

愛知県衛生研究所報

第 64 号 平成 26 年 3 月

目 次

調査研究

愛知県における特定健康診査データを活用した地域診断 - 服薬状況別にみた生活習慣病コントロールの現状 - 広瀬かおる、小栗 信、濱武通子、大参寛典、皆川洋子	1
愛知県におけるノロウイルス流行状況と分子疫学解析 - 2008/09 ~ 2012/13 シーズン - 小林慎一、中村範子、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、山下照夫、皆川洋子	9
黄色ブドウ球菌の全ゲノム配列を利用した系統樹解析 青木美耶子、鈴木匡弘、松本昌門、山下照夫、皆川洋子	15
培養細胞を用いたテトロドトキシン検査法の検討 長谷川晶子、中村瑞那、奥村正直、秦 眞美、山下照夫、皆川洋子	23
UPLC による無承認無許可医薬品中の瘦身、強壮成分の一斉分析法の検討 大野春香、棚橋高志、三上栄一、上野英二、猪飼誉友	33
愛知県民の尿中ヒ素の化学形態別分析 山本優子、小島美千代、市古浩美、小池恭子、猪飼誉友	41
他誌掲載論文抄録	49

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

Volume 64, March 2014

Contents

Original Papers

Evaluation of health conditions across Aichi Prefecture using specific health
checkup data - Comparison of lifestyle-related diseases according to medical
treatment - 1

Kaoru Hirose, Makoto Oguri, Michiko Hamatake, Hironori Ohmi,
Hiroko Minagawa

Detection and genetic characterization of Norovirus in infectious gastroenteritis
patients in Aichi Prefecture from 2008-09 to 2012-13 seasons 9

Shinichi Kobayashi, Noriko Nakamura, Hirokazu Adachi, Miyabi Ito,
Yoshihiro Yasui, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Phylogenetic analysis of *Staphylococcus aureus* using whole genome sequences
..... 15

Miyako Aoki, Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Teruo Yamashita,
Hiroko Minagawa

A cytolytic assay for the measurement of tetrodotoxin 23

Akiko Hasegawa, Mizuna Nakamura, Masanao Okumura, Mami Hata,
Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Simultaneous analysis of medicinal ingredients for weight control and sexual
enhancement in unapproved/unpermitted drugs using ultra-performance liquid
chromatography 33

Haruka Ohno, Takashi Tanahashi, Eiichi Mikami, Eiji Ueno, Yoshitomo Ikai

Speciation of arsenic compounds in urine of Aichi prefecture residents 41

Yuko Yamamoto, Michiyo Kojima, Hiromi Ichigo, Yasuko Koike, Yoshitomo Ikai

Summeries of papers accepted to other journals 49

調 査 研 究

愛知県における特定健康診査データを活用した地域診断 - 服薬状況別にみた生活習慣病コントロールの現状 -

広瀬かおる、小栗 信、濱武通子、大参寛典、皆川洋子

要 旨

愛知県における特定健康診査・特定保健指導データを活用して県民の健康水準の現状を把握し、課題を明確にして健康づくり施策に有用な情報構築を行うことを目的に調査研究を実施した。平成 20 年実施分 885,899 件を解析対象に、高血圧・脂質異常症・糖尿病治療群（服薬者）と未治療群（非服薬者）に区分し、血圧や血糖などのコントロール状況を性別、年齢階級別に比較した。高血圧服薬者の割合は男 21.3%、女 22.1%、脂質異常症服薬者の割合は男 8.8%、女 16.2%、糖尿病服薬者割合は男 7.1%、女 5.5%であった。高血圧未治療群における高血圧者は男 18.7%、女 15.2%であり、服薬治療群においては男女ともどの年齢階級においても約 40%が管理不良であった。脂質異常症未治療群において LDL コレステロール値が 140mg/dl 以上の者は男 31.4%、女 37.8%と高く、治療群では男女とも約 25%であった。糖尿病診断のめやすになるヘモグロビン A1c 6.1%を上回る受診者は未治療群において男 4.9%、女 2.8%存在していた。さらに治療群においてもヘモグロビン A1c 8.0%を上回る割合は男 13.6%、女 11.4%と高く、男女とも年齢階級が若いほどその割合は高くなり、血糖が十分コントロールされていない状況が明らかとなった。保健指導非該当者のなかにも生活習慣改善による生活習慣病の予防若しくは適切な治療による重症化防止を必要とする者の存在が判明し、地域・職域が連携して生活習慣病予防を推進する必要性が明らかになった。

キーワード：地域診断、特定健康診査・特定保健指導、生活習慣病、服薬状況

序 文

根拠に基づいた健康政策を展開する上で、対象となる地域（市町村、保健所管轄区域、二次医療圏、都道府県）の詳細な観察や保健医療統計を用いて地域ごとの課題や特徴を把握する「地域診断」は科学的根拠の有用な供給源となりうる。地方自治体における地域保健医療計画などの健康増進に関する計画の企画・立案・評価は、本来、地域集団の客観的評価の根拠に基づくことが望まれるが、現状では国の示した

指針や先行する自治体の計画を参考に作成されることが多い。そこで、愛知県における特定健康診査・特定保健指導（以下、特定健診・保健指導）データを活用して県民の健康水準の現状を把握し、生活習慣病予備群の確実な抽出や効果的な保健指導など施策評価のデータを整備、健康課題を明確にして健康づくり施策に有用な情報構築を行うことを目的に調査研究を実施した。

表1 特定健康診査における検査項目の保健指導及び受診勧奨判定値

項目名	保健指導判定値	受診勧奨判定値	単位
血圧(収縮期)	130	140	mmHg
血圧(拡張期)	85	90	mmHg
中性脂肪	150	300	mg/dl
HDLコレステロール	39	34	mg/dl
LDLコレステロール	120	140	mg/dl
空腹時血糖	100	126	mg/dl
HbA1c	5.2	6.1	%

資料と方法

愛知県内で協力の得られた健康保険組合・共済組合・全国健康保険協会・国民健康保険の各医療保険者から提供された特定健診・保健指導データに基づき集計解析を実施した。本調査研究においては平成20年度実施分 901,298 件を使用した。このうち必須項目等の入力不備などによりデータの取り込みが行えなかった 15,399 件を除く 40 歳～74 歳実施分 885,899 件を解析対象とした。「都道府県別人口をベースにした推定値」(厚生労働省、平成 22 年 7 月)による愛知県の特定健康診査受診者数は 1,174,910 人であり、今回の有効データは推定受診者数の 75.4%にあたる。

特定健診データの収縮期・拡張期血圧、中性脂肪、HDL-及び LDL-コレステロール、ヘモグロビン A1c (HbA1c) の結果を用い、表 1 に示す判定値に基づき保健指導及び受診勧奨者に分類した(表 1)。なお、血圧については日本高血圧学会のガイドラインに基づき正常値～III 度高血圧に分類した(表 2)。服薬状況は質問票の「血圧を下げる薬」、「コレステロールを下げる薬」、「インスリン注射又は血糖を下げる薬」の服薬状況に基づき高血圧・脂質異常症・糖尿病治療群(服薬者)と未治療群(非服薬者)に区分し、血圧などのコントロール状況を性別、年齢階級別に比較した。集計解析には解析用統計パッケージ SAS ver.9.2 (SAS

表2 日本高血圧学会「高血圧治療ガイドライン2009」による血圧判定区分(抜粋)

血圧判定区分	収縮期血圧 (mmHg)	拡張期血圧 (mmHg)	
正常値	<130	かつ	<85
正常高値	130～139	または	85～89
I 度高血圧	140～159	または	90～99
II 度高血圧	160～179	または	100～109
III 度高血圧	180	または	110

Institute, Cary, NC, USA)を使用した。なお集計解析の実施にあたり提供された特定健診・保健指導データにおける受診者情報のうち、氏名や被保険者の記号・番号等個人が特定される情報は予め削除されており、代わりに付番される整理用番号を用いた。研究に使用したデータはすべて連結不可能匿名化されており、解析は疫学倫理指針を厳守して行った。

結果

1 高血圧服薬者割合と血圧のコントロール状況

高血圧服薬者の割合は男 21.3%、女 22.1%、未治療で受診勧奨対象者の割合は男 6.8%、女 3.5%、未治療保健指導対象者の割合は男 10.4%、女 4.4%であった。男女とも年齢とともに服薬者割合は増加、70 歳以上では服薬者は 40%を超えていた(図 1)。

高血圧未治療群における I 度以上の高血圧者の割合は男 18.7%、女 15.2%、年齢とともにこの割合は増加し 70-74 歳ではそれぞれ 26.4%、25.1%であった(図 2-1)。

男の高血圧治療群では I 度以上の高血圧者割合がどの年齢階級においても 40%程度存在し、40-54 歳では II 度以上の高血圧者の割合が 10%を超えていた。女の治療群も同様の傾向を示し、若年群ほど II 度以上の高血圧者の割合は高い傾向であった(図 2-2)。

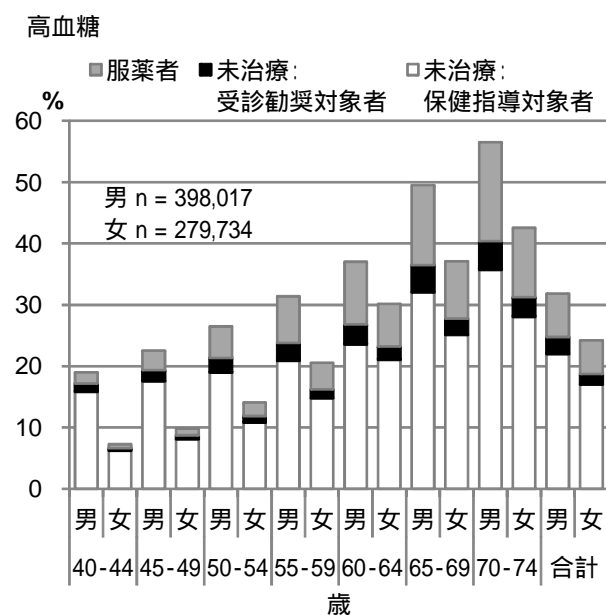
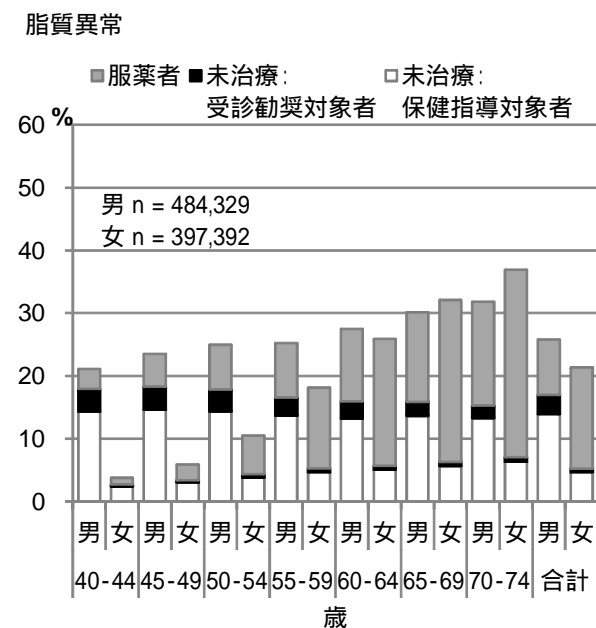
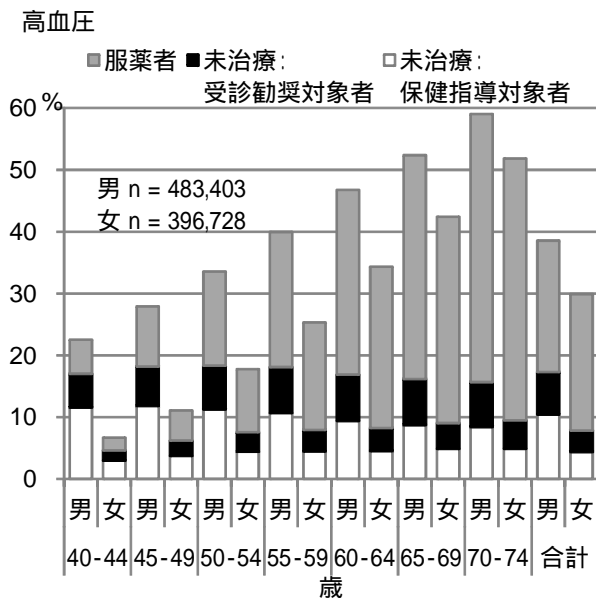


図1 性・年齢階級別服薬状況

2 脂質異常症服薬者割合と脂質関連項目のコントロール状況

脂質異常症服薬者の割合は男 8.8%、女 16.2%、未治療の受診勧奨対象者の割合は男 3.0%、女 0.6%、未治療保健指導対象者の割合は男 13.9%、女 4.6%であった(図1)。服薬者の割合は年齢とともに増加したが、特に50歳以上女性での急増が顕著であった。男では未治療保健指導対象者がどの年齢群でも15%程度存在した。

男の未治療群では中性脂肪が300mg/dl以上の割合は5.1%、HDLコレステロールが35mg/dl未満の割合は2.8%と低い一方で、LDLコレステロール値が140mg/dl以上の者の割合はどの年齢層でも約30%を占めていた。女の未治療群ではLDLコレステロール値が140mg/dl以上の者の割合は年齢とともに増加し55-59歳、60-64歳では46.6%、48.2%と高かった。

男の脂質異常症治療群においては中性脂肪値300mg/dl以上の者割合が若年群ほど高く40代では15%を超えていた。また、LDLコレステロール値が140mg/dl以上の者の割合も同様の傾向を示し、40-44歳では37.9%と高い割合を示した。女の治療群ではLDLコレステロール値が140mg/dl以上の者の割合は年齢群における差は少なく23%~29%であった。

3 糖尿病服薬者割合と血糖コントロール状況

糖尿病服薬者の割合は男7.1%、女5.5%、未治療で受診勧奨対象者の割合は男2.7%、女1.7%、未治療で保健指導対象者の割合は男22.0%、女17.0%であった(図1)。

糖尿病治療の有無別にHbA1cの分布をみると糖尿病診断のめやすになるHbA1c 6.1%を上回る者の割合が未治療群において男4.9%、女2.8%存在していた(図3-1)。

また、治療群においても HbA1c 8.0% を上回る割合は全体で男 13.6%、女 11.4% と高い状況であり、特に男女とも若年群でその割合が高かった（図 3-2）。

考 察

生活習慣病は平成 22 年度国民医療費の約 3 割を占め、死亡数割合では約 6 割を占めている。平成 13 年 3 月に策定された「健

康日本 21 あいち計画」の中間評価（平成 17 年度）によると糖尿病腎症による新規透析導入者数の増加をはじめ、循環器疾患やがんにおける目標指数の多くで平成 12 年度ベースライン時に比べて悪化が認められている。そこで、愛知県における特定健診・保健指導データを活用し生活習慣病予防対策策定にあたって有用な情報を得ることを目指して調査研究を実施した。

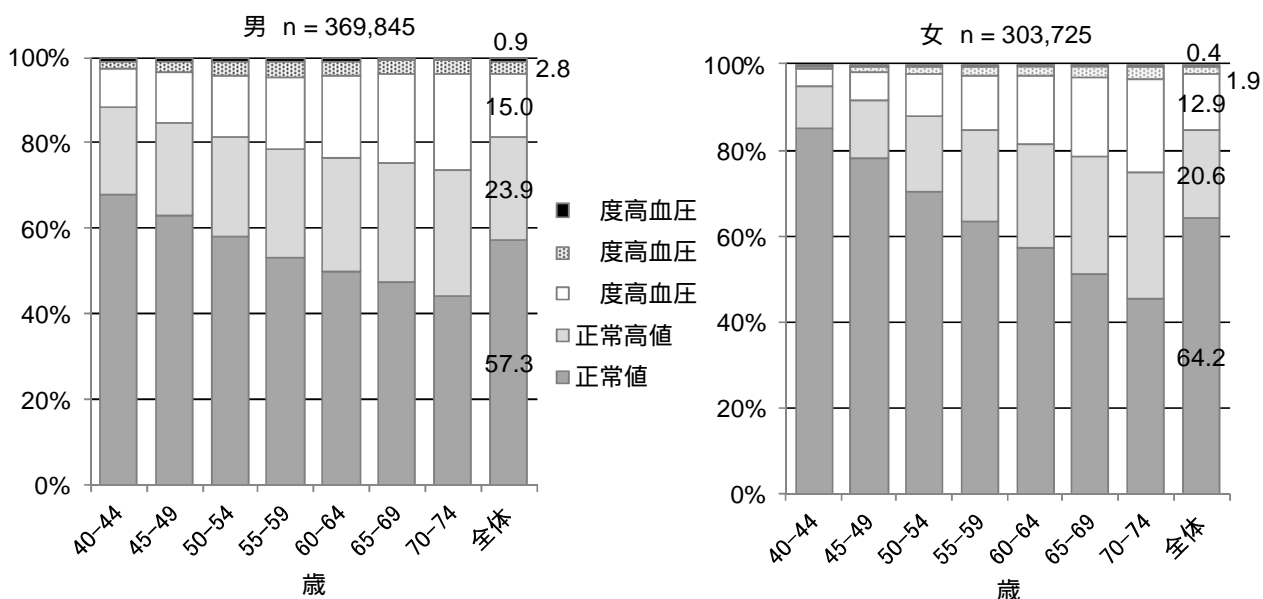


図2-1 高血圧未治療群における血圧判定区分

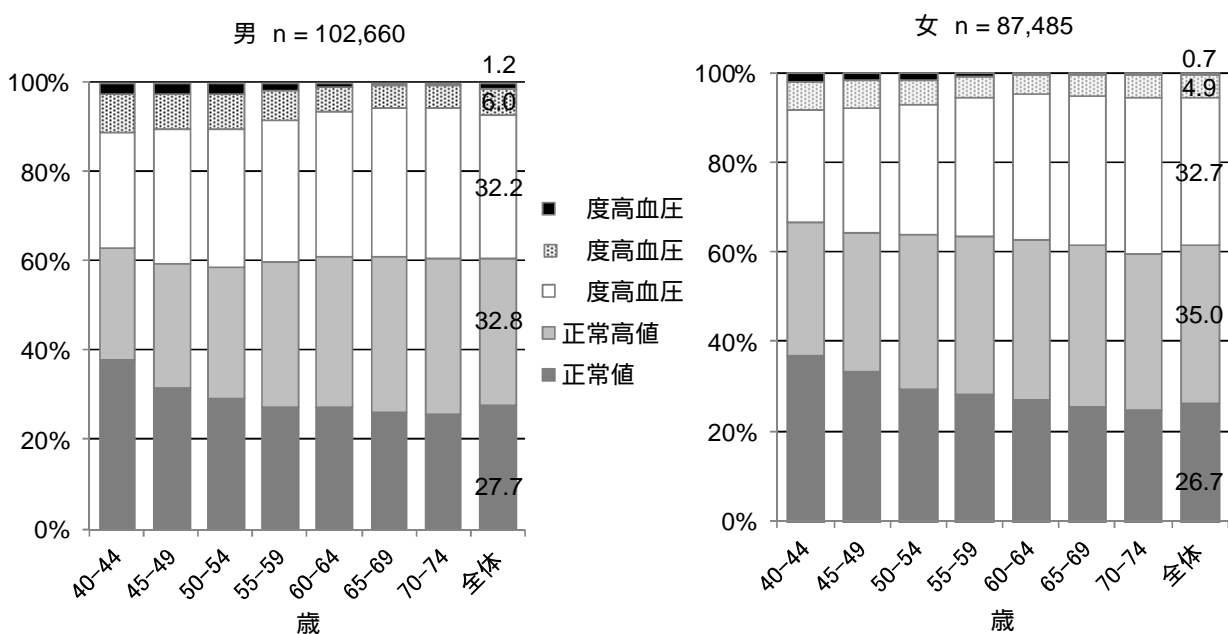


図2-2 高血圧治療群における血圧判定区分

40歳以上74歳までの公的医療保険加入者全員を対象とする特定健診・保健指導における様々なデータの活用により、地域の現状把握が可能となる。また、従来は患者調査などから推定するよりなかった有病者割合や受療状況など重要な情報を得ることもできる。本調査研究対象者は愛知県における推定受診者数の75%にあたり愛知

県全体の状況をかなり反映しているものと考えられる。一方で「平成23年国民健康・栄養調査報告」¹⁾と比較すると血圧や血糖値は平均値が低い傾向であった。今回の解析対象集団は特定健診未受診者が除外されているために比較的健康管理意識が高い人に偏っている可能性を考慮する必要がある。また、服薬状況の把握は質問

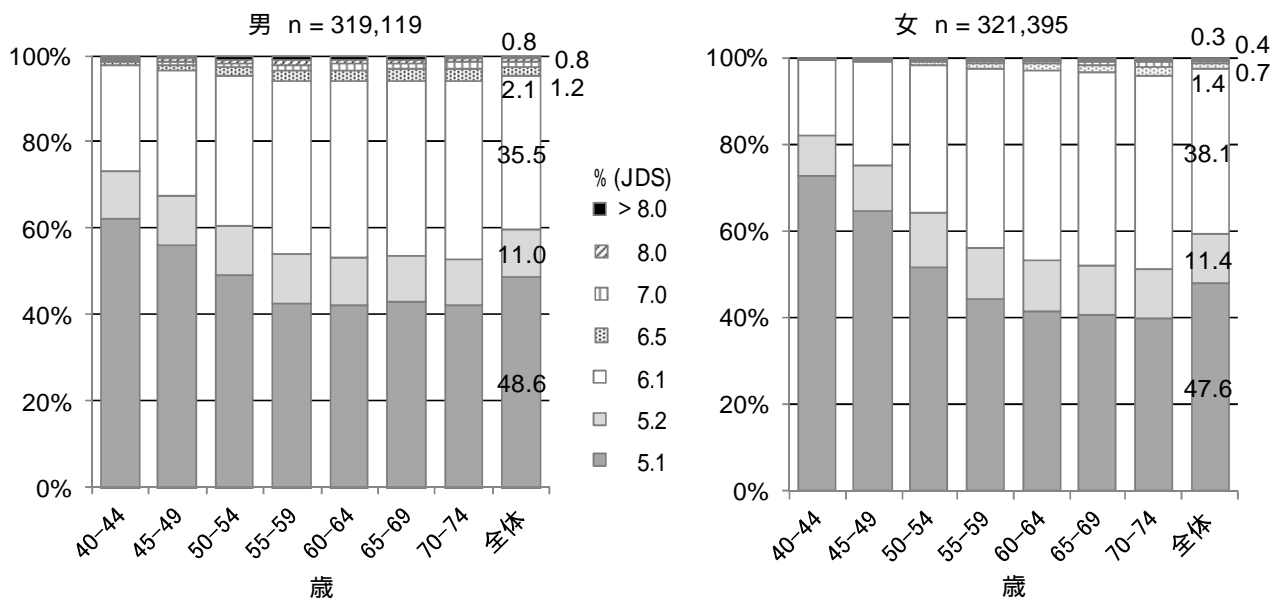


図3-1 糖尿病未治療群におけるHbA1cの分布

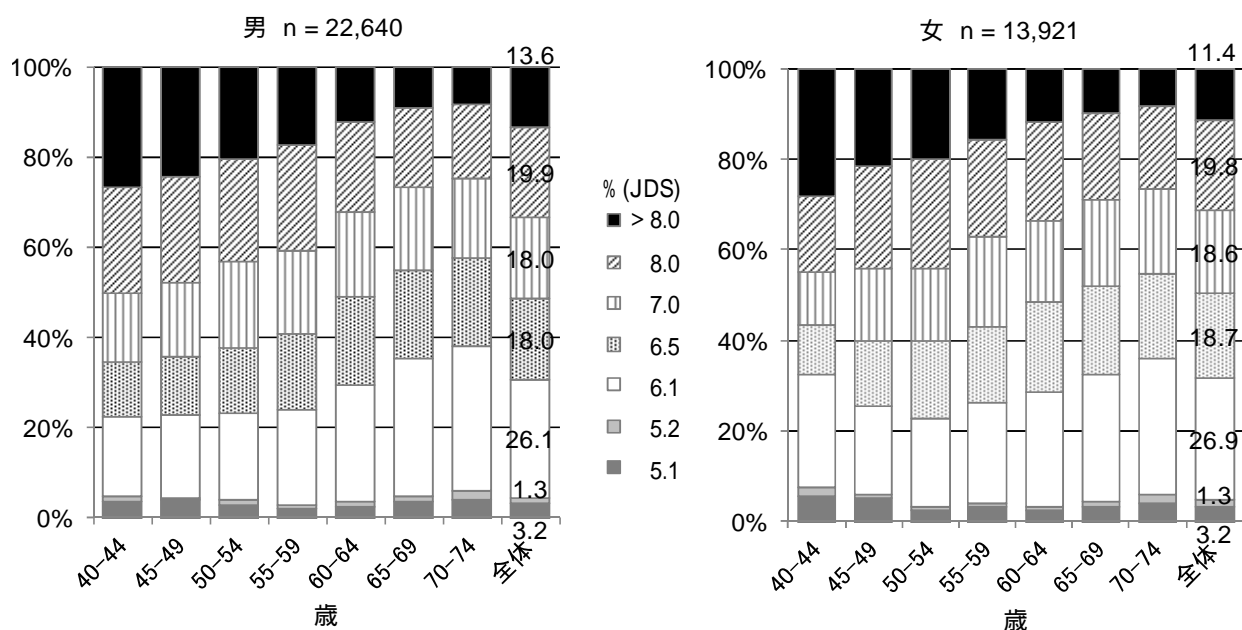


図3-2 糖尿病治療群におけるHbA1cの分布

票の回答による本人の申告に基づいており、情報の正確性や服薬アドヒアランスの点で限界がある。平成 20 年度の診療報酬改定により薬剤管理指導料が算定可能となり、医療者による服薬指導の徹底が図られた。特定健診が平成 20 年度に導入された後の平成 22 年国民健康・栄養調査では「糖尿病と言われたことがある」と回答した者の内「継続的に治療を受けている」「過去に中断したことがあるが現在は受けている」と回答した割合は 63.7%と平成 21 年の調査結果より 10%上回っていた²⁾。「メタボリックシンドローム」というキーワードの導入により生活習慣病予防の概念が普及し治療に参加する患者の意識も高まっていることが考えられる。従って、特定健診受診時の質問票情報に基づく治療群（服薬者）・未治療群（非服薬者）の比較は意義あるものと考えられる。

脳血管障害、心筋梗塞等心血管イベントの抑制には厳重な血压管理が重要である。最近の世界各国の高血压の頻度と管理状況をみると、高血压の頻度はポーランドで最も高く（男 68.9%、女 72.5%）、インド農村部で最も低い（男 3.4%、女 6.8%）³⁾。高血压の管理基準を 140/90mmHg 未満とすると血压管理不良例は 40%を超えている。米国における高血压の管理状況の推移をみると治療症例及び管理症例の頻度は上昇しているが、1999～2000 年においても 140/90mmHg 未満の高血压管理例は全体の 34%にすぎない⁴⁾。

わが国においても高血压未治療者の割合は高く、若年者では 8～9 割にのぼるとされる⁵⁾。本調査結果において未治療群における高血压者は男で 18.7%、女で 15.2%であり、保健指導対象とならない場合にも減塩を含め生活習慣の改善等による血压低下を指導する必要がある。また、高血压者のうち約半数が管理不十分と推定されているが⁵⁾、

本調査においても服薬治療群において男女ともどの年齢階級でも 40%程度が管理不良であった。さらなる高血压管理を促す環境整備が求められる。

高 LDL コレステロール血症は動脈硬化の最大の危険要因として位置づけられ、2012 年に改訂された「動脈硬化疾患予防ガイドライン」では LDL コレステロール値 120～139mg/dl を境界域高 LDL コレステロール血症として早期治療介入の領域として提案された。本調査結果によると脂質異常症未治療群の高 LDL コレステロール血症（140mg/dl 以上）は男 31.4%、女 37.8%、治療群では男 24.9%、女 25.4%と高率であった。特定健診における LDL コレステロール値のチェックは重要な機会であり、高血压や糖尿病などの病歴と併せて保健指導対象者とならない場合にも受診を促すなどの必要がある。

近年、糖尿病人口は年々増加傾向にあり、平成 23 年度国民健康栄養調査報告¹⁾によると糖尿病が強く疑われる者の割合は男 15.7%、女 7.6%である。本調査対象者では同割合は男 9.8%、女 6.8%で、男の 60 代、70-74 歳ではそれぞれ 14.0%、17.3%と高かった。糖尿病は様々な合併症をひきおこし、失明、人工透析導入の原因としての糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症の早期発見、治療が重要である。今回の解析から未治療群において糖尿病が疑われる者が男で 4.9%、女で 2.8%潜在していた。また、治療群においても HbA1c8.0%を上回る割合は全体で男 13.6%、女 11.4%と高い状況であった。特に男女とも若年群でその割合が高く、治療群においても血糖が十分コントロールされていない状況が明らかとなった。大阪府豊能医療圏域において保険薬局に院外処方箋を持参した糖尿病患者 1,026 名を対象にした実態調査によると約半数が血糖管理目標に達しておらず、特に 50 代後半から 60

代に血糖管理が悪い者の割合が高かったと報告されている⁶⁾。インスリン治療を受ける2型糖尿病患者において服薬または受診の不履行は、全死因死亡率を上昇させるとの報告がある⁷⁾。特定健診の機会に保健指導非該当者も含め専門医への受診を強く促すとともに、治療者においても血糖管理の重要性をさらに周知徹底し、地域において診療連携をさらに推進する必要がある。

今回は特定健診データに基づき愛知県内の服薬者割合と服薬の有無別に生活習慣病のコントロール状況を解析した。特に若年群での血圧や血糖等の管理が不十分な状況は、将来の医療費適正化の観点からも喫緊の課題であり、働き盛り世代からの適切な指導や早期受診勧奨を推進する必要がある。

今後も地域における健康課題を明確にし愛知県における健康増進計画策定などに有用となる情報提供をめざして、特定健診・保健指導データや保健医療統計データを活用した地域診断を実践する予定である。

謝 辞

特定健診・保健指導データ提供にご協力いただきました愛知県健康福祉部健康担当局健康対策課及び各医療保険者の皆様にあらためて深謝いたします。本研究のデータ処理・分析にご協力いただきました續木雅子様に心より感謝します。

文 献

1)厚生労働省：平成23年国民健康・栄養調査報告；<http://www.mhlw.go.jp/bunya/>

[kenkou/eiyou/h23-houkoku.html](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/h23-houkoku.html)

2)厚生労働省：平成22年国民健康・栄養調査報告；<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/h22-houkoku.html>

3)Keamey PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, He J:Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. Journal of Hypertension 22(1): 11-19,2004.

4)Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ,the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee: Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. Journal of Hypertension 42(12):1206-1252, 2003

5)高血圧治療ガイドライン2009(日本高血圧学会治療ガイドライン作成委員会編)日本高血圧学会発行：<http://minds.jcqhc.or.jp/n/med/4/med0019/G0000180/0001>

6)岸本一郎、芦田康宏、大盛陽子他：大阪府豊能医療圏における糖尿病実態と連携手帳所持率調査、糖尿病 56(8):543-550,2013

7)Currie CJ, Peyrot M, Morgan CL, PooleCD,Jenkins-Jones S, Rubin RR, Burton CM, Evans M. The impact of treatment noncompliance on mortality in people with type 2 Diabetes. Diabetes Care 35(6):1279-1284, 2012

Evaluation of health conditions across Aichi Prefecture using specific health checkup data - Comparison of lifestyle-related diseases according to medical treatment -

Kaoru Hirose, Makoto Oguri, Michiko Hamatake, Hironori Ohmi, Hiroko Minagawa

To reinforce health promotion program against lifestyle-related diseases in Aichi Prefecture by providing scientific basis, we evaluated the health conditions of people across Aichi Prefecture using data of specific health checkup and specific counseling guidance program focused on metabolic syndrome. Data obtained in fiscal year (FY) 2008 was provided by the insurers pursuant to the national uniform requirements set. A total of 885,899 beneficiaries were included. Comparison was made between medication noncompliers and compliers.

Hypertensive individuals were 18.7% in male and 15.2% in female among those who do not take an antihypertensive agent. Approximately 40% of subjects with medical treatment were not being controlled to blood pressure levels less than 140/90mmHg. Approximately 25% of subjects who had hypercholesterolemic drug were hyper LDL-cholesterolemia(140mg/dl) and those in non-treatment group were 31.4% in male, 37.8% in female, respectively. The proportions of latent diabetes patients who do not have an antidiabetic agent and were not treated with insulin were 4.9% in male, 2.8% in female, respectively. Among medical treatment group, the percentages of subjects who had higher HBA1c (>8.0%) were 13.6% in male and 11.4% in female, and younger age groups in both sexes were likely to show poor glucose control.

The effort to lower the morbidity rate of lifestyle-related diseases by management of hypertension, hyperglycemia and hyperlipdemia are major public health challenges for Aichi Prefecture. Measures are required at a population level to prevent the development of lifestyle-related diseases and to improve awareness, adequate treatment and control of hypertension, hyperglycemia and hyperlipidemia in the community.

Key words : community diagnosis, specific health checkup, life-style related diseases, medication status

調 査 研 究

愛知県におけるノロウイルス流行状況と分子疫学解析 - 2008/09 ~ 2012/13 シーズン -

小林慎一、中村範子、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、山下照夫、皆川洋子

要 旨

ノロウイルス(NV)は感染性胃腸炎及びわが国における食中毒の主要な病原ウイルスの一つである。2008/09 から 2012/13 の 5 シーズンに愛知県内の病原体定点医療機関で感染性胃腸炎患者から採取された糞便及び嘔吐物 1,609 検体について semi-nested RT-PCR 法を用いてノロウイルス遺伝子検査を実施した。NV が 599 検体 (37.2%) から検出され、遺伝子グループ I (GI) 陽性が 12 検体(2.0%)、遺伝子グループ II (GII) 陽性が 587 検体(98.0%)であった。NV 陽性検体の遺伝子配列に基づく系統樹解析の結果、GI は 4, 6, 7 の 3 遺伝子型に、GII は 2, 3, 4, 6, 12, 13, 14 の 7 遺伝子型に型別された。その内、GII.4 と GII.3 が主要な遺伝子型であった。GII.4 の遺伝子変異解析を目的に、GII.4 陽性の 351 検体をクラスター分類したところ、2004, 2006b, 2008a, 2008b, 2009a, 2012 の 6 変異型に分類された。2006b 型は 5 シーズンの内の 4 シーズンで流行を認めたが、2012/13 シーズンは 2012 変異型が新たに出現し、2006b に代わり大勢を占めた。NV 感染症の制御や流行予測の実用化には、NV の遺伝子型及び変異型の継続的監視が重要である。

キーワード： 感染性胃腸炎、ノロウイルス、分子疫学、サーベイランス

序 文

ノロウイルス (NV) は、乳幼児から高齢者までの幅広い年齢層のヒトに感染し、冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスの一つである¹⁾ とともにわが国におけるウイルス性食中毒のほとんどを占めている²⁾。NV は全長約 7.5kb のプラス 1 本鎖 RNA ウイルスであり、カリシウイルス科ノロウイルス属に分類される。NV のゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、ゲノム塩基配列の相同性に基づき Group I ~ V の 5 遺伝子グループに分類されている³⁾。GI, GII, GIV がヒトに感染するが、GI と GII が主流である。さらに、G は 9 種類 (GI.1 ~ GI.9)、G は 22 種類 (GII.1 ~ GII.22) の

遺伝子型 (genotype) に分類されている⁴⁾。しかしながら、NV は未だ培養細胞で増殖できず、感染実験モデル動物もないことから、NV の遺伝子型間の増殖性や病原性の差異は不明である。

2006 年 9 月に始まった 2006/07 (以下 06/07 と記す) シーズンは、NV に起因する感染性胃腸炎が全国的に流行する中で、NV 感染調理従事者を介した食中毒事件、及び老人福祉施設、病院や学校などでの NV 集団感染事例が多発し、大きな社会問題となった。GII.4 の新たな遺伝子変異型 (2006b 型) の出現が 06/07 シーズンにおける NV 大流行の主たる要因と考えられている^{5,6)}。06/07 シーズン以降も、2 年毎に感染性胃腸

炎の大きな流行が認められ、特に 12/13 シーズンには 06/07 シーズンに次ぐ規模で全国的に感染性胃腸炎が流行した⁷⁾。感染性胃腸炎の発生動向には NV の流行状況の関与が大きいと想定されることから、NV 感染症の制御には、流行遺伝子型の分布や遺伝子変異に関する流行動態の実態把握が重要である。

本稿では2008 年9月から2013 年8月までの5シーズンに、愛知県感染症発生動向調査事業の病原体定点（名古屋市を除き中核市病原体定点を含む）において採取された感染性胃腸炎患者由来検体からのNV検出状況、遺伝子型別及び変異型クラスター解析の結果を報告する。

材料と方法

1. 検査検体

2008 年9月から2013 年8月までの5シーズンに愛知県内の感染症発生動向調査病原体定点（名古屋市を除き中核市を含む）31箇所採取された散発性感染性胃腸炎患者の糞便及び嘔吐物（08/09シーズン：319検体と48検体、09/10：234と41、10/11:280と34、11/12:263と45、12/13:319と26）計1,609検体を検査対象とした。

2. NV検査法

Veal infusion broth で糞便を10 %乳剤、嘔吐物は50 %乳剤とした後、10,000xg で遠心分離し、上清からHigh Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany) を用いてウイルスRNAを抽出した。NV遺伝子検出検査はウイルス性下痢症診断マニュアルに収載されたプライマーを用いたRT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 法により実施した⁸⁾。

NVの遺伝子型は、構造タンパク遺伝子のPCR増幅産物をWizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) で精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, USA) を用いたダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、

Katayamaらの方法に従い遺伝子型別した⁹⁾。NV GII.4陽性検体については、さらにGII.4 のクラスター分類を目的として既知のGII.4 変異株との相同性を解析し、ClustalWを用いた近隣結合 (NJ) 法で系統樹解析した。

結果及び考察

1. NV検出状況

1,609 検体中GI型NV陽性が12検体(0.7%)、GII型NV陽性が587検体(36.5%)とGII型がGI型と比べて高率に検出された。シーズン別の検出率は08/09が26.7%、09/10:45.1%、10/11:41.1%、11/12:42.2%、12/13:34.2%であり、08/09シーズンを除いては、シーズン毎の検出率に大きな変動を認めなかった。

図1に検体採取月別のNV検出数と愛知県感染症発生動向調査における小児科定点当たりの感染性胃腸炎患者報告数の推移を示した。感染性胃腸炎は例年12月にピークを迎えるが、調査期間内では、2008年、10年、12年と2年毎に流行が大きい傾向が認められた。感染性胃腸炎の流行状況に合致してNV検出数も推移したが、NVは概ね年間を通じて検出された。

2. NVの遺伝子型別

調査期間内に検出されたNVを塩基配列に基づいて遺伝子型別した結果、GIで4,6,7の3遺伝子型、GIIで2,3,4,6,12,13,14の7遺伝子型に分類され、県内での多様な遺伝子型のNV流行を認めた。図2にGII NVのシーズン別・遺伝子型別の成績を示した。10/11シーズンを除いての4シーズンでNV GII.4が首座を占めたが、10/11シーズンは、GII.4に代わりGII.3が優勢であった。

3. NV GII.4の変異型解析

2006/07 シーズンには、GII.4 2006b 型に分類される新たな変異株が出現し、世界的に大流行した^{10,11)}。そこで、GII.4 の遺伝子変異解析を目的に、GII.4陽性の351検体についてクラスター分類し、図3にシーズン別の変異型検出割合として示した。調査

期間内に検出されたGII.4は、2004、2006b、2008a、2008b、2009a、2012型の6変異型に大別された。08/09と09/10シーズンは、06/07に大流行した2006bが高頻度に検出されたが、10/11、11/12では次第に検出割合が減少する一方で、2009aの検出割合が高くなった。12/13シーズンでは、新たに出現した2012が大勢を占めた。GII.4の遺伝子変異が、NV流行に関与するひとつの要因と推察された。

まとめ

2010年4月から2011年3月までに名古屋市を除く愛知県内の感染症発生動向調査病原体定点で採取された、散発性感染性胃腸炎患者の糞便及び吐物合計1,609検体中599検体(37.2%)からNVが検出された。検出ウイルスの大勢はGII NVであったが、遺伝子解析の結果、主要な流行遺伝子型はGII.4及びGII.3であった。06/07シーズンのNV大流行に関与したGII.4 2006bが、07/08から11/12

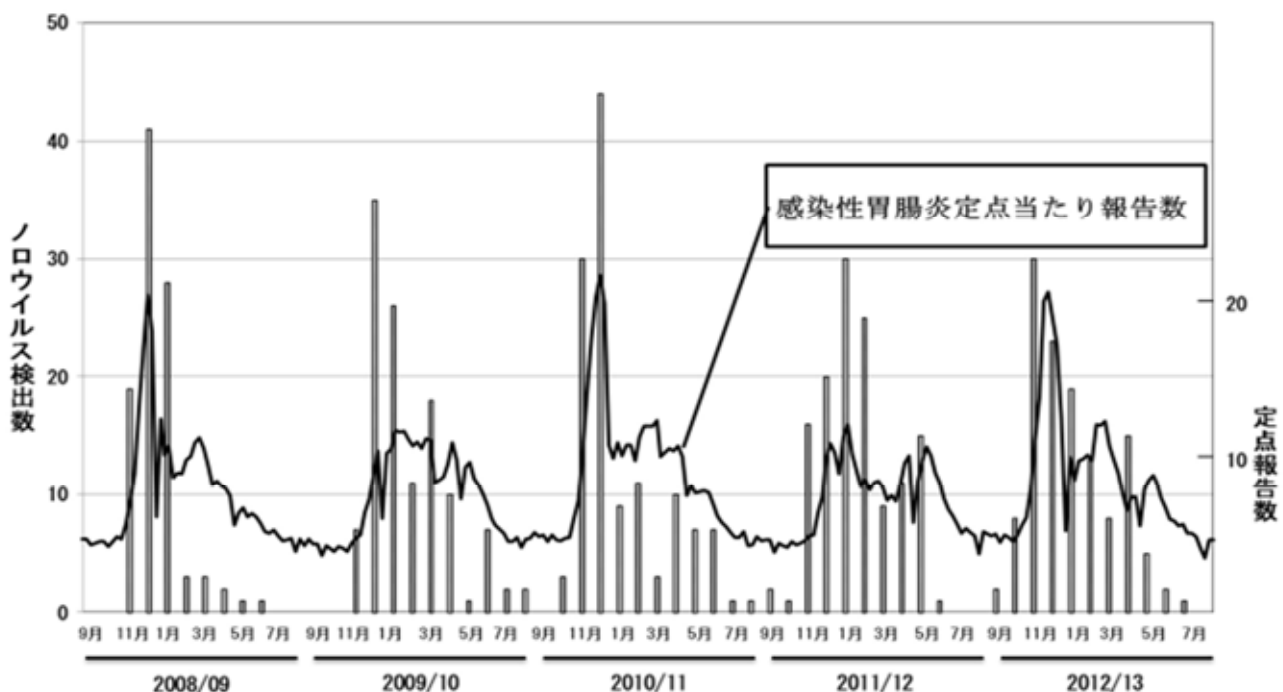


図1 ノロウイルスのシーズン別検出状況と感染性胃腸炎の流行状況（愛知県）

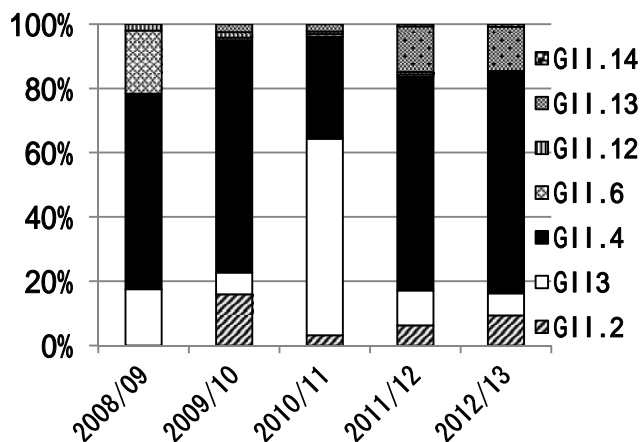


図2 GII型ノロウイルスの遺伝子型・シーズン別検出状況

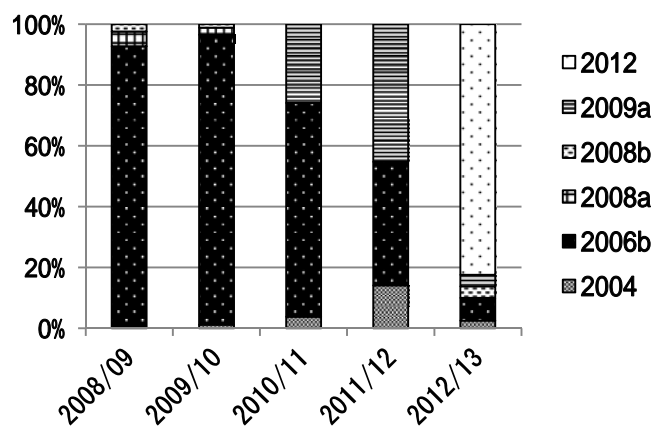


図3 シーズン別のノロウイルスGII.4の変異型検出状況

の4シーズンも主要な流行NVであったが、2012/13シーズンには、新たな遺伝子変異型であるGII.4 2012が大流行した。2006b及び2012ともに、全世界規模で同時多発的に流行したが、世界的流行の要因特定には至っていない^{12,13)}。

今回の調査期間(5シーズン)の間に、愛知県内では少なくとも6種類のGII.4変異株が流行していたことが明らかとなった。その中で2006b変異型は、シーズンを追うごとに感受性者の減少に伴って流行規模の縮小はみられたものの、12/13シーズンに2012変異型が出現するまでは、優勢な変異株であった。GII.4はヒトでの感染を繰り返す中で多様な変異型が出現しているが、その中から感染性や増殖性に優れたウイルスが大規模流行を起こすと推察される。

NVの培養増殖系及び感染動物実験系は未確立であるので、遺伝子型間及び変異型間の増殖性や病原性の差異は不明である。抗ウイルス剤やワクチン開発の可能性を高めるためにも、NV感受性細胞株の樹立若しくは発見が強く望まれる。喫緊のNV流行予測や防疫対策には、感染症発生動向調査はじめ、集団発生若しくは食中毒事例関連疫学調査におけるNVの遺伝子型や遺伝子変異の継続的監視が重要である。

謝 辞

愛知県内の定点医療機関、愛知県、豊田市、豊橋市及び岡崎市の各保健所、愛知県健康福祉部健康担当局健康対策課及び生活衛生課の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Glass RI, Parashar UD, Estes MK: Norovirus Gastroenteritis. *New England Journal of Medicine* 361(18):1776-1785, 2009.
- 2) 品川邦汎: わが国の食中毒の変遷 特に、微生物食中毒を中心に. *臨床とウイルス* 41(1):37-43, 2013.
- 3) Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS: Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346(2): 312-323, 2006.
- 4) Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M: Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives Virology* 158(10):2059-2068, 2013.
- 5) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T *et al.*: Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 Norovirus GII/4 epidemic population by genome wide tracing of evolutionary history. *Journal of Virology* 82(22): 11247-11262, 2008.
- 6) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T *et al.*: Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *Journal of Virology* 84(16):8085-8097, 2010.
- 7) 国立感染症研究所: ノロウイルス GII/4 の新しい変異株の遺伝子解析と全国における検出状況:
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/2957-pr3942.html>
- 8) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル ウイルス性下痢症検査マニュアル (第3版), 2003
- 9) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F B, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y *et al.*: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299(2):225-239, 2002.

- 10) Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinje J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S *et al.*: Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *The Journal of Infectious Diseases* 200(5):802-812, 2009.
- 11) Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O: Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *Journal of Clinical Virology* 56(3):185-193, 2013.
- 12) van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinje J *et al.*: Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance* 18(1):8-9, 2013.
- 13) Barclay L, Wikswo M, Gregoricu N, Vinje J, Lopman B, Parashar U, Hal A: Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney-United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 62(3): 55, 2013.

Detection and genetic characterization of Norovirus in infectious gastroenteritis patients in Aichi Prefecture from 2008-09 to 2012-13 seasons

Shinichi Kobayashi, Noriko Nakamura, Hirokazu Adachi, Miyabi Ito, Yoshihiro Yasui, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Norovirus (NV) is recognized as one of the most common causative agent of acute gastroenteritis. A total of 1,609 fecal samples were collected from patients with acute gastroenteritis in the pediatric sentinel hospitals in Aichi Prefecture during the 2008-09 and 2012-13 seasons, and then tested for NV by semi-nested RT-PCR. NV was detected in 599 (37.2%) of these samples. Of the 599 NV-positive samples, 12 (2.0%) belonged to Genogroup I (GI), 587 (98.0%) belonged to Genogroup II (GII). NV-positive samples were further characterized by sequencing of the PCR products and phylogenetic analysis. For NV GI, three genotypes were identified: GI.4, GI.6 and GI.7. NV GII could be classified into seven distinct genotypes: GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GII.12, GII.13, and GII.14. GII.4 and GII.3 were found to be the most frequently detected genotypes. Phylogenetic analysis indicated that 351 GII.4-positive strains were classified into six GII.4 variants including 2004, 2006b, 2008a, 2008b, 2009a and 2012 within a GII.4 cluster. GII.4 2006b was the most common GII.4 variant during 4 seasons, but emergence of GII.4 2012 variant replaced 2006b epidemic in 12/13 season. Continuous monitoring of the NV genotypes and emergence of GII.4 variant should be needed to control and forecast the NV infection.

Key words: infectious gastroenteritis, Norovirus, genetic analysis, surveillance

調 査 研 究

黄色ブドウ球菌の全ゲノム配列を利用した系統樹解析

青木美耶子、鈴木匡弘、松本昌門、山下照夫、皆川洋子

要 旨

次世代シーケンサーの登場により、ゲノムデータの利用が容易になったことでゲノムを利用した分子疫学解析が一層身近になった。これまで分子疫学解析のスタンダードであったパルスフィールドゲル電気泳動に代わる分子疫学解析手法の開発を目的に、データベース上の clonal complex 5(CC5)のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のゲノム塩基配列を用いて一塩基多型(SNP)による系統樹解析を試み、利用可能性を検討した。

“N315”株と比較したところ、“N315”ゲノム上の7,768か所にSNPが分布しており、株により375個~1,236個が見られた。さらに、sequence type(ST)105、ST228などの特定のST型は、系統樹上では近縁なクラスタ内に配置された。SNPによる系統樹解析は比較的近縁な細菌ゲノムを比較し、近縁関係を決めるのに実用的な手法であると考えられた。しかし、感染の疫学調査に使うためには、さらなる検討とデータ蓄積が必要である。

キーワード：系統樹解析、一塩基多型、黄色ブドウ球菌、全ゲノムデータ

序 文

黄色ブドウ球菌は、主なヒト病原体のひとつとして知られ、伝染性膿痂疹、毒素性ショック症候群、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、敗血症など様々な感染症及び毒素性食中毒の起因菌となる。薬剤耐性を獲得した株の蔓延も著しく、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*:MRSA)は我が国において一般的な院内感染原因菌となっている。また、MRSAは院内感染のみならず市中感染もみられる^{1,2)}。接触感染により容易に伝播するMRSAの感染対策には、分離菌株の識別による感染経路の調査が重要となる。MRSAはパルスフィールドゲル電気泳動(pulsed-field gel electrophoresis:PFGE)

によって多様な遺伝子型に分けられることが明らかとなっている³⁾。PFGEでは全ゲノムDNAを制限酵素で切断し、そのDNA断片の泳動パターンにより株同士を区別する。この泳動パターンの解析により、ほぼ十分な菌株識別能力が得られるため、PFGEは感染経路の調査に威力を発揮する。しかし、PFGE解析のみでは個々のバンドパターンの変化がどのような遺伝的变化に基づいているかは判明しない。従ってMRSAゲノムの変化の詳細や進化系統の研究などをPFGEで実施するには限界があった。

近年の塩基配列解析技術の進歩により、全ゲノムを解析することが容易となった。全ゲノム解析によって病原因子や耐性機構、進化系統解析などができると期待さ

れている。MRSA のゲノムとしては日本の分離株である “N315”、“Mu50” が 2001 年に解析され、耐性遺伝子や病原性アイランドなどゲノムについての理解が進んだ⁴⁾。当初はサンガーシーケンスによって全ゲノム解析したため、多大な費用と長い時間を要した。2005 年にパイロシーケンサーが発売されると、塩基配列解析能力は飛躍的に増大し、細菌サイズのゲノムであれば、全ゲノムを比較的 low コストで、容易に解読できるようになった⁵⁾。全ゲノム解析が容易になったことで、細菌の遺伝子解析は飛躍的に進歩しつつある。例えば複数菌株の全ゲノムの系統解析を行うことで、それぞれの菌がどの系統に属しどの程度の相同性を持っているか、解明できると期待される。

ところが現状では、細菌サイズのゲノムデータをそのまま系統樹解析することは、技術的に難しい。その解決法として、塩基置換による多型性、すなわち一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) による分析が考案された。SNP のみを用いて系統樹解析することで標準的なパーソナルコンピュータでも容易に解析が可能である。しかし、SNP による系統樹解析の定法が確立されているわけではない。

そこで、本研究ではデータベース上の全ゲノム塩基配列を用い、SNP による系統樹解析を試み、将来的に PFGE 解析に代わる分子疫学解析として利用できるか検討することを目的とした。

材料および方法

1 ゲノムデータ

Multi locus sequence typing (MLST) による sequence type (ST) 5 (1-4-1-4-12-1-10) およびその変異型である clonal complex 5 (CC5) の黄色ブドウ球菌全ゲノムデータを National Center for Biotechnology Information (NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) からダウンロードした。用いたデータは全

ゲノム解析が完了し、全体が 1 本につながった 16 株、および複数の断片からなるドラフトデータ 145 株である。ST228 (1-4-1-4-12-24-29) の 8 株は同一病院由来とされる⁶⁾。株の詳細については表 1 に示す。

2 データ解析

外来遺伝子を除いたコアゲノムによる解析を行うため、溶原ファージ、SCC*mec*、病原性アイランドなど明らかな外来遺伝子を除いた。さらに、indel (insert と deletion) の影響が出やすい繰り返し配列を持つ遺伝子として、*clfA*、*spa*、*coa*、SA2447 も除外した。

SNP の検出には MUMmer¹²⁾ を用いた。“N315”ゲノムデータをリファレンスとして MUMmer のパッケージのひとつである NUCmer スクリプトによって比較した後、show-snps スクリプトを用いて SNP を抽出した。その際、indel は無視した。Microsoft Access 2010 へ SNP ファイルをインポートし、整列した。SNP ファイルをテキスト形式でエクスポートし、FastTree¹³⁾ の generalized time-reversible model オプションを使ってブートストラップ値を計算し、系統樹ファイルを作成した。作成した系統樹ファイルは MEGA5¹⁴⁾ で描画した。

結果

“N315”株と比較したところ、株により 375 個～1,236 個の SNP が見られた。Microsoft Access 2010 上で SNP を集め、整列した結果 7,768 塩基からなる配列が得られた。7,768 塩基からなる配列を用いて系統樹を作成した (図 1)。

SNP はおおむねゲノム全体に散在していたが、株によっては一部の領域に SNP が集中する場合も見られた。また、全ての株で SNP の分布パターンは異なっており、CC5 内においても SNP の多様性が見られた。さらに、ST105 (1-4-1-4-12-1-28)、ST228 などの特定の ST 型は、系統樹上では近縁なクラスタ内に配置された。

表1 使用菌株データ

株名(Accession number)	ST***	文献または 解析機関
A5937(NZ_ACKC00000000)、A6224(NZ_ACKE00000000)、A6300(NZ_ACKF00000000)	5	Cameron D R, et al. 7)
CGS03(NZ_ABWY00000000)	5	Center for Genomic Sciences, Allegheny-Singer Research Institute (PA, USA)
B147830(NZ_AIWZ00000000)、B40723(NZ_AIWX00000000)、 B40950(NZ_AIWY00000000)、B53639(NZ_AIWW00000000)、 M0029(NZ_AIVR00000000)、M0035(NZ_AIVS00000000)、M0075(NZ_AQFY00000000)、 M0102(NZ_AIVW00000000)、M0108(NZ_AJCC00000000)、M0154(NZ_AJCE00000000)、 M0173(NZ_AIVZ00000000)、M0177(NZ_AJCF00000000)、M0192(NZ_AIWA00000000)、 M0210(NZ_ANZL00000000)、M0212(NZ_AJCH00000000)、M0213(NZ_ANZM00000000)、 M0216(NZ_AJCI00000000)、M0235(NZ_AJCK00000000)、M0237(NZ_AIWD00000000)、 M0240(NZ_ANZN00000000)、M0250(NZ_AJCK00000000)、M0273(NZ_ANZP00000000)、 M0279(NZ_ANZQ00000000)、M0306(NZ_AJCN00000000)、M0329(NZ_AIWI00000000)、 M0330(NZ_AIWJ00000000)、M0347(NZ_AIWL00000000)、M0351(NZ_AJCS00000000)、 M0363(NZ_AJCR00000000)、M0364(NZ_AIWM00000000)、M0367(NZ_AJCS00000000)、 M0374(NZ_AJCT00000000)、M0391(NZ_AIWN00000000)、M0404(NZ_ANZT00000000)、 M0427(NZ_AIWP00000000)、M0438(NZ_AJCX00000000)、M0460(NZ_ANZW00000000)、 M0467(NZ_AIWR00000000)、M0493(NZ_ANZX00000000)、M0510(NZ_AJZ00000000)、 M0528(NZ_AIXB00000000)、M0536(NZ_AIXD00000000)、M0562(NZ_AJDB00000000)、 M0565(NZ_AIXG01000000)、M0580(NZ_AIXH00000000)、M0584(NZ_AJDD00000000)、 M0622(NZ_AIXJ00000000)、M0628(NZ_AIYG00000000)、M0673(NZ_AOAC00000000)、 M0676(NZ_AIXK00000000)、M0687(NZ_AIXL00000000)、M0695(NZ_AOAD00000000)、 M0769(NZ_AIXO00000000)、M0780(NZ_AIXQ00000000)、M0822(NZ_AOAF00000000)、 M0871(NZ_AOAH00000000)、M0892(NZ_AOAK00000000)、M0900(NZ_AOAL00000000)、 M0927(NZ_AOAM00000000)、M0943(NZ_AIXV00000000)、M0953(NZ_AIXX00000000)、 M0994(NZ_AOAQ00000000)、M0998(NZ_AIXY00000000)、M0999(NZ_AIXZ00000000)、 M1010(NZ_AIYB00000000)、M1015(NZ_AIYC00000000)、M1016(NZ_AIYD00000000)、 M1036(NZ_AIYE00000000)、M1037(NZ_AIYF00000000)、M1044(NZ_AOAS00000000)、 M1060(NZ_AQGA00000000)、M1062(NZ_AOAU00000000)、M1068(NZ_AOAV00000000)、 M1078(NZ_AQGB00000000)	5	Broad Institute of MIT and Harvard(MA, USA)
CIG1057(NZ_AHVK00000000)、CIG1096(NZ_AIER00000000)、 CIG1165(NZ_AHVE00000000)、CIG1213(NZ_AHVF00000000)、 CIG1750(NZ_AHVX00000000)、CIG1769(NZ_AHVG00000000)	5	Institute for Genome Sciences, The University of Maryland School of Medicine (MD, USA)
IS-3(NZ_AHLL00000000)	5	The J. Craig Venter Institute (MD, USA)
N315(BA000018)、Mu50(BA000017)	5	Kuroda M, et al. 4)
ECT-R2(NC_017343)	5	Lindqvist M, et al. 8)
ED98(NC_013450)	5	Loeder B V, et al. 9)
Mu3(NC_009782)	5	Neoh HM, et al. 10)
A10102(NZ_ACS00000000)、A9719(NZ_ACKJ00000000)、 A9763(NZ_ACKK00000000)、A9781(NZ_ACKL00000000)	5	Broad Institute of MIT and Harvard(MA, USA)
JH1(CP000736)、JH9(CP000703)	105	US DOE Joint Genome Institute (CA, USA)

表1 使用菌株データ(続き)

株名(Accession number)	ST***	文献または 解析機関
M0001(NZ_AIVQ000000)、M0006(NZ_AJBY000000)、M0045(NZ_AIVT000000)、 M0060(NZ_AJCA000000)、M0066(NZ_AIVV000000)、M0077(NZ_AJCB000000)、 M0103(NZ_AIVX000000)、M0104(NZ_ANZJ000000)、M0144(NZ_AJCD000000)、 M0150(NZ_AIVY000000)、M0171(NZ_ANZK000000)、M0197(NZ_AIWB000000)、 M0200(NZ_AJCG000000)、M0252(NZ_AIWF000000)、M0270(NZ_ANZO000000)、 M0280(NZ_AJCM000000)、M0288(NZ_ANZR000000)、M0294(NZ_AQFZ000000)、 M0326(NZ_AIWG000000)、M0328(NZ_AIWH000000)、M0334(NZ_AJCO000000)、 M0350(NZ_AJCP000000)、M0375(NZ_AJCU000000)、M0415(NZ_ANZU000000)、 M0489(NZ_AIWU000000)、M0529(NZ_AIYH000000)、M0539(NZ_AIXE000000)、 M0547(NZ_AIXF000000)、M0571(NZ_AJDC000000)、M0586(NZ_AJDE000000)、 M0602(NZ_AIXI000000)、M0646(NZ_ANZY000000)、M0648(NZ_ANZZ000000)、 M0660(NZ_AOAA000000)、M0663(NZ_AOAB000000)、M0692(NZ_AIXM000000)、 M0719(NZ_AIXN000000)、M0770(NZ_AIXP000000)、M0792(NZ_AOAE000000)、 M0799(NZ_AIXR000000)、M0823(NZ_AIXS000000)、M0844(NZ_AIXT000000)、 M0934(NZ_AIXU000000)、M0944(NZ_AIXW000000)、M0964(NZ_AOAO000000)、 M1061(NZ_AOAT000000)、M1063(NZ_AIYI000000)、M1076(NZ_AIYJ000000)		Broad Institute of MIT and Harvard(MA, USA)
CIGC348(NZ_AHVT000000)	105	Institute for Genome Sciences, The University of Maryland School of Medicine (MD, USA)
A8796(NZ_ADJJ000000)、A8819(NZ_ADJK000000)	105	Broad Institute of MIT and Harvard(MA, USA)
04-02981(CP001844)	225	Nubel U, et al. 11)
10388(HE579059)、10497(HE579061)、15532(HE579063)、16035(HE579065)、 16125(HE579067)、18341(HE579069)、18412(HE579071)、18583(HE579073)	228	Valérie V, et al. 6)
M0450(NZ_AIWQ000000)	231	Broad Institute of MIT and Harvard(MA, USA)
M0478(NZ_AIWT000000)	496	Broad Institute of MIT and Harvard(MA, USA)
CIGC340D(NZ_AHVR000000)	634	Institute for Genome Sciences, The University of Maryland School of Medicine (MD, USA)
IS-99(NZ_AHLQ000000)	UT*	The J. Craig Venter Institute (MD, USA)
IS-M(NZ_AJLD000000)	UT**	The J. Craig Venter Institute (MD, USA)

* : MLST profiles : 114-4-1-4-12-1-28

*** : sequence type

** : MLST profiles : 114-4-1-4-12-1-10

表2 ST228株相互におけるSNP数

	10388 (HE579059)	10497 (HE579061)	15532 (HE579063)	16035 (HE579065)	16125 (HE579067)	18341 (HE579069)	18412 (HE579071)
18583 (HE579073)	4	19	22	20	24	18	21
18412 (HE579071)	25	26	43	31	45	39	
18341 (HE579069)	20	31	40	36	34		
16125 (HE579067)	28	43	46	44			
16035 (HE579065)	22	19	42				
15532 (HE579063)	26	41					
10497 (HE579061)	15						

日本で分離された株（“N315”、“Mu3”、“Mu50”）は進化系統樹上の比較的近縁な位置に配置されたが、今回用いたゲノムデータにおける主要なクラスタからは離れていた。

ST228 の 8 株は近縁関係にあることが示されたが、文献に掲載された系統樹とは各株の配置が異なっていた。この集団内での SNP 数は“16125”株に対して 24 個～46 個であった（表 2）。この 8 株間で最も SNP が少ない組み合わせは“10388”株と“18583”株間の 4 個、最も多い組み合わせは“16125”株と“15532”株間の 46 個であった。

考 察

今回は CC5 のデータのみを用いたが、全ての株データで SNP の分布は異なっており、SNP を疫学マーカーとして利用可能であることが示唆された。同一 ST 型株は近縁なクラスタに含まれ、おおむね実際の系統を反映した樹形図が描画できていると考えられる。その一方、集団感染とされた集団を解析したわけではないので、同一集団感染事例内における SNP 分布にどの程度変化が生じるかについては、今後データを収集する必要がある。また、今回はゲノムデータのみを用いたため、PFGE との相関も不明である。

唯一文献に SNP による系統樹解析と PFGE パターンが掲載されていた ST228 の 8 株⁶⁾については、文献上の系統樹と我々が作成した系統樹とでは各株の配置が異なっていた。また、どちらの系統樹解析によっても同一 PFGE パターン株が必ずしも近縁な関係にはなかった。系統樹が異なる原因としては、解析ソフトウェアの違いにより SNP の検出感度が異なる可能性、コアゲノムの抽出法の違いによる可能性、系統樹計算法の違いによる可能性などが考えられる。また、ブートストラップ値が高くなかったことから、近縁な株の系統樹解析は困難な可能性もある。今回、我々は MUMmer 及び

FastTree を使用したが、文献では Mugsy¹⁵⁾を使用していた。両者の違いを十分調査するに至らなかったが、より確かな系統樹を作成するために、他のソフトウェアも含め、検討する必要がある。また、PFGE パターンとの関連性については今後データを蓄積する必要がある。

日本で検出された“N315”株、“Mu3”株及び“Mu50”株は樹形図上では主要なクラスタから離れた場所に位置した。上記の株は 10 年以上前に分離された株であることから時間的な距離が離れている可能性や、多くのゲノムデータが欧米で解析された株であることから地理的な原因が考えられる。

SNP による系統樹解析は比較的近縁な細菌ゲノムを比較し、近縁関係を決めるのに実用的な手法であると考えられた。しかし、SNP の検索ソフトウェア、コアゲノムの選定法、系統樹の計算法など課題も多く、今後感染の疫学調査等に実用化するためにはさらなる検討とデータ蓄積が必要である。その一方、全ゲノム解析のコストは低下しており、将来的には PFGE 解析に取って代わる可能性を含めて、今後の進展が大いに期待される。

文 献

- 1) Centers for Disease Control and Prevention: Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997-1999. Morbidity and Mortality Weekly Report 48 (32):707-710, 1999.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin or soft tissue infections in a state prison-Mississippi, 2000. Morbidity and Mortality Weekly Report 50 (42):919-922, 2001.
- 3) Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K,

- Kato N, Takeuchi J: Genomic DNA fingerprinting by Pulsed-Field Gel Electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (12):2690-2695, 1991.
- 4) Kuroda M, et al.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357 (9264):1225-1240, 2001.
 - 5) Karl V V, Shale A D, Jacob D D: Next-generation sequencing: From basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry* 55 (4):641-658, 2009.
 - 6) Valérie V, Laurent F, Sandra P C, Patrick B, Dominique S B: Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital. *PLOS ONE* 7 (6):E38969, 2012.
 - 7) Cameron D R, Ward D V, Kostoulas X, Howden B P, Moellering R C Jr, Eliopoulos G M, Peleg A Y: Serine/threonine phosphatase Stp1 contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases* 205 (11):1677-1687, 2012.
 - 8) Lindqvist M, Isaksson B, Grub C, Jonassen T, Hällgren A: Detection and characterisation of SCCmec remnants in multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing a clonal outbreak in a Swedish county. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 31 (2):141-147, 2012.
 - 9) Loeder B V, et al.: Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (46):19545-19550, 2009.
 - 10) Neoh H M, Cui L, Yuzawa H, Takeuchi F, Matsuo M, Hiramatsu K: Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (1):45-53, 2008.
 - 11) Nubel U, et al.: A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathogens* 6 (4):E1000855, 2010.
 - 12) Kurtz S, Phillippy A, Delcher A L, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg S L: Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology* 5 (2):R12, 2004.
 - 13) Price M N, Dehal P S, Arkin A P: FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLOS ONE* 5 (3):e9490, 2010.
 - 14) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10):2731-2739, 2011.
 - 15) Samuel V A, Steven L S: Mugsy: fast multiple alignment of closely related whole genomes. *Bioinformatics* 27 (3):334-342, 2011.

Phylogenetic analysis of *Staphylococcus aureus* using whole genome sequences

Miyako Aoki, Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Teruo Yamashita,
Hiroko Minagawa

Recent rapid progress of next-generation sequence techniques is expected to make molecular epidemiology using whole genome sequences affordable. In this study, we attempted to construct a phylogenetic tree using single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *Staphylococcus aureus* genomes obtained from public genome database.

By comparisons of the “N315” genome to genomes of other 160 strains belonging to clonal complex 5, SNPs (375 to 1,236/strain) were found and were distributed in 7,768 positions on the “N315” genome. Correlation was observed between the phylogenetic tree based on the SNPs and the sequence types obtained from multi-locus sequence typing.

Thus, phylogenetic analysis based on the SNPs seems to make a good candidate to replace pulsed-field gel electrophoresis analysis as the standard method, provided the required data are further accumulated.

Key words: phylogenetic analysis, single nucleotide polymorphisms (SNPs), *Staphylococcus aureus*, whole genome sequences

調 査 研 究

培養細胞を用いたテトロドトキシン検査法の検討

長谷川晶子、中村瑞那、奥村正直、秦 眞美、山下照夫、皆川洋子

要 旨

テトロドトキシン(tetrodotoxin:TTX)は主としてフグ科魚類が保有し、フグ毒中毒の原因物質である。TTX は細胞のナトリウムチャンネルを選択的に阻害する神経毒で、ヒトなどの哺乳類は筋肉の弛緩に伴う呼吸麻痺を急激に発症し、しばしば致死的事であることなどから食品衛生上重要な自然毒である。TTX の検出は通常マウス試験法(以下マウス法)により行うが、近年、動物愛護・福祉の観点等から動物実験代替法の開発が望まれている。そこで今回、培養細胞を用いた TTX 検出法を構築し、その有用性を検討した。加えてマウス法および機器分析法-液体クロマトグラフィー質量分析法(Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry:LC/MS/MS)との比較を行った。検討の結果、暴露開始から最短 5 時間でマウス法よりも高感度に TTX を検出可能であった。本法による TTX 定量結果はマウス法並びに機器分析法とよく一致し、マウス法に代替可能な試験法である。

キーワード：テトロドトキシン、培養細胞、食中毒

序 文

日本は国土を海で囲まれ、昔から魚介類を好む食習慣があるが、魚介類の中にはフグ毒を始めとする海洋性自然毒(マリントキシン:marine toxin)を保有するものが少なくなく、これを原因とする食中毒がしばしば発生している。マリントキシンを原因とする食中毒は発生件数が少ないものの重篤な症状を引き起こすものが多く、とりわけフグ毒は、我が国において毎年数名の死亡例のみられる致命率の高い食中毒原因物質である。フグ毒(テトロドトキシン:tetrodotoxin(以下 TTX))は、重量当たりシアン化カリウムの 1000 倍以上の毒力を持つ神経毒で、調理に用いる熱や酸処理では分解されない。症状は喫食後 20 分~3 時間程度で麻痺、けいれんが起り、最悪の場合呼吸麻痺により死亡する。有効な治療法はなく、人工呼吸器による呼吸の確保が唯一の救助法である¹⁾。フグ毒は主に神経

細胞のナトリウムチャンネルをブロックし、細胞外からのナトリウムイオンの流入阻害により神経・筋伝達系をブロックし、ヒトに呼吸麻痺を起こす物質である²⁾。マリントキシンは、毒の成分が単一でないことが特徴である。フグ毒も TTX を始めそれに構造のよく似た複数の誘導体があり、ナトリウムチャンネルに対する親和性の差で毒性が大きく異なる^{3,4)}。成分が単一でないことから機器分析法での測定は難しく、毒力を包括的に測定できるマウス法が主に用いられている。その方法は、調製した検体をマウスの腹腔内に投与し、致死時間等から毒力を測定する⁵⁾。毒力は MU(マウスユニット)で表される。しかしながら、マウス法には次のような問題点がある。

近年、欧米を中心として強い動物実験の反対運動があり、動物愛護・福祉の観点から毒性試験をなるべく動物を使用しない方法に置き換えることが求められている。

検査に体重を厳密に管理されたマウスが必要になるため緊急事態に迅速に対応できない

生体を用いるため測定結果のばらつきが大きい

当所では、これまでマウス法の代替法として培養細胞を用いたマリントキシン検出法の実用化に取り組み、麻痺性貝毒[ゴニオトキシン(gonyautoxin: GTX)群、C1、C2群等]、パリトキシン(palytoxin: PTX)、シガトキシン(ciguatoxin: CTX)に関して生物試験法としての有用性を検討してきた⁶⁻¹⁰⁾。培養細胞を用いた試験法は、目的物質の細胞に対する薬理作用を利用して細胞活性の変化により検出するものである。TTXはナトリウムチャンネルを阻害する薬理作用を持ち、これと反対の作用を有する物質にウアバイン(ouabain: O)、ベラトリジン(veratridine: V)、CTX等がある。TTX検出法の原理は次のとおりである。培養細胞のナトリウムチャンネルのゲートをウアバイン等で開放すると、細胞内へ過剰なナトリウムイオンが流入し、一定時間後に細胞は死滅する。ここにTTXが存在すると、ナトリウムイオンの過剰な流入を妨げ、細胞が死滅するまでの時間が延長する。従って、一定時間後の細胞活性を測定することで、TTXを検出することができる。

培養細胞を用いたTTX検出法はこれまでも報告があるが、暴露時間がいずれも24時間程度で、迅速性に問題があった^{11,12)}。今回添加試薬O、Vに新たに合成シガトキシンCTX3Cを加え、迅速かつ安定的なTTX検出法を開発し、その有用性を検討するとともに、マウス法および機器分析法-液体クロマトグラフィー-質量分析法(Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry: LC/MS/MS)との比較を行った。

材料と方法

1. トキシン標準品の調製

TTX標準品(206-11071, 和光純薬)を滅菌蒸留水に溶解してストック溶液(100 ng/mL)を作成し、-20℃で保存した。TTX標準溶液は、TTXストック溶液を滅菌蒸留水

で希釈し作製した。

2. 細胞培養

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞(ECACC:89121404)は、増殖用培地としてRPMI 1640に10%ウシ胎児血清、100 U/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシン、1 mMピルビン酸ナトリウムを添加した培地を用い5%CO₂ 37℃の条件下で培養した。試験用培地として、血清及び添加試薬を加えないRPMI1640を用いた。培地、血清、培地添加試薬は、いずれもInvitrogen社製品を用いた。

3. 実検体試料の作製

実検体として、フグ8種(ヒガンフグ、ヨリトフグ、クロサバフグ、コモンフグ、ゴマフグ、マフグ、シヨウサイフグ、シロサバフグ)の筋肉、皮、肝臓、精巣および卵巣を用いた。細胞試験法、マウス法に用いる試験液は、「食品衛生検査指針理化学編フグ毒マウス検定法」⁵⁾の方法に従い作製した。LC/MS/MS機器分析実施にあたっては、上記試験液をC18カートリッジ(Sep-Pak C18, Waters)に通過させ、蒸留水で適宜希釈の後検液とした。

4. 検体条件検討試料の作製

TTXストック液を塩分濃度0~18%食塩水で1.6 µg/mLに調整した試験液を塩耐性の検討に用いた。TTXストック液をpH1~11に調整した蒸留水で1.6 µg/mLに希釈した試験液を作製し、pH耐性の検討に用いた。また、血清、尿の限外ろ過フィルター処理を行ったものを行わないもの、及び人工胃液(塩酸7 mL、ペプシン1 g、蒸留水1 L: pH1.2)でTTXストックを段階希釈したものを試験液とし、生体試料の影響を検討した。

5. 試薬の調整

(O)液はウアバイン八水和物(ouabain octahydrate, SIGMA)をPBSに溶解して10 mMに調製した。(V)液はベラトリジン(veratridine, SIGMA)を0.01 M塩酸(和光純薬)に溶解して1 mMに調製した。両溶液

は-20℃で保存し、必要時に溶解し、(0)液と(V)液を1:1で混合した液をO/V液とした。CTX液はCTX3Q(30-21581,和光純薬)をメタノールに融解して100 ng/mLに調整したものをを用いた。

6. TTX 検出法

試験は当所より既報の麻痺性貝毒等の試験法^{5,6)}を改変し、以下の系で行った。試験時には陽性コントロールとして1.6 µg/mL濃度のTTX標準溶液、陰性コントロールとして蒸留水を同時に暴露した。また、O/V液、CTX液を加えず試験用培地におきかえ試験液5 µLを加えたものを同時に暴露し、試験液の細胞毒性の有無を確認した。試験は3ウェル並行で行い、各ウェルの実測値の算術平均を測定値とした。

前培養

96ウェルマイクロプレート(平底、353072、Falcon)に 5×10^4 /ウェルのNeuro2a細胞を播種し、増殖用培地100 µLで24時間培養した。

検体の曝露

前培養で用いた培地を除いて、各ウェルに、試験用培地50~95 µL、O/V液10~40 µL、CTX(0~10 ng/mL)5 µL、試験液を5 µL加え、1ウェルあたりの液の総量を100 µLとした。攪拌振とう器(マイクロプレートミキサーNS-P、井内盛栄堂)で3~5秒攪拌した後、5%CO₂37℃の条件下で一定時間の曝露を行った。

試験液として、TTX標準溶液、実検体、検体条件検討試料のいずれかを用いた。検体は、適宜滅菌蒸留水で希釈して試験液とした。

生細胞数の測定

の操作の後ウェル内の液を除いて、50 µLの試験用培地でウェルを2回洗浄した後、試験用培地90 µLとCell Counting Kit-8溶液(同仁化学)10 µLを各ウェルに加えて、5%CO₂37℃の条件下で1時間培養して呈色反応を行った。マイクロプレートリーダー(Model 680、Bio-Rad)にて測定波長450 nm、参照波長620 nmにおける吸光度を測定した。

解析

においてO/V液を加えず、試験液の代わりに滅菌蒸留水5 µLを加えたウェルを、細胞生存率100%のウェルとした。このウェルの吸光度の値を100%として、各ウェルの吸光度の割合を求め、それを各ウェルでの細胞生存率とした。

TTX 濃度の定量

検体の試験時には、TTX標準溶液を用いて検量線を作成し、マイクロプレートリーダー付属解析ソフト内の4パラメータロジスティック(4-parameter logistic:4PL)モデルを用いて検体のTTX濃度を算出した。

7. 機器分析法 (LC/MS/MS)

LC/MS/MSによる測定は以下の装置および測定条件で行った。

装置：ウォータース社製LC-MS/MS-TQD、カラム：Atlantis HILIC Silica (3 µm, 2.1 x150 mm)、移動相：A=アセトニトリル、B=0.1%ギ酸水溶液、グラジエント条件：初期値A=90%、分析開始後10分A=70%リニアグラジエント、イオン化：エレクトロスプレー、ポジティブ、MRM条件：プリカーサーイオン、m/z 320；プロダクトイオン、m/z 162、コーン電圧、42 V；コリジョンエネルギー、38 eV

結果

1. 試験条件の最適化

TTX標準溶液を用いてTTXの曝露時間(4,6,24時間)、O/V液の添加量(10~40 µL)、CTXの添加濃度(0~10 ng/mL)を検討した結果、O/V液10 µL、CTX(10 ng/mL)5 µLの添加条件で4時間の曝露時間が最適であった(図1)。

2. 本試験において検体の諸条件が与える影響の検討

耐塩性：NaCl濃度0~18%ではO/V液およびTTXの存在に関わらずNaCl濃度が高くなるにつれ徐々に細胞生存率が下がっていったが、NaCl濃度10%で、約80-90%の細胞生存率であった。(図2)

pH耐性：pH1~11で検討した結果、pH1以外では細胞生存率に目立った影響はなかった(図3)。

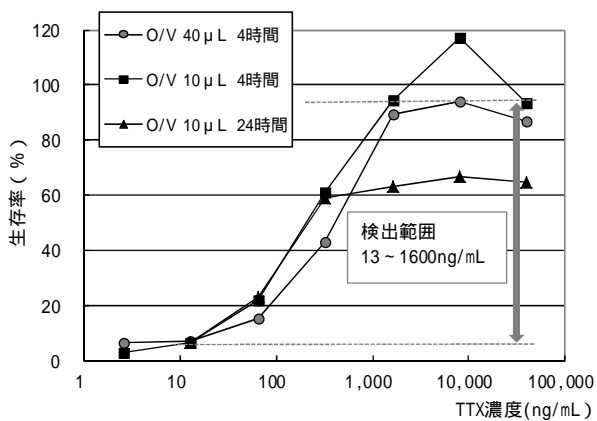


図1 試験条件の検討

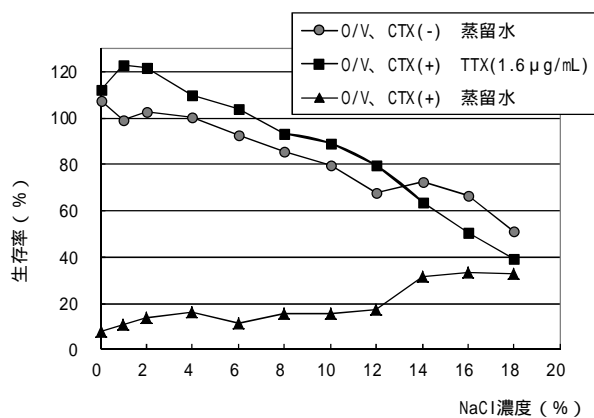


図2 細胞の塩分耐性

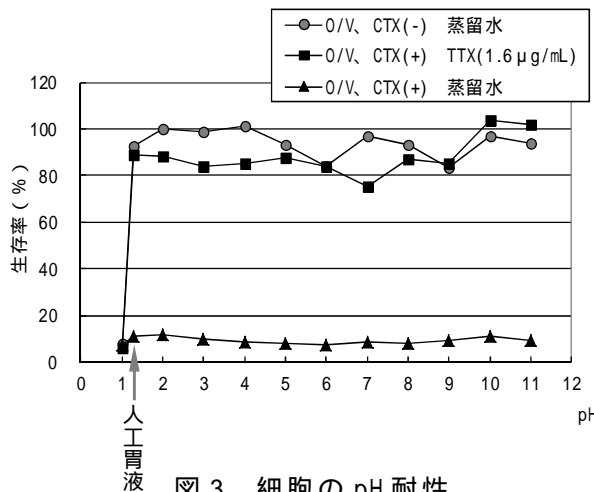


図3 細胞の pH 耐性

生体試料（血清、尿、人工胃液）からの TTX 検出の検討：血清は限外ろ過フィルター処理により、影響はみられなくなった。尿は限外ろ過フィルター処理の有無にかかわらず 30-1,000 ng/mL の範囲でやや低い細胞生存率となった。人工胃液では影響はみられなかった（図 4）。

3 . 本法を用いてのフグ実検体の TTX の検出

フグ検体（肝臓、皮、筋肉、精巣および卵巣）を本法、マウス法の 2 法、さらに一部の検体については機器分析法（LC/MS/MS）の 3 法で測定した。本法とマウス法の測定結果を表 1 に示す。3 法の測定結果を比較したところ、マウス法による測定限界内でよく一致した（図 5）。

4 . 食中毒事件検体での TTX の検出

過去に愛知県内で発生したフグ食中毒事件（原因フグ：シヨウサイフグ、検体：肝臓、皮、筋肉、患者吐物）の冷凍保存検体（全てマウス法で測定するために処理されたもの）を用い、本法とマウス法で測定した。本法とマウス法の測定値はよく一致しており、吐物検体からも検出可能であった（表 2）。

5 . 試験液の細胞毒性の確認

試験時には添加試薬 O/V 液、CTX 液を加えないウェルを置き、試験液の細胞毒性を確認した。結果 2 に示した耐塩性、pH 耐性試験及び尿検体を除いて、試験液に細胞毒性が認められたものはなかった（データ不掲載）。

考 察

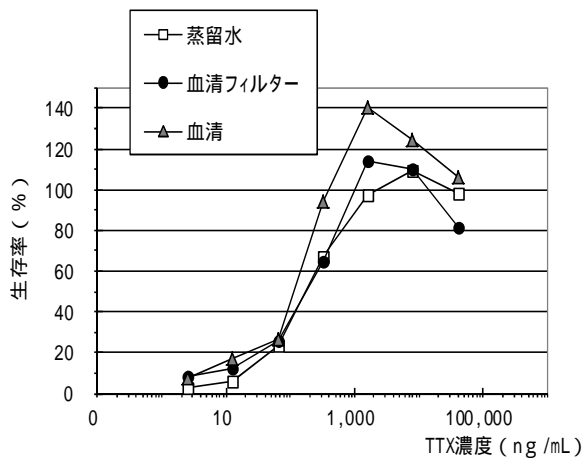
本法はこれまで当所で検討してきた培養細胞麻痺性貝毒検査法^{6,7)}で用いる添加試薬 O/V 液に新たに CTX を加えたことにより、暴露時間 4 時間での迅速な検出が可能であった。また、TTX 濃度 13 ng/ml (0.3 MU/g) まで測定可能で、マウス法の検出下限 5 MU/g と比較して高感度であった。

本法の TTX 検出に対する阻害作用について塩、pH について検討したところ、共に十分に耐性があり、食品加工品等の様々な検体からの TTX 検出が可能であると考えられた。また、血清、人工胃液では影響はほとんど認められず、尿ではやや低く検出されたものの、生体試料からの TTX 検出が可能であると考えられた。

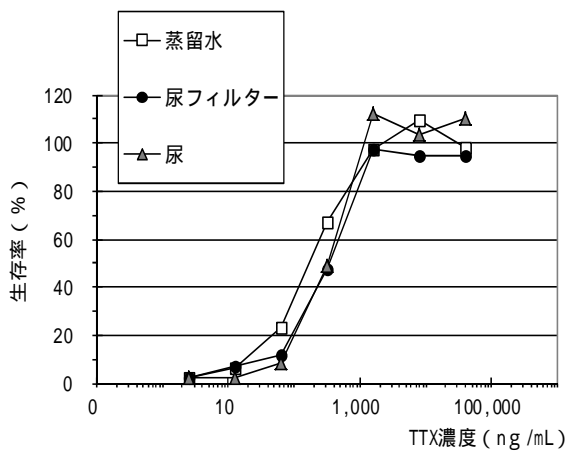
フグ実検体と食中毒事件検体では、臓器由来の阻害物質等の影響なく TTX を

表1 フグ検体の培養細胞法、マウス試験法でのTTX測定結果

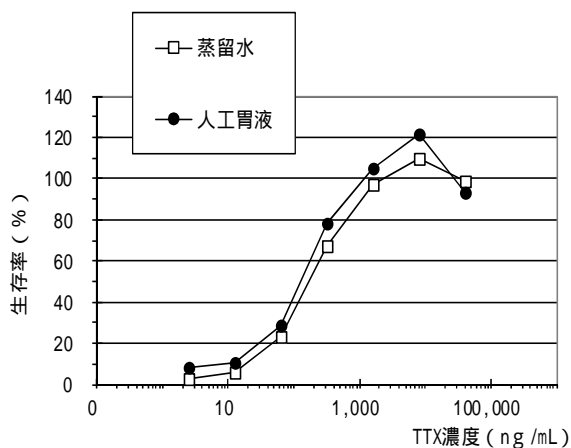
検査法 種類	臓器名	細胞培養法		マウス試験法	
		MU / g	ng / mL	MU / g	ng/mL
ヒガンフグ	肝臓	148.9	6,552.5	109.1	4,801.7
	皮	18.5	812.9	47.1	2,072.4
	筋肉	25.9	1,137.7	21.6	948.2
	卵巣	155.1	6,826.2	176.6	7,769.5
ヒガンフグ	肝臓	13,011.4	572,500.0	8,855.0	389,620.0
	皮	116.2	5,113.0	122.5	5,390.0
	筋肉	68.9	3,033.5	79.5	3,498.0
	精巣又は卵巣	755.9	33,260.0	1,160.3	51,053.2
ヒガンフグ	肝臓	48.6	2,138.0	41.4	1,821.6
	皮	12.3	543.3	12.3	541.2
	筋肉	7.8	344.7	5.6	244.6
	精巣又は卵巣	71.3	3,137.0	137.8	6,063.2
ヨリトフグ	肝臓	-	ND	<5	-
	皮	-	ND	<5	-
	筋肉	-	ND	<5	-
	精巣	-	ND	<5	-
クロサバフグ	肝臓	5.2	228.3	<5	-
	皮	-	ND	<5	-
	筋肉	-	ND	<5	-
	精巣	-	ND	<5	-
コモンフグ	肝臓	1.5	68.0	<5	-
	皮	1.1	49.9	<5	-
	筋肉	0.4	19.6	<5	-
	卵巣	63.3	2,787.0	70.0	3,080.0
ゴマフグ	肝臓	-	ND	<5	-
	皮	1.8	77.5	<5	-
	筋肉	-	ND	<5	-
	卵巣	8.3	363.5	<5	-
マフグ	肝臓	12.7	558.5	10.5	462.0
	皮	1.9	82.0	<5	-
	筋肉	1.0	43.8	<5	-
	精巣	20.0	882.0	34.6	1,522.4
マフグ	肝臓	89.5	3,938.6	37.6	1,654.4
	皮	25.4	1,119.3	19.1	840.4
	筋肉	9.7	428.8	8.4	369.2
	精巣	349.6	15,381.6	444.0	19,536.0
ショウサイフグ	肝臓	-	ND	<5	-
	皮	10.7	472.1	<5	-
	筋肉	46.9	2,065.4	<5	-
	精巣	-	ND	<5	-
ショウサイフグ	肝臓	448.0	19,710.7	382.0	16,808.0
	皮	19.7	867.6	12.8	563.2
	筋肉	8.6	379.7	7.5	328.7
	卵巣	1,743.8	76,727.7	951.2	41,852.8
シロサバフグ	肝臓	-	ND	<5	-
	皮	9.3	407.6	<5	-
	筋肉	-	ND	<5	-
	精巣	6.7	295.9	<5	-
シロサバフグ	肝臓	-	ND	<5	-
	皮	-	ND	<5	-
	筋肉	-	ND	<5	-
	精巣	-	ND	<5	-



a. 血清からのTTX検出

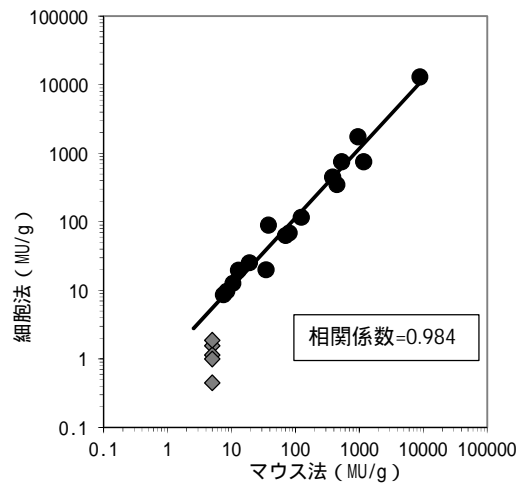


b. 尿中からのTTX検出



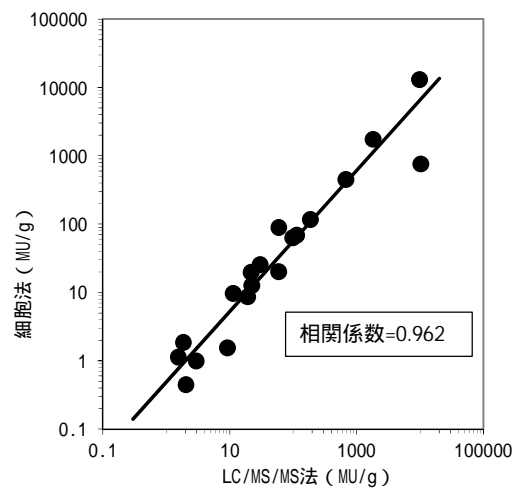
c. 人工胃液中からのTTX検出

図4 生体試料からのTTX検出

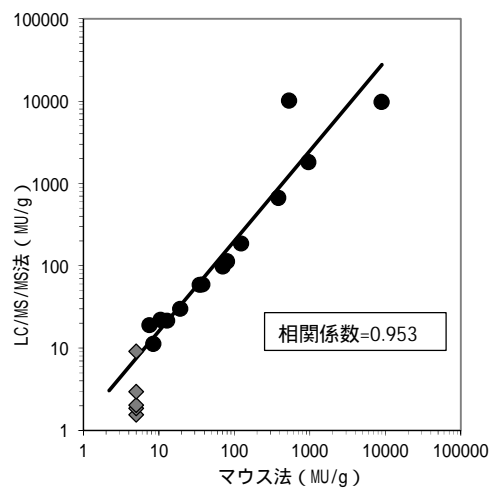


a. 細胞法とマウス法との相関係数図

マウス法で検出感度以下となった5件については計算に含めず
(検出下限値である5 MU/gとして図示)



b. 細胞法とLC/MS/MS法との相関係数図



c. マウス法とLC/MS/MS法との相関係数図

マウス法で検出感度以下となった5件については計算に含めず
(検出下限値である5 MU/gとして図示)

図5 TTX検出における細胞法、マウス法、LC/MS/MS法との相関

表2 フグ食中毒事件検体の培養細胞法、マウス試験法でのTTX測定結果

検査法		細胞培養法		マウス試験法	
種類	臓器名	MU / g	ng / mL	MU / g	ng/mL
食中毒事件 1 (ショウサイフグ)	肝臓*	4.1	180.0	4.0	176.0
	皮*	4.6	202.0	4.0	176.0
	筋肉*	4.3	190.0	4.0	176.0
食中毒事件 2 患者吐物	吐物	11.5	504.0	14.5	638.0

*4 MU/gに希釈調整した試料

定量的に検出できたことから、フグの毒力検査はもとより、食中毒事件等の発生の際にも有用な実用可能な試験法であると考えられた。

本法とマウス法を比較すると、二法の測定値には良好な相関性（相関係数 = 0.984）が認められた。さらに本法は、マウス法より検出感度及び迅速性の点で優れており、マウス法代替 TTX 検査法として有望であると考えられた。しかしながら、マウス法は様々な毒性物質の存在を検知可能であるのに対し、本法は TTX 以外の毒性物質は検出できず、毒性物質の予測がつかない事例ではマウス法の代替となりえない。

次に機器分析法(LC/MS/MS)を比較すると、二法の測定値には良好な相関性（相関係数 = 0.962）が認められた。フグ毒等の自然毒は単一成分ではなく、さらには生体内に入ってから分解等で代謝産物の測定が必要となる場合があり^{3,4)}、その際に機器分析法(LC/MS/MS)は測定条件の変更や各々の標準物質が必要となるのに対し、本法は毒量を包括的に測定できる点と迅速性で優れていると考えられた。一方、本法は成分特定の面では劣るため、必要に応じて TTX 特異的な検出法との並行実施等を行う必要がある。

本法はまた、96 ウェルマイクロプレートを用いるため多検体を同時に検査可能、試験に必要な試料は1ウェルあたり 5 μL/ウェルと微量なため生体試料など少量検体に対応

可能、比較的安価等の利点がある。一方、本法は TTX の細胞毒性試験ではなく TTX が CTX 等に拮抗する薬理学的性質を利用した間接的検出法であるため、TTX の存在下で細胞が生存し、非存在下で細胞が死滅する。従って検体に他の毒性物質が併存し細胞生存率が下がった場合等には存在する TTX が不検出となる（偽陰性）など、正確な測定が行えない場合が有り得る。今後は機器分析法を含めたデータの蓄積を進め、原因不明の中毒事例においてマウス法に代替しうる試験法の構築に向けて、問題点を解消していく必要がある。

謝 辞

LC/MS/MS での測定にご協力いただきました医薬食品研究室の伊藤裕子主任研究員、後藤智美主任研究員、フグ検体を提供いただきました食品監視・検査センターの皆様感謝申し上げます。

文 献

- 1)Noguchi T, Ebesu JSM: Puffer poisoning: epidemiology and treatment. Journal of Toxicology. Toxin Reviews 20(1):1-10, 2001.
- 2)Geffeney S, Ruben P: The structure basis and functional consequences of interactions between tetrodotoxin and voltage-gated sodium channels. Marine Drugs 4:143-156, 2006.
- 3)Yamashita YM: Chemistry of puffer fish toxin. Journal of Toxicology. Toxin Reviews 20(1):51-66, 2001.

- 4) 塩見一雄、長島裕二：海洋動物の毒（新訂版）、1-15、2006、成山堂書店、東京。
- 5) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針理化学編。691-695、2005。社団法人日本食品衛生協会、東京。
- 6) Hayashi R, Saito H, Okumura M, Kondo F: Cell bioassay for paralytic shellfish Poisoning(PSP):Comparison with postcolumn derivatization liquid chromatographic analysis and application to the monitoring of PSP in shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(2):269-273, 2006.
- 7) Okumura M, Tsuzuki H, Tomita B: A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay. *Toxicon* 46(1):93-98, 2005.
- 8) 長谷川晶子：培養細胞を用いた海洋性自然毒検出法，*ぶんせき* 11:627-628, 2009。
- 9) 林瑞那，秦眞美，館井浄子，長谷川晶子，藤浦明，皆川洋子：培養細胞を用いたパリトキシン毒性試験法の検討。愛知県衛生研究所報 61:31-38, 2011。
- 10) 中村(林)瑞那，長谷川晶子，林留美子，秦眞美，館井浄子，平松礼司，皆川洋子：培養細胞を用いたシガトキシン毒性試験法の検討。愛知県衛生研究所報 63:17-24, 2013。
- 11) Hamasaki K, Kogure K, Ohwada K: A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin(TTX):tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicon* 34(4):490-495, 1996.
- 12) 松居隆，大塚幸，酒井浄：フグ毒研究の最近の進歩，*薬学雑誌* 120(10):825-837, 2000。

A cytolytic assay for the measurement of tetrodotoxin

Akiko Hasegawa, Mizuna Nakamura, Masanao Okumura, Mami Hata,
Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Marine toxins present in seafood, e.g., tetrodotoxin from blowfish is potential hazard for human health through food-borne intoxication, frequently with lethal consequences. Tetrodotoxin is one of the most potent marine toxins and there are some death cases due to it every year in Japan.

The traditional mouse bioassay is generally used for the detection and quantification of tetrodotoxin. However, this method is far from ideal, because of its requirement for large amount of sample and time-consuming procedure. The ethical problem also exists as regarding the use of experimental animals. Therefore, alternative methods for the detection of tetrodotoxin in seafood are now being sought.

Under these circumstances, we developed a cell-based assay for the detection and quantification of tetrodotoxin. Our data demonstrated here indicated that the cytotoxic assay using Neuro2a cell could detect toxins within 5 hours after exposure and showed higher sensitivity than mouse bioassay. Further, this method allowed detecting only a small amount of materials and simultaneous measurement of many samples.

Key words: tetrodotoxin, cell-based assay, food poisoning

調 査 研 究

UPLC による無承認無許可医薬品中の瘦身、 強壯成分の一斉分析法の検討

大野春香、棚橋高志、三上栄一、上野英二、猪飼誉友

要 旨

無承認無許可医薬品中の瘦身系医薬品 8 成分、強壯系医薬品 4 成分の一斉分析法を検討した。その結果として、試料にメタノールを加えて超音波処理後、遠心式フィルターでろ過することにより試験溶液を調製し、その溶液中の目的成分を UPLC-PDA (Ultra performance liquid chromatography-Photodiode array) で分離・検出する方法を確立した。本法で採用した UPLC-PDA 条件は、上記 12 成分を 10 分以内で同時定量することができ、分析時間の短縮に有用で、分析に要する時間は試料 10 件あたり 4~5 時間に短縮された。試料中の各成分の検出限界濃度(S/N 比 3)は 1~36.75 $\mu\text{g/g}$ であり、これは各成分の標準的摂取量及び薬効量を考慮すると十分低い濃度であった。また、添加回収試験(n=5)での平均回収率は、錠試料で 97.5~103.0%、液状試料で 98.6~107.1%及び茶葉で 76.2~105.1%、相対標準偏差はすべて 3%以内と良好であった。

キーワード： UPLC、PDA、無承認無許可医薬品、瘦身成分、強壯成分

序 文

消費者の健康に対する関心の高まりに加え、インターネットと通信販売の普及により、いわゆる「健康食品」を個人が手軽に入手できるようになっている。しかし、これらの中には、瘦身、強壯作用の増強を目的として医薬品成分が添加された、薬事法で規制対象となる無承認無許可医薬品に該当する製品がある。これらの製品から検出される成分は主に、シブトラミン(Sib)、フェンフルラミン(Fen)等の瘦身成分、シルデナフィル(Sil)やその類似物質等の強壯成分であるが、強壯効果を謳う製品からグリベンクラミドを始めとする糖尿病治療薬が検出される等々、その分析は年々困難になってきている。このような無承認無許可医薬品による消費者の健康被害を未然に防

止する目的で、いくつかの一斉分析法が報告されている。従来、上記医薬品成分の検出には HPLC(High performance liquid chromatography) あるいは GC/MS(Gas chromatography mass spectrometry)¹⁾ が用いられてきた。しかし、HPLC には検出条件の異なる成分の同時分析が難しいことなどから分離に比較的長時間を要するという短所が、また、GC/MS には、難揮発性成分への適用が難しいという短所がそれぞれあった。一方で、これらの問題点を克服する測定法として、LC-MS(/MS)²⁻⁴⁾ を用いる方法も報告されているが、マトリックス効果が定量性へ及ぼす影響が懸念されている。

従来の HPLC と比較して、高圧条件下での送液を可能とした UPLC(Ultra performance liquid chromatography)は、分離カラムの

内径を細く、充填剤の粒子径を小さくすることが可能で少量の移動相で高い分離能力が得られることから、妨害成分の影響を回避するのに有用だけでなく、測定時間を短縮できるという利点がある。一方、PDA(Photodiode array)検出器は、分離されたピーク成分の紫外・可視吸収スペクトル解析が可能であり、より確実な定性が行えることから、無承認無許可医薬品成分や指定薬物等の分析に汎用されている。

今回、PDA 検出器を装着した UPLC を用いることにより、瘦身 8 成分[ヒドロクロチアジド(Hyd)、マジンドール(Maz)、Fen、ビスアコジル(Bis)、フロセミド(Fur)、フェノールフタレイン(Phe)、Sib 及び N-ニトロソフェンフルラミン(N-Fen)]、強壮 4 成分[バルデナフィル(Var)、Sil、タダラフィル(Tad)及びキサントアントラフィル(Xan)]を短時間で分離・検出する条件を中心に分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

平成23～24年度に愛知県内で試買された14検体(錠試料3検体、液状試料7検体、茶葉3検体及びカプセル試料1検体)と過去に医薬品成分が検出されたカプセル試料1検体を用いた。

2. 試薬及び標準物質

1) 試薬

アセトニトリルは和光純薬工業(株)製 LC/MS用、その他の試薬は和光純薬工業(株)製特級を用いた。メンブランフィルターは Millipore社製 Ultrafree-CL PTFE 0.2 μm を用いた。

2) 標準物質

Hyd、Fur、Phe及びN-Fenは和光純薬工業(株)製、Maz、Fen及びBisはSigma社製、SibはAlexis社製、SilはTocris社製、Tad及びVarはTront resarch chemicals社製、XanはFlcp harmachem社製を用いた。

3. 装置及び測定条件

UPLC-PDA装置は、Waters社製ACQUITY UPLC H-Classシステム(PDA e Detector付

属)にWaters社製ACQUITY UPLC HSS T3カラム(内径2.1 mm、長さ100 mm、粒子径1.8 μm)及びWaters社製ACQUITY UPLC HSS T3 van Guardカラム(内径2.1 mm、長さ5 mm、粒子径1.8 μm)を装着して用いた。

測定条件は、移動相：A液 水/トリフルオロ酢酸溶液(650:1)、B液 アセトニトリル、グラジエント条件：(A/B) [(80/20) (70/30)] 2.5 分 + (70/30) 3 分 + [(70/30) (0/100)] 3.5 分 + (0/100) 1 分 [(0/100) (80/20)] 0.01 分 + (80/20) 5 分、カラム温度：40、測定波長：確認、200～450 nm、定量、260 nm(Sibは230 nm)、流速：0.4 mL/min、注入量：1 μL に設定した。

4. 標準溶液の調製

各標準物質約5 mgをそれぞれ精密に量り、メタノールに溶かして1 mg/mL混合標準原液とした。この混合標準原液をメタノールで希釈して100 $\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液を調製し、さらに適宜希釈して用いた。

5. 試験溶液の調製

液状試料は混和後、0.2 mLを正確に量った。錠試料及び茶葉は乳鉢中で粉碎したものを、カプセル試料は内容物を、約0.2 g精密に量った。これらの試料にメタノール4 mLを加えて30分間超音波処理(37 kHz)し、さらにメタノールを加えて正確に5 mLとした。この試料溶液を遠心式メンブランフィルターで遠心する過し、UPLC-PDA測定用の試験溶液とした。

結果及び考察

1. 測定条件の検討

移動相及びグラジエント条件について、当初、指定薬物等の分析にも応用可能な0.1%ギ酸-0.1%ギ酸アセトニトリル混液を用いて検討した。しかし、対象成分は10分以内にすべて溶出したものの、Tad及びBisが分離せず、Sibについてはピーク形状が悪く、検出感度も十分ではなかった。そこで、三上ら⁵⁾の方法を参考に、水/トリフルオロ酢酸(650:1)-アセトニトリル混液を用いて検討したところ、図1に示したように10分以内に全成分を分離・検出することが可能となった。

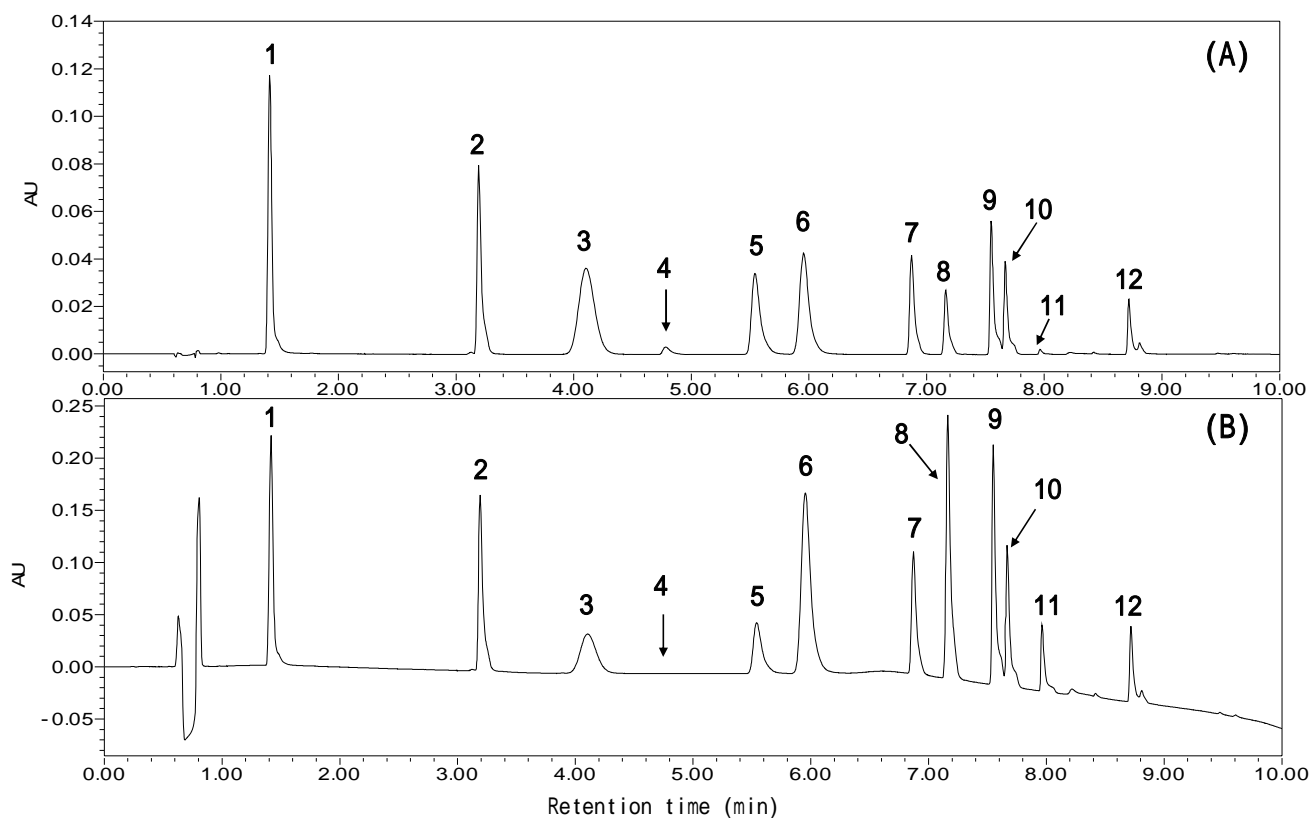


図 1 混合標準溶液のクロマトグラム (各成分: 50 $\mu\text{g/mL}$)
 ピーク : 1. Hyd, 2. Var, 3. Maz, 4. Fen, 5. Bis, 6. Fur, 7. Sil,
 8. Phe, 9. Tad, 10. Xan, 11. Sib, 12. N-Fen
 (A): 吸収波長 260 nm, (B): 吸収波長 230 nm

表 1 繰り返し精度及び検量線

Compound	Repeatability (n=6)			Calibration curve				LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
	RT(min)	RT(min) RSD(%)	Area RSD(%)	Range ($\mu\text{g/mL}$)	Slope ($\times 10^3$)	Intercept ($\times 10^3$)	r^2		
Hyd	1.40	0.11	0.2	1-100	5.0	1.7	0.999	0.04	0.14
Var	3.18	0.19	0.2	1-100	4.5	0.8	0.999	0.05	0.18
Maz	4.09	0.07	0.1	1-100	6.9	3.4	0.999	0.13	0.44
Fen	4.77	0.13	0.9	5-100	0.3	0.7	0.998	1.47	4.91
Bis	5.53	0.09	0.1	1-100	3.1	1.3	0.999	0.15	0.51
Fur	5.86	0.12	0.1	1-100	4.7	2.1	0.999	0.12	0.40
Sil	6.84	0.11	0.2	1-100	2.5	0.5	0.999	0.11	0.36
Phe	7.13	0.03	0.2	1-100	1.5	0.6	0.999	0.17	0.58
Tad	7.53	0.04	0.2	1-100	2.7	0.5	0.999	0.08	0.28
Xan	7.65	0.04	0.4	1-100	2.0	0.4	0.999	0.11	0.38
Sib	7.96	0.03	0.4	1-100	3.2	1.7	0.999	0.33	1.09
N-Fen	8.68	0.08	0.7	1-100	0.8	0.3	0.999	0.21	0.71

: 痩身成分, : 強壯成分 (各成分: 10 $\mu\text{g/mL}$)

RT: 保持時間, LOD: 検出限界 (S/N=3), LOQ: 定量限界 (S/N=10)

定量用波長は、Sibを除いて検出感度が最も低いFenの極大吸収付近である260 nmを第一選択とした。混合標準溶液 50 µg/mLを測定して確認したところ、図1(A)に示したように波長260 nmでベースラインは安定しており、ピークのS/N比はSib以外のすべての成分で10以上であった。一方、Sibは260 nmでの検出は困難であり、図1(B)に示したように230 nm付近でS/N比が10以上であったことから、定量用波長として230 nmを用いることとした。また、Xanの極大吸収波長は389 nm付近であり、その他多くの成分については200~340 nmに特徴的な極大吸収を有していたことから、確認用波長範囲は、これらすべての極大吸収波長を含む200~450 nmとした。

2. 検量線及び検出下限値

測定における対象12成分の定量性を確認するために、濃度がそれぞれ10 µg/mLになるように調製した混合標準溶液を6回繰り返し測定した結果を表1に示した。保持時間の相対標準偏差(RSD)は0.03~0.19%であり、ピーク面積のRSDも0.1~0.9%と良好であった。検量線は、Fenが標準溶液濃度で5~100 µg/mLの範囲で相関係数が0.998であった他はすべて1~100

µg/mLの範囲で相関係数が0.999と、良好な直線性を示した。クロマトグラム上のピークから得られる検出限界(S/N=3)は標準溶液濃度で0.04~1.47 µg/mL(試料中の濃度として1~36.75 µg/g)、定量限界(S/N=10)は0.14~4.91 µg/mL(3.5~122.75 µg/g)であり(表1)、試料の常用量及び各成分の薬効量を考慮すると十分な濃度であった。

3. 試験溶液調製法の検討

抽出溶媒には、医薬品中の有効成分や指定薬物の分析に汎用されるメタノールを使用した。また、抽出効率を向上させ、抽出液中の微細な不要物を除去する目的で、超音波処理及び0.2 µmの遠心フィルターによるろ過処理を採用した。本抽出処理を数種類の実試料に適用したところ、今回測定対象とした12成分の測定に重大な妨害となるピークは認められなかったことから、それ以上の精製処理は行わなかった。

本法を用いての10検体あたりの処理時間は約90分であった。

4. 添加回収試験

いわゆる「健康食品」は、様々な形態で流通・販売されていることから、錠、液状、茶葉試料を用いて添加回収試験を行った。

表2 添加回収試験結果

Compound	Recovery (n=5)					
	Tablet		Liquid		Tea leaves	
	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)
Hyd	102.1	1.1	98.8	1.6	100.7	0.5
Var	102.1	0.8	100.7	1.4	92.4	1.3
Maz	102.5	1.0	99.5	0.7	87.0	0.8
Fen	99.7	1.5	101.1	2.4	101.3	1.1
Bis	102.3	1.4	100.3	0.5	104.1	1.7
Fur	98.0	1.5	107.1	1.2	76.2	1.3
Sil	101.9	0.4	99.8	1.6	99.1	1.8
Phe	100.0	0.5	99.2	1.6	105.1	1.5
Tad	103.0	1.1	99.6	1.7	101.9	0.8
Xan	100.3	2.7	98.6	1.9	103.0	0.4
Sib	97.5	1.7	103.3	1.2	94.2	2.0
N-Fen	101.1	1.5	102.7	2.4	101.8	0.6

対象成分が検出されないことを確認した試料各 0.2 g に、混合標準溶液 100 $\mu\text{g/mL}$ を 0.5 mL 添加(試料中濃度として 250 $\mu\text{g/g}$) し、30 分間静置したのち、本法に従って試験溶液を調製し、UPLC-PDA により測定した結果を表 2 に示した。平均回収率(n=5)は、錠試料 97.5~103.0 %、液状試料 98.6~107.1 %、茶葉では Maz が 87.0 %、Fur が 76.2 %とやや低かったが、それ以外の成分は 92.4~105.1 %、RSD はいずれの試料も 3 % 以内と良好な結果が得られた。

5. 市販製品分析への応用

本法により試買された健康食品 14 検体を分析した。その結果、いずれの製品からも今回対象とした 12 成分は検出されなかった。

過去に Phe と Sib が同時に検出されたカプセル試料について、本法により分析した結果、保持時間 7.09 分及び 7.94 分にピークが検出された(図 2 (B))。紫外・可視吸収スペクトルを確認したところ、保持時間 7.09 分のピークは 229 nm 付近(図 2

(B)Unknown)に、保持時間 7.94 分のピークでは 223 nm 付近(図 2 (B)Unknown)に、それぞれ極大吸収が認められた。これらは、図 2 (A)に示した混合標準溶液の Phe 及び Sib の保持時間、スペクトルともに完全に一致した。なお、両成分について定量したところ、カプセル 1 個(400 mg)あたり、Phe が 40.7 mg、Sib が 9.49 mg が含まれていた。

結 語

無承認無許可医薬品に添加される恐れのある痩身 8 成分及び強壮 4 成分について、UPLC による一斉分析法を検討した。試料にメタノールを加えて超音波抽出し、遠心フィルターでろ過して試験溶液を調製した。移動相に水/トリフルオロ酢酸(650:1)-アセトニトリル混液を用いたグラジエント条件を採用し、定量用波長 260 又は 230 nm、確認用波長範囲 200~450 nm として、UPLC-PDA により測定することで、10 分以内に全成分を良好に分離・検出することができた。また、前処理に要する時間も短く 10

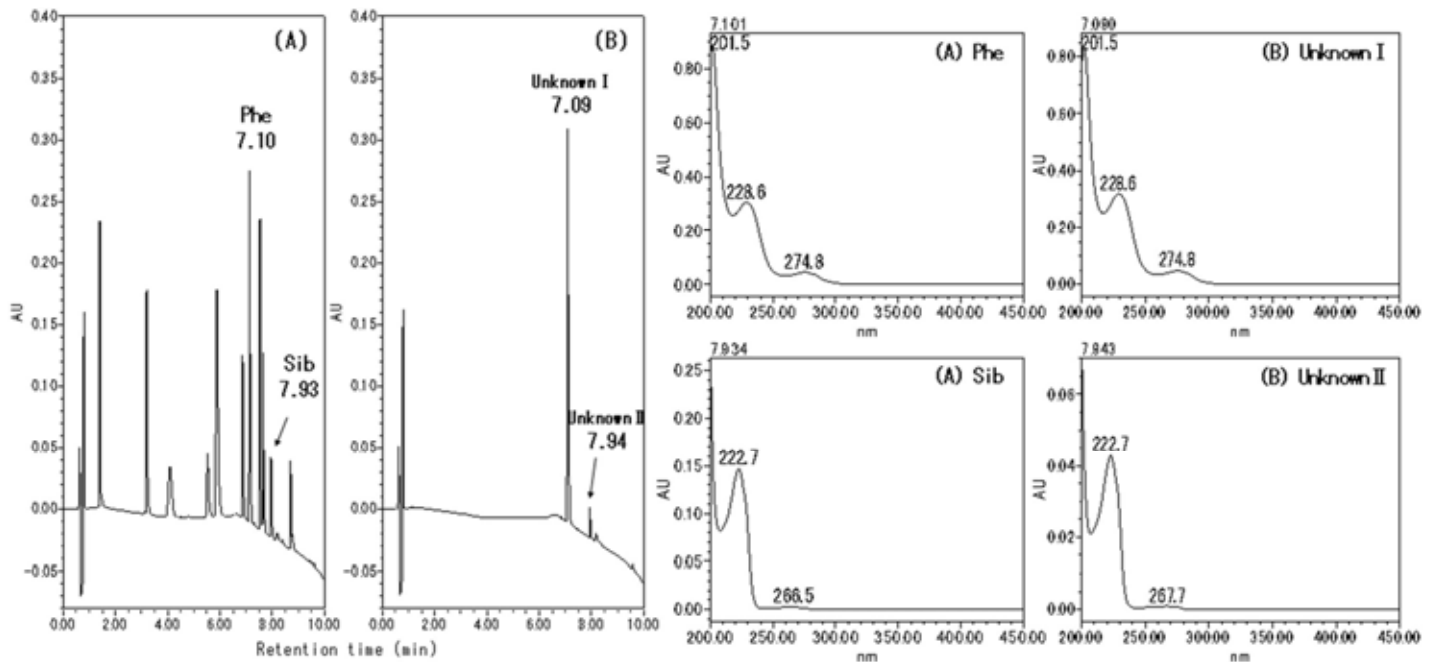


図 2 混合標準溶液と医薬品成分検出検体のクロマトグラム及び紫外・可視吸収スペクトル

(A): 混合標準溶液 (各成分濃度: 50 $\mu\text{g/mL}$),

(B): 医薬品成分検出検体 (試料液中濃度: 0.4 mg/mL)

吸収波長 230 nm

検体程度であれば1日以内に分析を終了することが可能であった。一方で、回収率についても錠試料で97.5~103.0%、液状試料で98.6~107.1%及び茶葉で76.2~105.1%と良好な結果が得られた。以上より、本法は、いわゆる「健康食品」に添加される恐れのある痩身及び強壮成分の分析に有用であると考えられた。

文 献

- 1) 守安貴子, 蓑輪佳子, 岸本清子, 坂本美穂, 門井秀郎, 中嶋順一, 濱野朋子, 中江大: 健康食品に含有される医薬品成分の分析. 東京都健康安全研究センター研究年報 62:25-39, 2011.
- 2) Inoue S, Miyamoto S, Ogasawara M, Endo O, Suzuki G: Simultaneous determination of medicinal ingredients in so-called health-promoting food using liquid

chromatography tandem mass spectrometry with a pentafluorophenyl Stationary Phase. Journal of Health Science 55(2):183-191, 2009.

- 3) 赤城理恵, 味戸一宏, 金成徹, 川田好徳, 鈴木照彦, 竹村悦子, 斎藤和男: LC/MSによる痩身用健康食品中未承認医薬品の一斉分析法について. 福島県衛生研究所年報 24:47-50, 2006.
- 4) 濱田寛尚, 山本理世, 吉田達雄, 飛野敏明, 村川弘: ダイエット用健康食品に含まれる医薬品成分の迅速一斉分析法の開発. 熊本県保健環境科学研究所報 41:48-54, 2011.
- 5) 三上栄一, 池田清栄, 大野勉: ダイエット用健康食品(美秀堂、加強型)に添加された医薬品成分の検索. 愛知県衛生研究所報 58:29-35, 2008.

Simultaneous analysis of medicinal ingredients for weight control and sexual enhancement in unapproved/unpermitted drugs using ultra-performance liquid chromatography

Haruka Ohno, Takashi Tanahashi, Eiichi Mikami, Eiji Ueno, Yoshitomo Ikai

A method for the determination of 12 medicinal ingredients (Hydrochlorothiazide, Mazindol, Fenfluramine, Bisacodyl, Furosemide, Phenolphthalein, Sibutramine and N-Nitroso-fenfluramine used for weight control, and Vardenafil, Sildenafil, Tadalafil and Xanthoanthrafil for sexual enhancement) in unapproved/unpermitted drugs was examined. As the result, following method was developed; the analyte is extracted from sample by sonication with methanol and filtration by centrifugal filter, and the extract is applied to UPLC-PDA analysis. The UPLC-PDA conditions established in this study were useful enough to shorten the analytical time of the method, because it can separate and detect the 12 ingredients within 10 minutes, simultaneously. The detection limits of each ingredient were 1-36.75 μ g/g (S/N=3) as the concentration in the sample, suggesting those are sufficient in consideration of a usual intake amount of sample and an effective dose of each ingredient. The total analytical time of the method was 4-5 hours per 10 samples. The recoveries of each ingredient were 97.5-103.0% from tablet sample, 98.6-107.1% from liquid sample and 76.2-105.1% from tea-leaf sample, and the relative standard deviations of the recoveries were within 3% for all samples.

Key words: UPLC, PDA, unapproved/unpermitted drug, weight control, sexual enhancement

調 査 研 究

愛知県民の尿中ヒ素の化学形態別分析

山本優子、小島美千代、市古浩美、小池恭子、猪飼誉友

要 約

愛知県民の平常時における尿中ヒ素 (As) の化学形態別濃度レベルを明らかにするために、LC-ICP/MS (液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ質量分析計) を用いて、3 種類のヒ素化合物 [モノメチルアルソン酸 (monomethylarsonic acid: MMA)、ジメチルアルシン酸 (dimethylarsinic acid: DMA)、アルセノベタイン (arsenobetain: AB)] 並びに 3 価無機ヒ素 (As³⁺) 及び 5 価無機ヒ素 (As⁵⁺) の分析を実施した。

検体提供者 210 名の尿において、クレアチニン補正後のヒ素としての濃度範囲 (括弧内は中央値) ($\mu\text{g As/g cre}$) は、MMA が N.D. ~ 27.5 (1.1)、DMA が 5.2 ~ 357 (29.6)、AB が 1.6 ~ 645 (44.0)、As³⁺ が N.D. ~ 78.5 (1.3)、As⁵⁺ が N.D. ~ 32.1 (N.D.) であり、尿中総ヒ素量に対する化学形態別存在比率 (%) は MMA が 2.3、DMA が 38.9、AB が 55.1、As³⁺ が 2.5、As⁵⁺ が 1.3 であり DMA と AB で 94% 以上を占めた。また、検体提供者の尿中から検出されるヒ素の化学形態及び濃度には海産物摂取習慣やその種類が影響することが示唆された。本調査データは、ヒ素の関与が疑われる健康危機事例発生時に、迅速な原因究明及び健康影響評価に活用できる有用な基礎資料となると考えられる。

キーワード：ヒ素、化学形態別分析、LC-ICP/MS

序 文

ヒ素 (As) の毒性は古くから知られており、古代ギリシアでは既に毒薬として使用されていたと言われている。わが国においても 1940 ~ 50 年代にはヒ素化合物が誤って食品に混入した食中毒事件等が散見されており、なかでも森永ヒ素ミルク中毒事件 (1955 年) は有名である。また和歌山毒物カレー事件 (1998 年) の原因物質としても記憶に新しい。一方でヒ素は環境中に広く存在し、多くの食品、特に海産物に高濃度に含有されており、ヒトは日常的に食品からヒ素を摂取している。海産物を多食する日本人のヒ素摂取量は 1 日に 200 ~ 400 μg 程度であり¹⁾、世界的にみても多いことが知られている^{2,3)}。一般的にヒ素は猛毒の

物質と思われているが、その毒性はその化学形態によって大きく異なり^{3,4)}、有機ヒ素化合物の中にはほとんど毒性のない物質もある。したがって、総ヒ素の摂取量や濃度のみから生体影響を評価することは適切ではなく、ヒ素の化学形態別情報に基づいた毒性評価が重要と考えられる。

生体内へ取り込まれたヒ素の大部分は速やかに尿中へと排泄されることから、尿中のヒ素濃度は直近の暴露状況を反映する良い指標となり、平常時の尿中濃度レベルの把握は健康危機事例発生時等に有益であると考えられる。しかしながら、職業的暴露のない一般人を対象に尿中ヒ素濃度を調査した報告は多くない。そこで本調査研究では、LC-ICP/MS (液体クロマトグラフ-誘

導結合プラズマ質量分析計)を用いて、平常時の愛知県民の尿中ヒ素の化学形態別濃度や存在比率を明らかにした。

方 法

1 試料及びアンケート調査

2007～2013年の各年度に、20歳代、30歳代、40歳代、50歳代、60歳代以上の5つの年齢階層に属する男女各3名(各年度30名、総試料数210件)を対象に早朝尿提供を依頼するとともに、アンケート方式(表1)による食習慣等の聞き取り調査を実施した。

2 測定項目

モノメチルアルソン酸(monomethylarsonic acid:MMA)、ジメチルアルシン酸(dimethylarsinic acid:DMA)、アルセノベタイン(arsenobetain:AB)、3価無機ヒ素(As³⁺)、5価無機ヒ素(As⁵⁺)及び尿クレアチニン濃度

3 標準品

MMA:メチルアルソン酸(トリケミカル研究所)

DMA:カコジル酸ナトリウム三水和物(和光純薬)

AB:アルセノベタイン(トリケミカル研究所)

As³⁺:亜ヒ酸ナトリウム(シグマアルドリッチ)

As⁵⁺:ヒ酸二ナトリウム七水和物(和光純薬)

4 分析

尿試料を超純水で2～10倍に希釈した後、孔径0.45µmのメンブランフィルターでろ過したものをLC-ICP/MS法にて分析した。LC-ICP/MSの分析条件は表2に示した。

また、尿クレアチニン濃度はJaffe法により測定した。

5 データ解析

尿中ヒ素の化学形態別濃度の統計解析には、尿クレアチニン濃度で補正した値[実

表1 アンケート調査項目

[使用米・飲料水・居住環境]

使用米	(1) 自主流通米 (2) 自家保有米 (3) (1)+(2) (4) その他()
飲料水	(1) 水道水 (2) 井戸水 (3) (1)+(2) (4) その他()
居住環境	(1) 工業地域 (2) 商業地域 (3) 住宅地域 (4) 農山村地域 (5) その他()

[食習慣]

量	(1) 腹一杯食べる方 (2) 腹八分目に控える方 (3) どちらともいえない
規則性	(1) 規則正しく食べる方 (2) 不規則 (3) どちらともいえない
味付	(1) 濃い方 (2) 薄い方 (3) どちらともいえない
米飯は、1日に何回位食べますか	(1) 0～1回/日 (2) 2回/日 (3) 3回/日
魚介類は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週 (2) 3～5日/週 (3) 6日以上/週
肉類は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週 (2) 3～5日/週 (3) 6日以上/週
鶏卵は、週に何個位食べますか	(1) 2個以下/週 (2) 3～6個/週 (3) 7個以上/週
野菜・果物は、1日に何回位食べますか	(1) 0～1回/日 (2) 2回/日 (3) 3回/日
海藻(ワカメ・ヒジキ等)は、週に何日位食べますか	(1) 2日以下/週 (2) 3～5日/週 (3) 6日以上/週
缶ジュース・缶詰等は、週に何缶(回)位食べますか	(1) 2缶以下/週 (2) 3～6缶/週 (3) 7缶以上/週
尿を採取する日にお答えください 昨夜、海藻を食べましたか	(1) はい (2) いいえ (ワカメ ヒジキ コンブ 海苔 その他)

[運動習慣]

30分程度の散歩に相当する運動を	(1) よくする(週3回以上) (2) 時々する(週1～2回) (3) ほとんどしない(月1～2回)
------------------	--

[喫煙]

(1) 吸わない (2) 以前は吸っていた(年前まで) (3) 吸っている 1日 本(年前から)
--

[飲酒]

(1) 飲まない (2) 以前は飲んでいた(年前まで) (3) 飲んでいる 1日 合(年前から)
--

[その他]

飲んでいる薬	(1) なし (2) あり(飲んでいる薬を記入してください。)
飲んでいる健康食品・サプリメント	(1) なし (2) あり(鉄剤、ビタミン剤等の健康食品・サプリメントを記入してください。)

測値 ($\mu\text{g As/L}$) / 尿クレアチニン濃度 (g/L) を用い、平均値及び標準偏差算出にあたり実測値が定量下限値 ($0.4 \mu\text{g/L}$) 未満であった試料には定量下限値の 1/2 である $0.2 \mu\text{g/L}$ をあてはめた。統計処理には解析ソフトウェア SPSS Statistics 17.0 を用い、有意水準の判定には Mann-Whitney 検定 (ノンパラメトリック法) を行った。

結 果

1 尿中ヒ素の化学形態別検出状況

5 種類の尿中ヒ素の化学形態別検出割合、クレアチニン補正後の各ヒ素濃度の平均値、標準偏差、中央値、最大値及び最小値を表 3 に示した。DMA 及び AB は全ての試料から検出され、その平均値や中央値は他の 3 形態に比べて格段に高い値であった。また化学形態別の濃度分布ではいずれも正規性は認められず、高濃度側に裾をひく形状を示した。いずれの化学形態においても、最大値は中央値の 10 倍以上であった (図 1)。

総ヒ素 (5 形態の合計) 量に対する化学形態別存在比率を表 4 及び図 2 に示した。5 形態中で最も存在比率が高かったのは AB、次いで DMA であり、AB と DMA で 94% 以上を

占めた。

2 年齢階層別及び性別における尿中ヒ素の化学形態別濃度及びクレアチニン濃度

尿中ヒ素の化学形態別濃度及びクレアチニン濃度を、年齢階層別及び男女別に表 5 に示した。60 歳代以上の女性の群ではいずれの化学形態も他の群に比べ高い値を示したが、その他の年齢階層では一定の傾向はみられなかった。

3 アンケート調査項目と尿中ヒ素の化学形態別濃度との関連

アンケートにより調査した各項目と、尿中ヒ素の化学形態別濃度との関連について解析を行った。その結果、魚介類及び海藻類の食習慣には関連が認められたが、居住環境や喫煙飲酒習慣等その他の項目には特に関連性は認められなかった。

そこで食習慣との関連性をさらに詳細に検討するため、魚介類と海藻類の摂食を頻度により 1 群 (週に 2 日以下) と 2 群 (週に 3 日以上) に分類し、解析を加えた。魚介類摂食では、2 群 ($n=124$) の DMA 濃度 (以下 [DMA] と略す) ($\mu\text{g As/g cre}$) の平均値 \pm 標準偏差は 41.8 ± 40.7 で、1 群 ($n=86$) の 33.4 ± 28.9 より有意に高く ($p < 0.01$)

表 2 LC-ICP/MS の測定条件

LC		ICP/MS	
装置	Agilent 1100 Series	装置	Agilent 7500ce
分離カラム	Agilent G3288-80000 ($4.6 \times 250 \text{ mm}$)	測定モード	時間分析
ガードカラム	Agilent G1836-65002	測定質量数	75
移動相	2.0 mM PBS/0.2 mM EDTA/10.0 mM CH_3COONa /3.0 mM NaNO_3 in 1% EtOH (pH11)	測定時間	12.5 min
注入量・流速	0.05 mL・1.0 mL/min		
カラム温度	室温		

表 3 尿中ヒ素の化学形態別検出割合及びヒ素濃度 ($\mu\text{g As/g cre}$) ($n=210$)

	検出割合 (%)	平均値	標準偏差	中央値	最大値	最小値
MMA	68.6	1.8	2.7	1.1	27.5	N.D.
DMA	100	38.4	36.5	29.6	357	5.2
AB	100	71.5	89.9	44.0	645	1.6
As	65.2	2.4	5.9	1.3	78.5	N.D.
As	40.5	1.1	2.6	N.D.	32.1	N.D.

N.D.: As 実測値 $0.4 \mu\text{g/L}$ 未満

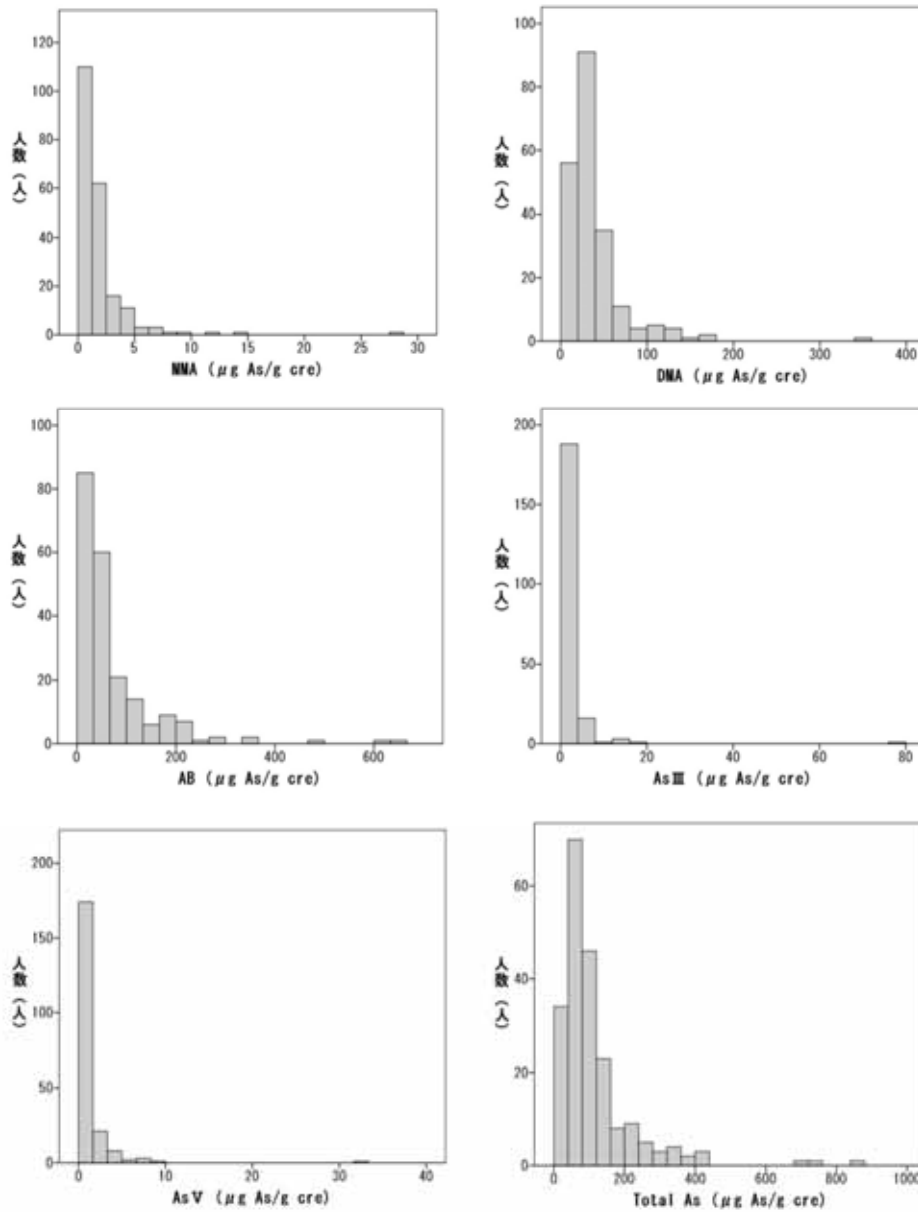


図 1 尿中ヒ素の化学形態別濃度分布図
(クレアチニン補正)

表 4 尿中ヒ素の化学形態別存在比率 (%) (n=210)

	平均値	中央値	最大値	最小値
MMA	2.3	1.8	10	<0.1
DMA	38.9	38.3	86.4	7.3
AB	55.1	56.2	91.6	12.8
As	2.5	1.8	21.5	<0.1
As	1.3	<0.1	9.0	<0.1

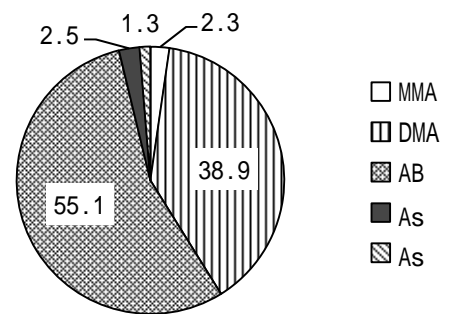


図 2 尿中ヒ素の化学形態別存在比率 (%)
(平均値)

2群の[AB] 81.9 ± 88.5 は1群の 56.6 ± 90.3 より有意に高かった ($p < 0.001$)。また2群の[Total As] 129.6 ± 117.3 は1群の 94.3 ± 110.6 よりも有意に高かった ($p < 0.001$) (図3)。海藻類摂食では、2群 ($n=85$) の [DMA] 47.2 ± 45.0 が1群 ($n=125$) の 32.3 ± 27.9 より有意に高く ($p < 0.001$)、2群の [Total As] 146.1 ± 149.8 が1群の 94.1 ± 79.0 よりも有意に高かった ($p < 0.01$) (図4)。

[DMA]は魚介類及び海藻類のいずれにおいても高頻度摂食群で有意に高くなることが認められた。そこで、両食品の摂食頻度で試料提供者を図5のように4つのグループに分け、各グループの中央値を指標として、両食品の [DMA]への寄与を検討した。その結果、[DMA]は $G^- (37.2 \mu\text{g As/g cre}) > G^- (34.2) > G^- (27.5) > G^- (21.5)$ であった。

考 察

DMA及びABは全試料から検出され、クレアチニン補正後の中央値 ($\mu\text{g As/g cre}$) はDMAが29.6、ABが44.0と他の形態に比べ高値であった。さらに、総ヒ素量に対するDMAとABの存在比率の合計値は94%以上となり、この2化合物が尿中ヒ素の主たる化学形態であることが明らかとなった。

以上の結果は、すでに報告^{1,5)}されている他地域における日本人の尿中ヒ素の化学形態別濃度や存在比率とほぼ一致した。

尿中ヒ素の化学形態別濃度は、年齢階層及び男女の違いによって一定の傾向はみられず、以下に述べるように年齢や性差よりもヒ素を含有する食品の摂取習慣による影響が大きいことが考えられた。

食品の摂取頻度との関連では、尿中ヒ素の形態や濃度は、魚介類の摂食頻度が高い群は[AB]が、海藻類の摂食頻度が高い群は [DMA]が高く、[Total As]に反映される傾向がみられた。魚介類中の主なヒ素化合物であるABは化学的に安定であり^{2,3)}、ヒト体内では代謝等を受けずにそのまま排泄される。一方、海藻には無機ヒ素やアルセノシュガーと総称される有機ヒ素化合物が含まれており^{2,3)}、これらはヒト体内で代謝されてほとんどがDMAとして尿中へ排出される。以上が、魚介類を高頻度に摂食する群では尿中 [AB] が、海藻類を高頻度に摂食する群では [DMA] がそれぞれ高くなった原因であると考えられる。

まとめ

2007年から2013年にかけて、愛知県民の早朝尿合計210検体の提供を受け、5種類の化学形態別にヒ素濃度分析を実施した

表5 年齢階層別及び性別尿中ヒ素の化学形態別濃度 ($\mu\text{g As/g cre}$) 及びクレアチニン濃度 (g/L) の平均値 \pm 標準偏差 (各 $n=21$)

年齢階層	性別	MMA	DMA	AB	As	As	クレアチニン
20	男	1.2 ± 0.9	21.4 ± 13.7	44.7 ± 44.3	1.5 ± 1.8	0.4 ± 0.6	2.4 ± 0.8
	女	1.2 ± 1.2	22.6 ± 13.9	59.2 ± 78.0	1.0 ± 0.9	0.6 ± 0.7	1.4 ± 0.9
30	男	1.3 ± 0.9	22.0 ± 13.8	34.1 ± 32.5	1.3 ± 1.4	0.5 ± 0.5	1.9 ± 0.8
	女	2.3 ± 2.3	41.9 ± 27.6	80.1 ± 84.3	3.1 ± 3.0	1.3 ± 1.7	1.2 ± 0.6
40	男	1.5 ± 1.3	28.2 ± 12.4	60.4 ± 56.2	1.9 ± 1.2	0.6 ± 0.8	1.5 ± 0.6
	女	1.8 ± 1.8	34.1 ± 23.8	56.4 ± 43.1	1.9 ± 1.9	1.1 ± 1.3	1.1 ± 0.7
50	男	1.4 ± 1.7	38.7 ± 19.4	90.0 ± 136.9	2.5 ± 3.2	1.4 ± 2.1	1.2 ± 0.5
	女	2.1 ± 2.4	44.2 ± 28.3	66.1 ± 66.7	2.2 ± 3.2	1.1 ± 1.5	0.9 ± 0.5
60	男	1.4 ± 2.5	52.0 ± 46.5	94.3 ± 89.2	1.9 ± 2.1	1.4 ± 2.0	0.9 ± 0.4
	女	3.5 ± 6.4	78.5 ± 75.0	129.7 ± 157.1	6.2 ± 17.1	2.7 ± 7.0	0.6 ± 0.4

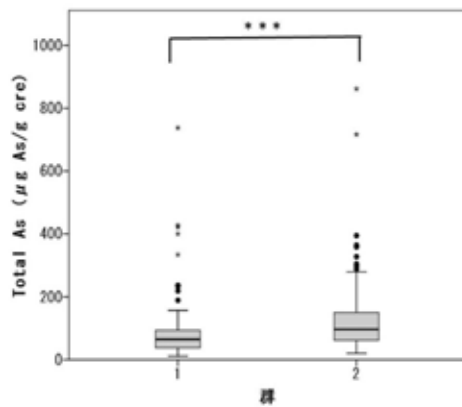
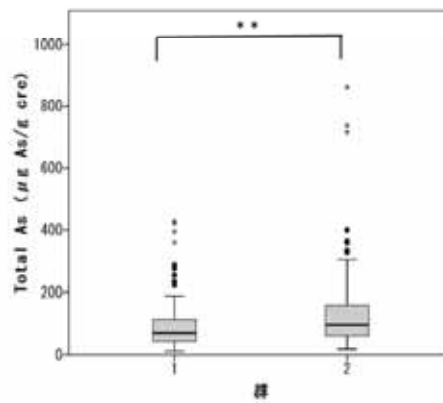
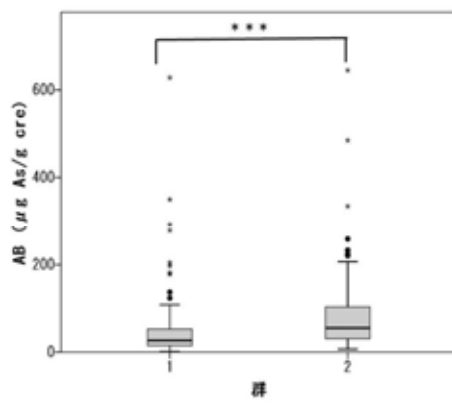
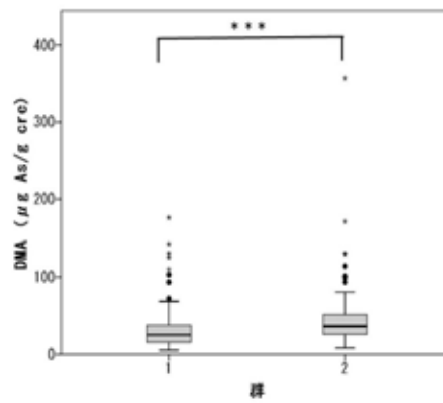
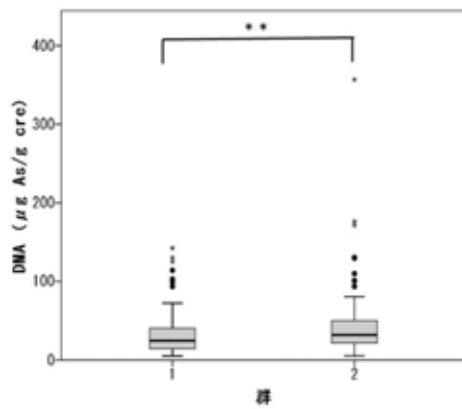


図4 海藻類摂食頻度別のDMA及びTotal As濃度
 1群：2日以下/週 ***： $p < 0.001$
 2群：3日以上/週 **： $p < 0.01$

図3 魚介類摂食頻度別のDMA、AB及びTotal As濃度

1群：2日以下/週 ***： $p < 0.001$
 2群：3日以上/週 **： $p < 0.01$

		海藻類の摂食頻度(群)	
		1	2
摂食頻度(群) 魚介類の	1	G- (n=56) 21.5	G- (n=30) 34.2
	2	G- (n=69) 27.5	G- (n=55) 37.2

図5 魚介類及び海藻類摂食頻度による4区分とDMAの中央値(μg As/g cre)
 1群：2日以下/週、2群：3日以上/週

結果、平常時の各濃度及び存在比率を明らかにすることができた。さらに、尿中ヒ素の化学形態や濃度は、摂取する海産物の頻度や種類に大きく影響されることが示唆された。本調査データは、ヒ素の関与が疑われる健康危機事例が発生した場合の迅速な原因究明及び健康影響調査において有用な基礎資料となると考えられる。

謝 辞

本調査研究は、愛知県健康福祉部健康担当局生活衛生課及び愛知県保健所生活環境安全課のご協力を得て実施したことを記し、関係者の方々に感謝申し上げます。

文 献

1) 糸川嘉則[編集]: ミネラルの事典. 初版: 389-396, 2003, 朝倉書店、東京.

- 2) 宮下振一, 貝瀬利一: 海産物由来のヒ素化合物の生体影響と体内動態. 食品衛生学雑誌 51(3):71-91, 2010.
- 3) 山崎静香: 内閣府食品安全委員会平成20年度食品安全確保総合調査「食品中に含まれるヒ素の食品影響評価に関する調査」. 第15回ヒ素シンポジウム講演要旨集 20-28, 2009.
- 4) 塩見一雄: 海洋生物のヒ素-化学形解明を中心として-. 第15回ヒ素シンポジウム講演要旨集 16-18, 2009.
- 5) Hata A, Endo Y, Nakajima Y, Ikebe M, Ogawa M, Fujitani N, Endo G : HPLC-ICP-MS speciation analysis of arsenic in urine of Japanese subjects without occupational exposure. Journal of Occupational Health 49(3):217-23, 2007.

Speciation of arsenic compounds in urine of Aichi prefecture residents

Yuko Yamamoto, Michiyo Kojima, Hiromi Ichigo, Yasuko Koike, Yoshitomo Ikai

In order to determine the ordinary concentration level of arsine (As) in human urine separately by its chemical forms, 3 arsenic compounds [monomethylarsonic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), arsenobetaine (AB)], AsIII and As were measured by LC-ICP/MS in 210 urine samples donated from residents in Aichi prefecture. The concentration range of each chemical form (as As, normalized by creatinine) and their median were N.D. ~ 27.5 and 1.1 $\mu\text{g As/g cre}$ for MMA, 5.2 ~ 357 and 29.6 for DMA, 1.6 ~ 645 and 44.0 for AB, N.D. ~ 78.5 and 1.3 for AsIII, N.D. ~ 32.1 and N.D. for As . The ratio of each chemical form to their total were 2.3, 38.9, 55.1, 2.5 and 1.3% for MMA, DMA, AB, AsIII and As , respectively, showing that DMA and AB are major form in urine. In addition, the analysis of inquiries concerning the daily meals of donors suggested that the concentration and chemical form depends on habits of eating seafood, especially frequency and foodstuff such as fish and seaweed. The results of this study are considered to be helpful as a referential data, when a health crisis occurred involving As in Aichi Prefecture.

Keywords: arsine, speciation analysis, LC-ICP/MS

 他誌掲載論文抄録

Polymorphisms in base excision repair genes are associated with endometrial cancer risk among postmenopausal Japanese women

Hosono S¹, Matsuo K¹, Ito H¹, Oze I¹, Hirose K, Watanabe M¹, Nakanishi T², Tajima K³, Tanaka H¹
¹Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, ²Department of Gynecologic Oncology, Aichi Cancer Center Hospital, ³Aichi Cancer Center Research Institute
 International Journal of Gynecological Cancer 23(9): 1561-1568, 2013

Polymorphisms in base excision repair (BER) genes are associated with risk for several types of cancers but have not been studied with respect to endometrial cancer among Japanese women. This study included a total of 91 postmenopausal subjects with endometrial cancer and 261 controls without cancer who visited the Aichi Cancer Center between 2001 and 2005. We focused on single nucleotide polymorphisms within coding regions of 5 BER genes (OGG1, MUTYH, XRCC1, APEX1 and PARP1). Associations were evaluated using multivariate unconditional logistic regression models. We also assessed whether there were intergenic associations or an interaction with obesity. We observed a significant association

between endometrial cancer risk and XRCC1 rs1799782(C>T, Arg194Trp) and XRCC1 rs25487(G>A, Arg399Gln). We uncovered a significant association between obesity and rs25487. The XRCC1 polymorphisms were in complete linkage disequilibrium, and the XRCC1 haplotype TG associated significantly with endometrial cancer risk. The interaction between the CA haplotype and body mass index was marginally significant, whereas interaction between haplotype in XRCC1 and rs1136410(PARP1) was not significant. We found a significant association between endometrial cancer risk and XRCC1 polymorphisms and haplotype TG in postmenopausal Japanese women.

Phenotypic and genetic analyses of *Campylobacter jejuni* Lior serotype 76 isolated from chicken meat and clinical specimens.

Matsumoto M, Hiramatsu R, Yamada K, Suzuki M, Miwa Y¹, Yabutani M², Nagai Y³, Tsuchiya M⁴, Noda M⁵, Nagata A⁶, Kawakami K⁷, Shima T⁸, Tatsumi N⁹, Minagawa H

¹Aichi Prefectural Ichinomiya Health Center, ²Nagoya City Public Health Research Institute, ³Mie Prefecture Health and Environment Research Institute, ⁴Gifu Municipal Institute of Public Health, ⁵Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences, ⁶Fukui Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ⁷Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, ⁸Toyama Institute of Health, ⁹Anjo Kosei Hospital
 Japanese Journal of Infectious Diseases 66(1):72-75, 2013

The aim of this study was to examine the link between *Campylobacter jejuni* isolates obtained from chicken meat (n = 7) and gastroenteritis patients (n = 744). In total, 751 isolates were subjected to Lior serotyping. All the isolates from chicken meats were serotyped as Lior serotype 76 (LIO76). Among 23 of the identified LIO76 strains, 13 strains (6 from chicken meat and 7 from clinical specimens) were indistinguishable by Penner serotyping, antimicrobial susceptibility testing,

and pulsed-field gel electrophoresis. These strains were isolated in 2 different Japanese prefectures in 2004–2005, suggesting that chicken meat is an etiological agent of *Campylobacter* gastroenteritis and that a diffuse outbreak occurred during this time. Therefore, a continuous surveillance program should be established in Japan in order to prevent *Campylobacter* gastroenteritis, especially large-scale food-borne outbreaks.

緒言

皆川洋子

臨床とウイルス 41(1): 35-36, 2013

わが国の食中毒の変遷にはじまり、ノロウイルス、サポウイルス、A型肝炎、ロタウイルスに加え、地方衛生研究所の対処が

求められる腸管出血性大腸菌、食肉の生食、マリントキシン、有毒植物、キノコによる食中毒を網羅した食中毒特集の緒言。

サポウイルス食中毒

小林慎一、山下照夫、皆川洋子

臨床とウイルス 41(1): 52-60, 2013

サポウイルス(SaV)は主要な感染性胃腸炎の原因ウイルスのひとつであり、電子顕微鏡でエンベロープを持たず、特徴的な表面構造を有する正20面体の球形粒子(直径30~40 nm)である。1977年に札幌の乳児院の胃腸炎集団検体より初めて発見され、サッポロウイルスと名付けられたが、2002年にカリシウイルス科の「サポウイルス」属に分類された。SaVは遺伝学的に5つの遺伝子群(Genogroup I~V)に分類される。そのうち、ヒトに感染するものは4つの遺伝子群

(GI、GII、GIV、GV)であり、GIIIはブタ由来の遺伝子群である。SaVは従来、乳幼児が感染するウイルスとされてきたが、近年は成人や高齢者の食中毒事例や集団感染事例が報告されている。二枚貝、下水、河川水のSaV汚染状況調査により、SaVの感染サイクルとしてノロウイルス(NoV)と同様なヒト 二枚貝 ヒトの感染環が想定されている。SaVのワクチンや抗ウイルス薬は実用化されていない。

渡航歴の無い麻疹集団発生からの B3 型麻疹ウイルス検出 - 愛知県

安井善宏、伊藤 雅、安達啓一、尾内彩乃、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子、氏木里依子¹、山下敬介¹、伴 友輪¹、鈴木英子¹、福永令奈¹、飯田 篤¹、吉兼美智枝¹、成瀬善己¹、服部 悟¹、土屋啓三²、深瀬文昭²、望月真吾²、片岡 泉²、大鷲雄二²、片岡博喜²
¹愛知県衣浦東部保健所、²岡崎市保健所
 病原微生物検出情報 34(11):345 - 346, 2013

2013年8月23日から9月12日までに愛知県内で麻疹と診断された患者のうち12例から、B3型麻疹ウイルス遺伝子を検出した。患者由来N遺伝子の部分塩基配列は全て同一であり、福岡市及び尼崎市から報告された配列とも同一であった。また、5例の患者由来検体から麻疹ウイルスが分離された。疫学調査では13例(B3型12例及び

型別不明1例)全ての患者及び同居者に患者発症前1カ月間の渡航歴はなく、県内の医療機関以外に接点がない患者5名が8月16日~21日に集中しており、感染源は共通と考えられた。患者13名中11名は麻疹ワクチン接種歴無し、又は不明で、麻疹が発生するとワクチン未接種者間で感染が拡大することが再認識された。

愛知県で 2013/14 シーズンに初めて分離された B 型インフルエンザウイルス (Victoria 系統) の性状

安井善宏、尾内彩乃、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子
 病原微生物検出情報 34(12):376-377, 2013

2013年10月15日に上気道炎、下気道炎、発疹より麻疹を疑われた6ヶ月児より採取された咽頭ぬぐい液検体から、B型インフルエンザウイルスが分離された。患者は10月5日に発熱、10月8日にベトナムより入国していた。麻疹・風疹及びパルボウイルスB19遺伝子検査は陰性だったが、咽頭ぬぐい液検体からMDCK細胞において細胞変性効果が認められ、赤血球凝集抑制(HI)

試験の結果B型インフルエンザウイルス(Victoria系統)と同定された。この分離株についてHA遺伝子の部分塩基配列を決定し、系統樹解析を行ったところ、2011/12シーズンワクチン株と同じクレード1aに分類された。NA遺伝子解析からは既知のノイラミニダーゼ阻害剤に対する耐性変異は検出されなかった。

Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of Aichi viruses in clinical and environmental samples

Kitajima M¹, Hata A², Yamashita T, Haramoto E³, Minagawa H, Katayama H²

¹Department of Soil, Water and Environmental Science, The University of Arizona, ²Department of

Urban Engineering, The University of Tokyo, ³International Research Center for River Basin Environment, University of Yamanashi
Applied and Environmental Microbiology 79(13):3952-3958, 2013

Aichi viruses (AiVs) have been proposed as a causative agent of human gastroenteritis potentially transmitted by fecal-oral routes through contaminated food or water. In the present study, we developed a TaqMan minor groove binder (MGB)-based reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) system that is able to quantify AiVs and differentiate between genotypes A and B. This system consists of two assays, an AiV universal assay utilizing a universal primer pair and a universal probe and a duplex genotype-specific assay utilizing the same primer pair and two genotype-specific probes. The primers and probes were designed based on multiple alignments of the 21 available AiV genome sequences containing the capsid gene. Using a 10-fold dilution of plasmid DNA containing the target sequences, it was confirmed that both

assays allow detection and quantification of AiVs with a quantitative range of 1.0×10^1 to 1.0×10^7 copies/reaction, and the genotype-specific assay reacts specifically to each genotype. To validate the newly developed assays, 30 clinical stool specimens were subsequently examined with the assays, and the AiV RNA loads were determined to be 1.4×10^4 to 6.6×10^9 copies/g stool. We also examined 12 influent and 12 effluent wastewater samples collected monthly for a 1-year period to validate the applicability of the assays for detection of AiVs in environmental samples. The AiV RNA concentrations in influent and effluent wastewater were determined to be up to 2.2×10^7 and 1.8×10^4 copies/liter, respectively. Our RT-qPCR system is useful for routine diagnosis of AiVs in clinical stool specimens and environmental samples.

ヒトパレコウイルス3型 (HPeV-3) による発疹性疾患の5症例

志水哲也¹、志水麻実子¹、山下照夫、皆川洋子
¹志水こどもクリニック
小児科臨床 66(8):1729-1733, 2013

2011年6月～7月に、ヒトパレコウイルス (Human Parechovirus、以下HPeV) 3型 (以下HPeV-3) が検出された発疹性疾患5症例を経験した。年齢は生後5カ月～2歳7カ月、男児3例、女児2例であった。発熱は3例にみられ、発熱期間は4～7日、2峰性熱型を2例に認めた。またヘルパンギーナ様の口腔粘膜疹を3例に認めた。発疹の出現日は、第4病

日が4例、第5病日が1例で、発疹の性状は、5例とも斑状丘疹、一部に紅斑もみられた。

随伴症状として1例に歩行障害が認められた。

HPeV-3感染は発疹の頻度も比較的高く、ウイルス性発疹性疾患の鑑別のため、ほかの型のHPeV感染も含め念頭におく必要がある。

風疹診断マニュアル（第2版）

森嘉生¹、大槻紀之¹、岡本貴世子¹、坂田真史¹、竹田 誠¹、安井善宏、皆川洋子

¹ 国立感染症研究所ウイルス第三部

病原体検出マニュアル， 2012

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Rubella121217.pdf>

LC-MS/MSによる農産物中残留農薬の一斉分析

渡邊美奈恵、上野英二、井上知美、大野春香、猪飼誉友、森下智雄、大島晴美、林 留美子
食品衛生学雑誌 54(1) : 14-24 , 2013

LC適用農薬にGC分析が不向きな農薬を加えた効率的で精度よく定量できるLC-MS/MSによる農産物中残留農薬の一斉分析法を検討した。試料からアセトニトリルで抽出したのち、GPC/グラファイトカーボンSPEで精製し、さらに、シリカゲル/PSA連結SPEにより精製してScheduled MRMモードのLC-MS/MSにより測定した。ほうれんそう、玄米、大豆、オレンジおよびトマト

に124種類の農薬成分を0.1 μg/g添加して回収率を求めたところ、回収率70~120%（相対標準偏差 15%）に収まった農薬成分は121種類であった。本法を適用して57種類の農産物239検体について実態調査を行ったところ、98検体から49種類の農薬成分（延べ197農薬成分）が検出された。

Comparison of barium and arsenic concentrations in well drinking water and in human body samples and a novel remediation system for these elements in well drinking water

Kato M^{1,2,3}, Kumasaka M^{1,2,3}, Ohnuma S², Furuta A¹, Kato Y^{1,2}, Shekhar H⁴, Kojima M, Koike Y, Thang N⁵, Ohgami N^{1,2}, Ly T⁶, Jia X³, Yetti H³, Naito H³, Ichihara G³, Yajima I^{1,2,3}

¹Unit of Environmental Health Sciences, Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, ²Voluntary Body for International Health Care in Chubu University, ³Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine, ⁴Departments of Biochemistry and Molecular Biology, University of Dhaka, ⁵Department of Biochemistry and Plant Physiology, Faculty of Biology, Vietnam National University of Science, ⁶Institute for Environmental Science and Technology, Hanoi University of Science and Technology

PLOS ONE 8(6):e66681.doi:10.1371/journal.pone.0166681, 2013

Health risk for well drinking water is a worldwide problem. Our recent studies showed increased toxicity by exposure to barium alone ($700 \mu\text{g/L}$) and coexposure to barium ($137 \mu\text{g/L}$) and arsenic ($225 \mu\text{g/L}$). The present edition of WHO health-based guidelines for drinking water revised in 2011 has maintained the values of arsenic ($10 \mu\text{g/L}$) and barium ($700 \mu\text{g/L}$), but not elements such as manganese, iron and zinc. Nevertheless, there have been very few studies on barium in drinking water and human samples. This study showed significant correlations between levels of arsenic and barium, but not its homologous elements (magnesium, calcium and strontium),

in urine, toenail and hair samples obtained from residents of Jessore, Bangladesh. Significant correlation between levels of arsenic and barium in well drinking water and levels in human urine, toenail and hair samples were also observed. Based on these results, a high-performance and low-cost adsorbent composed of a hydrotalcite-like compound for barium and arsenic was developed. The adsorbent reduced levels of barium and arsenic from well water in Bangladesh and Vietnam to $<7 \mu\text{g/L}$ within 1 min. Thus, we have showed levels of arsenic and barium in humans and propose a novel remediation system.

編集情報運営委員会

委員長 : 広瀬 かおる (企画情報部)
委員 : 井村 守邦 (総務課)
濱武 通子 (企画情報部・健康科学情報室)
伊藤 雅 (生物学部・ウイルス研究室)
山田 和弘 (生物学部・細菌研究室)
中村 瑞那 (生物学部・医動物研究室)
大野 春香 (衛生化学部・医薬食品研究室)
山本 優子 (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第 64 号

平成 26(2014)年 3 月 発行

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6

愛知県衛生研究所

所長 皆川洋子

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

電話 : ダイヤルイン

所長	052-910-5604
次長	052-910-5683
研究監	052-910-5684
総務課	052-910-5618
企画情報部長 健康科学情報室	052-910-5619
生物学部長 ウイルス研究室	052-910-5654
細菌研究室	052-910-5674
医動物研究室	052-910-5669
衛生化学部長 医薬食品研究室	052-910-5654
生活科学研究室	052-910-5638
	052-910-5639
	052-910-5643

FAX : 052-913-3641

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

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

(この刊行物は再生紙を使用しています)

