

愛知県衛生研究所報

第 69 号 平成 31 年 3 月

目 次

調査研究

愛知県の結核菌の遺伝子型別に基づく県内状況の分析	1
中村瑞那、青木美耶子、長瀬智哉、垣添寛和、山田和弘、續木洋一、鈴木匡弘 ¹ 、 松本昌門、鈴木裕子、皆川洋子 ¹ (現所属)藤田医科大学医学部微生物学講座	
愛知県で検出されたデングウイルスの分子疫学解析	10
齋藤典子、齋藤友睦、廣瀬絵美、中村範子、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、 松本昌門、皆川洋子	
制限酵素 XbaI 消化 <i>Salmonella</i> Narashino 遺伝子断片の パルスフィールドゲル電気泳動法による菌株識別能	20
山田和弘、四本信輔、中根衣久美、高橋佑太、續木洋一、松本昌門、皆川洋子	
LC/Q-TOF-MS による強壮用健康食品中の医薬品成分分析法の検討	25
舘 昌彦、小林俊也、富田浩嗣、棚橋高志、渡邊美奈恵、小池恭子	
体積計の使用に伴い生じる誤差について	34
加藤千佳、猪飼誉友 ¹ 、棚橋高志、小池恭子 ¹ (現所属)中部大学応用生物学部	
他誌掲載論文抄録	42

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

Volume 69, March 2019

Contents

Original Papers

Analysis of the database using VNTR typing method for Molecular epidemiology
of *Mycobacterium tuberculosis* in Aichi Prefecture1

Mizuna Nakamura, Miyako Aoki, Tomoya Nagase, Hirokazu Kakizoe,
Kazuhiro Yamada, Hirokazu Tsuzuki, Masahiro Suzuki¹, Masakado Matsumoto,
Hiroko Suzuki, Hiroko Minagawa

¹ Present affiliation: Department of Microbiology, Fujita Health University

Molecular epidemiological analysis of dengue virus detected in Aichi Prefecture
.....10

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

Discriminatory power of pulsed-field gel electrophoresis for chromosomal
fragments of *Salmonella* Narashino by using digestion of restriction enzyme XbaI
.....20

Kazuhiro Yamada, Shinsuke Yotsumoto, Ikumi Nakane, Yuta Takahashi,
Hirokazu Tsuduki, Masakado Matsumoto, Hiroko Minagawa

Evaluation of a newly-developed detection method using liquid chromatography/
quadrupole-time of flight mass spectrometry for medicinal ingredients in so-called
health food products advertised as enhancing male sexual performance
.....25

Masahiko Tachi, Shunya Kobayashi, Koji Tomita, Takashi Tanahashi,
Minae Watanabe, Yasuko Koike

Measurement error observed when using a volumeter34

Chika Katou, Yoshitomo Ikai¹, Takashi Tanahashi, Yasuko Koike

¹ Present affiliation: College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

Summaries of papers accepted to other journals42

調 査 研 究

愛知県の結核菌の遺伝子型別に基づく県内状況の分析

中村瑞那、青木美耶子、長瀬智哉、垣添寛和、山田和弘、續木洋一、鈴木匡弘¹、
松本昌門、鈴木裕子、皆川洋子

¹(現所属)藤田医科大学医学部微生物学講座

要 旨

結核菌の感染源及び感染経路等の究明を目的として、2016年9月より愛知県結核菌の遺伝子型別検査事業が開始された。愛知県の患者から分離された結核菌684株を対象に12領域(JATA12)のVNTR解析を実施したところ、258株(37.7%)が計67クラスターを形成した。データベースを分析したところ、12領域完全一致もしくは一領域のみ不一致であった検体間に疫学的関連を有する事例が7例見つかった。そのほか、薬剤耐性及び患者の出身国について、VNTR型との関連性が推測される事例が見つかった。VNTR解析は実地疫学調査に科学的裏付けを与えるものであり、効果的な結核対策、ひいては結核患者減少に結びつくものと期待される。

キーワード：結核、VNTR、*Mycobacterium tuberculosis*、実地疫学調査

序 文

結核は結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)による感染症であり、世界的に公衆衛生上の重要な問題となっている。2017年には世界で1,000万人の新たな結核患者が報告され、127万人が結核を原因として死亡していると推計されており、結核は世界的な死亡原因トップ10の一つとされている¹⁾。日本における結核患者発生報告は近年減少傾向にあるものの、2017年には16,789人の新たな結核患者が報告されており、罹患率(人口10万対)は13.3と結核中蔓延国(罹患率10以上)に位置づけられている²⁾。2017年の愛知県(名古屋市を除く)の罹患率は12.6²⁾と全国よりやや低いものの10を超えており、全国・県ともに他の先進諸国の罹患率(アメリカ:3.1、カナダ:5.5、オーストラリア:6.8、ドイツ7.5)と比べて高い状態が続いている¹⁾。

厚生労働省は「結核に関する特定感染症予防指針³⁾」を2016年11月に一部改正し、2020年までに日本を結核低蔓延国(罹患率10以下)とする目標を掲げた。また本指針では2011年5月の一部改正時に構築の必要性が明記された「分子疫学的手法からなる病原体サーベイランス」が、2016年の一部改正において、「地方自治体は結核菌が分離された全ての結核患者について結核菌を収集し、その検査結果を積極的疫学調査、発生動向の把握及び分析並びに対策の評価に用いるよう努める」ものと更に追記された。

こうした状況を踏まえ、愛知県では2016年9月から「愛知県結核菌の遺伝子型別検査事業」を実施している。本事業では、愛知県[名古屋市及び中核市(豊田市、豊橋市、岡崎市)を除く]の結核患者から分離された結核菌株を網羅的に収集し、VNTR

(Variable Numbers of Tandem Repeats) 法による解析を実施して、実地疫学調査と VNTR 解析結果を結び付けたデータベースの構築・分析を行っている。

VNTR 法は、結核菌 DNA に存在する反復配列のコピー数の比較に基づき菌株の異同を判定する方法である。標的となる VNTR 領域は多数存在するが、北京型が多く分離される日本では JATA12 領域の検査が遺伝子型別に適しているとして普及が進められており⁴⁾、愛知県ではこの JATA12 領域の検査を行って VNTR 解析を実施している。

本稿では、2016 年 9 月から 2018 年 8 月までに生物学部細菌研究室（以下、細菌研究室）において VNTR 解析が実施された菌株について、企画情報部で県内状況の分析を行った結果を報告する。

方 法

1. 供試菌株

愛知県（名古屋市、中核市を除く）12 保健所に登録された結核菌陽性患者について、医療機関または検査機関において分離、培養された検体を収集して網羅的に分析した。本稿では、2016 年 9 月から 2018 年 8 月までに愛知県 12 保健所より検査依頼があり、細菌研究室において VNTR 解析が実施された検体 684 件を対象とした。

2. VNTR 解析

供試菌株からの DNA 抽出及び PCR は、前

田ら⁵⁾及び結核菌 VNTR ハンドブック⁶⁾に従い、細菌研究室において実施した。得られた PCR 産物をキャピラリー電気泳動（QIAxcel Advanced、QIAGEN、ドイツ）又はアガロース電気泳動により分析し、JATA1 から JATA12 の 12 領域について反復数を算定した。

3. データベースの分析

愛知県 12 保健所による実地疫学調査結果と、細菌研究室による VNTR 解析を合わせたデータベースを、企画情報部で作成した。患者の疫学情報のうち登録年月日、年齢、性別、学会分類、喀痰塗抹菌量、薬剤耐性及び出生国は、感染症サーベイランスシステム内「結核登録者情報システム」に登録された患者情報（登録時履歴）を使用した。さらに、「愛知県結核菌の遺伝子型別検査事業実施要領」に基づき愛知県 12 保健所から衛生研究所に報告された、その他の疫学情報（患者が利用した福祉施設等）も活用した。

結 果

1 分析対象患者の特徴

VNTR 解析が実施された 684 株について、患者の性別・管轄保健所別件数を表 1 に、性別・年齢階級別件数を表 2 に示した。なお、患者の登録年月日は 2014 年 3 月～2018 年 6 月の範囲（2014 年 1 件、2015 年 2 件、2016 年 273 件、2017 年 353 件、2018 年 55 件）で

表1 性別、管轄保健所別VNTR解析実施件数

	一宮	瀬戸	半田	春日井	豊川	津島	西尾	江南	新城	知多	清須	衣浦東部	計
男	57	63	27	51	33	41	14	24	6	26	25	47	414
女	36	28	20	36	22	24	11	16	0	38	7	32	270
計	93	91	47	87	55	65	25	40	6	64	32	79	684

表2 性別、年齢階級別VNTR解析実施件数

	検査実施数	年齢階級別（年齢不詳である4件を除く）									
		0～14歳	15～19歳	20代	30代	40代	50代	60代	70代	80代	90代-
男	414	1 (0.2%)	6 (1.4%)	22 (5.3%)	12 (2.9%)	29 (7.0%)	25 (6.0%)	43 (10.4%)	103 (24.9%)	134 (32.4%)	38 (9.2%)
女	270	2 (0.7%)	1 (0.4%)	20 (7.4%)	19 (7.0%)	18 (6.7%)	7 (2.6%)	15 (5.6%)	44 (16.3%)	84 (31.1%)	57 (21.1%)
計	680	3 (0.4%)	7 (1.0%)	42 (6.2%)	31 (4.6%)	47 (6.9%)	32 (4.7%)	58 (8.5%)	147 (21.6%)	218 (32.1%)	95 (14.0%)

あった。

このうち外国生まれの患者は73名(10.7%)であり、出生国別ではフィリピンが31名と最も多かった(表3)。

2 探知されたクラスター形成状況

12領域VNTR型が完全一致した検体群を同一クラスターと定義して解析を行ったと

ころ、258株(37.7%)が計67クラスターを形成した(表4)。それぞれのクラスターを形成する患者数は多い順に35名、10名(3クラスター)、9名、8名(3クラスター)、6名(2クラスター)、5名(2クラスター)、4名(6クラスター)、3名(16クラスター)、2名(33クラスター)であった。

図1に、年齢層ごとのクラスター形成率を示した。50代のクラスター形成率が最も高く、50%を超えていた。

表3 外国出生者の

出生国別VNTR解析実施件数

出生国	患者数
フィリピン	31
ベトナム	10
中国	9
インドネシア	6
ネパール	4
ミャンマー	4
タイ	2
ブラジル	2
その他	5
計	73

3 関連性が推測された事例

(1) 疫学的関連性が推測された事例

同一クラスターに属する患者または12領域のうち1領域を除いて全て一致した患者について、疫学的関連性が見られた7事例を表5に示した。親子が4事例、共通の福祉施設使用が2事例、同胞が1事例であった。また、これらすべての事例において、登録年月が遅い者は接触者検診によって発見されていた。

表4 クラスターのVNTR型とクラスター形成患者数 (形成患者数の多い順)

クラスター番号	VNTR型 (JATA No.)												クラスター形成患者数				合計			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	登録年							
													2014-2015	2016	2017	2018				
AJ001	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	1	18	13	3	35			
AJ002	4	3	4	3	6	3	7	4	5	7	8	3		7	3		10			
AJ017	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	5		2	7	1	10			
AJ012	4	3	3	3	3	3	6	4	3	7	7	4		2	6	2	10			
AJ006	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5		3	5	1	9			
AJ007	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5		4	3	1	8			
AJ020	4	3	4	3	5	3	7	4	5	7	8	3		3	2	3	8			
AJ019	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	3		2	5	1	8			
AJ003	3	3	3	4	11	3	7	5	5	7	2	5	1	2	1	2	6			
AJ038	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2		1	4	1	6			
AJ005	4	3	3	3	6	3	7	4	5	8	8	5		4	1		5			
AJ018	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	≥10	5		3	2		5			
AJ004	4	3	3	3	6	3	7	4	5	7	8	5		3	1		4			
AJ009	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	7	4		2	2		4			
AJ015	2	2	2	3	N.D.	2	6	4	3	11	7	3		2	2		4			
AJ022	4	1	3	2	7	4	7	4	5	7	8	3		2	2		4			
AJ026	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	3	3		1	2	1	4			
AJ042	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	7	5		1	2	1	4			
クラスター形成患者数が3以下の49クラスター合計													44	60	10	114				
(N.D. : 検出せず)												全67クラスター合計 (クラスター形成率)				2 (67%)	106 (39%)	123 (35%)	27 (49%)	258 (38%)
												検査総数				3	273	353	55	684

(2) クラスタにおいて薬剤耐性が一致した事例

クラスタ-AJ011 を形成した 3 検体は全てストレプトマイシン (SM) 耐性であった (表 6)。この 3 件の疫学的関連性は不明であったが、いずれの患者も居住地は尾張西部であった。

(3) フィリピン出生者において VNTR 型の偏りがみられた事例

出生国がフィリピンである患者 31 件について、VNTR 型の偏りが観察された。一致する領域が最も多くなる VNTR 型 (1-4-9-3-8-1-2-4-4-7-7-2) を基準として全件を比較したところ、違いが 1 領域以内となる検体が 12 件 (38.7%)、違いが 2 領域以内となる検体が 23 件 (74.2%) となった (表 7)。

なお、出生国がフィリピンではない患者 653 名由来の菌株において同様の VNTR 型を基準として比較すると、違いが 1 領域または 2 領域以内となる検体は 7 件 (1.1%) であった。この 7 名のうち 1 名は、フィリピン出身者の配偶者であった (患者自身の出生国は日本)。

考 察

結核の伝播予防及び感染者の早期発見には、探知された結核患者における感染経路の特定が重要となる。患者由来菌株の VNTR 解析に基づく患者間の関連性の推測は、患

者に対する聞き取り調査による感染経路の推定に対し客観的かつ科学的な根拠を与え、また実地疫学調査のみでは判明しなかった未知の感染経路の特定にも繋がるものである。

今回の分析により判明した、7 組の親子間感染等の患者同士の関連性を示唆する事例は、保健所による実地疫学調査結果に VNTR 解析が科学的裏付けを賦与できた例と考えている。さらに全ての事例で登録年月が遅い者が接触者検診によって発見されていることは、保健所による接触者検診の有用性を改めて示す結果となった。また、7 事例のうち 3 事例において VNTR 型が 1 領域異なっていたことから、VNTR 型が 1 領域のみ異なる検体であっても疫学的関連性を分析すべきであると考えられた。

一方、保健所から疫学的関連が報告された患者であっても VNTR 型が大きく異なっている事例も複数見つかっている。これらの事例では、VNTR 解析が他の感染経路の推定に繋がる契機となることが期待される。

そのほか、クラスタ-AJ011 は 3 件すべて SM 耐性であること、フィリピン出生者に VNTR 型の偏りが見られることといった興味深い現状が確認されたことも、本事業の有効性の一端を示す結果であるといえる。なお、フィリピン ラグナ州の患者から分離された 116 株の MIRU (Mycobacterial Interspersed

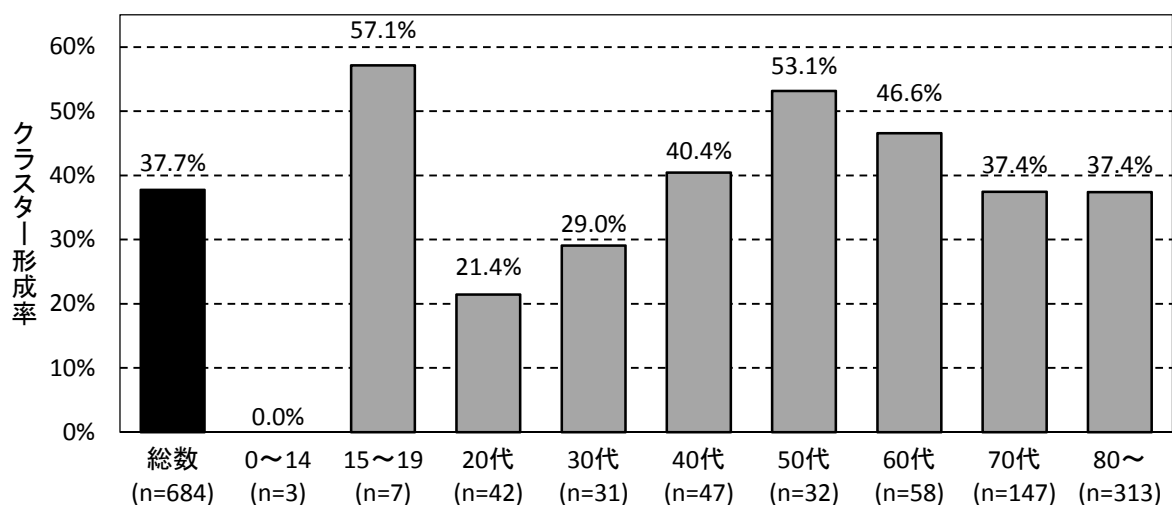


図 1 年齢層別クラスタ形成率
(年齢層別グラフは、年齢不詳の 4 例を除く)

表5 クラスタを形成した患者または12領域のうち1領域以外が一致した患者のうち疫学的関連性が確認された7事例

登録年月	管轄保健所	年齢	性別	学会分類	喀痰塗抹	薬剤耐性	疫学的関連性	VNTR型 (JATA No.)												クラスタ番号
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
◆事例①																				
2015.10	A	80	男	bII3	2+	感受性	親子	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	AJ001
2016.02	A	49	男	bIII1	±	感受性		3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	AJ001
◆事例②																				
2016.04	A	40	男	bIII2	3+	感受性	親子	3	5	2	1	2	3	1	2	3	≥15	8	4	—
2016.07	B	69	女	bIII1	±	感受性		3	5	2	1	2	3	1	2	3	14	8	4	—
◆事例③																				
2016.06	C	70	男	bIII3	1+	感受性	共通の福祉施設	3	3	3	4	11	3	7	5	5	7	2	5	AJ003
2017.05	C	78	男	rIII2	1+	感受性		3	3	3	4	11	3	7	5	5	7	2	5	AJ003
◆事例④																				
2016.07	A	25	男	bIII1	—	感受性	親子	2	3	7	3	5	3	7	2	4	15	9	4	—
2018.02	A	54	男	bII2	1+	感受性		3	3	7	3	5	3	7	2	4	15	9	4	—
◆事例⑤																				
2016.10	D	78	女	rII1	3+	感受性	同胞	2	3	2	3	5	3	5	2	5	10	9	4	AJ061
2017.11	E	68	男	rIII1	1+	感受性		2	3	2	3	5	3	5	2	5	10	9	4	AJ061
◆事例⑥																				
2017.01	F	88	女	bII2	2+	感受性	共通の福祉施設、夫婦	4	1	3	2	6	4	9	4	5	7	6	4	—
2017.08	F	95	男	III1	—	感受性		4	1	3	2	6	4	9	4	5	7	6	5	—
◆事例⑦																				
2017.05	G	81	男		陽性	感受性	親子	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	AJ001
2017.09	G	49	男	III1	—	感受性		3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	AJ001

(薬剤耐性は、イソニアジド (INH)、リファンピシン (RFP)、ストレプトマイシン (SM) 及びエタンブトール (EB) の検査結果を示す。)

網掛けは、VNTR型が不一致である領域を示す。

管轄保健所はアルファベットに置き換えて掲載。

表6 クラスタ-AJ011の個別情報

登録年月	管轄保健所	年齢	性別	学会分類	喀痰塗抹	薬剤耐性	疫学的関連性	VNTR型 (JATA No.)												クラスタ番号
								1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
2016.07	H	60	男	III1	±	SM	不明	4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	AJ011
2016.08	I	20	女	bIII2	2+	SM		4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	AJ011
2016.11	H	73	男	rII1		SM		4	3	4	3	8	3	7	4	5	7	8	3	AJ011

(薬剤耐性は、イソニアジド (INH)、リファンピシン (RFP)、ストレプトマイシン (SM) 及びエタンブトール (EB) の検査結果を示す。)

管轄保健所はアルファベットに置き換えて掲載。

表7 出生国がフィリピンである患者31件の個別情報

登録年月	管轄保健所	年齢	性別	学会分類	喀痰塗抹	薬剤耐性	VNTR型 (JATA No.)												VNTR型が基準と異なる領域数		
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
2017.03	B	31	女	bII2	1+	感受性	1	4	9	3	8	1	2	4	4	7	7	2	AJ047	0	
2016.05	C	20	女	rIII1	1+	感受性	1	4	9	3	8	1	2	4	4	7	6	2	AJ037		
2016.10	C	19	男	rII2	±	感受性	1	4	7	3	8	1	2	4	4	7	7	2	—		
2016.12	J	33	男	lIII1	—	感受性	1	4	9	3	5	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.01	D	16	男	bII2	±	感受性	1	4	10	3	8	1	2	4	4	7	7	2	AJ032		
2017.01	K	36	女	rII1	—	感受性	1	4	≥11	3	8	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.03	K	42	女	bIII2	—	感受性	1	1	9	3	8	1	2	4	4	7	7	2	—	1	
2017.04	C	60	男	bIII2	2+	感受性	1	4	10	3	8	1	2	4	4	7	7	2	AJ032		
2017.06	G	15	男	rII1	—	感受性	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	AJ038		
2017.08	H	31	女	bII3	±	感受性	1	4	6	3	8	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.10	E	27	女	lIII1	—	感受性	1	4	9	3	9	1	2	4	4	7	7	2	AJ038		
2018.02	B	33	女	O	—	感受性	1	4	9	3	6	1	2	4	4	7	7	2	—		
2016.08	H	33	女	bIII1	±	INH, SM	1	4	9	3	7	1	2	4	4	7	6	2	—		
2016.09	L	64	女	bII2	1+	感受性	1	4	7	3	7	1	2	4	4	7	7	2	—		
2016.11	I	29	女	lIII1	—	感受性	1	4	7	3	N.D.	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.01	E	19	男	bII1	2+	感受性	1	4	6	3	6	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.04	G	25	女	rIII1	—	感受性	1	4	9	3	9	1	2	4	4	3	7	2	—	2	
2017.04	A	30	男	rIII2	—	感受性	0	4	7	3	8	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.05	F	26	男	lIII1	—	感受性	1	4	8	3	9	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.08	B	57	男	bIII2	—	感受性	0	4	9	3	6	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.09	B	42	女	rIII1	2+	感受性	1	4	5	3	8	1	2	4	4	7	5	2	—		
2017.11	H	40	女	lII1	±	感受性	1	4	9	3	10	1	2	4	4	7	6	2	—		
2018.03	H	18	女	rIII1	±	感受性	1	4	7	3	9	1	2	4	4	7	7	2	—		
2016.02	F	14	女	bII2	2+	INH	1	4	9	3	9	2	2	4	4	7	4	2	—		
2016.08	E	33	女	lII1	—	感受性	1	4	8	3	9	1	2	4	4	8	7	2	—		
2017.02	K	29	女	rII2	1+	感受性	1	4	10	3	7	1	2	4	4	6	7	2	—		
2017.10	K	31	女	bIII1	1+	感受性	0	4	≥11	3	9	1	2	4	4	7	7	2	—		
2017.09	L	28	女	O	—	感受性	1	4	8	3	7	1	2	4	4	3	7	6	2	—	4
2016.02	H	47	女	rIII1	—	感受性	2	3	1	3	4	2	5	4	3	12	4	3	—	10	
2016.09	F	26	男	rIII1	—	感受性	4	3	N.D.	3	3	3	6	4	3	10	5	3	—		
2017.06	H	37	男	bII2	3+	INH, RFP, EB	2	2	2	1	3	2	5	2	3	12	7	3	—	11	

*クラスターAJ032はこの表に示す2件のみから成るクラスターである。

AJ037は2件、AJ038は6件、AJ047は3件から成るクラスターであり、いずれもこの表に示されていない患者（出生国がフィリピンではない患者）を含む。（薬剤耐性は、イソニアジド（INH）、リファンピシン（RFP）、ストレプトマイシン（SM）及びエタナブトール（EB）の検査結果を示す。網掛けは、基準としたVNTR型と一致しない領域を示す。N.D.：検出せず。管轄保健所はアルファベットに置き換えて掲載。）

Repetitive Units) 12 領域による VNTR 解析報告⁷⁾と、本稿のフィリピン出生者の VNTR 解析結果(表 7)とを、MIRU12 と JATA12 に共通する 8 領域(JATA No: 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 12)において比較したところ、JATA No. 12 ではコピー数 1 の株が 96.6% と、コピー数 2 が 90.3% を占める本稿とは異なっていた。しかし他の 7 領域については、本稿のフィリピン出生者の VNTR 型と同様の傾向がみられ、表 7 で基準とした VNTR 型と比較して 7 領域のうち違いが 1 領域以内となる株が 35.3%、2 領域以内となる株が 75.9% であった(同様の 7 領域で本稿の出生国がフィリピンではない患者由来株と比較した場合は、違いが 1 領域以内となる株が 1.1%、2 領域以内となる株が 1.7%)。さらに静岡県 JATA12 による VNTR 解析においてもフィリピン国籍患者由来の計 8 株で本稿と同様の偏りが観察されており⁸⁾、フィリピンにおいて一定の流行がみられる型と推測される。

一方、クラスターを形成した患者は 258 株(37.7%)に及んだにも関わらず、疫学的関連性が明らかでない事例が大半を占めている。この理由は、①疫学的関連性はあるが保健所による聞き取り調査では特定できなかった場合、②VNTR 解析の識別能の限界により異なる菌株が同一遺伝子型と判定された場合、の二つの可能性が考えられる。①の場合、さらに詳細に踏み込んだ疫学調査によって未知の感染経路が判明する可能性があり、実際に他の自治体においては VNTR 解析の結果から新たな感染経路が判明した事例も複数報告されている⁴⁾。しかしながら今回の分析では、クラスターを形成したが疫学的関連性が不明であった患者は 200 名を超えており、その全てにおいて追加の疫学調査を実施することは人的労力等を考慮すると容易ではない。②に関しては、解析領域数を追加することで回避できる場合が多いとされる⁴⁾。今回、当県における 12 領域の解析でのクラスター形成率は 37.7% となったが、他の自治体における網羅的分析でのクラスター形成率は、24 領域の解析で 3 割未満^{9),10)}、19 領域の解析では

31.8%との報告があり¹¹⁾、解析領域の追加によって更なる疫学調査を実施すべき患者を絞れる可能性は高い。加えて、疫学的リンクが判明している患者間の感染源調査には JATA12 の比較のみで十分な議論ができるとされる一方、サーベイランス調査の場合には解析領域の追加によって識別能を高める必要性が指摘されている現状がある¹²⁾。クラスター形成率は患者の年齢層が若いほど高いとの報告¹⁰⁾が愛知県においては当てはまらなかったことも、分解能の不足が影響している可能性がある。以上より、愛知県においても未知の伝播経路の調査を目標として、必要に応じた追加領域検査の体制整備が望まれる。

また、JATA12 領域は結核の分子疫学調査に取り組む各自治体に共通して検査領域として採用されているため、愛知県内の状況分析のみならず、将来的には自治体間の比較検討にも用いられることが期待される。例えば今回の分析で最大のクラスターとなった AJ001 は、北海道¹³⁾、阪神地域¹⁴⁾、徳島県¹⁵⁾、宮崎県¹⁶⁾からも高い頻度の検出が報告されており、日本の広範囲に分布している可能性が示唆される。今後、名古屋市や愛知県内中核市、更に他県とも情報共有を図ることで、より有用な成果が得られる可能性は高い。

愛知県における VNTR 検査事業の開始からまだ 2 年であるが、医療機関や検査機関の協力のもと、各保健所による菌株収集と疫学調査、細菌研究室における VNTR 解析の結果、既に約 700 事例の興味深いデータが蓄積されている。実地疫学調査と VNTR 解析を合わせることによって得られる公衆衛生上の利益としては、集団感染事例の追跡、新たな感染リスク集団の探知などが挙げられる⁴⁾。今後も保健所と衛生研究所の連携体制を保ち、データベースの蓄積と解析を続けることで、結核対策がより有益なものとなること、ひいては県内の結核患者減少に寄与することを目指したい。

謝 辞

結核菌遺伝子型別検査事業に関わる各医

療機関及び各検査機関、愛知県保健所、愛知県健康対策課の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) World Health Organization (WHO): Global tuberculosis report 2018. 2018.
- 2) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター: 2017年結核年報. 2018.
- 3) 結核に関する特定感染症予防指針(平成19年厚生労働省告示第72号, 平成28年11月25日最終改正)
- 4) 公益財団法人結核予防会結核研究所: 結核分子疫学調査の手引き 第一版. 2017.
- 5) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原勇, 加藤誠也: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム-JATA(12)-VNTR分析法の実際-. 結核 83(10):673-678, 2008.
- 6) 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編: 結核菌 VNTRハンドブック. 2012.
- 7) Montoya JC, Murase Y, Ang C, Solon J, Ohkado A: A molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* among Filipino patients in a suburban community in the Philippines. 結核 88(6):543-552, 2013.
- 8) 八木美弥, 道越勇樹, 飯田奈都子, 高橋奈緒美, 廣井みどり, 柴田真也, 西尾智裕, 神田 隆, 杉山寛治: 県内における結核菌の VNTR 法による分子疫学調査. 静岡県環境衛生科学研究所報告 54:21-23, 2011.
- 9) Seto J, Wada T, Suzuki Y, Ikeda T, Mizuta K, Yamamoto T, Ahiko T: *Mycobacterium tuberculosis* transmission among elderly persons, Yamagata Prefecture, Japan, 2009-2015. *Emerging Infectious Diseases* 23(3):448-455, 2017.
- 10) 瀬戸順次, 阿彦忠之, 和田崇之, 長谷篤, 山田敬子: 結核低蔓延地域における網羅的な結核菌反復配列多型(VNTR)分析の有用性. 結核 88(6):535-542, 2013.
- 11) Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, Kawakami Y: Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 47(10):3340-3343, 2009.
- 12) 地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編: 結核菌 VNTR ハンドブック(追補版). 2014.
- 13) 小川恵子, 渡邊涼太, 森本 洋: 北海道における結核菌の VNTR 型別結果報告(2014~2016年度). 北海道立衛生研究所報 67:109-114, 2017.
- 14) 和田崇之, 田丸亜貴, 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 小向 潤, 松本健二, 長谷 篤: 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基盤構築-JATA(12)-VNTR 型別に基づくクラスター形成とその傾向-. 結核 88(4):393-398, 2013.
- 15) 市原ふみ, 石田弘子, 嶋田啓司: 徳島県における VNTR 法を用いた結核菌 DNA 解析調査(2015). 徳島県立保健製薬環境センター年報 6:11-14, 2016.
- 16) 阿波野祥司, 福留智子, 山田 亨, 萩平敦朗, 元明秀成: 県内結核菌の DNA 解析データベースを用いた分子疫学的研究. 宮崎県衛生環境研究所年報 27:68-72, 2016.

Analysis of the database using VNTR typing method for Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Aichi Prefecture

Mizuna Nakamura, Miyako Aoki, Tomoya Nagase, Hirokazu Kakizoe,
Kazuhiro Yamada, Hirokazu Tsuzuki, Masahiro Suzuki¹, Masakado Matsumoto,
Hiroko Suzuki, Hiroko Minagawa

¹ Present affiliation: Department of Microbiology, School of Medicine, Fujita Health University

In Aichi Prefecture, molecular epidemiological research project of *Mycobacterium tuberculosis* using variable-number tandem-repeat (VNTR) typing method started in September 2016, with the aim of identifying tuberculosis (TB) transmission. During 2016-2018, we performed a TB investigation in Aichi Prefecture, by analyzing in-depth contact tracing performed by health center personnel and VNTR typing data based on the Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)-12 optimized for *M. tuberculosis* strains.

As a result, 67 clusters formed by 258 (37.7%) of the 684 isolates were found. We confirmed 7 epidemiologic links based on the VNTR profiles of the relevant strains, which were either identical or single-locus variant among each link. Moreover, our results suggested that VNTR profiles may provide clues to suspect anti-mycobacterial drug resistance and the countries where patients were infected.

In conclusion, a combination of VNTR analysis and field epidemiological investigation is useful to identify chains of TB transmission, and to perform evidence-based TB control.

Key words : tuberculosis, VNTR, *Mycobacterium tuberculosis*,
field epidemiological investigation

調 査 研 究

愛知県で検出されたデングウイルスの分子疫学解析

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

要 旨

デングウイルス (Dengue Virus : DENV) はデング熱・デング出血熱の病因ウイルスで、当所も 2000 年以降、渡航歴のある患者検体からのウイルス検出を実施している。DENV 遺伝子を検出したデング熱患者由来 35 検体について DENV の分子疫学解析を行ったところ、東南アジア・東アジアにおける遺伝子型の変化を反映し、県内で検出された各血清型 (DEN-1 ~ DEN-4) の遺伝子型も変化していた。県内で検出された DENV 遺伝子の血清型別系統解析から県内への流入状況が把握でき、今後の流入監視に役立つ分子疫学情報が得られた。

同じ蚊によって媒介されるデング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症は臨床症状や感染地域情報からは鑑別が困難な事例もみられる。そこで、デング熱の紛れ込み実態を検討するため、チクングニア熱若しくはジカウイルス感染症疑い患者検体についても DENV 検出を試みたところ、DENV は検出されなかった。

キーワード： デングウイルス、分子疫学、蚊媒介ウイルス感染症

序 文

デングウイルス (Dengue Virus : DENV) はフラビウイルス科フラビウイルス属に属する節足動物媒介ウイルスで、ネッタイシマカやヒトスジシマカにより媒介される。近年、世界的に感染者が激増しており、毎年推定 3.9 億人が感染し、そのうち 9,600 万人が比較的軽症のデング熱、あるいは重症型のデング出血熱やデングショック症候群を発症する¹⁾。第二次世界大戦中から戦後にかけてわが国においてもデング熱の国内発生がみられたが、1946 年以降 2014 年まで約 70 年間報告がなかった。2014 年 8 月から 10 月に全国で 162 例、東京都内で 108 例が報告された²⁾が、その後 3 年間国内発生患者報告はなく、現在 DENV は定着していないと考えられる。なお、2014 年に本県からの国内発生患者報告はなかった。しかしヒ

トスジシマカは北海道以外の全国に生息しており、今後も国内感染の発生する素地はある。そのため、平時より DENV の分子疫学情報を蓄積して輸入症例を確実に把握するとともに国内感染発生に備える必要がある。

そこで本研究では、デング熱とともに近年本県からも患者報告のある蚊媒介輸入感染症のチクングニア熱、ジカウイルス感染症疑いで当所に搬入された検体について、デング熱の紛れ込みの有無を検討した。DENV はチクングニアウイルス (CHIKV)、ジカウイルス (ZIKV) と同じ蚊により媒介され、症状と流行地域もしばしば重複するため、臨床症状や問診のみによる鑑別は難しい場合がある。ウイルス遺伝子診断に基づく診断精度向上のため、デング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症の流行地域から入国した患者を対象に DENV 検出を試みた。

また、デング熱患者由来 DENV 遺伝子陽性検体について、血清型より詳細な疫学情報を得ることを目的に、DENV の Envelope (E) 遺伝子の分子疫学解析を実施した。

材料・方法

1. 検体

2011 年 6 月から 2018 年 11 月に積極的疫学調査等の目的で当所に搬入されたチクングニア熱・ジカウイルス感染症疑い患者 25 名のうち、CHIKV 及び ZIKV 遺伝子検査陰性だった 20 名から採取した 40 検体を紛れ込みの検討に用いた。また、DENV の分子疫学解析のため、DENV 陽性患者 40 名の 40 検体（患者 1 名あたり 1 検体）を用いた。

2. DENV の遺伝子検出

検体 200 μ L から High Pure Viral RNA Kit (Roche, Switzerland) を用いて最終溶出量 50 μ L で RNA を抽出し、国立感染症研究所のマニュアル³⁾に従い、リアルタイム RT-PCR 法にて DENV 遺伝子検出を行った。

3. DENV 遺伝子の分子系統樹解析

リアルタイム RT-PCR 法で遺伝子検出陽性だった検体から Domingo et al.⁴⁾の方法を参考に E 遺伝子領域を増幅後、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。この配列を ML 法 (Maximum-likelihood method: ML 法) を用いて分子系統樹を作成した。

また、検体採取日が 2008 年以降かつ 2018 年 11 月末までに DDBJ へ報告された 9 か国（カンボジア、インドネシア、マレーシア、ミャンマー、フィリピン、スリランカ、タイ、ベトナム、モルディブ）約 2,500 の塩基配列を系統解析に使用した。

結果

1. チクングニア熱・ジカウイルス感染症疑い症例からの DENV 遺伝子検出

蚊媒介ウイルス感染症の輸入例は国内で毎年報告されており、媒介蚊であるヒトスジシマカの分布域も広いことから、輸入例だけでなく県内での流行も想定したモニタリング、遺伝子診断精度の向上が求められている。

DENV、CHIKV、ZIKV は流行地域が重複し症状が似ていることから問診と臨床所見のみ

から鑑別することは難しい場合がある。そこで本研究では 2011 年 6 月から 2018 年 11 月に積極的疫学調査等の目的で当所に搬入されたチクングニア熱・ジカウイルス感染症疑い患者 25 名のうち、ZIKV 遺伝子検査陰性だった 20 名（CHIKV 遺伝子検査陰性は 0 名）から採取した 40 検体について DENV の紛れ込みを検証した。その結果、すべての検体で DENV 遺伝子は検出されなかった。

2. DENV の分子疫学解析

日本におけるデング熱感染者数は 2010 年ごろから増加し、年間 200 例前後が報告されている。推定感染国はインドネシア、フィリピンなどのアジア地域が 90~95% を占めており⁵⁾、渡航先の流行状況と日本からの渡航者数の多さを反映していると考えられる。そこで本研究では、アジア諸国における DENV 血清型及び遺伝子型分布と流入状況を把握するため分子疫学解析を行った。

2-1 相同性解析

DENV 遺伝子陽性であった 40 検体中 35 検体で E 遺伝子領域の塩基配列が得られた。これらの塩基配列と患者が滞在した国の 1999~2017 年の間に報告された塩基配列との相同性を調べた結果を表に示した（表 1）。解析した 35 例中 32 例は滞在先で報告されている配列との相同性が 98.9% 以上と高かったが、血清型 2 のカンボジア輸入例 (16102/2016) は滞在先で報告例のない Cosmopolitan 遺伝子型、血清型 3 のタイ輸入例 (18195・18197/2018) は報告例の極めて少ない遺伝子型 I であり、相同性が低かった (96.2%)。

2-2 分子系統学解析

35 検体から得られた E 遺伝子における分子系統学解析の結果を 1~4 の血清型別にそれぞれ図 1~4 に示した。なお、作図の都合上、系統解析結果の一部は割愛し非表示とした。

(1) 血清型 1

Goncalvez et al.⁶⁾の方法で遺伝子型 I、II、III、IV、V に分類し、本県の輸入症例は遺伝子型 I と IV に分類された（図 1）。遺伝子型 I に分類されたカンボジア輸入例 (12389/2013)、マレーシア輸入例 (14228/2014)、2 例のスリランカ輸入例 (14056/2014, 16127/2016)、

表1 2011年以降に検出されたDENV遺伝子の解析結果

血清型	遺伝子型	滞在国	検体名	滞在国の配列	相同性(%)		
1	Genotype I	カンボジア	Aichi (KHN) 12389/2013	KT824985/2012	99.9		
		マレーシア	Aichi (MYS) 14228/2014	MG894883/2015	99.8		
		スリランカ	Aichi (LKA) 14056/2014	KT445955/2012	99.8		
			Aichi (LKA) 16127/2016	KT825030/2014	99.8		
		タイ	Aichi (THA) 18258/2018	MG564080/2015	99.9		
		インドネシア	Aichi (IDN) 13379/2014	KT825052/2013	100		
			Aichi (IDN) 17051/2017	MG894861/2015	99.7		
	Genotype IV	フィリピン	Aichi (PHL) 12217/2012	MG894731/2012	99.8		
			Aichi (PHL) 14294/2015	AY422786/1999	98.9		
			Aichi (PHL) 15117/2015	MG894689/2011	99.3		
不明	フィリピン	12003/2012	×	—			
2	Asian I	フィリピン カンボジア タイ	Aichi (PHL/KHN/THA) 17349/2018	Cosmopolitan (2008~15) MG895100/2015 (カンボジア) MG895105/2015 (タイ)	— 99.7 99.5		
			Cosmopolitan	インドネシア	Aichi (IDN) 13146/2013	KM216693/2010	99.8
					Aichi (IDN) 14328/2015	MH178413/2016	99.9
	Aichi (IDN) 14332/2015	MH178413/2016			99.9		
	マレーシア	Aichi (MYS) 18610/2018		MG895063/2014	99.6		
	モルディブ	Aichi (MDV) 18519/2018		MG895091/2015	99.5		
		Aichi (MDV) 18528/2018					
	タイ (プーケット)	Aichi (THA) 18184/2018 Aichi (THA) 18193/2018		LC410191/2017	99.7		
	カンボジア	Aichi (KHN) 16102/2016	Asian I (2008, 09, 15, 16)	—			
			KX577705/2015 (中国)	99.9			
			Aichi (TWN/VNM/THA) 16205/2016	KX577705/2015 (中国)	100		
			台湾 ベトナム タイ	KT781567/2014 (ベトナム) MG895150/2016 (タイ)	99.9 100		
	不明	インドネシア	11159/2011	×	—		
		フィリピン	15181/2015	×	—		
	3	Genotype I	フィリピン	Aichi (PHL) 15164/2015	MG895248/2015	99.8	
				Aichi (PHL) 17139/2017	MG895268/2016	99.7	
Aichi (PHL) 17164/2017				MG895268/2016	99.5		
Aichi (PHL) 17301/2018				MG895190/2012	99.4		
Aichi (PHL) 18389/2018				KY495822/2016	99.7		
タイ (プーケット)			Aichi (THA) 18195/2018	KU509285/2010 (タイ)	96.2		
			Aichi (THA) 18197/2018	MG933850/2017 (ミャンマー)	99.9		
Genotype III		タイ	Aichi (THA) 13015/2013	KP176707/2012	100		
			Aichi (THA) 15171/2015	JF968098/2010	99.3		
		ミャンマー タイ	Aichi (MMR/THA) 15185/2015	KX357894/2015 (ミャンマー) KP176707/2012 (タイ)	99.0 99.8		
不明		インドネシア	17143/2017	×	—		
4	Genotype I	ミャンマー	Aichi (MMR) 17168/2017	KR051897/2013 (ミャンマー) MG933863/2017 (中国)	99.7 100		
			Genotype III	フィリピン	Aichi (PHL) 14295/2015	MG895347/2014	99.4
	Aichi (PHL) 15186/2015	MG895314/2012			99.0		
	Aichi (PHL) 15142/2016	MG895319/2012			99.2		
	不明	タイ	15294/2016	×	—		

タイ輸入例（18258/2018）、及びⅣに分類された3例のフィリピン輸入例（12217/2012、14294・15117/2015）は滞在先の報告例に近縁であった。なお、輸入例で最も多いのは血清型Ⅰであり、2014年の国内感染例（LC002828）も血清型Ⅰであった。

2010年以降、インドネシアの主要な遺伝子型がⅣからⅠへ変化しており⁷⁾、本県の2014年及び2017年のインドネシア輸入例（13379/2014、17051/2017）も遺伝子型Ⅰに分類された。

（2）血清型Ⅱ

Twiddy et al.⁸⁾の方法でAsianⅠ、AsianⅡ、Cosmopolitan、American、American/Asian遺伝子型に分類し、本県の輸入症例はAsianⅠ遺伝子型とCosmopolitan遺伝子型に分類された（図2）。インドシナ半島に位置するカンボジア、ミャンマー、タイ、ベトナムにおける2008～2018年の配列を解析したところ、AsianⅠ遺伝子型が優位であり（データ非表示）、この遺伝子型に分類された2018年のフィリピン・カンボジア・タイ輸入例（17349/2018）は滞在先の報告例に近縁であった。また、Cosmopolitan遺伝子型は海洋東南アジア（インドネシア、マレーシア、フィリピン他）や南アジア（インド、スリランカ他）で優位とされており⁹⁾、この遺伝子型に分類された3例のインドネシア輸入例（13146/2013、14328・14332/2015）、マレーシア輸入例（18610/2018）及び2例のモルディブ輸入例（18519・18528/2018）は滞在先の報告例に近縁であった。

ベトナムとタイでは2000年代までAsianⅠ遺伝子型とAmerican/Asian遺伝子型で約80%以上を占めていた¹⁰⁾が、2010年代からCosmopolitan遺伝子型の報告が増加傾向にある。2008～2018年のタイにおけるCosmopolitan遺伝子型の報告例は約15%（約85%はAsianⅠ遺伝子型）を占めるに過ぎない（2018年11月末時点、データ非表示）。しかし、2016年及び2017年のタイ報告例の3例（LC410189～91）⁹⁾と2018年のタイ（プーケット）輸入例の2例（18184・18193/2018）との相同性は99.5%以上と高く、報告例のうち1名の居住地（ウタラ

ディット）とプーケットとの距離は約1,300kmであった。

中国南西部の雲南省はミャンマー、ラオス、ベトナムと国境を接しており、2008年から流行が何度も報告されている。2016年のカンボジア輸入例（16102/2016）及び台湾・ベトナム・タイ輸入例（16205/2016）は、2015年に雲南省シーサンパンナ州で大流行（1,067例が報告）した配列（KX577705/15）¹¹⁾との相同性が99.9%以上であり、2016年のタイ報告例及び2014年のベトナム報告例との相同性も99.9%以上であった。また、2015年のベトナム報告例（約20例）との相同性も99.5%以上であった。この州は雲南省南西端に位置し、ミャンマー、ラオス、タイとの交流が盛んで、毎年1,400万人以上の観光客が訪れる観光地であるため、DENV流行のリスクが高まっている⁹⁾。

以上の結果から、Cosmopolitan遺伝子型がインドシナ半島で広範囲に循環している可能性が示唆された。

（3）血清型Ⅲ

Wittke et al.¹²⁾の方法で遺伝子型Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴに分類し、本県の輸入症例は遺伝子型ⅠとⅢに分類された（図3）。遺伝子型Ⅰはインドネシアとフィリピンで優位であり（データ非表示）、遺伝子型Ⅰに分類された5例のフィリピン輸入例（15164/2015、17139・17164/2017、17301・18389/2018）はフィリピン報告例に近縁であった。

2012年ごろからタイで優位な遺伝子型がⅡからⅢへ変化しており¹¹⁾、2013年及び2015年のタイ輸入例（13015/2013、15171/2015）も遺伝子型Ⅲであった。

遺伝子型Ⅲに分類されたミャンマー・タイ輸入例（15185/2015）はミャンマーよりタイ報告例との相同性が高く、また、渡航歴からもタイで感染した可能性が高いと考えられた。

2018年のタイ（プーケット）輸入例（18195・18197/2018）はタイでの報告例の少ない（ドイツ輸入例（KU509285）のみ¹¹⁾）遺伝子型Ⅰに分類され、タイより近隣国であるミャンマー報告例（MG933850）との相同性が高かった（タイ：96.2%、ミャンマー：99.9%）。

図1 血清型1
E遺伝子 (1,485nt) の系統解析

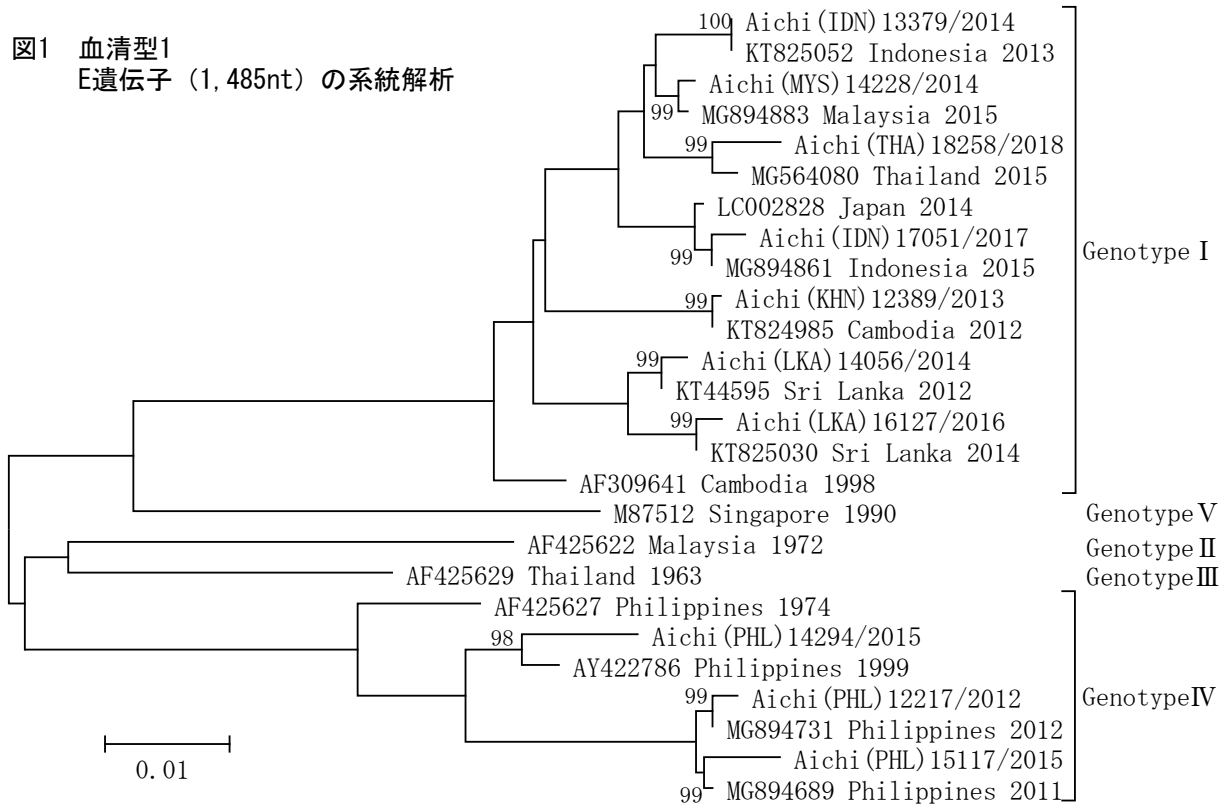


図2 血清型2
E遺伝子 (1,485nt) の系統解析

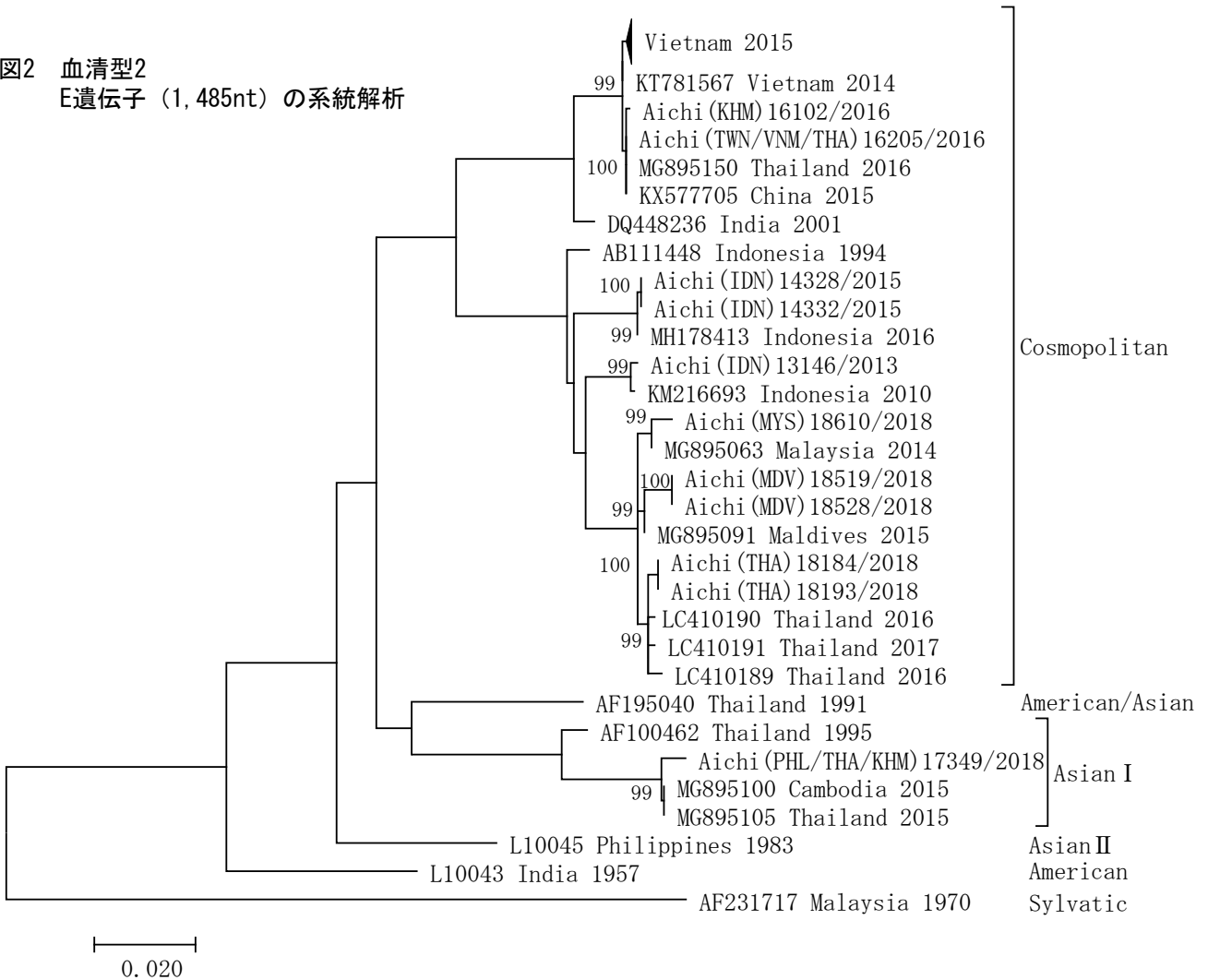


図3 血清型3
E遺伝子 (1,479nt) の系統解析

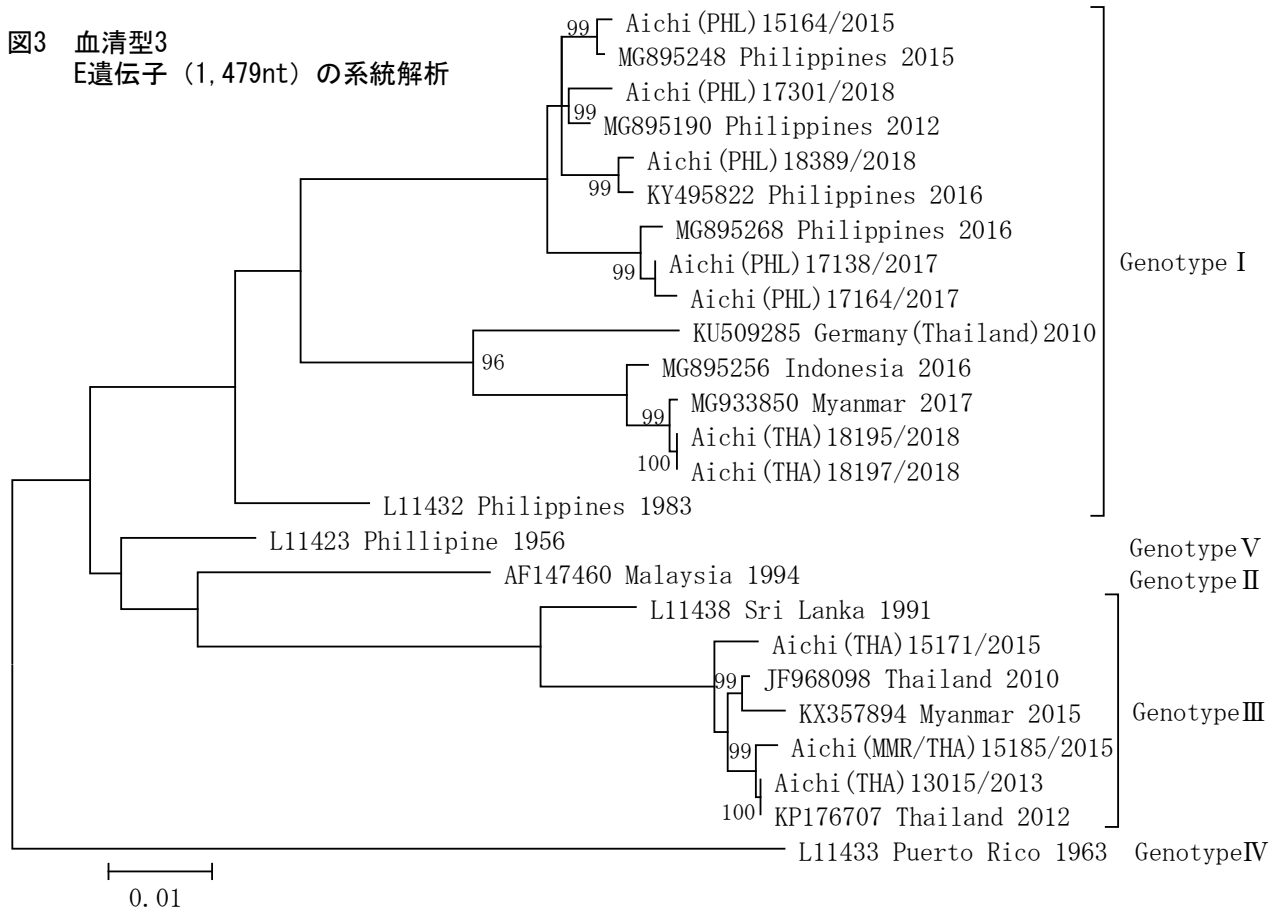
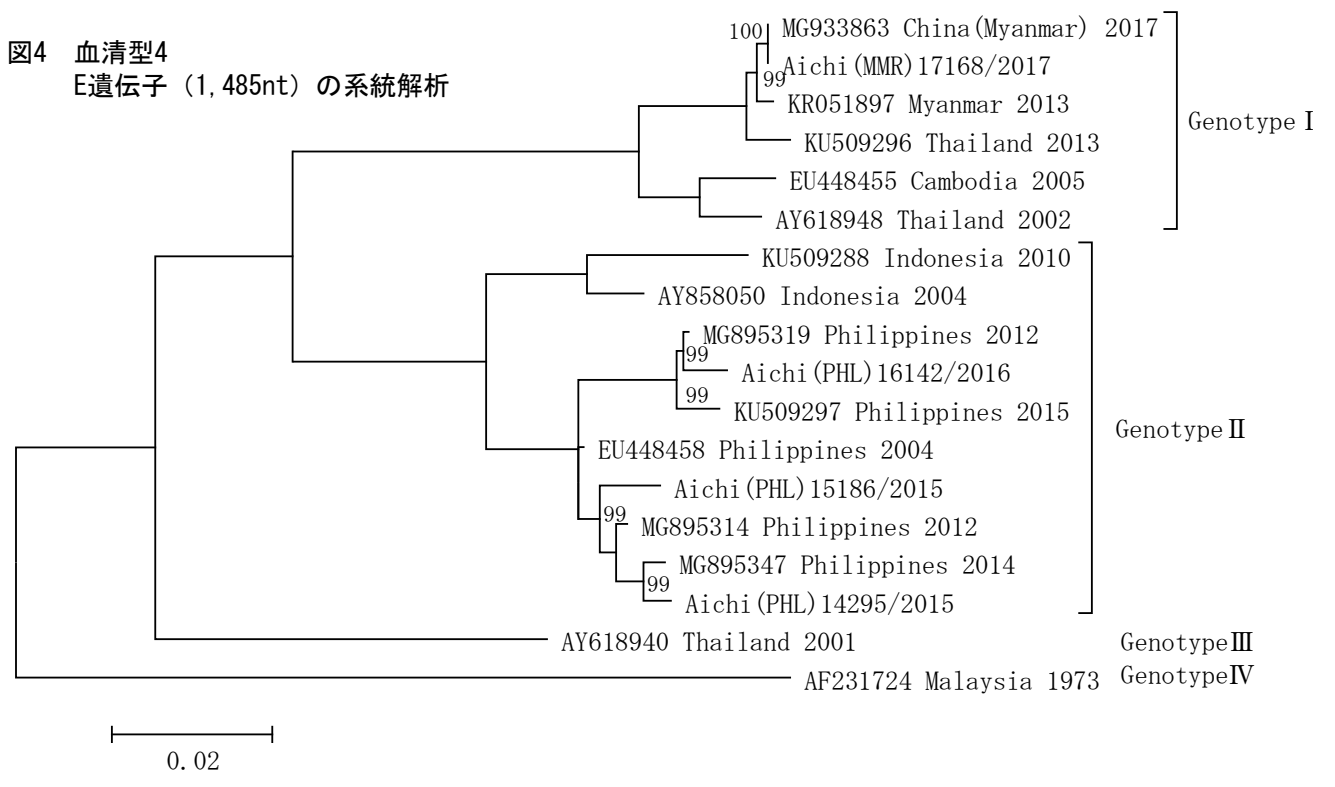


図4 血清型4
E遺伝子 (1,485nt) の系統解析



(4) 血清型 4

Klungthong et al.¹⁴⁾の方法で遺伝子型 I、II、III、IVに分類し、本県の輸入症例は遺伝子型 I と II に分類された(図 4)。フィリピンにおける 1950 年代から 2000 年代の主要な遺伝子型は I だったが、2010 年代から遺伝子型 II へ変化しており(データ非表示)、3 例のフィリピン輸入例(14295・15186/2015, 15142/2016)も遺伝子型 II であった。

遺伝子型 I に分類された 2017 年のミャンマー輸入例(17168/2017)は同年に中国南西部の雲南省ルイリー市経由でミャンマーから入国した旅行者による輸入例(MG933863/2017)¹⁵⁾との相同性が 100%であった。この市は雲南省南西部に位置し、ミャンマーと 3 面で接している。ミャンマーとの交流が盛んなことから、中国とミャンマーの国境付近で広く流行した DENV と考えられた。

考 察

デング熱が 1999 年 4 月に四類感染症に指定され、その後 2011 年 2 月にチクングニア熱が、2016 年 2 月にジカウイルス感染症が追加された。当所では 2000 年からデング熱、2011 年 6 月からチクングニア熱、2015 年 4 月からジカウイルス感染症の検査を開始している。2009 年から 2018 年 11 月末時点でこれら 3 疾病の全国と愛知県の患者報告数¹⁶⁾を表に示した(表 2)。患者報告数は 2010 年から急増し、200 例を上回るようになったが、東日本大震災の影響で出国者数が減少した 2011 年は報告数も減少し、国内感染が 162 例発生した 2014 年は輸入例だけをみると減少していた。本県の医療機関からデング熱・デング出血熱は毎年 10~20 例報告がある。また、DENV 遺伝子検査は当所以外に名古屋市衛生研究所及び名古屋検疫所においても実施されているが、当所は毎年 5~10 例の検出実績がある。当所に搬入された検体からはチクングニア熱・ジカウイルス感染症疑い症例への DENV の紛れ込みはみられなかったが、ウイルス遺伝子診断に基づく診断精度向上のため、今後もデング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症の流行地域から入国した患者を対象に

DENV 検出を試みることは重要である。

DENV は全長約 11,000 スクレオチドのプラス鎖 RNA ウイルスで、3 つの構造タンパク質、7 つの非構造タンパク質、非翻訳領域で構成される。E 遺伝子はエンベロープタンパク質をコードし、血清型 1, 2, 4 は 1,485 スクレオチド、血清型 3 は 1,479 スクレオチドである。この領域は GenBank、DDBJ などでもっとも多く登録されており、感染地域の推定に有用な情報となる。分子系統学解析

表2 デング熱、チクングニア熱、
ジカウイルス感染症の患者報告数
(2009~2018年48週)

年	四類感染症 疾患名	患者報告数	
		全国	愛知県
2009	デング熱	93	6(0)
	チクングニア熱		
	ジカウイルス感染症		
2010	デング熱	244	21(1)
	チクングニア熱		
	ジカウイルス感染症		
2011	デング熱	113	9(2)
	チクングニア熱	10	2(0)
	ジカウイルス感染症		
2012	デング熱	221	10(2)
	チクングニア熱	13	0(0)
	ジカウイルス感染症		
2013	デング熱	249	14(3)
	チクングニア熱	14	1(0)
	ジカウイルス感染症		
2014	デング熱	*341	11(3)
	チクングニア熱	16	0(0)
	ジカウイルス感染症		
2015	デング熱	293	17(10)
	チクングニア熱	17	0(0)
	ジカウイルス感染症		
2016	デング熱	342	20(5)
	チクングニア熱	14	3(3)
	ジカウイルス感染症	12	2(2)
2017	デング熱	245	23(5)
	チクングニア熱	5	1(0)
	ジカウイルス感染症	5	0(0)
2018	デング熱	185	21(11)
	チクングニア熱	3	1(0)
	ジカウイルス感染症	0	0(0)

*国内感染例162を含む

()内は当所での検査実績

チクングニア熱は2011年2月1日、

ジカウイルス感染症は2016年2月15日に

四類感染症に指定

により、血清型 1(インドネシア:IVから I)、血清型 3(タイ:IIから III)、血清型 4(フィリピン: I から II) で遺伝子型の優位性が変化していることが分かった。また、血清型 2 ではインドシナ半島で Cosmopolitan 遺伝子型が広範囲に循環している可能性が示唆された。

2018 年のタイ輸入例 (18184・18193・18195・18197/2018) は渡航歴からほぼ同時期にプーケットで感染したと考えられる。しかし、この内 2 例 (18184・18193/2018) は血清型 2 の Cosmopolitan 遺伝子型に、残り 2 例 (18195・18197/2018) は血清型 3 の遺伝子型 I に分類された。前者はインドネシア、モルディブ、マレーシア報告例とも近縁であり、後者は近隣国であるミャンマー報告例との相同性の方がタイよりも高かった。プーケットのような世界的に有名な観光地では近隣諸国をはじめ世界各国との交流が盛んであり、従来は存在しなかった DENV が導入され、各地へ拡大していくと考えられた。

台湾では DENV 輸入例のサーベイランスを継続して行っており、2003~2007 年¹⁷⁾と 2008~2010 年¹³⁾の解析からは「DENV の遺伝的關係と遺伝子型分布は地理的位置に大きく依存する」としているが、2011~2016 年のサーベイランスでは「遺伝子型の地理的境界が曖昧になり、東南アジア諸国間で DENV が広範囲に導入され、継続的に拡大中」と報告している¹⁹⁾。今回解析した 2012~2018 年の 35 輸入例の配列とアジア諸国の配列を比較することにより、主要な遺伝子型の変化や新たな遺伝子型の導入、また遺伝子型分布の境界が薄れつつあるという、ほぼ同時期に行われた台湾でのサーベイランスと同様の状況を確認できた。

流行地域の都市化やグローバル化によって流行地域が爆発的に増え、地球温暖化によって媒介蚊の生息可能域が拡大し、2004 年にはすべての血清型が中南米、アジアなどの熱帯・亜熱帯地域で報告されるようになった²⁰⁾。DENV の変異、血清型や遺伝子型の変化による病態変異の可能性を早期に発見し、渡航者へ注意喚起するためには遺伝子レベルでの流入監視が重要であ

る。しかし、アジア地域には詳細な遺伝子情報が入手できない国も存在するため、今後も輸入例の分子疫学解析は重要である。

謝 辞

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

文 献

- 1) Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Hay SI et al.: The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446):504-507, 2013.
- 2) 東京都福祉保健局: 東京都蚊媒介感染症対策会議報告書. 2014, 東京都 <http://www.metro.tokyo.jp/INET/KONDAN/2014/12/DATA/40oco101.pdf>
- 3) 国立感染症研究所: デングウイルス感染症診断マニュアル. 2014. <https://www.niid.go.jp/niid/images/1ab-manual/Dengue2014.pdf>
- 4) Domingo C, Niedrig M, Gascón J, Palacios G, Reyes N, Malo MJ, Wichmann O, Ruiz J, Schultze D, Tenorio A et al.: Molecular surveillance of circulating dengue genotypes through European travelers. *Journal of Travel Medicine* 18(3):183-190, 2011.
- 5) 国立感染症研究所: 日本の輸入デング熱症例の動向について(2018 年 12 月 14 日更新); <https://www.niid.go.jp/niid/ja/dengue-imported.html>
- 6) Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, Liprandi F: Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* 303(1):110-119, 2002.
- 7) Megawati D, Masyeni S, Yohan B, Lestarini A, Hayati RF, Meutiawati F,

- Suryana K, Widarsa T, Budiya DG, Sasmono RT: Dengue in Bali: Clinical characteristics and genetic diversity of circulating dengue viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11(5):e0005483. doi: 10.1371/journal.pntd.0005483(2017)
- 8) Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, Lloyd G, Holmes EC: Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue - 2 virus. *Virology* 298(1):63-72, 2002.
- 9) Phadungsombath J, Lin MY, Srimark N, Yamanaka A, Nakayama EE, Moolasart V, Suttha P, Shioda T, Uttayamakul S: Emergence of genotype Cosmopolitan of dengue virus type 2 and genotype III of dengue virus type 3 in Thailand. *PLoS One* 13(11): e0207220. doi: 10.1371/journal.pone.0207220(2018)
- 10) Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, Churcher C, Parkhill J, Cardoso J, Simmons CP: Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(7):e757. doi: 10.1371/journal.pntd.0000757(2010)
- 11) Zhao Y, Li L, Ma D, Luo J, Ma Z, Wang X, Pan Y, Chen J, Xi J, Sun Q: Molecular Characterization and Viral Origin of the 2015 Dengue Outbreak in Xishuangbanna, Yunnan, China. *Scientific Reports* 6:e34444. doi: 10.1038/srep34444(2016)
- 12) Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG: Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 301(1):148-156, 2002.
- 13) Shihada S, Emmerich P, Thomé-Bolduan C, Jansen S, Günther S, Frank C, Schmidt-Chanasit J, Cadar D: Genetic Diversity and New Lineages of Dengue Virus Serotypes 3 and 4 in Returning Travelers, Germany, 2006-2015. *Emerging Infections Diseases* 23(2):272-275, 2017.
- 14) Klungthong C, Zhang C, Mammen MP Jr, Ubol S, Holmes EC: The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology* 329(1): 168-179, 2004.
- 15) Wang B, Liang Y, Yang S, Du Y, Xiong LN, Zhao T, Yang F, Qin W, Xia X: Co-Circulation of 4 Dengue Virus Serotypes among Travelers Entering China from Myanmar, 2017, *Emerging Infections Diseases* 24(9):1756-1758, 2018.
- 16) 国立感染症研究所: 日本の輸入デング熱症例の動向について(2018年12月11日更新); <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>
- 17) Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH: Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007: Geographic distribution and genotype shift. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80(6):1039-1046, 2009.
- 18) Huang JH, Su CL, Yang CF, Liao TL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Shu PY: Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008-2010. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87(2):349-358, 2012.
- 19) Yang CF, Chang SF, Hsu TC, Su CL, Wang TC, Lin SH, Yang SL, Lin CC, Shu PY: Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2011-2016. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(9): e0006773. doi: 10.1371/journal.pntd.0006773(2018)
- 20) Scitable by Nature Education "Dengue Viruses" <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>

Molecular epidemiological analysis of dengue virus detected in Aichi Prefecture

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

Dengue virus (DENV) causes dengue fever and dengue hemorrhagic fever. Detection of DENV from specimens of patients with a relevant foreign travel history was introduced to this laboratory in 2000. In this study, we performed molecular epidemiological analyses of DENV detected in 35 samples from dengue fever patients. As a result, the genotypes of each 4 DENV serotypes (DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4) found from these patients reflected those reported from Southeast and East Asia. The phylogenetic analyses obtained in this study thus revealed the repeated introduction of DENV from overseas to Aichi Prefecture, and are useful molecular epidemiological information for future monitoring/surveillance of DENV.

Dengue, Chikungunya fever and Zika virus disease are transmitted to humans by the same vector mosquitoes, and there are cases with difficulties to diagnose based solely on clinical findings and epidemiological information such as suspected infected areas. In order to investigate the possible mix-in of Dengue fever in those cases suspected of Chikungunya fever and/or Zika virus infection, a total of 40 samples collected from 40 patients who were initially suspected of having Chikungunya fever or Zika virus infection and turned out to be negative for these viruses, were screened for presence of DENV by real-time RT-PCR. As a result, DENV was not detected from any of these tested samples.

Key words : Dengue virus, molecular epidemiology, mosquito-borne virus infections

調 査 研 究

制限酵素 XbaI 消化 *Salmonella* Narashino 遺伝子断片の パルスフィールドゲル電気泳動法による菌株識別能

山田和弘、四本信輔、中根衣久美、高橋佑太、續木洋一、松本昌門、皆川洋子

要 約

サルモネラ属菌は食中毒原因菌であり、食中毒発生時の菌株識別にはパルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis : PFGE) 法がよく利用されているが、*S. Typhimurium* 以外の特定の血清型単独での PFGE 法の菌株識別能のデータは少ない。そこで、愛知県内の食品取扱者から高頻度で分離される *S. Narashino* について、制限酵素 XbaI を用いた PFGE 法を実施し、菌株識別能の検討を行った。愛知県内の食品取扱者から分離された *S. Narashino* 52 株は 11 クラスタ (D index=0.634) に分類された。11 個のクラスタのうち 6 個のクラスタが複数株で形成されており、さらに、そのうち 4 個のクラスタには異なる分離年の *S. Narashino* が含まれていたことから、*S. Narashino* の遺伝的多様性は低いと推察された。今回供試した *S. Narashino* は全て愛知県内から分離された株のため、県内に定着している株の存在は否定できないが、*S. Narashino* においては食中毒等の集団発生時の科学的根拠として PFGE 法の使用は適切ではない可能性を示した。

キーワード : *S. Narashino*、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)、D index

序 文

サルモネラ属菌はヒトに急性胃腸炎を引き起こす食中毒原因菌であり、日本の食中毒発生に占める原因物質として 2000 年以降減少傾向にはあるが、常に上位にランクされている^{1), 2)}。サルモネラ属菌の菌株識別をする際には、パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis : PFGE) 法がよく利用される。PFGE 法は菌株識別能力が高く、再現性があるといった長所があるが、これまでに報告されているサルモネラ属菌の PFGE 法の菌株識別能のデータは *Salmonella Typhimurium*^{3), 4)} のデータが多くを占めている。また *S. Typhimurium* 以外の血清型は複数の血清を

まとめて菌株識別能を評価^{5), 6)}しているため、特定の血清型単独での菌株識別能のデータが少なく、種々の血清型のサルモネラ属菌集団発生の際の分子疫学解析法として PFGE 法を実施することが妥当かどうかは不明である。昨年度の所報において、国立感染症研究所による全国集計と比べ、愛知県の食品取扱者からは *S. Narashino* が高頻度に分離されることを報告した⁷⁾。*S. Narashino* は日本特有の血清型であり⁸⁾、爬虫類由来の血清型とされている⁹⁾。平成 27 (2015) 年には東京都で食中毒の原因菌として分離されており¹⁰⁾、今後当県においても食中毒等集団発生を起こす危険性がある。そこで、今回愛知県内の食品取扱者か

ら高頻度で分離される *S. Narashino* について、*Xba*I を用いた PFGE 法を実施することで菌株識別能を調査し、今後 *S. Narashino* の食中毒等集団感染が発生した際の解析法として、PFGE 法が有用か否かの検討を行った。

材料と方法

供試菌株：2007 年から 2016 年に一般社団法人愛知県食品衛生協会食品衛生センターより分与された *S. Narashino* 52 株を用いた。

PFGE 法：供試菌を Luria-Bertani (LB) 培地に接種し、37°C で 6 から 8 時間振盪培養したものを Certified™ Megabase Agarose (Bio-Rad, USA) (0.5%) と SeaKem®Gold を 2:1 で混合したアガロースゲルに直接包埋してプラグを作製した。Proteinase K (関東化学、東京) による溶菌処理及び精製水による洗浄の後、各プラグの DNA を 30U の制限酵素 *Xba* I を用い 37°C で 4 時間又は一晩処理して切断した。PFGE は CHEF DR III (Bio-Rad, USA) を用い、0.5×Tris-borate-EDTA buffer (TBE) に、14°C、内角 120° で電圧 6V/cm、スイッチングタイム 2.2 秒から 63.8 秒、20 時間の泳動を行った¹¹⁾。サイズマーカーには、*Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 を *Xba* I で処理したものを用いた。泳動後のゲルは臭化エチジウム (0.5 μg/mL) で染色し、トランスイルミネーター下で可視化した後、写真撮影を行った。泳動パターンのクラスター解析には BioNumerics version 6.1 (Applied Maths, Belgium) を用い、optimization と position tolerance を両方とも 1% とし、相同性が 95% 以上で同一のクラスターとした¹²⁾。

結果

S. Narashino 52 株は *Xba*I を用いた PFGE 法で 11 クラスターに分類され、31 株からなるクラスターが 1 個 (クラスター 1)、5 株からなるクラスターが 1 個 (クラスター 2)、3 株からなるクラスターが 3 個 (クラスター 3, 4 及び 5) 及び 2 株からなるクラスター

(クラスター 6) が 1 個認められた (図 1)。互いに関連のない 2 株をタイピングしたときに異なる株であると判定される確率である D index¹³⁾ は 0.634 であった。得られたバンド本数は 12 から 15 本であり、最も離れた株同士の相同性は 75.2% であった。

考察

D index は 1 に近くなるほど遺伝的相同性の低い株を正確に識別できる指標であり、その値が 0.95 以上であれば菌株識別に使用可能とされている⁴⁾。ヒトから分離された *S. Typhimurium* の D index は 0.95 以上の報告が多い⁴⁾ のに対し、今回供試した *S. Narashino* 52 株の D index は 0.634 と非常に低かった。また、形成したクラスター 6 個のうち、4 個には異なる分離年の *S. Narashino* が含まれていること (クラスター 1、3、4 及び 5) から、*S. Narashino* の遺伝的多様性は低いと推察された。しかし、同一年の分離株のみ含まれるクラスター (クラスター 2 及び 6) もあることや、今回供試した *S. Narashino* は全て愛知県内から分離された株のため、県内に定着している株の存在は否定できないことから、*Salmonella* 属菌の PFGE 法における第二選択の制限酵素である *Bln*I を用いて、PFGE を実施する等のさらなる検討をする必要があると考えられる。

今回 *S. Narashino* の *Xba*I を用いた PFGE 法の菌株識別能を検討することで、*S. Narashino* においては食中毒等の集団発生時の科学的根拠として PFGE 法の使用は適切ではない可能性を示した。今後、食品取扱者及び食中毒原因株から共通して分離される血清型である *S. Saintpaul* や *S. Thompson* 等に対しても同様に PFGE 法を実施し、それぞれの血清型における D index を算出し、食中毒発生時等の分子疫学解析法として、PFGE 法が有用か検討していきたいと考えている。

謝辞

長年にわたり菌株の分与を通じてサルモ

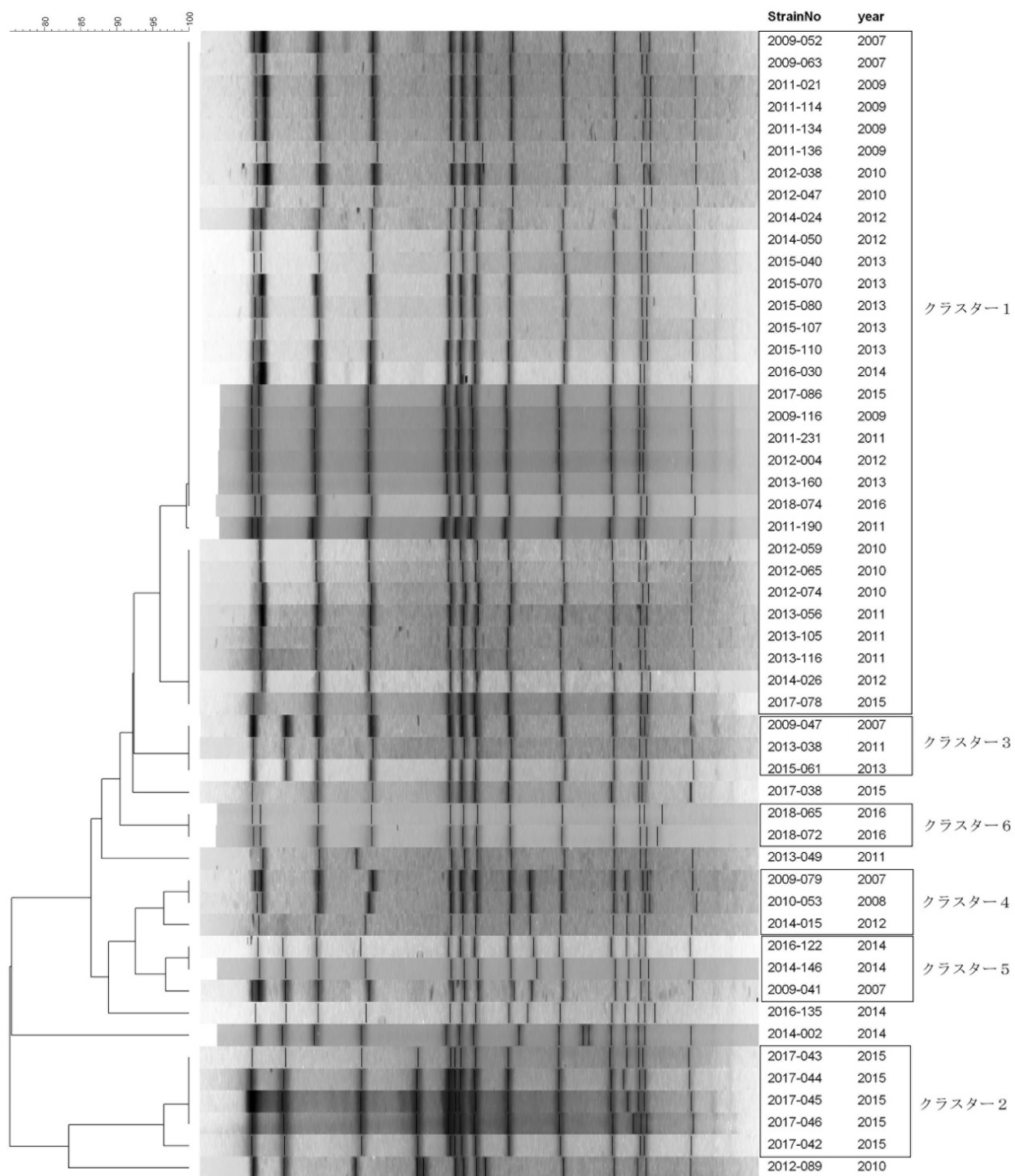


図 1 S. Narashino の XbaI を用いた PFGE 法によるクラスター解析

ネラ調査研究にご協力いただいている一般社団法人愛知県食品衛生協会食品衛生センターに深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：サルモネラ特集 病原微生物検出情報 30(8):206-207, 2009.
- 2) 厚生労働省：食中毒統計調査資料；http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html
- 3) Lienemann T, Kyyhkynen A, Halkilahti J, Haukka K, Siitonen A: Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA. *BMC Microbiology* 15:131, 2015.
- 4) Ferrari RG, Panzenhagen PHN, Conte-Junior CA: Phenotypic and Genotypic Eligible Methods for *Salmonella* Typhimurium Source Tracking. *Frontiers in Microbiology* 8:2587, 2017.
- 5) Soyer Y, Alcaine SD, Schoonmaker-Bopp DJ, Root TP, Warnick LD, McDonough PL, Dumas NB, Gröhn YT, Wiedmann M: Pulsed-field gel electrophoresis diversity of human and bovine clinical *Salmonella* isolates. *Foodborne Pathogens and Disease* 7(6):707-717, 2010.
- 6) Li B, Vellidis G, Liu H, Jay-Russell M, Zhao S, Hu Z, Wright A, Elkins CA: Diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* enterica isolates from surface water in Southeastern United States. *Applied and Environmental Microbiology* 80(20):6355-6365, 2014.
- 7) 山田和弘、四本信輔、中根衣久美、青木美耶子、白鳥浩美、平山達也、小林慎一、菅沼啓之助、北島直美、鈴木匡弘、松本昌門、皆川洋子：2007年から2015年に愛知県の食品取扱者より分離されたサルモネラ属菌の血清型別及びβ-ラクタマーゼ遺伝子保有状況 愛知県衛生研究所報 68:26-32, 2018.
- 8) 坂崎利一，中谷林太郎：日本における *Salmonelleae* の疫学と生態. 長崎大学風土病紀要 6(3):167-173, 1964.
- 9) Kuroki T, Ishihara T, Furukawa I, Okatani AT, Kato Y: Prevalence of *Salmonella* in wild snakes in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 66(4):295-298, 2013.
- 10) 東京都福祉保健局：平成 27 年 東京都の食中毒概要 2 食中毒統計表-2；http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/foods_archives/index.html
- 11) Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ: Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* 3(1):59-67, 2006
- 12) Gorski L, Parker CT, Liang A, Cooley MB, Jay-Russell MT, Gordus AG, Atwill ER, Mandrell RE: Prevalence, distribution, and diversity of *Salmonella enterica* in a major produce region of California. *Applied and Environmental Microbiology* 77(8):2734-2748, 2011.
- 13) Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 26(11):2465-2466, 1988.

Discriminatory power of pulsed-field gel electrophoresis for chromosomal fragments of *Salmonella* Narashino by using digestion of restriction enzyme XbaI

Kazuhiro Yamada, Shinsuke Yotsumoto, Ikumi Nakane, Yuta Takahashi,
Hirokazu Tsuduki, Masakado Matsumoto, Hiroko Minagawa

Salmonella enterica is globally recognized as a major cause of foodborne disease. *S. Narashino* is one of serotypes which are prevalent in food handlers in Aichi Prefecture. We investigated the discriminatory power of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for chromosomal fragments of *Salmonella* Narashino by using digestion of restriction enzyme XbaI. *S. Narashino* isolates of 52 from food handlers in Aichi Prefecture were divided into 11 PFGE patterns and the D index was 0.634. The six of 11 PFGE patterns involved multiple isolates and the four PFGE patterns among them contained *S. Narashino* isolated in different years. The genetic diversity of *S. Narashino* was estimated to be low and it suggested that PFGE by XbaI was not suitable for the use at the outbreak.

Key words : *S. Narashino*, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), D index

調 査 研 究

LC/Q-TOF-MS による

強壯用健康食品中の医薬品成分分析法の検討

舘 昌彦、小林俊也、富田浩嗣、棚橋高志、渡邊美奈恵、小池恭子

要 旨

健康食品に添加されるおそれのある強壯 40 成分について、LC/Q-TOF-MS による分析法を検討した。移動相に 0.1%ギ酸-0.1%ギ酸含有アセトニトリル混液を用いたグラジエント条件により全成分を良好に分離・検出することができた。また、本法で添加回収試験を行ったところ、回収率は錠試料 92.0~119.1%、液状試料 75.2~104.5%、茶葉 56.0~130.2% であり、相対標準偏差はすべての試料において 11%以内と概ね良好な結果が得られた。さらに今回、強壯成分のデータベース及びライブラリーを構築し、試料に添加した強壯成分の同定を試みた結果、一部のタダラフィル系強壯成分を除き 35 成分を同定することが可能であった。以上より、本法は、健康食品に添加されるおそれのある強壯成分の分析に有用であると考えられた。

キーワード：LC/Q-TOF-MS、分析化学、健康食品、強壯成分

はじめに

近年、消費者の健康に対する関心の高まりに加え、インターネットの普及に伴い、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た。これらの中には、様々な医薬品等成分が添加されている場合があり、人への健康被害を及ぼすおそれがあることから、「無承認無許可医薬品」として医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（医薬品医療機器等法）で取締りの対象となる。2001年度から実施されている厚生労働省の無承認無許可医薬品の実態調査によれば、強壯用健康食品からの医薬品成分の検出事例は依然として続いている。これら製品中からは勃起不全治療薬であるシルデナフィル、バルデナフィル、タダラフィル等の医薬品成分やこれらに構造が類似した様々な成分が検出

されている¹⁾。

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ぐ目的で、国や自治体により買上調査が実施されており、その検査方法として HPLC (High performance liquid chromatography) や質量分析等を用いた一斉分析法が報告されている²⁾⁻⁷⁾。当所では、2014年に UHPLC (Ultra-high performance liquid chromatography) を用いた痩身及び強壯成分の一斉分析法を確立した⁸⁾。本法は、検出器に PDA (photodiode array) を用い、保持時間と UV スペクトルにより 10 分以内に痩身 8 成分及び強壯 4 成分を良好に分離・検出することができる迅速法である。しかし、今回対象とした側鎖のみが異なる類似成分は、ほぼ同一の UV スペクトルを示すことが多く、保持時間も近接する傾向があるため、類似成分を含めたすべての成分

を識別することは困難である。多くの類似成分が存在し、それらを含めて添加される可能性のある強壯用健康食品の分析は、困難となることが予想される。

LC/Q-TOF-MS (liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry) は、高分解能での質量分析が可能であり、得られる精密質量と同位体比、化合物の部分構造を解析し、構造推定することができる。また、精密質量を用いることにより組成式から算出された理論値に基づくデータベース検索、あるいは、標準物質を測定して得られる実測値に基づくライブラリー検索が可能となり、化合物の高精度な同定を行うことができる。以上の理由により、LC/Q-TOF-MS は構造類似成分や保持時間が近接する成分の分離・同定が求められる強壯用健康食品の検査には特に有用と考えられた。今回、LC/Q-TOF-MS を用いたシルデナフィル系、バルデナフィル系及びタダラフィル系を含む強壯 40 成分の最適な分析条件を検討し、健康食品に強壯成分を添加した試料を用い、強壯成分のデータベース及びライブラリー検索による同定を検討したので報告する。

方 法

1. 試料

2012～2016 年に愛知県内で試買された糖衣錠 (動植物末配合) 試料、液状 (植物エキス配合) 試料、茶葉 (各種ハーブ配合) を用いた。

2. 試薬及び標準物質

1) 試薬

メタノール、アセトニトリル及びギ酸は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (東京) 製 LC/MS 用、その他の試薬は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (東京) 製特級を用いた。

2) 標準物質

シルデナフィル及びギサデナフィルは Tocris 社 (USA) 製、キサントアントラフィルは Tlc pharmachem 社 (Canada) 製、その他の強壯成分は Toronto research chemicals 社 (Canada) 製を用いた。

3. 標準溶液の調製

40 種の標準物質約 2 mg をそれぞれ精密に量り、メタノールまたはアセトニトリルに溶かして 1 mg/mL 標準原液とした。各標準原液は、表 1 に示すとおり同じ分子量を持つ成分が同一グループに入らないように 10 成分ずつ 4 つのグループに分け、個々の成分に 1～40 の番号を付した。標準原液 0.5 mL ずつを正確に量り混合し、100 μ g/mL 混合標準溶液 1～4 を調製した。これら混合標準溶液をさらにメタノールで適宜希釈して条件検討及び添加回収試験用標準溶液とした。

4. 装置及び測定条件

装置は、LC/Q-TOF-MS (Agilent 6530B Q-TOF LC/MS システム、Agilent Technologies、USA) を用いた。カラムは ACQUITY UPLC HSS T3 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μ m、Waters、USA) を用い、ガードカラムは ACQUITY UPLC HSS T3 van Guard (内径 2.1 mm、長さ 5 mm、粒子径 1.8 μ m、Waters、USA) を用いた。測定条件は、移動相:A 液 0.1%ギ酸、B 液 0.1%ギ酸含有アセトニトリル、グラジエント条件:(A/B) [(95:5) \rightarrow (80:20)] 20 分 + [(80:20) \rightarrow (20:80)] 30 分 + [(20:80) \rightarrow (5:95)] 1 分 + (5:95) 4 分 + (95:5) 6 分、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、流速: 0.3 mL/min、注入量: 1 μ L、イオン化法: ESI(+)、イオンスプレー電圧: 4000 V、イオン源温度: 350 $^{\circ}$ C、測定モード: information dependent acquisition モード、CID (Collision-induced dissociation) エネルギー: 10 及び 30 eV、測定質量範囲: m/z 100～1000 (MS スペクトル) 及び m/z 50～700 (MS/MS スペクトル) に設定した。

5. 強壯成分のデータベース及びライブラリー登録

混合標準溶液の LC/Q-TOF-MS 測定により得られた各強壯成分の MS/MS スペクトル及び保持時間について、名称、IUPAC 名、組成式、精密質量、Cas No. とともに Agilent 社製 MassHunter PCDL Manager に登録した。成分の同定には Agilent 社製解析ソフトウェア MassHunter Qualitative Analysis B. 06.00 を用いた。

6. 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法は、既報⁸⁾に従った。液状試料は混和均一後、0.2 mL を正確に量った。錠試料は乳鉢、茶葉はミニブレンダー (Mini Blender 663-11B, Oster, USA) で粉碎したものを約 0.2 g 精密に量った。これらの試料にメタノール 4 mL を加えた後、超音波洗浄機 (UT-306, Sharp, 大阪) で 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。この溶液を遠心式メンブランフィルター (Ultrafree-CL PTFE membrane 0.2 μ m, Merck Millipore, USA) で遠心ろ過し、LC/Q-TOF-MS 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、0.1%ギ酸-0.1%ギ酸含有アセトニトリル混液を用いて検討した。その結果、上述したグラジエント条件を用いることにより、マスクロマトグラム上において保持時間 15 分から 40 分の間に各混合標準溶液中のすべての強壯成分が良好なピークとして観測された (図 1)。次に、すべての強壯成分に対して効果的にフラグメントイオンが生成する CID 条件を検討した。タダラフィル系は、10 eV で容易に化合物の開裂が生じ、複数のフラグメントイオンが観測された。

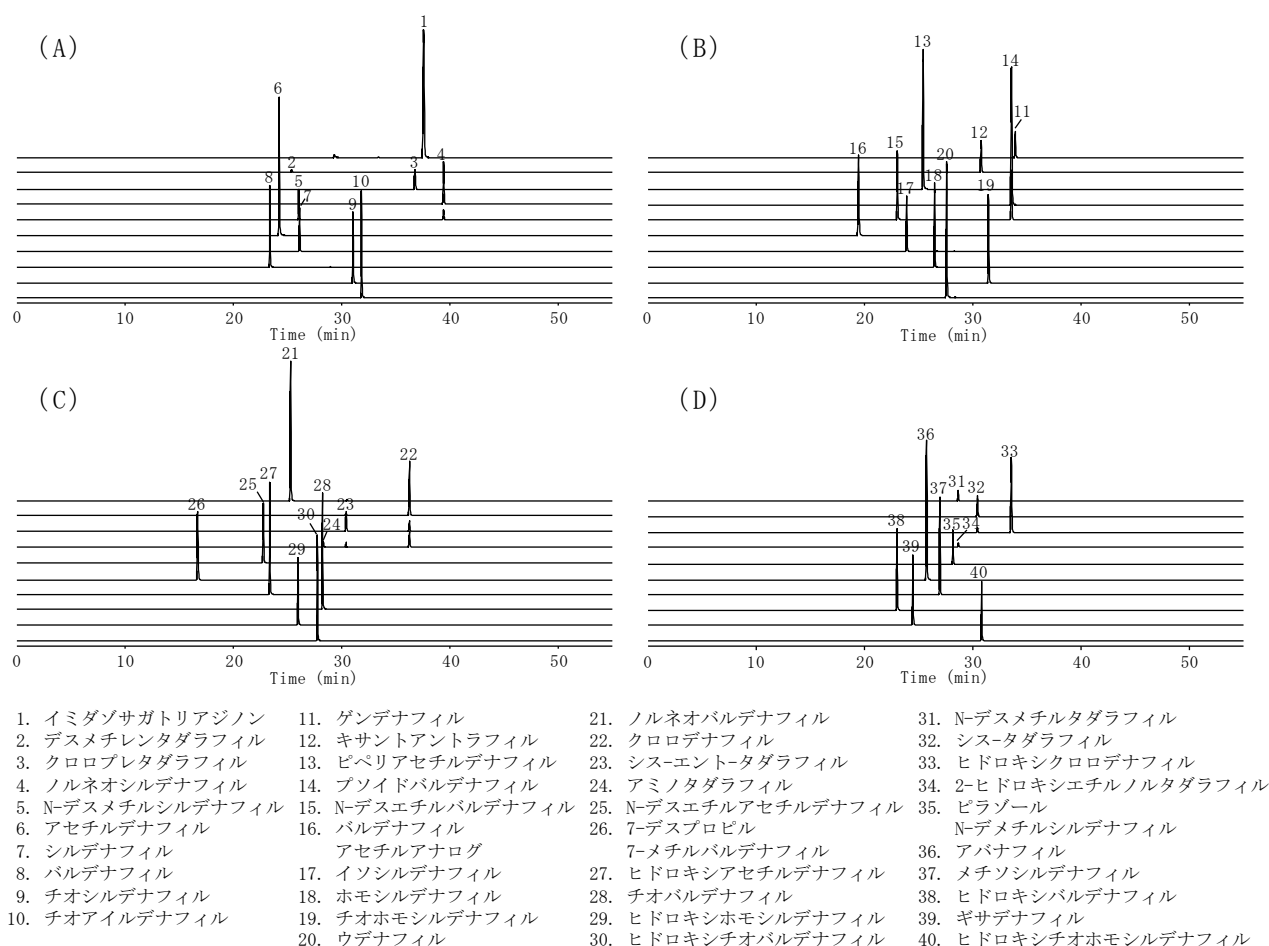


図 1 混合標準溶液のマスクロマトグラム (各成分 : 0.5 μ g/mL) :

(A) 混合標準溶液 1、(B) 混合標準溶液 2、(C) 混合標準溶液 3、(D) 混合標準溶液 4

それに対し、シルデナフィル系及びバルデナフィル系は、10 eV では観測されたフラグメントイオンがわずかであったため、30 eV に増幅したところ、両系統において複数のフラグメントイオンが観測された。強壯成分の化学構造及び物理化学的性質により、系統ごとに開裂パターン及び最適な CID 条件が異なることが示唆されたことから、CID エネルギーは、10 eV と 30 eV を交互に切り替えて測定する設定とした。

2. 検量線の直線性及び再現性

本条件における対象 40 成分の検量線の直線性を確認するため、各成分について濃度 0.002~2 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で検量線を作成した。シルデナフィル系及びバルデナフィル系強壯成分の多くは、低濃度範囲で直線性が得られるのに対し、タダラフィル系強壯成分は、比較的高濃度範囲で直線性が得られた (表 1)。各成分の濃度が 0.5 $\mu\text{g/mL}$ と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、ピーク面積の RSD (Relative standard deviation) は 1.6~6.5%、保持時間の RSD は 0.002~0.123% と良好であった。

3. 添加回収試験

いわゆる健康食品は、様々な形態で流通・販売されているため、試買した錠、液状、茶葉製品を用いて添加回収試験を行い、本法の有用性を検討した。対象成分を含有し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 125 μL 添加 (試料中濃度として 62.5 $\mu\text{g/g}$ 相当) し、本法に従って測定した結果を表 2 に示した。平均回収率 (n=5) は、錠試料が 92.0~119.1%、液状試料が 75.2~104.5%、茶葉が 56.0~130.2% であり、RSD はすべての試料において 11% 以内と概ね良好な結果が得られた。

4. データベース及びライブラリー検索

解析ソフトウェア MassHunter のデータベース検索は、化合物の組成式から算出し

た精密質量及び同位体比の理論値と保持時間の実測値を用いて化合物を照合する方法であり、ライブラリー検索は、あらかじめ標準物質を測定して登録した MS/MS スペクトルの実測値を用いて照合する方法である。健康食品試料へのデータベース及びライブラリー検索の有用性を確認するため、前項の添加回収試験の測定結果を用いて、両検索方法によるデータ解析を行い、添加した強壯成分の同定を試みた。

錠、液状及び茶葉試料のデータを検索したところ、同一の同定結果が得られ、試料による差はなかったため、茶葉試料の検索結果を表 3 に示した。データベース検索の結果、40 成分のうち 35 成分が同定され、同定されなかった成分が 4 成分、誤同定された成分が 1 成分であった。一方、ライブラリー検索では、32 成分が同定され、同定されなかった成分が 6 成分、誤同定された成分が 2 成分であった。ヒドロキシチオバルデナフィルとヒドロキシチオホモシルデナフィルはライブラリー検索では同定されなかったが、データベース検索で同定された。また、シス-タダラフィルはどちらの検索においてもシス-エント-タダラフィルと誤同定された。両成分は立体異性体の関係であることから、分子量や保持時間が一致しており、本法では両成分を識別することはできなかった。このような成分の場合は、キラルカラム等による立体異性体を識別する方法の必要性が考えられた。デスメチレンタダラフィル、アミノタダラフィル、N-デスメチルタダラフィル及び 2-ヒドロキシエチルノルタダラフィルは、両方の検索で同定されなかった。これらタダラフィル系 4 成分は検出感度が低いため、同定を可能とする十分な MS/MS スペクトルが取得できなかったことが原因の一つと考えられた。今回検討した添加回収試験の各成分の濃度は、タダラフィルの薬効量を考慮すると非常に低濃度であったことから、今後は、実試料の含有レベルを考慮した検討が必要であると考えられた。

表1 繰り返し精度及び検量線

No.	分類	成分名	プロトン化 分子 (理論値)	繰り返し精度 (n=6)			検量線	
				保持時間 (分)	保持時間 のRSD (%)	ピーク面積値 のRSD (%)	濃度範囲 ($\mu\text{g/mL}$)	r^2
1	▲	イミダゾサガトリアジノン	313.1659	37.58	0.024	2.1	0.002 - 0.5	0.9925
2	■	デスメチレンタダラフィル	378.1448	25.42	0.036	5.6	0.05 - 2	0.9972
3	■	クロロブレタダラフィル	427.1055	36.79	0.018	3.8	0.005 - 2	0.9952
4	●	ノルネオシルденаフィル	460.2013	39.42	0.016	4.5	0.002 - 2	0.9996
5	●	N-デスメチルシルденаフィル	461.1965	26.08	0.026	6.1	0.005 - 2	0.9978
6	●	アセチルденаフィル	467.2765	24.25	0.028	3.3	0.002 - 0.5	0.9940
7	●	シルденаフィル	475.2122	26.15	0.026	5.4	0.002 - 0.5	0.9995
8	▲	バルденаフィル	489.2278	23.40	0.040	6.1	0.002 - 0.5	0.9994
9	●	チオシルденаフィル	491.1894	31.07	0.031	5.0	0.002 - 0.5	0.9997
10	●	チオアイルденаフィル	505.2050	31.86	0.004	3.8	0.002 - 0.5	0.9997
11	●	ゲンденаフィル	355.1765	33.95	0.022	5.7	0.02 - 0.5	0.9999
12	◆	キサントアントラフィル	390.1660	30.79	0.025	4.4	0.005 - 2	0.9996
13	●	ピペリアセチルденаフィル	438.2500	25.42	0.038	1.6	0.002 - 0.5	0.9910
14	▲	プソイドバルденаフィル	460.2013	33.59	0.002	2.0	0.002 - 0.5	0.9939
15	▲	N-デスエチルバルденаフィル	461.1965	23.06	0.033	4.1	0.002 - 0.5	0.9996
16	▲	バルденаフィル アセチル アナログ	467.2765	19.47	0.003	3.3	0.002 - 0.5	0.9999
17	●	イソシルденаフィル	475.2122	23.93	0.002	3.5	0.002 - 0.5	0.9991
18	●	ホモシルденаフィル	489.2278	26.48	0.002	3.0	0.002 - 0.5	0.9998
19	●	チオホモシルденаフィル	505.2050	31.48	0.032	3.6	0.002 - 0.5	0.9999
20	●	ウденаフィル	517.2591	27.60	0.027	2.2	0.002 - 0.5	0.9945
21	▲	ノルネオバルденаフィル	357.1557	25.30	0.034	3.8	0.002 - 0.5	0.9954
22	●	クロロденаフィル	389.1375	36.26	0.026	6.5	0.005 - 2	0.9992
23	■	シス-エント-タダラフィル	390.1448	30.43	0.031	5.4	0.005 - 0.5	0.9987
24	■	アミノタダラフィル	391.1401	28.33	0.034	6.1	0.05 - 2	0.9973
25	●	N-デスエチルアセチルденаフィル	439.2452	22.78	0.039	5.7	0.02 - 2	0.9901
26	▲	7-デスプロピル 7-メチルバルденаフィル	461.1965	16.74	0.123	3.0	0.002 - 0.5	0.9994
27	●	ヒドロキシアセチルденаフィル	483.2714	23.39	0.039	4.3	0.002 - 0.5	0.9988
28	▲	チオバルденаフィル	505.2050	28.25	0.004	4.4	0.002 - 0.5	0.9980
29	●	ヒドロキシホモシルденаフィル	505.2228	26.00	0.054	4.4	0.002 - 0.5	0.9997
30	▲	ヒドロキシチオバルденаフィル	521.1999	27.78	0.031	4.1	0.002 - 0.5	0.9976
31	■	N-デスメチルタダラフィル	376.1292	28.70	0.003	4.5	0.02 - 0.5	0.9945
32	■	シス-タダラフィル	390.1448	30.44	0.002	5.0	0.005 - 0.5	0.9992
33	●	ヒドロキシクロロденаフィル	391.1531	33.58	0.021	4.9	0.002 - 0.5	0.9997
34	■	2-ヒドロキシエチルノルタダラフィル	420.1554	28.66	0.002	4.4	0.02 - 2	0.9997
35	●	ピラゾール N-デメチルシルденаフィル	461.1965	28.17	0.034	4.2	0.005 - 2	0.9985
36	◆	アバナフィル	484.1858	25.75	0.037	2.4	0.002 - 0.5	0.9900
37	●	メチソシルденаフィル	489.2278	26.97	0.034	4.2	0.002 - 0.5	0.9990
38	▲	ヒドロキシバルденаフィル	505.2228	23.02	0.031	2.5	0.002 - 0.5	0.9977
39	●	ギサденаフィル	520.2337	24.48	0.037	4.2	0.002 - 0.5	0.9990
40	●	ヒドロキシチオホモシルденаフィル	521.1999	30.83	0.002	4.8	0.002 - 0.5	0.9994

●：シルденаフィル系、▲：バルденаフィル系、■：タダラフィル系、◆：その他の強壯成分

表2 添加回収試験結果

No.	分類	成分名	回収率 (n=5)					
			錠		液状		茶葉	
			平均値 (%)	RSD (%)	平均値 (%)	RSD (%)	平均値 (%)	RSD (%)
1	▲	イミダゾサガトリアジノン	96.2	5.0	85.5	3.3	101.3	3.3
2	■	デスメチレンタダラフィル	98.8	5.4	77.8	6.2	98.5	6.3
3	■	クロロプレタダラフィル	97.1	8.5	75.2	5.6	98.4	2.3
4	●	ノルネオシルデナフィル	110.7	10.3	77.3	5.8	130.2	6.5
5	●	N-デスメチルシルデナフィル	92.9	7.8	78.2	4.5	91.6	6.4
6	●	アセチルデナフィル	98.7	4.8	85.1	3.9	74.2	10.0
7	●	シルデナフィル	97.6	9.6	79.7	5.1	103.6	4.3
8	▲	バルデナフィル	99.7	9.2	82.2	4.7	109.6	3.2
9	●	チオシルデナフィル	99.5	7.6	83.0	3.7	93.7	4.5
10	●	チオアイルデナフィル	99.0	6.1	84.4	5.0	84.9	5.7
11	●	ゲンデナフィル	106.3	3.0	102.3	1.4	105.7	3.1
12	◆	キサントアントラフィル	103.5	2.1	101.6	1.5	105.9	3.8
13	●	ピペリアセチルデナフィル	96.4	0.6	97.1	0.6	81.7	5.4
14	▲	プソイドバルデナフィル	100.5	1.3	100.0	0.7	100.0	1.6
15	▲	N-デスエチルバルデナフィル	95.5	2.5	99.6	1.6	85.9	4.1
16	▲	バルデナフィル アセチル アナログ	96.0	2.4	92.5	1.8	56.0	9.2
17	●	イソシルデナフィル	102.5	3.4	102.1	2.4	101.3	3.7
18	●	ホモシルデナフィル	100.5	2.2	100.0	2.2	100.8	3.7
19	●	チオホモシルデナフィル	99.6	2.3	97.7	2.0	78.3	4.9
20	●	ウデナフィル	99.4	1.7	100.6	1.2	101.2	1.8
21	▲	ノルネオバルデナフィル	107.5	3.8	100.9	2.0	104.6	1.0
22	●	クロロデナフィル	119.1	4.7	101.9	3.6	106.2	2.4
23	■	シス-エント-タダラフィル	110.4	4.3	100.6	2.4	103.9	2.5
24	■	アミノタダラフィル	115.6	3.0	103.1	3.7	104.2	2.4
25	●	N-デスエチルアセチルデナフィル	112.0	3.2	104.5	3.8	87.5	2.9
26	▲	7-デスプロピル 7-メチルバルデナフィル	109.8	3.3	100.2	3.8	102.8	2.2
27	●	ヒドロキシアセチルデナフィル	107.6	3.1	99.8	3.2	66.5	5.8
28	▲	チオバルデナフィル	112.9	4.0	104.0	2.7	99.3	1.5
29	●	ヒドロキシホモシルデナフィル	111.9	3.0	99.2	2.7	105.0	0.8
30	▲	ヒドロキシチオバルデナフィル	112.2	4.1	103.8	4.3	101.5	1.7
31	■	N-デスメチルタダラフィル	94.3	2.5	93.7	9.7	87.0	3.4
32	■	シス-タダラフィル	94.7	2.6	91.3	9.3	87.3	3.2
33	●	ヒドロキシクロロデナフィル	95.6	1.5	92.3	10.0	86.0	3.8
34	■	2-ヒドロキシエチルノルタダラフィル	92.0	4.9	90.1	10.4	88.8	2.7
35	●	ピラゾール N-デメチルシルデナフィル	95.4	3.4	94.7	9.4	88.5	4.9
36	◆	アバナフィル	99.2	1.3	98.4	6.8	96.8	3.0
37	●	メチソシルデナフィル	95.9	2.9	96.4	9.8	90.8	3.9
38	▲	ヒドロキシバルデナフィル	96.6	1.6	93.7	9.7	90.4	4.9
39	●	ギサデナフィル	97.5	1.3	97.7	9.0	93.1	4.2
40	●	ヒドロキシチオホモシルデナフィル	96.6	3.0	96.0	9.8	84.5	5.6

●：シルデナフィル系、▲：バルデナフィル系、■：タダラフィル系、◆：その他の強壯成分

表3 データベース及びライブラリー検索結果

No.	分類	成分名	茶葉	
			データベース検索	ライブラリー検索
4	●	ノルネオシルデナフィル	○	○
5	●	N-デスメチルシルデナフィル	○	○
6	●	アセチルデナフィル	○	○
7	●	シルデナフィル	○	(イソシルデナフィル) *1、*2
9	●	チオシルデナフィル	○	○
10	●	チオアイルデナフィル	○	○
11	●	ゲンデナフィル	○	○
13	●	ピペリアセチルデナフィル	○	○
17	●	イソシルデナフィル	○	○
18	●	ホモシルデナフィル	○	○
19	●	チオホモシルデナフィル	○	○
20	●	ウデナフィル	○	○
22	●	クロロデナフィル	○	○
25	●	N-デスエチルアセチルデナフィル	○	○
27	●	ヒドロキシアセチルデナフィル	○	○
29	●	ヒドロキシホモシルデナフィル	○	○
33	●	ヒドロキシクロロデナフィル	○	○
35	●	ピラゾール N-デメチルシルデナフィル	○	○
37	●	メチソシルデナフィル	○	○
39	●	ギサデナフィル	○	○
40	●	ヒドロキシチオホモシルデナフィル	○	×
1	▲	イミダゾサガトリアジノン	○	○
8	▲	バルデナフィル	○	○
14	▲	ブソイドバルデナフィル	○	○
15	▲	N-デスエチルバルデナフィル	○	○
16	▲	バルデナフィル アセチル アナログ	○	○
21	▲	ノルネオバルデナフィル	○	○
26	▲	7-デスプロピル 7-メチルバルデナフィル	○	○
28	▲	チオバルデナフィル	○	○
30	▲	ヒドロキシチオバルデナフィル	○	×
38	▲	ヒドロキシバルデナフィル	○	○
2	■	デスメチレンタダラフィル	×	×
3	■	クロロプレタダラフィル	○	○
23	■	シス-エント-タダラフィル	○	○
24	■	アミノタダラフィル	×	×
31	■	N-デスメチルタダラフィル	×	×
32	■	シス-タダラフィル	(シス-エント-タダラフィル) *1	(シス-エント-タダラフィル) *1
34	■	2-ヒドロキシエチルノルタダラフィル	×	×
12	◆	キサントアントラフィル	○	○
36	◆	アバナフィル	○	○

●：シルデナフィル系、▲：バルデナフィル系、■：タダラフィル系、◆：その他の強壯成分

*1：（ ）内は誤同定成分

*2：候補No.2としてシルデナフィルを同定

まとめ

無承認無許可医薬品に添加されるおそれのある強壯 40 成分について、LC/Q-TOF-MS による分析法を検討した。移動相に 0.1%ギ酸-0.1%ギ酸含有アセトニトリル混液を用いたグラジエント条件により全成分を良好に分離・検出することができた。また、添加回収試験を行ったところ、回収率は錠試料 92.0～119.1%、液状試料 75.2～104.5%、茶葉 56.0～130.2%と良好な結果が得られた。さらに、強壯成分のデータベース及びライブラリーを構築し、試料に添加した強壯成分の同定を試みた結果、一部のタダラフィル系を除いた 35 成分の同定が可能であった。以上より、本法は、健康食品に添加される恐れのある強壯成分の分析に有用であると考えられた。

参考文献

- 1)厚生労働省：健康被害情報・無承認無許可医薬品情報（2018年12月19日現在）；
<https://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musyounin.html>
- 2)厚生労働省医薬・生活衛生局監視指導・麻薬対策課長通知“医薬品迅速分析法について”平成28年12月2日付け薬生監麻発1202第8号
- 3)竹内浩，林克弘，山本昌宏：無承認無許可医薬品等の一斉分析法の検討．三重県保健環境研究所報 17(60):50-57, 2015.
- 4)Tagami T, Aoyama A, Takeda A, Asada A, Doi T, Kajimura K, Sawabe Y: Simultaneous identification of 18 illegal adulterants in dietary supplements by using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Journal of the Food Hygienic Society of Japan)* 55(1):34-40, 2014.
- 5)武田章弘，淺田安紀子，田上貴臣，土井崇広，皐月由香，梶村計志，沢辺善之：「いわゆる健康食品」に含まれる勃起不全治療効果を示す医薬品成分の分析．大阪府立公衆衛生研究所報 50:19-23, 2012.
- 6)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.
- 7)吹譯友秀，長谷川貴志，芦澤英一，小倉誠，高橋市長，西條雅明，元木裕二：UPLC/PDA によるいわゆる健康食品中の医薬品成分スクリーニング分析法について．千葉県衛生研究所年報 59:79-83, 2010.
- 8)大野春香，棚橋高志，三上栄一，上野英二，猪飼誉友：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．愛知県衛生研究所報 64:33-39, 2014.

Evaluation of a newly-developed detection method using liquid chromatography/quadrupole-time of flight mass spectrometry for medicinal ingredients in so-called health food products advertised as enhancing male sexual performance

Masahiko Tachi, Shunya Kobayashi, Koji Tomita, Takashi Tanahashi,
Minae Watanabe, Yasuko Koike

A newly-developed method for the identification of 40 medicinal ingredients in so-called health food products for sexual enhancement was examined. The chromatographic separation of these analytes was achieved using gradient elution with mobile phases of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile. The recoveries from health food product samples were 92.0-119.1% from tablet sample, 75.2-104.5% from liquid sample and 56.0-130.2% from leaf tea sample, and the relative standard deviations of the recoveries were equal or less than 11% for all samples, which indicates an acceptable level of reproducibility. Furthermore, database and library searches were applied to all 40 medicinal ingredients tested as above. As a result, all analytes except for a few tadalafil analogues were identified. These results suggest that the developed method is applicable to the routine analysis of medicinal ingredients for sexual enhancement in health food products.

Key words : LC/Q-TOF-MS, analytical chemistry, health food product,
sexual enhancement

調 査 研 究

体積計の使用に伴い生じる誤差について

加藤千佳、猪飼誉友¹、棚橋高志、小池恭子

¹(現所属)中部大学応用生物学部

要 旨

理化学検査で汎用する様々な材質の器具及び計量対象溶媒について、温度影響による計量誤差を調査し、その結果から各条件で希釈操作を行った際の精度と調製濃度の誤差を算出した。その結果、体積計の計量誤差を極力抑えるには、①原則ガラス製器具を使用する、②試料は室温に戻す(有機溶媒は特に注意を払う)、③希釈操作時は可能な限り小容量器具の使用を避けるべきであることが示唆された。

キーワード：体積計、誤差

序 文

水質検査をはじめとする理化学分析を実施するにあたって、計量は結果の根幹を成す重要な操作であり、その誤差について知ることは正確な分析結果を得るためには欠かせない。計量誤差にはまず、検査者の手技による誤差、計量器具による誤差、計量対象溶媒による誤差が考えられる。さらに検査室の環境、例えば温度による器具の膨張収縮、計量対象溶媒の密度変化等も誤差の要因となると考えられる。

日本工業規格(JIS)により、汎用されるガラス製体積計の目盛は20℃の水を測定したときの体積とされている¹⁾が、それ以外の使用条件ではどの程度の誤差を生じるかはあまり知られていない。今回、理化学検査の定量分析において標準物質の希釈等、精度と正確性が重要な操作で汎用される全量フラスコ、全量ピペット及びピストン式ピペットの三種類の体積計について、個々のバラツキや計量対象溶媒の温度により生じる誤差について検討した。

方 法

1 計量対象溶媒

調査に使用した水は超純水製造装置(NANOpure Diamond UV、Thermo Fisher Scientific、USA)を用いて精製した。

メタノールは富士フィルム和光純薬工業の特級を用いた。

2 使用器具、装置

全量フラスコはガラス製100 mL(カスタム A、柴田科学)、ポリプロピレン(PP)製100 mL(A社:サンプラテック、B社:Nalgene、USA)、フッ素樹脂(PFA)製100 mL(VITLAB、Germany)各10本を使用した。

全量ピペットはガラス製10 mL(柴田科学)、1 mL(柴田科学、イワキ)各20本を使用した。

ピストン式ピペットは可変式100-1000 μ L用及び1-5 mL用(フィンピペット、Thermo Fisher Scientific、USA)、を使用した。

計量には電子天秤(RC210S、ザルトリウス、Germany)を、超音波脱気には超音波洗浄装置(UT-105、SHARP)を、溶媒の温度管理には恒温槽(MIR-154-PJ、パナソニック)

を使用した。

3 各種器具による分取量

1) 全量フラスコ

予め重量を測定した空フラスコの標線付近まで溶媒を充填し、水流アスピレーターで減圧しながら超音波洗浄装置中で脱気した。これを 10、20、30℃に設定した恒温槽内に約 1 日静置し、十分温度が安定した状態で速やかにメニスカスを合わせ密栓した。天秤室に静置し室温に戻した後、重量を測定し、溶媒を充填する前後の重量差から、それぞれの温度で全量フラスコにより計量された溶媒の重量を求めた。室温より低温の試料の際は特に、外壁につく水滴が完全に乾いたことを確認した後計量を行った。

2) 全量ピペット

10、20、30℃に設定した恒温槽内に静置した溶媒を全量ピペットで分取し、その重量を測定した。溶媒の温度と室温に差がある場合、ピペットから伝わる熱により分取する溶媒の密度が変化し、正確な測定ができないため、溶媒を標線より高く吸い上げ、一旦保持した後に捨てる操作を 2、3 回繰り返す、ピペットの温度を溶媒温度に近づけてから操作を行った。また、計量した溶媒を開放容器に取り重量測定を行うと、測定までの間に溶媒が揮散し正確な重量が求められないため、ピペットで計量した溶媒は予め重量測定した蓋付容器に取り、前後の重量差から、分取した溶媒の重量を求めた。

3) ピストン式ピペット

全量ピペットの場合と同様に、蓋付容器へ 10、20、30℃に管理した溶媒を分取し、その重量を測定した。分取操作ではプレリンスを行わず、同じチップで分取操作を 20 回連続して行った。また、今回使用前に校正は行わなかった。

4 データの比較

上記の方法で測定した溶媒の重量を 20℃でのそれぞれの密度（水：0.99823 g/cm³ ²⁾、メタノール：0.97293 g/cm³）で除して 20℃における体積（mL）に換算し、分取量等を比較した。なおメタノールの密度は 2 L 全量フラスコを用い、当所にて算出した。

20℃における溶媒の体積（mL）＝

$$\frac{\text{設定温度で分取した溶媒の重量 (g)}}{20\text{℃での溶媒の密度}}$$

結果及び考察

各種器具による水及びメタノールの分取量の温度ごとの平均値と相対標準偏差 (RSD) を表 1、2 に示した。また、各種器具による分取量の個体間のバラツキを図 1-3 に示した。

1 器具による誤差

器具によるバラツキを表 1 のうち JIS で

表 1 各種器具による水分取量の温度影響

器具	容量	平均分取量 mL (RSD %)						
		10℃		20℃		30℃		
全量フラスコ (各 n=10)	ガラス製	100.05	(0.03)	99.91	(0.03)	99.67	(0.03)	
	PP 製	A 社	100.03	(0.18)	100.25	(0.19)	100.32	(0.21)
		B 社	99.95	(0.09)	100.27	(0.08)	100.41	(0.08)
	PFA 製	99.68	(0.28)	99.81	(0.28)	99.94	(0.28)	
全量ピペット (各 n=20)	1 mL	1.001	(0.37)	1.002	(0.39)	1.000	(0.37)	
	10 mL	10.00	(0.14)	9.98	(0.13)	9.97	(0.14)	
ピストン式ピペット (各 n=17)	100-1000 μL 用	0.969	(0.11)	0.989	(0.11)	1.010	(0.10)	
	1-5 mL 用	1.003	(0.44)	1.019	(0.17)	1.037	(0.20)	

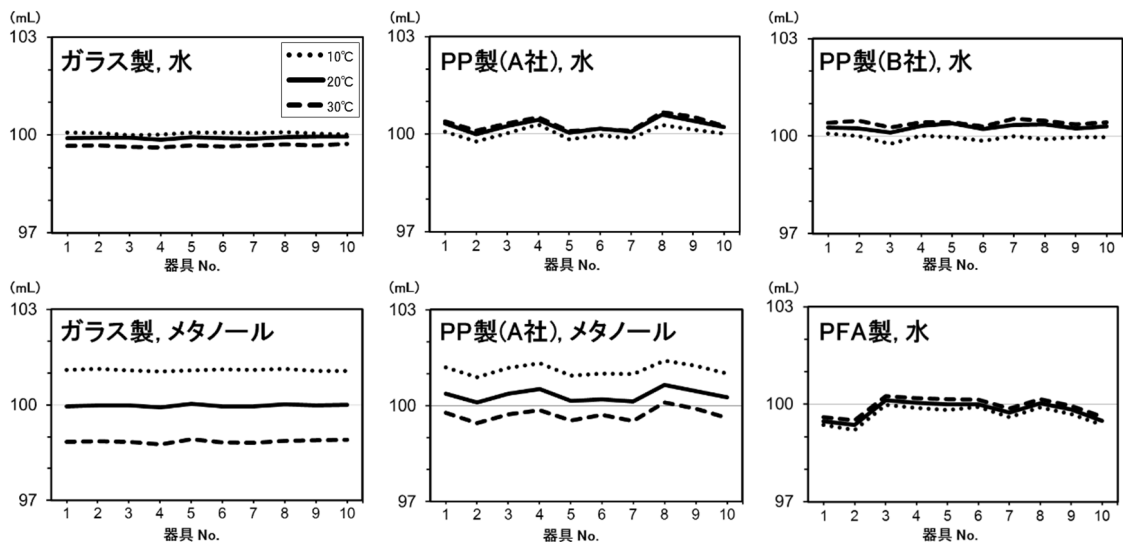


図1 全量フラスコの個体間のばらつき

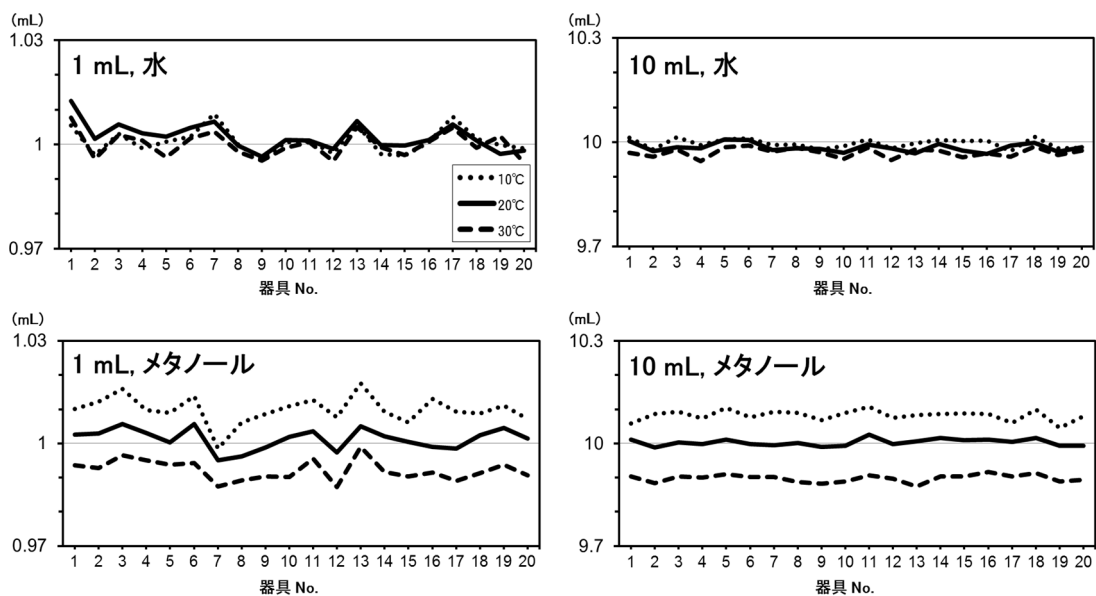


図2 全量ピペットの個体間のばらつき

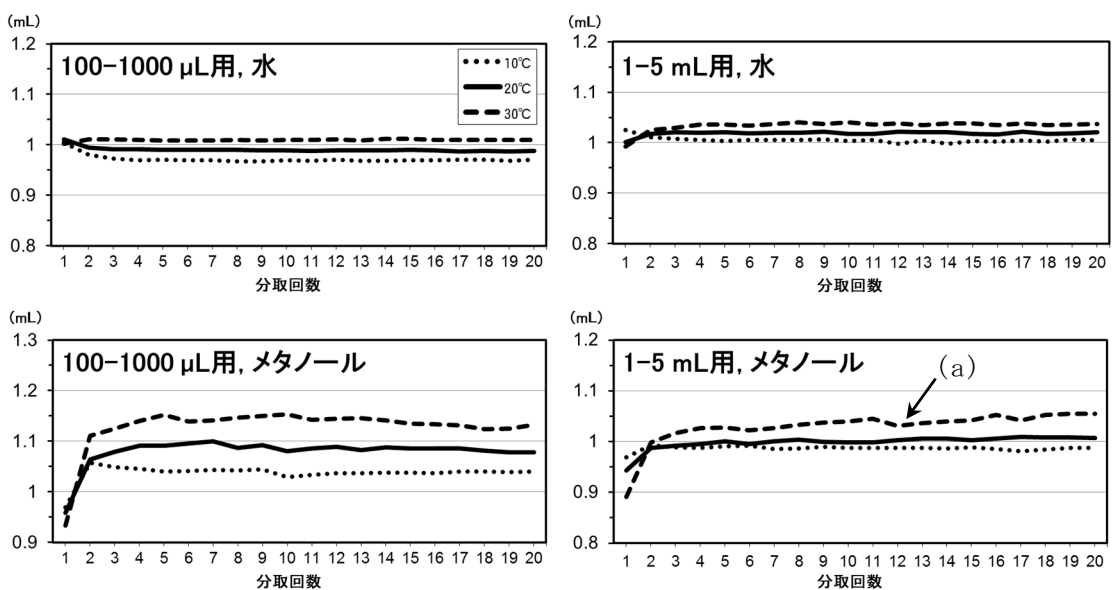


図3 ピストン式ピペットの分取回数による分取量の変化 (1 mL 分取時)

※分取時の室温：18～20℃ (100-1000 µL用、水のみ 26～28℃)

規定されている 20℃において、水を分取した際の RSD により比較した。

全量フラスコの場合、図 1 から明らかなように、材質、メーカーにより個体差の程度が大きく異なった。ガラス製は RSD 0.03% とバラツキが小さかったが、それに比べると樹脂製は個体差が大きく、中でも PFA 製は RSD 0.28% とバラツキが大きかった。今回使用した器具はいずれも 5 年以上使用中であるため、長年の使用に伴う変形や傷により分取量の誤差が大きくなった可能性が考えられるが、正確な分取のためには、吸着、溶出等のやむを得ない場合を除いては、ガラス製の全量フラスコを使用することが適当と考えられた。

全量ピペットについては、1 mL に比べ 10 mL は相対標準偏差が小さく、精度が高かった。器具個体間のバラツキを示した図 2 のうち、1 mL ピペットの結果を見ると、どの温度でも同じような容量の傾向がみられた。今回、同種の器具のバラツキの実験は同一人物が実施しており、手技によるバラツキよりも器具個体間のバラツキの方が大きいことが認められた。

ピストン式ピペットで 20℃水を分取した際の相対標準偏差（4 回目以降 n=17）を見ると、1 mL 分取する際は、1-5 mL 用（RSD 0.17%）でなく 100-1000 μL 用（RSD 0.11%）を使用した方がバラツキが少なく

なり、器具の許容誤差に沿う結果であった。分取回数による分取量変化（図 3）を見ると、ピペットの種類、対象溶媒によらず、分取操作の始め数回は分取量が大きく変動し、操作を続けると次第に分取量が安定することが確認された。今回の実験では分取の際に行うべきプレリンス操作をあえて省いており、分注前に数回吸排を繰り返すことの必要性が明らかとなった。メーカーでは分注前に少なくとも 3 回吸排を繰り返すことを推奨しておりこれを支持する結果であった。

2 計量対象溶媒に起因する誤差

20℃における水とメタノールの分取量を表 1、2 により比較すると、全量フラスコ、全量ピペットについては分取量平均の差が 0.2% 以下であったが、ピストン式ピペットでは計量対象溶媒により分取量が大きく異なった。特に 100-1000 μL 用による 20℃水の分取量の平均値（4 回目以降 n=17）は 0.989 mL、20℃メタノールは 1.087 mL であり、メタノールの分取量には 10% に近い誤差が認められた。これは、溶媒密度により液面とピストン間に存在する空気の体積が変化するためだと考えられる。ピストン式ピペットを使用する際は使用する溶媒ごとに校正を行う必要があることが示唆された。

表 2 各種器具によるメタノール分取量の温度影響

器具	容量	平均分取量 mL (RSD %)		
		10℃	20℃	30℃
全量フラスコ (各 n=10)	ガラス製	101.09 (0.03)	99.98 (0.03)	98.85 (0.05)
	PP 製 A 社	101.12 (0.17)	100.32 (0.18)	99.72 (0.20)
全量ピペット (各 n=20)	1 mL	1.010 (0.40)	1.001 (0.31)	0.992 (0.31)
	10 mL	10.08 (0.16)	10.00 (0.10)	9.90 (0.11)
ピストン式ピペット (各 n=17)	100-1000 μL 用	1.039 (0.38)	1.087 (0.54)	1.140 (0.76)
	1-5 mL 用	0.987 (0.26)	1.003 (0.44)	1.039 (1.01)

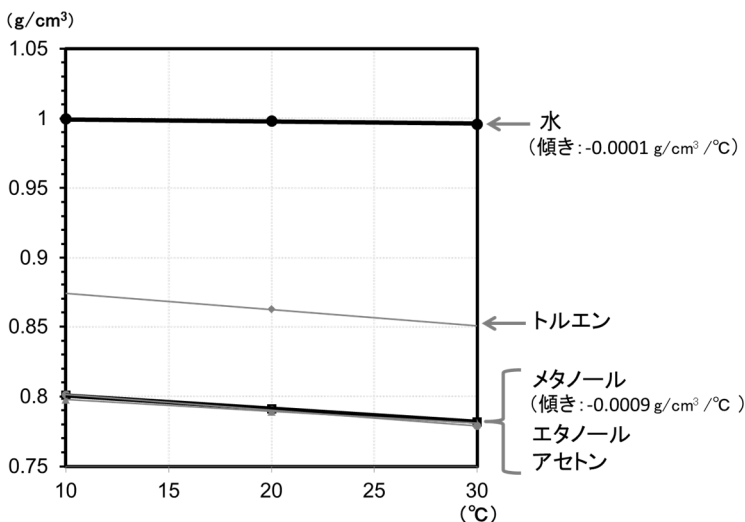
3 温度による誤差

1) 器具の温度影響

全量フラスコで水を分取した際の結果について、分取時の温度における密度（10℃：0.999868 g/cm³、30℃：0.995637 g/cm³）²⁾で補正し、器具の温度影響を比較した結果を表3に示した。今回検討した10℃から30℃において、ガラス製は分取量が温度によりほとんど変化しない（10℃の温度変化あたり約0.02 mL）のに対し、樹脂製は温度による分取量変化が大きかった（PP製A社：約0.35 mL、B社：約0.45 mL、PFA製約0.34 mL）。これは材質の熱膨張率の違いが影響していることが考えられ、樹脂製は温度の影響を受けやすく、膨張収縮により容量が変化することが確認された。

表3 全量フラスコの容量変化(各 n=10)

		平均容量 (mL)		
		10℃	20℃	30℃
ガラス製		99.89	99.91	99.93
PP製	A社	99.87	100.25	100.58
	B社	99.78	100.27	100.67
PFA製		99.51	99.81	100.20



※参考：産業技術総合研究所 分散型熱物性データベース

図4 温度による溶媒の密度変化

2) 計量対象溶媒の温度影響

100 mL ガラス製全量フラスコの10℃の温度変化あたりの分取量の差は、表1、2に示したように、水が約0.2 mLであるのに対し、メタノールは約1.1 mLであり、水の約5倍であることが観察された。全量ピペットでも同様にメタノールで顕著な温度影響が確認された。これはメタノールの温度に対する密度変化が大きいためと考えられる。汎用する溶媒の温度と密度について、AIST分散型熱物性データベース²⁾のデータを図4に示した。エタノールやアセトン等他の有機溶媒も温度影響が大きいことが推察される。

ピストン式ピペットでは水分取時でも温度影響が大きく、10℃の温度変化あたり、設定容量の約2%の誤差が発生することが確認され（表1）、メタノールではその誤差は約5%に拡大することが認められた（表2）。また図3(a)に示すように、1-5 mL用ピストン式ピペットによる30℃メタノールの分取では不安定な分取が長く続き、分取量が安定するのにより多くのプレリンスが必要であった。

ピストン式ピペットでの分取初めに見られる変動には図5(a)に示すように、主に

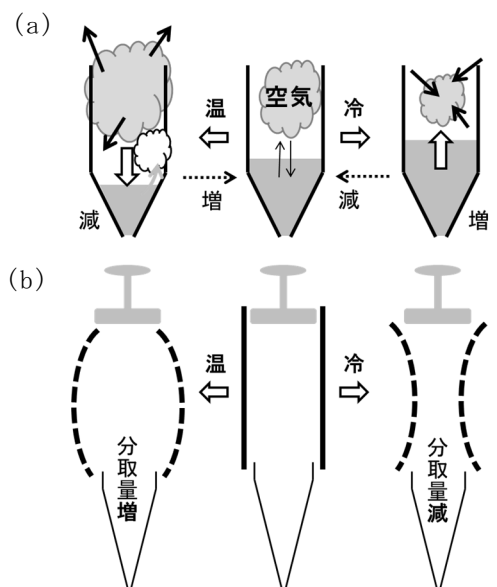


図5 ピストン式ピペットの温度影響

チップ内空気の膨張収縮と試料溶媒の揮発が関わる。高温試料を分取する際には、試料の温度が空気と液体の境界面を通して空気に伝わり、チップ内の空気が膨張する。特に有機溶媒では、飽和状態になるまで溶媒が揮発し、チップ内空気の体積が増大することで内圧が高くなり、試料がチップ内から押し出されることで分取量が減少する。低温試料は逆にチップ内空気の体積が減少することでチップ内に試料が引き込まれ、分取量が増加する。分取を続けるとチップ内の空気温度や蒸気圧が平衡状態となり、体積変化が小さくなることで分取量が安定する。そのため、チップ内に間隙が多い大容量ピペットは、分取量安定までに必要なプレンス回数が増加することが考えられる。

分取量の温度誤差については、図 5 (b) に示すようにシリンジの材質である合成樹脂の膨張収縮が関わる。高温試料を分取した場合、試料の温度が空気を介してシリンジ部分へ伝わり、その熱によりシリンジが膨張し、径が太くなる。すると同じ距離で

ピストンを動かした場合、より多くの空気を吸い上げられる、すなわち分取量が増える。低温試料は逆にシリンジが収縮し、径が細くなることで分取量が減少する。以上より、ピストン式ピペットはシリンジに熱膨張率の大きい合成樹脂が使われているため、温度の影響が大きく、注意が必要であると考えられる。

4 希釈方法と誤差の試算

今回得られた各種器具による水及びメタノールの分取量の平均値と RSD を用いて、1000 ppm の原液から 10 ppm の希釈液を 100 mL 調製する際の誤差を試算した。原液温度は冷蔵庫から出して直ぐに分取したことを想定した 10°C と、室温に戻したことを想定した 20°C とした。分取した原液は、全量フラスコで 20°C の溶媒を用いてメスアップし、得られた溶液は原液温度によらず 20°C であると仮定した。操作全体の RSD は、各操作の RSD の二乗和の平方根（ボトムアップ法）により求めた。表 4 に示す試算結果より、水についてはピストン式ピペットを

表 4 希釈方法と誤差の試算結果

原液 温度	希釈 回数	使用器具		調製濃度平均 ppm (RSD%) ^{*1}	
		全量フラスコ	ピペット	水	メタノール
10°C	1 回 ^{*2}	ガラス製	1 mL 全量	10.02 (0.37)	10.10 (0.40)
		ガラス製	100-1000 μL 用ピストン式 ^{*4}	9.81 (0.11)	9.52 (0.38)
		PP製	100-1000 μL 用ピストン式 ^{*4}	9.78 (0.22)	9.49 (0.42)
	2 回 ^{*3}	ガラス製	10 mL 全量	10.00 (0.19)	10.09 (0.19)
20°C	1 回 ^{*2}	ガラス製	1 mL 全量	10.03 (0.39)	10.02 (0.31)
		ガラス製	100-1000 μL 用ピストン式 ^{*4}	10.01 (0.11)	10.00 (0.53)
		PP製	100-1000 μL 用ピストン式 ^{*4}	9.98 (0.22)	9.97 (0.61)
	2 回 ^{*3}	ガラス製	10 mL 全量	9.99 (0.18)	10.01 (0.15)

※1：ボトムアップ法により算出： $\sqrt{(\text{分取操作の RSD})^2 + (\text{メスアップ操作の RSD})^2} \times 100$

※2：100 倍希釈を 1 回 (1 mL→100 mL)

※3：10 倍希釈を 2 回 (10 mL→100 mL
↳10 mL→100 mL)

※4：20°C で 1.00 mL に校正したと仮定

除くと、温度影響はほとんどないが、メタノールはすべての希釈方法で、顕著な温度影響がみられた。希釈回数について全量ピペットを使用した2つの例をみると、RSDは2回希釈の方が小さくなった。この差は全量ピペットの誤差の大きさが影響しており、希釈操作が増えても1 mL全量ピペットを使用するより、10 mL全量ピペットを使用した方が精度が高いという結果となった。今回得られた数値は検査者の手技による誤差を含んだものであるが、分取操作やメスアップ操作の精度が悪い場合は同様の結果になるとは限らない。また、使用器具を比べると、ピストン式ピペットは温度影響を最も大きく受けることが認められ、使用する際は校正時の温度、溶媒との違いにより、分取量が大きく変化することに留意すべきであると考えられる。

まとめ

器具、計量対象溶媒、温度影響による体積計の計量誤差を調査し、得られた個々のデータを図 1-3 に示した。また、参考として今回使用した器具の許容誤差 (JIS) を表 5 にまとめた。

得られたデータを基に、各種器具により希釈液を調製した場合の誤差について試算

を行った結果、器具の使用に伴う具体的な誤差の程度が明らかとなった。正確かつ精度の高い試料を調製するためには、対象物質の吸着や溶出が分析に影響するようなやむを得ない場合を除いてはガラス製器具を使用すること、計量対象溶媒は室温に戻してから使用し、有機溶媒には特に注意を払うこと、希釈する際は小容量の器具を可能な限り使用しないことが重要であると考えられる。また、定期的に器具の正確な分取量を確認し、使用する器具の選定を行うことも正確な計量へ繋がると考えられる。

また、今回の実験は、器具の使用に細心の注意を払い操作を行った結果であるが、検査者の熟練度や理解度によって誤差はさらに拡大することも考えられる。正確かつ精度のよい計量を行うには、検査者全員が正しい操作法を習得し、手技によるバラツキを最小限にすることが重要である。

文 献

- 1) JIS R 3505:1994, ガラス製体積計
- 2) 国立研究開発法人産業技術総合研究所: 分散型熱物性データベース; <https://tpds.db.aist.go.jp/>
- 3) JIS K 0970:2013, ピストン式ピペット

表 5 使用器具の許容誤差 (JIS^{1,3)})

	呼び容量	許容誤差	
ガラス製全量フラスコ	100 mL	±0.1 mL	
	1 mL	±0.01 mL	
ガラス製全量ピペット	10 mL	±0.02 mL	
	公称容量	最大許容系統誤差	最大許容偶然誤差
ピストン式ピペット	1000 μL	±8 μL	±3 μL
	5000 μL	±40 μL	±15 μL

Measurement error observed when using a volumeter

Chika Katou, Yoshitomo Ikai¹, Takashi Tanahashi, Yasuko Koike

¹ Present affiliation: College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

Pipetting and dilution with a volumetric flask are ones of essential procedures for quantitative analysis. Knowing how errors occur during measurement is important to obtain an accurate result, the error originated from instrument, solvent and temperature were studied. Accuracy and concentration deviations occurring during diluting in various conditions were calculated. In conclusion, three key points to decrease measurement error when using volumeters are 1)Use primarily a glass volumeter in principle, 2)Let sample come to room temperature before measurement, 3)Avoid using small capacity volumeters as possible.

Key words : volumetric apparatus, measurement error

他誌掲載論文抄録

A one-month-old boy with a seizure during a febrile illness

Muto T¹, Nago M¹, Kurahashi H¹, Minagawa H, Okumura A¹

¹Aichi Medical University

Clinical Pediatrics 57(3):355-357, 2018

トピックス 1 2018年の麻しん流行を経験して i. もう一度麻しんを見直す
-愛知県衛生研究所から-

皆川洋子

愛知県小児科医会会報 108 : 3-9, 2018

2018年4月に、沖縄で感染後に愛知県内で発症した10代患者を発端者とする麻しんの流行について、愛知県において感染症発生動向調査病原体検索を担当する立場か

ら、今回のアウトブレイクにおける感染伝播状況および検出されたウイルス検査情報をふまえ、麻しんおよび風しん対応について考察した。

I 総論 11 地方衛生研究所の役割

皆川洋子

日本臨床ウイルス学会編 ウイルス検査法 臨床と検査室のための手引き : 70-77, 2018

地方衛生研究所におけるウイルス検査の位置づけ、感染症発生動向調査(NESID)、感

染症流行予測調査(NESVPD)、今後地衛研が担うウイルス検査について概説した。

Emergence of new recombinant noroviruses GII.P16-GII.2 and GII.P16-GII.4 in Aichi, Japan, during the 2016/17 season

Hata M, Nakamura N, Kobayashi S¹, Onouchi A, Saito T, Hirose E, Adachi H, Saito N, Ito M, Yasui Y, Matsumoto M, Minagawa H

¹Aichi Food Hygiene Center

Japanese Journal of Infectious Diseases 71(4):319-322, 2018

During the 2016-2017 season, new recombinant norovirus, GII.P16-GII.2 and GII.P16-GII.4 emerged in Aichi Prefecture. GII.P16-GII.2 was identified as the cause of 17(71%) of the 24 foodborne outbreaks in the season. The capsid gene sequence of GII.2 displays several amino acid

substitutions in the P2 domain known to be responsible for antigenic specificity. Amino acid changes in GII.P16 RdRp were consistent in both GII.2 and GII.4 capsid strains, indicating common ancestor of the GII.P16.

麻疹・風疹疑い例の中に混在する他のウイルス感染症

安達啓一、安井善宏、皆川洋子

臨床とウイルス 46(1):33-39, 2018

近年予防接種率の向上に伴ってわが国の麻疹、風疹の患者は減少し、麻疹や風疹をみたことのない小児科医も珍しくなくなった。しかし、現在でも麻疹ウイルスや風疹ウイルスが地域社会に入り込むと集団発生を引き起こすことは、最近の事例をみても明らかである。麻疹及び風疹疑い事例が発生すると、地方衛生研究所は健康危機事例対応の一環として、行政上必要な実験室診断を担当することとなり患者検体からウイルス遺伝子検出及びウイルス分離を試みる。われわれは、臨床的に麻疹又は風疹を疑わ

れて保健所より愛知県衛生研究所にウイルス検査を依頼されたが当該ウイルスが検出されなかった症例について、他の病原ウイルス検索を試みた。その結果、伝染性紅斑の病原体として知られるパルボウイルス B19 はじめ、発疹症に関連する様々なウイルスを検出した。発疹症の病原診断は、麻疹と風疹に限らず臨床症状のみでは困難な場合も少なくないと考えられ、とくに空気や飛沫を介して伝播可能なウイルスについて、実験室診断の重要性が確認された。

麻疹の抗体保有状況—平成 29（2017）年と感染症流行予測調査（暫定結果）

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

¹ 国立感染症研究所感染症疫学センター、² 国立感染症研究所ウイルス第三部
病原微生物検出情報 39(4):61-62, 2018

感染症流行予測調査における麻疹の感受性検査は 1978 年度からほぼ毎年実施されている。乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層を対象とし、予防接種状況ならびに抗体保有状況について調査を行っている。2017 年度はわが国における麻疹排除認定（2015 年 3 月）2 年後の調査となり、抗体保有状況調査は今後の麻疹対策および麻疹排除の維持を継続していく上で重要である。

2017 年度の調査において、麻疹の抗体保

有率は 2015 年度調査以降、3 年連続で 2 歳以上のすべての年齢／年齢群で 95% 以上を示し、高い抗体保有率が維持されていた。一方、すべての年齢層に PA 抗体価 1:128 未満の低い抗体価の者が存在することから、麻疹の排除状態を維持するため、引き続き麻疹患者が 1 人発生した時の迅速な感染拡大予防策に加え、渡航前の麻しん含有ワクチンの接種ならびに高い予防接種率・抗体保有率の維持が重要である。

平成 28 年度ポリオ環境水サーベイランス（感染症流行予測調査事業および調査研究）にて検出されたエンテロウイルスについて

吉田 弘¹、愛知県衛生研究所他（ポリオ環境水サーベイランス協力地衛研）

¹ 国立感染症研究所ウイルス第二部

病原微生物検出情報 39(4):67-69, 2018

経口生ポリオワクチン(OPV)に代わる定期接種用ワクチンとして、わが国では2012年9月より不活化ポリオワクチン(IPV)を導入した。そして2013年度より、輸入が想定されるポリオウイルスを効率よく監視する環境水サーベイランスを感染症流行予測調査事業（感染源）および各地方衛生研究所による調査研究として開始することとなった。本調査では2016年1月～2017年3月の間、月1回の頻度で流入下水を採取した。なお事業として16カ所、調査研究として2カ所、計18カ所の地衛研の協力を得ており、調査対象地域の下水道利用人口は合計約600万人である。（本年度より1カ所

調査地点が変更になっている）平成28年度感染症流行予測調査事業実施要領に基づき、流入下水を陰電荷膜法にて濃縮（50～100倍）し、ウイルス分離・同定を行った。平成28年度の調査期間において、1カ所の調査地点から3型ポリオウイルス（ワクチン株）が7月に検出された。その後、同地点にて検出されていないことから、輸入による一過性の検出と考えられた。その他、環境水からは主にエンテロウイルスB群に属するウイルス（E-6、CV-B5など）が検出された。今後も感染症発生動向調査の結果と組み合わせ質の高いポリオウイルスの監視を継続する必要がある。

2017/18 シーズンのインフルエンザ分離株の解析

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

¹ 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

病原微生物検出情報 39(11):184-189, 2018

2017/18 シーズンのインフルエンザは、2017年第47週に定点当たりの報告が1を超え、流行期に突入した。これは前シーズンとほぼ同様の流行入りであった。国内のインフルエンザウイルスの流行はA(H1N1)pdm09、A(H3N2)およびB型の混合流行であったが、B型山形系統が流行の主流であった。国立感染症研究所では2017/18 シーズンに全国の地方衛生研究所

で分離および型・亜型同定されたウイルスの約10%について分与を受け、ヘマグルチニン遺伝子系統樹解析、抗原性解析および抗インフルエンザ薬耐性の検出と性状解析を行った。2018年2月以降B型ビクトリア系統のウイルスからは抗原性が変化（多くは2アミノ酸欠損）した分離株の割合が増加していた。

2016/17シーズンのインフルエンザ予防接種状況および2017/18シーズン前のインフルエンザ抗体保有状況－2017年度感染症流行予測調査より

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

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

病原微生物検出情報 39(11):193-195, 2018

インフルエンザ感受性調査はインフルエンザの全国的流行が始まる前にインフルエンザに対する国民の抗体保有状況を把握し、抗体保有率が低い年齢層に対する注意喚起等を目的としている。調査の結果、A(H1N1)pdm09 亜型では 10 歳～24 歳、

A(H3N2)亜型では 5 歳～19 歳、B 型（山形系統）では 15～34 歳の抗体保有率が他の年齢層と比較して高い傾向が見られた。また、0～4 歳群および 65 歳以上の年齢群における抗体保有率は相対的に低い傾向が見られた。

Distribution and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* International Clone II Lineage in Japan

Matsui M¹, Suzuki M¹, Suzuki M, Yatsuyanagi J², Watahiki M³, Hiraki Y⁴, Kawano F⁴, Tsutsui A¹, Shibayama K¹, Suzuki S¹

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 62(2):e02190-17, 2018

¹Antimicrobial Resistance Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan, ²Akita Prefectural Institute of Public Health, Akita, Japan, ³Department of Bacteriology, Toyama Institute of Health, Toyama, Japan, ⁴Department of Infection Control Unit, National Hospital Organization Kumamoto Medical Center, Kumamoto, Japan

Multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter* spp. have been globally disseminated in association with the successful clonal lineage *Acinetobacter baumannii* international clone II (IC II). Because the prevalence of MDR *Acinetobacter* spp. in Japan remains very low, we characterized all *Acinetobacter* spp. ($n = 866$) from 76 hospitals between October 2012 and March 2013 to describe the entire molecular epidemiology of *Acinetobacter* spp. The most prevalent species was *A. baumannii*

($n = 645$; 74.5%), with *A. baumannii* IC II ($n = 245$) accounting for 28.3% of the total. Meropenem-resistant isolates accounted for 2.0% ($n = 17$) and carried IS*Aba1-bla*_{OXA-23-like} ($n = 10$), *bla*_{IMP} ($n = 4$), or IS*Aba1-bla*_{OXA-51-like} ($n = 3$). Multilocus sequence typing of 110 representative *A. baumannii* isolates revealed the considerable prevalence of domestic sequence types (STs). *A. baumannii* IC II isolates were divided into the domestic sequence type 469 (ST469) ($n = 18$) and the globally

disseminated STs ST208 ($n = 14$) and ST219 ($n = 4$). ST469 isolates were susceptible to more antimicrobial agents, while ST208 and ST219 overproduced the intrinsic AmpC β -lactamase. *A. baumannii* IC II and some *A. baumannii* non-IC II STs (e.g., ST149 and ST246) were associated with fluoroquinolone resistance. This study revealed that carbapenem-susceptible *A. baumannii* IC II was moderately

disseminated in Japan. The low prevalence of acquired carbapenemase genes and presence of domestic STs could contribute to the low prevalence of MDR *A. baumannii*. A similar epidemiology might have appeared before the global dissemination of MDR epidemic lineages. In addition, fluoroquinolone resistance associated with *A. baumannii* IC II may provide insight into the significance of *A. baumannii* epidemic clones.

Effects of processing and cooking on the reduction of dinotefuran concentration in Japanese rice samples

Watanabe M, Ueyama J¹, Ueno E, Ueda Y¹, Oda M¹, Umemura Y, Tanahashi T, Ikai Y, Saito I²

¹Department of Pathophysiological Laboratory Science, Field of Radiological and Medical Laboratory Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine,

²Food Safety and Quality Research Center, Tokai COOP Federation

Food Additives & Contaminants: Part A 35:1316-1323, 2018

Dinotefuran is an insecticide belonging to the neonicotinoid class, which is frequently used to control pests in paddy rice owing to its permeability and effectiveness against sucking insects. In this study, the effects of processing and cooking on the reduction of dinotefuran residues in commercially available brown rice were investigated. Boiled rice is difficult to homogenize and extract with acetonitrile. Using pre-freezing and cryogenic milling with powdered dry ice, dinotefuran in boiled rice was extracted well. Even after polishing, washing, and boiling, dinotefuran was detected in 10 brown rice samples, with mean residue levels of 74.7%, 60.8%,

and 39.6%, respectively, of the original concentration in brown rice. Based on these data, the processing factor of dinotefuran in boiled rice has been estimated to be approximately 0.4. Dinotefuran residues were reduced in the boiled rice, but less so than other pesticides. Although the maximum daily intake of dinotefuran in boiled rice was 0.0065 mg/person/day, its percent ratio to the acceptable daily intake of dinotefuran in Japan was less than 0.05%. These results suggest that the daily intake of dinotefuran from rice might not be a critical problem at present, in spite of its relatively high detection frequency in boiled rice.

Densification of cyanobacteria from a lake leading to production of β -cyclocitral and related volatile organic compounds and species change

Arii S¹, Tsuji K², Tomita K, Hasegawa M¹, Yamashita R¹, Bober B^{1,3}, Harada K¹

¹Graduate School of Environmental and Human Science and Faculty of Pharmacy, Meijo University, ²Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, ³Department of Plant Physiology and Development, Jagiellonian University

Phycological Research 66(3):161-166, 2018

The purpose of the present study was to demonstrate that the lysis with the blue color formation was caused by densification of the cyanobacteria, and related events of the species change in the cyanobacteria were induced by the resulting volatile organic compounds (VOCs), particularly β -cyclocitral. In order to obtain a high cell density of cyanobacteria in the laboratory, a concentration technique (graduated cylinder method) using the buoyancy of the gas vesicles was successfully used. The collected scum contained mainly *Dolichospermum* spp. and *Microcystis*, and the dispersed cyanobacteria were concentrated in the surface layer after several hours and the concentration ratio became approximately 10. The concentrated cyanobacteria were gradually lysed, while some of the cyanobacteria sank to the

bottom, which finally died and disappeared. This method has the additional advantage that it is possible to visualize the entire lysis process. During the concentration process, β -cyclocitral and its oxidation products together with β -ionone were significantly detected. Because β -cyclocitral was easily oxidized to the corresponding carboxylic acid, the pH of the water in the graduated cylinder decreased to approximately 6. Under favorable conditions, lysis with the blue color from phycocyanin could be observed due to the acid stress. Overall, the results of the present study were consistent with the hypothesis that VOCs were produced when the cyanobacteria are highly dense, and that the lysis with the blue color formation occurs due to the higher density.

器具・容器包装における蒸発残留物試験の試験室間共同試験（第1報）

大野浩之¹、六鹿元雄²、阿部智之³、阿部裕²、天野保希⁴、石原絹代⁵、大坂郁恵⁶、大野春香、大野雄一郎⁷、尾崎麻子⁸、柿原芳輝⁹、小林尚¹⁰、櫻木大志¹、柴田博¹¹、城野克広¹²、関戸晴子¹³、高坂典子¹⁴、竹中佑¹⁵、但馬吉保¹⁶、田中葵¹⁷、田中秀幸¹²、外岡大幸¹⁸、中西徹⁵、野村千枝⁸、羽石奈穂子¹⁹、早川雅人²⁰、三浦俊彦²¹、山口未来²、渡辺一成²⁰、佐藤恭子²

¹名古屋市衛生研究所、²国立医薬品食品衛生研究所、³(公社)日本食品衛生協会、⁴長野県環境保全研究所、⁵(一財)日本食品分析センター、⁶埼玉県衛生研究所、⁷(一財)千葉県薬剤師会検査センター、⁸(地独)大阪健康安全基盤研究所、⁹(一財)日本穀物検定協会、¹⁰(一財)食品分析開発センターSUNATEC、¹¹(一財)東京顕微鏡院、¹²(国研)産業技術総合研究所、¹³神奈川県衛生研究所、¹⁴(一財)食品薬品安全センター秦野研究所、¹⁵(一財)日本文化用品安全

試験所、¹⁶(一財)食品環境検査協会、¹⁷(一社)日本海事検定協会、¹⁸さいたま市健康科学研究センター、¹⁸(国研)産業技術総合研究所、¹⁹東京都健康安全研究センター、²⁰(一財)化学研究評価機構、²¹(一財)日本食品検査
食品衛生学雑誌 59(1):55-63, 2018

水、4%酢酸および20%エタノールの3種類の浸出用液で調製した試験溶液を用い、器具・容器包装の蒸発残留物試験における試験室間共同試験を行い、公定法と公定法変法の性能を評価した。試験には23機関が参加し、濃度非明示の試験溶液9種類の蒸発残留物量を測定した。蒸発乾固の際の加熱装置として、公定法では水浴を、公定法

変法ではホットプレートを使用した。ほとんどの試験機関では、蒸発乾固の際、試験溶液を乾固直前まで加熱したのち、余熱で乾固させていた。その結果、加熱装置にかかわらず、両法の性能には大きな差はないことが判明した。それにより、公定法変法は公定法と同様に規格試験法として適用できると判断された。

器具・容器包装における蒸発残留物試験の試験室間共同試験（第2報）

大野浩之¹、六鹿元雄²、阿部智之³、阿部裕²、天野保希⁴、石原絹代⁵、大坂郁恵⁶、大野春香、大野雄一郎⁷、尾崎麻子⁸、柿原芳輝⁹、小林尚¹⁰、櫻木大志¹、柴田博¹¹、城野克広¹²、関戸晴子¹³、高坂典子¹⁴、竹中佑¹⁵、但馬吉保¹⁶、田中葵¹⁷、田中秀幸¹²、中西徹⁵、野村千枝⁸、羽石奈穂子¹⁸、早川雅人¹⁹、三浦俊彦²⁰、山口未来²、山田恭平²¹、渡辺一成¹⁹、佐藤恭子²

¹名古屋市衛生研究所、²国立医薬品食品衛生研究所、³(公社)日本食品衛生協会、⁴長野県環境保全研究所、⁵(一財)日本食品分析センター、⁶埼玉県衛生研究所、⁷(一財)千葉県薬剤師会検査センター、⁸(地独)大阪健康安全基盤研究所、⁹(一財)日本穀物検定協会、¹⁰(一財)食品分析開発センターSUNATEC、¹¹(一財)東京顕微鏡院、¹²(国研)産業技術総合研究所、¹³神奈川県衛生研究所、¹⁴(一財)食品薬品安全センター秦野研究所、¹⁵(一財)日本文化用品安全試験所、¹⁶(一財)食品環境検査協会、¹⁷(一社)日本海事検定協会、¹⁸(国研)産業技術総合研究所、¹⁸東京都健康安全研究センター、¹⁹(一財)化学研究評価機構、²⁰(一財)日本食品検査、²¹さいたま市健康科学研究センター
食品衛生学雑誌 59(1):64-71, 2018

へプタンで調製した試験溶液を用い、油脂および脂肪性食品用器具・容器包装の蒸発残留物試験における試験室間共同試験を行い、公定法と公定法変法の性能を評価した。試験には23機関が参加し、濃度非明示の試験溶液9種類の蒸発残留物量を測定した。蒸発乾固の際の加熱装置として水浴を用いた場合を公定法とし、ホットプレートを使用した場合、ならびに蒸発乾固前の減圧濃縮を省略した場合を公定法変法とした。ほとんどの試験機関では、蒸発乾固の際、

試験溶液を乾固直前まで加熱したのち、余熱で乾固させていた。その結果、加熱装置にかかわらず、両法の性能には大きな差はないことが判明した。それにより、公定法変法は公定法と同様に規格試験法として適用できると判断された。さらに、EUで擬似溶媒として用いられる95%エタノールおよびイソオクタンを浸出用液として用いた場合の性能についても検証したところ、それらの性能はへプタンとほぼ同等であった。

編集情報運営委員会

委員長 : 吉兼 博美 (研究監)
委員 : 岡元 裕幸 (総務課)
鈴木 裕子 (企画情報部)
中村 瑞那 (企画情報部・健康科学情報室)
齋藤 友睦 (生物学部・ウイルス研究室)
山田 和弘 (生物学部・細菌研究室)
長谷川晶子 (生物学部・医動物研究室)
戸塚 昌子 (衛生化学部・医薬食品研究室)
加藤 千佳 (衛生化学部・生活科学研究室)

愛知県衛生研究所報

第 69 号

平成 31(2019)年 3 月 発行

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7 番 6

愛知県衛生研究所

所長 皆川洋子

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

電話 : ダイヤルイン

所長 052-910-5604

次長 052-910-5683

研究監 052-910-5684

総務課 052-910-5618

企画情報部長
健康科学情報室 052-910-5619

生物学部長 052-910-5654

ウイルス研究室 052-910-5674

細菌研究室 052-910-5669

医動物研究室 052-910-5654

衛生化学部長 052-910-5638

医薬食品研究室 052-910-5639

生活科学研究室 052-910-5643

FAX : 052-913-3641

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

Published by

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

(この刊行物は再生紙を使用しています)