

ヒトパレコウイルス感染症

伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子

臨床検査, 53(1):105-110, 2009.

ヒトパレコウイルス (Human parechovirus: HPeV) はピコルナウイルス科パレコウイルス属 (*Genus Parechovirus* par (a) = 傍 echo=エコー) に分類される 1 本鎖の RNA ウイルスである。

同ウイルス科には、他に小児麻痺の原因となるポリオウイルスや無菌性髄膜炎、手足口病、ヘルパンギーナの原因となるコクサッキー、エコーウイルス等が属するエンテロウイルス属、呼

吸器疾患の原因ウイルスが属するライノウイルス属、A型肝炎の原因ウイルスが属するヘパトウイルス属、胃腸炎患者から検出されたアイチウイルスが属するコブウイルス属の他、カルヂオウイルス属（脳心筋炎ウイルス等）、アフトウイルス属（口蹄疫ウイルス）、エルボウイルス属、テッシュウイルス属等、多数の重要な動物ウイルスが属している。

パレコウイルス属は、ヒトパレコウイルス Human parechovirus (HPeV) とユンガンウイルス Ljungan virus (LV) の2つの種から成る。HPeVは1956年に小児夏季下痢症の病原体として分離されたエコーウイルス22型及びエコーウイルス23型がウイルス学的特徴から1999

年にパレコウイルス属として独立し、ヒトパレコウイルス1型 (HPeV-1) 及び2型 (HPeV-2) と改名された。主に小児の胃腸炎や呼吸器疾患患者から分離される。現在のところ6種類の血清型/遺伝子型が存在し、世界各国から検出報告がなされているが、我が国からはHPeV-1とHPeV-3の報告が多い。LVは、1999年に報告された野ネズミ bank vole (*Clethrionomys glareolus*) から検出されたウイルスで2つ以上の血清型が知られている。2007年には子宮内死亡胎児(IUFD)の脳と胎盤から免疫組織化学的にLV抗原の存在が報告され、人獣共通感染症の可能性も示唆されている。

海外渡航者から入国時に分離されたインフルエンザウイルスの解析

秦 眞美、田中正大、皆川洋子、熊谷則道¹、野間 学¹、一戸邦彦¹、橋本迪子¹

¹厚生労働省名古屋検疫所中部空港検疫所支所
病原微生物検出情報, 29(1):16-17, 2008.

2007年3月から5月にかけて中部国際空港(セントレア)において入国時に採取した咽頭ぬぐい液検体から11株のインフルエンザウイルスを分離した。11株中9株はAH3亜型インフルエンザウイルス、2株はB型インフルエンザウイルス(Victoria系統)であった。分離株のHA1遺伝子領域の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を解析した。AH3ウイルス株について、2006/07シーズンワクチン株の

A/Hiroshima/52/2005と比較したところ、複数のアミノ酸置換変異が認められた。9株中6株にはG50E及びK140I変異が認められた。G50E/K140I変異は、南半球における2008シーズンのワクチン推奨株A/Brisbane/10/2007にみられている変異である。A/Brisbane/10/2007類似ウイルスの国内における今後の動向が注目される。

感染性胃腸炎および流行性角結膜炎患者からのアデノウイルス検出状況－愛知県

山下照夫、伊藤 雅、川口まり子、田中正大、秦 眞美、小林慎一、榮 賢司、皆川洋子
病原微生物検出情報, 29(4):96-98, 2008.

2003年～2007年の5年間に1,605名の胃腸炎患者の糞便と289名の流行性角結膜炎患者の結膜拭い液が集められた。これら検体はVero、HeLa、RD-18S細胞を用いたウイルス分離とPCR法による遺伝子検出を実施した。感染性胃腸炎患者1,605名中145名(9.0%)からアデノウイルスが検出された。145件中54件(37.2%)は41型、31件(21.4%)は2型、23件(15.9%)は3型、15件(10.3%)は1型、10件(6.9%)は5型であった。胃腸炎の原因ウイルスとされる41型は毎年検出され胃腸炎患者からの検出率は3.4%(54/1,605)であっ

た。40型は5年間で2名から検出されたのみであった。流行性角結膜炎患者289名中108名(37.4%)からアデノウイルスが検出された。その内訳は、3型が53名(49.1%)、37型が27名(25.0%)、8型が24名(22.2%)、4型が4名(3.7%)であった。37型は毎年検出され2003年はウイルス陽性者23名中13名(56.5%)が37型であった。8型は2004年と2005年に検出され、2004年はウイルス陽性者21名中12名(57.1%)、2005年はウイルス陽性者22名中12名(54.5%)が8型であった。

無菌性髄膜炎からのエンテロウイルス検出状況、2004～08年—愛知県

山下照夫、伊藤 雅、水谷絵美、藤原範子、皆川洋子

病原微生物検出情報, 30(1):6-8, 2009.

2004年1月から2008年9月までの約5年間に、無菌性髄膜炎患者338名から採取された460検体(髄液277件、糞便112件、咽頭ぬぐい液64件、その他7件)が集められた。これら検体はVero、HeLa、RD-18S細胞を用いたウイルス分離とRT-PCR法による遺伝子検出を実施した。患者338名中126名(37.3%)からRT-PCR法によりエンテロウイルスが検出され、109名(32.2%)からはウイルス分離も陽性であった。患者数が96名と最も多かった2004年にはエコーウイルス6型(E-6)が22名、コクサッキーウイルスB2型(CV-B2)が13名から検出されている。2005年は患者数が36名と少なくウイルスは8名のみから検出された。患者数が73名であった2006年には、E-18の8名に次いで、この年手足口病患者から多く検出され

たエンテロウイルス71型(EV-71)が4名から分離された。2007年には80名の患者のうち31名(38.8%)からCV-B5が検出された。2008年は9月末現在患者53名中12名からE-30が検出されている。細胞培養法で陽性であった検体が117件に対し、RT-PCR法では158件と1.4倍の検出数であった。ウイルス別に比較すると、検出数の多かったウイルスではE-30が細胞培養で8件、RT-PCR法で19件(2.4倍)であった。以下、E-18が4件対9件(2.3倍)、CV-B4が3件対7件(2.3倍)、CV-B1が20件対27件(1.4倍)、CV-B5が42件対47件(1.1倍)、E-6が28件対30件(1.1倍)の順でRT-PCR法が細胞培養法より高率に陽性であった。流行株により細胞培養の検出感度が異なるものと思われた。

Identification and Epidemiological Description of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains Producing Low Amount of Shiga Toxin 2 in Aichi Prefecture, Japan

Masakado Matsumoto, Masahiro Suzuki, Masao Takahashi, Kaoru Hirose, Hiroko Minagawa, Michio Ohta¹

¹ Department of Bacteriology, Nagoya University Postgraduate School of Medicine
Jpn J Infect Dis 61(6): 442-445, 2008.

Of 68 strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 (O157) in Aichi Prefecture tested for Shiga toxin (Stx) 2 production, 12 strains (17.6%) possessed *stx2* genes, but produced non- or a low-level of Stx2 (Stx 2 non- or low- producing strain; TNLP). The rest of 56 strains were Stx2 high-producing strains. In general, the TNLPs carried *q21* gene and showed nucleotide substitutions and insertions in the promoter region of the *stx2* gene, compared with that of O157 EDL933, in contrast to the Stx2 high-producing strains having *q933* gene and non-mutation in the

promoter region of the *stx2* gene.

It is probably that two genetic makers of *q* gene and mutation in the promoter region of the *stx2* gene are associated with Stx2 production. To investigate the pathogenesis of the TNLPs, *q* gene was used as an index of Stx2 production to examine 164 strains, involving the 68 and additional 100 strains. As results, the strain carrying *q21* gene tended to be isolated from healthy carriers more than the strain possessing *q933* gene ($p < 0.005$). In other words, the TNLP is possibly less virulent than Stx2 high-producing strains.

Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: A collaborative study

Yukiko Hara-Kudo¹, Noriko Konishi², Kayoko Ohtsuka³, Reiji Hiramatsu, Hiroyuki Tanaka⁴, Hirotaka Konuma⁵, Kosuke Takanori¹

¹ National Institute of Health Sciences

² Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

³ Saitama Institute of Public Health

⁴ Japan Food Research Laboratories

⁵ Department of Oceanography, Tokai University

Int J Food Microbiol 122(1-2): 156- 161, 2008.

In order to establish a sensitive method for the detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26, a collaborative study was conducted focusing on a comparison of the efficiency of loop-mediated amplification (LAMP) assay targeting the Verocytotoxin (also called Shigatoxin) gene, utilizing a direct plating method and a plating method with immunomagnetic separation (IMS-plating method) using various agar media. In combination with enrichment with the modified EC supplemented with novobiosin, *E. coli* O157 was detected in most samples of

ground beef and alfalfa sprouts by LAMP assay, the direct plating method and the IMS-plating method. *E. coli* O26 was detected in approximately 100% of the food samples by LAMP assay. However, the IMS-plating and direct plating methods recovered 80 and 50% in ground beef samples, respectively. As a result, it was demonstrated the LAMP assay is superior to the IMS-plating method. Based on these results, it appears LAMP assay is effective as a screening assay to detect *E. coli* O157 and O26 from positive samples.

リジン脱炭酸反応陰性の腸管出血性大腸菌血清型 O111 による集団感染事例－愛知県

山崎 貢、鈴木匡弘、山本弘明、青木日出美、松本昌門、平松礼司、遠山明人、皆川洋子

奥村貴代子¹、深津知子¹、高木 茂¹、酒井高子¹、角谷 裕¹、鈴木康元¹

¹ 豊田市保健所

病原微生物検出情報, 29(9): 256-257, 2008.

2006年7月、豊田市内の医療機関からA託児所におけるEHEC血清型O111(VT1+, VT2+)による患者1名(1歳)の発生届が豊田市保健所にあり、同保健所において接触者61名の検便を実施した。しかし、一般的な大腸菌性状を示し市販病原大腸菌免疫血清O111に凝集する大腸菌は分離できなかった。届出患者由来O111株がリジン陰性であったことから、新たにリジン陰性の大腸菌を検査して接触者4名からリジン陰性O111大腸菌(VT1, VT2遺伝子

陽性、及び両毒素産生菌)を検出した。

一方、1998年～2008年に愛知県内で発生した散発性下痢症9事例(患者9名及び保菌者2名)に由来するEHEC(O111型)11株についてリジン脱炭酸性状をみると、1998年の4株は全てリジン陽性であったが2000～2008年の7株は全てリジン陰性であった。EHECの疫学調査にはリジン陰性菌を想定した検査及び接触者検便からの釣菌に際しては初発患者株の性状確認が必要である。

LAMP 法による増殖性を有する耐熱性溶血毒 (TDH) 産生性腸炎ビブリオの海産魚介類からの検出法の開発

荒川英二¹、山崎 貢、岩出義人²、松本昌門、皆川洋子

¹国立感染症研究所

²三重県科学技術振興センター

厚生労働科学研究費補助金食の安全・安心確保推進事業「食品における微生物迅速検査法の開発及びその精度評価システムに関する研究」(分担研究者荒川英二)平成19年度 総括・分担研究報告書 105-114.

食中毒菌である腸炎ビブリオ(以下 *V. p*)の主要な病原因子は耐熱性溶血毒(Thermostable direct hemolysin:TDH)であるが、自然界にはTDH産生菌(TDH⁺*V. p*)が僅かしか存在しない。本食中毒の推定原因食品中に存在する増殖性TDH⁺*V. p*を短時間で簡便に検出するために、近年開発されたLAMP(loop-mediated isothermal amplification)法を応用した検査法を検討した。

LAMP反応には、TDH⁺*V. p*の熱アルカリ抽出物、Primerセット、Loop primer及びLoopamp DNA増幅試薬キットを用い、リアルタイム濁度測定装置によりTDH遺伝子を検出した。

その結果、①PrimerセットとLoop primerを組み合わせるによりLAMP反応を約2分の1に短縮できた。②TDH⁺*V. p*(15株)は全株LAMP陽性であったのに対し、TDH⁻*V. p*(10株)

及び*V. p*類縁菌(28株)は全株陰性とLAMP法の特異性は高かった。③検出限界は反応チューブ当たり8MPN TDH⁺*V. p*(増菌液中約10⁴MPN/mL)でありPCR法に比べ100~1,000倍高感度であった。④培養液中のTDH⁺*V. p*が僅かでも37°C5時間培養によりLAMP法の検出限界(約10⁴MPN/mL)を超えた。⑤海産魚介類7件へのTDH⁺*V. p*添加実験において、培養0時間及び5時間後の増菌液の10倍濃縮液をプレートに用い、培養前後の成績陽転によって増殖性を有するTDH⁺*V. p*が検出できた。

今回検討したLAMP法は、海産魚介類から増殖性を有するTDH⁺*V. p*を検体入手から僅か約8時間(培養5時間)と短期間に検出可能であるため*V. p*食中毒の原因解明につながる有用な検査法と期待される。

Rapid determination of carbamate pesticides in food using dual counter-current chromatography directory interfaced with mass spectrometry

Yuko Ito, Tomomi Goto, Sadaji Yamada, Tsutomu Ohno, Hiroshi Matsumoto, Hisao Oka¹, Yoichiro Ito²

¹Kinjo Gakuin University

²Center for Biochemistry and Biophysics, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health

Journal of Chromatography A, 1187: 53-57, 2008.

Dual counter-current chromatography (dual CCC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) is successfully performed with a newly designed spiral column for dual CCC. A small column capacity required for directly coupling with electro-spray MS/MS is accomplished by forming a rectangular spiral groove on a plastic disk and sealing it with a PTFE sheet. This novel dual CCC MS/MS technique is successfully applied for rapid

determination of methomyl, fenobucarb and carbaryl in food. A two-phase solvent system of n-hexane-acetonitrile-0.1 % formic acid (45: 45: 10) is suited for both good dual CCC separation and sufficient ionization of pesticides. Recoveries of these three pesticides from mandarin orange and spinach samples fortified at 0.05 mg/kg are in the range of 93-107 % with coefficients of variation of 2.4-3.8 %.

愛知県における野菜・果実中の農薬残留データ（2001～2005 年度）に基づいたポジティブリスト制度下での農薬検査対象設定方法の検討

椛島由佳、上野英二、大島晴美、大野 勉、斎藤 勲¹

¹東海コープ事業連合商品安全検査センター

食品衛生学雑誌, 49: 283-293, 2008.

2001～2005年度の愛知県における野菜・果実中の農薬残留データに基づき、ポジティブリスト制度に対応した農薬検査対象設定方法を検討した。検出頻度の高い農薬と食品の抽出、および基準を超える可能性が高い農薬と食品を抽出し、本制度下で効率的かつ効果的な検査業務を行うための適切な食品および対象農薬の選択を可能にした。また、農薬残留データを国産野菜、国産果実、輸入野菜、輸入果実別に分類し、各群における農薬検出率(分析試料数に対する農薬検出試料数の割合)の年次推移と傾向性、および1試料当たりから検出された農薬の種類数について、統計解析を行った。その結

果、国産野菜における農薬検出率は5年間で減少傾向を示すこと ($p < 0.001$)、また1試料当たりから検出された農薬の種類数は、他の3群と比較して国産果実において有意に高いことが判明した ($p < 0.001$)。ポジティブリスト制度下の基準値に照らして過去のデータを再判定し、“基準値の10%以下”、“基準値以下”、“基準値超過”に分類し、各検出農薬について3つの分類の割合の年次推移についても統計解析を行った。その結果、5年間で基準値超過の割合は減少傾向を示し、基準値の10%以下の割合は増加傾向を示した ($p < 0.001$)。

データベースソフトウェアを用いた GC/MS による農産食品中残留農薬の多成分一斉分析法の検討

上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野 勉

食品衛生学雑誌, 49: 316-319, 2008.

253 種類の農薬成分の保持時間、マススペクトルおよび検量線情報があらかじめ登録しており、定性・定量用の標準品測定を行うことなく残留農薬の有無、およその濃度を確認することができるデータベースソフトウェアを用いた SCAN モード GC/MS による一斉分析法 (SCAN 法) を作成し、残留分析への応用を試みた。SCAN 法により野菜・果実類などから 26 種類の農薬成分、延べ 131 成分を検出し、標準品測定を行う SIM モード GC/MS による一斉分析法 (SIM 法)

と定性結果は良く一致した。定量値の (SCAN 法/SIM 法) 比は 0.3~3.1 (標準偏差 0.63) と半定量法として概ね満足すべき範囲にあった。適切な試料調製法を採用することによって、SCAN 法はスクリーニング分析法としての実用性が示唆される結果が得られた。SCAN 法は、健康危機管理状況下での未知成分の同定および、およその濃度を確認できると考えられ、今後の発展的展開が期待される。

NCI モード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロ ECD による畜水産物中残留農薬の多成分分析

上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野 勉

食品衛生学雑誌, 49: 390-398, 2008.

NCI モード GC/MS およびデュアルカラム GC- μ ECD による畜水産物中残留農薬の頑健性を有し、高感度かつ定量性に優れた多成分分析法を構築した。固体試料はアセトン/ヘキサン、液体試料はアセトニトリルで抽出し、GPC において脂質成分などが重なって溶出する農薬画分のみを選別してグラファイトカーボン/PSA 二層式カラムにより精製したのち、NCI-SIM/スキャンモード GC/MS により測定して定性し

た。なお、GPC は内径 10mm、長さ 50cm の分離カラムなどを用いることで分離能力を向上させ、溶媒の使用量を大幅に削減した。さらに、試料液はフロリジルカートリッジカラムにより精製/分画したのち、デュアルカラム GC- μ ECD により測定して定量した。添加回収率は、クロロタロニルなど 5 成分を除いて、76.8~107.9% (相対標準偏差<9.7%) と良好であった。

サロゲート物質の食品中残留農薬分析への利用について（講座）

上野英二

食品衛生学雑誌, 49: J-309 -J-313, 2008.

食品衛生法によるポジティブリスト制度が、平成 18 年 5 月から導入され、GC/MS 及び LC/MS(/MS)を用いた一斉分析法が普及してきている。しかし、従来の選択検出器付き GC や LC を用いた分析法に比べて、定量性が劣る場合も少なくない。これは、一斉分析法では多くの農薬を測定可能とする条件のために試料精製が不十分となりやすく、除去できなかった夾雑成分が MS のイオン化部へ導入され、農薬のイオン化効率を変動させることが原因の一つ

と考えられる。著者らは、イオン化効率の変動などを補正するために、対象農薬の安定同位体（サロゲート物質）を内標準として用いた定量分析法を開発している。そこで、サロゲート物質を用いた定量法について解説した上で、食品中 2, 4-D (2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸) の個別分析、GC/MS 及び LC/MS(/MS)を用いた一斉分析へのサロゲート物質の具体的な応用例について紹介しながら、定量分析上のノウハウなどについて解説した。

農作物中残留農薬の多成分分析法に関する研究 （平成 20 年度日本食品衛生学会学術貢献賞）

上野英二

食品衛生学雑誌, 49: J-350 -J-352, 2008.

食品を取り巻く重大事件が相次いで発生し、「食」の安全・安心を求める声がいっそう高まっている。こうした情勢に対応するために食品衛生法が改正され、平成 18 年 5 月よりポジティブリスト制度が導入された。この新たな制度に対応して効果的な検査業務を実施するためには、残留実態などを把握して対象農薬等を的確に選択することが必要となってくる。また、効率的な分析法の採用を図りながら試験検査機能を強化していく必要がある。しかし、基準値の多くは 1ppm 以下であり、食品から抽出される大量の夾雑物の影響もあって、性状多岐に

わたる多くの農薬等を分析することが困難となる場合も少なくない。そこで、日常的に様々な食品が搬入され、行政検査を実施している地方衛生研究所にあって、微量の残留農薬等を精度良く分析するために、適切な試料調製 (GPC/グラファイトカーボン SPE など)、溶出パターンの異なる複数のクロマト分離 (デュアルカラム GC など) に加えて、特異的な複数の検出器 (安定同位体を内標準として用いた GC-MS など) を組み合わせた多成分分析法の開発を進めた。

農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の精度管理に関する研究

遠藤 明¹、田中之雄²、土田由里子³、上野英二、田中敏嗣⁴、宇野正清⁵、木野善夫⁶、佐々木珠生⁷、堤 泰造⁸、花田喜文⁹

¹ (財) 食品薬品安全センター、²大阪府立公衆衛生研究所、³新潟県保健環境科学研究所、⁴神戸市環境保健研究所、⁵奈良県保健環境研究センター、⁶和歌山市衛生研究所、⁷広島市衛生研究所、⁸徳島県保健環境センター、⁹北九州市環境科学研究所

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）「検査機関の信頼性確保に関する研究」遠藤 明〈主任研究者〉、田中之雄〈分担研究者〉

平成 19 年度分担研究報告書：27-154, 2008.

残留農薬規制のポジティブリスト制への移行に伴い、多数の農薬についての的確な検査が要求され、検査結果の信頼性確保が重要な課題となっている。今年度は、一律基準（0.01 ppm）付近の農薬検査の信頼性を確保するために、地方衛生研究所 9 機関による外部精度管理を実施した。均質性、安定性を確認したハウレンソウ（GC/MS 用）、トウモロコシ（LC/MS/MS 用）に一律基準付近の低濃度の農薬 10 種類を添加した結果は、全機関が添加農薬を正しく検出し

た。R 管理図では適正域に入っていない（RSD が 10%を超える）機関も認められたが、安定同位体（サロゲート物質）を内標準として補正した結果、再現性において RSD が 5%以内となり良好な結果が得られた。9 機関は、いずれも信頼性のあるデータを得るための要素である「正確な標準品」を用い、「適正な分析法」を採用して、「良好な状態の装置」で分析が行われており、測定データの信頼性について問題のないことが示唆された。

畜水産食品中の残留農薬の実態

加藤保博¹、根本 了²、上野英二

¹ (財) 残留農薬研究所、²国立医薬品食品衛生研究所

厚生労働科学研究補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）「食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究」加藤保博〈主任研究者〉、根本 了〈分担研究者〉

平成 19 年度分担研究報告書：9-21, 2008.

平成 19 年度は、愛知県において、牛、豚、鶏の筋肉、鶏の内臓、卵、牛乳及び魚介類等の市販の畜水産食品中の残留農薬の実態調査を行った。筋肉 15 検体、鶏の内臓 2 検体、牛乳 6 検体、卵 7 検体及び魚介類 30 検体の合計 60 検体について、282 農薬の調査を実施したとこ

ろ、DDT 類、BHC 類、 α 及び β -エンドスルファン、エンドスルファンスルフェート、*cis* 及び *trans*-クロルデン、*cis* 及び *trans*-ノナクロル、イソプロチオラン、エトフェンプロックス及びフルフェノクスロンなど 35 種類の農薬が痕跡量～14 ng/g 検出された。DDT 類が最も

高頻度で検出され、60 検体中 17 検体から検出された。また、魚介類では 1 検体から複数の農薬が検出される事例が多く見られ、特に貝類で

は 6 検体中 4 検体から 1 検体あたり 10 種類以上の農薬が検出された。

編集情報運営委員会

委員長：竹内一仁

委員：石田 勝寿（総務課）

續木 雅子（企画情報部・健康科学情報室）

山下 照夫（生物学部・ウイルス研究室）

鈴木 匡弘（生物学部・細菌研究室）

奥村 正直（生物学部・医動物研究室）

大島 晴美（衛生化学部・医薬食品研究室）

小島美千代（衛生化学部・生活科学研究室）

愛知県衛生研究所報

第 59 号

平成 21 年 3 月 31 日 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・生活安全化学担当 052-910-5638

医薬食品研究室・食品安全化学担当 052-910-5639

医薬食品研究室・医薬品化学担当 052-910-5629

生活科学研究室・水道水質担当 052-910-5643

生活科学研究室・環境水質担当 052-910-5644

生活科学研究室・環境保健担当 052-910-5664

FAX：052-913-3641

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

Published by

AICHI PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

7-6 Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya, 462-8576 Japan

（この刊行物は再生紙を使用しています）