

愛知県衛生研究所報

第 65 号 平成 27 年 3 月

目 次

調査研究

愛知県における自殺死亡の動向と特徴	1
大参寛典、広瀬かおる、中村瑞那、森 一明、皆川洋子	
愛知県におけるインフルエンザウイルス流行状況と分子疫学的解析 - 2009/10 ~ 2013/14 シーズン -	9
安井善宏、中村範子、安達啓一、尾内彩乃、廣瀬絵美、伊藤 雅、小林慎一、 山下照夫、皆川洋子	
カンピロバクターの Penner 遺伝子型別法の検討	17
市古浩美、山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、山下照夫、皆川洋子	
2014 年シーズン愛知県においてマウス法規制値を超えた麻痺性貝毒の分析	23
長谷川晶子、早川大輔、中村瑞那、秦眞美、山下照夫、皆川洋子	
食中毒の原因物質となる植物性自然毒(リコリン、コンバラトキシン)の同時分析法	31
後藤智美、尾関史晃、青山文生、伊藤裕子 ¹ 、上野英二、猪飼誉友 ¹ 愛知県がんセンター中央病院	
愛知県の一般住宅におけるダニアレルゲン調査	39
小島美千代、青木梨絵、市古浩美、椋島由佳 ¹ 、小池恭子、猪飼誉友 ¹ 愛知県がんセンター中央病院	
他誌掲載論文抄録	47

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

Volume 65, March 2015

Contents

Original Papers

Trends and Features of suicide in Aichi Prefecture 1
Hironori Ohmi, Kaoru Hirose, Mizuna Nakamura, Kazuaki Mori,
Hiroko Minagawa

Detection and genetic characterization of influenza virus
from influenza and influenza-like illness patients
in Aichi Prefecture between 2009/10 and 2013/14 seasons 9
Yoshihiro Yasui, Noriko Nakamura, Hirokazu Adachi, Ayano Onouchi, Emi Hirose,
Miyabi Ito, Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Evaluation of a PCR-based serotyping (Penner genotyping)
for *Campylobacter jejuni* 17
Hiromi Ichigo, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto,
Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Analysis of Paralytic Shellfish Poison exceeding the official regulatory
standard level in bivalves collected in Aichi Prefecture
during 2014 season 23
Akiko Hasegawa, Daisuke Hayakawa, Mizuna Nakamura, Mami Hata,
Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

The simultaneous analysis of vegetable natural poison
(lycorine and convallatoxin) that causes food poisoning 31
Tomomi Goto, Fumiaki Ozeki, Fumio Aoyama, Yuko Ito¹, Eiji Ueno, Yoshitomo Ikai
¹ Aichi Cancer Center Hospital

Determination of mite-allergens in private houses in Aichi prefecture 39
Michiyo Kojima, Rie Aoki, Hiromi Ichigo, Yuka Kabashima¹, Yasuko Koike,
Yoshitomo Ikai
¹Aichi Cancer Center Hospital

Summaries of papers accepted to other journals 47

調査研究

愛知県における自殺死亡の動向と特徴

大参寛典、広瀬かおる、中村瑞那、森 一明、皆川洋子

要 旨

全国的にも自殺者数が急増した 1998 年以降愛知県においても 14 年連続 1,500 人前後と多い状況が続いており、愛知県は「あいち自殺対策総合計画」を掲げ予防対策に取り組んでいる。そこで地域ごとの有効かつ効果的な自殺対策立案・実践に有用な情報を得ることを目的として、愛知県における自殺死亡の実態解明を試みた。自殺者数の動向や地域集積性については人口動態統計死亡データを、原因・動機については警察データを使用して解析を行った。その結果、年齢階級別死亡率は、男女ともに 70 歳以上の高齢者では減少傾向を示す一方、20～30 歳代の男性では増加傾向を示した。原因・動機では「健康問題」が 40.2 %と最も高く、その細分類では健康問題のうち「病気の悩み・影響（うつ病）」と分類されるものがどの世代でも約 20 %を占めていた。さらに、2003 年～2007 年市町村別標準化死亡比を目的変数に社会生活指標（22 項目）を説明変数として重回帰分析（ステップワイズ法）を行った。男性では「65 歳以上の親族のいる世帯割合」が正の、女性では「人口一人あたり市町村民所得」が負の有意に関連する指標として選択され、過疎化や社会生活要因が自殺死亡の地域差に影響を与える可能性が示唆された。自殺死亡率が漸増傾向を示す 20 歳代～30 歳代の男性など若年群に焦点をあてながら、地域の実情を踏まえ「健康問題」とりわけ「うつ病」対策を中心に性・ライフステージ別に効率よく対策を行う必要が示唆された。

キーワード：自殺死亡率、損失生存年数、標準化死亡比、重回帰分析、二次医療圏

序 文

世界保健機関（WHO）2014 年の報告¹⁾によれば日本の自殺死亡率は 172 ヶ国中 9 位と高く、全国的に自殺者数が急増した 1998 年以降、30,000 人前後と高い水準で推移している。2006 年に施行された自殺対策基本法では、自殺対策は自殺が個人的な問題としてのみとらえられるべきものではなく社会的な取組として実施されなければならない公衆衛生上の課題として位置づけられ、国、地方公共団体等を単位とした対策が求められて

いる。愛知県では 2007 年より「あいち自殺対策総合計画」²⁾を掲げ、自殺者数を一人でも減らすことをめざして予防対策に取り組んでいる。本研究では愛知県における地域ごとの有効かつ効果的な自殺対策立案・実践に有用な情報を得ることを目的として、自殺の動向とリスク要因分析を実施した。

資料及び方法

(1) 自殺死亡者数の把握には厚生労働省の「人口動態統計」と警察庁の「自殺の概要」

があり、両者は対象者や集計方法等が異なっている。前者は死体検案書もしくは死亡診断書に基づき住所地ごとに作成されており、後者は警察官が作成する自殺統計原票を基に自殺死体発見地ごとに作成されている。従って両者の自殺死亡数の推移は同じ傾向を示しているが必ずしも一致しない。本調査研究では自殺者数の動向や地域集積性については人口動態統計データを、原因・動機については警察データを使用して解析を行った。

(2) 人口動態死亡データに基づき 1985 年～2012 年の自殺死亡数・年齢調整死亡率(10 歳以上)を性・年齢階級別に算出した。さらに、全国的に自殺者数が急増した 1998 年を挟む自殺者数急増前 10 年(1988 年～1997 年)と急増後 10 年(1998 年～2007 年)の性比を年齢階級別に比較した。

性・年齢(10 歳)階級別にみた死因順位を、自殺者数急増前の 1997 年と直近の 2012 年で比較した。

また、人口動態データに基づき 2003～2007 年の性別、市町村別標準化死亡比(SMR; standardized mortality ratio)を算出した。

(3) 自殺死亡数のように発生頻度が低い変数は人口規模が小さい地域の死亡率が偶然性の影響を受け大きく変動するため、ベイズ推定値を使用する必要がある。ベイズ推定死亡率は自殺予防総合対策センターのホームページで公開されている「自殺対策のための自殺死亡の地域統計」³⁾を使用した。2008 年～2012 年二次医療圏別年齢調整死亡率(ベイズ推定値)を用いて地域差を観察した。

(4) 自殺死亡による損失を「健康日本 21」⁴⁾等で使用されている損失生存年数(PYLL; potential years of life)⁵⁾を活用し検討した。生存目標年数を 65 歳に設定、損失年

数を(65 - 死亡時年齢)とし、2007 年～2009 年の自殺死亡の生産年齢人口の損失の大きさを PYLL65 率(人口 10 万対)として算出した。

(5) 自殺の原因・動機については 2007 年から原因・動機を最大 3 つまで、7 つの大分類(家庭問題、健康問題、経済・生活問題、勤務問題、男女問題、学校問題、その他)に分類し報告されることとなった。2009～2011 年の年代別にみた原因動機を年代別死亡数に対する割合として算出した。さらに詳細な 52 に細分類化し青少年(30 歳未満)・中高年(30 歳～59 歳)・高齢者(60 歳以上)の 3 つの世代別に割合を比較検討した。

(6) 社会生活指標と自殺死亡との関連性については、2003 年～2007 年における性別市町村別 SMR を目的変数、表 1 に示す 22 項目の社会生活指標を説明変数としてステップワイズ法による重回帰分析を行った。

表1 重回帰分析に用いた社会生活指標(22項目)

分類	項目
住環境	人口(2005年)
	0～14歳の人口に占める割合(2006年)
	15～64歳の人口に占める割合(2006年)
	人口増減率(2005年)
	転出率(2005年)
	未婚率(2005年)
	有配偶率(2005年)
	単独世帯割合(2005年)
経済産業	持ち家率(2005年)
	完全失業率(2005年)
	第1次産業就業者割合(2005年)
	第2次産業就業者割合(2005年)
	第3次産業就業者割合(2005年)
	年間販売額総数(単位:百万円)(2004年)
	小売事業所総数(2004年)
	人口一人あたり市町村民所得(単位:千円)(2005年)
保健福祉	65歳以上親族のいる世帯(2005年)
	65歳以上に占める「一人暮らし高齢者」の割合(2005年)
	人口千人あたり医師数(2004年)
	人口千人あたり健康相談被指導延人員(2005年)
	人口千人あたり民生委員数(2005年)
	老人クラブ男女計加入率(60歳以上人口)(2005年)

結 果

(1) 自殺死亡数・年齢調整死亡率の推移 (図1)

愛知県では1997年自殺死亡者数の男690人、女370人から1998年には男997人(1.4倍)、女454人(1.2倍)に増加し全国と同様の傾向を示した。その後2003年に男1,083人、女483人と最も多い自殺者数1,566人となった。2012年は男913人、女419人、合計1,322人となり、自殺者数が急増した1998年以降初めて1400人を下回った。

男の年齢調整死亡率は死亡数同様、1998年に急増し人口10万人対30.7と上昇、その後も全国の年齢調整死亡率を若干下回るものの横ばい状態である。女では1986年の16.8以降減少傾向を示していたが、1998年以降横ばい傾向で推移している。

(2) 性・年齢階級別自殺死亡率の推移(図2)

70歳以上の高齢者では男女とも死亡率は減少傾向を示した。40歳代～60歳代の男は1998年に急増した。その後、60歳代男では2003年に小さなピークを形成した後やや減少傾向、50歳代男では2004年頃ま

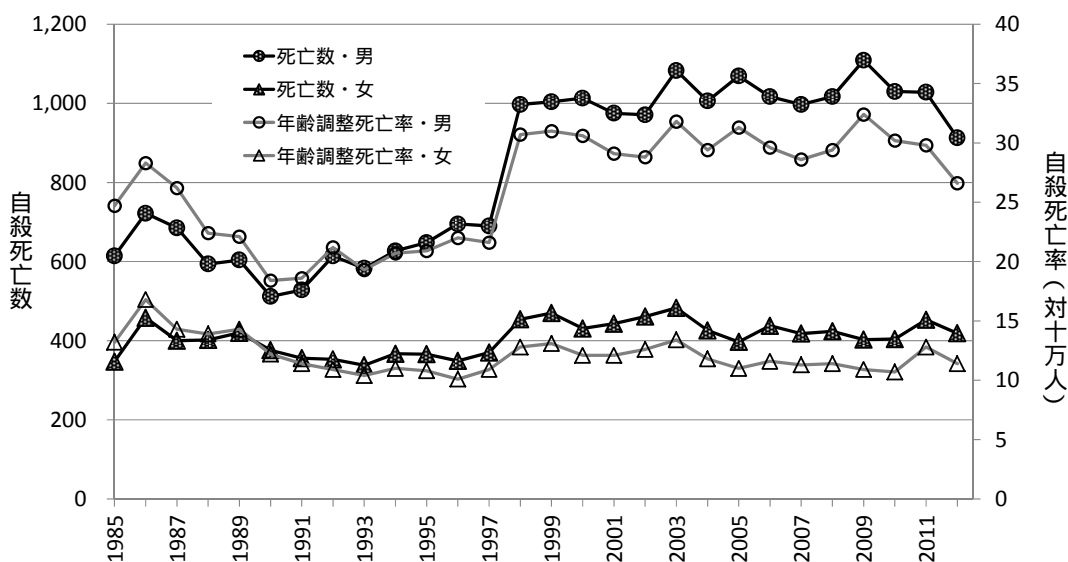


図1 愛知県における自殺死亡数・年齢調整死亡率(10歳以上)の推移(1985年-2012年)

出典：厚生労働省「人口動態統計」

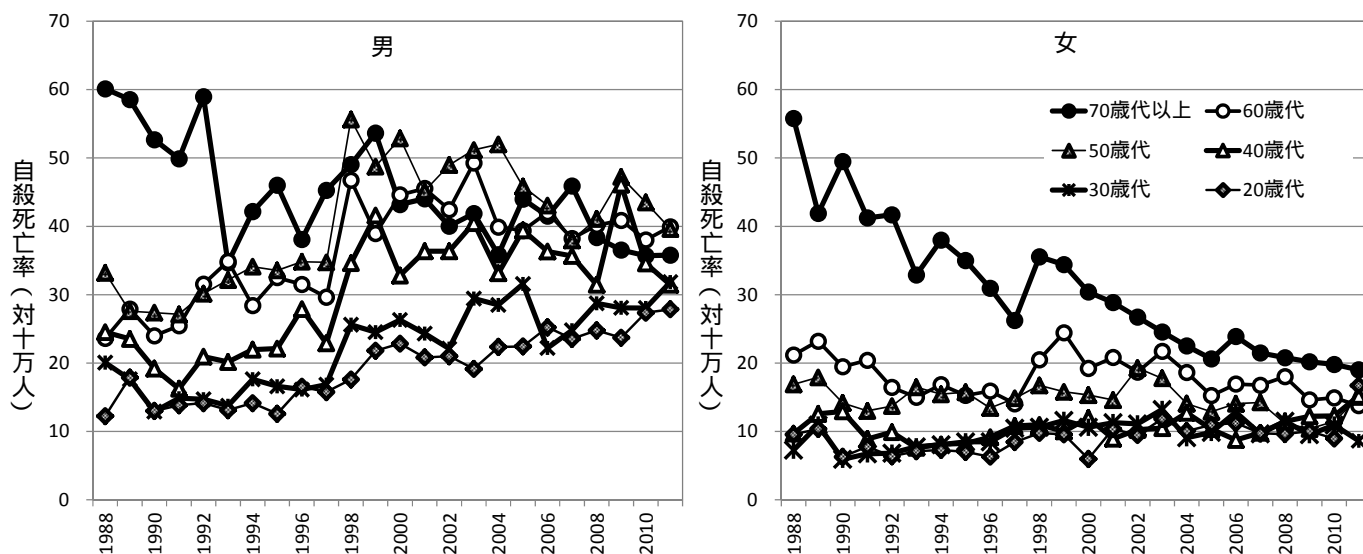


図2 性・年齢階級別自殺死亡率の年次推移(1988年-2011年)

出典：厚生労働省「人口動態統計」

で横ばいであったがその後やや減少傾向、40歳代男では2008年までほぼ横ばいであったが2009年にピークを示した。20歳代、30歳代の男では漸増傾向を示した。30歳代～60歳代の女では大きな変動はみられなかったが、20歳代の女ではやや増加傾向を示した。

(3) 年齢階級別自殺者数の性比 (図3)

自殺者数急増の1998年前後とも70歳未満ではどの年齢層でも男の占める割合は高かったが、急増後の40歳代以降の高齢者群では急増前に比べると女性の占める割合は低下していた。性比は年齢層によって異なっていたが40歳代で男性の占める割合が最も高く(急増前69.6%、急増後78.6%)、

70歳以上で女性の占める割合が最も高かった(急増前55.7%、急増後46.5%)。

(4) 性・年齢階級別死因順位

死因順位についてみると男では、20歳・30歳代で1997年には自殺が第2位であったものが、2012年にはそれぞれ1位の死因となっていた。40歳代でも3位から2位に、50歳代でも5位から3位へと上昇していた。女でも1997年から2012年にかけて死因としての自殺の順位は上昇し、10・20歳代では第1位、30・40歳代では第2位を占めるに至った。

(5) 二次医療圏別年齢調整死亡率 (図4)

2008年～2012年の性別年齢調整死亡率(対10万人)は全国の男34.4、女12.8に

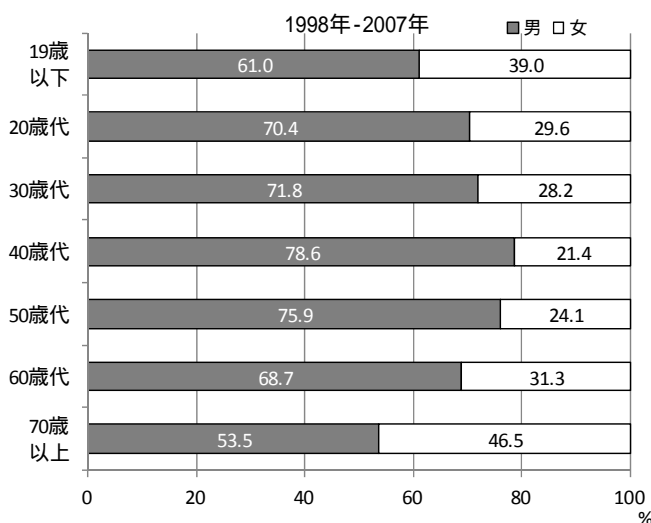
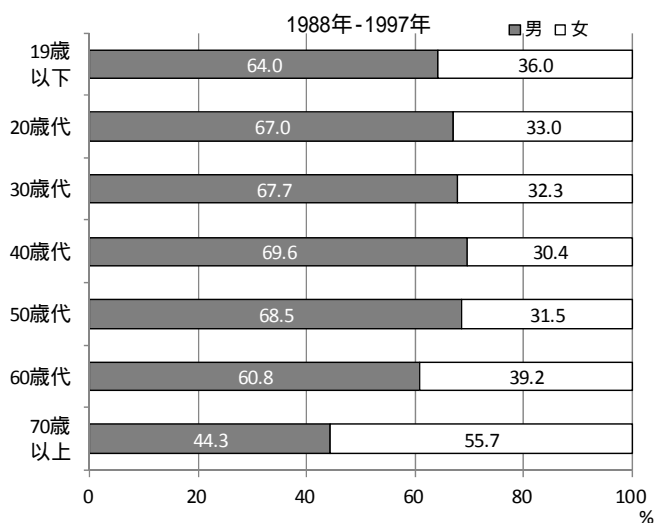


図3 愛知県における年齢階級別自殺者数の性比

出典：厚生労働省「人口動態統計」

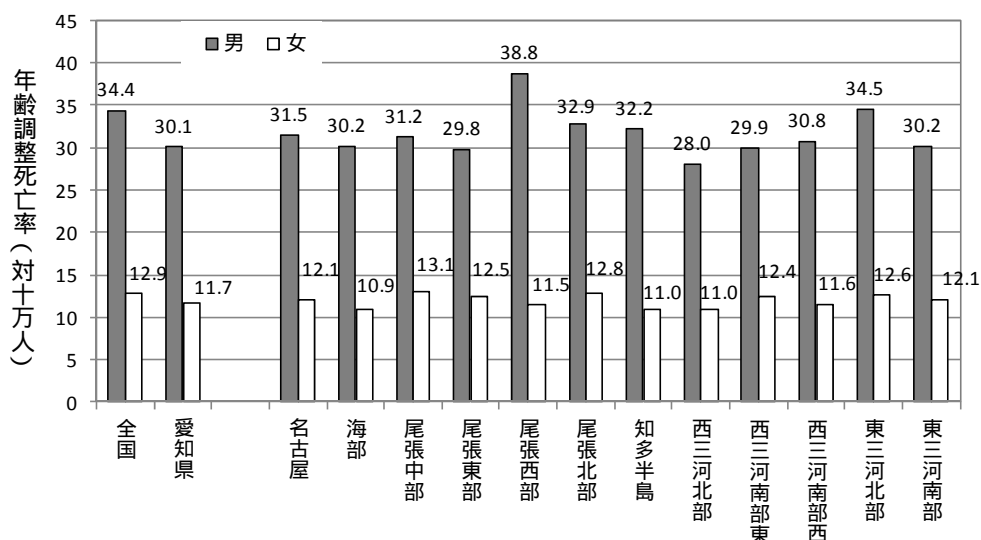


図4 愛知県の二次医療圏別推定自殺年齢調整死亡率 (2008年 - 2012年)

出典：自殺予防総合対策センター「自殺対策のための自殺死亡の地域統計」

し、愛知県はそれぞれ 30.1、11.7 と全国を下回っていた。二次医療圏別に年齢調整死亡率のベイズ推定値を比較してみると、男では、尾張西部(38.8)、東三河北部(34.5)、女では尾張中部(13.1)で全国より高い死亡率を示す地域が認められた。また、死亡率が低い地域としては、男では西三河北部(28.0)、女では海部(10.9)、知多半島(11.0)、西三河北部(11.0)が観察された。

(6) 損失生存年数 (PYLL)

生産年齢人口の喪失への寄与を示す PYLL65 率(2007~2009年)は、男では悪性新生物 588.6、自殺 545.5、不慮の事故 303.4、女では悪性新生物 517.1、自殺 203.9、不慮の事故 118.2 の順であり、男女とも自殺が第 2 位であった。男の PYLL65 率は悪性新生物とほぼ同程度の高い値を示した。

(7) 原因・動機 (図 5)

原因・動機特定者の原因・動機は「健康問題」が 40.2%と最も多く、次いで「経済・生活問題」18.0%、「家庭問題」11.0%の順であった。年齢階級別にみると、男では高齢者で「健康問題」の割合が高くなり、70歳代以上では 50%を超えていた。一方、女では 10歳代を除きどの年齢層でも「健康問

題」が最多であった。20歳代でも 51%を占め、年齢とともに割合は増加、70歳代、80歳以上では 64%、69%と高かった。さらにその細分類でみると健康問題のうち「病気の悩み・影響(うつ病)」と分類されるものが青少年(30歳未満)、中高年(30歳~59歳)、高齢者(60歳以上)のどの世代でも約 20%を占めていた。また、高齢者では「病気の悩み(身体の病気)」が 31.5%を占め主な原因となっていた。原因・動機不特定者は 16.3%であった。

(8) SMR と社会生活指標との関連

重回帰分析の結果、男の自殺死亡 SMR と正の有意に関連する指標として「65歳以上の親族のいる世帯割合(標準化偏回帰係数 0.832)」、「15歳~64歳の人口に占める割合」(0.510)、「65歳以上に占める一人暮らし高齢者の割合」(0.473)が、負の有意になった要因として「市町村別の人口」(-0.297)が選択された。また、女性の自殺死亡 SMR との関連では正の有意になった要因として「年間販売額総数」(標準化偏回帰係数 0.262)、負の有意になった要因として「人口一人当たり市町民所得」(-0.313)が選択された。

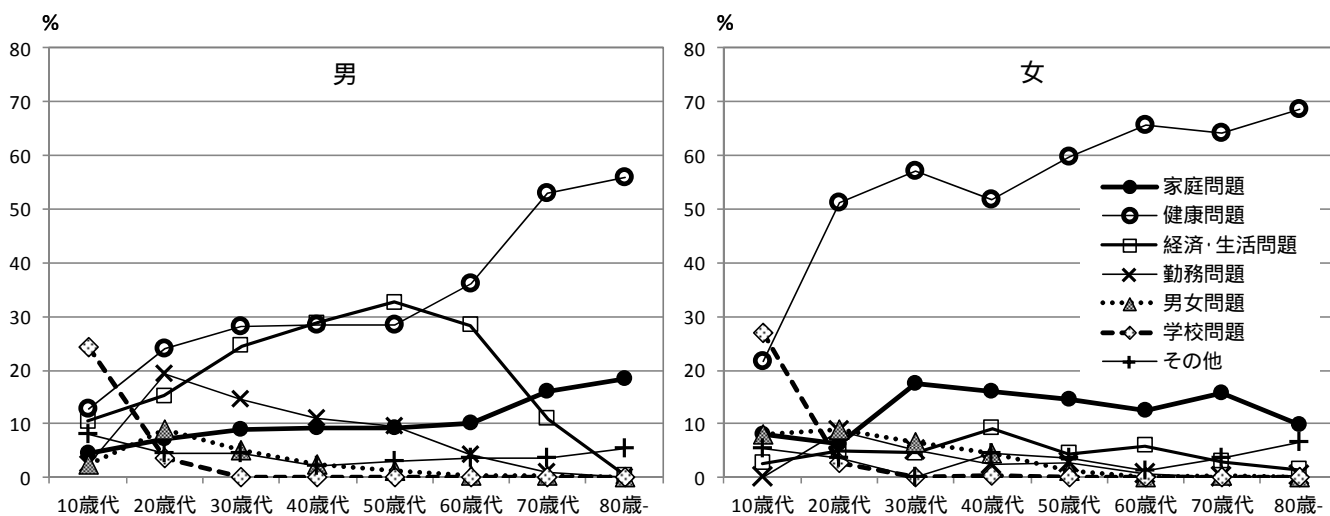


図5 愛知県における年齢階級別に見た自殺の原因・動機 (2009-2011年)

出典：愛知県警察本部データ

考 察

愛知県の自殺者数は全国同様 1998 年に急増し 2003 年には過去最高の 1,566 人となった。約 70 % は男性が占めているが、その性比は年代により異なっており若年群と高齢群で女性の割合が比較的多かった(図 2)。年齢階級別死亡率をみると 1998 年に自殺死亡が急増した 50 歳代では 2004 年以降は減少傾向を示している。一方、20 歳代、30 歳代の若年層は増加傾向である。自殺死亡急増後は 50 歳未満の全年齢層の死因順位において男女とも自殺が第 1 位もしくは 2 位になっており、若年層において自殺が死亡原因として重要な位置を占めている。若い世代で死因の第 1 位が自殺となっているのは先進 7 か国では日本のみでその死亡率も高い状況であり、わが国における若い世代の自殺は深刻な状況といえる。ネット世代の自殺関連行動などの実態等を捉え若年者に対する対策を講じることは喫緊の課題と考えられる。

男の愛知県全体の年齢調整死亡率は全国より低いレベルで推移していたが医療圏別では尾張西部、東三河北部で全国より高い地域が観察された。東三河北部は先行研究⁶⁾においても死亡率が高いと報告されており地域差の存在が伺えた。今回の SMR と社会生活指標との関連を検討した重回帰分析の結果からも過疎との関連が示唆された。秋田県⁷⁾や鹿児島県⁸⁾の研究によれば、市町村別自殺死亡 SMR の分布は男女とも都市部で低く農村部で高い傾向が認められたと報告されている。市区町村を単位とした自殺と社会経済的要因を検討した生態学的研究のレビュー⁹⁾によれば危険因子として婚姻・世帯構成に関する項目(有配偶人口、死別人口、離別人口、離婚件数、単独世帯数)、労働・職業に関する項目(完全失業率)、予防因子としては保健医療福祉に関する項

目(医師数、看護師数、訪問看護師数、民生委員数)が挙げられている。しかし多くの研究が同一時点での自殺指標と多数の社会経済指標を探索的に相関分析しており、社会経済指標間の相関関係を考慮していないなどの課題が指摘されている。市区町村単位で公表されている統計は限られており必然的に制約を受けることになるが、さらに分析に使用する社会生活要因を検討し、地域差に影響に与える要因を明確にしていく必要がある。

わが国における原因・動機別の自殺死亡率をみると¹⁰⁾「健康問題」が最も高く、次いで「経済・生活問題」となっており、1998 年の自殺率急上昇以前から入れ替わっていない。「経済・生活問題」による死亡率は 2009 年以降の 3 年間で -38 % と大幅な低下が認められた。しかし、「経済・生活問題」の関連指標である「完全失業率」はリーマン・ショック直後の 2009 年には 5.1 % となり 2012 年には 4.3 % となったものの、自殺死亡率急上昇以前の 3.4 % までは低下していない。「失業」を原因・動機とする自殺死亡率は「完全失業率」と強い相関関係が認められており、「経済・生活問題」を原因とする自殺死亡率は今後も景気変動の影響を受け推移していくものと推察される。今回の解析結果でも 30 歳代から 50 歳代男性では「経済・生活問題」が「健康問題」と同程度の割合で挙げられていた(図 5)。狭義の自殺対策を超えた総合的な経済対策に加えて、失業率上昇などの景気悪化が自殺に結びつく経路を監視し予防に繋げる対策が求められる。

また、20 歳・30 歳代の男性では「経済・生活問題」とならんで「勤務問題」の割合が高かった。若年層における自殺死亡率の上昇は経済状況の相対的改善にもかかわらず、非正規雇用者割合の増加など雇用情勢

の悪化が影響している可能性が考えられる。今後も若年自殺者の動向を注視する必要がある。

愛知県においても全国同様、男女ともに原因動機として「健康問題」が最も多かった。また、その細分類「病気の悩み・影響（うつ病）」を原因とする自殺者数が多い傾向がここ数年続いている。精神科受診につながるための対策、外来通院者のフォローアップ体制の強化など治療構造・治療環境の設定、地域関係機関との連携等精神科医療における自殺予防対策を発展させていく必要が考えられる。

生産年齢人口喪失の観点からみたPYLL65率の結果からも、自殺死亡は男性の場合、悪性新生物とほぼ同程度の影響があり、社会全体として取り組むべき重要な公衆衛生上の課題といえる。「健康問題」、「うつ病」対策を中心として、地域ごとに性・ライフステージ別に効率よく対策を行う必要性が示唆された。

謝 辞

人口動態死亡データ提供にご協力いただきました愛知県健康福祉部障害福祉課こころの健康推進室及び愛知県警察本部生活安全部の皆様に深謝いたします。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ご心より感謝します。

文 献

1)WHO : Preventing suicide : A global imperative(2014);http://www.who.int/mental_health/prevention/suicide/

[suicideprevent/en/](http://www.who.int/mental_health/prevention/suicide/)

2)愛知県：あいち自殺対策総合計画～「気付きと見守りにより生きやすい社会の実現を目指して」～；<http://www.pref.aichi.jp/shogai/kokoro/taisaku/pdf/sinjisatukeikaku.pdf>

3)自殺予防総合対策センター：自殺の統計；<http://ikiru.ncnp.go.jp/ikiru-hp/toukei/index.html>

4)公益財団法人健康・体力づくり事業団：健康日本21（第2次）；<http://www.kenkounippon21.gr.jp/>

5)厚生労働省：健康日本21総論参考資料；http://www1.mhlw.go.jp/topics/kenko21_11/s1.html

6)岡本和士：愛知県の自殺の疫学，現代医学，58(1)，137-144，2010

7)本橋豊、劉揚、佐々木久長：秋田県の自殺死亡の地域較差と社会生活要因に関する研究，厚生指標，46(15)，10-15，1999年

8)寒水章納：鹿児島県における自殺死亡の地域集積性と社会生活指標との関連，厚生指標，60(8)，17-29，2013

9)平成22年度厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）報告書「自殺の原因分析に基づく効果的な自殺防止対策の確立に関する研究」地域における自殺と関連する精神保健上の問題に関する実態把握の方法と活用の検討（分担研究者：稲垣正俊）

10)内閣府：平成25年版自殺対策白書；<http://www8.cao.go.jp/jisatsutaisaku/whitepaper/w-2013/html/index.html>

Trends and Features of suicide in Aichi Prefecture

Hironori Ohmi, Kaoru Hirose, Mizuna Nakamura,
Kazuaki Mori, Hiroko Minagawa

Within developed countries suicide rates in Japan are one of the highest, and are a matter of public health concern. Suicide figures in Japan dramatically increased in 1998, and annual number of suicide has surpassed 30,000 subsequently. This study examined the trends and the relevant determinants of suicidal deaths in Aichi Prefecture, with particular emphasis on gender and age.

Suicide mortality between 1985 and 2012 was obtained from the Vital Statistics of Japan and Aichi Prefectural Police data were used to calculate features in motivation-specific suicide by gender and age. To explore the influence of socio-economic variables on suicide we conducted multiple regression analyses.

Suicide mortality in 70 years old or more were decreasing, while in 20-39 years were increasing. Suicide was one of the commonest causes of death among young people in 2012. Although proportion of male suicide deaths showed higher than that of female in age group younger than 70 years, gender ratio varied among age groups.

In regards to causes and motives, "health problems" was most frequent, accounting for 40.2 %, followed by "economic problems" (18.0 %), and "family problems" (11.0 %). When "health problems" was divided into subdivision categories, "depressive psychosis" accounted for approximately 20 % in all generations. Furthermore, the effects of socio-economic factors on suicide were gender-dependent by multiple regression analysis.

Our findings suggested gender- and generation- specific approach would shed light on efficient suicide prevention strategy. Moreover, enhancing both the primary and the specialized mental health services may reduce the burden of suicide.

Key words: suicide mortality, potential years of life, standardized mortality ratio, multiple regression analysis, secondary medical service area

調 査 研 究

愛知県におけるインフルエンザウイルス流行状況と 分子疫学的解析 - 2009/10 ~ 2013/14 シーズン -

安井善宏、中村範子、安達啓一、尾内彩乃、廣瀬絵美、伊藤 雅、小林慎一、
山下照夫、皆川洋子

要 旨

インフルエンザウイルス(FluV)は主に冬季に風邪様症状を引き起こす主要な病原ウイルスの一つである。2009/10 から 2013/14 の 5 シーズンに愛知県内の病原体定点医療機関でインフルエンザ及びインフルエンザ様患者から採取された咽頭ぬぐい液 1,441 検体について培養細胞によるウイルス分離を行い、分離された FluV 株(分離株)の型・亜型・系統の同定を実施し、流行株の変化を解析した。更に、A 型インフルエンザウイルス(FluA)分離株について、ウイルスの抗原性変化及び抗インフルエンザ薬であるノイラミニダーゼ(NA)阻害剤に対する薬剤耐性変異の獲得状況等を調べた。また、ヘマグルチニン(HA)及びNA遺伝子領域の塩基配列に基づく系統樹解析を行い、抗原変異や薬剤耐性と関連がある遺伝子変異を解析した。調査期間の間、AH1N1pdm2009 の抗原性に大きな違いは認められなかったが、HA 遺伝子系統樹解析の結果から多様なウイルスが流行を繰り返していることが示唆された。薬剤耐性変異(H275Y)は 2009/10 から 2010/11 シーズンに散発例として検出されたが、2011/12 シーズン以降は検出されなかった。本県では薬剤耐性株の集団発生は検知されなかった。2010/11 シーズンと 2013/14 シーズンの AH3 亜型には抗原性がワクチン株と比べ少し変化した株が存在した。HA 遺伝子系統樹解析の結果は F193S, A138S, F159S, N225D K326R の変異が抗原性の変化と関連があることを示した。

キーワード： インフルエンザウイルス、分子疫学、サーベイランス、薬剤耐性

序 文

インフルエンザウイルス(FluV)はエンベロープを持つマイナス 1 本鎖 RNA ウイルスであり、オルソミクソウイルス科に分類される¹⁾。A 型インフルエンザウイルス(FluA)は 8 分節の RNA からなる。ウイルスの表面にはヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)が存在し、その抗原性の違いによって H1~H17、N1~N9 の亜型に分けられる¹⁾。ヒトの間で流行が確認されている FluA は H1N1 亜型、H2N2 亜型、H3N2 亜型のみである。現在は H1N1 亜型

(AH1N1pdm2009)と H3N2 亜型(A 香港型)及び B 型が季節性インフルエンザとして流行している。

2009 年 4 月に発生が確認され世界的流行が起こったインフルエンザは豚の中でヒト、豚と鳥の FluA が遺伝子再集合を起こし、新たに誕生した FluA が病因ウイルスであった²⁾。この FluA の抗原性や HA 遺伝子の相同性は今までの H1N1 亜型(A ソ連型)よりも古典的豚 FluV に近かったため³⁾、ほとんどの人は抗体を保有しておらず、瞬く間に世界中へ広がった。この新たな FluA の出現

が2009/10(09/10)シーズンにおけるインフルエンザ流行の主たる要因であった⁴⁾。過去10年では、09/10シーズンを除くと04/05と11/12シーズンに全国で比較的大きな流行が認められた⁵⁾。その10年間のFluAの分離・検出報告数を比較するとAH3亜型とAH1亜型が入れ替わるように流行を起こしていた⁶⁾。

インフルエンザの抗ウイルス治療にはNA阻害剤が使用される。08/09シーズンのAH1亜型はこのNA阻害剤に耐性を示すことが知られている遺伝子変異をほぼ100%獲得していた⁷⁾。これらのことから、インフルエンザの制御には、流行亜型の分布、抗原性の変化、遺伝子変異に関する実態把握が重要である。

本稿では2009年9月から2014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インフルエンザ及びインフルエンザ様患者由来検体からのFluV検出状況、型・亜型・系統別同定及び分子疫学的解析の結果を報告する。

材料と方法

1. 検査検体

2009年9月から2014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(名古屋市を除き豊橋市、岡崎市、豊田市を含む)31医療機関(小児科31、内科23)で採取されたインフルエンザ及びインフルエンザ様患者(09/10シーズン:467検体、10/11:368、11/12:206、12/13:196、13/14:204)計1,441検体を検査対象とした。薬剤耐性検査については上記定点以外で採取された検体及び集団発生で採取された検体も検査対象に含めた。

2. ウイルス分離及び型・亜型・系統別の同定

咽頭ぬぐい液検体は1,000 g、15分間の遠心処理を行い、その上清100 µLをMDCK細胞(5x10⁵ cells/well)に接種し、1週間、34℃、5% CO₂の条件下で培養を行った。経日的に観察を行い細胞変性効果(CPE)が認められた場合を分離陽性とした。1週間を経過してもCPEが認められなかった場合は、新しく培養

したMDCK細胞に培養上清50 µLを接種し、更に1週間観察・培養を行った。ウイルス分離陽性の時は、国立感染症研究所(感染研)によりシーズン毎に配布されたFluV同定用抗原抗体キットを用い、感染研インフルエンザ診断マニュアル(診断マニュアル)⁸⁾に従って赤血球凝集阻止(HI)試験を行い、FluVの型・亜型・系統を同定した。赤血球凝集(HA)活性が低くHI試験が実施できない場合には、診断マニュアルに従ってコンベンショナルRT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)法によりFluV遺伝子を検出して同定を行った。遺伝子検査に用いるRNAは分離株からHigh Pure Viral RNA Kit(Roche, Germany)を用いて抽出し、検査に使用するプライマーは診断マニュアルに掲載されたものを用いた。

3. 遺伝子解析

FluVのHA及びNA遺伝子解析は診断マニュアル⁸⁾に従った。分離株より抽出したRNAからRT-PCR法によって各遺伝子を増幅し、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シング法で塩基配列を決定した。更に既知のワクチン株及び標準株との相同性をClustalW(Ver.2.1)を用いて解析し、近隣結合(NJ)法で系統樹解析を行った。

4. 薬剤耐性変異の検出

AH1N1pdm2009(AH1pdm09)に関しては、上記NA遺伝子塩基配列解析(09/10シーズンのみ)により、NA阻害薬(オセルタミビルとペラミビル)に対する耐性変異であるNA分子275番目に相当するヒスチジン(H)からチロシン(Y)へのアミノ酸置換を検索した。10/11シーズン以降は感染研と当所を含む地方衛生研究所(地衛研)の連携にて開発された、リアルタイムPCR機器を用いたAllele-specific RT-PCR法^{8,9)}により上記耐性変異(H275Y)の有無を検出した。

AH3亜型に関してはNA遺伝子塩基配列解析から既知の薬剤耐性変異に相当するアミノ酸変異(E119V、R292K、N294S)¹⁰⁾を検索した。

結 果

1. FluV分離・検出状況

図1にシーズン毎の型・亜型・系統別分離・検出状況を示した。2009年4月に新型インフルエンザ（後の季節性AH1pdm09）が発生し、09/10シーズンはシーズン入りした9月からインフルエンザの流行が認められ、467検体中392検体からFluVを分離し、その内382検体（97.4%）（以後割合のみ記載）がAH1pdm09であった。その他はAH3亜型（0.8%）、B型ビクトリア系統（1.5%）、B型山形系統（0.3%）であった。10/11シーズン（368検体中315検体FluV分離）は、AH1pdm09（44.1%）が主に検出されたが、AH3亜型（31.1%）、B型ビクトリア系統（24.4%）、B型山形系統（0.3%）も検出された。11/12（206検体中178検体FluV分離）及び12/13（196検体中171検体FluV分離）シーズンはAH1pdm09（11/12:0%、12/13:3.5%）がほとんど検出されなくなり、AH3亜型（11/12:77.5%、12/13:62.6%）が主に検出された。B型はビクトリア系統（11/12:14.6%、12/13:3.5%）が年々減少し、山形系統（11/12:7.9%、12/13:30.4%）の検出が増加した。13/14シーズン（204検体中170検体FluV分離）はAH1pdm09（32.4%）の検出が10/11シーズン以来増加し、AH3亜型（33.5%）、B型ビクトリア系統（14.1%）、B型山形系統（20.0%）と4つの型・亜型・系統が混合して検出された。

2. FluAの年齢群別検出割合のシーズン別比較

図2にAH1pdm09の結果を示した。最初の流行である09/10シーズンと翌10/11シーズンは小学校高学年～大学生に相当する10-14歳群（09/10:29.7%、10/11:15.9%）、15-19歳群（09/10:8.1%、10/11:10.1%）、20-24歳群（09/10:4.2%、10/11:9.4%）において検出割合が13/14シーズン（10-14歳群:9.8%、15-19歳群:0.0%、20-24歳群:2.0%）に比べ高かった。2シーズン流行が認められなかった後の13/14シーズンは、パンデミックを経験していない0-4歳群（25.0%）及び30歳代～40歳代（33.3%）で検出割合が09/10シーズン（15.7%、5.0%）と比較して高かった。図3にAH3亜型の結果を示した。10/11シーズンからシーズンを経るごとに5-9歳

群（35.4%、25.2%、20.0%、16.7%）、10-14歳群（14.6%、14.4%、9.5%、3.7%）、15-19歳群（6.3%、4.3%、1.0%、0.0%）での検出割合が減少し、相対的に20歳代以降の各年齢群で検出割合が増加する傾向にあった。

3. FluAの抗原性状のシーズン別比較

感染研によりシーズン毎に配布されたFluV同定用抗原抗体キット（HI試験用キット）を用い、HI試験により抗原性の変化を解析した。AH1pdm09は5シーズンともキットに同じ標準株（A/California/07/2009）が用いられ、調査期間中に調べた295株全てが標準株と類似した抗原性を示した（表1）。AH3亜型はシーズン毎にキットの標準株が異なり、期間中に調べた188株中2株に、そのシーズン標準株と比較して8倍のHI価の差異が認められた。4倍の差異を示した抗原性が少し変化した株を含めると10株に抗原性の変化が認められた（表1）。

4. FluAのHA遺伝子系統樹解析と分子疫学的解析

調査期間内に検出されたFluAの一部についてHA遺伝子塩基配列に基づいた系統樹解析を行った。AH1pdm09の結果を図4Aに示した。10/11シーズン分離株は09/10シーズンに比べアミノ酸置換が増え、クレード3、7に分類された。12/13分離株はクレード7と1株が6Aに、13/14分離株はクレード6Bに分類された。AH3亜型の結果を図4Bに示した。10/11分離株は主にPerth16クレードとVictoria208クレード5に分類され、11/12分離株はクレード3Bと3C.1に、12/13分離株はクレード3C.2と3C.3に、13/14分離株は12/13シーズンと同じクレード3C.2と3C.3に分類された。13/14シーズン後半には更に分岐が進んだ3C.2aと3C.3aに分類される株が出現した。表1に示した抗原性が少し変化していた11/12シーズンの6株はクレード3C.1のF193Sアミノ酸置換を持った分岐に属しており¹¹⁾、国内ではユニークな株であった。次シーズンの流行株になることが懸念されたが、流行株にはならなかった。13/14シーズンの抗原性が少し変化していると考えられる4株はクレード3C.3aに分類され、3C.3よりも更に4つのアミノ酸置換（A138S、F159S、N225D、K326R）が起こっていた。

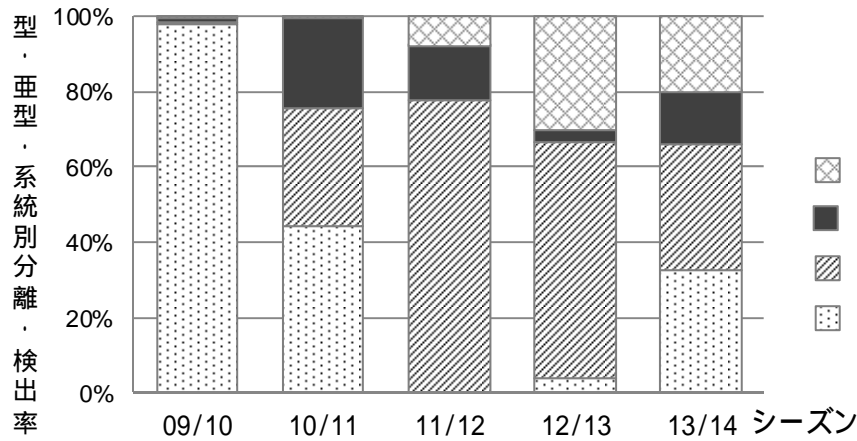


図1 インフルエンザウイルスのシーズン別分離・検出状況

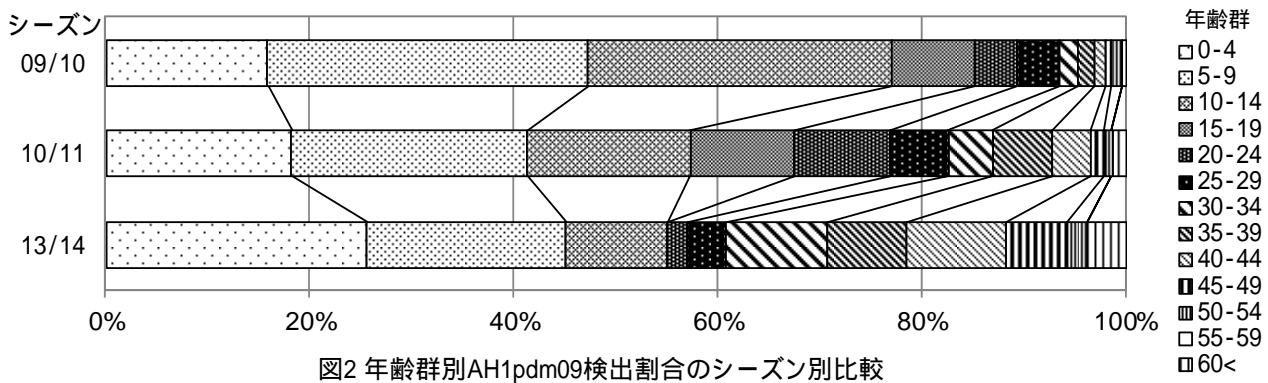


図2 年齢群別AH1pdm09検出割合のシーズン別比較

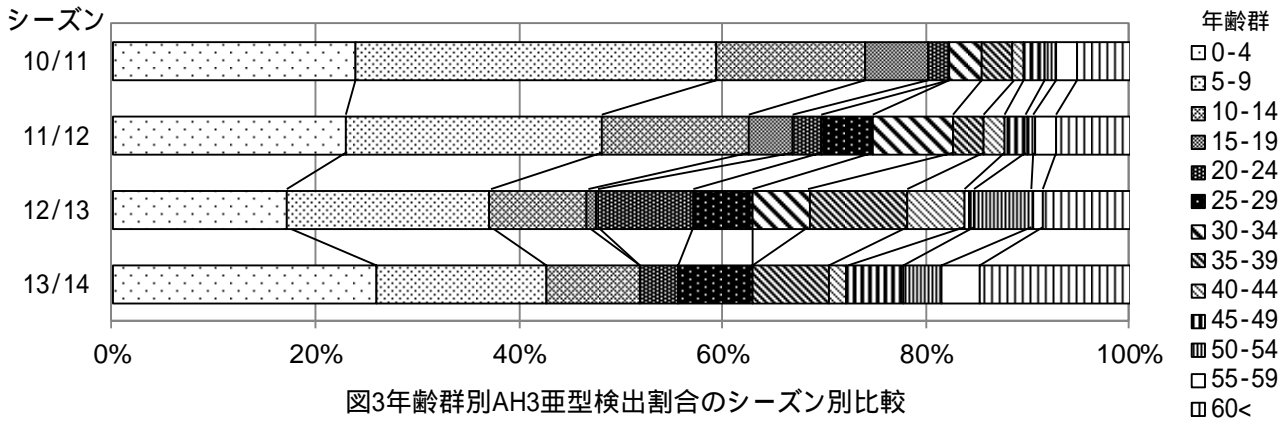


図3 年齢群別AH3亜型検出割合のシーズン別比較

表1 A型インフルエンザウイルスの抗原性状

シーズン	AH1pdm09			AH3		
	標準株	解析株数	変異株数*	標準株	解析株数	変異株数
09/10	A/California/07/2009	202	0	A/Uruguay/716/2007	0	0
10/11	A/California/07/2009	31	0	A/Victoria/210/2009	41	0
11/12	A/California/07/2009	0	0	A/Victoria/210/2009	91	1(6)
12/13	A/California/07/2009	6	0	A/Victoria/361/2011	9	0
13/14	A/California/07/2009	56	0	A/Texas/50/2012	47	1(4)

*標準株と比較し8倍以上のHI価の差異を示した株数。()内は4倍以上の差異を示した株数を含めた総数。

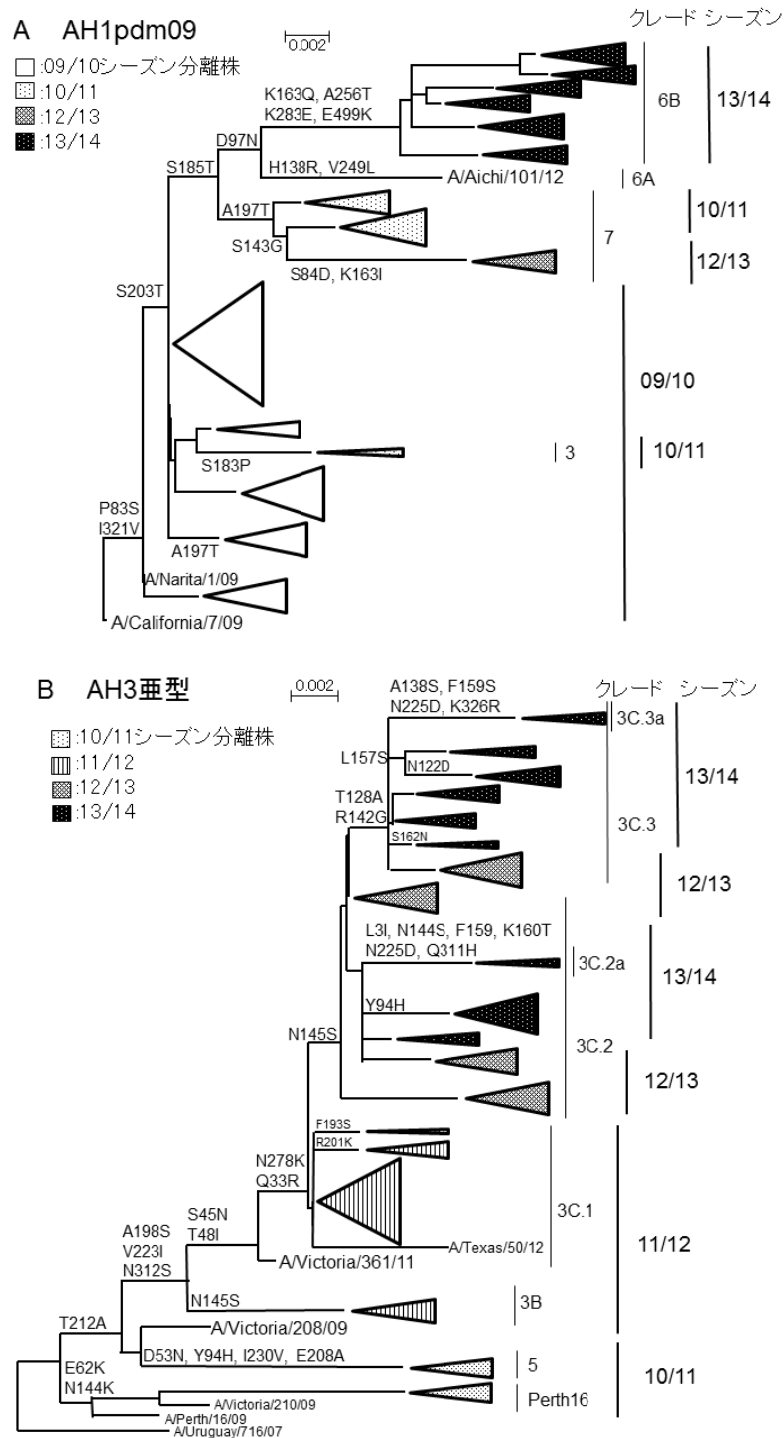


図4 A型インフルエンザウイルス HA 遺伝子の系統樹解析

5. NA阻害剤に対する薬剤耐性変異の検出状況

世界的にもNA阻害剤の使用量が多い我が国においては耐性株の流行状況を把握することは必要不可欠である。そこで、09/10シーズン以降、AH1pdm09において分離株のNA遺伝子上の耐性変異(H275Y)を検索した。表2に示すように09/10シーズンに5株(2.3%)、10/11

シーズンに1株(1.5%)の薬剤耐性変異を検出した。これら6株は感染研において詳細な薬剤感受性試験が行われ、その結果5株は感受性株と比較してオセルタミビルに対する感受性低下が認められたが、ザナミビルに対しては感受性を保持していた。残り1株は耐性変異(275Y)と感受性(275H)の両者が混合しており薬剤感受性試験では両薬剤に対

して感受性を示した。11/12シーズン以降、県内では薬剤耐性マーカー（H275Y）は検出されなかった。

11/12シーズン：22株、12/13：22株、13/14：29株のAH3亜型分離株についてNA遺伝子の塩基配列を解析した結果、既知の薬剤耐性変異は全てに認められなかった。

表2 ノイラミニダーゼ阻害剤に対する薬剤耐性変異の検出数

シーズン	検査数	H275Y陽性数（％）
9/10	222	5（2.3％）
10/11	67	1（1.5％）
11/12	0	0
12/13	6	0
13/14	63	0

考 察

2009年9月から2014年8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、インフルエンザ及びインフルエンザ様患者の咽頭ぬぐい液1,441検体中1,216検体からFluVが検出された。AH1pdm09は09/10シーズン分離株のほとんどを占めており、10/11シーズンも流行した。年齢群別検出割合の解析から、パンデミック時には集団生活をする学生の年齢層でより感染拡大が起こることが示唆された。年齢群別検出割合の解析は採取医療機関標榜科（小児科、内科）による影響が大きく各年齢群の母数に違いがあることを考慮しなければならないが、罹患歴や生活様式などを反映していると考えられた。13/14分離株はパンデミック時の分離株と比べ抗原性に変化はなかったが、HA遺伝子解析からは10/11及び12/13分離株とは異なったクレード6B（1～8に分類）に分類されたため、遺伝子には変異が蓄積し多様化が進んでいると考えられた。

AH3亜型はAH1pdm09の流行と入れ替わるように10/11シーズンから分離が増え、11/12シーズンはA型分離株の全てをAH3亜型が占めた。11/12シーズンは比較的大きな規模の流行が起こっており、シーズンを通して各分離株でHA遺伝子配列の相同性が高い（クレード3C.1）ウイルスが分離された。このシーズンのAH3亜型は感染研の詳細な抗原性解析に

より抗原変異株が全国分離株の34％に存在していた¹²⁾ことから、本県の分離株(3C.1)中にも抗原変異株がもう少し高い頻度で存在していたかもしれない。13/14分離株の中にはHA抗原領域にアミノ酸置換を持ち、抗原性が少し変化した株（クレード3C.3a）が分離された。シーズン後半には国内でもクレード3C.2a及び3C.3aが分離されており、これらの分離株は抗原性が少し変化していることが明らかにされた¹³⁾。これらのことから調査期間内のAH3亜型はヒトの中和抗体選択圧によりHA抗原部位に変異を生じ、流行を繰り返していたと考えられた。

データは示していないが、9/10及び10/11シーズンにオセルタミビル耐性変異が認められたAH1pdm09株6株はHA遺伝子系統樹解析により特異的なクラスターを形成することはなかった。また、耐性変異が検出された検体の由来患者は特定の保健所管内に集中することはなく、搬入された検体は薬剤投与後の検体であったため、耐性株は患者体内で薬剤選択圧によって変異を獲得したと考えられた。これらのことから、ヒトの間で感染を繰り返すような薬剤耐性株は未だ県内では流行していないと考えられた。しかし、全国の地衛研から報告された耐性株の比率は年々増加する傾向にあり¹⁴⁾、13/14シーズンには札幌市を中心に耐性株の地域流行が起こった¹⁵⁾。08/09シーズンには、AH1亜型（Aソ連型）においてNA阻害剤に対する耐性変異H275Yを獲得した株が流行したが⁷⁾、流行する前にすでにH275Y変異によるウイルス安定性や適応性低下を補完する変異（R222Q, V234M）が起こっていたと考えられている¹⁶⁾。同じAH1亜型に属するAH1pdm09のH275Y変異を安定化するアミノ酸置換（V241I, N369K, N386S）も報告されており¹⁷⁾、今後は安定化変異を獲得したAH1pdm09株の流行状況についても監視する必要があると考えられた。

謝 辞

愛知県内の定点医療機関、愛知県、豊橋市、岡崎市及び豊田市の各保健所、愛知県健康福祉部保健医療局健康対策課及び生活衛生課の皆様、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターの皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Shaw ML, Palese P: Orthomyxoviridae. Fields Virology Sixth edition (Knipe DM, Howley PM eds), 1151-1185, 2013, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 2) Neumann G, Noda T, Kawaoka Y: Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature 459: 931-939, 2009.
- 3) Garten RJ, Davis CT, Russell CA, *et al.*: Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science 325(5937): 197-201, 2009.
- 4) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR) インフルエンザウイルス分離・検出状況 2009年第19週～2010年第19週 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/influ09.html>
- 5) 国立感染症研究所: 感染症発生動向調査週報 (IDWR) 過去10年間との比較グラフ <http://www.nih.go.jp/niid/ja/10/2096-weeklygraph/1644-01flu.html>
- 6) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報 (IASR) インフルエンザウイルス分離・検出状況 2000/01～2014/15 シーズン比較 http://www.nih.go.jp/niid/images/iasr/rapid/inf1/2014_49w/in1j_141210.gif
- 7) Ujike M, Shimabukuro K, Obuchi M, Kageyama T, Shirakura M, *et al.*: Oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 viruses during the 2007-2009 influenza seasons, Japan. Emerging Infectious Diseases 16(6): 926-935, 2010.
- 8) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル: インフルエンザ診断マニュアル(第3版), 2014. <http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Influenza2014.pdf>
- 9) Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T, the influenza virus surveillance group of Japan: Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. Journal of Medical Virology 83 (7): 1121-1127, 2011.
- 10) Moscona A: Oseltamivir resistance-disabling our influenza defenses. New England Journal of Medicine 353(25): 2633-2636, 2005.
- 11) 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子: 2011/12シーズン用同定キットの赤血球凝集抑制活性が低いインフルエンザウイルスAH3亜型分離株 - 愛知県, 病原微生物検出情報 (IASR) 33(3): 67-68, 2012.
- 12) 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎ら: 2011/12シーズンのインフルエンザ分離株の解析. 病原微生物検出情報 (IASR) 33(11): 288-294, 2012.
- 13) 中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之ら: 2013/14シーズンのインフルエンザ分離株の解析. 病原微生物検出情報 (IASR) 35(11): 254-258, 2014.
- 14) Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T, the Influenza Virus Surveillance Group of Japan: Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. Influenza and Other Respiratory Viruses 7(6): 1390-1399, 2013.
- 15) Takashita E, Ejima M, Itoh M, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M: A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. Eurosurveillance 19(1): pii=20666. 2014. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20666>
- 16) Bloom JD, Gong LI, Baltimore D: Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. Science 328:1272-1275, 2010.
- 17) Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, *et al.*: Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza in Australia. Journal of Infectious Diseases 206(2): 148-157, 2012.

Detection and genetic characterization of influenza virus from influenza and influenza-like illness patients in Aichi Prefecture between 2009/10 and 2013/14 seasons

Yoshihiro Yasui, Noriko Nakamura, Hirokazu Adachi, Ayano Onouchi, Emi Hirose, Miyabi Ito, Shinichi Kobayashi, Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Influenza virus is recognized as one of the most common causative agent of respiratory illness in winter. A total of 1,441 throat swab samples were collected from patients with influenza and influenza-like illness in the sentinel hospitals consisting of pediatrics and internal medicine in Aichi Prefecture between 2009/10 and 2013/14 seasons. To analyze the change of circulating viruses, the isolated influenza viruses were typed by haemagglutination inhibition test or the detection of haemagglutinin (HA) gene using conventional RT-PCR. We investigated the antigenic characteristics of the isolates during 5 seasons and their oseltamivir-resistance. By phylogenic analysis of the HA and neuraminidase (NA) genes, we identified major variants of the influenza virus A and critical mutations associated with the change of antigenicity. All of the tested AH1N1pdm2009 (AH1pdm09) isolates were antigenically similar to the vaccine strain for 2009/10-2013/14 seasons. However, our sequence analysis suggested that some variants of the AH1pdm09 viruses had emerged and circulated as a minor population during the 5 seasons. Oseltamivir-resistant mutation, i.e., NA-H275Y, was detected in sporadic cases during the 2009/10 and 2010/11 seasons, but after the 2011/12 season, the mutation was not detected. No evidence of sustained spread of oseltamivir-resistant AH1pdm09 viruses was recognized in Aichi Prefecture, Japan. Of the 2011/12 and 2013/14 seasons subtype AH3 isolates tested, antigenicity of some isolates was slightly changed from that of the particular vaccine strain prepared for each season. Phylogenetic analysis of the HA genes showed that the mutations of F193S, A138S, F159S, N225D and K326R were associated with the change of antigenicity.

Key words: influenza virus, genetic analysis, surveillance, oseltamivir resistance

調 査 研 究

カンピロバクターの Penner 遺伝子型別法の検討

市古浩美、山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、山下照夫、皆川洋子

要 旨

カンピロバクターは動物腸管内に広く分布し、感染性胃腸炎の原因菌の一つである。カンピロバクター食中毒が発生した際には、原因究明の手段として分離菌株について血清型別が行われる。カンピロバクターの血清型別法には Penner 血清型別法と Lior 血清型別法があり、それぞれに一長一短がある。近年、莢膜多糖遺伝子を PCR により型別することで Penner 遺伝子型を決める方法（Penner 遺伝子型別法）が報告された。そこで既存の血清型別法と Penner 遺伝子型別法を比較することで、Penner 遺伝子型別法が今後、疫学調査をおこなう際に、Penner 血清型別法に変わる方法として利用可能であるか検討した。

Penner 血清型別法、Lior 血清型別法、Penner 遺伝子型別法によって、当所保存の *Campylobacter jejuni* 125 株中、それぞれ 48 株、101 株、105 株の血清型もしくは遺伝子型が決定された。Penner 血清型別法と Penner 遺伝子型別法の比較では、Penner 血清型別法における型別可能株の割合は約 4 割（38.4%）、Penner 遺伝子型別法における型別可能株の割合は 8 割以上（84.0%）と大きな差が見られた。Penner 血清型別法で型別不能であった 77 株のうち、67 株は Penner 遺伝子型別法で遺伝子型を決定することができたことから、供試株が血清型遺伝子を保有しているが発現していない可能性が考えられた。

Penner 遺伝子型別法には遺伝子の発現の有無の問題等、今後さらなる検討が必要な課題も存在するが、型別率が高く、既存の血清型別法と相関関係もあり、時間、コストともに削減できる効率性からも、今後の疫学調査において Penner 血清型別法に替わる有効な方法であると考えられた。

キーワード：カンピロバクター、血清型別、血清遺伝子型別

序 文

カンピロバクターは動物腸管内に広く分布し、感染性胃腸炎の原因菌の一つである。カンピロバクター腸炎の原因菌の 9 割以上を *Campylobacter jejuni* が占めており、調理不十分な鶏肉、レバー、水などが原因となる¹⁾。カンピロバクターは 2003 年以降、日本で発生する細菌性食中毒の中で検出件

数が最も多く²⁾³⁾、患者糞便等から検出された際には疫学調査の 1 つとして血清型別が行われる⁴⁾。

カンピロバクターの血清型別法には、Penner 血清型別法、Lior 血清型別法の 2 法がある。Penner 血清型別法は、リポオリゴサッカライドを主体とする耐熱性抗原を標的とした受身血球凝集法により型別する⁵⁾。

型別率は Lior 血清型別法に比べやや低い、市販品があるため実施できる機関が多いという利点がある。しかし、Penner 血清型別法は、多くの菌量が必要となることや、手技が煩雑であり 1 件あたりのコストも約 2000 円と高いといった問題点がある⁶⁾。Lior 血清型別法は、鞭毛抗原を含む多糖体抗原などの複合的菌体表層抗原である易熱性抗原を標的としたスライド凝集法により型別する⁵⁾。型別率は低くないが、市販品がないため、すべての血清型をそろえることが難しく、実施できる機関が限られてくる。

近年、莢膜多糖遺伝子を PCR により型別することで Penner 遺伝子型を決める方法 (Penner 遺伝子型別法) が報告された⁷⁾。この方法は 14 個の莢膜多糖遺伝子を 2 組のマルチプレックス PCR により検出することで、遺伝子型を決めることができる。Penner 遺伝子型別法は、25 種類の血清型が決められる Penner 血清型別法に比べ、型別できる遺伝子型数が 12 種類と少ないが 1 件当たりのコストを抑えることができる (表 1)。また、我が国において分離頻度の高い Penner 血清型は B 群、D 群など限られており⁶⁾、Penner 遺伝子型別法にも含まれているため、迅速に結果を得られるという利点がある。そこで今回、当所で保存されている *C. jejuni* を用いて、Penner 血清型別法と Penner 遺伝子型別法を比較することで、Penner 遺伝子型別法が Penner 血清型別法に替わる方法として今後疫学調査をおこなう際に利用可能であるか検討した。

方 法

使用菌株：当所に保存されている 2011 年から 2014 年に分離された *C. jejuni* 125 株を用いた。Penner 血清型別法：PHA 法によるカンピロバクター血清型別用試薬 (デンカ生研) を用いて感作血球抗原を作製後、カンピロバクター免疫抗血清 (デンカ生研) と反応させ添付文書に従い判定した。Lior 血清型別法：生理食塩液 1 mL に、菌を

McFarland2 程度になるように懸濁後、全国地方衛生研究所協議会カンピロバクター・レファレンス委員会より配布された血清を用いて、スライド凝集法を行った。DNA 抽出：Tris-EDTA Buffer (pH8.0) 100 μ L に菌を McFarland2 程度になるように懸濁し、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱し 16000g で 1 分間遠心した上清をテンプレートとした。Penner 遺伝子型別法：プライマーミックスは文献 5 に記載されたとおりの組み合わせで、それぞれのプライマーの反応液中最終濃度が 0.5 μ M になるように混合した。PCR 反応は、KAPA2G HotStart ReadyMix with dye (2 \times) (KAPA BIOSYSTEMS、USA) を用い、PCR マスターミックス 10 μ L、プライマーミックス 5 μ L、蒸留水 3 μ L を混合し、テンプレートを 2 μ L 加え、94 $^{\circ}$ C 3 分、94 $^{\circ}$ C 15 秒間、56 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 45 秒間のサイクルを 30 回繰り返して行った。PCR 反応終了後、3%KANTO HC(短フラグメント用) (関東化学、東京) を用い 120V 55 分間電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色し、増幅産物の有無を確認することで判定した。

結 果

Penner 血清型別法によって 125 株中、48 株 (38.4%) の血清型が決定し、その内訳は単一血清型が 47 株 (37.6%)、複数血清型が 1 株 (0.80%) であった。しかし、型別不能株が 77 株と最多であった (表 2)。

Lior 血清型別法によって 125 株中 101 株 (80.8%) の血清型が決定し、その内訳は単一血清型が 72 株 (57.6%)、複数血清型が 29 株 (23.2%) であった (表 3)。血清型 L4 が 35 株と単一血清型に決まった株の約半数を占めていた。

Penner 遺伝子型別法では 125 株中、105 株 (84.0%) の遺伝子型が決定した (表 2、3)。Penner 血清型別法、及び Penner 遺伝子型別法の両法で血清型と遺伝子型が決定した株は 38 株 (30.4%) あり、その中で Penner 血清型別法、及び Penner 遺伝子型別法の結

表1 Penner遺伝子型別法で検出可能な血清型⁷⁾

血清群	抗原因子	プライマーミックス	プライマーミックス
A	1,44		HS1complex
B	2	HS2	
C	3	HS3	
D	4,13,16,43,50	HS4complex	HS4complex
F	6,7	HS6	
G	8		HS8/17complex
I	10	HS10	
L	15	HS15/HS31	
R	23,36,53	HS53	HS23/36complex
S	27		
U	31	HS15/HS31	
Z2	41	HS41	
-			HS42

表2 Penner血清型別法とPenner遺伝子型別法との相関

Penner 遺伝子型	Penner血清型														型別不能	総計
	B	C	D	F	G	L	R	J	J/L	K	O	Y	Z6			
B	12					4					1				34	51
C		3				1									3	7
D			4												6	10
F				2												2
G					3										14	17
L/U						5									2	7
R							3								6	9
Z2															2	2
型別不能									1	1	1	2	4	1	10	20
総計	12	3	4	2	3	10	3	1	1	1	3	4	1	77	125	

表3 Lior血清型別法とPenner遺伝子型別法との相関

Penner 遺伝子型	Lior血清型														複数血清型	型別不能	総計	
	L1	L2	L4	L6	L7	L9	L10	L11	L18	L19	L27	L28	L49	TCK1				TCK13
B		1	32						1							14	3	51
C			1												1	3	2	7
D			1		4											2	3	10
F				2														2
G					1		3	1		1			1			5	5	17
L/U								1		1				4				7
R				1				2								1	5	9
Z2															1	1		2
型別不能	1		1			1	1	2	1		1	3			1	3	5	20
総計	1	1	35	3	5	1	4	6	2	2	1	3	1	4	3	29	24	125

表4 Penner血清型が型別不能となった株のLior血清型別法とPenner遺伝子型別法の相関

Penner遺伝子型	Lior血清型										型別不能	複数血清型	総計
	L1	L4	L10	L11	L19	L49	L7	L9	TCK13				
B		22									2	10	34
C		1									1	1	3
D		1					1				2	2	6
G			3	1	1	1	1				3	4	14
L/U				1	1								2
R				2							3	1	6
Z2									1			1	2
型別不能	1	1	1	2				1			3	1	10
総計	1	25	4	6	2	1	2	1	1	1	14	20	77

果が一致した株は 32 株 (84.2%) であった (表 2)。不一致だった 6 株のうち 5 株の Penner 血清型は L 群であった。Penner 血清型別法で型別不能であった 77 株中、Penner 遺伝子型別法において遺伝子型が決定したのは 67 株 (87.0%) であった。一方、Penner 遺伝子型別法で型別不能となった 20 株中、Penner 血清型別法で血清型が決定したのは、9 株 (45.0%) であったが、それらは J 群、K 群、Y 群、O 群、Z6 群と、すべて Penner 遺伝子型別法に含まれない血清型であった。Penner 遺伝子型別法において B 群遺伝子 (HS2) が陽性だった 51 株中 32 株は Lior 血清型において L4 であり、複数血清型に分類された 14 株も全て L4 への凝集があった (表 3)。また、Penner 血清型別法で型別不能であった 77 株のうち、Penner 遺伝子型別法において B 群遺伝子 (HS2) が陽性だった 34 株中 22 株は L4 であり、複数血清型に分類された 10 株も全て L4 への凝集があった (表 4)。Penner 血清型別法、Lior 血清型別法、Penner 遺伝子型別法すべてにおいて血清型、遺伝子型を決定できなかった株が、3 株 (2.4%) 存在した。

考 察

Penner 血清型別法と Penner 遺伝子型別

法の比較では、Penner 血清型別法における型別不能の割合は約 6 割 (61.6%)、Penner 遺伝子型別法における型別不能の割合が 2 割以下 (16.0%) と大きな差が見られた。Penner 血清型別法では使用する血球のロットにより成績に変化が生じやすいという問題点が知られており⁸⁾、今回使用した試薬のロットでは血清型を決定できなかったため、決定率に大きな差が出たと考えられた。

また、型別率の大きな差の原因の一つとなったのが、Penner 遺伝子型別法において B 群遺伝子が陽性だった 51 株の Penner 血清型別法における B 群への型別率が低かった (23.5%, 12/51) ことにあった。これは市販 B 群血清の抗体価が低下していること⁶⁾や、Penner 血清型別法は未吸収の血清を用いるため非特異反応がみられること⁸⁾から差が出たと考えられた。このように、Penner 血清型別法は試薬ロットや抗体価などにより結果が安定しないこともあるので、Penner 遺伝子型別法により保有遺伝子を調べることが有用であると考えられた。

これまでに Lior 血清型別法と Penner 血清型別法にもある程度の相関があることが知られており、L4 は Penner B 群、TCK1 は Penner L 群に相関するとされる⁷⁾。今回の

結果はその相関性を支持しており、Penner 遺伝子型 B 群の株は Lior 血清型 L4 (62.7%, 32/51) に、Penner 遺伝子型 L/U 群の株は Lior 血清型 TCK1 (57.1%, 4/7) に多く型別された。Penner 遺伝子型と Lior 血清型の関係も考慮すると、Penner 血清型で型別不能となった株は本来 Penner 遺伝子型で型別される血清型に属し、その供試株は血清型遺伝子を保有しているが発現していない可能性も考えられた。

一方、Penner 遺伝子型別法で型別不能となった 20 株のうち、Penner 血清型別法で血清型が決定したのは 9 株であり、これらは全て Penner 遺伝子型別法に含まれない血清型であった。このうち O 群 (HS19) はトリ由来株との関連が示唆されており⁹⁾、Y 群 (HS37) はアジアやアメリカで分離頻度が 2% 程度ある¹⁰⁾。今後、これらの血清型の検出割合が増加した時には、Penner 遺伝子型別法に改良を加える必要があると考えられた。

カンピロバクター食中毒の場合、原因食材等が複数の血清型に汚染されていることも多く、食品由来株と患者由来株や、同一事例由来株の血清型が不一致となる場合もあるため⁵⁾、より多くのコロニーを釣菌することが望ましい。しかし、Penner 血清型別法は多くの菌量が必要となることから、釣菌数を増やすことで作業は非常に煩雑になり、コストもかかるようになる。Penner 遺伝子型別法は遺伝子の発現の有無の問題等、今後さらなる検討が必要な課題も存在するが、型別率が高く、既存の血清型別法と相関関係もあり、時間、コストともに削減できる効率性からも、今後の疫学調査において Penner 血清型別法に替わる有効な方法であると考えられた。

文 献

- 1) 藤本秀士：戸田新細菌学 改訂 34 版。吉田真一，柳雄介，吉開泰信編。302-306，2013，南山堂、東京。
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：

カンピロバクター腸炎 1999～2005。病原微生物検出情報 27(7)：167-168，2006。

- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター：カンピロバクター腸炎 2006～2009。病原微生物検出情報 31(1)：1-3，2010。
- 4) Matsumoto M, Hiramatsu R, Yamada K, Suzuki M, Miwa Y, Yabutani M, Nagai Y, Tsuchiya M, Noda M, Nagata A, Kawakami K, Shima T, Tatsumi N and Minagawa H. Phenotypic and genetic analyses of *Campylobacter jejuni* Lior serotype 76 isolated from chicken meat and clinical specimens. Japanese Journal of Infectious Diseases 66(1)：72-75，2013。
- 5) 仲西寿男，丸山務監修：食品由来感染症と食品微生物。347-364，2009，中央法規、東京。
- 6) 宮崎義継：国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究。平成 25 年度 総括・分担研究報告書：33-38，2014。
- 7) Poly F, Serichatalergs O, Schulman M, Ju J, Cates CN, Kanipes M, Mason C, Guerry P: Discrimination of major capsular types of *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 49(5)：1750-1757，2011。
- 8) 伊藤 武：新訂食水系感染症と細菌性食中毒。坂崎利一編。336-362，2000，中央法規、東京。
- 9) 山本香織，中村寛海，藤原淳史，山田和弘，鈴木匡弘，小笠原準，西尾孝之：食中毒患者、ウシおよびトリ由来カンピロバクターの PCR binary typing (P-BIT) 法による解析。第 35 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集：87，2014。
- 10) Pike BL, Guerry P, Poly F: Global distribution of *Campylobacter jejuni* Penner serotypes: A Systematic Review. PLOS ONE 8(6)：e67375，2013。

Evaluation of a PCR-based serotyping (Penner genotyping) for *Campylobacter jejuni*

Hiromi Ichigo, Kazuhiro Yamada, Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto,
Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Campylobacter is widely distributed in the animal intestinal tract and a major bacterial enteric pathogen. When a food-borne outbreak of *Campylobacter* is suspected, serotyping tests are performed as a part of epidemiological investigation. Lior and Penner serotypings are usually performed, and these two methods have both advantages and disadvantages. For example, Lior serotype is able to classify over 60% of the isolates, but the antiserum reagent set is not commercially available. Penner serotype can be commercially purchased, but its typeability is not high and its procedure is labor-intensive. A PCR-based serotyping (Penner genotyping) to target a capsular gene was recently developed. In this study, we have evaluated the relationships between the Penner genotyping and serotyping.

Of 125 clinical *C. jejuni* isolates, 48, 101, and 105 isolates were classified by Penner, Lior serotyping and Penner genotyping, respectively. The ability of classification of the Penner serotyping and genotyping was quite different, i.e., 38.4% and 84.0%. Of 77 Penner-untypeable isolates, 67 isolates were classified by the genotyping, suggesting that those isolates carried the gene, but did not express the protein.

In conclusion, Penner genotyping would be an alternative typing method for epidemiological investigation of *C. jejuni*, because it has a high typeability and a well correlation with the serotypings in addition to the rapidness and cost-effectiveness.

Key words: *Campylobacter*, serotyping, Penner genotyping

調 査 研 究

2014年シーズン愛知県においてマウス法規制値を超えた 麻痺性貝毒の分析

長谷川晶子、早川大輔、中村瑞那、秦 眞美、山下照夫、皆川洋子

要 旨

麻痺性貝毒(Paralytic Shellfish Poison)は *Alexandrium* 属等の有毒渦鞭毛藻が産生する強力な神経毒であり、下痢性貝毒と共に藻などプランクトンを捕食する二枚貝類の毒化原因となっている。アサリの主要生産地である愛知県で原因プランクトンの発生時期に実施している貝毒検査において、2014年シーズン(平成26年3月～5月)に出荷規制値(4 MU/g)を上回る麻痺性貝毒が検出され、13年ぶりの出荷自主規制が行われた。毒化の起きたシーズンの二枚貝の毒化及び減毒の解析を目的として、マウス法検査を実施したアサリ、トリガイ、ウチムラサキ 65 検体を高速液体クロマトグラフィー法(High Performance Liquid Chromatography 法:HPLC 法)により麻痺性貝毒成分を分析した。解析の結果、アサリとトリガイは、低毒性のC群が主成分であったのに対し、ウチムラサキは、毒の総量はアサリ、トリガイよりも少ないが、C群よりも毒性の強い dc-GTX2 と dc-GTX3 が主成分であり、貝種により毒の蓄積、排出、および毒変換の様相に顕著な差異がみられた。

キーワード：麻痺性貝毒、HPLC 法、アサリ、ウチムラサキ

序 文

麻痺性貝毒(Paralytic Shellfish Poison (以下 PSP))は *Alexandrium* (アレキサンドリウム)属等の渦鞭毛藻と呼ばれるプランクトンが産生する強力な神経毒であり、同じく渦鞭毛藻の *Dinophysis* (ディノフィシス)属等が産生し、ヒトに下痢を引き起こす下痢性貝毒と共に、プランクトンを捕食する二枚貝類の毒化原因となっている¹⁾²⁾。有毒渦鞭毛藻は日本全国の沿岸に分布し、国内ではホタテガイ、アサリ、カキなど二枚貝の毒化が問題となる。PSPは食物連鎖を介して肉食の貝類、甲殻類等も毒化させることが知られている¹⁾²⁾。毒化した二枚貝類をヒトが喫食すると、口唇、四肢の麻痺、運

動失調などの典型的な神経性の症状を呈し、重症の場合、呼吸麻痺により死亡することもある。有効な原因療法はなく、人工呼吸器による呼吸の確保が唯一の救助法である。成人の致死量は、サキシトキシン換算で約2 mgと考えられている²⁾³⁾。PSPにはサキシトキシンを基本骨格にもつ20以上の誘導体の存在が判明しており¹⁾²⁾、これらは、ナトリウムチャンネルに対する親和性の差から毒性が大きく異なり、また、容易に変換がおきることが特徴的である^{1)~4)}。厚生労働省は食品衛生法に基づく規制値(麻痺性貝毒：4 MU/g)を設定し⁵⁾、農林水産省は生産海域において貝毒の監視を行い、規制値を超えた場合には出荷の自主規制を指導している。

愛知県はアサリの年間漁獲量が 17.6 千 t (平成 24 年度) で全国の 6 割以上を占め、アサリは県を代表する水産物の一つである。愛知県では昭和 54 年度より、アサリ等貝類の安全性を確保するため、「愛知県貝類安全対策指導要領」に基づき、貝毒原因プランクトンの分布調査(愛知県の海域では主に *A. tamarense* (アレキサンドリウム タマレンセ) が発生⁶⁾)及び、貝毒原因プランクトンの発生時期(通常 3 月～5 月)にアサリを検査対象とした貝毒検査を実施し、規制値を上回る貝毒が検出された場合には漁業関係者等に対して貝類の出荷自主規制の指導等を行っている。このうち当所は県農林水産部からの依頼を受け、貝類の麻痺性貝毒及び下痢性貝毒検査を担当している。

2014 年シーズン(平成 26 年 3 月～5 月)に実施した検査で出荷規制値(4 MU/g)を上回る麻痺性貝毒が検出され、3 月 19 日より 1 海域(蒲郡・豊橋海域)、3 月 25 日より 2 海域(蒲郡・豊橋海域および渥美半島海域)で 4 月 4 日までの最長 17 日間にわたり 2001 年以来 13 年ぶりに出荷自主規制が行われた。(図 1 に示した愛知県の海域図を参照)。当シーズンは通常検査対象であるアサリに加え、出荷規制が行われた 2 海域でトリガイ、ウチムラサキについても検査を実施した。

本研究では、貝種による毒の蓄積(毒化)、排出(減毒)及び毒変換の差異の検討を目的として、県内海域で採取され 2014 年シーズンにマウス法による麻痺性貝毒検査を実施した二枚貝検体について高速液体クロマトグラフィー法(High Performance Liquid Chromatography 法: HPLC 法)により毒量と毒組成を解析した。

材料と方法

1. 試料

平成 26 年 3 月～5 月に愛知県内で採取され、マウス法による麻痺性貝毒検査を実施した二枚貝 65 検体[アサリ: 57 件、トリガイ: 5 件(ホール(内臓を含むむき身全体): 3 件、斧足(トリガイの可食部): 2 件)、ウ



図 1 愛知県海域図

チムラサキ: 3 件]

2. 方法

1) 毒性試験

公定法のマウス試験法により実施した³⁾。貝のむき身をホモジナイズ後、100 g を採取し、0.1 N 塩酸 100 mL を加え pH 3 に調整し、沸騰水中で 5 分間加熱後、室温に冷却し pH 3 に調整し蒸留水で 200 mL に定容、3000 rpm・10 分間の遠心分離を行い調整した試料 1 mL を体重 19～21 g の ddY 系雄マウス 5 匹の腹腔内に投与し、中央致死時間を求め、マウス単位(MU)換算表により毒力を算出した。

2) HPLC 法による貝類の麻痺性貝毒成分分析

(独)水産総合研究センター平成 23 年度貝毒分析研修会で示された方法を用いた⁷⁾。マウス試験法に用いた試験液を SepPakC18 カートリッジ(Waters)および遠心チューブ型限外ろ過膜(分画分子量 10,000 Ultrafree-MC、Millipore)に通過させ、50 mM 塩酸で適宜希釈の後検液とした。

麻痺性貝毒標準品は(独)水産総合研究センターより配布されたものを用い、C1、C2、GTX1、GTX2、GTX3、GTX4、dc-GTX2、dc-GTX3、および neoSTX の 9 成分の分析を行った。また、比毒性の数値は大島報告の数値を用いた⁸⁾。

ポストカラム蛍光誘導化 HPLC 法⁸⁾による測定は以下の装置および測定条件で行った。

HPLC装置: LC: LC10A[島津製作所]、カラ

表1 愛知県のアサリ、トリガイ、ウチムラサキ麻痺性貝毒組成 2014年シーズン

貝種(検体数)	比毒性	陽性アサリ(6)		陰性アサリ(51)		トリガイ(5)				ウチムラサキ(3)	
		平均	(%)	平均	(%)	ホール平均	ホール(%)	斧足平均	斧足(%)	平均	(%)
C1	15	1.312	26.5	0.113	41.6	1.800	30.0	0.045	50.5	0.286	17.0
C2	239	2.848	57.6	0.109	40.2	3.568	59.4	0.041	46.4	0.131	7.8
neoSTX	2295	0.119	2.4	0.006	2.4	0.039	0.6	0.000	0.0	0.035	2.1
GTX4	1803	0.076	1.5	0.008	2.9	0.023	0.4	0.000	0.0	0.010	0.6
GTX1	2468	0.247	5.0	0.021	7.7	0.247	4.1	0.000	0.0	0.067	4.0
dc-GTX3	1872	0.055	1.1	0.003	1.1	0.067	1.1	0.001	1.3	0.490	29.1
dc-GTX2	1617	0.025	0.5	0.002	0.6	0.034	0.6	0.000	0.0	0.557	33.1
GTX3	1584	0.184	3.7	0.005	2.0	0.157	2.6	0.001	1.4	0.050	3.0
GTX2	892	0.079	1.6	0.004	1.4	0.074	1.2	0.000	0.5	0.055	3.3
計(μM)		4.943	100	0.272	100	6.010	100	0.089	100	1.680	100

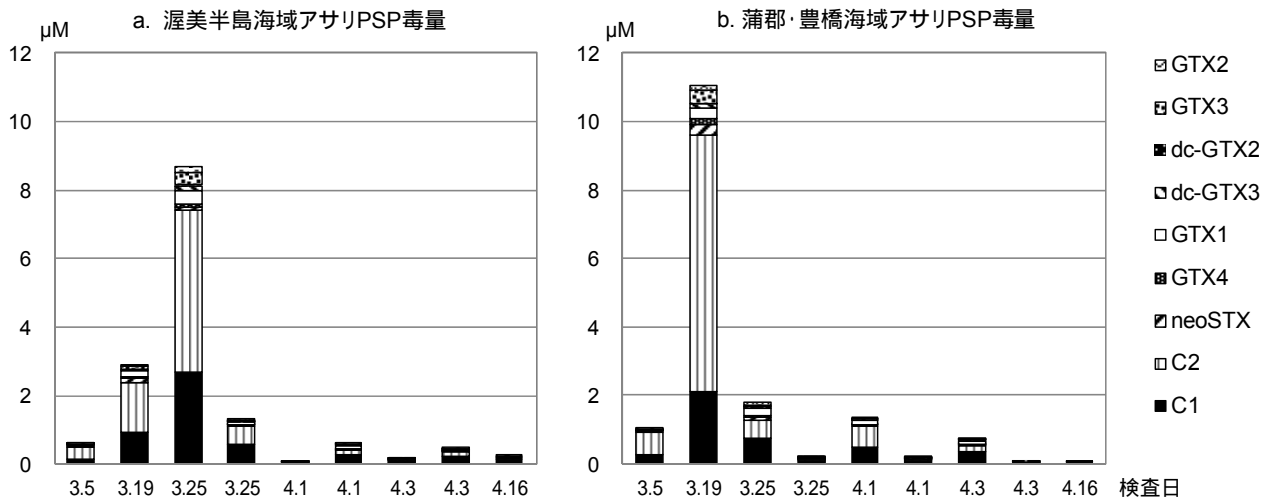


図2 規制値を超えた海域のアサリPSP毒量推移

Δ: Develosil [野村化学](4.6 mm id×250 mm)、カラム温度: 35、反応: 65 移動相: C群: 2 mM テトラブチルアンモニア、リン酸塩 pH6.0、GTX群: 2 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム、10 mMリン酸アンモニウム緩衝液pH7.1、STX群: 2 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム、30 mMリン酸アンモニウム緩衝液pH7.1: アセトニトリル 100: 5、反応液: 7 mM過ヨウ素酸、10 mMリン酸カリウム緩衝液、中和液: 0.5 N酢酸、流速: 移動相: 0.8 mL/min、反応液: 0.4 mL/min、中和液: 0.4 mL/min、注入量: 10 μL

結果

1. アサリ

アサリはマウス試験法にて貝毒を検出した検体を陽性、不検出検体を陰性とし解析

を行った(表1)。陽性検体平均は9成分全てが陰性検体平均の9.5倍以上を示しており、割合は陽性検体でC2が40%から58%と増加し、反対にC1は42%から27%と減少し、陽性・陰性検体間でC1+C2にほぼ変化はなく、C1+C2で80%以上を占めた。また、毒量は少ないが、GTX3の割合は増加、GTX4の割合は減少していた。図2に規制値を超えた海域の毒量の推移を、図3に毒組成の推移を示した。いずれの海域においても、毒量はピーク[3月19日(蒲郡・豊橋海域)、3月25日(渥美半島海域)]の後急激に減少した。C1、C2比に着目すると、毒量のピークまではC2>C1であるが、ピーク後徐々にC2<C1と変化していた。

2. トリガイ

1回目検査(3月25日)ではホール検体を

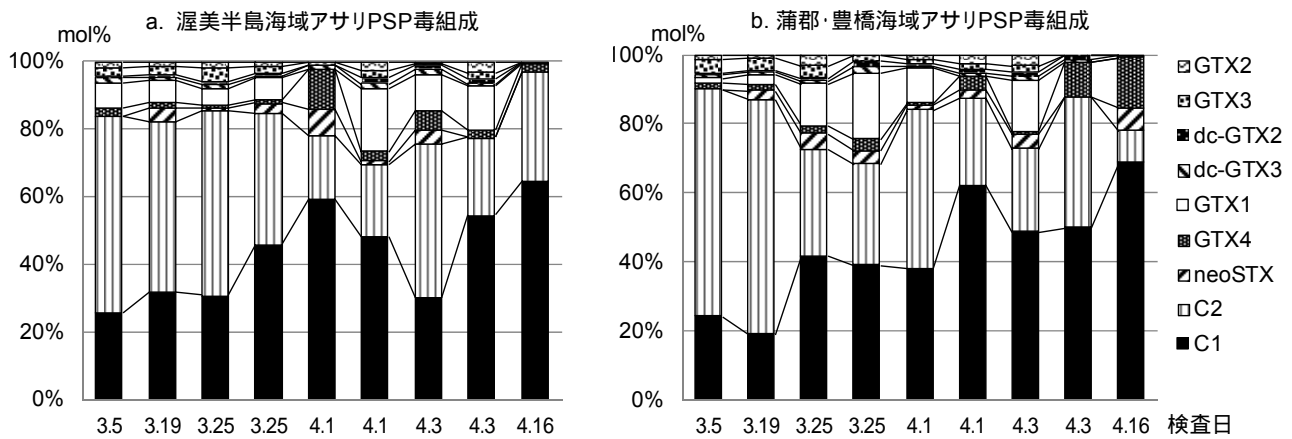


図3 規制値を超えた海域のアサリPSP毒組成推移

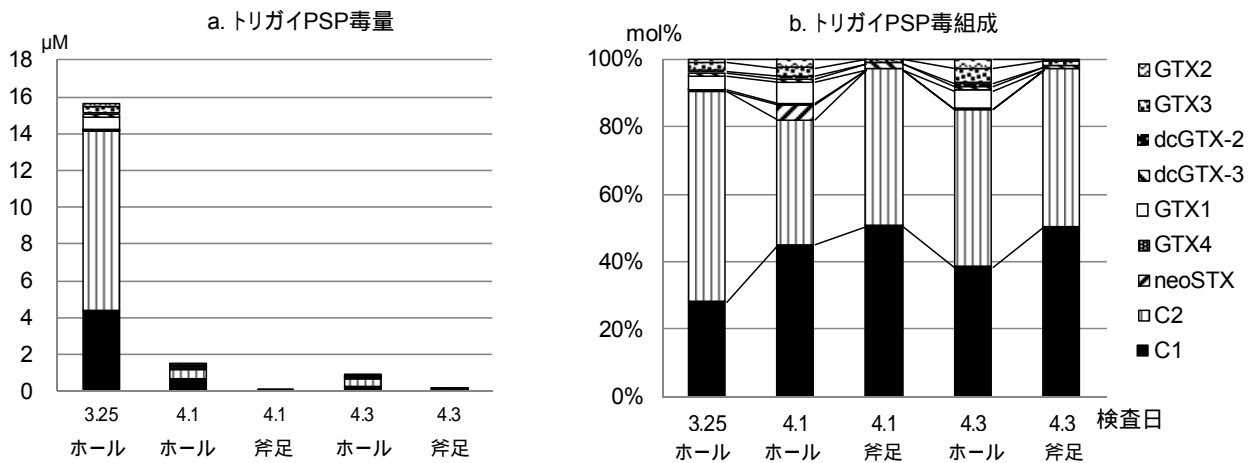


図4 蒲郡・豊橋海域トリガイPSP推移

検査したが、トリガイの可食部は斧足のみであることから、2回目検査(4月1日)以降はホールと斧足の検査を実施した。表1に毒組成、図4に毒量および毒組成の推移を示した。HPLC分析では、マウス法で規制値を超えるPSPを検出した3月25日(9.96 MU/g)に15.68 μMを検出後毒量は急激に減少した。また、ホール検体よりPSPが検出されても、斧足ではほとんど検出されず、部位により毒量は異なった。ホール検体のPSP組成は、C2が59%、C1が30%、GTX1、GTX3が数%の割合で、アサリ陽性検体と類似していた。C1、C2に着目するとPSP検出時はC2 > C1であるが、その後C2 < C1と変化しており、アサリのPSP推移と同様であった。

3. ウチムラサキ

ウチムラサキは大アサリとも呼ばれ、県内では海岸近くの観光地で焼いて供されることも多い貝である。表1に毒組成、図5に毒量および毒組成の推移を示した。マウス法で規制値を超えたPSPを検出した3月25日(4.28MU/g)および4月1日(4.09MU/g)のPSP毒量はそれぞれ2.23 μM、2.10 μM、とアサリのピーク値の1/4程度と少なく、毒組成は、dc-GTX2、dc-GTX3が最も多くこの2成分で62%を占め、アサリ、トリガイがC1、C2が主な成分であるのと大きく異なる結果であった。

4. 地域別3種の貝のPSP推移と*A. tamarensis*数の推移

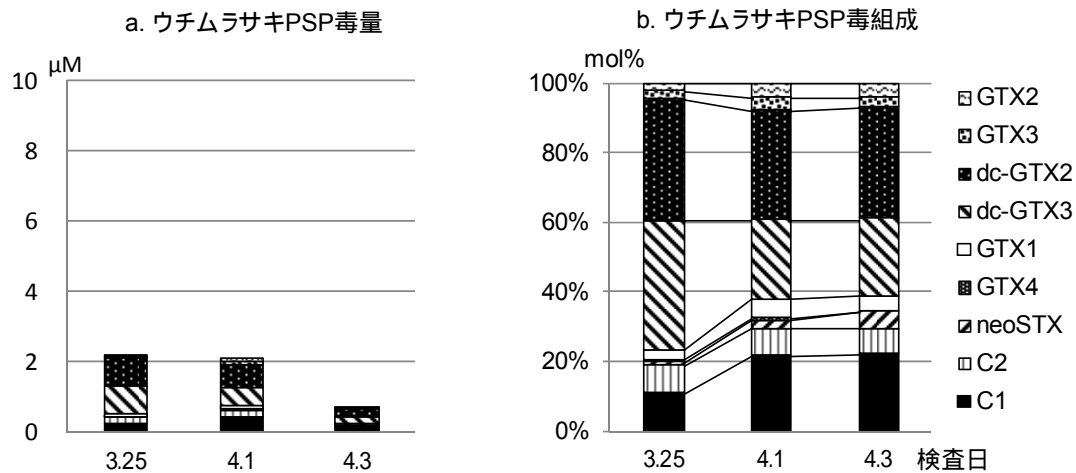


図5 渥美半島海域ウチムラサキPSP推移

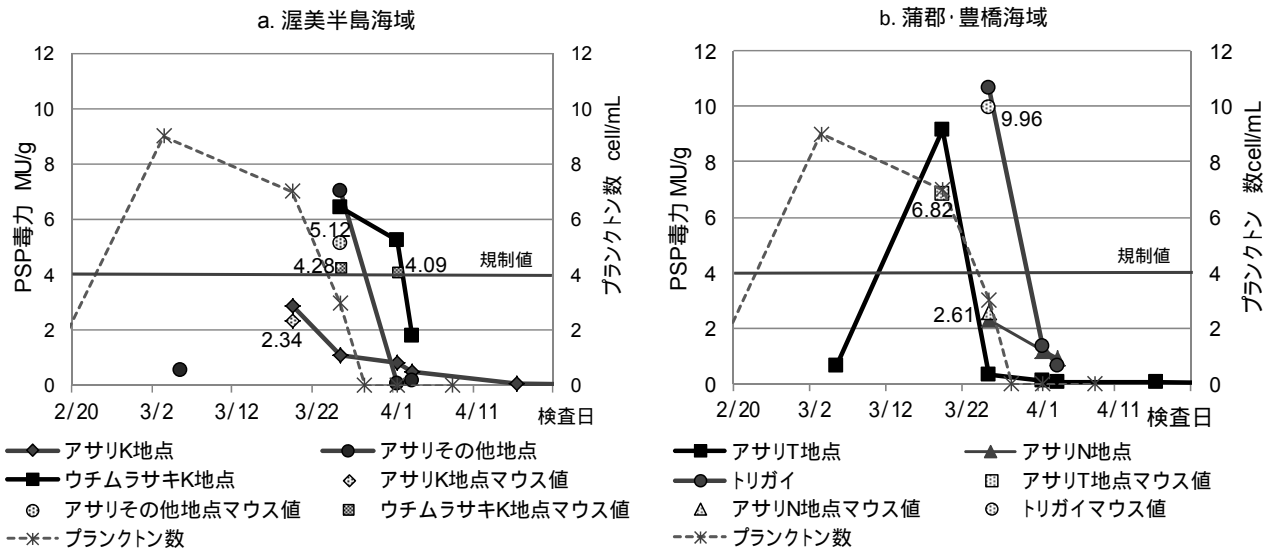


図6 二海域におけるプランクトン数及び貝種別PSP推移

1) 渥美半島海域

図6に海域別のPSP推移を示した。平成25年度 *A. tamarensis* 数は水産試験場業務報告の数値を用いた⁹⁾。本シーズンの *A. tamarensis* 数は、3月3,4日調査の9 cell/mLを最高値とし、3月19,20日調査で7 cell/mL、その後速やかに減少し3月28日以降は検出されていない。渥美半島海域では、アサリはプランクトン数の上昇2週間後の3月19日(2.34 MU/g)及び25日(5.12 MU/g)にマウス法でPSPが検出された。ウチムラサキは3月25日(4.28 MU/g)及び4月1日(4.09 MU/g)にマウス法でPSPが検出された。また、3月25日よりアサリの1海域での採取地点を1

2か所に増やしたが、25日採取の2地点で毒力は5.12 MU/gと不検出で大きく異なった。

2) 蒲郡・豊橋海域

蒲郡・豊橋海域では、アサリはプランクトン数の上昇2週間後の3月19日(6.82 MU/g)及び25日(2.82 MU/g)にマウス法でPSPが検出された。トリガイは3月25日にホール検体よりマウス法でPSPが検出され(9.96 MU/g)、その後不検出であった。

5. マウス法とHPLC法測定値の比較

マウス法とHPLC法の測定値を比較すると、全ての検体でマウス法値とHPLC法値がほぼ一致するか、マウス法値 < HPLC法値となり(図6)、マウス法値とHPLC法値の相関係数は

$R^2 = 0.98$ であった(データ不掲載)。マウス法値 < HPLC法値となる報告は多く⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾、今回の結果はこれと同様であった。

考 察

2014年シーズンに愛知県の二海域において採取されたアサリにおけるPSPは、*A. tamarense*数の増加が確認された(3月3,4日調査)2週間後の3月19日および25日にマウス法で規制値を超えたが、4月1日以降は不検出であった。HPLC解析ではいずれの海域においても、毒量は急激な増加、減少を示した。毒組成はC群で80%以上を占め、これは2001年に愛知県で規制値を超える毒化が発生した際の毒組成とほぼ同様の結果であった¹²⁾。愛知県の海域で主に発生する*A. tamarense*が産生するPSPはC群が主成分で⁶⁾¹⁴⁾、アサリの毒組成と類似することから、アサリは毒変換の少ない貝であると考えられた。次にC1, C2比に着目すると、C1, C2は異性体で、平衡到達点における存在比は約3:1となることが知られている²⁾⁴⁾¹³⁾。アサリのC1, C2比が毒量のピークを境にC2 > C1からC2 < C1へと変化していた結果はこの平衡化によるものと考えられ、比毒性はC2(239) > C1(15)であるので、相対的に毒力は減少していた。すなわちアサリの毒化はプランクトン数の推移にやや遅れて始まり、プランクトンのPSPを変換することなく蓄積し、減毒時には毒量の減少と、毒組成の変化による毒力の減少が同時に起きていた。また、毒量は14日間で最大10倍に増加し、2週間の検査間隔で初回PSP検出時がすでに規制値を超過していたことから(蒲郡・豊橋海域)、プランクトン数増加時には検査間隔を短くする必要性が示唆された。

トリガイのPSP毒量、毒組成の推移は、アサリとよく似た様相であった。しかしながら、3月25日時点でアサリ2検体は2.82 MU/gと不検出であったのに対し、トリガイは本調査期間中最も高いPSP(9.96 MU/g)が検出されたことから、採取場所が同一でないことから厳密な比較はできないがトリガイはアサリと比較し減毒が遅い傾向がうかがえ

た。また、毒量の少ない検体での比較ではあるが、可食部である斧足とホールではPSPの毒量、毒組成共に異なった。PSPは臓器により濃度が異なり、内臓部に多く蓄積されることが知られているが⁴⁾、トリガイでの詳細な報告はないため、今後、毒化したトリガイ検体で組織別の毒の蓄積の差異を調査する必要がある。

ウチムラサキでは、マウス法で規制値を超えたPSP検出時の毒量は約2 μ Mとアサリ、トリガイと比較して少なく、毒成分はdc-GTX群が主成分であった。愛知県の海域で主に発生する*A. tamarense*が産生するPSPはC群が主成分である⁶⁾¹⁴⁾ことから、ウチムラサキ体内でC群からdc-GTX群へ毒の変換(N-スルホカルバモイルの加水分解による脱カルバモイル変換)が起きたと考えられた。ウチムラサキはこの変換能力が高く、蓄積する毒量は少ないもののC群よりも強毒なdc-GTX群が主成分であったため、規制値を超える毒力となったと推察された。また、4月1日時点で同一海域のアサリはマウス法でPSP不検出であったのに対し、ウチムラサキでは規制値を超えるPSPが検出されたことから、採取場所が同一でないことから厳密な比較はできないがウチムラサキはアサリと比較し減毒が遅い傾向がうかがえた。

二枚貝へのPSPの蓄積および減毒の様相は、種特異的であることが知られており、例えばムラサキイガイは高い毒レベルに速やかに達する種として知られ、PSP発生の指標貝として利用されている。一方ホタテガイは減毒が遅いことが報告されている⁴⁾¹³⁾。本研究により貝種によるPSPの蓄積、排出、毒変換の差異の一端が明らかになり、特にウチムラサキは脱カルバモイル変換能力が高く毒化しやすいことが示唆された。今回の調査では、トリガイ及びウチムラサキは検査開始時期がアサリの毒化判明後であったため、それ以前の毒化の推移は不明で、アサリよりも早期に毒化していた可能性も否定できない。今後、アサリ以外の二枚貝についての毒化及び減毒の解明のため、更なる詳細な調査が必要であると考えられた。

PSP検査においてHPLC解析は、マウス法と比較して迅速性に劣り、包括的な測定ができない問題点はあるが、解析により貝種による差異を明らかにする等の基礎資料を得ることができる。これを基に貝種ごとにPSP主成分のみHPLC法検査を実施する等、モニタリング手法としてマウス法と併用しHPLC法を活用できる可能性も考えられた。

最後に今回の調査で明らかになった現状の監視体制の問題点を対処法の提案とともに以下に記す。2週間隔の検査では規制値を超える前段階でPSP発生を探知できなかった。プランクトン数増加時には検査間隔を短くする必要がある。同一海域内においても採取地点により、毒力は大きく異なった。海域内でより毒化しやすい地点を探知のうえできるだけ毒化の可能性の高い検体を確保する必要がある。同一海域内で同日採取された検体においても貝種により毒力は大きく異なった。アサリ以外の貝種についても、漁獲量が多く、毒化しやすい種については通常調査の対象種に加えることを検討すべきである。

謝 辞

本研究にあたり、HPLC法についてご教示いただきました衛生化学部猪飼誉友博士、多大なるご指導、ご協力をいただきました愛知県水産試験場および水産課の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 塩見一雄、長島裕二：海洋動物の毒（新訂版）、1-15、2006、成山堂書店、東京。
- 2) 後藤哲久、佐藤吉朗、吉田充監修：食品危害要因 その実態と検出法、151-154、2014、テクノシステム、東京。
- 3) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針理化学編、673-680、2005、社団法人日本食品衛生協会、東京。
- 4) 村上りつ子、野口玉雄：麻痺性貝毒 - 最近の知見を中心に - .食品衛生学雑誌 41(1):1-10,2000.
- 5) 厚生労働省：昭和 55 年 7 月 1 日環乳第

- 29号 厚生省環境衛生局長通知(2014年12月24日現在) ; <http://www.mhlw.go.jp/file.jsp?id=148310&name=0000014154.pdf>
- 6) 平成 13 年度二枚貝等貝毒安全対策事業報告書、2002、愛知県(2014年12月24日現在) ; http://ay.fish-jfrca.jp/akashio-backup/bunken2/nimaigai_aichi_H13.pdf
- 7) 大島泰克：独立行政法人水産総合研究センター平成 23 年度貝毒研修会テキスト「麻痺性貝毒 HPLC 分析法」。
- 8) Oshima Y: Postcolumn Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins. Journal Of AOAC International 78(2):528-532, 1995.
- 9) 平成 25 年度水産試験場業務報告、107-109、2014、愛知県(2014年12月24日現在) ; <http://www.pref.aichi.jp/0000009470.html>
- 10) 今井一郎、福代康夫、広石伸互 編 社団法人日本水産学会監修：貝毒研究の最先端 現状と展望、19-29、2007、恒星社厚生閣、東京。
- 11) 鈴木敏之、高坂祐樹、木村淳子、松嶋良次、渡辺龍一、村田昌一：貝毒監視体制の世界的な動向と日本の現状。食品衛生学雑誌 54(3):265-274、2013.
- 12) 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.
- 13) 高田久美代、妹尾正登、東久保靖、高辻英之、高山晴義、小川博美：マガキ、ホタテガイおよびムラサキガイにおける麻痺性貝毒の蓄積と減毒の差異.Nippon Suisan Gakkaishi (4):598-606, 2004.
- 14) Okumura M, Yamada S, Oshima Y, Ishikawa N: Characteristics of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins Derived From Short-Necked Clams(Tapes japonica) in Mikawa Bay. Natural Toxins 2:141-143, 1994.

Analysis of Paralytic Shellfish Poison exceeding the official regulatory standard level in bivalves collected in Aichi Prefecture during 2014 season

Akiko Hasegawa, Daisuke Hayakawa, Mizuna Nakamura, Mami Hata,

Teruo Yamashita, Hiroko Minagawa

Paralytic shellfish poison (PSP) is a group of potent neurotoxins produced by a number of toxic dinoflagellate species, *e.g.*, *Alexandrium*, and causes food-poisoning if accumulates in bivalves by predatory behavior. PSP infestation in Mikawa Bay was first observed at the end of March in 2014 after 13 years since March of 2001 in Aichi Prefecture. The toxic level exceeding the official regulatory standard of 4 mouse units (MU)/g was observed by the mouse bioassay in a course of PSP monitoring of bivalves in Mikawa Bay. The toxin profile was further analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). In *Ruditapes philippinarum* (Clam) and *Fulvia mutica* (Torigai), predominant toxins were C1 and C2. In contrast, the primary toxin components of *Saxidomus purpurata* (Uchimurasaki) differed from Clam and Torigai, consisting of decarbamoyl derivatives (dc-GTX2, 3), which are more toxic than C1 and C2. Moreover, *Saxidomus purpurata* required more days than other bivalves until the toxicity level drops below the regulation standard. The results indicated a need for more intense and efficient monitoring for PSP in *Saxidomus purpurata*.

Key words: Paralytic Shellfish Poison, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), *Ruditapes philippinarum* (Clam), *Saxidomus purpurata* (Uchimurasaki)

調 査 研 究

食中毒の原因物質となる植物性自然毒 (リコリン、コンバラトキシン)の同時分析法

後藤智美、尾関史晃、青山文生、伊藤裕子¹、上野英二、猪飼誉友

¹ 愛知県がんセンター中央病院

要 旨

ニラ様植物が原因の食中毒において、その原因物質となる有毒物質を検出する目的でスイセンに含有されるリコリン、スズランに含有されるコンバラトキシンの同時分析法を検討した。試料から水で抽出し、PLS-2 カートリッジにより精製した試験溶液を HPLC-UV で測定し、LC-MS/MS で確認するという方法を確立した。この方法を用いてスイセン及びスズランの分析に適用したところ、それぞれの有害物質は夾雑物の影響を受けることなく良好なピーク形状で分離・検出が可能であり、添加回収率 95.1 ~ 98.5 %、標準偏差 (RSD%) 3.7 % 以下と良好な結果が得られた。ニラ、スイセン及びスズランを食材として、誤食の可能性のあるおひたし、味噌汁、卵とじを調理後、分析に供した。いずれの調理済み食品においても、分析の妨害となるピークは認められず、それぞれの有害物質を良好に定量・確認することが可能であった。

キーワード：リコリン、コンバラトキシン、スイセン、スズラン、食中毒、HPLC-UV、LC-MS/MS

はじめに

食中毒は全国で毎年 1,000 件以上発生しており、その原因物質は、カンピロバクターやサルモネラなど細菌、ノロウイルスなどウイルス及びアニサキスなど寄生虫が患者数全体の 9 割を占めている。この他に動物性及び植物性の自然毒、ヒスチジンから生成したヒスタミンによる化学性食中毒がある¹⁾。このうち、フグによる食中毒の多くは自家調理によるものであり、致死率の高いことがよく知られている。また、植物性自然毒による食中毒の大半は、野草やきのこ等の有毒植物を食用可能なものと誤認して摂食することにより発生している。近

年の健康志向及び登山ブームを反映して、誤食による食中毒事例の報告数は増加傾向にある。当所においても、ジャガイモ中のソラニン及びチャコニンによる中毒事例や、チョウセンニンジンをごぼうと誤認して喫食した中毒事例への対応を実施している。このため、今後、発生する可能性のある植物性自然毒による食中毒に備えて、迅速かつ簡便な分析法を開発しておく必要があると考えられる。

スイセンは有毒物質であるリコリン (Lycorine)²⁾を、スズランは同じくコンバラトキシン (Convallatoxin)³⁾を含有しており(図 1)、その若芽をニラ等と誤認

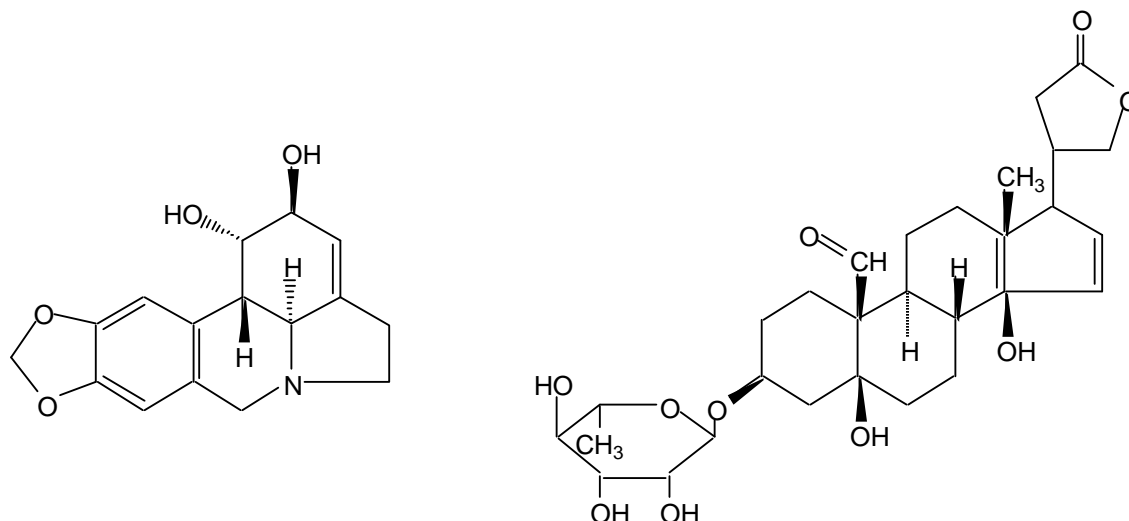


図1 リコリン及びコンバラトキシンの構造式

して喫食して食中毒を引き起こすことがあるため、今回、これらによる食中毒発生時に備えるための同時分析法を検討した。なお、食中毒が発生した場合、その原因食品は調理済みのものであることから、調理品によっては様々な食品成分による妨害が懸念される。そのため、このような妨害を回避できる HPLC-UV (High performance liquid chromatography / ultraviolet spectroscopy、高速液体クロマトグラフィー/紫外分光法) による定性・定量法、さらに、より精密な確認が可能な LC-MS/MS (Liquid chromatography / tandem mass spectrometry、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法) による同時分析法を検討の後、調理済み食品に応用し、その有用性を確認したので報告する。

方法

1. 試料

試料は、平成 22 年度に名古屋市内で観賞用として購入したスイセンとスズランの葉のみを細切したものと及び市内の小売店で購入したニラを使用した。

2. 試薬及び標準品

アセトニトリルは液体クロマトグラフィー用(和光純薬工業(株)製)、ギ酸は LC/MS 用(和光純薬工業(株)製)、その他の試薬は

試薬特級を用いた。

標準品はシグマ社製のリコリン塩酸塩及びコンバラトキシンの構造式を用いた。(図1)

超純水はミリポア社製 Simpli Lab を用いて調製したものをを用いた。

固相抽出カートリッジはジーエルサイエンス社製 GL-Pak PLS-2(500 mg)を用いた。

3. 標準溶液

標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 10 mL としたものを標準原液とし、これを適宜希釈して用いた。

4. 装置及び測定条件

(1) HPLC 条件

装置：(株)島津製作所製 SPD-10Avp 型多波長検出器付 LC-10Svp システム及びクロマトパック C-R6A。カラム：Waters 社製 XBridge Phenyl カラム (4.6×150 mm, 3.5 μm)。移動相：A 液；アセトニトリル、B 液；0.02 M リン酸緩衝液 (pH 2.5)。グラジエント条件：分析開始から 6.5 分まで A 液 5% を保持した後、8 分までリニアグラジエント溶出で A 液 30% とし、16 分まで A 液 30% を保持した後、16.1 分から 30 分まで A 液 70% を保持した後、A 液 5% に戻し 45 分まで保持した。カラム温度：40 。流速：1.0 mL/min。測定波長：290 nm (リコリン)、230 nm (コンバラトキシン)。注入量：10 μL

表1 リコリン及びコンバラトキシンのESI MS/MS条件

	Lycorine	Convallatoxin
Ion Mode	ESI+	ESI-
Precursor ion(m/z)	288	549
Cone Voltage(V)	40	42
Product ion(m/z)	147	385
Collision energy(eV)	28	18

(2) LC-MS/MS 条件

装置：Hewlett Packard 社製 HP-1100 LC に、Micromass 社製 Z スプレー付き Quattro MS/MS を接続して用いた。カラム：Waters 社製 XBridge Phenyl カラム (2.1×150 mm, 3.5 μm)。移動相：A 液；0.1 %ギ酸メタノール、B 液；0.1 %ギ酸水溶液。グラジエント条件：A 液 10 %から 5 分までのリニアグラジエント溶出で A 液 35 %とした後、9 分までのリニアグラジエント溶出で A 液 40 %とした後、A 液 10 %として 25 分まで保持した。カラム温度：30 °C。流速：0.2 mL/min。注入量：1 μL。測定モード：MRM。イオン化モード：リコリン；ESI+、コンバラトキシンのESI-。イオン源温度：400 °C。その他の条件は、表 1 に示した。

5. 分析操作

試料 2 g を秤取し、超純水 50 mL を加えてホモジナイズ抽出した。毎分 3,100 回転で 10 分間遠心した後、上清をガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液を、あらかじめメタノール 10 mL、水 10 mL でコンディショニングした PLS-2 (500 mg、5 mL) に負荷し、水 5 mL で洗浄後、30 %アセトニトリル 5 mL で溶出した。溶出液を適宜希釈して試験溶液とした。

6. 添加回収試験

スイセン及びスズランに、リコリン及びコンバラトキシンのそれぞれ 50 ppm となるよう標準溶液を添加した後、本法にしたがって分析した。スイセンのリコリン定量値は、試験溶液より得られた値から、ブランク溶液より得られた値を差し引いて求めた。同様に、スズランのコンバラトキシンの定量値を求めた。

7. 調理品の添加回収試験

スイセン、スズラン及びニラを用いて、以下の調理品を調製した。

(1) おひたし

ビーカーに水 200 mL を加えガスバーナーで加熱して沸騰させた後、各試料 25 g を加えて 2 分間加熱し、引き揚げて水を絞り、かつおぶし 5 g と醤油 5 mL を加えた。

(2) 味噌汁

ビーカーに水 200 mL を加え、ガスバーナーで加熱して沸騰させた後、各試料 25 g と油揚げ 5 g を加えて 2 分間加熱し、だし入り味噌を加え放冷した。

(3) 卵とじ

ビーカーに水 50 mL と市販の顆粒出汁を加え、ガスバーナーで加熱して沸騰させた後、各試料 25 g と醤油 2 mL を加えて 2 分間加熱し、溶き卵 20 mL を加え放冷した。(1) ~ (3) の固形部分を細切した後、リコリン及びコンバラトキシンのそれぞれ 50 ppm となるよう標準溶液を添加した後、本法に従って分析した。

結果および考察

1. HPLC 条件の検討

リコリン及びコンバラトキシンの紫外吸収スペクトルを測定し、その結果より HPLC-UV における測定波長をそれぞれ 290 nm、230 nm とした。移動相に用いる溶媒については、コンバラトキシンの測定波長が 230 nm と比較的の低波長であるため、低波長側に吸収を持たない溶媒を選択する必要があり、アセトニトリルを選択した。

分析カラムについては、当初、ODS を検討したが、移動相に 20 %アセトニトリルを用いて測定した結果、リコリンとコンバラトキシンのいずれも 3 分以内に溶出したが、

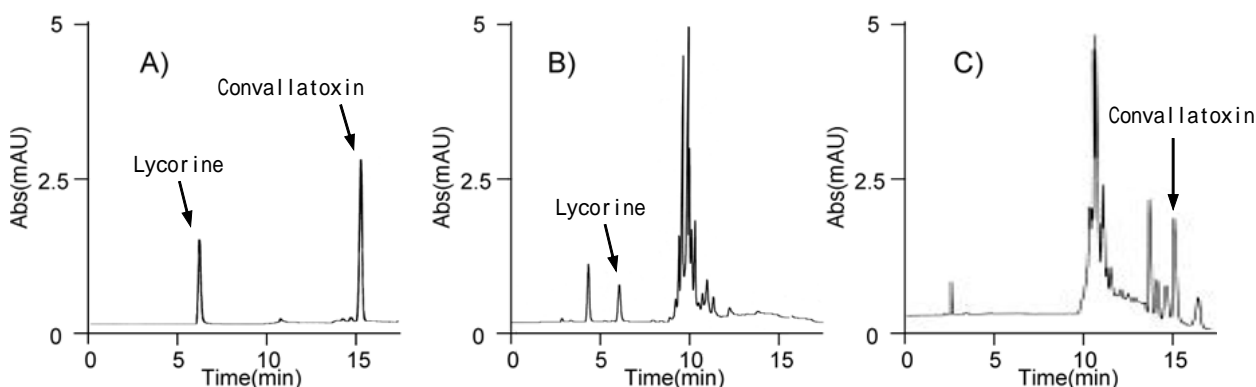


図2 HPLC-UVにより得られたクロマトグラム：A) リコリン及びコンバラトキシンの標準溶液（10 ppm），B) スイセンの試験溶液，C) スズランの試験溶液

著しくテーリングしたピークとなった。次いで順相カラムである Cosmosil 5NH₂ を検討したが、リコリン及びコンバラトキシンのピークが分離せず、良好な結果を得ることができなかった。一方、XBridge Phenyl を用いたところ、0.1 %ギ酸メタノール-0.1 %ギ酸水溶液を用いたグラジエント溶出条件で、ある程度良好な分離及びピーク形状が得られた。LC-MS/MS は、必ずしも夾雑物との分離や良好なピーク形状を必要としないことから、上記条件を当該装置の分離条件として採用した。上記条件は、コンバラトキシンの保持が比較的強く、夾雑物の影響を回避するのに都合が良いと考えられた反面、リコリンについては保持が弱く夾雑物の影響を受けやすいことや、ピーク形状等に若干の問題があることなどから、HPLC-UV 分析には不十分であった。そこで、上述のカラムを用いて HPLC-UV に適用可能な分離条件をより詳細に検討した結果、アセトニトリル-0.02 M リン酸緩衝液 (pH 2.5) を用いたグラジエント溶出条件下で良好な結果を得た。

方法の項に示した HPLC-UV 条件下で、図 2 (A) に示したようにリコリンは 5.5 分に、コンバラトキシンは 15.2 分に良好に分離した。この条件におけるリコリン及びコンバラトキシンの検量線は、それぞれ 1~50 µg/mL の濃度範囲で、 r^2 0.999 の良好な直線性を示した。

2. 精製法の検討

食中毒発生時には、調理された残品を検

査する必要があり、夾雑物の影響が大きくなることが考えられたため、固相抽出法による精製を検討した。すなわち、それぞれの標準品水溶液 10 mL を各カートリッジカラムに通液し、通過液中の各濃度を測定して保持能力を、通液後のカートリッジを 30 %アセトニトリル 10 mL で溶出して溶出能力をそれぞれ評価した。その結果、表 2 に示したように GL-Pak PLS-2 が最も良好な結果を示したため、これを用いることとした。

3. 抽出法の検討

これまで報告されている自然毒分析法^{4)・6)}の多くが、メタノールによる抽出を行い、その抽出液を希釈して試験溶液とし、妨害ピークとの分離を必ずしも必要としない LC-MS/MS を用いて測定を行っている。しかし、メタノールは、水と比較して多くの夾雑物も抽出するため、妨害ピークが出現しやすい HPLC-UV に適用するためには、煩雑な精製操作が必要となる。リコリン及びコンバラトキシンはともに水溶性であり、リコリンを含有したヒガンバナは水にさらすことで喫食が可能となる飢饉食⁷⁾であったこと、スズランを差したコップの水を飲用して死亡した報告⁸⁾があることから、超純水による抽出法を検討した。試料に細切したスイセンとスズランを用い、試料量として 2 g を、抽出液量として 50 mL をそれぞれ選択し、一回抽出と二回抽出における定量値を比較した。その結果、両者間には 2~3 %の差しか認められなかった

表2 各種カートリッジカラムからのリコリン及びコンバラトキシンの溶出率(%)

Cartridge column	Effluent		Eluate	
	Lycorine	Convallatoxin	Lycorine	Convallatoxin
Bond - Elut C18 (500 mg)	6	N.D.	90	99
Mega Bond - Elut C18 (1 g)	2	N.D.	95	99
Bond - Elut SCX (500 mg)	25	92	N.D.	N.D.
Bond - Elut PRS (500 mg)	88	N.D.	10	4
Sep - Pak Plus Silica (690 mg)	46	52	12	41
GL - Pak PLS - 2 (500 mg)	N.D.	N.D.	101	98

表3 食中毒原因物質(リコリン、コンバラトキシンの)のスイセン及びスズランからの回収率

	Lycorine		Convallatoxin	
	Recovery(%)	RSD(RSD%)	Recovery(%)	RSD(RSD%)
スイセン	98.5	3.7	96.1	1.4
スズラン	95.1	1.8	97.9	3.1

n = 5, RSD: Relative standard deviation

ため、迅速性を考慮して一回抽出を選択した。なお、本分析法の要する時間は、3検体あたり5時間以内であった。

この分析法を用いて得られたスイセン及びスズランの HPLC-UV クロマトグラムを図2(B, C)に示した。スイセンからはリコリンのピークのみを検出し、コンバラトキシンと保持時間が重なるピークは検出されなかった。同様に、スズランからはコンバラトキシンのピークのみを検出し、リコリンと保持時間が重なるピークは検出されなかった。方法の項に従って、リコリン及びコンバラトキシンがそれぞれ50 ppmとなるよう添加して回収率を求めた。表3に示すように、回収率95.1~98.5%、標準偏差(RSD%)3.7%以下の良好な結果を得ることができた。

4. LC-MS/MS 測定条件の検討

MS/MS 条件の検討を目的に、それぞれの濃度が2 ppmとなるようにメタノールで調製した標準溶液を、フローインジェクションで LC-MS/MS に導入し、それぞれのマススペクトルを得た。リコリンについては m/z288 にプロトン化分子[M+H]⁺が、コンバラトキシンについては m/z549 に脱プロトン分子[M-H]⁻が確認されたため、それら

をプリカーサーイオンに用いて、MS/MS 条件を最適化し、結果を表1に示した。

得られた LC-MS/MS 条件を用いて標準溶液を測定した結果、図3(A-1, A-2)に示したようにリコリンは3.9分に、コンバラトキシンは6.6分に良好に分離した。また、スイセン及びスズランの試験溶液を測定した結果、妨害となるピークは検出されず、保持時間8分以内に良好なMRMクロマトグラムを得ることができた。この条件下における検出下限(S/N 3)はリコリンは0.005 ppm、コンバラトキシンは0.02 ppmであった。

5. 添加回収試験

方法の項7. 調理品の添加回収試験に従って調製した各々調理品について、超純水で抽出し PLS-2 カートリッジを用いて精製し、得られた試験溶液を HPLC-UV 及び LC-MS/MS 分析に供した。HPLC-UV 及び LC-MS/MS いずれの測定条件においても、ニラを用いた調理品からはリコリン及びコンバラトキシンを妨害するピークは検出されなかった。同様に、スイセンを用いた調理品からも、リコリンのみを検出しコンバラトキシンを妨害するピークは検出されず、スズランを用いた調理品からも、コンバラ

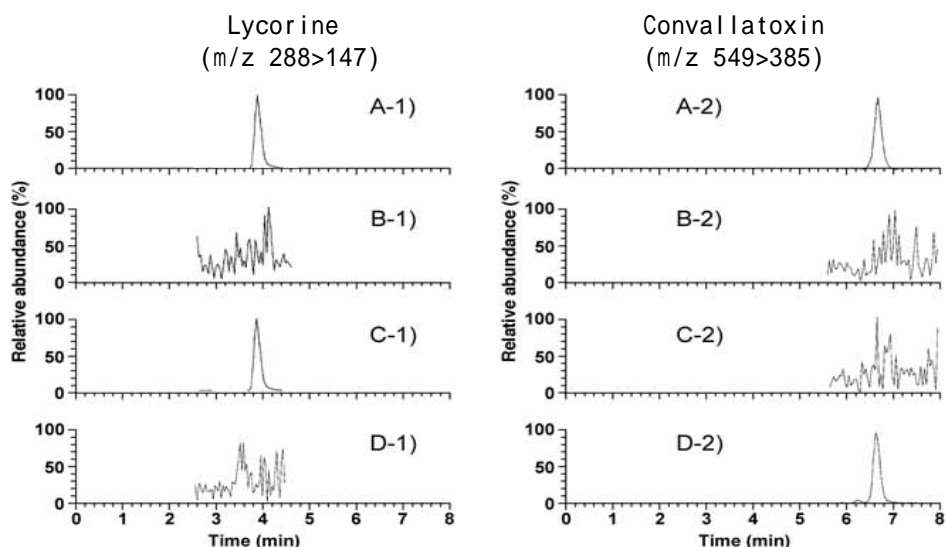


図3 LC-MS/MSにより得られた卵とじの試験溶液のMRMクロマトグラム：A) リコリン、コンバトキシンの混合標準溶液 (1 ppm)，B) ニラを用いた調理品の試験溶液，C) スイセンを用いた調理品の試験溶液，D) スズランを用いた調理品の試験溶液

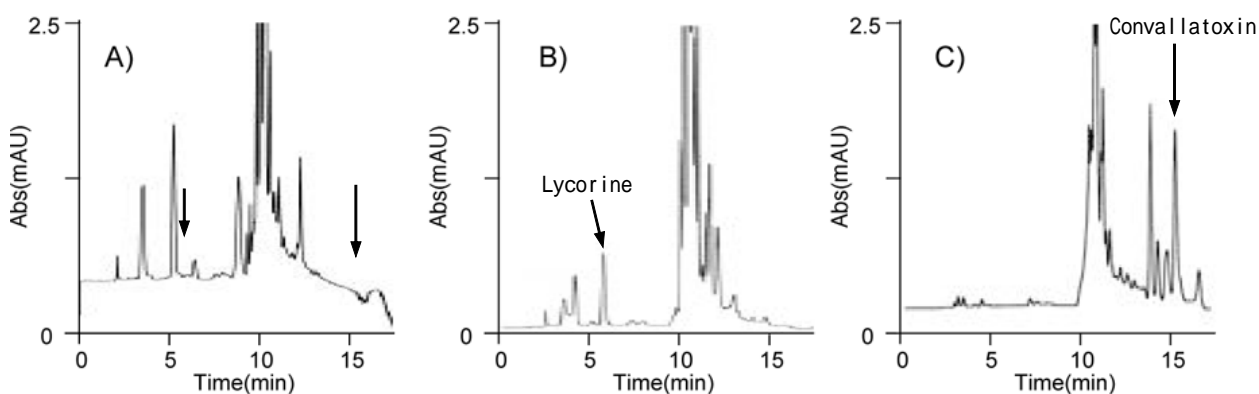


図4 HPLC-UVにより得られた卵とじの試験溶液のクロマトグラム：A) ニラを用いた調理品の試験溶液，B) スイセンを用いた調理品の試験溶液，C) スズランを用いた調理品の試験溶液

トキシンのみを検出しリコリンを妨害するピークは検出されなかった (図 3、4)。さらに、これら調理品からの添加回収試験を実施した。その結果、表 4 に示すように、すべての試料から 92.3~103.5 %の回収率が得られただけでなく、RSD %も 4 %以下と良好であった。

まとめ

有害物質を含有するスイセン及びスズランの誤食が疑われる食中毒発生に備えて、リコリン及びコンバトキシンの同時分析法を検討した。観賞用として栽培されたス

イセン、スズラン及びそれらを食材として用いた調理品を、超純水で抽出し PLS-2 カートリッジを用いて精製して試験溶液を調製した。アセトニトリル - 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 2.5) 混液によるグラジエント条件下、リコリン 290 nm、コンバトキシンの 230 nm の波長で HPLC-UV により測定したところ、いずれの試験溶液においても両有害物質は 20 分以内に良好な分離及びピーク形状を示した。この分析法における添加回収率は 92.3~103.5 %、RSD%は 4 %以下であった。また、上記試験溶液を用い、0.1 %ギ酸メタノール - 0.1 %ギ酸水溶液混液のグラジエ

表4 食中毒原因物質（リコリン、コンバラトキシン）のおひたし、味噌汁、卵とじからの回収率

		Lycorine		Convallatoxin	
		Recovery(%)	RSD(RSD%)	Recovery(%)	RSD(RSD%)
おひたし	ニラ	96.5	3.7	94.6	2.1
	スイセン	101.8	1.8	97.1	1.1
	スズラン	96.2	1.1	98.2	2.9
味噌汁	ニラ	92.3	1.8	94.1	1.9
	スイセン	99.8	3.7	95.1	2.2
	スズラン	97.8	2.3	100.9	3.9
卵とじ	ニラ	98.1	2.0	93.7	1.6
	スイセン	103.5	3.9	94.9	1.4
	スズラン	96.2	1.8	99.9	3.8

n = 5, RSD : Relative standard deviation

ト条件下で LC-MS/MS による確認法を検討した結果、いずれも両有害物質を 8 分以内に良好に検出し確認することが可能であった。加えて、前処理から確認・定量までに要する時間は 3 検体あたり 5 時間程度であった。以上の結果より、本法は、迅速かつ簡便であることから、ニラ様植物の誤食による食中毒発生時の原因物質の定量・確認法として有用であることが示唆された。

文 献

- 1) 厚生労働省：食中毒事件一覧速報(2012年12月11日現在); http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 2) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル(2012年12月11日現在); <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/>

higher_det_09.html

- 3) 岡田稔監修：新訂原色牧野和漢薬草大圖鑑，p.622，2002，北隆館，東京．
- 4) 上田泰人，伊藤光男：スイセンの LC/MS/MS 分析について，神戸市環境保健研究所報，60-61，2008．
- 5) 藤原美智子，立野幸治：LC/MS/MS による - ソラニン及び - チャコニンの分析法の検討，山口県環境保健センター所報，58-61，2008．
- 6) 坂本智徳，赤木浩一：HILIC-MS/MS によるヒガンバナ科植物中のリコリン，福岡市保健環境研究所，89-92，2009．
- 7) 樋口清之：梅干と日本刀 .140-152 ,2000，祥伝社，東京．
- 8) 朝日新聞社編：薬草毒草 300 .94 ,1986，朝日新聞社，東京．

The simultaneous analysis of vegetable natural poison (lycorine and convallatoxin) that causes food poisoning

Tomomi Goto, Fumiaki Ozeki, Fumio Aoyama, Yuko Ito¹, Eiji Ueno, Yoshitomo Ikai

¹ Aichi Cancer Center Hospital

We developed a new multi analysis method for two vegetable natural poisons, lycorine and convallatoxin contained narcissus and lily of the valley that have sometimes be eaten by mistake with edible plant such as leek. The two compounds are extracted from sample by ultra-pure water. The extract was cleaned-up by PLS-2 cartridge column, and the resulting solution was applied to HPLC-UV and/or LC-MS/MS for the determination and/or the confirmation of the two compounds. To evaluate the performance of present method, three popular dishes of Japan were prepared using narcissus, lily of the valley and leek as foodstuffs, and were applied to analysis. Lycorine and convallatoxin were successfully identified on the chromatograms of each dish used narcissus and lily of the valley, respectively, and any interfering peaks were not observed on those of all test samples. The recoveries were up to 90 % with satisfactory RSD value of < 4.0 % for both compounds at poisoning level, suggesting that the present method are usable to solve the food-poisoning accident related narcissus and lily of the valley.

Key words: lycorine, convallatoxin, narcissus, lily of the valley, food poisoning, HPLC- UV, LC-MS/MS

調 査 研 究

愛知県の一般住宅におけるダニアレルゲン調査

小島美千代、青木梨絵、市古浩美、椋島由佳¹、小池恭子、猪飼誉友

¹ 愛知県がんセンター中央病院

要 約

平成 11 年度から平成 24 年度に、愛知県内の一般住宅において室内塵中ダニアレルゲン調査を実施した。ヤケヒョウヒダニ排泄物由来アレルゲン (Der p1) とコナヒョウヒダニ排泄物由来アレルゲン (Der f1) の合計から求めた Der 1 量は、微細塵量が多い場所で高くなる傾向がみられた。また、Der 1 量の季節による変動は小さかった。ダニ相については多くの住宅で一定している傾向がみられ、全体的にはコナヒョウヒダニが優勢であった。本調査の結果から、室内塵中ダニアレルゲン量を低く抑えるには、カーペット類及び寝具などの微細塵が残りやすい場所の清掃頻度を高くすることが重要であると考えられた。

キーワード：ダニアレルゲン、室内塵、Der 1

序 文

日本において室内に生息する塵性ダニ類は 10 種前後¹⁾である。その中のチリダニ科ヒョウヒダニ属のヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 及びコナヒョウヒダニ (*D. farinae*) は、排泄物や虫体がぜんそく、鼻炎、アレルギー性皮膚炎などのアレルゲンとなるため、室内環境中の生息数を抑えることが重要である。ヒョウヒダニは、その名のとおりヒトの皮膚・表皮を餌とするダニで、ヒトが生活を始めることによって急激に増加することが知られている。増殖の至適温湿度は室温 25 前後、相対湿度 76% 前後とされており、20 以下、50% 以下ではほとんど増殖できない²⁾。かつての日本の家屋は、木造が中心で通気性に優れ、湿度を低く保つのに好

都合であった。これに対し、1970 年代に起きた二度の石油危機以降に建築された住宅は、熱効率を重視するあまり気密性が高く、換気率が低いことなどから湿度が高くなりがちとなり、ヒョウヒダニの生息に好条件をもたらした。このような住宅事情の変化が、ダニによるアレルギー性疾患が増加した一要因になったと考えられる。

以上の状況から愛知県では、平成 10 年度から健康快適・居住環境確保対策事業の中で県内の一般住宅を対象としたダニアレルゲン調査を実施しており、当所は測定を担当している。ここでは平成 11 年度から平成 24 年度までの調査結果の解析を行うとともに、ヤケヒョウヒダニとコナヒョウヒダニの生息状況や傾向及びその要因について考察した。

方 法

1. 調査期間及び試料

平成 11 年度から平成 24 年度に、愛知県健康福祉部（旧衛生部）が実施する室内汚染実態調査の対象となった県内の一般住宅において、床面や寝具等から採取した室内塵 539 検体（内訳：フローリング；101、畳；112、カーペット類；210、寝具；103、その他；13）。

2. 測定ダニアレルゲン及び方法

ヤケヒョウヒダニ排泄物由来アレルゲン（Der p1）量（ $\mu\text{g/g dust}$ ）及びコナヒョウヒダニ排泄物由来アレルゲン（Der f1）量をダニアレルゲン測定用 ELISA キット（平成 11～17 年度；LCD 社、平成 18～24 年度；Indoor 社）を用いて測定し、両者の合計を総ダニアレルゲン（Der 1）量とした。

3. 試料採取及びその他の調査項目

室内塵の採取には、ダストサンプラーを接続した家庭用掃除機を用いた。ダストサンプラー内部には、目開き 1.00 mm（16 メッ

シュ）及び 75 μm （200 メッシュ）の篩を各 1 枚重ねて装着し、床面や寝具等から 1 m^2 当たり 1 分間を目安に室内塵を採取し、200 メッシュ上の微細塵を測定用試料とした。これ以降、微細塵を試料と記す。また、アレルゲン量を評価するデータとして、試料採取箇所の面積及び総試料量を測定し、さらに、調査対象住宅の建築物情報、家族の状況、掃除頻度等住まい方の聞き取り調査を併せて実施した。

結果及び考察

1. 試料数及びアレルゲン検出状況

採取箇所別の試料数及び Der 1（Der p1+Der f1）の検出状況を年度別に表 1 に示した。検出率、中央値及び平均値について増減傾向は認められなかった。ただし、測定キットの変更等により、定量下限値が 0.1～0.5 $\mu\text{g/g dust}$ の範囲で異なったため、本表中の統計量のみ定量下限値を 0.5 $\mu\text{g/g dust}$ に統一して算出した。

表1 試料数及びアレルゲン検出状況

年度	試料数						合計	検出率(%)	Der1量 ($\mu\text{g/g dust}$)		
	フローリング	畳	カーペット類	寝具	その他	中央値			平均値	標準偏差	
11	1	13	8	21	1	44	88.6	3.4	11.3	17.0	
12	3	10	7	10	-	30	73.3	3.6	8.9	14.6	
13	5	4	8	10	-	27	77.8	1.0	1.6	1.9	
14	4	10	3	12	-	29	75.9	1.5	5.3	11.1	
15	3	8	6	13	-	30	83.3	3.7	11.0	24.1	
16	5	11	6	9	-	31	61.3	1.4	4.7	11.0	
17	8	8	5	10	2	33	57.6	0.9	3.4	9.3	
18	7	6	9	8	4	34	73.5	1.6	9.7	19.7	
19	4	8	8	10	1	31	74.2	2.1	3.7	4.8	
20	20	6	23	-	1	50	78.0	1.8	15.2	40.5	
21	11	9	27	-	3	50	74.0	1.6	4.5	7.8	
22	6	9	35	-	-	50	70.0	2.2	9.1	17.7	
23	9	7	34	-	-	50	80.0	1.9	6.5	10.1	
24	15	3	31	-	1	50	70.0	0.9	3.9	6.6	
総計/平均	101	112	210	103	13	539	74.4	1.7	7.3	17.9	

定量下限値を 0.5 $\mu\text{g/g dust}$ に設定して算出。実際の定量下限値は、H11～13；0.5、H14～17；0.4、H18～24；0.1 ($\mu\text{g/g dust}$)

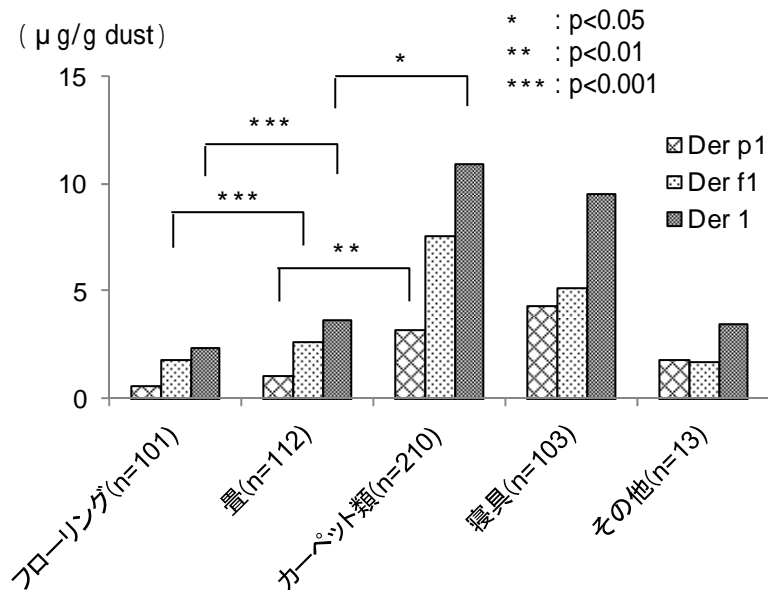


図1 採取箇所別のアレルギー量(平均値)

2. 採取箇所とアレルギー量

採取箇所別アレルギー量の平均値を図1に示した。フローリング、畳、カーペット類、寝具において、アレルギー量の平均値はDer p1よりもDer f1が高く、また、Der p1、Der f1、Der 1のいずれにおいても、フローリング<畳<カーペット類、寝具の順に高くなる傾向がみられた。ノンパラメトリック法で、フローリング-畳間のDer f1量 ($p<0.001$)、Der 1量 ($p<0.001$)及び畳-カーペット類間のDer p1量 ($p<0.01$)、Der 1量 ($p<0.05$)に有意差が認められた(Mann-Whitney検定)。以上の結果より、ダニの生息には、その場所の形状、構造が大きな要因の一つとして関与していることが考えられた。

3. 閾値によるアレルギー量の評価

Platts-Millsらが示す閾値を用いて試料のDer 1量を評価した。ダニ感作の閾値とされる $2 \mu\text{g/g dust}$ 及び喘息発作誘発の閾値とされる $10 \mu\text{g/g dust}$ で試料中のDer 1量を3段階のレベル(L1: $2.0 \mu\text{g/g dust}$ 以下、L2: $2.1 \sim 10.0 \mu\text{g/g dust}$ 、L3: $10.0 \mu\text{g/g dust}$ 超過)に区分したところ、L2及びL3に区分される試料がそれぞれ539中159(29.5%)及び91(16.9%)あった。これら試料のうち、前者の38%、後者の

57%がカーペット類から採取した塵であった。図2に試料採取箇所別のDer 1量レベルを示した。フローリングでは約8割の試料がL1に区分されたが、カーペット類や寝具では、過半数の試料がL2またはL3に区分され、そのうちL3に区分される試料は2割であった。以上の結果から、Der 1量を閾値以下に下げするために、カーペット類の使用を控えることが望ましいと考えられた。

4. 試料量とアレルギー量

試料の単位面積当たり重量とDer 1量の間には、弱い相関($r=0.324$)がみられた。そこで上述のDer 1量レベル別に単位面積当たりの試料量を比較し、表2に示した。L1-L2間、L2-L3間の試料量には、それぞれ有意な差($p<0.001$ 、 $p<0.01$)が認められ、室内塵中の試料量を少なくすることが、Der 1量を低く保つために有効であることが示唆された。

5. 掃除頻度とアレルギー量

試料採取箇所の掃除頻度とアレルギー量との解析を試みた(表3)。床面の掃除機かけ回数で、群(毎日)、群(2~3回/週)、群(1回以下/週)の3群に分けてアレルギー量を比較した。その結果、掃除頻度が低くなるほどDer p1、Der f1、Der 1いずれのアレルギー量も高くなる傾向がみ

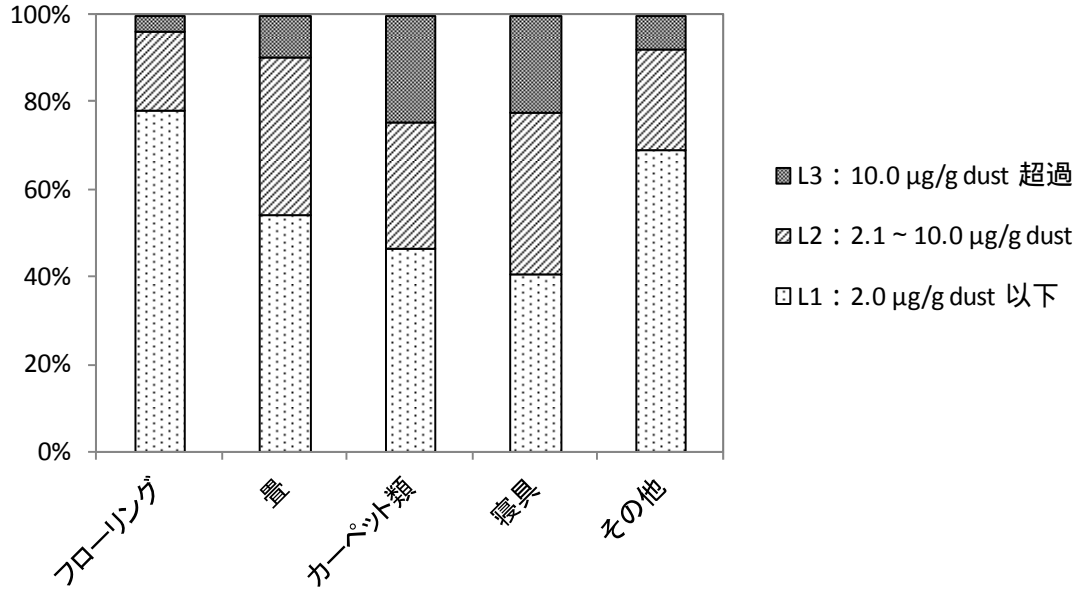


図2 試料採取箇所別のDer 1量レベル

表2 試料量とアレルゲン量

Der 1量 レベル	Der 1量 (µg/g dust)	単位面積当たりの試料量 (mg/m ²)					標準偏差	
		中央値	最小値	最大値	平均値			
L1	2.0 以下	22.8	0.6	427.4	46.8	60.1	*** **	
L2	2.1 ~ 10.0	46.1	0.6	415.3	76.6	77.4		
L3	10.0 超過	80.8	1.3	631.6	120.7	130.0		

Platts-Millsらによるガイドライン 2µg/g dust : 感作の閾値 **: p<0.01 *** : p<0.001
10µg/g dust : 喘息発作誘発の閾値

表3 掃除頻度とアレルゲン量

採取箇所	掃除頻度	試料数	単位 (µg/g dust)						
			Der p1量		Der f1量		Der 1量		
			平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	
床面	(毎日)	91	1.27	4.28	2.30	6.75	3.57	8.07	**
	(2~3回/週)	161	1.89	4.98	5.30	20.06	7.23	21.31	
	(1回以下/週)	166	2.61	7.99	6.03	15.97	8.72	18.82	
寝具	(毎日)	15	1.69	2.50	1.70	2.94	3.39	3.44	*
	(1回以上/週)	34	4.76	12.19	7.35	22.35	12.10	25.02	
	(1回未満/週)	53	4.86	10.44	4.95	7.67	9.81	14.35	

* : p<0.05 ** : p<0.01

表4 季節別ダニアレルゲン量

季節	試料数	単位 ($\mu\text{g/g dust}$)					
		Der p1量		Der f1量		Der 1量	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
春(3~5月)	4	0.98	0.75	1.20	0.97	2.18	1.64
夏(6~8月)	105	2.96	7.72	3.83	9.60	6.79	14.85
秋(9~11月)	289	2.59	7.71	5.29	17.71	7.89	19.69
冬(12~2月)	141	1.86	5.49	4.97	15.03	6.97	16.31

られ、群 - 群間の Der p1 量、Der f1 量、Der 1 量全てにおいて有意差 (Der p1、Der f1、Der 1 の順に $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$) が認められたが、群 - 群間には有意な差は認められなかった。一方、寝具の掃除頻度 (掃除機かけまたは日光干し) についても、群 (毎日)、群 (1 回以上/週)、群 (1 回未満/週) の 3 群に分けて同様の比較を行ったが、床面ほど顕著な傾向は認められなかった。しかしながら、群の Der f1 量は、それ以外の群と比較して有意に低い ($p < 0.05$) ことが認められた。これらの結果は、床面や寝具の掃除頻度が高いほどアレルゲン量を低く抑えられることを示しており、その頻度として、[毎日] が望ましいと考えられた。

6. 有症者の有無とアレルゲン量

呼吸器症状や皮膚症状等、アレルギー性の症状を呈する家族がいる住宅群 ($n=272$) といない住宅群 ($n=264$) でアレルゲン量を比較したが、今回の調査では、両群の間に一定の傾向や有意な差はみられなかった。アレルギー症状の発現には、個人の体質や遺伝的要因、また、アレルゲンとしてダニ以外にも花粉や化学物質等様々な因子が関連していることがその理由として考えられた。

7. 季節とアレルゲン量

試料採取時期を春 (3~5 月)、夏 (6~8 月)、秋 (9~11 月)、冬 (12~2 月) に分けて季節ごとにアレルゲン量の平均値及び標準偏差を求めた (表 4)。試料数が少ない春を除く 3 季でアレルゲン量を比較したとこ

ろ、Der p1、Der f1、Der 1 のいずれにおいても季節間に有意な差は認められなかった。気象庁のデータ³⁾によると、平成 11 年度から平成 24 年度の名古屋市における外気温の月平均値は、10 月には 20 を下回り、11 月には 12~13 に、12~3 月には 10 以下となる。冬季には多くの住宅で暖房器具を使用するため、室温は 20 程度に保たれていることが考えられるが、秋季はヒョウヒダニの繁殖に適しているとは言い難い。一方、試料採取箇所のカーペット類使用割合を季節別に調べると、夏が 19%、秋が 34%、冬には 65% と、平均気温が下がるにつれてその割合が増加していることが判った。この結果より、室温が低くなる季節にはダニがカーペット類に潜り込んで生息していることが考えられ、これが秋季や冬季にアレルゲン量が減少しない一因と推測された。

8. 試料採取居室の階層とアレルゲン量

住宅の湿度は、気密性や窓の開閉頻度、外気の影響等を受け、高層階では低層階に比べて低くなる傾向がある⁴⁾。そこで、試料を採取した居室の階層で、1~3 階を低層群、4~14 階を高層群として両群のアレルゲン量を比較したところ、低層群 ($n=457$) の Der p1 量 ($\mu\text{g/g dust}$) 2.28 ± 6.85 に対し、高層群 ($n=38$) 0.33 ± 0.99 と、低層群が有意に高い ($p < 0.05$) ことが認められた。しかし、Der f1 量と Der 1 量については有意差が認められなかった。ヤケヒョウヒダニはコナヒョウヒダニに比べて乾燥に弱いことが知られている。今回の調査でも、ヤ

ケヒョウヒダニは高層階では生息しにくいという既報^{5,6)}を支持する結果が得られた。

9. アレルゲン種

安枝⁷⁾は1997年(平成9年)に、相模原周辺の住宅における室内塵中 Der p1 量と Der f1 量の比率はほぼ 1:1 であったことを報告している。しかし今回の調査結果は、Der f1 が高い傾向にあることを示しており、この傾向は調査開始当初(平成11~13年度)に比べ約10年後(平成20~24年度)がより顕著であった(図3)。そこで、最近のダニ相の実態を把握するため、平成20~24年度に、同一住宅で秋季(9月、10月)と冬季(12月、1月)に実施した2回の調査結果(延べ115住宅)から、季節間の両アレルゲン種の動向について解析を実施した。すなわち、個々の住宅のアレルゲン測定値から、両季節の p1 比(Der 1 量に対する Der p1 量の比)を求め、両者の相関分析を行った。その結果、図4に示すように、半数以上の住宅の p1 比は両季節を通してほぼ一定であり、データ全体についても相関係数 0.71 と明らかな正の相関が認められた。これより、最近の住宅の多くは、年間を通してダニ相が安定している可能性が示唆された。さらに、図4のプロットエリアを p1 比 = 0.5 のラインで4分割することにより、季節とアレルゲン種優劣の組み合わせで、対象住宅を ~ 群に分けた。その結果、両季節ともに Der p1 が高い 群の住宅数が 16 (全体の 14%)、両季節ともに Der f1 が高い 群の住宅数が 85 (全体の 74%) と、両季節を通してダニの優占種が変わらない住宅が全体の約 9 割を占め、その中ではコナヒョウヒダニの優占する住宅が圧倒的に多いことなどの実態が明らかとなった。

まとめ

平成11年度から24年度までに愛知県内の一般住宅で実施したダニアレルゲン調査結果をまとめ、解析を行った。その結果、フローリングよりも畳、畳よりもカーペット類や寝具から採取される塵中のアレルゲ

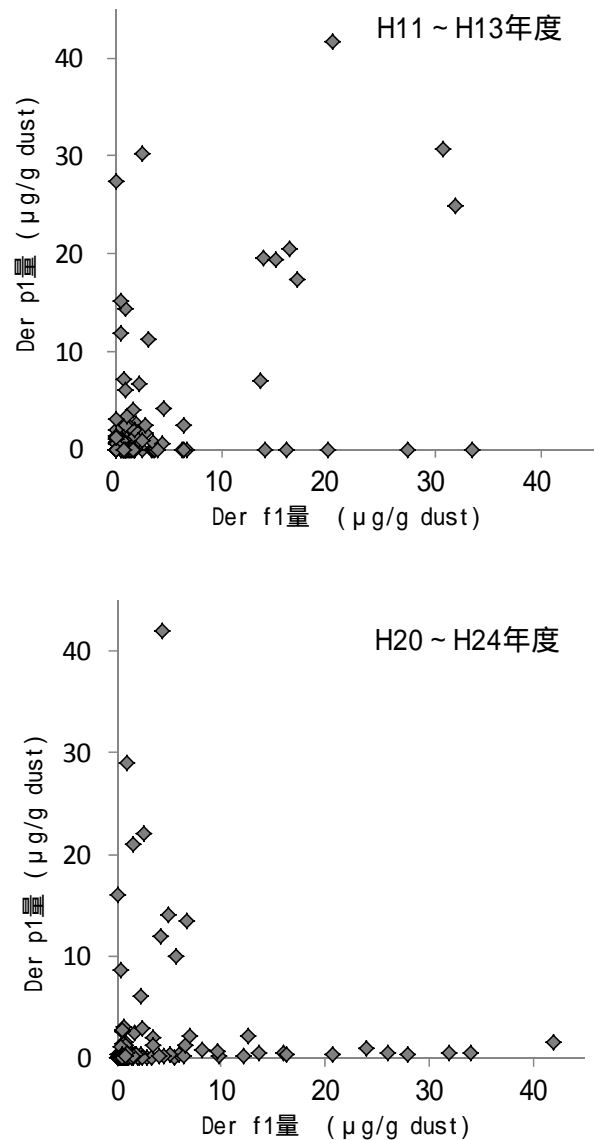


図3 アレルゲン種の比較

ン量が高い傾向にあった。また、ヒョウヒダニの繁殖には不適な気候と考えられる秋から冬季においてもアレルゲン量の有意な減少は認められず、その一因としてカーペット類の使用が考えられた。塵量とアレルゲン量とは正の相関が認められ、掃除頻度が高い住宅のアレルゲン量は低かった。ダニアレルゲン量を低く抑えるには、掃除の頻度を高くするとともに、塵の除去が難しいカーペット類の使用を控えることが効果的であることが示唆された。また、調査開始当初と約10年後ではダニ相が異なっており、平成20年以降はコナヒョウヒダニがヤケヒョウヒダニよりも優勢である傾向

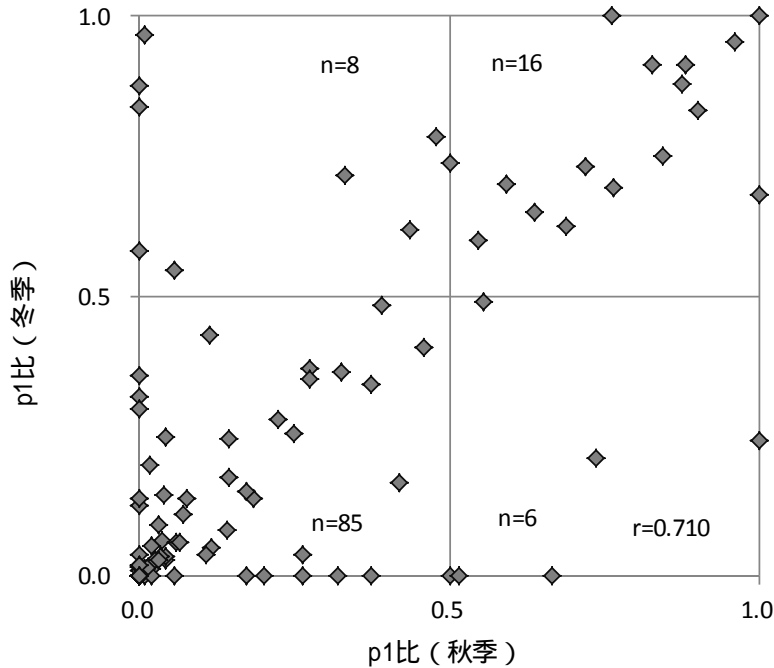


図4 両調査時期におけるp1比(Der p1量/Der 1量)の関係

がみられた。これは室内の相対湿度の低下を示唆しており、その要因として、機械換気設備の設置を義務付けた建築基準法の改正(平成15年)や一般家庭における空調機の普及⁸⁾等が影響していることが考えられた。

謝 辞

本調査は、試料採取の担当及び貴重な御助言をいただいた愛知県健康快適・居住環境検討ワーキンググループ(事務局 生活衛生課)構成員と共に実施したことを記し、関係各位に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 室内環境学会編：室内環境学概論 .2010 . 東京電機大学出版局、東京 .
- 2) 鳥居新平：わが国の居住環境におけるアレルギー問題の概要 . Journal of National

Institute of Public Health 47(1) : 2-6 , 1998 .

- 3) 気象庁ホームページ : <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/>
- 4) 名古屋市衛生センター：ダニアレルゲン量等調査結果について .第58回名古屋市公衆衛生研究発表会 , 2012 .
- 5) 須藤千春：コナヒョウヒダニとヤケヒョウヒダニの生息状況に影響する要因の比較 .ペストロジー学会誌 11(1):1-8 ,1996 .
- 6) 彭城郁子, 須藤千春：高層集合住宅における屋内性ダニ類の生息状況と居住環境要因の重回帰分析 . 衛生動物 46(4) : 367-380 , 1995 .
- 7) 安枝浩：ダニアレルゲンの分析 . アレルギー科 . 4(4) : 326-332 , 1997 .
- 8) 内閣府消費動向調査結果 : <http://www.esri.cao.go.jp/jp/stat/shouhi/shouhi.html>

Determination of mite-allergens in private houses in Aichi prefecture

Michiyo Kojima, Rie Aoki, Hiromi Ichigo,
Yuka Kabashima¹, Yasuko Koike, Yoshitomo Ikai
¹Aichi Cancer Center Hospital

In order to research indoor contamination of mite allergen, those originated from *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) and *D. farinae* (Der f1) in the house dust were determined by ELISA kit. Five hundred and thirty nine dust samples were collected from living and bed rooms of the residents of Aichi prefecture between 1999 and 2012, and were sifted through 16 and 200 meshes to separate fine dust for determination. The total allergen (Der 1, total of Der p1 and Der f1) value in the fine dust tended to be higher together with the weight of sample dust per sampling area, especially on carpet and bed, suggesting that frequent house cleaning is essential for reducing the numbers of mites from such places. The Der 1 value tended to be stable through the seasons in almost all houses. The ratio of *D. pteronyssinus* and *D. farinae* was also stable in many houses, though the latter was dominant species.

Key words: mite allergen, house dust, Der 1

 他誌掲載論文抄録

Molecular detection and nucleotide sequence analysis of a new Aichi virus closely related to canine kobuvirus in sewage samples

Yamashita T, Adachi H, Hirose E, Nakamura N, Ito M, Yasui Y, Kobayashi S, Minagawa H.
Journal of Medical Microbiology. 63(5):715-720, 2014

Between 2001 and 2005, 207 raw sewage samples were collected at the inflow of a sewage treatment plant in Aichi Prefecture, Japan. Of the 207 sewage samples, 137 (66.2%) were found to be positive for amplification of Aichi virus (AiV) nucleotide using reverse transcription (RT)-PCR with 10 forward and 10 reverse primers in the 3D region corresponding to the nucleotide sequence of all kobuviruses. AiV genotype A sequences were detected in all 137 samples. New sequences of AiV were detected in nine samples, exhibiting 83% similarity with AiV A846/88, but 95% similarity with canine kobuvirus (CKV) US-PC0082 in this region.

The nucleotide sequences from the VP3 region to the 3' untranslated region (UTR) of sewage sample Y12/2004 were determined. The number of nucleotides in each region was the same as that of CKV. The similarity of the nucleotide (amino acid) identity of a complete VP1 region was 90.5% (94.8%) between Y12/2004 and CKV US-PC0082. The phylogenetic analyses based on the nucleotide and the deduced amino acid sequences of VP1 and 3D showed that Y12/2004 was independent from AiV, but closely related to CKV. These results suggested that CKV is present in Aichi Prefecture, Japan.

Detection and genotyping of rubella virus from exanthematous patients suspected of having measles using reverse transcription-PCR

Yasui Y, Mori Y¹, Adachi H, Kobayashi S, Yamashita T, Minagawa H
¹Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases
Japanese Journal of Infectious Diseases 67(5):389-391, 2014

Between July 2012 and March 2013, a total of 133 clinical specimens from 47 patients suspected of having measles were collected for virological surveillance in Aichi prefecture, Japan. Facing the rubella epidemic, the

reverse transcription (RT)-PCR protocol for measles virus (MeV) was modified to simultaneously detect rubella virus (RUBV) in these clinical specimens. As a result, 30 specimens from 15 patients were positive for

RUBV and 8 specimens from 3 patients were positive for MeV. The RUBV Genotype analysis for samples from 13 patients revealed 12 samples as 2B and 1 sample as 1E. The results provided additional evidence for the difficulty in the diagnosis of exanthematous diseases based on clinical manifestations alone and the necessity of

virological diagnosis to maintain the accuracy of case-based surveillance. Furthermore, the results indicated that the modified RT-PCR protocol could be useful as a routine procedure to simultaneously detect MeV and RUBV in clinical specimens of patients suspected of having exanthematous disease caused by these viruses.

New PCR-based open reading frame typing method for easy, rapid, and reliable identification of *Acinetobacter baumannii* international epidemic clones without performing multilocus sequence typing

Suzuki M, Hosoba E¹, Matsui M², Arakawa Y³.

¹National Hospital Organization Nagoya Medical Center, ²National Institute of Infectious Diseases, ³Nagoya University Graduate School of Medicine

Journal of Clinical Microbiology 52(8): 2925-2932, 2014

Antimicrobial resistance issues have become a global health concern. The rapid identification of multidrug-resistant microbes, which depends on microbial genomic information, is essential for overcoming growing antimicrobial resistance challenges. However, genotyping methods, such as multilocus sequence typing (MLST), for identifying international epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* are not easily performed as routine tests in ordinary clinical laboratories. In this study, we aimed to develop a novel genotyping method that can be performed in ordinary microbiology laboratories. Several open reading frames (ORFs) specific to certain bacterial genetic lineages or species, together with their unique distribution patterns on the chromosomes showing a

good correlation with the results of MLST, were selected in *A. baumannii* and other *Acinetobacter* spp. by comparing their genomic data. The distribution patterns of the ORFs were visualized by agarose gel electrophoresis after multiplex PCR amplification and digitized. *A. baumannii* sequence types (STs) corresponding to international clones I and II were successfully discriminated from other STs and *Acinetobacter* species by detecting the distribution patterns of their ORFs using the multiplex PCR developed here. Since bacterial STs can be easily expressed as digitized numeric data with plus (+) expressed as 1 and minus (-) expressed as 0, the results of the method can be easily compared with those obtained by different tests or laboratories. This PCR-based ORF

typing (POT) method can easily and rapidly identify international epidemic clones of *A. baumannii* and differentiate this microbe from other *Acinetobacter* spp. Since this

POT method is easy enough to be performed even in ordinary clinical laboratories, it would also contribute to daily infection control measures and surveillance.

ベトナム渡航者からの麻疹ウイルス遺伝子 H1 型の検出 - 愛知県

安井善宏、尾内彩乃、伊藤雅、安達啓一、中村範子、廣瀬絵美、小林慎一、山下照夫、皆川洋子、荒ヶ田智子¹、浅井康浩¹、加藤勝子¹、竹内清美¹

¹豊田市保健所

病原微生物検出情報 35(7):177-178, 2014

2014年1月から5月までに愛知県では麻疹と診断された患者のうち12例から、B3型(10例)とH1型(2例)麻疹ウイルス遺伝子を検出した。B3型を検出した10例中3例はフィリピン、H1型の2例はベトナム輸入関連であった。H1型患者由来N遺伝子の部分塩基配列は2例で同一であり、ベトナムから報告された配列と100%相同であったが、2013年本県で決定され

た中国由来株とは異なっていた。また、2例の患者由来検体から麻疹ウイルスが分離された。世界保健機関西太平洋地域の2014年麻疹累積患者数は中国、フィリピン、ベトナムの順に多く、H1型は中国、ベトナムから多く報告されている。東南アジア由来輸入麻疹のリスクが高まっており、今後も輸入麻疹に対する備えと分子疫学的解析が重要になると思われる。

Hyperferritinemia in neonatal and infantile human parechovirus-3 infection in comparison with other infectious diseases

Hara S¹, Kawada J², Kawano Y², Yamashita T, Minagawa H, Okumura N¹, Ito Y³.

¹Department of Pediatrics, Toyota Memorial Hospital, ²Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, ³Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine.

Journal of Infection and Chemotherapy. 20(1):15-19, 2014

Human parechovirus-3 (HPeV-3) has been associated with severe clinical manifestations in neonates and infants in the form of sepsis or hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH)-like illness. To clarify the clinical features of HPeV-3

infection, we compared clinical signs and laboratory findings among enteroviruses (EVs), HPeV-3, and other infections. Participants were 26 febrile infants in whom EVs (n = 20) or HPeV-3 (n = 6) were isolated from throat swab or fecal specimens.

Clinical and laboratory data were compared among EVs, HPeV-3, respiratory syncytial virus (RSV) infection (n = 15), and bacterial meningitis (n = 8) groups. Apnea was frequently seen in the HPeV-3 group although there were no significant differences in other clinical symptoms. Leukocyte count was significantly lower in the HPeV-3 group than in the EV and RSV group. Platelet count was significantly lower in the HPeV-3 group than in the RSV group. Serum ferritin levels in the HPeV-3 group (mean, 2437 ng/ml) and EV group (mean, 552 ng/ml) were significantly higher than in

the RSV group (mean 237 ng/ml; P = 0.008 and P = 0.002, respectively). The frequency of patients with clearly high ferritin levels ≥ 1000 ng/ml was comparatively higher in the HPeV-3 group (4/6) than the EV group (3/20) (P = 0.03). In the HPeV-3 group, ferritin levels were high on Days 4-5. Elevated ferritin levels, decreased leukocyte and platelet counts could offer diagnostic clues to HPeV-3 infection in infant. These laboratory findings might be associated with aberrant immune response to HPeV-3, which could contribute to the development of sepsis or HLH-like illness in neonates.

Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections

Kotani O^{1,2}, Iwata-Yoshikawa N¹, Suzuki T¹, Sato Y¹, Nakajima N¹, Koike S³, Iwasaki T¹, Sata T¹, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F², Hasegawa H¹, Shimizu H⁴, Nagata N¹

¹Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, ²Department of Virology and Viral Infections, Faculty of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University, ³Neurovirology Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ⁴Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

Neuropathology, 2014 Sep 28. doi: 10.1111/neup.12171

The aim of this study was to establish a reliable method of virus detection for the diagnosis of critical enterovirus infections such as acute infective encephalitis, encephalomyelitis and myocarditis. Because histopathological and immunohistochemical analyses of paraffin-embedded tissues play an important role in recognizing infectious agents in tissue samples, six in-house polyclonal antibodies raised against three representative enteroviruses using an indirect

immunofluorescence assay and immunohistochemistry were examined. This panel of polyclonal antibodies recognized three serotypes of enterovirus. Two of the polyclonal antibodies were raised against denatured virus particles from enterovirus A71, one was raised against the recombinant VP1 protein of coxsackievirus B3, and the other for poliovirus type 1 were raised against denatured virus particles, the recombinant VP1 protein and peptide 2C. Western blot

analysis revealed that each of these antibodies recognized the corresponding viral antigen and none cross-reacted with non-enteroviruses within the family Picornaviridae. However, all cross-reacted to some extent with the antigens derived from other serotypes of enterovirus. Indirect immunofluorescence assay and immunohistochemistry revealed that the virus capsid and non-structural proteins were localized in the cytoplasm of affected culture cells, and skeletal muscles and neurons in neonatal mice experimentally-infected with human enterovirus. The antibodies also

recognized antigens derived from recent clinical isolates of enterovirus A71, coxsackievirus B3 and poliovirus. In addition, immunohistochemistry revealed that representative antibodies tested showed the same recognition pattern according to each serotype. Thus, the panel of in-house anti-enterovirus polyclonal antibodies described herein will be an important tool for the screening and pathological diagnosis for enterovirus infections, and may be useful for the classification of different enterovirus serotypes, including coxsackieviruses A and B, echoviruses, enterovirus A71 and poliovirus.

Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan

Takashita E¹, Fujisaki S¹, Kishida N¹, Xu H¹, Imai M¹, Tashiro M¹, Odagiri T¹, the Influenza Virus Surveillance Group of Japan (including Yasui Y)

¹Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases

Influenza and Other Respiratory Viruses 7: 1390-1399, 2013

Japan has the highest frequency of neuraminidase (NA) inhibitor use against influenza in the world. Therefore, Japan could be at high risk of the emergence and spread of NA inhibitor-resistant viruses. The aim of this study was to monitor the emergence of NA inhibitor-resistant viruses and the possibility of human-to-human transmission during four influenza seasons in Japan.

To monitor antiviral-resistant A(H1N1)pdm09 viruses, we examined viruses isolated in four seasons from the

2008–2009 season through the 2011–2012 season in Japan by allelic discrimination, NA gene sequencing, and NA inhibitor susceptibility.

We found that 157 (1.3%) of 12,026 A(H1N1)pdm09 isolates possessed an H275Y substitution in the NA protein that confers about 400- and 140-fold decreased susceptibility to oseltamivir and peramivir, respectively, compared with 275H wild-type viruses. The detection rate of resistant viruses increased from 1.0% during the pandemic period to 2.0% during the

post-pandemic period. The highest detection rate of the resistant viruses was found in patients who were 0–9 years old. Furthermore, among the cases with resistant viruses, the percentage of no known exposure to antiviral drugs increased from 16% during the pandemic period to 44% during the post-pandemic period, implying that suspected human-to-human

transmission of the resistant viruses gradually increased in the post-pandemic period.

A(H1N1)pdm09 viruses resistant to oseltamivir and peramivir were sporadically detected in Japan, but they did not spread throughout the community. No viruses resistant to zanamivir and laninamivir were detected.

Invasive infection caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter soli*, Japan

Kitanaka H¹, Sasano MA², Yokoyama S¹, Suzuki M, Jin W¹, Inayoshi M², Hori M², Wachino J¹, Kimura K¹, Yamada K¹, Arakawa Y¹

¹Nagoya University Graduate School of Medicine, ²Okazaki City Hospital

Emerging Infectious Diseases 20(9): 1574-1576, 2014

We report a case of infection with carbapenem-resistant *Acinetobacter soli* producing Tripoli MBL 2 (TMB-2) metallo- β -lactamase, in a man in Japan. The

TMB-2-producing *A. soli* strain that we isolated came from a blood culture, indicating that *A. soli* is a potential cause of bloodstream infections or bacteremia.

Emergence of type I restriction modification system-negative emm1 type *Streptococcus pyogenes* clinical isolates in Japan

Okada R¹, Matsumoto M, Zhang Y¹, Isaka M¹, Tatsuno I¹, Hasegawa T¹

¹Department of Bacteriology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica 122(10): 914-921, 2014

Streptococcus pyogenes emm1 type is the dominant cause of streptococcal toxic shock syndrome (STSS) in Japan and many other developed countries. Recently, the number of STSS patients in Japan was reported to be increasing. Hence, we analyzed the *S. pyogenes* clinical isolates detected in Japan

after 2005. We found that the regions encoding the Spy1908–1910 two-component regulatory system and the adjacent type I restriction modification system were deleted in some emm1 type isolates. The isolates with the deletion were detected only in the emm1 strains that were isolated

between 2010 and 2013, but not before 2010. Twenty-six of 46 (56.5%) *emm1* type isolates were isolated in 2010–2013, and among these isolates, five of seven (71.4%) *emm1* type STSS isolates were shown to have that deletion. PFGE and PCR analysis for the presence of several pyrogenic exotoxin-related genes suggested that the *emm1* isolates with and without the

deletion shared the same genetic background. The *emm1* isolates with the deletion could incorporate exogenous plasmids by experimental electroporation transformation far more efficiently. These results suggested that the novel *emm1* isolates have occupied a fairly large part of total *emm1* isolates.

インフルエンザ診断マニュアル（第3版）

中村一哉¹、藤崎誠一郎¹、白倉雅之¹、高下恵美¹、中内美名¹、高山郁代¹、影山努¹、小田切孝人¹、長野秀樹²、高橋雅輝³、林志直⁴、川上千春⁵、小淵正次⁶、加瀬哲男⁷、岡山文香⁸、山下育孝⁹、千々和勝己¹⁰、喜屋武向子¹¹、安井善宏、皆川洋子

¹国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター、²北海道立衛生研究所、³岩手県環境保健研究センター、⁴東京都健康安全研究センター、⁵横浜市衛生研究所、⁶富山県衛生研究所、⁷大阪府立公衆衛生研究所、⁸堺市衛生研究所、⁹愛媛県立衛生環境研究所、¹⁰福岡県保健環境研究所、¹¹沖縄県衛生環境研究所

病原体検出マニュアル， 2014

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Influenza2014.pdf>

岡崎市におけるノロウイルス遺伝子型の6年間の特徴 - 2007年4月～2013年3月 -

中根邦彦¹、小林慎一

¹岡崎市保健所

感染症学雑誌 88(6): 875-877, 2014

2007年4月から2013年3月までの6年間に岡崎市で発生したノロウイルス(NoV)集団感染51事例から検出されたgenogroupII NoV (GII NoV) の遺伝子型を解析した。その結果、51事例中、GII.4が37事例(72.5%)と大勢を占め、次いでGII.6が4事例(7.8%)、以下GII.2、GII.12、

GII.13、GII.3、GII.6、GII.11の順であった。また、GII.4の変異型解析では、調査期間内に2006b、2008a、2008b、2009a及びSydney 2012を検出したが、主流な変異型は2006bからSydney 2012へと変遷していた。

市中感染型 MRSA の分子疫学的調査 - 市販流通食肉がその感染媒体である可能性の検討 -

緒方喜久代^{1,2}、成松浩志²、鈴木匡弘、樋口渉³、山本達男³、谷口初美²

¹大分県衛生環境センター、²産業医科大学、³新潟大学

産業医科大学雑誌 36(3): 179 - 190, 2014

黄色ブドウ球菌は、食中毒や院内感染型 MRSA (hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA)) の起炎菌として公衆衛生上重要な位置を占めてきた。加えて近年、市中感染型 MRSA (community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)) の増加が問題になっている。しかし、その感染源は明らかにされておらず、疫学情報の報告も少ない。本稿では、市中における MRSA の汚染状況を把握するため、大分県

下で流通する市販食肉 305 検体と下痢症患者便 1,543 検体を対象に、黄色ブドウ球菌ならびに MRSA の分離を試みた。黄色ブドウ球菌は 301 株分離され、うち MRSA は 18 株 (鶏肉 2 株、豚肉 1 株、鴨肉 1 株、下痢症患者便 14 株) で、すべて Panton-Valentine leucocidin 遺伝子陰性であった。これら MRSA 株の性状比較ならびに分子遺伝学的疫学解析を行い、市販流通食肉が CA-MRSA の来源の一つとして伝播拡大に関与している可能性を明らかにした。

複数の分離・検出法を併用した食品中残留農薬の多成分系統分析 (講座)

上野英二、井上知美

食品衛生学雑誌 55(4) : J-121-J-128, 2014

食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度の導入に伴い、広範の農薬成分の一斉分析を可能とする四重極型の質量分析計を装備した GC-MS 及び LC-MS が普及している。さらに、平成 20 年 1 月に発覚した中国製冷凍ギョーザに混入されたメタミドホスによる中毒事案もあって、生鮮食品だけでなく、複雑な成分で構成される加工食品中の微量農薬の一斉分析を可能とするために、より選択的で高感度なタンデム型質量分析計を装備した GC-MS/MS 及び LC-MS/MS が普及してきている。しかし、分析対象となる農薬

成分は、物理的・化学的にさまざまな性質を有する物質群であるうえに、複雑なマトリックスの中から微量の農薬成分を分離して定性・定量することは、GC-MS/MS や LC-MS/MS をもってしても決して容易なことではない。そこで、第一選択となる GC-MS(/MS) 及び LC-MS(/MS) に加えて、選択型検出器付き GC や HPLC、さらに、複数の分離カラムを併用した多成分系統分析法の有用性などについて具体的な応用例を挙げながら解説するとともに、分析上のノウハウについても併せて紹介した。

LC-MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価

上野英二、渡邊美奈恵、梅村優子、井上知美、猪飼誉友

食品衛生学雑誌 55(6) : 290-296, 2014

LC-MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析法について、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従って評価を行った。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 により精製し、さらに、シリカゲル/PSA 連結 SPE により精製して Scheduled MRM 及び ESI ポジティブ/ネガティブスイッチングモードを組み合

わせた LC-MS/MS により測定した。5 種類の農産物、122 種類の農薬成分を対象にして添加濃度 0.01 $\mu\text{g/g}$ 及び 0.1 $\mu\text{g/g}$ で、分析者 1 名が 1 日 2 併行で 5 日間の枝分かれ試験を行って、真度（回収率）、併行精度及び室内精度を求めた。その結果、両濃度でガイドラインに示されている目標値を満たした農薬成分は、農産物 5 種類ともに 121 種類であった。

編集情報運営委員会

委員長 : 今井 隆太 (研究監)
委員 : 井村 守邦 (総務課)
広瀬かおる (企画情報部)
中村 瑞那 (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)
長谷川晶子 (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)
金涌 えり (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第 65 号

平成 27(2015)年 3 月 発行

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6

愛知県衛生研究所

所長 皆川洋子

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

電話 : ダイヤルイン

所長 052-910-5604

次長 052-910-5683

研究監 052-910-5684

総務課 052-910-5618

企画情報部長
健康科学情報室 052-910-5619

生物学部長 052-910-5654

ウイルス研究室 052-910-5674

細菌研究室 052-910-5669

医動物研究室 052-910-5654

衛生化学部長 052-910-5638

医薬食品研究室 052-910-5639

生活科学研究室 052-910-5643

FAX : 052-913-3641

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

Published by

AICHI PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH

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

(この刊行物は再生紙を使用しています)